



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2007 00766**

(22) Data de depozit: **07.11.2007**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **29.04.2011** BOPI nr. **4/2011**

(41) Data publicării cererii:
29.05.2009 BOPI nr. **5/2009**

(73) Titular:
• UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE
ASACHI" DIN IAȘI,
BD.PROF.D.MANGERON NR. 67, IAȘI, IS,
RO

(72) Inventatori:
• MAIER STELIAN SERGIU,
STR.GRĂDINARI, NR.23, BL.C3, SC.C,
ET.2, AP.21, IAȘI, IS, RO;

• BADEA NICOLAE, STR.ȘAPTE OAMENI
NR.22, IAȘI, IS, RO;
• MAIER VASILICA, STR. GRĂDINARI,
NR.23, BL.C3, SC.C, ET.2, AP.21, IAȘI, IS,
RO;
• PRUNEANU MELINDA,
STR.VASILE LUPU NR.83, BL.D1, SC.B,
ET.9, AP.33, IAȘI, IS, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
US 6548077 B1, 4294241;
KR 20020029859 A; JP 1124465 A

(54) **PROCEDEU PENTRU OBTINEREA SOLUȚIILOR COLOIDALE
DE ATELOCOLAGEN HIPOIMUNOGEN DE ÎNALTĂ
PURITATE**

(57) Rezumat:

Prezenta invenție se referă la un procedeu pentru obținerea soluțiilor coloidale de atelocolagen hipoimunogen de înaltă puritate, cu aplicabilitate în medicină, farmacie, biochimie. Procedeul conform invenției constă în aplicarea succesivă, conform unui flux parcurs integral sau parțial, a următoarelor etape de procesare interconținute: izolarea și preprocesarea surselor tisulare de colagen, solubilizarea hidrolitică a colagenului din sursele tisulare, purificarea soluțiilor coloidale obținute,

conferirea caracterului hipoimunogen formelor atelocolagenice prezente în soluțiile coloidale rezultate în urma purificării, ultrapurificarea soluțiilor coloidale atelocolagenice hipoimunogene și condiționarea finală a soluțiilor coloidale de atelocolagen hipoimunogen de înaltă puritate.

Revendicări: 25



Invenția se referă la un procedeu pentru obținerea soluțiilor coloidale de atelocolagen hipoimunogen de înaltă puritate, caracterizate prin aceea că prezintă concentrații ridicate de unități triplu-helicale, cvasi-native și minimal denaturate, precum și o polidispersitate redusă a caracteristicilor structurale și de reactivitate ale formelor colagenice pe care le conțin. Respectivul soluții sunt destinate aplicațiilor din ingineria tisulară, culturii celulare, obținerii substraturilor și structurilor utile în refacerea tisulară ghidată, tratării rănilor extinse și a arsurilor, realizării mediilor electice de biosinteză, obținerii biomaterialelor cu componentă scleroproteică, obținerii vehiculanților pentru specii farmaceutice, de interes biochimic și/sau a factorilor de modulare a activității celulare în țesuturi vii ori în substraturi artificiale, obținerii vectorilor în terapia genetică și/sau în producerea anticorpilor, precum și realizării surogatelor și substituenților matricei extracelulare, prin conjugare cu alți compuși macromoleculari naturali, ori cu (co)polimeri de sinteză. Toate clasele de aplicații citate impun utilizarea de forme colagenice cu edificii moleculare cât mai apropiate de starea nativă, dar lipsite de capacitatea de a induce reacții imunologice sau xeno-genice semnificative. Speciile triplu-helicale, obținute conform procedurii ce face obiectul prezentei invenții, îndeplinesc aceste condiții.

Dintre cele 28 de tipuri de collagen a căror existență a fost demonstrată până în anul 2006 (Khoshonoodi J., Cartailier J. P., Alvares K., Veis A., Hudson B. G., *Journal of Biological Chemistry*, 281 (50), 2006, p. 38117-38121), doar circa o pătrime și-au găsit aplicații practice, mai ales datorită dificultăților legate de izolarea lor în stare nealterată fizico-chimic (Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J. E. (editors), *Biomaterials Science. An Introduction to Materials in Medicine*, 1996, Academic Press, New York, cap. 2.7). Din literatura de specialitate și din cea de brevete, este cunoscut faptul că forme colagenice fibrilare apte utilizării în sfera biomedicală (în special aparținând tipurilor I, II și III) se pot obține prin clivarea și/sau detașarea acestora din matricea extracelulară a organelor alcătuite predominant din țesuturi conjunctive (piele, tendon, cartilaj, comee și sclerotică, os etc.) (Liu S. Q. - *Bioregenerative Engineering: Principles and Applications*, 2007, Wiley Interscience, Hoboken, New Jersey, cap. 4 și 24).

Clivarea unităților colagenice triplu-helicale se realizează prin extracție în soluții de electroliți slabi (acizi și săruri), obținându-se, cu randamente deosebit de reduse, forme native ale scleroproteinei (numite generic, în cazul speciilor fibrilare, macromolecule de tropocolagen), ori forme renaturabile prin procese fizico-chimice, care reformează macromolecule triplu-helicale, sau care conțin domenii triplu-helicale net evidențiabile. Tehnica clivării este însă fezabilă doar la nivel de laborator, ori la scară micropilot, oferind cantități reduse de tropocolagen din tipurile I, II, III, V și XI, ce sunt utilizate drept etalon analitic sau pentru studii asupra conformației spațiale și reactivității formelor colagenice fibrilare, dat fiind faptul că soluțiile rezultate prezintă o polidispersitate suficient de redusă și o reactivitate foarte apropiată de cea pe care collagenul fibrilar nativ o exprimă *in vivo*. Majoritatea tipurilor de collagen nefibrilar (de asociere fibrilară - tipurile IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, de ancorare - în special tipul VII, membranare - în special tipul IV, transmembranare - tipurile XIII și XVII, de multiplexare - tipurile XV, XVI, XVIII, microfibrilare - tipul VI, rețelare - tipurile VIII și X) se obțin, și ele, în stare nativă, prin tehnici de clivare/extracție protejată, fiind destinate mai ales studiilor științifice și nu aplicațiilor practice.

Cantități de forme colagenice suficiente, pentru a putea fi avute în vedere în aplicații practice, se obțin doar pe calea detașării din structurile fibrilare ale matricei extracelulare, prin tehnici echivalente solubilizării hidrolitice, mediată de specii chimice cu acțiune energică (electroliți, agenți liotropi și agenți chaotropi), sau de specii enzimatică. Principala deficiență a tehnicii solubilizării hidrolitice, imposibil de ocolit chiar și în cazul tratamentelor exclusiv

enzimatice, constă în variabilitatea largă a caracteristicilor formelor colagenice rezultate, concretizată mai ales într-o mare polidispersitate la nivelul structurii terțiare, care generează importante diferențe de spațialitate și masă moleculară, dar și la nivelul structurii catenelor aminoacidice laterale, soldată cu diferențe de reactivitate, comparativ cu scleroproteina nativă.

Atunci când își mențin spațialitatea triplu-helicală, formele colagenice rezultate în urma solubilizării hidrolitice poartă denumirea generică de atelocolagen, dat fiind faptul că porțiunile terminale, nehelicale, ale macromoleculei de tropocolagen, denumite telopeptide, au fost scindate hidrolitic, aceasta fiind singura modalitate prin care unitățile triplu-helicale pot fi detașate din agregatele fibrilare. În plus, mai ales în cazul solubilizării pornind de la țesuturi mature, o serie de punți de reticulare, ce stabilizează structura cuaternară a colagenului fibrilar, au fost și ele scindate hidrolitic. Din acest punct de vedere, solubilizarea hidrolitică a colagenului fibrilar, pornind de la țesuturi mature, poate fi considerată ca fiind un proces de dereticulare. Formele colagenice rezultate prin solubilizare hidrolitică protejată (fără intervenția temperaturii și presiunii ridicate, a pH-urilor extreme, ori a concentrațiilor mari de agenți liotropi), care își păstrează în mare măsură integritatea lanțurilor polipeptidice, dar care au pierdut structura triplu-helicală, poartă denumirea generică de eucolagen. Ele pot fi considerate gelatine cu mase moleculare ridicate, deoarece conferă viscozitate ridicată soluțiilor și, în plus, pot forma spontan hidrogeluri atunci când depășesc o concentrație limită (mai mică în comparație cu gelatinele clasice, din tipurile A și B).

Practic toate soluțiile de atelocolagen sunt impurificate, în măsură variabilă, dar ridicată, cu eucolagen. Alături de fracția eucolagenică, în soluțiile coloidale obținute prin solubilizare hidrolitică, se regăsesc și fragmente peptidice cu diverse mase moleculare, inclusiv tronsoanele telopeptidice scindate. Separarea avansată a speciilor atelocolagenice triplu-helicale, cvasi-native, de speciile divers alterate de eucolagen și de peptidele prezente în soluție, se poate realiza prin tehnici de fracționare a amestecurilor complexe, între care: precipitarea fracționată, separarea cromatografică preparativă, atacul enzimatic nespecific al formelor denaturate (Walker J. M. (editor), *The Proteomics Protocols Handbook*, 2005, Humana Press Inc., Totowa - New Jersey, cap. 11; Walker J. M. (editor), *The Protein Protocols Handbook*, Second Edition, 2002, Humana Press Inc., Totowa - New Jersey, cap. 82). De regulă, în urma aplicării tehnicilor de fracționare citate, rezultă soluții diluate, cu volum ridicat, dificil de postprocesat și/sau de stocat. De aceea, fracțiile cvasi-native sunt supuse, imediat după separare, unor operații de concentrare specifice speciilor proteice, care nu le alterează structural, compozițional și din punctul de vedere al reactivității. Între operațiile aplicabile volumelor mari de soluții atelocolagenice se citează: ultrafiltrarea, diafiltrarea, filtrarea prin curgere tangențială, centrifugarea în prezența gradientilor unor specii precipitante (Desai M. A. (editor), *Downstream Processing of Proteins. Methods and Protocols*, 2000, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, cap. 1, 3, 4, 5, 6). Deși separarea prin simplă precipitare este mai economică, ea nu asigură selectivitatea necesară, chiar și atunci când se repetă în condiții diferite (la temperaturi, pH-uri, tării ionice, compoziții diferite ale agenților de precipitare).

