



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU

K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

269 196

(21) PV 3168-88.R
(22) Přihlášeno 11 05 88

(40) Zveřejněno 12 09 89
(45) Vydáno 15 03 91

(11)

(13) B1

(51) Int. Cl.⁴
A 61 K 35/32

(75)

Autor vynálezu

GALATÍK ANTONÍN ing., CSc., OTROKOVICE
KUBĚNA KAREL doc.MUDr., CSc., GOTTWALDOV
BLAŽEJ ANTON akademik, BRATISLAVA

(54)

Biokompatibilný kolagénový materiál a
spůsob jeho přípravy

(57) Riešenie sa týka sterilného biokompaktibilného kolagénového materiálu zloženého z jedného kolagénového typu, známeho pod označením typ I, obsahujúceho 2 odlišné polypeptidické reťazce $\alpha 1(I)/2$ a $\alpha 2$ priečne sieťované 1,5 až 8 väzbami na 1 mol kolagénu, pričom obsah nekolagénových bielkovín je najviac 0,5 % hmot. a obsah minerálnych látok menší než 0,5 % hmot., pričom prítomné ióny viacmocných kovov sú prevedené do neaktívnej formy chelátového komplexu. Kolagénový materiál neobsahuje žiadne bakteriostatické látky, ani cudzie modifikujúce skupiny, je mikrobiálne odolný a potláča rast mikroflóry vo vlhkom stave i za nestabilných podmienok. Postup prípravy vychádza z kolagénu šlachy, používa extrakciu medzivláknitých bielkovín a protelytické odbúranie nekryštalických terminálnych peptidov i konjugovaných proteoglykánov, spolu s regulovaným alkalickým štiepením priečných väzieb, čistenie od solí a rozpustných dusíkatých látok, vytvorenie jednotnej vláknitej štruktúry rozvláknením a separáciou nerozvláknitých podielov tlakovou filtráciou, obohatenie kolagénovej substancie o hyaluronát a prípadne ďalšie farmakologicky účinné zložky, ktoré možno pridať i pred vlastnou aplikáciou, ďalej vytváranie plošných vláknitých útvarov, rôzne tvarovaných dielcov, uzavretých a otvorených penových štruktúr vytváraných do formy, ktoré vyhovujú konkrétnym chirurgickým a ambulantným požiadavkám.

Vynález sa týka biokompatibilného kolagénového materiálu a spôsobu jeho prípravy.

Kolagén, dôležitá bielkovina väziva, kostí, chrupavky, kože a šliach, je už dlho používaná súčasť rôznych prípravkov a pomocných materiálov aplikovaných v zdravotníctve. Využívajú sa viaceré užitočné vlastnosti, ako je nízka imunogenita, pozvoľné samovoľné odbúranie metabolickou cestou, znášanlivosť v tkanivách a vhodné fyzikálno-mechanické vlastnosti, alebo dokonca i priamy terapeutický podporný účinok v niektorých patologických situáciách u väzivových štruktúr. Kolagénová hmota rôzne tvarovaná a s rôznym stupňom pórovitosti, obsahu vlhkosti alebo ďalších terapeuticky účinných látok sa používa na vytváranie drenáží, upohávk, podložiek, alebo výplní v chirurgii, alebo dokonca ako náhrada xenotransplátátov a rekonštrukčný materiál pri úrazoch a hlbokých patologických zmenách. (Chvapil, M., Kronenthal R.L., Van Winkle: Medical and surgical applications of collagen. Int. Rev. Connective Tissue Research, 1973, 6, 1-61; Yanas I.V., Burke J.F., Design of an artificial skin. J.Biomed.Mater.Res., 1980, 14, 65-81; Oliver R.F., Barker H., Cooke A., Grants R.A., Dermal Collagen implants, Biomaterials, 1982, 3, 38-40; Doillon C.J., Whyne C.F., Berg R.A., Olson R.M., Silver F.H., Fibroblast-collagen sponge interactions in vitro and in vivo, Scanning El.Microscopy, 1984, III, 1313-1320; Chvapil M., Collagen sponge: theory and practice of medical applications. J.Biomed. Material Res., 1977, 11, 721-741; Degalakis N., Flinck J., Stasikalis J.F., Burke J.F., Yannas I.V., Design of an artificial skin, part II: J.Biomed.Mater. Res., 1980, 14, 511-528.

