

71.163/SZE

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

Eljárás természetes kollagén folyékony közegben való
sterilizésére, a kapott természetes kollagén, az ezt tartalmazó
készítmények és alkalmazásuk

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás természetes formájú kollagén előállítására, ami abból áll, hogy a kollagént egy kettős transzverzális vágókésekkel ellátott keverőben előkezeljük, amely keverőben a keverési sebesség és a nyíróerő szabályozható, és van hozzá egy termosztát, majd a kollagént folyékony közegben sterilezzük. A találmány tárgya továbbá a steril kollagén, főleg az I-es típusú kollagén, természetes formájában, valamint gyógyszerek, és/vagy gyógyhatású anyagok, és/vagy orvosi-sebészeti és/vagy szemészeti és/vagy kozmetikai készítmények, melyek aktív anyagként csak kollagént tartalmaznak, vagy ~~melyekben a kollagén másikkal van kombinálva, valamint a kollagén alkalmazása fenti készítmények előállításában.~~

VT

PO1 2575

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda 1
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323



A2

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

71.163/SZE

Eljárás természetes kollagén folyékony közegben való
sterilizésére, a kapott természetes kollagén, az ezt tartalmazó
készítmények és alkalmazásuk

A jelen találmány tárgya eljárás kollagén előállítására, azzal
jellemmezve, hogy az eljárás során az említett kollagént sterilizzük,
a találmány tárgya továbbá az így kapott steril kollagén, valamint
a készítmények és alkalmazásuk, pontosabban a gyógyszerészeti
és/vagy gyógyhatású és/vagy orvosi-sebészeti és/vagy
szemészeti és/vagy kozmetikai készítmények és ezek használata.

A kollagént és használatát a szakirodalomban általánosság-
ban leírták [Collagen, 1, 2, 3, Marcel E. Nimni., CRC Press Inc.
(1988); Methods in Enzymology 144, szerk.: Leon W.
Gunningham (1987); Methods in Enzymology 82, szerk.: Leon W.
Gunningham (1982)].

Az közismert, hogy a kollagén egy háromdimenziós szerke-
zetű molekula, ami a legtöbb emberi és állati szövetben jelen
van, és elsősorban a bőrben, az inakban és a méhlepényben
fordul elő.

Az ismert szerepei közé tartozik, többek között a hidratálás,
a véralvadásban és a sebek gyógyulásában játszott szerepe.

Ahhoz, hogy megőrizze a hemosztatikus hatását, ahhoz ál-
talában arra van szükség, hogy a kollagén az emberi testbe való
beadás előtt megőrizze a természetes formáját [US-A-4,515-637
számú Amerikai Egyesült Államok-beli szabadalmi leírás].



Emellett a különböző felhasználásai miatt, különösen orvosi és/vagy kozmetikai alkalmazásai miatt a kollagénnek mentesnek kell lennie mindenféle fertőzéstől (vírus, baktérium, prion, stb). A kollagén sterilizését korábban különbözőképpen vizsgálták, amely módszerek az elmúlt néhány évben a kollagén természetes eredete miatt új kihívásokkal kerültek szembe (az AIDS, a Creutzfeld-Jakob szindróma, stb. átvitelének veszélye).

A kollagén szilárd formája sterilizési technikáiban etilén-oxidot használnak (FR-A-2,393,581 számú francia szabadalmi leírás) vagy besugárzást (béta vagy gamma ionizáló sugárzást), amint azt az EP-A-0,224,453 számú szabadalmi leírásban ismertették. Az utóbbi, ami kollagén alapú szivacs típus kozmetikai és gyógyszerészeti használatát ismerteti, a sterilizés száraz formáját javasolja, mivel a dokumentum szerint lehetetlen az emulziókban vagy oldatokban levő oldható természetes kollagén száraz formában való sterilizése.

Az EP-A-0,664,132 számú szabadalmi leírás egy ragasztót ír le sebészeti alkalmazás céljára, oxidatív hasítással módosított, keresztkötést nem tartalmazó kollagénre alapozva. Az ismertetett készítmény egy előnyben részesített megvalósítási módjában ismertetik, hogy oxidatív hasítással steril port készítenek a keresztkötést nem tartalmazó I-es típusú kollagénből, majd ezt a port sterilre ultraszűrt vízben oldják, oly módon, hogy kevertetés közben körülbelül 60 °C-ra melegítik. Azt specifikálják, hogy az elvégzett szabályozott melegítés alatt a kollagén elveszti a helikális struktúráját és zselatinná alakul át. Emellett elmagyarázzák,



hogy a dokumentumban említett korábbi, a technika állásának megfelelő ragasztókat, amik keresztkötéses kollagénre alapulnak, nem könnyű kezelni, és alkalmazási valamint mechanikai szilárdsági problémákat vetnek fel.

