SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

**281 461**

(21) Číslo prihlášky: **1380-96**

(22) Dátum podania: **15.04.1995**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(31) Číslo prioritnej prihlášky: **P 44 14 755.4**

(51) Int. Cl[7]:

**A 61K 47/42**
A 61K 9/00
A 61K 9/22
A 61K 9/26
A 61K 9/70

(32) Dátum priority: **27.04.1994**

(33) Krajina priority: **DE**

(40) Dátum zverejnenia: **06.08.1997**

(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: **09.04.2001**

(86) Číslo PCT: **PCT/EP95/01428, 15.04.1995**

(73) Majiteľ patentu: LTS LOHMANN THERAPIE-SYSTEME GMBH, Neuwied, DE;

(72) Pôvodca vynálezu: Roreger Michael, Neuwied, DE;

(74) Zástupca: Patentservis Bratislava, a. s., Bratislava, SK;

(54) Názov vynálezu: **Kolagénový prípravok na riadené uvoľňovanie účinných látok**

(57) Anotácia:
Kolagénový prípravok je schopný riadeného uvoľňovania účinných látok v dôsledku toho, že obsahuje zmesi kolagénov nerozpustných v kyseline s rozdielnym rozdelením molekulárnych hmotností.

## Oblasť techniky

Vynález sa týka kolagénového prípravku určeného na riadené uvoľňovanie farmakologicky alebo kozmeticky účinných látok.

## Doterajší stav techniky

Na prípravu foriem podávania farmakologicky alebo kozmeticky účinných látok sa používa celý rad polymérov, ktoré majú každej príslušnej forme podávania prepožičať vlastnosti žiadané pre dané miesto použitia. Prostriedky na ošetrenie rany a implantabilné materiály je nutné prispôsobiť povrchu príslušného miesta aplikácie a telové bunky, ako sú napr. keratinocyty fibroplasty a bunky endotelu by nemali brániť ich funkcii a aktivite. Spektrum použiteľných polymérov sa preto v týchto prípadoch obmedzuje na také, ktoré majú v styku s väzivom výbornú kompatibilitu (znášanlivosť) a obzvlášť, ktoré sú biologicky odbúrateľné.

Medzi polymérmi prichádzajúcimi pritom do úvahy má už dlhý čas zvláštne miesto kolagén, hlavný proteín väzivového tkaniva, a to pre biologickú znášanlivosť a odbúrateľnosť z neho vyrobených foriem podávania. Kolagénové preparáty sa v prevažnej miere nasadzujú na pokrytie rán bez ďalších prídavkov. Samozrejme nechýbali ani pokusy vložiť do kolagénových matríc v najrôznejšej forme biologicky aktívne látky a ovplyvniť druhom, štruktúrou a zložením matrice uvoľnenie týchto látok, po ktorom spravidla nasleduje rozpustenie a/alebo enzymatické odbúranie kolagénovej nosnej matrice.

Na prípravu kolagénových matríc, opisovanú napr. v patentoch US 5 024 84L, US 4 789 663 US 4 774 09L, US 4 563 350, US 5 246 457 alebo EP 429 438, sa spravidla použijú roztoky v kyseline rozpustného kolagénu bez telopeptidov a z týchto roztokov sa s pomocou dialýzy posunutia hodnoty pH alebo iných postupov získajú rekonštituované fibrily, ktoré sa spracujú potom prednostne na pórovité matrice s pomocou rôznych postupov. Tieto prípravky môžu síce mať výbornú biokompatibilitu, pretože sa skladajú z čistého kolagénu, majú však nevýhodu, že len v obmedzenej miere umožňujú retardáciu uvoľňovania účinnej látky, čo je podmienené použitím rozpustného kolagénu.

Túto retardáciu uvoľňovania je možné dosiahnuť znížením rozpustnosti kolagénovej matrice s použitím zosieťovacích a viazacích prostriedkov, opísaných napr. v US 4 409 332 DE 2 843 963, WO 93/00890 alebo WO 85/04413 lakovacích prostriedkov opísaných v DE 38 41 397, alebo s použitím kombinácie vo vode rozpustného kolagénu s inými polymérmi prednostne s prírodnými aniontovými polymérmi a ich derivátmi. V každom z opísaných prípadov je však nutné v dôsledku pridávania ďalších komponentov vziať do úvahy aj ďalšie (dodatočné) toxikologické riziká, ktoré nie je možné podceniť najmä pri použití známych zosieťovacích prostriedkov pre kolagén.

Ďalšia možnosť retardácie uvoľňovania účinných látok je opísaná v EP 518 697, pri ktorej sa vyrobia lamináty z vodorozpustného a/alebo vodonerozpustného kolagénu, ktoré pozostávajú z viacerých rezervných vrstiev s obsahom účinne látky a z jednej vrstvy retardujúcej uvoľňovanie účinnej látku. Tieto lamináty by mohli v porovnaní so skôr vymenovanými preparátmi umožniť retardáciu uvoľňovania pri minimálnom toxikologickom riziku, majú však tú nevýhodu, že sú extrémne náročné na výrobu a že držanie vrstiev na sebe je možné dosiahnuť len pri „vlhkých" filmoch. Suché filmy, bezpodmienečne nutné vzhľadom na náchylnosť účinných látok k rozkladu, nie je možné spojiť na lamináty tohto druhu.

Retardácia uvoľňovania účinných látok nemusí byť však žiadaná v každom prípade. V EP 224 453 je opísaná kolagénová matrica pozostávajúca z väčšej časti z vodonerozpustného retikulovaného kolagénu a navyše obsahuje vodorozpustný neretikulovaný kolagén. V kozmetických prípravkoch, ako sú napr. masky na tvár, funguje tento rozpustný kolagén ako aktívna látka, ktorá sa po aplikácii v dôsledku prirodzenej vlhkosti kože alebo v dôsledku extrémneho zvlhčenia prípravku vylúhuje a začne pôsobil na kožu. Na farmaceutické účely je možné do takéhoto prípravku zapracovať účinné látky, ktoré sa po aplikácii spolu s rozpustným kolagénom veľmi rýchlo z kolagénovej matrice vylúhujú a uvoľnia. Takýto kolagénový prípravok môže potom byť užitočný, ak sa žiada a je účelné rýchle uvoľňovanie.