Napriek tomu, že mnoho rokov bol rôznymi spôsobmi vyčistený kolagén považovaný za neimmunogenný materiál a ani dnes nie je považovaný za silný imunogén, predsa len hore uvedená literárna evidencia ukazuje, že výberu kolagénového zdroja a spôsobu jeho čistenia je potrebné venovať pozornosť i z tohto hľadiska. Ďalšie otázky, ktoré súvisia s dosiaľ nedoriešenými problémami spojenými s regulovaním rýchlosti odbúrania kolagénových implantátov presnejšou kontrolou stupňa zasieťovania pri výrobe kolagénovej substancie, s otázkou distribúcie kolagénových vlákien, nedostatočnou odlnosťou vlhkých kolagénových preparátov proti sekundárnej mikrobiologickej kontaminácii a v neposlednom rade tiež s vhodnou štruktúrou samontnej fibrilárnej hmoty pre špeciálne aplikácie, si vyžadovali nové riešenie.

Uvedené nevýhody rieši kolagénový materiál podľa vynálezu, ktorého podstata spočíva v tom, že pozostáva z jedného kolagénového typu (I) obsahujúceho dva odlišné polypeptidické reťazce $\alpha 1(I)/2$ a $\alpha 2$ prične zasieťované 1,5 až 8 väzbami na 1 mol kolagénu, pričom obsah nekolagénových bielkovín je najviac 0,5% hmot. vzťahnuté na kolagén, obsah vápnika neprevyšuje 1 mg/g kolagénu a obsah popola je najviac 0,5 % hmot., pričom kovové ióny sú vo forme chelátového komplexu. Takto pripravený kolagén na rozdiel od známych materiálov sa vyznačuje schopnosťou odolávať rastu mikroorganizmov i za vlhkých a nesterilných podmienok, bez použitia ďalších bakteriostatických prípravkov. Otázku kontroly doby zotrvania implantátu v tkanive príjemcu možno do určitej miery riešiť kontrolovaným stupňom zníženia pričného zasieťovania kolagénu účinkom alkalického prostredia počas určitej doby, pričom platí, že čím dlhšia je doba alkalického pôsobenia, tým kratšia je doba zotrvania implantátu, resp. rýchlejšie je jeho rozloženie fagocytosou a enzymatickými procesmi.

Podstata spôsobu prípravy uvedeného kolagénového materiálu spočíva v tom, že na kolagénové väzivo šliach sa posobí z 50 % nasýteným až nasýteným roztokom hydroxidu vápennatého najmenej trikrát za sebou, potom sa väzivo preperie vodou, neutralizuje vodným roztokom obsahujúcim 1 až 12 % hmot. chloridu alebo síranu amónneho alebo hydrogénsíranu sodného vzťahnuté na hmotnosť väziva, potom sa väzivo podrobí nekolagenolytickému účinku proteázy ako je pronáza, trypsin, chymotrypsin, pepsín, pancreatín alebo alkaláza pridanej v množstve odpovedajúcom 10 až 10 000 kazeinovým jednotkám na 1 g kolagénu pri teplote 20 až 37°C počas najmenej 20 minút, znova sa preperie vodou a preprané väzivo sa vystaví účinku komplexotvorného činidla, vybraného zo skupiny látok

ako je kyselina nitrilotrioctová, sodná soľ tejto kyseliny, kyselina etyléndiamino-tetraoctová alebo jej sodná soľ po dobu najmenej 30 minút a nakoniec sa kolagénová hmota preperie vodou.

Kolagénová hmota sa po okyselení na pH 2 až 4,5 môže rozomlieť a prefiltrovať cez tkaninový filter, prípadne sa okyselená kolagénová hmota po filtrácii vyzráža do vláknitej formy a znova premyje vodou. Vlákniť alebo gélovitá kolagénová hmota sa môže zmraziť pri teplote -90 až -60°C a potom vysušiť lyofilizáciou a sterilizovať pôsobením teploty vyššej ako 80°C alebo gama žiarením, prípadne sa pred zmrazením alebo počas mrazenia môže vystaviť pôsobeniu plynného alebo kvapalného oxidu uhličitého pod pretlakom 0,02 až 0,6 MPa.

