



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

⑯ Veröffentlichungsnummer: 0 049 469
B2

⑯

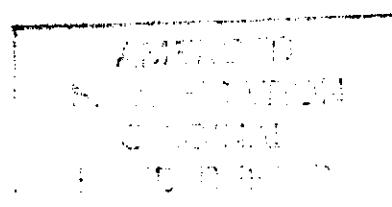
NEUE EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

⑯ Veröffentlichungstag der neuen Patentschrift:
26.10.88

⑯ Int. Cl. 1: A 61 L 15/04

⑯ Anmeldenummer: 81107775.9

⑯ Anmeldetag: 30.09.81



⑯ Kollagene Wundaflage.

⑯ Priorität: 03.10.80 DE 3037513

⑯ Patentinhaber: Dr. Ruhland Nachf. GmbH, Stadtplatz 7,
D-8425 Neustadt/Donau (DE)

⑯ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
14.04.82 Patentblatt 82/15

⑯ Erfinder: Stemberger, Axel, Dr. rer. nat.,
Cramer-Klett-Strasse 35e, D-8014 Neubiberg (DE)

⑯ Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:
23.11.83 Patentblatt 83/47

⑯ Vertreter: Hansen, Bernd, Dr.rer.nat. et al, Hoffmann,
Eitie & Partner Patentanwälte Arabellastrasse 4,
D-8000 München 81 (DE)

⑯ Bekanntmachung des Hinweises auf die Entscheidung
über den Einspruch:
26.10.88 Patentblatt 88/43

⑯ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

⑯ Entgegenhaltungen: (Fortsetzung)
"Collagen-Platelet Interaction", Proceedings of the
First Munich Symposium on Biology of Connective
Tissue (July 1976), S. 379-382 u. 397-398
Wiener Med. Wochenztschr. Nr. 7/1976, S. 86-89

B2

⑯ Entgegenhaltungen:
DE - A - 1 570 169
DE - A - 2 625 289
DE - A - 2 823 620
DE - A - 2 843 963
US - A - 4 089 333

Med. Welt, Bd.29, Heft 17, (1978), S. 720-724
Thrombos. Hemostas. 38 (1977), S.191
Blut 39 (1979), S.64, Vortrag 1.5.2
"Fibrinogen, Fibrin und
Fibrinkleber", Verhandlungsbericht der Deutschen
Arbeitsgemeinschaft für Blutgerinnungsforschung über
die 23. Tagung in Heidelberg, Febr.1979 (Verlag F.K.
Schattauer, N.Y.), S.257, 271-272, 291

EP 0 049 469 B2

Beschreibung

Kollagen wird seit geraumer Zeit in der Chirurgie verwendet. Es kann in Form von Schwämmen oder Fasern zur Blutstillung verwendet werden und ist auch nach entsprechender Modifizierung zur Beschleunigung der Wundheilung geeignet. Bei Patienten mit defekter Blutgerinnung oder bei grossflächigen Blutungen genügen übliche kollagene Wundauflagen nicht. Man hat daher bereits versucht, Kollagenmaterial mit dem Gewebe zu verkleben, wobei man Kleber auf Basis Resorcin-Formaldehyd, Kollagen oder Gelatine verwendete. Solche Kleber sind zwar hämostyptisch, jedoch wegen ihrer Toxizität für die Praxis ungeeignet. Dies gilt auch für Acrylatkleber und die Kombination mit kollagenen Wundauflagen.

Es ist bekannt, dass Kollagen kovalente Vernetzungen mit Bindegewebebestandteilen eingehen kann. Dabei finden Vernetzungen vom Kollagen über Schiff-Basen sowie Aldolkondensation statt. Bekannt ist auch, dass bei Basalmembranen die Gewebefestigkeit zusätzlich durch S-S-Brücken des Basalmembrankollagens erreicht wird. Bekannt ist weiterhin, Proteine, wie Albumin mit intermolekularen S-S-Bindungen nach milder Reduktion und nachfolgender Oxidation, über S-S-Brücken zu vernetzen.

Bei Verletzungen bildet sich durch die Blutgerinnung ein primärer Wundverschluss. Hierfür sind aggregierte Thrombozyten und ein Fibrinnetzwerk verantwortlich. Es ist bekannt, dass einzelne Fibrinmoleküle durch Transglutaminase vernetzt werden. Hierbei bilden sich neue Peptidbindungen zwischen Glutaminsäure und Lysin zwischen benachbarten Ketten. Mit der Technik der Fibrinklebung, also durch Verwendung von Fibrinogen und Thrombin, wird die Endphase der plasmatischen Blutgerinnung nachgeahmt.

Die Fibrinklebung allein ist nicht in der Lage, grossflächige Blutungen zu stillen. Dies gelingt erst durch eine kombinierte Anwendung der Fibrinklebung mit einer resorbierbaren kollagenen Wundauflage. Jedoch muss man dabei drei Komponenten bereithalten, nämlich die kollagene Wundauflage, Thrombinlösung mit Antifibrinolytika und eine tiefgefrorene hochkonzentrierte Fibrinogenlösung. Da Blutungen häufig plötzlich und unprogrammiert auftreten, stehen diese drei Komponenten im entscheidenden Augenblick häufig nicht anwendungsbereit zur Verfügung, denn zumindest die tiefgefrorene Fibrinogenlösung muss zuvor aufgetaut werden. Auch das Mischen vor der Applikation ist verhältnismässig kompliziert.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine kollagene Wundauflage zur Verfügung zu stellen, die mit dem Gewebe verklebt und die bekannten Nachteile der Fibrinklebung in Kombination mit resorbierbarem Kollagen nicht aufweist. Verbunden mit dieser Aufgabe ist eine Verbesserung der kollagenen Wundauflagen zur lokalen Hämostase.

Zur Lösung dieser Aufgabe dient eine gewebeverklebbare kollagene Wundauflage, die dadurch

gekennzeichnet ist, dass Kollagen und Fibrinogen durch Gefriertrocknung miteinander kombiniert worden sind.