Boli teda opísané najrôznejšie spôsoby mechanizmov retardovania alebo urýchľovania uvoľňovania účinných látok. Avšak každý z týchto kolagénových prípravkov ponúka podľa stavu techniky na základe dopredu pevne daného zloženia len jedinú možnosť ovplyvnenia uvoľňovania, a tým aj jediný dopredu daný profil uvoľňovania, ktorý je vždy prispôsobený riešeniu jediného špecifického problému jednému určitému princípu terapie alebo jednému určitému ochoreniu. So žiadnym kolagénovým prípravkom podľa stavu techniky nie je možné dosiahnuť cieleného a pritom mnohotvárneho riadenia uvoľňovania účinnej látky, t. j. variabilného a individuálneho prispôsobenia kinetiky uvoľňovania účinných látok práve sa vyskytujúcim rôznym (odlišným) problémom, pričom je nutné brať adekvátny ohľad na faktory, ako sú rozdielne vlastnosti účinných látok ako aj rozdiely vo vstupe účinku a čase účinku.

## Podstata vynálezu

Úlohou predloženej prihlášky vynálezu teda bolo nájsť taký kolagénový prípravok, ktorý by bol nielen vhodný pre určitú účinnú látku, určitú kombináciu účinných látok alebo pre určitý profil uvoľňovania, ale ktorý by umožňoval v širokom rámci najrôznejších použití bezpečné a na príslušný problém orientované riadenie uvoľňovania účinných látok.

Prekvapivý spôsob riešenia úlohy bol nájdený v kolagénovom prípravku na riadené uvoľňovanie účinných látok, ktorý obsahuje zmesi v kyseline nerozpustných kolagénov s rozdielnym rozdelením molekulárnych hmotností.

Jedno vyhotovenie predpokladá, že kolagénový prípravok obsahuje rôzne účinné látky. Môže obsahovať aj pomocné látky, ako sú prostriedky na reguláciu viskozity, spojovacie prostriedky, prostriedky na udržovanie vlhkosti, zmäkčovadlá, urýchľovače penetrácie, konzervačné prostriedky, dezinfekčné prostriedky, regulátory pH, antioxidanty, stabilizátory účinných látok, oleje, tuky, vosky, stabilizátory emulzií, vonné látky, farbivá a/alebo inertné plnivá.

Jedno výhodné vyhotovenie predpokladá, že nerozpustný kolagén je bez telopeptidov, natívny nezosieťovaný kolagén typu 1. Môže ísť pritom o nerozpustný kolagén, ktorý je produktom získaným alkalickým rozkladom z teľacej kože.

Ďalej kolagénový prípravok môže byť vo forme prášku, púdru, mikročastíc, vlákien, vločiek, peny, ihličiek, tyčiniek, tabliet, gélu (želé), krémov, vrátane filmov alebo laminátov.

Na docielenie žiadanej kinetiky uvoľňovania môže kolagénový prípravok obsahovať tiež najrôznejšie formy lie-

čív. Prednosť je dávaná bioadhezívnemu kolagénovému prípravku.

Postup výroby kolagénového prípravku môže zahŕňať sušenie rozstrekovaním, mrazením, poťahovaním alebo liatím s následným sušením, postupmi separácie a koacervácie fáz, komprimovanie alebo plnenie do nádob (schránok).

Podľa postupu je možné ďalej uvoľňovanie účinných látok ovplyvniť a/alebo riadiť zmiešavacím pomerom v kyseline nerozpustných kolagénov s rozdielnym rozdelením molekulárnych hmotností. Ďalej podľa použitého postupu je možné uvoľňovanie účinných látok riadiť rozpúšťaním alebo napúčaním alebo eróziou kolagénového prípravku. Ďalšou možnosťou riadenia uvoľňovania účinných látok je použitie biologického odbúrania kolagénového prípravku.

Použitie kolagénového prípravku podľa vynálezu spočíva v riadenej aplikácii účinnej látky do rany. Použitie však môže byť tiež smerované na riadenú aplikáciu účinnej látky na neporušenú kožu. A konečne môže byť kolagénový prípravok použitý na implantovanie alebo injekčné vstrekovanie do živého organizmu.

Kolagénové prípravky na uvoľňovanie účinných látok sú podľa stavu techniky väčšinou vyrábané z kolagénu rozpustného v kyseline, t. j. z kolagénu, ktorý sa v zriedených kyselinách rozpustí pri pH 2 na číry roztok. Tento kolagén rozpustný v zriedených kyselinách môže byť izolovaný najrôznejšími postupmi z celého radu tkanív živočíšneho a rastlinného pôvodu.

Naproti tomu v prípade kolagénu použitého podľa vynálezu sa jedná o kolagén v kyseline nerozpustný, ktorý (ak je vo vodnej disperzii) nie je možné uviesť do roztoku ani prídavkom koncentrovanej kyseliny octovej. Tento nerozpustný kolagén je najmä natívny kolagén, ktorý je z väčšej časti kolagénom typu I a z menšej časti kolagénom typu III. Označenie natívnu kolagén sa vzťahuje na molekulu kolagénu s nezmenenou tripelhelikálnou (trihelikálnou) terciárnou štruktúrou.