Zabezpečenie homogenity kolagénového typu zabezpečuje voľba kolagénu šľachy, s výhodou achilovej, namiesto častejšie používaných kožných materiálov. Je známe, že kolagén je tvorený tyčinkovými polymérovými molekulami, zloženými z troch polypeptidických reťazcov, tzv. alfa reťazcov, ktoré sú navzájom navinuté do tvaru charakteristickej trojitej skrútkovice. Existencia a stabilita takejto štruktúry je podmienená prítomnosťou glycínu v každej tretej polohe a ku stabilite prispieva i relatívne veľký obsah aminokyselinových zvyškov, prolínu a hydroxyprolínu. V rôznych tkaninových štruktúrach sa nachádzajú odlišné, geneticky určené typy kolagénov. Počet všetkých známych typov sa stále zvyšuje, v súčasnosti poznáme 8 typových skupín, z ktorých sa väčšina ešte ďalej delí na jednotlivé členy typovej skupiny. Pokiaľ je väzivo v normálnej fyziologickej situácii, je prítomný len jeden z dvoch známych členov rodiny kolagénového typu I, teda kolagén, ktorý obsahuje dva odlišné polypeptidické reťazce $\alpha 1(I)$ a $\alpha 2$. Druhý člen tejto typovej skupiny, tzv. trimer a organizáciou $(\alpha 1(I))_3$ sa nachádza len v patologických podmienkach, alebo pri kultivácii in vitro v bunčných kultúrach, v nádoroch alebo nadmerne rastúcich tkanivách. Samotná voľba zdroja kolagénu však nemôže zabezpečiť problém imunologickej aktivity kolagénových preparátov, len ju zjednodušuje. I keď v mnohých prípadoch tvorba antigenov stimulovaná kolagénom nie je významná, v niektorých situáciách, pri celkovo zníženej imunologickej odolnosti príjemcu kolagénového implantátu, môže byť i mierne imunogenná schopnosť cudzieho materiálu nepriaznivý faktor. V týchto súvislostiach sa zvyčajne rozlišujú dve imunologické vlastnosti bielkovinových antigenov: antigenová špecifita/a imunogenicitá. Antigenicitá je termín používaný pre popis schopnosti bielkoviny reagovať s vylučovanými protilátkami, kým pod pojmom imunogenicitá rozumieme schopnosť bielkoviny stimulovať tvorbu protilátok. Immunochemické testy u kolagénov rôzneho pôvodu odkryli tri odlišné oblasti kolagénových molekúl, vyznačujúcich sa antigenicitou. Najdôležitejšia z týchto oblastí sa nachádza v terminálnom, C-koncovom telopeptide. Ďalšia antigenická oblasť je v strednej, helikálnej oblasti molekuly, ale táto je aktívna obzvlášť pri štrukturnej transformácii vedúcej ku zníženiu usporiadanosti, teda pri premene kolagénu na želatínovú modifikáciu. Aj v N-koncovom telopeptide a hlavne pre a pro -kolagénových peptidoch, odštiepaných pri biosyntéze, sa vyskytujú antigenické oblasti. Najdôležitejšie antigenické oblasti sú tie, ktoré sa nachádzajú v koncových peptidoch. Pretože tieto oblasti sú súčasne najcitlivejšie, ľahko sa odštiepujú proteínázami nekolagenolytickej povahy, existuje teda možnosť zníženia antigenicity kolagénových preparátov enzymatickou cestou. Táto možnosť sa využíva v spôsobe prípravy kolagénového materiálu podľa vynálezu. Na rozdiel od ostatných metód čistenia kolagénovej suroviny pri výrobe zdravotnícky vyhovujúceho materiálu, používa sa v čistiacej fáze krok založený na pôsobení pronázy, trypsinu, chymotrypsinu alebo pesinu a dôkladná extrakcia odštiepených peptidov i zostávajúcich enzýmov z vyčisteného materiálu. Pokiaľ ide o imunogenicitu, schopnosť indukovať tvorbu protilátok, potom dôvod tejto vlastnosti je dosiaľ nejasný. Niektorí pracovníci sa domnievajú, že príčina môže byť v heterogenite kolagénových typov, pretože imunogenná reakcia sa zvyšuje so stúpajúcim počtom kolagénových typov nachádzajúcich sa v testovanom kolagéne. Enzymatické štiepenie terminálnych oblastí imunoge-