Die erfindungsgemässen kollagenen Wundauflagen können in an sich bekannter Weise mit Arzneimittelwirkstoffen beladen werden.

Das als Wundauflage verwendete Kollagen liegt in der üblichen Form von Wundauflagen, also als Netz, Gewebe, Schwamm und dgl. vor. Solche Wundauflagen sind aus dem Stand der Technik bekannt.

Das verwendete Kollagen zeigt eine Reinheit, ausgedrückt durch den Faktor Stickstoff: Hydroxyprolin <4 vorzugsweise <3. Da Hydroxyprolin nur in Kollagen vorkommt, ist dies ein Mass für die Reinheit des Kollagens.

Das Fibrinogen ist in der gewebeverklebbaren kollagenen Wundauflage in einer Menge von 0,5 bis 10 mg/cm² vorzugsweise 4 bis 6 mg/cm² enthalten.

Bekannt ist, dass Kollagen als Träger für Antibiotika, wie Gentamycin, geeignet ist. Auch Tetracyclin oder weitere Antibiotika oder Chemotherapeutika können in das modifizierte Kollagen eingearbeitet werden. Dies ist ein zusätzlicher Effekt, der bei den erfindungsgemässen Wundauflagen erzielt werden kann.

Herstellung von Kollagenen:

Von allen Pigmentschichten und Muskelresten befreite frische Rindersehnen wurden homogenisiert und eine Menge, die 100 g Trockengewicht entspricht, in 3 l 0,05 m Citratpuffer (pH 3,7) 24 Stunden lang extrahiert und anschliessend gegen 1% Essigsäure 12 Stunden lang dialysiert.

Das in 3 l 1% Essigsäure suspendierte Gewebe wird 48 Stunden bei 15°C unter ständigem Rühren mit Pepsin im Verhältnis Kollagen:Pepsin = 50:1 inkubiert.

Der Ansatz wird mit 1% Essigsäure auf 5 Liter verdünnt und durch Zentrifugation von den unlöslichen Sehnenfragmenten befreit.

Die viskose Kollagenlösung wird gegen alkaliisiertes Leitungswasser (pH 8,0) dialysiert und dann scharf zentrifugiert. Der Rückstand wird erneut in 5 Liter 1% Essigsäure gelöst und dialysiert. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis der Faktor Stickstoff:Hydroxyprolin <3 ist. Nach dem letzten Dialysieren wird mittels 0,05% Essigsäure eine 1,5% Kollagenlösung hergestellt, die für die nachfolgenden Versuche Verwendung findet.

Herstellung von Fibrinogenlösungen:

Im Handel befindliche sterile Fibrinogenbulkware wird in sterilem Aqua dest. gelöst, so dass eine Lösung von 50 mg Fibrinogen/ml Lösung vorliegt, die für die nachfolgenden Versuche verwendet wird.

Beispiel 1

Herstellung einer Kollagen-Fibrinogen-haltigen Wundauflage:

Von einer strahlensterilisierten 1,5%igen Kollagenlösung werden 10 ml unter aseptischen Bedingungen in eine sterile Flasche mit Septum ge-

geben und im Kältebad (Trockeneis-Äthanol) unter leichtem Rühren tiefgefroren. Nachdem etwa $\frac{2}{3}$ dieser Lösung gefroren sind, werden 5 ml einer Kollagen-Fibrinogenlösung (Kollagen:Fibrinogen = 1:1) zugegeben und erneut tiefgefroren, bis $\frac{2}{3}$ dieser Lösung tiefgefroren sind. Dann werden 5 ml der Fibrinogenlösung zugegeben, tiefgefroren und lyophilisiert.

Beispiel 2

Herstellung gentamycinhaltiger Wundauflagen:

Zur Herstellung gentamycinhaltiger Wundauflagen werden 100 mg Gentamycin zu 100 ml einer 1%igen Kollagenlösung gegeben und diese Lösung wie vorher beschrieben zur Herstellung der kollagen-fibrinogenhaltigen Wundauflage verwendet.

Beispiel 3

Herstellung von Wundauflagen, die Kollagen und Fibrinogen enthalten:

Es wird zunächst 100 ml einer 0,5-1%igen Kollagenlösung in eine Metallform von 10×10 cm gegeben, nach üblicher Technik gefriergetrocknet und der resultierende Schwamm dann sterilisiert. Unter aseptischen Bedingungen wird nun dieser sterilisierte Kollagenschwamm mit einer Fibrinogenlösung besprühlt, wobei pro Quadratzentimeter Kollagenoberfläche 0,5-10 mg Fibrinogen aufgetragen werden. Anschliessend erfolgt eine erneute Gefriertrocknung und Verpackung unter sterilen Kautelen.

Bei Anwendung der erfundungsgemässen modifizierten gewebeverklebbaren kollagenen Wundauflagen in der Praxis findet die Resorption innerhalb klinisch angemessener Zeiträume statt. Erfundungsgemäss können grossflächige Wunden insbesondere im Bauchbereich versorgt werden.

Patentansprüche

1. Gewebeverklebbare kollagene Wundauflage aus einer Kombination von Kollagen mit Fibrinogen, die Arzneimittelwirkstoffe enthalten kann, dadurch gekennzeichnet, dass Kollagen und Fibrinogen durch Gefriertrocknung kombiniert worden sind.
2. Gewebeverklebbare kollagene Wundauflage gemäss Anspruch 1 dadurch gekennzeichnet, dass der Arzneimittelwirkstoff ein Antibiotikum ist.
3. Gewebeverklebbare kollagene Wundauflage gemäss Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Antibiotikum Gentamycin ist.

4. Gewebeverklebbare kollagene Wundauflage, gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Kollagen in Form eines Gewebes oder eines Schwammes vorliegt.