Nerozpustný kolagén podľa vynálezu je možné získať modifikáciou postupov, opísaných napr. v DE-OS 3034273, US 4 021 522 alebo DE-OS 27 16 602, a to alkalickým rozkladom biomateriálu rôzneho pôvodu. Ako počiatočný materiál slúži prednostne koža z teľaťa starého 6 mesiacov. Oproti obvykle používaným tkanivám a častiam tiel hovädzieho dobytka, prasiat a koní je tým zaistené, že je k dispozícii počiatočný materiál definovanej stálej akosti, čo zase zaisťuje spoľahlivú reprodukovateľnosť jednotlivých krokov postupov, ktoré sú opísané ďalej a v príklade 1 podrobne znázornené. Teľacie kože sa najskôr mechanicky zbavia chlpov a tuku. Potom sa extrahujú a odstránia (odhodia) rozpustné kolagény a nekolagénové rozpustné časti väzivového tkaniva. V ďalšom kroku sa väzivové tkanivo vyčiní najskôr vodným roztokom alkalického hydroxidu, výhodne hydroxidu sodného, a alkalického sulfátu, výhodne síranu sodného, a na to sa pôsobí vodným roztokom alkalického sulfátu na vylúhovanie kožného tuku a na riadené napúčanie kolagénových vlákien. Pri tom sa odštiepia tiež koncové nehelikálne časti kolagénovej molekuly, takzvané telopeptidy, ktoré sú zodpovedné za antigénové vlastnosti xenogénnych kolagénov. Ďalej pôsobením roztoku alkalického hydroxidu/alk.sulfátu alebo čistého alkalického sulfátu sa v závislosti od koncentrácie a času pôsobenia roztokov odštiepi definovaná časť intermolekulárnych kolagénových väzieb z vlákien napúčaného väzivového tkaniva. Intramolekulárne väzby kolagénu nie sú narušené, takže helikálna štruktúra molekuly zostáva nedotknutá. Rozložené väzivové tkanivo sa v niekoľkých stupňoch premyje vodou a zriedenými kyselinami, vyčistí a neutralizuje, potom sa mechanicky rozdrobí a disperguje vo vode.

Rozhodujúcim krokom na izolovanie v kyseline nerozpustného kolagénu podľa vynálezu, majúceho rôzne (rozdielne) rozdelenie molekulárnych hmotností, je cielené alkalické štiepenie intermolekulárnych väzieb kolagénu. Ak necháme napr. pôsobiť vodný roztok 9,75 % hydroxidu sodného a 9,2 % síranu sodného 48 hodín na napúčané väzivové tkanivo, potom po dispergovaní vo vode nerozpustný kolagén po vyhodnotení oproti chromatogramu s kalibrovacím proteínom vykáže strednú molekulárnu hmotnosť cca 420 000 (s použitím kvapalinovej chromatografickej analýzy: kolónový systém Biosil TSK-400 + Biosil TSK-125; eluent 0,5 m pri amoniumacetátovom pufri s pH 6,7: detektor UV 275 nm, rozsah citlivosti s rozlíšením 0,02). Ak však vyčiníme naproti tomu napúčané väzivové tkanivo len 12 hodín s vodným roztokom len 5 % hydroxidu sodného a 9,2 % síranu sodného, potom sa rozštiepi medzimolekulárnych väzieb jednoznačne menej, a po disperzii vo vode získané molekulové agregáty vykážu pri analýze strednú molekulárnu hmotnosť cca 2.500.000. Tieto rozdiely sa prejavujú predovšetkým na chovaní pri tečení, a tým na spracovateľnosti disperzií nerozpustných kolagénov. Zatiaľ čo disperzia 5 % nízkomolekulárneho nerozpustného kolagénu je pomerne hustá, ale ešte voľne tečúca masa, pri disperzii viacmolekulárneho nerozpustného kolagénu je hranica tečenia pri cca 2,5 %.

Teda koncentrácia a čas pôsobenia hydroxidu sodného sú variabilnými faktormi rozkladného pochodu, ktorých menením je možné dosiahnuť príslušné odlišné rozdelenie molekulárnych hmotností. Čím vyššia je koncentrácia hydroxidu sodného a/alebo čím dlhší je čas jeho pôsobenia, tým menšia je stredná molekulárna hmotnosť izolovaného, v kyseline nerozpustného kolagénu, a naopak. Aby sme si mohli znázorniť súvislosť medzi dosiahnuteľnou molekulárnou hmotnosťou a spomínanými podmienkami rozkladu (napr. v tvare krivky), musíme mať jeden faktor konštantný, teda koncentráciu alebo čas pôsobenia, zatiaľ čo druhý budeme meniť. Toto je síce v podstate možné, avšak z výrobných a prevádzkovo-technických aspektov málo účelné, pretože napr. voľná variácia času pôsobenia nie je spravidla možná. Pri veľmi dlhom čase pôsobenia a zodpovedajúcej nízkej koncentrácii hydroxidu by sa napr. predĺžil čas chodu strojov a nasadenie personálu, čo by nebolo prijateľné z aspektu prevádzkových nákladov. Na druhej strane krátke časy pôsobenia, podmienené nutným zvýšením koncentrácie hydroxidu sodného, vedú ku zvýšenému opotrebovaniu zariadení, ako napr. systémov prívodov a filtrov, čo tiež nie je možné doporučiť z dôvodov s tým spojeného zvýšenia nákladov. Potrebný čas pôsobenia a koncentrácie je teda nutné pre každý problém stanoviť individuálne empiricky tak, aby predstavovali optimum ako z pohľadu požiadaviek na formu liečiva, a najmä na kinetiku uvoľňovania účinných látok, tak aj z ekonomických aspektov.

Rozdiely v rozdelení molekulárnych hmotností nerozpustných kolagénov malú zreteľný vplyv na vlastnosti kolagénových prípravkov, vyrobených z nich sušením. V príklade 2 je znázornené, že peny pripravené sušením vymrazovaním z nerozpustných kolagénov s rozdielnym rozdelením molekulárnych hmotností majú v závislosti od pomeru zmiešavania veľmi rozdielne rozpadové vlastnosti. Zatiaľ čo peny zo 100 % nízkomolekulárneho nerozpustného kolagénu v umelom výronku z rán (sekrétu) s pH 6,4 sú po 45 minútach úplne rozpadnuté, peny zo 100 % vysokomolekulárneho nerozpustného kolagénu nie sú pri rovnakých podmienkach rozpadnuté ani po 10 dňoch.

Príklad ukazuje, že použitie vysokomolekulárnych kolagénových agregátov má na penu jasne stabilizujúci vplyv, čo je vyjadrené spomalenou absorbciou sekretu a napúča-

ním a veľmi silne zbrzdeným rozpadom. Stabilizácia formy (tvaru) v dôsledku vysokého stupňa prirodzeného zosieťovania kolagénu má predovšetkým z toxikologického pohľadu tú rozhodujúcu prednosť, že sú zbytočné dodatočné manipulácie na spevnenie štruktúry, ako je napr. činenie alebo zosieťovanie. Produkt získava stabilitu tvaru len tým, že zostáva zachovaná pôvodná kvartérna štruktúra kolagénu tak, ako sa vyskytuje v koži.