Atunci când macromoleculele de atelocolagen li s-au îndepărtat integral (sau suficient de „adânc”) telopeptidele, iar aceste catene polipeptidice nehelicale au fost eficient și complet înlăturate din soluții, se obțin forme de atelocolagen hipoimunogen. Dacă soluțiile acestor specii hipoimmunogene urmează a fi utilizate în aplicații grefabile la om, se impune și îndepărtarea avansată a glicoproteinelor și glicoz-amino-glicanilor, ce pot conduce la reacții inflamatorii ori alergice. Aceste specii polizaharidice sau cu conținut de polizaharide se îndepărtează prin hidroliză controlată, alcalină sau enzimatică.

Seria brevetelor ce au drept obiect obținerea formelor colagenice și atelocolagenice este relativ extinsă, abordând în special metode de inducere a solubilizării hidrolitice pe cale chimică (**US 4592864/1986**; **US 4983721/1991**) și enzimatică (**US 5316942/1994**; **EP 1270672/2003**), ori mixtă (spre exemplificare s-au selectat doar patru din multitudinea de brevete semnificative). Tehnicile brevetate până în acest moment reușesc eliminarea avansată a fracțiilor peptidice și a celor eucolagenice (**US 4294241/1981**, **US 6548077/2003**, **KR 2002-0029859**). Ele nu asigură însă certitudinea separării și reținerii speciilor triplu-helicale, ci oferă doar amestecuri ale acestora cu lanțuri polipeptidice detașate, integral sau parțial, din agregarea supramoleculară specifică stării native a collagenului. Acestea din urmă pot reforma cu dificultate, prin renaturare, structuri triplu-helicale, dar probabilitatea succesului acestui proces este redusă.

Certificarea stării native a collagenului extras ori solubilizat hidrolitic pornind de la surse tisulare mature este dificil de realizat și poate fi afectată de erori semnificative, datorate imposibilității standardizării respectivelor tehnici analitice. Până la ora actuală, există trei căi de stabilire a conținutului procentual de unități triplu-helicale în soluțiile coloidale, respectiv (i) prin tehnica dicroismului circular în ultravioletul îndepărtat, asociată sau nu cu alte tehnici spectrometrice (Shcheslavskiy V. I., Petrov G. I., Yakolev V. V., *Chemical Physics Letters*, 402, 2005, p. 170-174.), (ii) determinarea raportului între conținutul total de hidroxiprolină din soluție și conținutul aceluiași aminoacid în soluțiile tratate agresiv cu enzime nespecifice (**EP 1312383/2003**) și (iii) asocierea selectivă a coloranților direcți cu structurile triplu-helicale intacte și cvasi-intacte (metoda Hofman, ce utilizează Sirius Red F3BA) (Marotta M., Martino G., *Analytical Biochemistry*, 150 (1), 1985, p. 86-90) (cu exemplificarea utilizării în **WO 01/38396/2001**). Aceste tehnici sunt însă fie destinate exclusiv studiilor științifice (metoda (i)), fie prea costisitoare și, din acest motiv, acceptabile doar în aplicațiile la nivel de laborator (metoda (ii)), fie sunt intens și negativ afectate de prezența speciilor de atelocolagen denaturate (metoda (iii)).

Problema pe care o rezolvă invenția este legată de separarea cantitativă a formelor colagenice triplu-helicale cvasi-native, aparținând tipurilor I, II și III, prezente în soluțiile coloidale obținute prin solubilizare hidrolitică, pornind de la surse tisulare de collagen, cu eliminarea avansată a formelor colagenice denaturate, ori a căror structură terțiară a fost afectată parțial. Astfel, prezenta invenție soluționează problema separării avansate a formelor triplu-helicale din soluțiile de atelocolagen hipoimunogen, asigurând obținerea de soluții coloidale de înaltă puritate, libere de structuri terțiare parțial denaturate și de lanțuri polipeptidice independente.

Procedeul pentru obținerea soluțiilor coloidale de atelocolagen hipoimunogen de înaltă puritate, conform invenției, include:

- izolarea și preprocesarea unei surse tisulare de collagen,
- solubilizarea hidrolitică a collagenului din sursa tisulară în prezența unei enzime proteolitice sau a unui agent slab liotrop,
- purificarea soluției coloidale obținute prin solubilizarea hidrolitică,
- conferirea caracterului hipoimunogen prin tratarea cu papaină a soluțiilor atelocolagenice rezultate în urma purificării,
- ultrapurificarea soluțiilor coloidale atelocolagenice hipoimunogene utilizând pronaza, în prezența unor agenți cosmotropi și a unor amestecuri ternare ce conțin agenți de aglomerare macromoleculară,
- condiționarea finală a soluțiilor de atelocolagen hipoimunogen ultrapurificate prin diafiltrare contra unor soluții ce conțin agenți cosmotropi, inhibitori enzimatici și antibiotice,

RO 123256 B1

- conservarea și stocarea soluțiilor coloidale obținute în vase sterile închise ermetic, incluse la rândul lor în pungi din polietilenă în care se introduce o soluție alcoolică a unui agent antifungic, pungi ce se închid apoi sub vid.	1 3
În principiu, procedeul pentru obținerea soluțiilor coloidale de atelocolagen hipoimunogen de înaltă puritate, procedeu care face obiectul prezentei invenții, implică parcurgerea următoarelor etape (acolo unde nu se specifică în mod expres, operațiile se efectuează la temperatura ambientală, care nu va depăși însă plaja $15 \pm 25^\circ\text{C}$):	5 7
i. - prelevarea sursei tisulare de collagen matur, pornind de la organe sau structuri anatomice cu conținut ridicat de scleroproteine; această etapă include curățarea fizică și chimică a suprafețelor, secționarea primară, și spălarea cu soluții saline;	9
ii. - formarea de loturi cu mase egale, de circa $0,3 \pm 1$ kg, care vor parcurge apoi în paralel operațiile de solubilizare hidrolitică, purificare și ultrapurificare;	11
iii. - tratarea loturilor cu agenți de sterilizare generală, în vederea stopării activității microorganismelor prezente în eșantioanele de țesut; se utilizează antibiotice și/sau azidă de sodiu;	13 15
iv. - mărunțirea țesutului și defibrarea fizico-mecanică a acestuia; eșantioanele de țesut se congelează înaintea mărunțirii/defibrării, iar în cursul acestei operații se adaugă bucăți de gheață;	17
v. - îndepărtarea preliminară a componentelor necolagenice solubile în soluții saline, prin suspendarea țesutului mărunțit, de cel puțin trei ori, în soluție apoasă a unui amestec $3 \pm 9\%$ NaCl și $2 \pm 5\%$ Na_2SO_4 , la final aplicându-se o spălare abundentă cu apă deionizată;	19 21
vi. - inhibarea activității autolitice a enzimelor proprii țesutului, prin dozarea de inhibitori enzimatici generali; această etapă este opțională, fiind recomandată mai ales în cazul țesuturilor cu populație celulară însemnată numeric;	23
vii. - delipidarea structurilor tisulare defibrate mecanic, utilizând soluții de n-propanol; acesta induce și un efect de dezinfecție suplimentară;	25
viii. - afânarea structurilor tisulare defibrate mecanic, utilizând soluții de perhidrol;	27
ix. - îndepărtarea avansată a excesului de perhidrol, prin centrifugare și spălarea repetată, eventual în centrifugă, a structurilor tisulare defibrate mecanic;	29
x. - condiționarea structurilor tisulare în vederea solubilizării hidrolitice; această etapă se conduce diferențiat, în funcție de agentul de solubilizare; astfel, dacă solubilizarea se va realiza enzimatic utilizând pepsină (cea mai ieftină dintre enzimele proteolitice nespecifice), condiționarea constă în conferirea unei umflări acide limitate; dacă solubilizarea se va realiza utilizând acid acetic, condiționarea implică inducerea unei umflări alcaline controlate, utilizând baze energice, urmată de neutralizarea excesului de alcalii și spălarea cu soluții slab acide; în vederea solubilizării cu alte enzime decât pepsina, condiționarea prevede labilizarea avansată a structurilor colagenice utilizând clorhidrat de etilen-diamină, la pH slab alcalin ($8,2 \pm 9,5$), continuată cu corecția pH-ului la valoarea optimă pentru atacul enzimatic;	31 33 35 37
xi. - aplicarea solubilizării hidrolitice, în oricare dintre variantele ce utilizează enzime, cum ar fi pepsina, tripsina ori papaina, sau un agent slab liotrop, ionogen, așa cum este acidul acetic; la finalul acestei etape se obține soluția brută de atelocolagen; operația se efectuează în condiții de termostatare la $2 \pm 10^\circ\text{C}$;	39 41
xii. - separarea avansată a debriurilor tisulare, prin demicrofibrilare repetată și filtrarea soluției coloidale obținute; operația se efectuează la temperaturi de $10 \pm 15^\circ\text{C}$;	43
xiii. - precipitarea fracționată preliminară a varietăților de atelocolagen solubilizat, utilizând concentrații bine precizate, crescânde, de NaCl; se aplică cinci precipitări distincte, diferențiate prin adaosul de NaCl și prin valoarea pH-ului de lucru; (i) mai întâi cu 0,7 M NaCl, la pH 2,5, în vederea îndepărtării telopeptidelor și a fracțiilor polipeptidice hidrolizate	45 47