Az EP-A-0667,352 számú szabadalmi leírásban oldatban levő kollagén lúgos kezelését írják le az esetleges prionok eliminálása céljából. Abból a célból, hogy az említett prionok reziduális fertőzésének minden kockázatát elkerüljék, a dokumentumban specifikusabban ismertetnek egy eljárást, amiben a szövetből extrahált kollagént enzimes emésztéssel, vagy a kollagén láncokat összetartó kovalens kötés lúgos hasításával viszik oldatba, majd szűréssel eltávolítják a szövettörmelékeket, és az így oldatba vitt kollagént lúgos kezelésnek vetik alá.

Az FR-A-2,586,703 számú szabadalmi leírásban ismertetik átlátszó és fiziológiás gélek, vagy kollagén oldatok készítését a IV-es típusú kollagénre alapozva. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy az I-es, II-es vagy III-as típusú kollagének, mivel gyakorlatilag oldhatatlanok semleges pH-n, csak átlátszatlan szuszpenziók előállítását teszik lehetővé, és ezeket nem lehet átlátszó és fiziológiás gélek előállítására használni, anélkül hogy a kollagén molekulát kémiaiilag módosítanánk, ami valószínűleg antigénné és/vagy toxikussá teszi.

A szakirodalom ismerete és a kutatómunka lehetővé tette a jelen találmány szerzője számára, hogy demonstrálja az alábbi nehézségeket és problémákat, amik a mai napig megmaradtak a



steril természetes kollagén, pontosabban az I-es típusú kollagén készítése során:

***Kezelés**

- A természetes kollagén magas viszkozitása, ami technikai nehézségeket okoz a szűrés során, különösen a hagyományos természetes kollagén közvetlen szűrésénél.

*** Denaturálódás**

- A természetes kollagén részleges vagy teljes hődenaturációja a különböző szokásos sterilizáló kezelések során, ami a struktúrájának és/vagy jóékony tulajdonságainak, azaz például a reszorpció, mechanikai erősség vagy nedvesítés, részleges vagy teljes elvesztését okozza.

- Sugárzással (ionizáló sugárzással) vagy etilén-oxiddal végzett sterilizálás, ami a kollagénnel oldatban levő előnyös aktív adalékanyagok, azaz például az antibiotikumok tönkremenését okozza, és/vagy ami egy hagyományos, kollagénből készült gél két fázisra való szétválását okozza, aminek következtében nem lehet kereskedelmi forgalomba hozni.

- Denaturálódás a hosszantartó lúgos kezelés következtében.

*** Toxicitás és/vagy fertőződés (vírusok, prionok)**

- Reziduális etilén-oxid nyomok visszamaradása az ezzel a módszerrel sterilizett termékekben/szennyező anyagok jelenléte a nyers kiindulási anyagban.

*** Inkompatibilitás**



- pH inkompatibilitás a semleges pH-n oldható, előnyös aktív adalékanyagok, azaz például fertőtlenítő ágensek és a kollagén között, ami savas közegben oldódik.

* Galenusi készítmény

- A természetes kollagén alapú készítmény nem kielégítő megjelenési formája, mivel szálas és heterogén megjelenésű.

- A biológiai ragasztók hagyományos készítményeinek a megcélzott felhasználáshoz való alkalmatlansága (azaz például olyan készítmények, amik nem azonnal használhatók, és elkészítésükhöz túl hosszú időre van szükség).

Tehát a jelen találmány tárgya az előzőekben említett nehézségek leküzdése és az előzőekben említett problémák megoldása, főleg a kollagén folyékony közegben való sterilizése, úgy, hogy közben őrizze meg természetes formáját, valamint más, a későbbiekben említett problémák.

A jelen találmány tárgya tehát eljárás természetes formájú kollagén előállítására, ami abból áll, hogy a kollagént egy kettős transzverzális vágókésekkel ellátott keverőben előkezeljük, amely keverőben a keverési sebesség és a nyíróerő szabályozható, és van hozzá egy termosztát, majd a kollagént folyékony közegben sterilezzük.

A jelen találmány tárgya továbbá a steril kollagén, főleg az I-es típusú kollagén, természetes formájában, valamint humán- és/vagy állatgyógyászat célokra használható készítmények, amik aktív adalékanyagként csak kollagént tartalmaznak, vagy amikben a kollagén más előnyös anyagokkal van kombinálva,

amik gyógyszerészeti szempontból, a gyógyhatású anyagok szempontjából, orvosi-sebészeti szempontból és/vagy szemészeti szempontból elfogadhatók.

A jelen találmány tárgya továbbá a jelen találmány szerinti kollagén használata olyan készítmények előállításában, amiket egy emberi- vagy állati test gyógyszerekkel, és/vagy gyógyhatású anyagokkal, és/vagy orvosi-sebészeti szempontból és/vagy szemészeti szempontból való kezelésében lehet használni.

Ezek és más szempontok a szakterületen jártas szakember számára nyilvánvalóak lesznek az alábbi, részletes leírás elolvasása után.