Kolagénové peny, ktoré boli kedysi pripravované z jediného základného typu nerozpustného kolagénu, majú tiež zreteľné rozdiely, a to napr. vo vzťahu k sekrétu vychádzajúcemu z rany. Samozrejme tieto mono-prípravky, ako bolo na počiatku vysvetlené, môžu len v špeciálnych jednotlivých prípadoch vyhovieť súhre (profilu) požiadaviek na kolagénový produkt, ktorá je výsledkom jedného určitého účelu použitia. Naproti tomu predložený vynález ponúka dvojitú možnosť ako vždy presne upraviť vlastnosti kolagénového prípravku podľa daného profilu požiadaviek. Prvou možnosťou je nestupňovito (plynule) a vo veľmi širokom rámci meniť rozdelenie molekulárnych hmotností nerozpustného kolagénu cieleným riadením štiepenia medzimolekulárnych väzieb. Po druhé, zmiešaním týchto variácií nerozpustného kolagénu s rôznym rozdelením molekulárnych hmotností je možné nastaviť (zostaviť) požadované vlastnosti produktu. To bude jasnejšie pri vykonaní už spomínaného príkladu 2, tykajúceho sa rozkladu pien vysušených mrazením, pri ktorom sa pred mrazením vždy v rôznych pomeroch zmieša nerozpustný kolagén so strednou molekulárnou hmotnosťou cca 420.000 s nerozpustným kolagénom so strednou molekulárnou hmotnosťou cca 2.500.000. Časy rozpadu pri rôznych hodnotách pH majú stupňovité skrátenie pri stupňovitom zvyšovaní percentuálneho podielu nerozpustného kolagénu s nižšou strednou molekulárnou hmotnosťou.

Presné nastavenie vlastností produktu na terapeuticky optimálny požadovaný profil má význam predovšetkým v terapii s farmaceutickými účinnými látkami.

Kolagénový prípravok vyrobený podľa vynálezu nachádza uplatnenie prednostne na koži, na vonkajších aj vnútorných ranách, ako aj na vnútorných telesných tkanivách a dutinách po implantácii alebo injekcii. Preto na vloženie do kolagénového prípravku prichádzajú do úvahy účinné látky prednostne na dermálnu a transdermálnu aplikáciu, účinné látky na ošetrenie rán a podporu ich hojenia, ako aj účinné látky obvykle podávané s prípravkami pre implantáciu alebo injekcie.

Na dermálne ošetrenie lokálnych ochorení kože sa používajú lokálne anestetiká, lokálne antibiotiká, antiseptiká, antimykotiká, antihistaminiká, svrbenie utišujúce liečivá, keratolytiká a leptavé liečivá, virustatiká, antiskabiotiká, steroidy ako aj rôzne látky na ošetrenie akné, psoriázy a solárnej dermatitídy. K účinným látkam aplikovaným intradermálne patria napr. steroidálne a nesteroidálne antireumatiká, prekrvujúce látky alebo vasoprotektory a konstriktory na ošetrenie cievnych ochorení. K transdermálne aplikovateľným účinným látkam patria napr. neuroleptiká, antidepresíva, upokojujúce látky, hypnotiká, psychostimulanty, analgetiká, svalové relaxanty, antiparkinsonové prostriedky, gangliové biokátory, sympatomimetiká, alfa-sympatolytiká, beta-sympatolitiká, antisympatotoniká, antidiabetiká, liečivá koronárnych ciev, antihypertoniká, antiastmatiká alebo diuretiká. Kolagénový prípravok podľa vynálezu je použiteľný na koži tiež v kozmetických prípravkoch, vo forme napr. penových masiek alebo filmov na ošetrenie napr. zostarnutej kože, vrások alebo nečistej pleti, alebo v starostlivosti o telo, odstraňovanie chĺpkov, na zmiernenie potivosti alebo na ochranu pred žiarením (svetlom).

K účinným látkam prichádzajúcim do úvahy na použitie v kolagénových prípravkoch podľa vynálezu na vonkajšie a vnútorné rany patria prednostne látky zastavujúce krvácanie, medzi nimi zvláštny význam má kolagén sám, ďalej látky čistiace rany, ako sú napr. enzýmy, antiseptiká, dezinfikujúce látky a antibiotiká, ako aj účinné látky podporujúce liečenie rán, ktorými sa vybudí granulácia, indukuje nové tvorenie ciev alebo podporuje epitelizáciu. Medzi účinnými látkami podporujúcimi liečenie rán nadobúdajú vzrastajúci význam biologicky aktívne peptidy a proteíny, majúce vysoké aktivity aj v nepatrnej koncentrácii, a väčšinou sú vyrábané rekombinačnými technológiami. K týmto látkam, pre ktoré je kolagénový prípravok podľa vynálezu obzvlášť vhodný nosič a predávací systém, patria takzvané rastové faktory, ako je Platelet derived growth factor (PDGF), Epidermal growth factor (EGF). Platelet derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), acidic Fibroblast growth factor (aFGF), basic Fibroblast growth factor (bFGF), Transforming growth factor alpha (TGF alpha), detto beta (TGF beta), Keratinocyte growth factor (KGF), Insuline-like growth factors 1 a 2 (IGF1, IGF2), ako aj Tumor necrosis factor (TNF).

K účinným látkam podávaným parenterálne prostredníctvom kolagénového prípravku podľa vynálezu patria napr. antibiotiká, antiseptiká, anestetiká, analgetiká s rôznou účinnosťou, cytostatiká, hormóny, steroidy, cytokíny ako napr. interleukíny, interferóny a faktory stimulujúce kolónie, faktory na uvoľňovanie a zabraňovanie uvoľňovaniu hormónov, prostanglandíny, enzýmy ako aj rastové faktory, najmä osteoinduktívne účinné faktory na rast kostí.

Jednou z najdôležitejších požiadaviek na vývoj prípravkov obsahujúcich účinné látky je nájsť také formulácie, ktoré by uvoľňovali účinnú látku tak, že sa dosiahne optimálny účinok, a tým aj optimálna terapia. Väčšina účinných látok, najmä spomínané biologicky aktívne peptidy a proteíny, majú v tele len krátky polčas, a preto musia byť podávané viackrát denne.