ori necolagenice; (ii) apoi cu 1,2 M NaCl, la pH 2,5, pentru separarea fracțiilor de collagen IV și V, reduse ca și participație în soluție, dar care incomodează în operațiile de purificare ulterioare; (iii) se continuă cu 1,76 M NaCl, la pH 7,5, pentru colectarea fracției de atelocolagen III; (iv) apoi cu 2,4 M NaCl, la pH 7,5, pentru colectarea fracției de atelocolagen I; (v) se încheie cu 4,5 M NaCl, la pH 7,5, pentru colectarea fracției de atelocolagen II; după fiecare precipitare se realizează centrifugări în vederea recuperării fracțiilor separate, iar creșterea concentrației de NaCl și eventualele corecții de pH se aplică, succesiv, supernatantului; fracția dominantă masic depinde de țesutul de la care s-a pornit; de regulă se colectează fracția de atelocolagen I, cea mai abundentă; toate operațiile se realizează în condiții de termostatare la $4 \pm 6^\circ\text{C}$;

xiv. - eliminarea conținutului de proteoglicani și glicoz-amino-glicani eventual prezenți în soluția atelocolagenică obținută pornind de la cartilaje; se realizează prin tratarea formelor colagenice cu o soluție concentrată de guanidină, în care s-a dozat o sare anti-chaotropă;

xv. - sterilizarea chimică energetică și hidroliza eventualelor urme de prioni și toxine bacteriene, se realizează prin tratament cu soluții puternic alcaline, capabile să hidrolizeze la rece ($4 \pm 6^\circ\text{C}$) speciile chimice potențial toxice și/sau patogene;

xvi. - condiționarea soluției de atelocolagen în vederea ultrapurificării vizează asigurarea condițiilor optime enzimelor cu acțiune hidrolitică extinsă asupra telopeptidelor; se realizează dozând activatori enzimatici specifici, agenți anti-chaotropi și specii puternic bactericide;

xvii. - ajustarea finală uniformă a porțiunilor terminale nehelicale prezente încă în macromoleculele de atelocolagen hipoimunogen, se realizează prin tratament enzimatic cu papaină, care este capabilă să elimine în întregime tronsoanele telopeptidice care conțin aminoacidul tirozină, ceea ce asigură caracterul hipoimunogen soluției de atelocolagen; porțiunile scindate de către papaină conțin însă și punțile covalente de intra-reticulare, ce stabilizează triplul helix (Sato K., Ebihara T., Adachi E., Kawashima S., Hattori S., *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (33), 2000, p. 25870-25875); în plus, papaina prezintă o activitate proteolitică remarcabilă chiar și la temperaturi coborâte (Stockell A., Smith E. L., *Journal of Biological Chemistry*, 227 (1), 1957, p. 1-26; Gul S., Mellor G. W., Thomas E. W., Brocklehurst K., *Biochemical Journal*, 396, 2006, p. 12-21; Ikada Y., *Tissue Engineering. Fundamentals and Applications*, 2006, Elsevier Ltd., London, cap. 1.2.1), condiție impusă de faptul că macromoleculele de atelocolagen hipoimunogen își pierd integritatea structurală (starea cvasi-nativă de triplu-helix) atunci când temperatura mediului apos crește peste $10 \pm 12^\circ\text{C}$, în absența cosmotropilor și/sau a agenților macromoleculari de „aglomerare”; la finalul acestei etape se obține soluția brută de atelocolagen hipoimunogen; conferirea caracterului hipoimunogen al soluției de atelocolagen utilizând papaină se realizează după o condiționare chimică cu cel puțin un agent cosmotrop, care poate fi un compus selectat dintre sărurile anorganice neutre prezente în seria Hofmeister, compușii organici neionizabili, cu mase moleculare mici și medii și săruri ale acestora din urmă cu contraioni anorganici din seria Hofmeister, și cu cel puțin un agent de aglomerare macromoleculară, care poate fi un compus selectat dintre speciile macromoleculare înalt solubile, dar neionogene, capabile să stabilizeze proteinele în starea lor nativă, de tipul polietilenglicolilor și polizaharidelor, acestea din urmă în stare naturală sau modificate chimic.

xviii. - eliminarea fracțiilor peptidice scindate, realizată prin diafiltrare utilizând membrane cu limita de trecere de 100 kDa (100.000 MWCO/NMWL); pe parcursul filtrării, volumul soluției de atelocolagen hipoimunogen se menține constant adăugând tampon TRIS/TRIS-clorhidrat cu pH-ul $7,3 \pm 7,5$, preparat utilizând apă deionizată și liberă de pirogeni (răcită la 10°C); în soluția tampon se dozează 50 mM/l $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și 0,01% azidă de sodiu, sau un alt antimicrobian;

xix. - rafinarea enzimatică a formelor atelocolagenice hipoimunogene vizează degradarea controlată a fracțiilor denaturate, a căror structură triplu-helicală a fost afectată chiar și doar parțial; se realizează utilizând produsul Pronase® (un amestec de circa zece enzime proteolitice extrase din culturi de <i>Streptomyces griseus</i> , cu o foarte largă specificitate, capabile să inducă degradări hidrolitice avansate ori chiar totale porțiunilor de catenă neimplicate în structuri spațial regulate, stabilizate cel puțin prin punți de hidrogen (Walker J. M. (editor), <i>The Protein Protocols Handbook</i> , Second Edition, 2002, Humana Press Inc., Totowa - New Jersey, cap. 82)); acest tratament enzimatic deosebit de energic poate conduce la atacuri hidrolitice haotice asupra triplului helix, diminuând sever randamentul procesului de ultrapurificare a soluțiilor de atelocolagen hipoimunogen; pentru controlul strict al acțiunii pronazei se impune lucrul în medii apoase „aglomerate” și în prezența unor agenți cosmotropi eficienți; agenții de „aglomerare” (<i>crowding agents</i>) utilizați în prezenta invenției sunt polietilenglicoli (PEG) și amestecurile de polietilenglicoli cu diverse mase moleculare; se preferă amestecuri ternare de polietilenglicoli cu mase moleculare mici, medii și mari, în proporții variabile, dar favorabile polietilenglicolilor cu mase moleculare medii; ca agenți cosmotropi se pot utiliza compuși selectați dintre sărurile anorganice neutre prezente în seria Hofmeister, compuși organici neionizabili, cu mase moleculare mici și medii și săruri ale acestora din urmă cu contraioni anorganici din seria Hofmeister; enzimele complexului Pronase® acționează eficient și la temperaturi reduse (Wieckowski E. U., Kokai-Kun J. F., McLane B. A., <i>Infection and Immunity</i> , 66 (12), 1998, p. 5897-5905), dar pentru a asigura cinetici suficient de rapide, în prezenta invenției se prevede lucrul cu cantități ridicate de pronază, de circa trei ori peste valorile uzuale (Helseth D. L., Veis A., <i>Journal of Biological Chemistry</i> , 256 (4), 1981, 7118-7128); la finalul acestei etape se obțin soluții coloidale pure de atelocolagen hipoimunogen, în care acesta din urmă este secundat doar de polipeptide scurte, ușor de îndepărtat prin diafiltrare;	1 3 5 7 9 11 13 15 17 19 21 23 25
xx. - condiționarea finală a soluției pure de atelocolagen hipoimunogen, are în vedere asigurarea condițiilor de stabilitate a edificiului triplu-helical al atelocolagenului hipoimunogen, precum și prevenirea atacului hidrolitic mediat de către microorganisme (bacterii și fungi); se realizează prin diafiltrare utilizând membrane cu limita de trecere de 100 kDa (100.000 MWCO/NMWL), urmată de reglarea tăriei ionice a soluției coloidale prin adaos de săruri; se impun și adaosuri de antimicrobieni și antioxidanți; pe parcursul operațiilor de condiționare, temperatura soluției se menține la maximum 10°C; ca agenți antimicrobieni se pot utiliza antibiotice cu spectru larg, de preferință active și împotriva micoplasmelor.	27 29 31 33
Prezenta invenție mai prezintă și o variantă suficient de expeditivă și de exactă pentru determinarea conținutului procentual de atelocolagen triplu helical din soluțiile coloidale obținute prin procedeul brevetat. Conform prezentei invenții, stabilirea concentrației de forme triplu-helicale cvasi-native în soluția atelocolagenică hipoimunogenă de înaltă puritate, precum și în oricare dintre soluțiile coloidale rezultate pe parcursul procesării, se realizează pornind de la cantitățile de azot proteic în soluția supusă determinării și respectiv în cea rezultată după îndepărtarea entităților proteice atacate de tripsină, din soluția supusă determinării.	35 37 39 41
Soluția de atelocolagen hipoimunogen de înaltă puritate, obținută conform descrierii din prezenta invenție, își menține neschimbate caracteristicile timp de cel puțin un an, dacă este stocată la $4 \pm 8^\circ\text{C}$, în condiții sterile, la întuneric și în absența vibrațiilor ori șocurilor mecanice.	43 45
Procedeul de obținere a soluțiilor coloidale de atelocolagen hipoimunogen de înaltă puritate, conform prezentei invenții, prezintă următoarele avantaje:	47
- asigură concentrații ale formelor atelocolagenice triplu-helicale cvasi-native de peste 95% în soluția finală; valorile medii obținute uzual sunt de $97 \pm 1,8\%$;	49