A steril kollagén előállításának jelenleg használt módszerei a megvalósítás más, már az előzőekben említett problémáival rendelkeznek, és a mai napig nem teszik lehetővé a gyakorlatban a kollagén folyékony közegben önmagában, vagy más aktív adalékanyagok jelenlétében való olyan sterilizését, amit egyszerűen végre lehet hajtani, és főleg ami hatékonyan garantálja az így kapott kollagén sterilitását és natív természetét, ezzel megőrizve jótékony tulajdonságait.

A jelen találmány elérte ezt a célt, és tárgyát a kollagén előállítási módszere képezi, ami a nem-steril természetes kollagén kivonat (szolubilizálva és tisztítva, adott esetben pepszinnel kezelve) sterilizése előtt tartalmaz egy mechanikai előkezelést egy mixerben, azaz például egy „vágó mixerben” [DITO-SAMA 175 (LA BOVIDIA)], amit például a J.F.I. Graulhet (Franciaország) cég módosított, és fel van szerelve egy hőmérséklet-ellenőrzési rend-



szerrel. Ez az előkezelési lépés váratlanul és meglepő módon lehetővé teszi a kollagén folyékony formájának a sterilizését és természetes formájának megőrzését, amikor nem pepszinizáljuk.

Az így előállított kollagén főleg I-es típusú.

Az így előállított, főleg I-es típusú kollagén steril, és natív, természetes formájú, azaz nem változott meg a szekunder és a terciér struktúrája, és megőrizte az összes jótékony tulajdonságát, még a sterilizálás után is.

A jelen találmány szerinti kollagén jól használható számos, az alábbiakban részletesen megadott alkalmazásban:

- Humán- és állatgyógyászati alkalmazások:
gyógyszerkészítményben való alkalmazások
gyógyhatású készítményben való alkalmazások
szemészeti alkalmazások
orvosi-sebészeti alkalmazások
- Kozmetikai alkalmazások

Használható önmagában, azaz minden hozzáadott aktív adalékanyag nélkül, például egy tiszta, steril oldat formájában:

- injekciózható készítményekhez
- vagy egy másik változat szerint biológiai ragasztóként, valamint más, a későbbiekben részletezett formában

Használható kombinációs készítményekben

- alacsony pH-n, más aktív adalékanyagok hordozójaként, az adalékanyag azonnali felszabadulásának biztosítására. Ezeket az aktív adalékanyagokat előnyösen az alábbi csoportból választjuk meg: véralvadási faktorok, azaz például trombin, fertőt-



lenítőszer, azaz például metronidazol, antibiotikumok, főleg makrolidok, azaz például gentamicin, a fluorokinolonok, azaz például a pefloxacin, a gyulladáscsökkentő anyagok, azaz például a szteroid vagy nem-szteroid ágensek acilkarbonsav- vagy oxicam származékai, gombaellenes ágensek és növekedési faktorok, főleg a csontnövekedési faktorok, azaz például a szomatotropin és az epidermális növekedési faktorok, azaz például az EGF.

Azonban bizonyos specifikus alkalmazásokban, például a szemészetben vagy az olyan aktív adalékanyagot tartalmazó gyógyszerkombinációk esetében, amik inkompatibilisek a savas pH-val, mint amilyen például a vankomicin antibiotikum, hogy csak ezt a két problémát említsük, természetesen előnyös, ha a kollagénnak semleges a pH-ja.

Akkor is előnyös, hogy a kollagénnak semleges a pH-ja, ha hordozóként használjuk aktív adalékanyagok, azaz például véralvadásgátló faktorok hosszan tartó felszabadulásának biztosításához, vagy egy másik változat szerint akkor, amikor az utóbbinak az aktivitását és egy mechanikai hatást akarunk keverni. Tehát az is különösen előnyös, ha a kollagént a jelen találmány szerint használjuk.

- vagy rétegzett szilárd formákban kombinálva a két előző, savas és semleges pH-jú kombinációt, specifikus alkalmazásokban, amiket később ismertetünk.

A jelen találmány szerinti kollagén számos prezentációjának példáiként a következőket említhetjük:

- folyékony formák: gélek, főleg injekciózható gélek, cseppek, habok, permetek,
- pszeudo-szilárd formák: filmek, lemezek, membránok, kötések vagy tapaszok, stb.
- szilárd formák: porok, laminált/rétegzett szivacsok, filmek, membránok, fonalak, varratok, stb.

Az is lehetséges, hogy kihasználjuk a jelen találmány szerinti steril kollagén savassági és oldhatósági tulajdonságait gyógyszerészeti és kozmetikai készítményekben, főleg hidratáló készítményekben.

Az is lehetséges például, hogy a kollagént alacsony pH-n használjuk, a jelen találmány szerinti eljárással kapott pszeudo-szilárd formában, vagy önmagában, vagy más aktív adalékanyagokkal, azaz például E vitaminnal vagy C vitaminnal kombinálva, különösen szöveti hidratálószerként alkalmazva az epidermiszre, és aktív adalékanyag(ok) hordozójaként használva arcpakolásban.