5. Gewebeverklebbare kollagene Wundauflage gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Kollagen eine Reinheit ausgedrückt durch den Faktor Stickstoff:Hydroxyprolin <4, vorzugsweise <3 hat.

Claims

1. A tissue bonding collagenic surgical dressing consisting of a combination of collagen with fibrinogen, which can contain pharmaceutical active ingredients, characterized in that collagen and fibrinogen were combined by freeze drying.

2. A tissue bonding collagenic surgical dressing as set forth in claim 1, characterized in that the pharmaceutical active ingredient is an antibiotic.

3. A tissue bonding collagenic surgical dressing as set forth in claim 2, characterized in that the antibiotic is gentamycin.

4. A tissue bonding collagenic surgical dressing as set forth in claim 1, characterized in that the collagen is present in the form of a fabric or of a sponge.

5. Tissue bonding collagenic surgical dressing as set forth in claim 1, characterized in that the collagen has a purity expressed by the factor nitrogen:hydroxyprolin <4, preferably <3.

Revendications

1. Pansement à base de collagène pouvant adhérer aux tissus, constitué par une combinaison de collagène et de fibrinogène, qui peut contenir une substance active thérapeutiquement, caractérisé en ce que le collagène et le fibrinogène sont combinés par lyophilisation.

2. Pansement à base de collagène pouvant adhérer aux tissus selon la revendication 1, caractérisé en ce que la substance active thérapeutiquement est un antibiotique.

3. Pansement à base de collagène pouvant adhérer aux tissus, selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'antibiotique est la gentamycine.

4. Pansement à base de collagène pouvant adhérer aux tissus, selon la revendication 1, caractérisé en ce que le collagène se présente sous la forme d'un tissu ou d'une éponge.

5. Pansement à base de collagène pouvant adhérer aux tissus selon la revendication 1, caractérisé en ce que le collagène a un degré de pureté exprimé par le rapport azote:hydroxyproline inférieur à 4, de préférence inférieur à 3.



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

EUROPEAN PATENT OFFICE LIBRARY

⑯ Veröffentlichungsnummer: **0 049 469**
B1

⑯

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

⑯ Veröffentlichungstag der Patentschrift:
23.11.83

⑯ Int. Cl.³: **A 61 L 15/04**

⑯ Anmeldenummer: **81107775.9**

⑯ Anmeldetag: **30.09.81**

SEARCHED
SERIALIZED
INDEXED
FILED IN FRONT

⑯ **Kollagene Wundauflage.**

⑯ Priorität: **03.10.80 DE 3037513**

⑯ Patentinhaber: **Dr. Ruhland Nachf. GmbH, Stadtplatz 7,
D-8425 Neustadt/Donau (DE)**

⑯ Veröffentlichungstag der Anmeldung:
14.04.82 Patentblatt 82/15

⑯ Erfinder: **Stemberger, Axel, Dr. rer. nat.,
Cramer-Klett-Strasse 35e, D-8014 Neubiberg (DE)**

⑯ Bekanntmachung des Hinweises auf die Patenterteilung:
23.11.83 Patentblatt 83/47

⑯ Vertreter: **Hansen, Bernd, Dr.rer.nat. et al, Hoffmann,
Eitie & Partner Patentanwälte Arabellastrasse 4,
D-8000 München 81 (DE)**

⑯ Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

⑯ Entgegenhaltungen:
**DE - A - 1 570 169
DE - A - 2 823 620
US - A - 4 089 333**

EP 0 049 469 B1

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Kollagene Wundauflage

Kollagen wird seit geraumer Zeit in der Chirurgie verwendet. Es kann in Form von Schwämmen oder Fasern zur Blutstillung verwendet werden und ist auch nach entsprechender Modifizierung zur Beschleunigung der Wundheilung geeignet. Bei Patienten mit defekter Blutgerinnung oder bei grossflächigen Blutungen genügen übliche kollagene Wundaflagen nicht. Man hat daher bereits versucht, Kollagenmaterial mit dem Gewebe zu verkleben, wobei man Kleber auf Basis Resorcin-Formaldehyd, Kollagen oder Gelatine verwendete. Solche Kleber sind zwar hämostyptisch, jedoch wegen ihrer Toxizität für die Praxis ungeeignet. Dies gilt auch für Acrylatkleber und die Kombination mit kollagenen Wundaflagen.

Es ist bekannt, dass Kollagen kovalente Vernetzungen mit Bindegewebebestandteilen eingehen kann. Dabei finden Vernetzungen vom Kollagen über Schiff-Basen sowie Aldolkondensation statt. Bekannt ist auch, dass bei Basalmembranen die Gewebefestigkeit zusätzlich durch S-S Brücken des Basalmembrankollagens erreicht wird. Bekannt ist weiterhin, Proteine, wie Albumin mit intermolekularen S-S Bindungen nach milder Reduktion und nachfolgender Oxidation über S-S Brücken zu vernetzen.

Bei Verletzungen bildet sich durch die Blutgerinnung ein primärer Wundverschluss. Hierfür sind aggregierte Thrombozyten und ein Fibrinnetzwerk verantwortlich. Es ist bekannt, dass einzelne Fibrinmoleküle durch Transglutaminase vernetzt werden. Hierbei bilden sich neue Peptidbindungen zwischen Glutaminsäure und Lysin zwischen benachbarten Ketten. Mit der Technik der Fibrinklebung, also durch Verwendung von Fibrinogen und Thrombin, wird die Endphase der plasmatischen Blutgerinnung nachgeahmt.

Die Fibrinklebung allein ist nicht in der Lage, grossflächige Blutungen zu stillen. Dies gelingt erst durch eine kombinierte Anwendung der Fibrinklebung mit einer resorbierbaren kollagenen Wundauflage. Jedoch muss man dabei drei Komponenten bereithalten, nämlich die kollagene Wundauflage, Thrombinlösung mit Antifibrinolytika und eine tiefgefrorene hochkonzentrierte Fibrinogenlösung. Da Blutungen häufig plötzlich und unprogrammiert auftreten, stehen diese drei Komponenten im entscheidenden Augenblick häufig nicht anwendungsbereit zur Verfügung, denn zumindest die tiefgefrorene Fibrinogenlösung muss zuvor aufgetaut werden. Auch das Mischen vor der Appliktion ist verhältnismässig kompliziert.