RO 123256 B1

1 - asigură randamente masice de peste 25%, calculate raportând substanța proteică
a soluției finale la substanța proteică a sursei colagenice (țesutul conjunctiv de la care se
3 pornește); valorile medii uzuale ale randamentului masic al procedeului sunt de $28 \pm 2,2\%$;
- asigură eliminarea fracțiilor proteice, polizaharidice și lipidice prezente în țesutul de
5 start;
- asigură eliminarea efectelor cito-toxice ale componentelor soluției finale, făcând-o
7 aptă utilizărilor în ingineria tisulară și în medicina regenerativă;
- asigură eliminarea efectelor imunogene, patogene și inflamatorii ale soluției finale,
9 făcând-o aptă utilizărilor bio-medicale;
- asigură menținerea caracteristicilor formelor atelocolagenice triplu-helicale cvasi-
11 native pe o durată de cel puțin un an, în condiții adecvate de stocare;
- la diluțiile finale și în urma condiționării finale, formele atelocolagenice triplu-helicale
13 cvasi-native nu prezintă tendință de asociere supramoleculară în soluție, asociere ce s-ar
solda cu separarea de entități proteice la scară coloidală ori la mezo-scară și care ar afecta
15 gradul de polidispersitate al soluției coloidale;
- permite obținerea de produse colagenice și atelocolagenice cu diferite grade de
17 puritate prin simpla parcurgere parțială a fluxului operațiilor;
- toate produsele și subprodusele colagenice și atelocolagenice obținute prin
19 parcurgerea parțială a fluxului sunt apte utilizărilor tehnice ($12 \pm 4,7\%$ participatie la
randamentul total), cosmetice ($14 \pm 1,3\%$ participatie la randamentul total), farmaceutice și
21 biomedicale ($46 \pm 1,9\%$ participatie la randamentul total);
- subprodusele cu aplicații tehnice sunt reprezentate de hidrolizatele proteice; cele
23 cu aplicații cosmetice sunt reprezentate de fracțiile de collagen și atelocolagen recuperate
în urma precipitărilor și/sau filtrărilor ce separă tipurile de collagen prezente în sursa
25 colagenică, precum și de fracțiile eucolagenice; subprodusele cu aplicații farmaceutice și
biomedicale sunt reprezentate de fracțiile atelocolagenice cu diverse grade de purificare, ori
27 divers condiționate.

În continuare se prezintă exemple de aplicare a procedeului conform invenției.

Descrierile ce urmează au titlu exemplificativ din următoarele puncte de vedere:

29 - sursa colagenică (organul, structura anatomică, țesutul de start);
31 - tipul de collagen vizat a se solubiliza (I, II, III);
- natura și cantitățile de specii chimice (reactivi și/sau adjuvanți) utilizate;
33 - parametrii de operare (timpi, temperaturi, pH-uri, regimuri hidrodinamice ale agitării,
condiții de precipitare, centrifugare, filtrare/diafiltrare, dializă, rapoartele de amestecare,
35 modul de maturare, regimurile de termostatare);
- ordinea, cadența, repetarea proceselor și operațiilor din fluxul de procesare.

37 Toate elementele enumerate admit variații ce țin de alegerea și preprocesarea
surselor colagenice, de seriile de specii chimice utilizate (similare acțiunii, rolului și eficacității
39 în raport cu cele incluse în descrierile exemplificative) și de plajele uzuale de lucru.

Exemplele vizează procesarea la nivel semiindustrial și industrial a surselor
41 colagenice. Pentru asigurarea fezabilității procesării acestora, loturile medii sunt de $60 \div 120$
kg per șarjă, în cazul pieilor și de $40 \div 80$ kg per șarjă, în cazul tendoanelor și cartilajelor.
43 Pentru lucrul la nivel pilot, loturile medii vor reprezenta a patra parte, iar pentru lucrul la nivel
de laborator, acestea vor reprezenta a douăzecea parte.

45 **Exemplul 1. Obținerea soluțiilor coloidale de atelocolagen I hipoimunogen**

Exemplul 1.1. Fluxul operațiilor preliminar

47 Se pornește de la piei de vițel nou născut, având masa, după jupuire, de circa 6 kg.
Acestea se supun spălării cu flotă de 200% soluție de sare industrială, cu densitatea de
49 $1,025 \pm 1,050$ g/ml, la $16 \div 25^\circ\text{C}$, timp de $30 \div 60$ min, prin agitare în butoi tăbăcăresc din
oțel inoxidabil. După scurgerea flotei, pielea se agită la sec timp de $10 \div 15$ min. În
51 continuare, se îndepărtează aderențele și fasciile hipodermice prin procedeul ștrecurii și
șervirii tăbăcărești.

RO 123256 B1

1.1. A. Pielea se supune depărării enzimatică prin procedee tăbăcărești, aplicând mai întâi o labilizare a învelișului pilos (utilizând reducători) și apoi tratamentul enzimatic propriu-zis. La final se individualizează porțiunile de interes tăbăcăresc (crupon, poale, gât), care se regularizează prin operația tăbăcărească de ștuțuire a marginilor.

1.1. B. Pielea se secționează, individualizând porțiunile de interes tăbăcăresc (crupon, poale, gât). Porțiunile marginale ale acestora se regularizează prin operația tăbăcărească de ștuțuire. Porțiunile de poale și gât se prelucrează în continuare conform subexemplului 1.1.A. Porțiunea cruponului se fixează în stare întinsă, părul se tunde uniform, iar apoi firele scurtate se rad utilizând lame metalice bine ascuțite. Cruponul se re-ștrechiește și apoi se despică prin operația tăbăcărească de șpăltuire, individualizând stratul central (cel al învelișului pilos și cel învecinat hipodermei se îndepărtează, putând fi utilizate în vederea obținerii de hidrolizate colagenice).

1.1. C. Porțiunile de crupon obținute aplicând subexemplele 1.1.A și 1.1.B se secționează sub forma unor pătrate cu latura de aproximativ 10 cm, formând apoi loturi de câte un kg; acestea se spală de două ori, câte 30 ÷ 60 min, în flote saline de 100% (densitatea 1,025 ± 1,050 g/ml), se clătesc în două flote de 200%, iar apoi se mențin timp de 6 ÷ 12 h în flotă de 150% apă deionizată, cu adaos de 0,3 ÷ 0,5 g/l antibiotic de uz veterinar, la temperaturi de 6 ÷ 10°C. Opțional, dar mai ales dacă pieile au urmat prelucrarea conform subexemplului 1.1.B, în flota de stocare se adaugă 0,01% azidă de sodiu. Dacă pieile au fost prelucrate conform subexemplului 1.1.A, se aplică 3 ÷ 6 clătiri cu flote de 200% apă deionizată având temperatura de 20 ÷ 25°C, până la îndepărtarea avansată a tensioactivilor anterior utilizați. La final, loturile de piele se scurg prin presare și se congelează la -15 ÷ -18°C, în condiții sterile (incluse în pungi din polietilenă în care s-au introdus mici cantități din soluția unui antibiotic de uz veterinar), menținându-se în stare congelată 24 ÷ 72 h. În vederea defibrării mecanice, loturile de piele congelată se lasă la temperatura ambientală timp de 1 ÷ 3 h, după care se mărunțesc prin măcinare, adăugând bucăți de gheață în utilaj. Măcinătura se suspendă apoi succesiv, de trei ori câte 2 ÷ 5 h, în flote de 200% apă deionizată cu adaos de 3 ÷ 9% NaCl și 2 ÷ 5% Na₂SO₄, la temperatura ambiantă. În continuare măcinătura se spală abundent, pe filtru metalic, cu apă deionizată, parțial recirculată (raportul de recirculare fiind de 60 ÷ 80%). În continuare, măcinătura se suspendă, timp de 1 ÷ 5 h în flotă 150% apă deionizată cu adaos de 2 ÷ 6 ml/l amoniac soluție și 0,6 ÷ 2,0% EDTA, sub agitare energică. La final, măcinătura se spală abundent, pe filtru metalic, cu apă deionizată, parțial recirculată (raportul de recirculare fiind de 60 ÷ 80%), până la readucerea pH-ului la neutru. În continuare, măcinătura se centrifughează și se spală în centrifugă cu apă caldă (25 ÷ 35°C). Măcinătura încălzită se tratează, de trei ori câte o oră, cu soluție caldă (25 ÷ 35°C) de 5 ÷ 15% n-propanol, cu pH-ul tamponat la 6,0 ÷ 6,8. După spălarea timp de trei ore cu apă deionizată, conținând doar sistemul tampon, măcinătura se tratează încă de trei ori, câte trei ore, cu soluție rece (2 ÷ 10°C) de 20 ÷ 50% n-propanol, cu pH-ul tamponat la 6,0 ÷ 6,8. După fiecare tratament cu n-propanol, la rece, se aplică spălări ale măcinăturii cu soluție tampon, la aceeași temperatură. În continuare măcinătura se suspendă în soluție rece (2 ÷ 10°C) de perhidrol 2 ÷ 8%, menținându-se sub termostatare și agitare lentă timp de 6 ÷ 36 h, în funcție de natura sursei tisulare de collagen. La final, măcinătura se supune centrifugării și spălării abundente, în centrifugă, cu apă deionizată rece (2 ÷ 10°C). Apa de spălare se poate recircula parțial (raportul de recirculare fiind de 60 ÷ 80%). După îndepărtarea completă a urmelor de perhidrol, măcinătura afânată se zvântă în centrifugă.

Exemplul 1.2. Fluxul operațiilor de solubilizare hidrolitică a collagenului

În continuare, măcinătura provenită din loturile de piele inițiale, prelucrată conform subexemplului 1.1.C, se procesează după proceduri diferențiate, în funcție de natura agentului de solubilizare hidrolitică.