Ezeket és más prezentációkat a leírás hátralevő részében illusztráljuk.

A jelen találmány szövegösszefüggésében:

a „természetes kollagén” szakkifejezés jelentése egy olyan kollagén, aminek a kiindulási struktúrája nem változott meg, polipeptid láncának integritása megőrződött (beleértve a telopeptidket is), és a molekula helikális struktúrája intakt maradt.

Az „atelopectid kollagén” szakkifejezés jelentése egy olyan kollagén, ami enzimes emésztés következtében limitált proteolizi-

sen ment át, egy kollagenáztól eltérő proteolitikus enzimmel, azaz például tripszinnel, papainnal, stb., vagy még inkább pepszinnel, ami a telopeptidjei eltávolítását eredményezi. Ha természetes formájú, akkor természetesen megtartja a trihelikális struktúráját.

A „steril kollagén” szakkifejezés jelentése egy olyan kollagén, ami a World Health Organization, az Európai Gyógyszerkönyv és az USA Gyógyszerkönyv (USP22) szabványai szerint steril, azaz az érintett hatóságok által elismert kritériumok alapján végzett mikrobiológiai elemzés szerint sterilnek bizonyult.

A „folyékony kollagén” szakkifejezés jelentése oldatban levő, vagy szuszpenzióban, diszperzióban vagy gélben levő kollagén.

A „pszeudo-szilárd kollagén” szakkifejezés jelentése egy gélformájú kollagén, ami nem folyik meg, és több mint 75% vizet tartalmazó kompakt és homogén tömeget képez.

A „szilárd kollagén” szakkifejezés jelentése olyan kollagén, ami 10-25%-nál több vizet nem tartalmaz, és szilárd formájú, azaz például porított, film, szivacs, membrán, stb. formájú.

A „polimerizálódásra képes természetes kollagén” szakkifejezés jelentése egy olyan természetes kollagén, amit a jelen találmány szerinti eljárás valamilyen variánsával állítottunk elő, és ami folyékony formában, vagy egy szilárd formából szolubilizálódva 37 °C-nál magasabb hőmérsékleten folyékony. Homogén tömeggé transzformálódik és „pszeudo-szilárd” formában van 37 °C-on, vagy annál alacsonyabb hőmérsékleten. Egy atelopeptid

kollagén is megtarthatja az említett polimerizálódásra való képességet.

A „szolubilizált és tisztított extraktum” szakkifejezés jelentése nem-steril kollagén alacsony (1,5-6,5, hagyományosan 3-6, előnyösen 4-5 pH érték között), amiben a szulfáthamu tartalom általában kisebb mint 2%, és a lipidtartalom általában kisebb mint 1%, 12-13,9% hidroxiprolint és 17-18,7% össz-nitrogént tartalmaz, nincsenek benne triptofán-nyomok, és a polipeptid lánc 95000 Da-nál kisebb.

Egy ilyen extraktumot szárított meszezett friss bőrből állíthatunk elő, azaz például borjú- vagy nyúl bőrből, és/vagy kötőszövetekből, főleg szarvasmarha, kecske, sertés, birka, ló, nyúl, szarvas, strucc, hal, stb. kötőszövetekből, vagy szárított vagy friss állati csontokból, szaruhártyából, vagy éppen inakból (például strucc Achilles ínből), vagy egy másik változat szerint tisztított kollagén szálakból vagy porból. Emberi eredetű méhlepényekből is extrahálható.

A jelen találmány körülményei között jól használható kivonatot számos kezelés után kapjuk meg, ami összefoglalóan az alábbi lépésekből áll:

meszezés/szór-eltávolítás/mosás/mésztelenítés/epidermisz és a bőralatti szövetek eltávolítása/feldarabolás/centrifugálás/1 mol/l nátrium-hidroxid oldatba merítés 12 órára 25 °C-on/mosás, a nátrium-hidroxid teljes eltávolításáig/darálás/filmre vágás/zsírmentesítés 0,01%-os Triton X-100 oldatban/adott esetben az aminoglikánok eliminálása K_2HPO_4



fürdőben/mosás/centrifugálás/mosás tisztított vízzel/centrifugálás/savazás 10^{-2} mol/l ecetsavval, monoklórecetsavval vagy citromsavval/adott esetben a kollagén kivonat hígítása.

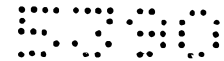
A kivonat lehet vizes oldat, szuszpenzió vagy diszperzió, vagy gél, vagy paszta, stb.

A jelen találmány szerinti eljárás a különböző, I-es, II-es, III-as, IV-es, stb. típusú kollagénekre is használható. Azonban a továbbiakban, anélkül, hogy ezekre korlátoznánk magunkat, a „kollagén kivonat” és „kollagén” szakkifejezés, hacsak az eltérést külön nem jelezzük, főleg I-es típusú kollagén kivonatra vagy kollagénekre vonatkozik.