nicitu neznižuje, rovnako ako pokles usporiadanosti v helikálnych oblastiach napr. v dôsledku tepelnej denaturácie. V súvislosti s prípravou bezpečných kolagénových implantátov je dôležité pozorovanie, že chemická modifikácia kolagénu často vedie ku výraznému zvýšeniu imunogenicity. Tak napr. acetylácia, pôsobenie hydroxylaminu, sukcinylácia, metylácia alebo iné modifikácie na vedľajších reťaziciach kyslých a bazických aminokyselín kolagénu premenia tento materiál na pomerne silný imunogén. To poukazuje na riziko, aké môže vyvolávať chemická modifikácia vedľajších reťazcov kolagénu, používaná často v postupoch prípravy kolagénových materiálov uvedených v odbornej literatúre (Oliver R.F., Barker H., Cooke A., Grands R.A., Dermal Collagen implants, Biomaterials, 1982, 3, 38-40). V spôsobe podľa vynálezu je rešpektovaná požiadavka čo najnižšej modifikácie natívnej kolagénovej molekuly za súčasného rešpektovania požiadavky čo najmenšieho počtu kolagénových typov. Na druhej strane takýto prístup vylučuje chemické úpravy, ktoré zabezpečujú inak nevyhnutnú mikrobiálnu odolnosť kolagénových derivátov vo vlhkom prostredí s možnosťou sekundárnej kontaminácie mikroorganizmami. Pri riešení problému bolo využité sistenie autorov, že dôkladné zbavenie kolagénu minerálnych látok, najmä vápnika a iných solí viacmocných kationov, vyvolá výraznú mikrobiálnu odolnosť i v neprítomnosti bakteriostatických látok, alebo aldehydickej modifikácie bazických skupín kolagénu, aké sú známe z dosiaľ uvádzaných postupov prípravy.

Inou výhodou riešenia podľa vynálezu je možnosť reprodukovateľnej regulácie stupňa prirodzeného priečneho zasietovania vyrábaných kolagénových derivátov, pomocou alkalického pomalého šiepenia zosiatovania. Takto je možné presne definovať najdôležitejšiu vlastnosť kolagénových substrátov, ktorá určuje rýchlosť metabolickej výmeny, alebo samovoľného odbúravania implantátov in vivo.

Posledná z výhod prípravy kolagénových materiálov podľa prihlášky vynálezu sa týka výroby kolagénových plien určených pre hemostatické a iné účely. Doteraz pripravované materiály tohto typu vychádzajú z kolagénovej hmoty nasiaknutej kyselinou alebo zásadou a jej mrazovej sublimácie za sníženého tlaku. Tieto hmoty majú štruktúru uzavretej peny, tj. jednotlivé dutinky hubovitej štruktúry sú navzájom oddelené tenkou stenou. Takáto štruktúra je vhodná vo väčšine prípadov, kedy materiál slúži pre účely upchávky, ale v niektorých aplikáciách je vyžadovaná schopnosť rýchleho nasávania terovej alebo fyziologickej kvapaliny alebo regulovateľná priepustnosť pre kvapaliny. Pre takéto účely možno použiť spôsob podľa vynálezu, založený na použití plynu rozpustného vo vodnej fáze, s výhodou oxidu uhličitého, ktorý sa pod tlakom rozpustí vo vlhkom kolagénovom polotovare pred jeho zarazením. V priebehu mrazovej lyofilizácie za zníženého tlaku, sa expandujúci plynom perforujú steny dutiniek v peně, takže vzniknutý výrobok má otvorenú štruktúru so schopnosťou nasávať a prepúšťať kvapaliny.