1.2. A. Dacă solubilizarea hidrolitică se va realiza prin tratament cu pepsină, măcinătura se spală pe filtru metalic cu soluție de HCl în apă deionizată, având pH-ul de 2,2 ÷ 3,5 și temperatura de 2 ÷ 10°C, timp de 5 ÷ 30 min, cu recircularea integrală a apei acide și eventuala corecție de pH.

1.2. B. Dacă solubilizarea hidrolitică se va realiza utilizând enzime cu acțiune optimă în mediu neutru sau slab alcalin (cele mai accesibile fiind tripsina și papaina), măcinătura se suspendă în 400% soluție 0,8 ÷ 1,2 M clorhidrat de etilen-diamină în apă deionizată rece (2 ÷ 10°C), cu adaos de 20 ÷ 40% NaCl, sub agitare lentă, timp de 2 ÷ 10 h, în funcție de natura sursei colagenice. La final, măcinătura se spală abundant pe filtru metalic, cu apă rece (2 ÷ 10°C) recirculată în proporție de 75 ÷ 95%, în care se adaugă soluție 30% acetat de sodiu.

1.2. C. Dacă solubilizarea hidrolitică se va realiza utilizând acid acetic, măcinătura se suspendă în 200% soluție salină obținută dizolvând în apă deionizată următoarele specii chimice: 20 ÷ 40% NaCl, 10 ÷ 25% Na₂SO₄, 3 ÷ 8% p-hidroxi-benzoat de metil, 2 ÷ 5% ZnCl₂, la temperatura de 2 ÷ 10°C, timp de 1 ÷ 6 h. În continuare, în flotă se adaugă, în fir subțire, soluție 40% NaOH până la atingerea unei concentrații echivalente cu 10% raportat la volumul flotei. Măcinătura se agită lent în flota alcalină, în regim termostatat, timp de 6 ÷ 12 h. La final, măcinătura moderat umflată se separă pe filtru metalic și se spală, pe același filtru, mai întâi cu apă deionizată rece (2 ÷ 10°C), iar apoi cu soluție 3 ÷ 8% HCl, rece și ea. Soluția acidă de spălare se poate recircula parțial (la un raport de recirculare de 75 ÷ 95%), cu corecția pH-ului, atunci când este necesar, până la îndepărtarea alcalinității din măcinătura. La final, soluția acidă se reține în vederea separării fracțiilor colagenice hidrolizate.

1.2. D. În vederea solubilizării hidrolitice a colagenului I, utilizând papaină, măcinătura se împarte în loturi de câte 300 g și se introduce în săculeți din sită filtrantă de nylon. Săculeții umpluți se introduc într-un utilaj tip „butoi tăbăcăresc” din oțel inoxidabil, sterilizat în prealabil la interior și în regiunea capacului. Se adaugă 300 ÷ 500% flotă cu pH-ul reglat în plaja 2,2 ÷ 3,2 utilizând HCl și se termostatează la 25 ÷ 35°C, sub agitare lentă. Pentru asigurarea sterilității pe durata procesului de solubilizare, în flotă se dozează 0,01% azidă de sodiu. Înainte de a fi montat, capacul și zona sa de închidere se spală cu soluție 0,03% azidă de sodiu. După ce temperatura flotei s-a stabilizat, în utilaj se adaugă o suspensie acidă (pH 2,2 ÷ 2,8 realizat cu HCl, în apă deionizată) obținută prin ampastarea și apoi diluarea a 60 ÷ 80 g pepsină pulverulentă per 100 ml. Cantitatea de suspensie dozată se calculează astfel încât să asigure în flota de solubilizare o concentrație de 14 ÷ 22%. Săculeții cu măcinătura se agită lent în flota enzimatică timp de 6 ÷ 18 h, la temperatura de 15 ÷ 35°C. În funcție de creșterea viscozității flotei de solubilizare, aceasta se poate schimba de trei până la cinci ori. Pentru fiecare cantitate de soluție colagenică prelevată din utilaj, se determină conținutul de substanță uscată, conținutul de substanțe minerale, conținutul total de azot și conținutul de specii triplu-helicale cvasi-native. De regulă, prima cantitate prelevată se orientează spre alte aplicații. Doar cele ce urmează se reunesc și se vor procesa în continuare în vederea obținerii formelor atelocolagenice hipoimunogene de înaltă puritate.

1.2. E. În vederea solubilizării hidrolitice utilizând enzime cu activitate proteolitică optimă în mediu neutru sau slab alcalin, loturile de măcinătură se pregătesc după tehnica descrisă la subexemplul 1.2.D. Condițiile de lucru sunt de asemenea aceleași (utilaj, pregătirea utilajului, raport de flotă, temperatură, durate, regimul agitării). Flota se aduce în plaja optimă de acțiune a enzimei. Suspensia de enzimă se prepară utilizând apă deionizată. Soluțiile se prelevă și se caracterizează după aceleași reguli.

1.2.F. În vederea solubilizării liotrope utilizând acidul acetic, loturile de măcinătură se pregătesc după tehnica descrisă la subexemplul 1.2.D. Condițiile de lucru sunt de asemenea aceleași (utilaj, pregătirea utilajului, raport de flotă, temperatură, durate, regimul agitării).

RO 123256 B1

Flota se prepară pornind de la apă deionizată, prin adaos de acid acetic glacial, sub agitare, până la atingerea unui pH stabil cuprins între 3,2 și 3,5 unități. În flotă se dozează, în loc de azidă de sodiu, 0,2 ÷ 0,5% sulfat de gentamicină. Soluțiile se prelevă și se caracterizează după aceleași reguli.

Exemplul 1.3. Fluxul operațiilor de purificare a soluției coloidale de atelocolagen

Soluția coloidală brută, obținută în urma reunirii cantităților prelevate din utilajul în care s-a efectuat solubilizarea, se supune purificării prin tratamente fizico-chimice. În urma operațiilor de purificare se obține soluția coloidală de atelocolagen.

1.3. A. Soluția coloidală brută se termostatează la $10 \pm 15^\circ\text{C}$, după care se filtrează prin trecerea de 20 ÷ 50 ori prin site filtrante cu 40 ± 60 ochiuri/cm². După îndepărtarea debriurilor tisulare grosiere, soluția coloidală brută se laminează trecând-o de 5 ÷ 30 ori, sub presiune, prin sisteme filtrante cu porozitatea de $180 \pm 250 \mu$. În continuare, soluția se lasă spre maturare timp de 16 ÷ 36 h, în vase și incinte sterile, la temperatura de $2 \pm 10^\circ\text{C}$. Încă rece, soluția se trece apoi de 5 ÷ 30 ori, sub presiune, prin sisteme filtrante cu porozitatea de $20 \pm 50 \mu$, în vederea demicrofibrilării. La final, soluția se lasă spre maturare timp de 16 ÷ 36 h, în vase și incinte sterile, la temperatura de $2 \pm 10^\circ\text{C}$.

1.3. B. Soluția coloidală eliberată de debriuri tisulare și de orice alte impurități fizice se termostatează la $4 \pm 6^\circ\text{C}$ și se aduce la pH $2,5 \pm 0,3$, prin adaos de soluție 15 ÷ 25% HCl în apă deionizată. Utilizând o soluție de 330 g/l NaCl în apă deionizată, în soluția coloidală se dozează, sub agitare eficientă, o cantitate echivalentă cu $0,7 \pm 0,02$ M NaCl. După circa 30 ÷ 60 min de la încheierea dozării saramurei, suspensia formată, răcită la $4 \pm 6^\circ\text{C}$, se supune centrifugării la 7.000 g, cu separarea fracției proteice sedimentate. Sedimentul se înlătură și se poate utiliza în vederea recuperării fracțiilor telopeptidice și/sau oligopeptidice. pH-ul supernatantului se corectează, dacă este cazul, la $2,5 \pm 0,3$, după care, prin aceeași procedură, i se adaugă o cantitate de NaCl echivalentă cu $1,2 \pm 0,05$ M. După aceeași perioadă de maturare a precipitatului, suspensia formată se supune centrifugării la 7.000 g, cu separarea fracției proteice sedimentate. Din sediment se pot recupera fracțiile de collagen IV și V. pH-ul supernatantului se reglează la $7,5 \pm 0,1$, după care, prin aceeași procedură, i se adaugă o cantitate de NaCl echivalentă cu $1,75 \pm 0,02$ M. După aceeași perioadă de maturare a precipitatului, suspensia formată se supune centrifugării la 7.000 g, cu separarea fracției proteice sedimentate. Din sediment se poate recupera fracția de collagen III. pH-ul supernatantului se corectează, dacă este cazul, la $7,5 \pm 0,1$, după care, prin aceeași procedură, i se adaugă o cantitate de NaCl necesară pentru a atinge o concentrație echivalentă cu $2,4 \pm 0,05$ M. După 30 ÷ 60 min, suspensia răcită la $4 \pm 6^\circ\text{C}$ se supune centrifugării la 7.000 g, cu separarea fracției proteice sedimentate. Respectivul sediment, ce conține fracția de atelocolagen I, se va supune în continuare operațiilor de purificare și apoi ultra-purificare. pH-ul supernatantului se reglează la $7,5 \pm 0,1$, după care, prin aceeași procedură, i se adaugă o cantitate de NaCl echivalentă cu $4,5 \pm 0,02$ M. După aceeași perioadă de maturare a precipitatului, suspensia formată se supune centrifugării la 7.000 g, cu separarea fracției proteice sedimentate. Din sediment se poate recupera fracția de collagen II.