Tehát a jelen találmány összefüggéseiben a kollagén kivonat főleg I-es típusú tartalmaz, azaz több mint 90% I-es típusú kollagént tartalmaz. A kivonat természetesen tartalmazhat kizárólag I-es típusú kollagént, például úgy, hogy a III-as típusú kollagént folyamatosan elimináljuk a dialízis, centrifugálás és nátrium-kloridos differenciál-kicsapás ismert technikáit alkalmazva.

Az I-es típusú kollagén egy nagy molekulásúlyú, 285000 Daltonos polimer, ami trihelikális formában két polipeptid lánc $[\alpha_1(I)_2]$ és egy harmadik polipeptid lánc $[\alpha_2(I)_1]$ asszociációját tartalmazza. Ez a fonalas kollagének családjába tartozik (I-es, II-es, III-as és V-ös típusú).

A kollagéneknek van egy denaturációs csúcsa, ami függ az eredetétől, az előállításához használt extrakciós módszertől, és attól, hogy keresztkötéses vagy nem keresztkötéses formájú. A



nem-keresztkötéses formában a denaturációs csúcs 35-45 °C-nál van.

A kollagénben, főleg az I-es típusban az $\alpha_2(I)_1/\alpha_1(I)_2$ arány 0,48-0,52 között van, amit a láncok elektroforézisével kapott poliakrilamid gélen végzett denzitometriával határozhatunk meg.

Ennek a kivonatnak és az adott esetben jelenlevő pepszinnek a virális inaktiválását kémiai kezeléssel végezhetjük el, változtatva többször átbocsátva 13-as, vagy annál magasabb pH-jú és 2,5-ös, vagy annál alacsonyabb pH-jú pufferoldatokon. Az önmagukban ismert kezeléseket általában a szokásos módon hajtjuk végre, azaz 3%-os nátrium-szulfiddal kombinált 4%-os kalcium-hidroxid fürdőbe merítve, majd egy második, 2% ammónium-kloriddal kombinált 0,5%-os nátrium-metabiszulfid fürdőbe merítve.

A pepszin optimális semlegesítését nátriumos kezeléssel végezhetjük el, ami a pH-t 6,8-7,4-re viszi vissza, amint azt például az FT 2,586,703 számú szabadalmi leírásban közlik.

Hasonló módon, a szarvasmarha szivacsos agyvelőgyulladásáért esetleg felelős ágensek, amiket „prionoknak” neveznek eliminálását is elvégezhetjük valamilyen ismert módon, a World Health Organization (WHO) direktíváiban, (WHO/COS/VHP/92.104) és például az Európai Közösség 1991. december 11-i direktíváiban ismertetett módszerrel. Ez az eliminálás abból áll, hogy 1 mol/l nátrium-hidroxiddal 1-48 óra

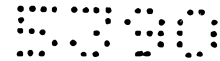


hosszat 25 °C-on kezeljük, vagy egy másik módszer szerint, legalább 1 óra hosszat, 25 °C-on nátrium-hipoklorittal kezeljük.

Az első szempont szerint a jelen találmány tárgya tehát pontosabban eljárás kollagén előállítására nem-steril, természetes kollagén szolubilizált és tisztított kivonatából. Ez hagyományosan tartalmazza azt a lépést, hogy az említett kivonatot egy kettős tanszverzális késes keverőben összekeverjük és nyírjuk 1-60 percig, hagyományosan 15-40 percig, előnyösen 10-20 pecig, 100-10000 per perc fordulatszámmal, általában 500-7000 per perc fordulatszámmal, előnyösen 1000-5000 per perc fordulatszámmal, miközben a hőmérsékletet szabályozzuk, majd az említett kivonatot sterilezzük, és ezután sterilezzük az említett kivonatot.

Az első megvalósítási mód szerint előnyösen, és ha a kivonatot nem pepszinizáljuk (a továbbiakban az „1-es variáns” kifejezés az egyszerűség kedvéért a jelen találmánynak arra a megvalósítási módjára utal, amiben a kivonatot nem pepszinizáljuk, az eltérést külön jelezzük), a hőmérséklet, amit mindig szabályozunk, általában nem haladja meg a 40-50 °C-t, vagy éppen a 60-80 °C-t egy keresztkötéses ágens jelenlétében (egy másik megvalósítási mód szerint, ami ennek a megvalósítási módnak az alternatívája, és később részletesebben ismertetjük).