Aufgabe der Erfindung ist es, eine kollagene Wundauflage zur Verfügung zu stellen, die mit dem Gewebe verklebt und die bekannten Nachteile der Fibrinklebung in Kombination mit resorbierbarem Kollagen nicht aufweist. Verbunden mit dieser Aufgabe ist eine Verbesserung der kollagenen Wundaflagen zur lokalen Hämostase.

Zur Lösung dieser Aufgabe dient eine gewebe-

verklebbare kollagene Wundauflage, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie Kollagen in Kombination mit einem resorbierbaren Biopolymer aus der Gruppe Fibrinogen, SH-Gruppen-modifizierte Gelatine, SH-Gruppen-modifiziertes Kollagen oder SH-Gruppen-modifizierte Oxyzellulose enthält.

5 Kollagen und Fibrinogen oder die mit SH-Gruppen modifizierte Gelatine, entsprechend modifiziertes Kollagen oder entsprechend modifizierte Oxyzellulose können vorteilhaft durch Gefriertrocknung miteinander kombiniert werden. Im Falle der Kombination von Kollagen mit SH-Gruppen modifizierten Kollagen ist es aber auch möglich, SH-Gruppen in das Kollagen einzuführen.

10 20 25 Die Erfindung wird anschliessend anhand der Kombination von Kollagen mit Fibrinogen beschrieben, jedoch steht Fibrinogen hier stellvertretend für die genannten resorbierbaren Biopolymere, nämlich SH-Gruppen-modifizierte Gelatine, SH-Gruppen-modifiziertes Kollagen oder SH-Gruppen-modifizierte Oxyzellulose.

30 35 40 45 50 55 60 Problematisch bei der Fibrinogenapplikation ist das vereinzelte Auftreten von Hepatitis. Diese Problematik kann natürlich vollständig vermieden werden, wenn man nicht Fibrinogen einarbeitet, sondern andere reaktive SH-Gruppen-haltige Biopolymere einführt. Solche SH-Gruppen-haltigen Biopolymere sind SH-Gruppen-modifizierte Gelatine, SH-Gruppen-modifizierte regenerierte Oxyzellulose oder SH-Gruppen-modifiziertes Kollagen.

Die Einführung von SH-Gruppen in Kollagen kann in an sich bekannter Weise erfolgen. Beispielsweise kann man gemäss der Vorschrift von Benesch & Benesch in «Proceedings of the National Academy of the USA, Washington», Band 44, 1958, S. 848 bis 853 arbeiten.

Die Einführung von SH-Gruppen in Kollagen kann aber auch dadurch erfolgen, dass man eine SH-Gruppen-modifizierte Gelatine, oder eine entsprechend modifizierte regenerierte Oxyzellulose auf Kollagen aufbringt oder mittels eines Gradientenmixers einmischt. Gelatine entsteht durch chemische bzw. enzymatische Spaltung aus Kollagen und hat daher die gleiche chemische Zusammensetzung. Infolgedessen haben auch kollagene Wundaflagen, welche mit SH-Gruppen-modifizierter Gelatine versehen sind, im wesentlichen die Eigenschaften des Kollagens, verbunden mit dem Vorteil, dass durch die SH-Gruppen in diesen Materialien oxidativ eine Vernetzung erfolgen kann.

Die erfindungsgemässen kollagenen Wundaflagen können in an sich bekannter Weise mit Arzneimittelwirkstoffen beladen werden.

Das als Wundauflage verwendete Kollagen liegt in der üblichen Form von Wundaflagen, also als Netz, Gewebe, Schwamm und dgl. vor. Solche Wundaflagen sind aus dem Stand der Technik bekannt.

Das verwendete Kollagen zeigt eine Reinheit ausgedrückt durch den Faktor Stickstoff: Hydroxyprolin < 4 vorzugsweise < 3. Da Hydroxyprolin nur in Kollagen vorkommt, ist dies ein Mass für die Reinheit des Kollagens.

Das resorbierbare Biopolymer ist in der gewebeverklebbaren kollagenen Wundauflage in einer Menge von 0,5 bis 10 mg/cm² vorzugsweise 4 bis 6 mg/cm² enthalten. Die Anzahl der SH-Gruppen pro Molekül des resorbierbaren Biopolymers kann in einem weiten Bereich schwanken. Sie liegt bei Gelatine mit einem mittleren Molekulargewicht von etwa 40000 bei etwa 2 bis 7 und im Durchschnitt bei etwa 5 und bei den anderen resorbierbaren Biopolymeren in der gleichen Grössenordnung.

Bekannt ist, dass Kollagen als Träger für Antibiotika, wie Gentamycin geeignet ist. Auch Tetracyclin oder weitere Antibiotika oder Chemotherapeutika können in das SH-Gruppen-modifizierte Kollagen eingearbeitet werden. Dies ist ein zusätzlicher Effekt der bei den erfundungsgemässen Wundaflagen erzielt werden kann.

Herstellung von Kollagenen:

Von allen Pigmentschichten und Muskelresten befreite frische Rindersehnen wurden homogenisiert und eine Menge, die 100 g Trockengewicht entspricht, in 31 0,05 m Citratpuffer (pH 3,7) 24 Stunden lang extrahiert und anschliessend gegen 1% Essigsäure 12 Stunden lang dialysiert.

Das in 31% Essigsäure suspendierte Gewebe wird 48 Stunden bei 15°C unter ständigem Rühren mit Pepsin im Verhältnis Kollagen:Pepsin = 50:1 inkubiert.