1.3. C. Sedimentul de atelocolagen I se resuspendă în soluție 0,1 M NaOH, preparată cu apă deionizată având temperatura de $4 \pm 6^\circ\text{C}$, pentru a forma, sub agitare eficientă, o soluție coloidală cu concentrația de 16 ÷ 25 g/l proteină. În soluție se adaugă o cantitate de EDTA echivalentă cu $0,05 \pm 0,15$ M/l. Sub termostatare, agitarea eficientă se menține timp de 30 ÷ 150 min, evitând incorporarea de bule de aer în soluția vâscoasă. La final, soluția se neutralizează lent, prin adăugarea, în picături, la început, și apoi în fir subțire, a unei soluții de $0,6 \pm 0,05$ M HCl. După atingerea neutralității, soluția se aduce lent la pH $2,5 \pm 0,3$, prin adaos de soluție 0,2 M HCl în apă deionizată. Soluția acidifiată se termostatează la $4 \pm 6^\circ\text{C}$ și se menține sub agitare alte 20 ÷ 60 min, efectuând eventuale corecții de pH. În

RO 123256 B1

continuare, se adaugă soluție de NaCl cu concentrația de 330 g/l, într-un volum egal cu o treime din volumul soluției de atelocolagen I acidulată. Precipitatul format se menține, spre maturare, timp de 6 ÷ 18 h, la 10 ÷ 15°C, după care se centrifughează la 7.000 g, recuperând sedimentul. Acesta din urmă se resuspendă în soluție de acid acetic cu pH-ul 3,0 ÷ 3,5 și temperatura de 4 ÷ 12°C, sub agitare eficientă. Soluția obținută se supune diafiltrării prin sisteme cu membrane având limita de trecere de 100 kDa, menținându-i permanent volumul constant, prin adăugare de soluție de acid acetic cu pH 3,0 ÷ 3,5, preparată utilizând apă deionizată liberă de pirogeni. Volumul de soluție de acid acetic adăugată va fi dublul până la triplul volumului inițial al soluției de atelocolagen supus diafiltrării. După diafiltrare, soluția se menține, spre maturare, timp de 12 ÷ 72 h, la 4 ÷ 12°C, în vase și în incinte sterile.

Exemplul 2. *Purificarea și ultrapurificarea soluțiilor coloidale de atelocolagen I hipoimunogen*

Exemplul 2.1. *Condiționarea soluției de atelocolagen I în vederea ultrapurificării*

Soluția coloidală de atelocolagen tip I, rezultată la finalul operațiilor reunite în exemplul 1, se supune precipitării cu soluție rece (2 ÷ 6°C) de 330 g/l NaCl dizolvată în apă deionizată liberă de pirogeni. Procedura generală de precipitare și separare a precipitatului este similară celei prezentate în subexemplul 1.3.C. Precipitatul se resuspendă în soluție 1 M NaCl preparată cu apă deionizată liberă de pirogeni având temperatura de 2 ÷ 6°C, la care se adaugă 0,01% azidă de sodiu, 2÷12 mM/l tioglicolat de amoniu și 80 ÷ 240 ml/l polietilenglicol cu masa moleculară medie de 600 Da, sterilizat anterior prin încălzire, în condiții etanșe, la 115°C, timp de o oră. Soluția coloidală obținută se supune filtrării prin sisteme filtrante cu porozitatea de 180 ÷ 250 μ, după care se supune dializei față de o soluție cu pH 6,0 ÷ 6,5, ce are același conținut de specii chimice (exceptându-le pe cele proteice), timp de 18 ÷ 72 h, sub controlul variațiilor conductivității și în condiții de termostatare la 2 ÷ 6°C. În continuare, sub agitare lentă soluția coloidală se lasă să ajungă la temperatura ambiantă, după care se aduce la 30 ÷ 36°C, prin încălzire cu o pantă de 0,2 ÷ 0,3°C/min, menținând apoi temperatura constantă timp de 30 ÷ 120 min.

Exemplul 2.2. *Conferirea caracterului hipoimunogen soluției de atelocolagen I*

Sub agitare lentă, soluției coloidale condiționate i se adaugă 1 ÷ 2,5 g/l papaină sub formă de soluție în apă deionizată liberă de pirogeni, cu temperatura de 15 ÷ 25°C. Dozarea soluției de papaină se realizează prin picurare. După încheierea dozării, soluția coloidală se aduce și se menține, la 6 ÷ 10°C, sub agitare lentă, timp de 8 ÷ 18 h, după care se adaugă 0,2 ÷ 1,5 ml/l perhidrol 32% și se continuă agitarea timp de alte 60 ÷ 90 min. La final, soluția coloidală se termostatează la 4 ÷ 6°C și se supune diafiltrării în sisteme cu membrane având limita de trecere de 100 kDa. Pe durata acestui proces, volumul soluției coloidale se menține constant, adăugând tampon TRIS/TRIS-HCl cu pH-ul 7,3 ÷ 7,5, preparat utilizând apă deionizată liberă de pirogeni. În soluția tampon se adaugă 50 mM/l CaHPO₄ · 2H₂O și 0,1 g/l gentamicină. Volumul de soluție tampon adăugat va fi de trei până la cinci ori mai mare decât volumul inițial, menținut constant, al soluției coloidale. Diafiltratul se îndepărtează și nu se recirculă. La finalul diafiltrării, temperatura soluției coloidale se aduce și se menține la 4 ÷ 8°C, timp de 3 ÷ 12 h, sub agitare lentă.

Exemplul 2.3. *Ultrapurificarea soluției de atelocolagen I hipoimunogen*

În soluția de collagen I hipoimunogen purificată conform exemplului 2.2, se adaugă, în condiții de termostatare la 4 ÷ 8°C și agitare lentă, o masă de 6 ÷ 15% raportat la volumul soluției dintr-un amestec, anterior formulat în condiții sterile, ce conține 60 ÷ 70% masic polietilenglicol cu masa moleculară medie 10.000, 10 ÷ 15% masic Na₂SO₄ anhidru și 15 ÷ 25% TMAO cristalizat (CAS 62637-93-8), dizolvate în tampon TRIS/TRIS-HCl cu pH-ul 7,3 ÷ 7,5, format utilizând apă deionizată liberă de pirogeni. Polietilen-glicolul citat (PEG 10.000)

RO 123256 B1

se poate înlocui cu un amestec, separat formulat, de PEG 400, PEG 6.000 și PEG 20.000, sau PEG 600, PEG 8.000 și PEG 10.000, sau încă PEG 400, PEG 600 și PEG 8.000. Rapoartele de amestecare ale polietilenglicolilor enumerați se stabilesc prin optimizarea receptorilor, astfel încât participația respectivelor amestecuri să nu depășească $60 \div 70\%$ din amestecul final cu TMAO și Na_2SO_4 anhidru. După o agitare lentă, cu durată de $60 \div 180$ min, în soluția coloidală condiționată se adaugă o soluție sterilă de pronază, proaspăt preparată și liberă de suspensii, într-o cantitate care să asigure o concentrație de $3,0 \pm 0,2\%$ masic raportat la substanța proteică regăsită în soluția coloidală supusă ultrapurificării. Tratamentul enzimatic se conduce în condiții de termostatare la $5 \pm 0,5^\circ\text{C}$, sub agitare lentă dar eficientă, timp de $12 \div 16$ h. La final, pH-ul soluției coloidale se coboară lent la $4,2 \div 4,6$, adăugând, în picături, o soluție 1N H_3PO_4 . Soluția coloidală se menține apoi, în aceleași condiții de temperatură și pH, sub agitare lentă, timp de $30 \div 90$ min.

Exemplul 2.4. Condiționarea finală a soluției de atelocolagen I hipoimunogen

Soluția obținută conform prescripțiilor prezentate în exemplul 2.3, se supune diafiltrării în sisteme cu membrane având limita de trecere de 100 kDa, în condiții de termostatare la $5 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Volumul soluției atelocolagenice se menține constant prin adaosul unei soluții de 1% acid acetic în care s-au dozat $8,6 \pm 0,1$ g/l NaCl, $0,4 \pm 0,03$ g/l KCl, $0,2 \div 0,5$ g/l sulfat de gentamicină, 0,5 g/l streptomycină și $0,1 \div 0,3$ g/l acid trans-cinamic (CAS 140-10-3), preparată utilizând apă deionizată liberă de pirogeni, răcită apoi la 10°C . Volumul de soluție acidă trecut prin instalația de diafiltrare va fi de trei ori mai mare decât volumul inițial al soluției atelocolagenice. Caracteristicile diafiltratului se urmăresc conductometric. Diafiltratul se îndepărtează, iar soluția atelocolagenică hipoimunogenă de înaltă puritate, astfel obținută, se închide în vase sterile din sticlă sau din materiale plastice inerte chimic, cu volume de $1 \div 5$ litri, care se stochează apoi la temperaturi de $6 \div 10^\circ\text{C}$, la întuneric, introduse în pungi din polietilenă închise sub vid, cu adaos de antifungici.