Előnyösen, a jelen találmány szerinti eljárás első variánsa szerint, mivel a kivonat nincs pepszinezve, hőmérséklete az említett keverőben fokozatosan nő szobahőmérsékletről 40-50 °C-ig, ezalatt a kiindulási keverési sebesség lépésekben 500 per perc

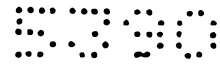


fordulatszámról 5000-7000 per perc fordulatszámmra nő, és eközben a viszkozitás minden egyes fázisban nő, a kivonatot higítani kell. A kollagént ezáltal a kiválasztott magas viszkozitási értéken tartjuk, miközben koncentrációja csökken. Az említett viszkozitás előnyösen 17000-20000 cps (15-20 Pa·s) között változik. Ha például az említett maximális hőmérséklet 42-44 °C, akkor az említett kivonatot állni hagyjuk az említett sterilizációs lépés előtt.

A sterilizálás után megfigyelhetjük, hogy az így nem-pepszinézett kivonatból előállított kollagén megőrzi a natív formáját és jobb tulajdonságokra tesz szert, azaz megnő az elaszticitása és mechanikai erőssége. Ragasztó és polimerizáló tulajdonságai lesznek.

Az említett kivonat hőmérsékletét az említett keverőben előnyösen szobahőmérsékletéről legfeljebb 40-50 °C-ra növeljük, 2-10 °C-os, előnyösen 3-5 °C-os lépésekben, miközben egyidejűleg növeljük a kevertetési sebességet, szintén 500-1000 per perces lépésekben, amíg eléri az 1500-7000 per perc fordulatszámot, előnyösen az 5000 per perc fordulatszámot.

Tény az, hogy a hőmérséklet lépésekben való növelése lényeges, mivel a hőmérséklet hirtelen növelése ideiglenesen denaturálja a kollagént, anélkül hogy elegendő mértékben megnövelné elasztikus tulajdonságait. Ezt a hőmérsékletet növeljük legalább 40 °C-ra, mivel ezalatt a hőmérséklet alatt az utána következő szűrés nagyon nehéz, ha nem éppen lehetetlen.



Az is lényeges, hogy a keverési sebességet lépésenként növeljük, mivel így jobban kézben tarthatjuk a kiválasztott magas viszkozitást, mialatt csökkentjük a kollagén koncentrációját, amint azt korábban már említettük.

A kivonatban a kollagén koncentrációja 0,001-15%, általában 0,1-10%, előnyösen 3-6%.

Amint azt az előzőkben ismertettük, az említett keverőben a hőmérséklet akár 80 °C-ra is emelkedhet keresztkötéses ágensek, azaz például glutáraldehid és acilsavak, azaz például hidrazin jelenlétében, vagy bármilyen más keresztkötéses ágens jelenlétében, amik kompatibilisek a kollagénnel. Amikor jelen vannak, akkor ezeknek az ágenseknek a végkoncentrációja a kivonatban a glutáraldehid esetében 0,00075-0,1%, előnyösen 0,0075-0,01%, és a hidrazin esetében 0,1-2%, előnyösen 0,5-1,5%. Az ily módon „keresztkötésessé” vált kollagének magasabbra állíthatjuk a hőmérsékletét, ami 40-50 °C körül lehet, és *in vivo* reszorpciós ideje a nem-keresztkötéses kollagénhez viszonyítva hosszabb, elérheti a 8-12 hetet.

A jelen találmány szerinti eljárás ezen variánsa egy bizonyos megvalósítási módja szerint, ami abból áll, hogy steril, natív kollagént állítunk elő viszkózus folyadék formájában, az alábbi eljárást hajtjuk végre:

- Egy nem-steril, natív kollagént, amit vagy nyúl bőrből, vagy strucc Achilles inából vonunk ki, elég magas, körülbelül 10-15%-os koncentrációban állítjuk elő.



- A nem-steril, natív kollagén kivonatát azután a már említett, kettős transzverzális késeket tartalmazó keverőben kevertetjük és nyírásnak vetjük alá, 500-1000 per perc fordulatszámmal, szobahőmérsékleten, azaz körülbelül 20 °C-on.

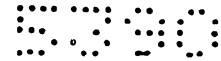
- A forgási sebességet és a nyíróerőt lépésekben növeljük, aminek az a hatása, hogy nagymértékben fokozza a kivonat viszkozitását. Ennek a viszkozitásnak az értéke 7000-20000 cps között változik. 1500 cps-től a kivonatnak virtuális elasztikus megjelenési formája van, ami a keverőben való keverését és nyírását rendkívül nehézvé teszi.

- Az egyes fázisokban a viszkozitás növekszik, ekkor a kivonatot hígítjuk, injekciós víz (WFI) vagy 10^{-2} mol/l citromsav hozzáadásával, majd a keverőben lépésenként megnöveljük a keverési sebességet és a hőmérsékletet, ameddig egy nagyon magas, 20000 cps-es (20 Pa·s) viszkozitást el nem érünk.

- Ezt a műveletet többször megismételjük, előnyösen négyszer-ötször, ameddig elérjük a 35 °C-os hőmérsékletet, 3000-5000 per perc fordulatszámot és körülbelül 3-6%-os kollagén koncentrációt.