Der Ansatz wird mit 1% Essigsäure auf 5 Liter verdünnt und durch Zentrifugation von den unge lösten Sehnenfragmenten befreit.

Die viskose Kollagenlösung wird gegen alkali siertes Leitungswasser (pH 8,0) dialysiert und dann scharf zentrifugiert. Der Rückstand wird erneut in 5 Liter 1% Essigsäure gelöst und dialysiert. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis der Faktor Stickstoff:Hydroxyprolin < 3 ist. Nach dem letzten Dialysieren wird mittels 0,05% Essigsäure eine 1,5% Kollagenlösung hergestellt, die für die nachfolgenden Versuche Verwendung findet.

Herstellung einer SH-modifizierten Gelatine, SH-Kollagen oder SH-regenerierten Oxyzellulose:

1000 ml einer 2% Gelatinelösung (die Vorschrift gilt analog für 1,5% Kollagenlösung oder einer Suspension von 50 g Kollagen bzw. regenerierter Oxyzellulose) werden bei pH 7,0 mit 318 mg N-Acetylhomocysteinsäurethiolacton versetzt und dann werden 340 mg AgNO₃ zugegeben, wobei die Lösung durch Zugabe von NaOH auf pH 7,0 gehalten wird.

Nach zwei Stunden wird mit 1n HCl auf pH 2,5 eingetellt und Thioharnstoff im Überschuss zugegeben. Mit einem Kationenaustauscher werden die Silberionen entfernt und die Lösung unter Stickstoff dialysiert. Dann stellt man einprozentige Lösungen der modifizierten SH-Gelatine so-

wie des modifizierten SH-Kollagens für die nachfolgenden Versuche her.

Die regenerierte Oxyzellulose wird durch Lyophilisierung getrocknet.

5

Herstellung von Fibrinogenlösungen:

10

Im Handel befindliche sterile Fibrinogenbulkware wird in steriles Aqua dest. gelöst, so dass eine Lösung von 50 mg Fibrinogen/ml Lösung vorliegt, die für die nachfolgenden Versuche verwendet wird.

15

Beispiel 1

Herstellung einer Kollagen-Fibrinogen-haltigen Wundauflage:

20

Von einer strahlensterilisierten 1,5%igen Kollagenlösung werden 10 ml unter aseptischen Bedingungen in eine sterile Flasche mit Septum gegeben und im Kältebad (Trockeneis - Äthanol) unter leichtem Rühren tiefgefroren. Nachdem etwa $\frac{1}{3}$ dieser Lösung gefroren sind, werden 5 ml einer Kollagen-Fibrinogenlösung (Kollagen:Fibrinogen = 1:1) zugegeben und erneut tiefgefroren, bis $\frac{2}{3}$ dieser Lösung tiefgefroren sind. Dann werden 5 ml der Fibrinogenlösung zugegeben, tiefgefroren und lyophilisiert.

25

Beispiel 2

Herstellung einer Wundauflage, die Kollagen und modifizierte SH-Gelatine enthält:

30

Von einer Kollagenlösung (1,5%) werden 10 ml in eine Flasche mit Septum gegeben und im Kältebad (Trockeneis-Äthanol) unter leichtem Rühren tiefgefroren. Nachdem etwa $\frac{1}{3}$ dieser Lösung gefroren sind, werden 10 ml der modifizierten SH-Gelatinelösung zugegeben, tiefgefroren und lyophilisiert. Dieser Schwamm wird dann strahlensterilisiert.

35

Beispiel 3

Herstellung gentamycinhaltiger Wundaflagen:

40

Zur Herstellung gentamycinhaltiger Wundaflagen werden 100 mg Gentamycin zu 100 ml einer 1%igen Kollagenlösung gegeben und diese Lösung wie vorher beschrieben zur Herstellung der kollagen-fibrinogenhaltigen Wundauflage sowie zur Herstellung der kollagen-SH-gelatinehaltigen Wundauflage verwendet.

45

Beispiel 4

Herstellung von Wundaflagen, die Kollagen und Fibrinogen enthalten:

50

Es wird zunächst 100 ml einer 0,5-1%igen Kollagenlösung in eine Metallform von 10×10 cm gegeben, nach üblicher Technik gefriergetrocknet und der resultierende Schwamm dann sterilisiert. Unter aseptischen Bedingungen wird nun dieser sterilisierte Kollagenschwamm mit einer Fibrinogenlösung besprüht, wobei pro Quadratzentimeter

ter Kollagenoberfläche 0,5-10 mg Fibrinogen aufgetragen werden. Anschliessend erfolgt eine erneute Gefriertrocknung und Verpackung unter sterilen Kautelen.

Bei Anwendung der erfundungsgemässen modifizierten gewebeverklebbaren kollagenen Wundauflagen in der Praxis findet die Resorption innerhalb klinisch angemessener Zeiträume statt. Erfundungsgemäss können grossflächige Wunden insbesondere im Bauchbereich versorgt werden.

Patentansprüche

1. Gewebeverklebbare kollagene Wundauflage, dadurch gekennzeichnet, dass Kollagen in Kombination mit einem resorbierbaren Biopolymer aus der Gruppe Fibrinogen, SH-Gruppen-modifizierter Gelatine, SH-Gruppen-modifizierten Kollagen oder SH-Gruppen-modifizierter regenerierter Oxyzellulose vorliegt.

2. Gewebeverklebbare kollagene Wundauflage gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie zusätzlich einen Arzneimittelwirkstoff enthält.

3. Gewebeverklebbare kollagene Wundauflage gemäss Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Arzneimittelwirkstoff ein Antibiotikum ist.

4. Gewebeverklebbare kollagene Wundauflage gemäss Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Antibiotikum Gentamycin ist.

5. Gewebeverklebbare kollagene Wundauflage, gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Kollagen in Form eines Gewebes oder eines Schwammes vorliegt.