Príklad 1

1 kg očistenej hovädzej achillovej šľachy, zbavenej koncových častí a nakrájanej na kúsky približne 1 cm³ sa premyje vodou a extrahuje trikrát vždy 5 l roztoku obsahujúceho 100 g/l chloridu sodného za občasného miešania, vždy po dobu 24 hodín pri teplote 10°C. Extrahované šľachy sa premyjú destilovanou vodou dvakrát vždy po 5 l vody za miešania po dobu 4 hodín. Potom sa extrahujú trikrát po sebe s 50 % nasýteným roztokom hydroxidu vápenatého vždy po dobu 24 hodín pri teplote 10°C za občasného miešania. Pokiaľ je stupeň priečneho zasietovania stanovený z denaturačnej teploty kolagénu v 6 M roztoku močoviny vyšší, ako 4/mol, pokračuje sa v alkalickom pôsobení vo vymenenom roztoku hydroxidu vápenatého tak dlho, až sa stupeň kovalentného zasietovania zníži na túto hodnotu. Po alkalicknej modifikácii sa vykoná neutralizácia pôsobením 2 l roztoku síranu amonného o koncentrácii 25 g/l po dobu 12 hodín. Po dekantácii sa šľachy premyjú destilovanou vodou, dvakrát s 5 l premiešavajú 4 hodiny a potom sa v 10 l redestilovanej vody ponechajú 24 hodín pri 5°C. Kúsky šľachy sa potom rozmixujú vo vode pomocou mixéru s nerezovými nožmi pri teplote neprevyšujúcej 15°C. Zmes vlákien sa premyje trikrát destilovanou vodou a odvodní dekantáciou. Vlákna sa rozmieša v 2 l vody

o teplote 25°C , obsahujúcej 200 mg enzýmu Pronáza (použitý výrobok Pronase P reinat, produkt presne *Streptomyces griseus*, dodaný fy. Serva, Heidelberg, NSR) a mierne sa mieša po dobu 12 hodín. Potom sa vlákna dekantuje a opakovane päťkrát premýva rededilovanou vodou, vždy po dobu 5 hodín. Po poslednom praní voda ponechaná 24 hodín v styku s vlákninou nezníži svoju vodivosť o viac než 36 % a neobsahuje rozpustné bielkoviny detekovateľné ninhydrinom. Kolagénová vlákna sa potom okyseli kyselinou octovou na pH 3,6 a mixuje sa v napučanom stave pri 5°C po dobu 5 minút, potom sa pridá 20 mg chelatonu III na g kolagénu a neutralizuje pomocou zriedeného hydroxidu sodného na pH 7,0. Oddelené vlákna sa premýjú rededilovanou vodou, vždy 5 l po dobu 5 hodín trikrát a 5 l po dobu 24 hodín trikrát. Vlákna sa potom čiastočne odvodní odstredením a použije sa na výrobu kolagénových dielcov, ktoré sa sterilizujú gama žiarením.