- A terméket azután néhány percre, előnyösen 3-5 percre ezen a 35 °C-os hőmérsékleten és 3000-5000 per perc fordulatszámon tartjuk.

- A keverőben a hőmérsékletet 40-50 °C-ra, előnyösen a 40-45 °C-ra növeljük a nem-kereszt kötéses kollagén esetében. Ezen a hőmérsékleten meglepő módon a kivonat elfolyósodását tapasztaljuk, és a viszkozitás körülbelül 40-100 cps-re esik vissza.



- Az előzőekben említett módon előállított kollagén kivonatot azonnal alaposan megszűrjük, 40-50 °C-ra szabályozott hőmérsékleten, 0,45-0,22 μm pórusméretű membránon keresztül.

- Ezután sterilizésnek vetjük alá, előnyösen abszolút szűréssel, 0,22 μm -es membránon keresztül, azaz például a Millipore által forgalmazott Millidisk membránon keresztül, 40-50 °C-ra szabályozott üzemi hőmérsékleten. 40-50 °C-on a szűrési időt úgy választjuk meg, hogy ne haladja meg az 1 órát, előnyösen a 10-20 percet. A sterilizést előnyösen úgy is elvégezhetjük, hogy perezetsavat adunk hozzá (az Air Liquide vállalat terméke Sopropor márkaneven), aminek a végkoncentrációja a gondosan megszűrt kivonatban 0,5-50 tömeg% között változik, előnyösen 5-15 tömeg% között, a kollagén szárazsúlyára vonatkoztatva. Ennek a steriliző ágensnek a semlegesítését úgy hajtjuk végre, hogy 1 g perezetsavra számítva 2-20 g nátrium-tiosulfátot adunk hozzá, előnyösen 4-12 g/g perezetsav mennyiséget. A perezetsavval való sterilizéshez szükséges érintkezési idő 1-24 óra szobahőmérsékleten, előnyösen 2-4 óra.

A jelen találmány szerinti eljárás első variánsának megfelelő másik megvalósítási mód szerint, ami abból áll, hogy a natív kollagént pszeudo-szilárd gél formájában állítjuk elő, mivel a kollagén koncentrációja 0,5-10% között változik, előnyösen közvetlenül sterilezzük besugárzással, 2,5 Mrad ($2,5 \times 10^{-5}$ Gy) dózissal (béta vagy gamma ionizáló sugárzással). Megfigyeltük, hogy a pszeudo-szilárd gél a hagyományos gélekkel ellentétben kompakt és homogén marad, megőrzi fizikai-kémiai tulajdon-



ságait és polimerizálódó képességét. Ez, a jelen találmány szerinti eljárással sterilizett pszeudo-szilárd gél előnyösen elfolyósítható, úgy, hogy kombinálható legyen steril aktív adalékanyagokkal, amik érzékenyek az ionizáló sugárzásokra, mint például a véralvadási faktorok, antibiotikumok, gombaellenes ágensek, stb., folyékony vagy szilárd készítmények, főleg az alábbiakban említett készítmények előállításához: szivacsok, porok, filmek, membránok, tapaszok, stb.

Ha ezt a sterilizési módszert használjuk a kollagén szilárd készítményeire, amit a jelen találmány első variánsa szerint állítunk elő, és amik csak a kollagént tartalmazzák, vagy olyan aktív adalékanyagokkal vannak kombinálva, amik rezisztensek az ionizáló sugárzásokra, és a jelen találmányban említett terápiás osztályokból választhatók, a kollagén ezen formájának sem a fizikai-kémiai tulajdonságai, sem a polimerizációs képessége, sem a ragasztó ereje nem módosul.

Eszerint az 1. variáns szerint a jelen találmány szerinti eljárás tartalmaz egy semlegesítési lépést is. A semlegesítést elvégezhetjük a sterilizési lépés előtt és után is. Ezt a semlegesítést elvégezhetjük például nátrium-hidroxiddal, azért hogy a pH-t 6,8-8,2 közé állítsuk, előnyösen 7,0-7,4 közé. Megjegyezzük azonban, hogy meglepő módon a viszkózus folyadék formájú kollagének ez a semlegesítése 40-50 °C között nem okozza a kollagén kicsapódását. A kivonat tiszta és áttetsző viszkózus folyadék marad, és gyorsan megdermed, mint az alacsony pH-n levő kollagén. Ez nagyon előnyös, mivel bizonyos készítmények, azaz pél-



dául egy kollagén alapú gél, vagy a kollagénnek vankomicinnel való kombinájának előállítása ezidáig nem volt lehetséges, mivel a kollagén semleges pH-n kicsapódik.

A jelen találmány szerinti kollagén molekulák elemzése a már említett hagyományos technikákkal igazolja az így semlegesített kollagén primer, szekunder és terciér struktúráinak integritását.