6. Gewebeverklebbare kollagene Wundauflage gemäss Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Kollagen eine Reinheit ausgedrückt durch den Faktor Stickstoff:Hydroxyprolin < 4 , vorzugsweise < 3 hat.

Claims

1. Tissue-bonding collagenic surgical dressing, characterised in that collagen is present in combination with a resorbable biopolymer from the group of fibrinogen, SH group-modified gelatines, SH group-modified collagen or SA group-modified regenerated oxycellulose.

5 2. Tissue-bonding collagenic surgical dressing according to claim 1, characterised in that it additionally contains a pharmaceutical active ingredient.

10 3. Tissue-bonding collagenic surgical dressing according to claim 2, characterised in that the pharmaceutical additive is an antibiotic.

4. Tissue-bonding collagenic surgical dressing according to claim 3, characterised in that the antibiotic is gentamicin.

15 5. Tissue-bonding collagenic surgical dressing according to claim 1, characterised in that the collagen is present in the form of a fabric or a sponge.

20 6. Tissue-bonding collagenic surgical dressing according to claim 1, characterised in that the collagen has a purity expressed by the nitrogen:hydroxyprolin factor of < 4 , and preferably < 3 .

Revendications

25 1. Pansement à base de collagène pouvant adhérer aux tissus, caractérisé en ce que la collagène se présente en combinaison avec un biopolymère résorbable du groupe fibrinogène, gélatine modifiée à groupes SH, collagène modifié à groupes SH ou oxycellulose régénérée modifiée à groupes SH.

30 2. Pansement à base de collagène pouvant adhérer aux tissus selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il contient en plus une substance active thérapeutiquement.

35 3. Pansement à base de collagène pouvant adhérer aux tissus selon la revendication 2, caractérisé en ce que la substance active thérapeutiquement est un antibiotique.

40 4. Pansement à base de collagène pouvant adhérer aux tissus selon la revendication 3, caractérisé en ce que l'antibiotique est la gentamycine.

45 5. Pansement à base de collagène pouvant adhérer aux tissus, selon la revendication 1, caractérisé en ce que le collagène se présente sous la forme d'un tissu ou d'une éponge.

50 6. Pansement à base de collagène selon la revendication 1 pouvant adhérer aux tissus, caractérisé en ce que le collagène a un degré de pureté exprimé par le rapport azote:hydroxyproline inférieur à 4, de préférence inférieur à 3.

REGISTER ENTRY FOR EP0049469

European Application No EP81107775.9 filing date 30.09.1981

Application in German

Priority claimed:

03.10.1980 in Federal Republic of Germany - doc: 3037513

Designated States BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE AT

Title COLLAGEN WOUND DRESSING

Applicant/Proprietor

DR. RUHLAND NACHF. GMBH, Stadtplatz 7, D-8425 Neustadt/Donau, Federal
Republic of Germany [ADP No. 50652890001]

Inventor

DR. RER. NAT. AXEL STEMBERGER, Cramer-Klett-Strasse 35e, D-8014 Neubiberg,
Federal Republic of Germany [ADP No. 51774248001]

Classified to

C3H

A61L

Address for Service

JENSEN & SON, 8 Fulwood Place, High Holborn, London, WC1V 6HG, United
Kingdom [ADP No. 00000968001]

EPO Representative

DR.RER.NAT. BERND HANSEN, Hoffmann, Eitle & Partner Patentanwälte
Arabellastrasse 4, D-8000 München 81, Federal Republic of Germany
[ADP No. 50354729001]

Publication No EP0049469 dated 14.04.1982 and granted by EPO 23.11.1983.

Publication in German

Examination requested 15.10.1981

Patent Granted with effect from 23.11.1983 (Section 25(1)) with title COLLAGEN
WOUND DRESSING

20.06.1984 EPO: Opposition filed on 20.06.1984

Entry Type 25.1 Staff ID. Auth ID. EPT

18.03.1992 Notification of change of Address For Service address of

JENSEN & SON, 8 Fulwood Place, High Holborn, London, WC1V 6HG,
United Kingdom [ADP No. 00000968001]

to

JENSEN & SON, 70 Paul Street, LONDON, EC2A 4NA, United Kingdom
[ADP No. 00000968002]

dated 18.03.1992. Official evidence filed on EP0363420

Entry Type 7.3 Staff ID. AB Auth ID. EO

19.07.1994 Application under Section 32 filed on 08.07.1994

Entry Type 8.1 Staff ID. PH Auth ID. F21

TIMED: 11/08/94 09:12:14

REGISTER ENTRY FOR EP0049469 (Cont.)

PAGE: 2

20.07.1994 Notification of change of Applicant/Proprietor name of
DR. RUHLAND NACHF. GMBH, Stadtplatz 7, D-8425 Neustadt/Donau,
Federal Republic of Germany [ADP No. 50652890001]
to
INNOCOLL GESELLSCHAFT ZUR HERSTELLUNG INNOVATIVER COLLAGENPRODUKTE
MBH, Incorporated in the Federal Republic of Germany, Stadtplatz 7,
D-8425 Neustadt/Donau, Federal Republic of Germany [ADP No. 06592810001]
dated 08.07.1994. Official evidence filed on EP0250904
Entry Type 7.2 Staff ID. LM1 Auth ID. F20

25.07.1994 IMMUNO AKTIENGESELLSCHAFT, Incorporated in Austria,
Industriestrasse 72, A-1220 Wien, Austria [ADP No. 06278253002]
registered as Applicant/Proprietor in place of
INNOCOLL GESELLSCHAFT ZUR HERSTELLUNG INNOVATIVER COLLAGENPRODUKTE
MBH, Incorporated in the Federal Republic of Germany, Stadtplatz 7,
D-8425 Neustadt/Donau, Federal Republic of Germany [ADP No. 06592810001]
by virtue of deed of assignment dated 18.04.1994. Certified copy
filed on EP0250904
Entry Type 8.4 Staff ID. PH Auth ID. F21