Preto sa vzrastajúcemu významu tešia nosiče účinných látok, ktoré účinnú látku brzdia alebo úplne riadia jej uvoľňovanie. Kolagénové prípravky podľa predloženého vynálezu poskytujú možnosť s pomerne malým počtom základných formulačných prvkov vyvinúť také nosné (nosičové) systémy, ktoré sú veľmi flexibilné v možnostiach použitia a utvárania a ktoré je možné veľmi presne prispôsobovať pre požadované riešenie problému. Mechanizmy, prepožičiavajúce kinetike uvoľňovania účinnej látky jej charakteristiku, môžu byť cielene riadené zmiešavaním nerozpustných kolagénov s rôznou molekulárnou hmotnosťou a tvarovaním kolagénového prípravku. Týmito faktormi sú ovplyvňované vedľa štruktúry a hustoty polymérovej kolagénovej kostry tiež počet a rozdelenie hydrofilných, hydrofóbnych a iontových väzbových miest pozdĺž celej kostry polyméru. Pretože účinná látka môže byť nielen uzatvorená v dutinách kolagénového prípravku podľa vynálezu, ale aj adsorbovaná na povrchu kolagénovej kostry, sú sila väzby medzi kolagénom a účinnou látkou, a tým aj spôsob uvoľňovania, rozhodujúcou mierou určované iontovými vzťahmi, ako aj hydrofilným a hydrofóbnym vzájomným pôsobením.

Pri dermálnej, interdermálnej a transdermálnej aplikácii účinnej látky pomocou kolagénového prípravku podľa vynálezu majú vplyv na priebeh uvoľňovania vedľa štruktúry, hustoty a väzbovej aktivity kolagénového prípravku aj rozpustnosť účinnej látky v prípravku, stupeň nasýtenia ako aj difúzna rýchlosť účinnej látky vnútri prípravku.

Pri použití kolagénových prípravkov na prenos účinnej látky na vonkajšie alebo vnútorné rany, alebo pri ich použití na implantáciu alebo injekciu, pristupuje ešte jeden ďalší faktor.

V uvedených prípadoch použitia kolagénové prípravky podľa vynálezu prichádzajú do styku s telovými tekutinami. Preto ako možnosť riadenia uvoľňovania, spomínanú už v príklade 2, je možné využiť rozsah absorpcie tekutín v kolagénovom prípravku, a tým aj napúčanie a rozpad tohto prípravku. Vedľa rozpadu koladénového prípravku ako riadiaceho mechanizmu prichádzajú na riadenie uvoľňovania pri styku s telovou tekutinou predovšetkým do úvahy vylúhovanie účinnej látky z kolagénového prípravku telovou tekutinou ako aj tekutinou sprostredkovaná difúzia účinnej látky z jadra kolagénového prípravku na jeho povrch. Mimo to uvoľňovanie je ovplyvňované biologickým odbúravaním kolagénového prípravku, a to hydrolýzou a enzymatickým pôsobením pri styku s telovou tekutinou. Na príklade 2 už bola znázornená veľká šírka vzájomných účinkov medzi tekutinou a prípravkami zo zmesi nerozpustného kolagénu s rôznym rozdelením molekulárnych hmotností. Z príkladov 3 a 4 je zrejmé ako ticto vzájomné pôsobenia v spolupôsobení jedného alebo viacerých spomínaných faktorov ovplyvňujú kinetiku uvoľňovania účinnej látky. Je zrejmé, že kinetiku uvoľňovania účinnej látky význačne určuje zmiešavací pomer nerozpustného kolagénu s rozdielnym rozdelením molekulárnych hmotností. Tým je umožnené kolagénový prípravok cielene prispôsobiť pre požadované údaje pri danej účinnej látke a dopredu stanovenom uvoľňovaní v čase, aby sa dosiahlo terapeuticky optimálne dávkovanie účinnej látky v predpokladanom čase použitia. Ak má byť účinná látka prenesená v čase užívania 24 až 48 hodín, a to pri forme lieku zvolenej v príklade 3 a 4 a s prípravkom opísaným v príklade 1 z nerozpustného kolagénu s rozdielnym rozdelením molekulárnych hmotností, potom pomer zmiešavania nízkomolekulárneho a vysokomolekulárneho kolagénu by nemal byť menší ako 3: 1. Ak má na druhej strane dôjsť k rovnomerne udržiavanému uvoľňovaniu účinnej látky z porovnateľnej formy lieku v čase podávania 7 až 14 dní, potom tento zmiešavací pomer nízkomolekulárneho a vysokomolekulúrneho nerozpustného kolagénu by nemal byť väčší ako 1 : 3.

V príkladoch boli skúmané vedome len čisté kolagénové prípravky plus účinná látka, aby sme doložili možnosti riadenia prípravkov zo zmesi nerozpustného kolagénu s rozdielnym rozdelením molekulárnych hmotností bez ovplyvnenia inými pomocnými látkami. V praxi sa však bez ďalších, vo vode rozpustných alebo dispergovateľných aditív vôbec nezaobídeme, pretože vedľa nárokov na uvoľňovanie účinnej látky sa spravidla kladú tiež nároky podľa cieľa použitia - na vlastnosti potrebné na manipuláciu a stabilitu kolagénového prípravku s účinnou látkou.

Takýmito pomocnými látkami môžu byť prídavné polyméry, ktoré slúžia napr. ako prostriedky na reguláciu viskozity v prípade kvapalných prípravkov alebo ako spojivá v prípade pevných prostriedkov. Sú nimi napr. deriváty celulózy, škrobu, galaktomanánu, dextrány, rastlinné polysacharidy ako algináty, pektíny, karrageenán alebo xanthán, chitosan, proteíny, glykoproteínu, proteoglykány, glukosamínglykány, polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidón, zmesové polymerizáty vinylpyrrolidón-vinylacetát, polyetylénglykol, polyakryláty a polymetakryláty, polylaktidy a polyglykosidy ako aj polyaminokyseliny.