Príklad 2

1 kg telacej achillovej šľachy, očistenej a zbavenej koncových častí úponov svaloviny sa premyje vodou, rozmixuje vo vodnom prostredí pomocou mixéru s nerezovými nožmi pri teplote nižšej ako 20°C a niekoľkokrát premyje destilovanou vodou. Vlákna sa extrahuje pomocou vodného roztoku chloridu sodného o koncentrácii 10 % hmot. pri obvyčajnej teplote, trikrát vždy 7 l extrakčného kúpela za miešania po dobu 24 hodín. Potom sa vlákna dekantuje v 10 l vody, odvodní odstredením a rozmiešava v 7 l nasýteného roztoku hydroxidu vápenatého. V tomto roztoku sa ponechá 48 hodín, potom sa odstredí a roztok hydroxidu sa vymení za nový. Za rovnakých podmienok sa alkalické pôsobenie ešte dvakrát opakuje, čím sa dosiahne hodnota pričného zasietovania, asi 5 väzieb na mol kolagénu. Táto hodnota závisí od druhu aplikácie pre ktorú je kolagénová hmota určená. Vlákna sa potom opakovane perie rededilovanou vodou až je pracia voda len mierne alkalická (pH je menšie ako 9,0) a neutralizuje sa roztokom chloridu amonného a hydrogensíranu sodného 1:1 pri celkovej koncentrácii 25 g/l po dobu 24 hodín. Neutralizovaný kolagén sa potom odvodní odstredením, premyje sa trikrát rededilovanou vodou a potom sa vloží do 3 l roztoku, obsahujúceho 5 g pankreatínu. Pri teplote 35°C sa zmes mieša po dobu 10 hodín, potom sa vlákna odstredí, trikrát premyje rededilovanou vodou a extrahuje 7 l rededilovanej vody, vždy po dobu 10 hodín, pri teplote 5°C . Extrakcia sa opakuje päťkrát, posledný extrakt už nedáva pozitívnu reakciu na dusíkaté látky ninhydrinovou kolorimetrickou metódou. Vlákna sa potom rozpýtli v 3 l roztoku obsahujúceho 1,5 g/l kyseliny nitrilotriacetovej a 5,5 g/l dvojsodnej soli kyseliny etylendiamintetraacetovej. Po 24 hodinách sa roztok dekantuje, päťkrát premyje 7 l rededilovanej vody po dobu 10 hodín. Posledná pracia voda po 24 hodinovej ekvilibracii s kolagénovou vlákninou nezvýši pôvodnú hodnotu svojej vodivosti o viac než 35 %. Vlákna je použiteľná na prípravu vláknitých kolagénových útvarov, alebo sa ďalej spracováva postupom vedúcim k prípravku tvoriacemu penu s dodaním kyseliny hyaluronovej a ďalších terapeuticky pôsobiacich látok. Pre tento účel sa vlákna najskôr okyseli kyselinou octovou na pH 3,8, ochladí na 5°C a pri tejto teplote mixuje nerezovými nožmi. Vzniknutá gelovitá hmota sa prefiltruje cez polyamidový sieťový filter o hustote $\delta k 100/\text{cm}^2$, neutralizuje zriedeným roztokom uhličitanu sodného a vylúčená vlákna sa odstredí. Vlákna sa potom premyje rededilovanou vodou, rozmieša v 7 l rededilovanej vody a ponechá pri 10°C 12 hodín. Po dekantácii sa pranie v 7 l vody ešte dvakrát zopakuje, až sa vodivosť rededilovanej vody už nemení o viac než 3 % z pôvodnej hodnoty. Takto pripravenú vlákninu možno použiť pre vytváranie vláknitých útvarov, kapilárnych trubičiek, rôznych dielcov a plošných útvarov určených pre zdravotnícke účely. Pred sušením, alebo lyofilizáciou do materiálu možno pridať potrebné množstvo hyaluronátu, antibiotík, imunodepresívne pôsobiacich látok a iných farmaceutických preparátov, podľa požiadaviek konkrétnej zdravotnej situácie. Tieto aktívne látky tiež možno pridať až pri zvlhčení suchého materiálu, alebo v prípade, že je požadovaná penová štruktúra, do kolagénového materiálu vo forme peny. V tomto prípade sa vlákna znovu okyseli kyselinou mravčou alebo octovou na pH 3,2 a ku vzniknutému gelu sa pridá roztok hyaluro-

nátu v množstve 1,5 % na hmotnosť suchého kolagénu. Do gélu možno pridať i ďalšie farmaceutické preparáty podľa požiadaviek lekára. Po zamiešaní a homogenizácii sa gel zmrazí a lyofilizuje za zníženého tlaku. Vzniknutý produkt má tvar uzavretej peny, z ktorej sa farmakologicky účinné látky vylučujú pomaly behom celého hojivého procesu. Vytvorený gel s prídavkom hyaluronátu možno použiť i pre prípravu otvorenej peny tak, že po ochladení na 5°C sa v uzavretej tlakovej nádobe nasýti plynným oxidom uhličitým a potom náhle zmrazí na teplotu nižšiu ako -40°C. Zmrazený materiál, prípadne vytvarovaný do požadovaného konečného stavu-tvaru sa podrobí mrazovej sublimácii za zníženého tlaku. Sterilizuje sa po vysušení v teplovzdušnom sterilizátore 30 minút pri 115°C. Takto sa získajú kolagénové útvary tvorené otvorenou penou a obsahujúce prípadne podporné farmaceutické preparáty, dodané buď pred zmrazením, alebo spolu s vlhčiacim fyziologickým roztokom, až pred vlastnou aplikáciou.