**** END OF REGISTER ENTRY ****

OA80-01
EP

OPTICS - PATENTS

11/08/94 09:12:21
PAGE: 1

RENEWAL DETAILS

PUBLICATION NUMBER EP0049469

PROPRIETOR(S)

Immuno Aktiengesellschaft, Incorporated in Austria,
Industriestrasse 72, A-1220 Wien, Austria

DATE FILED 30.09.1981

DATE GRANTED 23.11.1983

DATE NEXT RENEWAL DUE 30.09.1994

DATE NOT IN FORCE

DATE OF LAST RENEWAL 30.12.1993

YEAR OF LAST RENEWAL 13

STATUS PATENT IN FORCE

URNR. 2739 /1985 H
pö

36426

VERIFICATION OF TRANSLATION

I, Dr. Bernd Hansen
of c/o Hoffmann, Eitle & Partner, Arabellastraße 4, 8000 Munich 81,
Federal Republic of Germany, do hereby certify that I am conversant
with the English and German languages and am a competent translator
thereof, and I further certify that to the best of my knowledge and
belief the attached is a full, true, and faithful translation made
by me of the certified copy of European Patent No. 0 049 469.

Signed this 27 day of November, 1985

Dr. B. Hansen

File No. 2739 /1985 H
pö

I hereby certify that the above is the true signature signed
in my presence, of

Mr./Mrs. Bernd Hansen (Dr.), born on January 26, 1943
residing in Gralstraße 15, 8000 München 81
identified by German Passport, Chartered Patent Agent.

Munich, 27th November 1985


v. Heynitz,
Notary Public

EUROPEAN PATENT

45 Publication Date of Patent: 51 International
23 Nov 83 Class.: A61L 15/04

21 Filing No.: 81 107 775.9

22 Filing Date: 30 Sep 81

54 Collagenic Surgical Dressing

30 Priority: 3 Oct 80 DE 3037513

43 Publication date of application:
14 Apr 82 Patent Bulletin 82/15

45 Publication of the mention of the grant of
the patent: 23 Nov 83 Patent Bulletin 83/47

84 Designated States:
AT, BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE

56 Citations:
DE-A-1 570 169
DE-A-2 823 620
US-A-4 089 333

73 Patentee: Dr. Ruhland Nachf, GmbH, Stadtplatz 7, D-8425
Neustadt/Donau (West Germany)

72 Inventor: Stemberger, Axel, Dr. rer. nat.,
Cramer-Klett-Strasse 35e, D-8014 Neubiberg
(West Germany)

74 Rep.: Hansen, Bernd, Dr. rer. nat. et al,
Hoffmann, Eitle & Partner, Patent Attorneys,
Arabellastrasse 4, D-8000 Munich 81 (West
Germany)

Collagenic Surgical Dressing

Collagen has been used in surgery for a long time. It can be used in the form of either sponges or threads to stop bleeding and is suited, after appropriate modification, for speeding wound healing. The normal collagenic surgical dressings are however not sufficient for patients with defective blood coagulation or with widespread bleeding. It has already been tried to bond collagenic material to tissues, whereby one has tried bonds composed of resorcin-formaldehyde, collagen or gelatine. Such bonds are hemostyptic, are however unsuited for practical use because of their toxicity. This applies also for acrylate bonds and the combination with collagenic surgical dressings.

It is known, that collagen covalent interlaced with components of connective tissue can shrink thereby interlacing of collagen over Schiff-Basen as well as aldol condensation occurs. It is also known that the tissue firmness of basal membranes is achieved by additional "S-S" bridges of the basal membrane collagens. It is known furthermore how to connect proteins, like albumin with inter-molecular bonds after a mild reduction and subsequent oxidation over "S-S" bridges.

After injuries the blood clots build a primary scar. Aggregate thrombocyte (blood platelets) and fibrin network are responsible for this. It is known that individual fibrin molecules are cross-linked by transglutaminase. Hereby new peptic connections are formed between the glutamin acids and lysin and between neighbouring chains. By the use of the technique of fibrin bonding, in other words through the

use of fibrinogens and thrombines, the end phase of plasmic blood coagulation is simulated.

The fibrin bonding is not sufficient of itself to stop widespread bleeding. This can be achieved only through a combined application of fibrin bonding and resorbable collagenic surgical dressings. However, one must hold three components at the ready, namely, the collagenic surgical dressing, a thrombin solution with antifibrinolytics and a deep frozen, highly concentrated fibrinogen solution. Since bleeding often begins suddenly and unprogrammed, these three components are not necessarily ready and available in crucial moments, for example the deep frozen fibrin solution must first be thawed. Also the mixing of the solution before application is relatively difficult.

It is the object of this invention to produce a surgical dressing, that will bind with the tissue and which will not show the known disadvantages of the fibrin-bonding in combination with resorbable collagens. Coupled with this object is an improvement of the collagenic surgical dressing for local haemostasis.

A tissue bonding collagenic surgical bond, which is characterized in that it contains collagen in combination with a resorbable biopolymer from the groups fibrinogen, SH-groups-modified-gelatine SH-groups of modified collagen and SH-groups - modified - oxy-cellulose, will accomplish this object.

Collagens and fibrinogens, or SH-groups-modified-gelatines, correspondingly modified collagens or

correspondingly modified oxycellulose can be combined advantageously with each other through freeze dried processing. In the case of the combination of collagens with SH-modified-collagens is however also possible to introduce SH-groups into the collagen.

The invention is described in the following by example of the combination of collagen with fibrinogen, however fibrinogen is used here representatively for the above mentioned resorbable biopolymere, namely SH-groups-modified gelatine, SH-groups-modified collagen or SH groupsmodified oxycellulose.