Kolagénový prípravok môže obsahovať tiež ďalšie pomocné látky:
- prostriedky na udržiavanie vlhkosti, ako sú napríklad glycerín, sorbitol, polyetylénglykol, polypropylénglykol
- zmäkčovadlá, ako sú napríklad estery kyseliny citrónovej, vínnej, alebo estery glycerínu;
- urýchľovače penetrácie, ako sú napríklad alkylsulfáty, alkysulfonáty, alkalické mydlá, soli mastných kyselín a viacmocných kovov, betaíny, aminoxidy, estery mastných kyselín, mono-, di- alebo triglyceridy, alkoholy s dlhým reťazcom, sulfoxidy, estery kyseliny nikotínovej, kyselina salicylová, N-metylpyrrolidón, 2-pyrrolidón alebo močovina:
- konzervačné prostriedky, ako sú napr. p-Cl-m-Kresol, fenyletylalkohol, fenoxyetylalkohol, chlórbutanol, metylester kyseliny 4-hydroxybenzoovej, jej propylester, benzalkoniumchlorid, cetyl- pyridíniumchlorid, diacetát alebo diglukonát chlór- hexidínu, etanol alebo propylénglykol:
- dezinfekčné prostriedky, ako sú napríklad halogény ako Polyvidon-jód, halogénové zlúčeniny ako chlórnan sodný alebo tosylchlorid-nátrium, oxidačné prostriedky ako peroxid vodíka alebo permanganát draselný, zlúčeniny arylortuti ako fenylmerkuriborát alebo Merbromin, zlúčeniny alkylortuti ako Thiomersal, organociničité zlúčeniny ako tri-n-butyl-cínbenzoan, zlúčeniny striebra ako acetylstanát strieborný, alkoholy ako etanol, n-propanol alebo isopropanol, fenoly ako tymol, o-fenylfenol, 2-benzyl-4-chlórfenol, hexachlorofén alebo hexylresorcin alebo organické zlúčeniny dusíka ako 8-hydroxychinolín, Chlorquinaldol, Cloquinol, ethakridír, hexetidín, chlórhexidín alebo Ambazon;
- regulátory pH, ako sú napríklad glycínový, citrátový, boritanový, fosfátový pufer (ústojný roztok) alebo pufer s kyselinou citrónovou a fosfátom;
- antioxidanty, ako sú napríklad kyselina askorbová, askorbylpalmitát, tokoferolacetát, propylgalát, butylhydroxianisol alebo butylhydroxytoluén;
- stabilizátory účinných látok, ako je mannitol, glukóza, laktóza, fruktóza, sacharóza;
- emulgovateľné pomocné látky, ako sú oleje, tuky a vosky;
- vonné látky, farbivá, čistiace látky, prostriedky starostlivosti o pleť;
- stabilizátory emulzií ako napr. neionogénne emulgátory, amfoterné, katiónaktívne a aniónaktívne emulgátory;
- plnivá ako napr. mikrokryštalinická celulóza, alumíniumoxid, kysličník zinočnatý, titaničitý, mastok, kysličník kremičitý, kremičitan horečnatý, magnézium-alumíniumsilikát, kaolín, hydrofóbne škroby, stearát alebo fosfát vápenatý.

Pomocné látky je možné napr. ešte pred procesom formovania liečiva rozpustiť, dispergovať alebo emulgovať v disperziách nerozpustného kolagénu. Môžu byť však tiež vnášané spôsobom známym a obvyklým pre príslušný proces formovania až v ďalších stupňoch vytvárania liečiva, a to až po ukončení jedného z ďalej uvedených primárnych procesov vytvárania liečiva.

Formy vyhotovenia umožňujúce využitie zmesí nerozpustného kolagénu s rôznym rozdelením molekulárnych hmotností na riadený prenos účinných látok sú nespočitateľné, a nie je preto možné ich všetky opísať.

Formy vyhotovenia kolagénového prípravku podľa vynálezu môžu byť vyrobené rôznymi, pre odborníka bežnými metódami zo zmesí disperzií nerozpustného kolagénu s rôznym rozdelením molekulárnych hmotností, a to s použitím napr. sušenia rozprašovaním, sušenia vymrazovaním, poťahovania alebo odliatia s následným sušením, postupov separácie fází a koacervácie pre častice a emulgované kvapôčky na sušenie, komprimovanie, ako aj jednoduchého plnenia napr. do túb a vo výslednej forme napr. prášku, púdru, mikročastíc, vlákien, vločiek, pien, špongie, ihlíc, tyčiniek, tabliet, želé, krémov, jednovrstvových filmov a laminátov. Prednostne používanými formami vyhotovenia sú

rozstrekovanie sušených mikročastíc, vymrazovanie sušenej peny a poťahovanie vyrobené filmami vo forme gélov (želé).

Vnášanie účinnej látky do kolagénového prípravku podľa vynálezu sa môže uskutočniť tak, že účinná látka sa rozpustí alebo disperguje v hotovej zmesi disperziou nerozpustného kolagénu s rozdielnym rozdelením molekulárnych hmotností ešte pred formovacím procesom. Ak má byť zapracovaná viac ako jedna účinná látka, môžu byť tieto látky oddelene rozpustené alebo dispergované v jednotlivých frakciách nerozpustného kolagénu tiež pred zmiešavacím procesom. Ale účinnú látku je tiež možné vniesť do alebo naniesť na prípravok až po formovacom procese, a to poťahovaním, nastriekaním, impregnovaním, ponorovaním a inými adsorpčnými postupmi.

Možné formy vyhotovenia, zodpovedajúce výrobné postupy a metódy vnášania účinnej látky je však možné vzájomne kombinovať z dôvodu dosiahnutia žiadaných vlastností.

Tak napr. kolagénový prípravok podľa vynálezu môže tvoriť v telesnej tekutine rozpustné alebo prinajmenšom napučiavateľné puzdro nerozpustného kolagénu s nižšou strednou molekulárnou hmotnosťou vo forme špongie alebo filmu a v ňom sú dispergované mikročastice nerozpustného kolagénu s vysokou strednou molekulárnou hmotnosťou. Pri zapracovaní len jednej účinnej látky táto vonkajšia špongiovitá alebo filmová fáza slúži na rýchle dosiahnutie minimálnej potrebnej koncentrácie účinnej látky, s nasledujúcim pomalším rovnomernejším uvoľňovaním účinnej látky z vnútornej mikročasticovej fázy, čím sa udržuje potrebná koncentrácia účinnej látky v priebehu celého časového intervalu aplikácie. Podobných profilov uvoľňovania je možné dosiahnuť aj inými formami prípravku ako napr. ihlicami v hydrogéloch, špongiovitými emulziami olej-voda, zmesami komprimátov pre implantovateľné tablety, viacvrstvovými filmami, kombináciami filmov a pien, atď.