Kolagénový materiál podľa vynálezu môže nájsť široké uplatnenie hlavne v zdravotníctve. Nasiaknutý prídavkom kyseliny a vody vytvára gelovitú hmotu vysokej viskozity. Môže sa použiť ako nosič a sorbent farmakologicky účinných prípravkov a podporných látok v hojivom procese a k príprave umelej kože, xerotransplantátov a náhrad v očnej, cievnej a vnútornej chirurgii.

P R E D M E T V Y N Á L E Z U

1. Biokompatibilný kolagénový materiál vyznačujúci sa tým, že pozostáva z jedného kolagénového typu (I) obsahujúceho dva odlišné polypeptidické reťazce $\alpha 1(I)/2$ a $\alpha 2$, prične sietované 1,5 až 8 väzbami na 1 mol kolagénu, pričom obsah nekolagénových bielkovín je najviac 0,5 % hmot. vztiahnuté na kolagén, obsah vápnika neprevyšuje 1 mg/g kolagénu, obsah popola je najviac 0,5 % hmot. a kovové ióny sú vo forme chelátového komplexu.

2. Spôsob prípravy kolagénového materiálu podľa bodu 1 vychádzajúci z vyčistených a rozomletých zvieracích šliach vyznačujúci sa tým, že na kolagénové väzivo šliach sa pôsobí z 50 % nasýteným až nasýteným roztokom hydroxidu vápenatého najmenej trikrát za sebou, potom sa väzivo preperie vodou, neutralizuje vodným roztokom obsahujúcim 1 až 12 % hmot. chloridu alebo síranu amonného alebo hydrogénsíranu sodného vztiahnuté na hmotnosť väziva, potom sa väzivo podrobí nekolagénolytickému účinku proteázy ako je pronáza, trypsin, chymotrypsin, pepsín, pankreatidín alebo alkaláza pridanej v množstve odpovedajúcom 10 až 10 000 kazeinovým jednotkám na 1 g kolagénu pri teplote 20 až 37°C počas najmenej 20 minút, znova sa preperie vodou, preprané väzivo sa vystaví účinku komplexotvorného činidla vybraného zo skupiny látok ako je kyselina nitriolotrioctová, sodná soľ tejto kyseliny, kyselina etylóndiaaminotetraoctová alebo jej sodná soľ po dobu najmenej 30 minút a nakoniec sa kolagénová hmota preperie vodou.

3. Spôsob prípravy kolagénového materiálu podľa bodu 1 a 2 vyznačujúci sa tým, že kolagénová hmota sa po okyslení na pH 2 až 4,5 rozomelie a prefiltruje cez tkaninový filter.

4. Spôsob prípravy kolagénového materiálu podľa bodu 1 až 3 vyznačujúci sa tým, že okyslená kolagénová hmota sa po filtrácii neutralizáciou alebo pôsobením chloridu sodného vyzráža do vláknitej formy a znova sa premyje vodou.

5. Spôsob prípravy kolagénového materiálu podľa bodu 1 až 4 vyznačujúci sa tým, že vláknitá alebo gelovitá kolagénová hmota sa zmrazí pri teplote -10 až -60°C, vysuší lyofilizáciou a sterilizuje pôsobením teploty vyššej ako 80°C a/alebo gama žiarením.

6. Spôsob prípravy kolagénového materiálu podľa bodu 1 až 5 vyznačujúci sa tým, že na kolagénovú hmotu sa pred zmrazením alebo počas mrazenia pôsobí plynným alebo kvapalným oxidom uhličitým pod pretlakom 0,02 až 0,6 MPa.