Exemplul 3. Stabilirea conținutului de specii triplu-helicale, cvasi-native, din soluțiile de atelocolagen, atelocolagen hipoimunogen și atelocolagen hipoimunogen de înaltă puritate

Indiferent de natura și de gradul de puritate al soluțiilor cu conținut de collagen, eucolagen și/sau atelocolagen, din acestea se preiau două loturi a câte cinci probe al căror volum se stabilește astfel încât, fiecare probă, să conțină echivalentul a circa $1,0 \div 1,5$ grame formă colagenică. Opțional, probele pot fi supuse diafiltrării pentru a elimina excesul de săruri ori speciile chimice necolagenice. În soluțiile coloidale aparținând ambelor loturi, termostatate la $8 \pm 2^\circ\text{C}$, se adaugă, prin picurare, soluție 50% CaCl_2 într-un volum suficient pentru a asigura o concentrație de 0,1 M ioni Ca^{2+} . În continuare, soluțiile coloidale se aduc la pH $7,8 \pm 0,2$, dozând în picături o soluție 0,2 M NaOH și apoi li se adaugă o cantitate de soluție 1: 3 alcool izopropilic în apă, suficientă pentru a asigura o concentrație de 80 mM alcool izopropilic în soluția coloidală. În continuare, în soluția coloidală se dozează o cantitate de soluție concentrată de tripsină echivalentă cu 15 mg tripsină pură raportat la conținutul de proteină al soluției coloidale luată inițial în lucru. Soluțiile coloidale cu adaos de tripsină se termostatează și se mențin la $8 \pm 2^\circ\text{C}$, timp de 12 h, sub agitare lentă. La final, se adaugă o cantitate de 20 ml soluție 2 M ZnCl_2 și se continuă agitarea timp de încă o oră. În continuare, cele două loturi de câte cinci probe se procesează diferențiat. Primul lot se aduce la sec, pe baie de apă, se aduce la pond constant, la 105°C și apoi se determină conținutul de azot total, prin tehnica Kjeldahl. Cele cinci valori numerice obținute se prelucurează statistic, iar valoarea medie obținută se notează N_{total} . Cel de-al doilea lot se diafiltrează peste membrane cu limita de trecere de 100 kDa, adăugând soluție alcalină (pH $7,8 \pm 0,2$), îndepărtând diafiltratul și reținând soluția coloidală. Aceasta din urmă se aduce

RO 123256 B1

1 apoi la sec pe baie de apă, se aduce la pond constant la 105°C și apoi se determină
 3 conținutul de azot total, prin tehnica Kjeldahl. Cele cinci valori numerice obținute se
 5 prelucrează statistic, iar valoarea medie obținută se notează N_{nativ} . Conținutul procentual de
 specii triplu-helicale, cvasi-native din soluția coloidală luată în lucru se calculează aplicând
 relația:

$$\begin{array}{l} 7 \qquad \text{Frație colagenică rezistentă la digestia triptică} \qquad N_{\text{nativ}} \\ \text{\% Colagen triplu-helical} = \frac{\text{-----}}{\text{Conținut total de colagen în soluție} \qquad N_{\text{total}}} = \text{-----} \times 100. \\ 9 \end{array}$$

11 Valorile numerice obținute pentru mai multe serii de soluții de același tip (colagenice
 brute, atelocolagenice brute, atelocolagenice hipoimunogene, atelocolagenice hipoimuno-
 13 gene de înaltă puritate) se utilizează drept referință pentru etalonarea citirilor de densitate
 optică în tehnica Hofman, de determinare a conținutului de specii colagenice native în soluții.
 15 Această din urmă tehnică este mult mai rapidă, pretându-se analizelor de rutină.

Revendicări	1
1. Procedeu pentru obținerea soluțiilor coloidale de atelocolagen hipoimunogen de înaltă puritate, caracterizat prin aceea că include:	3
- izolarea și preprocesarea unei surse tisulare de collagen,	5
- solubilizarea hidrolitică a collagenului din sursa tisulară în prezența unei enzime proteolitice sau a unui agent slab liotrop,	7
- purificarea soluției coloidale obținute prin solubilizarea hidrolitică,	9
- conferirea caracterului hipoimunogen prin tratarea cu papaină a soluțiilor atelocolagenice rezultate în urma purificării,	11
- ultrapurificarea soluțiilor coloidale atelocolagenice hipoimunogene utilizând pronaza, în prezența unor agenți cosmotropi și a unor amestecuri ternare ce conțin agenți de aglomerare macromoleculară,	13
- condiționarea finală a soluțiilor de atelocolagen hipoimunogen ultrapurificate prin diafiltrare contra unor soluții ce conțin agenți cosmotropi, inhibitori enzimatici și antibiotice,	15
- conservarea și stocarea soluțiilor coloidale obținute în vase sterile închise ermetic, incluse la rândul lor în pungi din polietilenă în care se introduce o soluție alcoolică a unui agent antifungic, pungi ce se închid apoi sub vid.	17
2. Procedeu conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că izolarea și preprocesarea sursei tisulare de collagen cuprinde prelevarea sursei tisulare de collagen, formarea de loturi cu mase egale din sursa tisulară de collagen prelevată, tratarea loturilor cu agenți de sterilizare generală, mărunțirea țesutului și defibrarea fizico-mecanică a acestuia, îndepărtarea preliminară a componentelor necolagenice solubile în soluții saline, opțional inhibarea activității autolitice a enzimelor proprii țesutului prin dozarea de inhibitori enzimatici generali, delipidarea structurilor tisulare defibrate mecanic, afânarea structurilor tisulare defibrate mecanic utilizând perhidrol, îndepărtarea avansată a excesului de perhidrol, condiționarea structurilor tisulare în vederea solubilizării hidrolitice.	19
3. Procedeu conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că enzima proteolitică utilizată pentru solubilizarea hidrolitică a collagenului din sursele tisulare este pepsina, tripsina sau papaina.	21
4. Procedeu conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că agentul slab liotrop utilizat pentru solubilizarea hidrolitică a collagenului din sursele tisulare este acidul acetic.	23
5. Procedeu conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că purificarea soluțiilor coloidale obținute prin solubilizarea hidrolitică se realizează prin laminări și filtrări repetate, utilizând medii filtrante cu porozități controlate.	25
6. Procedeu conform revendicării 1, caracterizat prin aceea că , în vederea conferirii caracterului hipoimunogen, soluția rezultată în urma purificării se supune condiționării chimice, utilizând cel puțin un agent cosmotrop și cel puțin un agent de aglomerare macromoleculară.	27
7. Procedeu conform revendicărilor 1 și 6, caracterizat prin aceea că agentul cosmotrop utilizat în vederea condiționării chimice a soluțiilor purificate, precum și în etapa de ultrapurificare a soluțiilor coloidale atelocolagenice, este selectat dintre sărurile anorganice neutre prezente în seria Hofmeister, compușii organici neionizabili, cu mase moleculare mici și medii și săruri ale acestora din urmă cu contraioni anorganici din seria Hofmeister.	29
8. Procedeu conform revendicării 6, caracterizat prin aceea că agentul de aglomerare macromoleculară utilizat în vederea condiționării chimice a soluțiilor purificate este selectat dintre speciile macromoleculare înalt solubile, dar neionogene, capabile să stabilizeze proteinele în starea lor nativă, de tipul polietilenglicolilor și polizaharidelor, acestea din urmă în stare naturală sau modificate chimic.	31

9. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** agenții de aglomerare macromoleculară utilizați în etapa de ultrapurificare a soluțiilor coloidale atelocolagenice hipoimunogene sunt polietilenglicoli cu mase moleculare medii sau amestecuri ternare de polietilenglicoli cu mase moleculare mici, medii și mari, în proporții variabile, dar favorabile polietilenglicolilor cu mase moleculare medii.

10. Procedeu conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** antibioticul utilizat în etapa de condiționare finală a soluțiilor de atelocolagen hipoimunogen ultrapurificate este selectat dintre antibioticele cu spectru larg, de preferință active și împotriva micoplasmelor.

11. Procedeu conform revendicărilor 1 ÷ 10, **caracterizat prin aceea că** sursa tisulară de collagen este orice organ sau structură anatomică, provenite de la un mamifer sau de la un animal aparținând seriei cordatelor, cu conținut ridicat de scleroproteine.

12. Procedeu conform revendicărilor 1 ÷ 11, **caracterizat prin aceea că** sursa tisulară de collagen este pielea.

13. Procedeu conform revendicării 12, **caracterizat prin aceea că** pielea proaspăt jupuită se supune spălării în flotă salină, după care se prelucrează prin operații tăbăcărești uzuale de ștercuire, șervuire, spălare abundentă în flote cu tensioactivi neionogeni, labilizare a învelișului pilos utilizând reducători, depărare enzimatică utilizând produse de uz industrial tăbăcăresc, fățuire mecanică, fățuire chimică, clătire abundentă în flote fără tensioactivi, secționare conform zonării tăbăcărești, regularizare a porțiunilor marginale prin ștuțuire, rezultând porțiuni care vor reprezenta sursa tisulară de collagen pentru operațiile următoare.

14. Procedeu conform revendicării 12, **caracterizat prin aceea că** pielea proaspăt jupuită se secționează conform zonării topografice tăbăcărești, iar porțiunea de crupon se spală în soluție salină și apoi în flote de tensioactivi neionogeni, se clătește abundent cu apă deionizată, se eliberează pe cale mecanică de aderențele hipodermice și de învelișul pilos, prin operații mecanice tăbăcărești de ștercuire și șervuire, după care se despică prin operația tăbăcărească de șpăltuire, cu individualizarea zonei mediene a secțiunii dermei, porțiune care va reprezenta sursa tisulară de collagen pentru operațiile următoare.

15. Procedeu conform revendicărilor 13 și 14, **caracterizat prin aceea că**, în scopul îndepărtării preliminare a componentelor necolagenice, sursa tisulară de collagen se secționează în porțiuni cu aria aproximativă de 1 dm², care apoi se spală în flote saline, se sterilizează superficial prin menținere în flote de apă deionizată cu adaos de antibiotice și opțional azidă de sodiu, se presează și se congelează în condiții sterile, se mențin congelate timp de 24 ÷ 72 h, se decongelează parțial, se mărunțesc prin măcinare mecanică în prezența adaosului de gheață, iar măcinătura se suspendă în flote sterile ce conțin NaCl și Na₂SO₄, se spală abundent cu apă deionizată, se suspendă și se agită energic în soluție de amoniac și EDTA, se spală din nou abundent cu apă deionizată, se centrifughează și se spală în centrifugă, se tratează cu soluții calde de n-propanol, tamponate la pH 6,0 ÷ 6,8, se suspendă în soluție de 2 ÷ 8 % perhidrol, la rece, timp de 6 ÷ 36 h, se centrifughează și se spală abundent în centrifugă cu apă deionizată, iar la final se zvântă prin centrifugare.