Podobné viacfázové prípravky je tiež možné použiť v prípadoch, keď sa požaduje uvoľňovanie rôznych účinných látok v rôznych časových bodoch a v rôznych dávkach uvoľňovania, alebo keď sa jedna alebo viac účinných látok majú uvoľňovať fázovo, t. j. s intervalmi bez uvoľňovania.

Pritom môže byť napr. účinná látka A obsiahnutá v ľahko rozpustnej, rýchlo sa uvoľňujúcej vonkajšej fáze, zatiaľ čo látka B je obsiahnutá v ťažko rozpustnej, retardujúcej a riadene sa uvoľňujúcej vnútornej fáze. Ak je požadovaný fázový profil uvoľňovania jedinej účinnej látky, môžu účinnú látku uvoľňovať vonkajšie aj vnútorné fázy, napr. s rovnakou kinetikou. Vnútorná fáza bude však v tomto prípade vybavená vrstvou nerozpustného kolagénu bez účinnej látky, a táto vrstva po rozpustení vonkajšej fázy alebo vyčerpaní účinnej látky z nej sa musí sama rozpustiť alebo napučať, aby mohlo dôjsť k uvoľňovaniu účinnej látky z vnútornej fázy. Týmto usporiadaním je možné dosiahnuť interval, v ktorom sa neuvoľňuje žiadna účinná látka.

Pri použití kolagénového prípravku podľa vynálezu na dermálnu, intradermálnu a transdermálnu aplikáciu farmaceuticky účinných látok alebo kozmetických aktívnych substancií sa dáva prednosť plochým formám vyhotovenia, ako sú filmy, membrány alebo tenké špongie. Tieto ploché formy vyhotovenia môžu pozostávať tiež z laminátu, ktorý má tiež oddeľujúce vrstvy bez účinnej látky, priepustné oddeľujúce vrstvy, regulujúce membrány a vrstvy lepidla. Do jednotlivých vrstiev alebo medzi ne je možné znovu vložiť subštruktúry, ako sú doštičky, prášok, mikročastice alebo kvapôčky oleja, aby sa dosiahla vhodná kinetika uvoľňovania jednej alebo viacerých účinných látok. Prednostne tieto jedno- či viacvrstvové kolagénové prípravky na spomínané použitie slúžia napr. na ochranu pred vyschnutím či pred vrastením klíčkov, podľa známych postupov zadnou vrstvou a na opačnej strane uvoľniteľnou ochrannou vrstvou, pričom zadná aj ochranná vrstva sa môžu skladať z materiálov bežných pre odborníka, aké sa používajú napr. pri formovaní náplastí a lepiacich pások.

V jednom výhodnom vyhotovení kolagénového prípravku podľa vynálezu, určeného na vonkajšie rany aj vnútorne, je forma prípravku pórovitá, napr. penovitá alebo špongiovitá. Veľkosť pórov a štruktúra prípravku sú usporiadané tak, že je umožnené vnikanie buniek, napr. fibroblastov alebo osteoblastov, prípravku, a bunkám je pri tom dodávaná štruktúrna orientácia odvoditeľná od usporiadania kolagénu prípravku podľa vynálezu, ktoré je podobné usporiadaniu väzivového tkaniva. Vrastanie buniek môže byť nutné napr. na odbúranie prípravku alebo na prenos či ukladane látok napr. potrebných na novú tvorbu tkaniva alebo na vaskularizáciu tkaniva, ktoré má nastúpiť na miesto kolagénového prípravku podľa vynálezu.

V inom výhodnom vyhotovení určenom na použitie na vonkajšie rany alebo vnútorne sa kolagénový prípravok podľa vynálezu primiešaním pomocných látok, ako napr. karboxymetylcelulózy, kyseliny polyakrylovej, tragantu, natriumalginátu alebo hydroxypropylcelulózy, upraví tak, aby bol bioadhezívny, t. j. aby sa v dôsledku povrchových síl po určitý čas držal na povrchu tkaniva v aplikovanom mieste, a teda, aby sa tak zvýšil čas zotrvania na mieste aplikácie alebo resorbcie.

**Príklady uskutočnenia vynálezu**

Príklad 1

Získanie nerozpustného kolagénu z teľacej kože

1.1 Vyčinenie s $Ca(OH)_2$,1 % v $H_2O$ 100 h
Vyčinenie s $NH_4Cl$, 3 % v $H_2O$ 1 h
Vyčinenie s NaOH 5 % + $Na_2SO_4$ 9,2 % v H2O 12 h
Vyčinenie s $Na_2SO_4$, 1-molárny roztok $H_2O$ 0,5 h
Vyčinenie s HCl, 1 % v $H_2O$ 1,5 h
Vyčinenie s $H_2O_2$, 0,5 % v $H_2O$ 6 h

Po mechanickom rozmelnení a dispergovaní vo vode (pH 6,0) má nerozpustný kolagén strednú molekulárnu hmotnosť cca 2.500.000. Koncentrácia kolagénu činí 0,75 %.

1.2 Ako a) rozdiel
Vyčinenie s $Ca(OH)_2$, 1 % v $H_2O$ 72 h
Vyčinenie s 9,75 % NaOH + 9,2 % $Na_2SO_4$ v $H_2O$ 48 h

Po mechanickom rozmelnení a dispergovaní vo vode (pH 6,0) má nerozpustný kolagén strednú molekulárnu hmotnosť cca 420.000. Koncentrácia kolagénu je 0,75 %.

Príklad 2

Príprava lyofylizátov bez účinnej látky zo zmesí disperzií podľa 1.1 a 1.2 a stanovenia časov rozpadu v zmesiach tlmivých roztokov s rozdielnymi hodnotami pH.