Problematic with the application of fibrinogens is the occasional appearance of hepititus. This problem can be naturally totally avoided, if one does not use fibrinogens, rather one introduces other reactive SH-groups, which are contained in biopolymers. Such SH-groups containing biopolymers are SH-group-modified gelatines, SH-group-modified regenerated oxycellulose or SH-groupmodified collagens. The introduction of SH-groups in collagens can occur in a way known per se. For example, one can work according to the regulations of Benesch & Benesch in "Proceedings of the National Academy of USA, Washington" volume 44, 1958, pages 848 to 853.

The introduction of SH-groups into collagens can however, occur thereby, that one applies SH-group-modified gelatines or a correspondingly regenerated oxycellulose to the collagens, or by mixing it in a gradient mixer. Gelatine is produced by chemical or enzymatic splitting of collagen and therefore has the same chemical composition. Consequently, collagenic surgical dressings, which have been treated with

SH-group-modified gelatines, have essentially the same properties as the collagens, together with the advantage, that because of the SH-groups in these materials, cross-linking occurs through oxidation.

The collagenic surgical dressings, according to the invention, can also be used in the conventional way with pharmaceutical active ingredients.

The collagens which are used as surgical dressings are available in the standard form of surgical dressings, as gauze, tissue, sponge etc. Such surgical dressings are known in the state of the art.

The collagens which have been used, show a purity expressed through the amount of carbondioxide: hydroxyprolin < 4 preferably < 3. Since hydroxiprolin exists only in collagen, it is used as the measure of the purity of the collagen.

The resorbable biopolymer is contained in the tissue bonding collagenic surgical dressing in an amount of 0,5 to 10 mg/cm² preferably 4 to 6 mg/cm². The number of SH-groups per molecule of the resorbable biopolymer can fluctuate in a wide range. It lies by gelatines with an average molecular weight from about 40 000 at approximately 2 to 7 and in average approximately at 5, with similar resorbable biopolymers in the same range.

It is known that collagens are suitable as carriers for antibiotics such as gentamycin. Also tetracyclin or other antibiotics or chemotherapeutics can be worked into SH-groups-modified collagens. This is an additional effect, which can be reached with the surgical dressing according to the invention.

The production of collagens:

Fresh beef sinew freed from all layers of pigment and muscle rests are homogenized and an amount that equals 100 g dried weight was extracted in 3 L 0,05 M citrate buffer (pH 3,7) for 24 hours. Afterwards they are subjected to dialysis for 12 hours in 1% acetic acid.

The tissue which had been suspended in 3 L of 1% acetic acid, is then incubated at 15°C under constant stirring with pepsin in a relation collagen: pepsin = 50:1.

The composition with the 1% acetic acid is then thinned to 5 liters and freed from the undissolved sinew fragments by centrifuge.

The viscous collagen solution is then dialysiert against alkalinized tap water (pH 8.0) and then centrifuged sharply. The residue is again then dissolved in 5 liters of 1% acetic acid and dialysed. This procedure is repeated until the factor carbondioxide to hydroprolin < 3 is reached. After the final dialysation a 1,5% collagenic solution is produced using 0,05% acetic acid, which is then used for the final tests.

The production of SH-modified gelatines, SH-collagens or SH-regenerated oxycellulose:

1000 ml of a gelatine solution (this requirement applies analogously for 1,5% collagenic solutions or a suspension of 50 g collagen or regenerated oxy-cellulose) are added at pH 7,0 to 318 mg acetylhomocysteine acidthiolactone, then 340 mg AgNO_3 are

added, whereby the solution is held at pH 7,0 through the addition of NaOH.

After two hours the solution is brought with 1n HCl to pH 2,5 and thiourea is added in excess. The silverions are removed by cation exchanger and the solution is dialysed under carbondioxide. From the resulting solution one then produces the modified SH-gelatines as well as the modified SH-collagens in a concentration of one percent for the following experiments.

The regenerated oxycellulose is dried by lyophilization.

The production of fibrinogen solutions:

Commercial sterile fibrinogen bulk product is dissolved in sterile Acqua dest. so that a solution of 50 mg fibrinogen/ml solution results, which is then used for the following experiments.

Example 1

The production of collagen-fibrinogenic surgical dressings.

Approximately 10 ml from a 1,5% collagenic solution, which has then been sterilized by radiation, is placed under antiseptic conditions in a sterile bottle with septum and is deep frozen in a cold bath (dry ice - ethanol) while being stirred slightly. After approximately 2/3 of the solution has been frozen, 5 ml of the collagenic-fibrinogen solution (collagen: fibrinogen = 1:1) is added and again deep frozen until 2/3 of this solution is deep frozen. Then 5 ml of the fibrinogenic solution is added, deep frozen and lyophilized.

Example 2:

Production of a surgical dressing, which contains collagens and modified SH-gelatines:

10 ml of a collagenic solution (1,5%) is placed in a bottle with septum thereafter in cold bath (dry ice/ethanol) and frozen, while being lightly stirred. After approximately 2/3 of the solution is frozen, 10 ml of modified SH-gelatine solution is added, deep frozen and lyophilized. The sponge is then sterilized by radiation.

Example 3:

The production of surgical dressing containing gentamycin:

To produce surgical dressings containing gentamycin, 100 mg gentamycin is added to 100 ml of a 1% collagenic solution. This solution is then used to produce the collagen fibrinogenic surgical dressings as well as for the production of collagenic SH-gelatine surgical dressings.

Example 4:

The production of surgical dressings, which contain collagens and fibrinogens:

100 ml of a 0,5 - 1% collagenic solution is placed in a metal form measuring 10 x 10 cm, it is then lyophilized according to the usual techniques and the resulting sponge is then sterilized. Under anti-septic conditions the sterilized collagenic sponge is then sprayed with a fibrinogenic solution, whereby 0,5 to 10 mg of fibrinogen is applied per square centimetre of collagenic surface. These are then again frozen and packed under sterile conditions.

Through application of the modified tissue bonding collagenic surgical dressings according to the invention, resorption occurs in practice in a clinically reasonable time. By means of this invention large wounds, in particular those in the stomach area can be treated.