16. Procedeu conform revendicării 15, **caracterizat prin aceea că**, în scopul solubilizării hidrolitice a collagenului, măcinătura zvântată se spală pe filtru metalic cu soluție rece de HCl având pH-ul 2,2 ÷ 3,5, se împarte în loturi care se introduc în săculeți din sită filtrantă de nylon, iar aceștia se introduc în butoi tăbăcăresc din oțel inoxidabil sterilizat, se agită lent în flota acidă termostată la 25 ÷ 35 °C, se adaugă 14 ÷ 22 % suspensie acidă de pepsină cu pH 2,2 ÷ 2,8, care conține 60 ÷ 80 % masic pepsină, se agită lent 6÷18 h, cu schimbarea de 3 ÷ 5 ori a flotei din utilaj, se prelevă soluțiile vâscoase, se înlătură prima prelevare, iar celelalte se reunesc într-o soluție coloidală brută.

RO 123256 B1

17. Procedeu conform revendicării 15, **caracterizat prin aceea că**, în scopul solubilizării hidrolitice a collagenului, măcinătura zvântată se suspendă în soluție de clorhidrat de etilen-diamină și NaCl, la rece, sub agitare lentă, după care se spală abundant pe filtru metalic, cu soluție de acetat de sodiu, apoi se tratează similar tehnicii prezentate în revendicarea 17, dar înlocuind pepsina cu $8 \div 15\%$ tripsină sau $10 \div 18\%$ papaină și reglând pH-ul la $7,5 \div 8,5$, respectiv $6,0 \div 6,8$. 1
18. Procedeu conform revendicării 15, **caracterizat prin aceea că**, în scopul solubilizării hidrolitice a collagenului, măcinătura zvântată se suspendă în flotă ce conține NaCl, Na_2SO_4 , p-hidroxi-benzoat de metil și ZnCl_2 , cu temperatură de $2 \div 10^\circ\text{C}$, timp de $1 \div 6$ h, după care se adaugă 10% soluție 40% NaOH, se agită la rece $6 \div 12$ h, apoi se spală pe filtru metalic cu apă deionizată rece și cu soluție de HCl rece, până la îndepărtarea alcalinității, iar apoi se tratează similar tehnicii prezentate în revendicarea 16, înlocuind suspensia sau soluția de enzime cu soluție de acid acetic cu pH-ul de $3,2 \div 3,4$, cu adaos de sulfat de gentamicină. 7
19. Procedeu conform revendicărilor 16, 17 sau 18, **caracterizat prin aceea că**, în scopul purificării, soluția coloidală brută răcită se supune operațiilor de îndepărtare a debriurilor tisulare prin trecerea repetată prin site filtrante și prin medii filtrante cu porozitatea de $180 \div 250 \mu$ și apoi de $20 \div 50 \mu$, în condiții de termostatare la $2 \div 10^\circ\text{C}$, cu intercalarea unor etape de maturare. 9
20. Procedeu conform revendicării 19, **caracterizat prin aceea că**, în scopul separării tipurilor collagenice, soluția coloidală collagenică liberă de debriuri tisulare și impurități solide se termostatează la $4 \div 6^\circ\text{C}$, se aduce la pH $2,5 \pm 0,3$, apoi i se adaugă $0,7 \pm 0,02$ moli/l NaCl, se separă precipitatul, care conține fracții telopeptidice și/sau oligopeptidice, prin centrifugare la 7000 g, apoi, supernatantului i se adaugă, la aceeași valoare de pH, un plus de NaCl până la $1,2 \pm 0,05$ moli/l, se separă precipitatul, care conține fracțiile de collagen IV și V, prin centrifugare la 7000 g, apoi, supernatantului i se ajustează pH-ul la $7,5 \pm 0,1$, i se adaugă un plus de NaCl până la $1,75 \pm 0,02$ moli/l și se separă precipitatul, care conține fracția de atelocolagen III, prin centrifugare la 7000 g, apoi, supernatantului, la același pH, i se adaugă un plus de NaCl până la $2,4 \pm 0,05$ moli/l, se lasă la maturare și apoi se separă precipitatul prin centrifugare la 7000 g, acest precipitat conținând fracția de atelocolagen I, iar opțional, la același pH, se adaugă un plus de NaCl până la $4,5 \pm 0,02$ moli/l și se separă un ultim precipitat, prin centrifugare la 7000 g, care conține fracția de atelocolagen II. 11
21. Procedeu conform revendicării 20, **caracterizat prin aceea că**, în scopul sterilizării energice, hidrolizei și separării urmelor de prioni și toxine, precipitatul care conține fracția de atelocolagen I se suspendă în soluție 0,1 M NaOH, la temperatura de $4 \div 6^\circ\text{C}$, pentru a forma o soluție coloidală cu concentrația de $16 \div 25$ g/l, la care se adaugă $0,05 \div 0,15$ moli/l EDTA, iar aceasta se agită eficient timp de $30 \div 150$ min, se neutralizează lent utilizând o soluție de HCl, apoi i se ajustează pH-ul la $2,5 \pm 0,3$ unități, după care i se adaugă un volum de soluție saturată de NaCl egal cu o cincime până la o treime din volumul soluției coloidale acidulate, precipitatul format se menține spre maturare, apoi se separă prin centrifugare, recuperând sedimentul, care se suspendă apoi în soluție de acid acetic, se termostatează, iar soluția coloidală astfel obținută se diafiltrează prin membrane cu limita de trecere de 100 kDa, adăugând permanent soluție de acid acetic cu pH $3 \div 3,5$, pentru a menține constant volumul, iar în final soluția coloidală obținută se supune maturării la rece. 13
22. Procedeu conform revendicării 21, **caracterizat prin aceea că**, în scopul conferirii caracterului hipoimunogen, soluția coloidală se precipită cu un volum de soluție saturată de NaCl egal cu o cincime până la o treime din volumul inițial al soluției coloidale, iar precipitatul se separă centrifugal și se suspendă în soluție 1 M NaCl, în care s-au adăugat azidă de sodiu, tioglicolat de amoniu și polietilenglicol cu masă moleculară medie 600 Da, după care soluția rezultată se filtrează prin filtre cu porozitatea de $180 \div 250 \mu$, se dializează contra 15

unei soluții saline cu aceeași compoziție, apoi se aduce la $30 \pm 36^{\circ}\text{C}$, prin încălzire cu pantă de $0,2 \pm 0,3$ grade/min, se lasă pentru maturare la această temperatură, după care se adaugă lent $1 \pm 2,5$ g/l papaină dizolvată în apă deionizată liberă de pirogeni la temperatura de $15 \pm 25^{\circ}\text{C}$, după dozare, se răcește și se menține sub agitare timp de 8 ± 18 h, apoi i se adaugă $0,2 \pm 1,5$ ml/l perhidrol și se agită încă 60 ± 90 min, în final, se tratează enzimatic, se răcește și se diafiltrează prin membrane cu limita de trecere de 100 kDa, menținându-i volumul constant prin adaos de tampon TRIS/TRIS-HCl cu pH-ul $7,3 \pm 7,5$ în care se dozează $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ și sulfat de gentamicină, volumul de soluție tampon adăugată fiind de trei până la cinci ori mai mare decât volumul inițial al soluției coloidale supuse diafiltrării, iar în final soluția coloidală se maturează, după care se supune, în continuare, ultrapurificării.

23. Procedeu conform revendicării 22, **caracterizat prin aceea că**, în scopul ultrapurificării soluției de atelocolagen hipoimunogen, aceasta se termostatează la $4 \pm 8^{\circ}\text{C}$ și i se adaugă $6 \pm 15\%$ soluție de amestec ce conține PEG 10.000 sau amestecuri, separat formulate, de PEG 400, PEG 600, PEG 6.000, PEG 8.000, PEG 10.000 și PEG 20.000, sau PEG și PPG cu alte mase moleculare medii, în diverse rapoarte de amestecare, optimizate în funcție de condițiile concrete de lucru, alături de Na_2SO_4 anhidru și TMAO cristalizat, după care soluției coloidale astfel condiționată i se adaugă $3,0 \pm 0,2\%$ pronază raportat la substanța proteică, iar în final, soluția coloidală se termostatează la $5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ și se agită eficient timp de 12 ± 16 h, după care se acidulează până la pH $4,2 \pm 4,6$ prin adăugare de soluție de H_3PO_4 .

24. Procedeu conform revendicării 23, **caracterizat prin aceea că**, în scopul condiționării finale a soluțiilor de atelocolagen hipoimunogen ultrapurificate, acestea se termostatează la $5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ și apoi se supun diafiltrării prin membrane cu limita de trecere de 100 kDa, menținând volumul constant prin adăugarea unei soluții de acid acetic în care s-au dizolvat NaCl, KCl, sulfat de gentamicină, sulfat de streptomycină și acid trans-cinamic, preparată utilizând apă deionizată liberă de pirogeni, iar volumul de soluție acidă adăugat la diafiltrare este de trei până la cinci ori mai mare decât volumul inițial al soluției coloidale.

25. Procedeu conform revendicării 24, **caracterizat prin aceea că**, în scopul conservării, soluțiile ultrapurificate se introduc în vase sterilizate, din sticlă sau din materiale plastice chimic inerte, cu dop înfiletabil, având volume de 1 ± 5 l, care se închid ermetic și apoi se introduc în pungi din polietilenă în care s-a adăugat soluție alcoolică de Amfotericina B sau un produs farmaceutic care o conține, cum ar fi Fungizon, pungile fiind apoi închise sub vid și fiind păstrate la întuneric și la $6 \pm 10^{\circ}\text{C}$.