Boli pripravené nasledujúce zmesi disperzií podľa 1.1 a 1.2:

| | Disperzia 1.1 | Disperzia 1.2 |
|---|---|---|
| A | 100 % | 0 % |
| B | 75 % | 25 % |
| C | 50 % | 50 % |
| D | 25 % | 75 % |
| E | 0 % | 100 % |

Hlboké výťažky s rozmermi 6 x 4 x 1,5 cm boli naplnené po 24 gramoch zmesou A až E, zmrazené šokom a v priebehu 60 minút privedené na teplotu - 50 °C. Potom boli zmesi vysušené vymrazovaním.

pri výsledných hubách (s rozmermi 6 x 4 x 0,8 cm) bol pri miernom miešaní stanovený čas rozpadu vždy v 100 ml nasledujúcich tlmivých roztokov (pufrov):

pH 3: Ústojná zmes kyselina citrónová/chlorid sodný/lúh sodný - s prídavkom fungicidu,

pH 5: Kyselina octová (0,1 molárna) octan sodný (0,2 molárny),

pH 6,4: Umelý výron z rany (bez albumínu),

pH 7,5: Hydrofosforečnan draselný (kys. f. d.)/NaOH (0,1 molárny/0,1 molárny)

Výsledky:

| Zmes | pH ústrojného roztoku (pufra) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 3 | 5 | 6.4 | 7.5 |
| A | 2 h 15 min. | > 10 d | > 10 d | > 10 d |
| B | 1 h 10 min. | 3 d | 3 d | 2 d |
| C | 1 h | 24 h | 24 h | 6 h |
| D | 20 min. | 4 h 10 min. | 4 h 30 min. | 1 h 45 min. |
| E | 2 min. | 35 min. | 45 min. | 15 min. |

Príklad 3

Príprava lyofylizátov s propylesterom kyseliny p-hydroxubenzoovej a stanovenie uvoľňovania.

V zmesiach A až E podľa príkladu 2 bolo rozpustených vždy 0,275 % (vztiahnuté na disperziu) propylesteru kyseliny p-hydroxybenzoovej. Vždy 10 g zmesi bolo vložených do hlbokých výťažkov podľa príkladu 2, zmrazených šokom, v priebehu 60 min. vychladených na - 50 °C, a potom vysušených vymrazovaním.

Od každého výsledného lyofylizátu (hmotnosť špongie cca 135 mg. teoret. obsah esteru PHB 27,5 mg) bolo vždy po cca 30 mg (teoret. obsah esteru PHB 6,1 mg) vložených do lopatkovej aparatúry a miešaných v 500 ml 0,05 N lúhu sodného pri 37 °C a 45 ot./min. Po 4 hodinách bolo odobraných vždy po 10 ml média obsahujúceho uvoľnenú látku. Obsah účinnej látky bol stanovený uv-fotometricky pri hrúbke vrstvy 1 cm oproti štandardu pri 294 nm.

Výsledky:

| Zmes | A | B | C | D | E |
|---|---|---|---|---|---|
| uvoľnená účinná látka (mg) | 2,1 | 2.7 | 3.4 | 3.8 | X |

X/ Nebolo možné stanoviť, pretože lyofylizát sa úplne rozpadol.

Príklad 4

Príprava lyofylizátov s lidokain-hydrochloridom a stanovenie uvoľňovania

V zmesiach A až E podľa príkladu 2 sa rozpustí vždy 0,042 % hmotn. (vztiahnuté na disperziu) lidokain-hydrochloridu. Vždy 24 g zmesi bolo vložených do hlbokých výťažkov podľa príkladu 2, zmrazených šokom, v priebehu 60 min. vychladených na - 50 °C a potom vysušených vymrazovaním.

Každý výsledný lyofylizát (hmotnosť špongie cca 250 mg teoret, obsah lidokain-hydrochloridu 10 mg) bol vložený do lopatkovej aparatúry a sieťkou pripevnený ku dnu nádoby. Do aparatúry bolo vložených 350 ml vody s teplotou 37 °C a premiešavaných pri 45 ot./min. Po 24 hodinách boli odobrané vzorky média obsahujúceho uvoľnenú látku. Obsah účinne látky bol stanovený pri hrúbke vrstvy 1 cm uv-fotometricky pri 262,5 nm s vyhodnotením pomocou kalibračnej krivky.

Výsledky:

| Zmes | Uvoľnená účinná látka |
|---|---|
| A | 1,2 mg |
| B | 5,1 mg |
| C | 7,4 mg |
| D | 8,8 mg |
| E | 10,0 mg |

## PATENTOVÉ NAROKY

1. Kolagénový prípravok na riadené uvoľňovanie účinných látok, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje zmesi kolagénov nerozpustných v kyseline s rozdielnym rozdelením molekulárnych hmotností.

2. Kolagénový prípravok podľa nároku 1, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje rôzne účinné látky.

3. Kolagénový prípravok podľa nároku 1 alebo 2, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje pomocné látky, ako sú prostriedky na úpravu viskozity, spojivá, prostriedky na udržanie vlhkosti, zmäkčovadlá, urýchľovače penetrácie, konzervačné prostriedky, dezinfekčné prostriedky, regulátory pH, antioxidanty, stabilizátory účinných látok, oleje, tuky, vosky, stabilizátory emulzií, vonné látky, farbivá a/alebo vnútorné plnivá.

4. Kolagénový prípravok podľa jedného z nárokov 1 až 3, **vyznačujúci sa tým**, že nerozpustný kolagén je bez telopeptidov, nativny, nezosieťovaný kolagén typu 1.

5. Kolagénový prípravok podľa jedného alebo viacerých nárokov 1 až 4, **vyznačujúci sa tým**, že nerozpustný kolagén je produktom získaným alkalickým rozkladom teľacej kože.

6. Kolagénový prípravok podľa jedného alebo viacerých nárokov 1 až 5, **vyznačujúci sa tým**, že formou vyhotovenia je prášok, púder, mikročastice, vlákna, vločky, pena, špongia, tyčinky, tablety, gély, krémy, jednoduchý film alebo lamináty.

7. Kolagénový prípravok podľa jedného alebo viacerých uvedených nárokov, **vyznačujúci sa tým**, že obsahuje kombinácie najrôznejších foriem vyhotovenia na dosiahnutie žiadanej kinetiky uvoľňovania účinnej látky.

8. Kolagénový prípravok podľa jedného alebo viacerých uvedených nárokov, **vyznačujúci sa tým**, že je bioadhezívny.

**Koniec dokumentu**