Az 1. variáns szerint kapott kollagén jellemzői:

Megjegyezzük, hogy a jelen találmány szerinti első variánsnak megfelelően sterilizett kollagén meglepő módon megőrzi a natív formáját.

40-50 °C-on viszkózus, áttetsző folyadék.

Viszkozitása általában 20-300 cps (20×10^{-3} - 300×10^{-3} Pa·s) között változik, előnyösen 30-200 cps (30×10^{-3} - 200×10^{-3} Pa·s) között, és az a legjobb, ha 40-100 cps (40×10^{-3} - 100×10^{-3} Pa·s) között.

pH-ja általában 1,5-6,5 között van, előnyösen 2-5 között, és még jobb, ha 3-4 között van.

Koncentrációja általában 0,001-15% között van, előnyösen 0,1-10% között, és még jobb, ha 3-6% között van. Nagyon gyorsan megdermed 38 °C-on, vagy annál alacsonyabb hőmérsékleten. Pszeudo-szilárd formát vesz fel, aminek figyelemre méltó, hemosztatikus ragasztókra jellemző ragasztási tulajdonságai vannak. Dermedési ideje körülbelül 38 °C-on kevesebb mint 1 perc, 5%-os, vagy annál magasabb koncentrációban, 1-2 perc 3-4%



között, és körülbelül 3 perc 2%-nál alacsonyabb koncentrációban.

A kapott natív steril kollagénnek az alábbi más fontos jellemzői és tulajdonságai vannak:

- a kollagén főleg I-es típusú azaz 90%-ban vagy annál nagyobb mértékben tartalmaz I-es típusú kollagént, azaz az $\alpha_2(I)_1 / \alpha_1(I)_2$ arány 0,48-0,52 között van
- a víztartalom nagyobb mint 80%
- megjelenés: folyadék körülbelül 38 °C-nál magasabb hőmérsékleten, és érintésre ragadós; pszeudo-szilárd kompakt és homogén géles tömeg körülbelül 38 °C-nál alacsonyabb hőmérsékleten
- össz-nitrogén: 17,0-18,7%-ig
- hidroxiprolin: 12-13,9%
- mentes triptofántól, aminoglikánoktól és 95000 daltonnál kisebb molekulasúlyú polipeptidektől
- lipid: <1%
- szulfáthamu
- denaturálási csúcs: 38 – 45 °C, differenciál-termográfiaval (DSC) mérve
- ragasztóképeség
- polimerizálóképeség
- szobahőmérsékleten megőrződik
- azonnal használható.

Tehát a jelen találmány tárgya még egy olyan kollagén, ami az előzőekben említett jellemzőkkel rendelkezik.



A jelen találmány szerinti eljárás első variánsa szerint kapott kollagén alapú készítmények és alkalmazások:

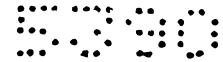
Amint azt korábban már említettük, a jelen találmány szerinti kollagén semleges vagy savas pH-n polimerizáló képességgel és említésre méltó ragasztó tulajdonságokkal rendelkezik. Ez utóbbi, a hemosztatikus és reszorpciós tulajdonságokkal kombinálva, adja a felszívódó hemosztatikus ragasztóanyag minőségét.

A jelen találmány szerinti kollagén előnyösen 2-5 ml-es fecskendőkbe vagy ampullákba mérhető szét, amik előnyösen üvegből készültek, és amiket olyan hőmérsékleten tartunk, amik lehetővé teszik, hogy polimerizálódjanak vagy megdermedjenek 0-38 °C között, de még jobb, ha ez szobahőmérsékleten történik.

Ennek, a jelen találmány szerinti felszívódó hemosztatikus ragasztóanyagnak egy másik előnyös megjelenési formája a száraz, porított vagy szivacsos forma. Ezt a formát felhasználás előtt nem kell előkészíteni.

Ahhoz, hogy egy ilyen formát megkapjunk, a jelen találmány szerinti, viszkózus formában kapott kollagént például liofilizzük.

A kollagént a jelen találmány szerinti folyadék formájában egyenlően mérjük szét tartóedényekbe (liofilező tálcák), aszeptikus körülmények között, így olyan liofilizátumokat kapunk, amiknek a vastagsága 1-20 mm, előnyösen 2-10 mm, de még jobb, ha 3-5 mm. A kapott liofilizátum krémszínű és enyhén elastikus, filmképző tulajdonságú. Víz tartalma 1-25%, előnyö-



sen 5-15%. A liofilizátumot megőrölhetjük, hogy előre meghatározott részecskeméretű port kapjunk.

A por-készítményekhez az az előnyös, ha a kollagén koncentrációja liofilezés előtt körülbelül 3-6% vagy több, ami a jobb permevezhetőséget biztosítja.

Örlés után a port steril, duplafedelű polietilén ampullákba tehetjük, vagy más olyan tartóedénybe, ami lehetővé teszi a sterilitás megőrzését, és elősegíti a hemorrágiás felszínre való permevezést.

A szivacsok esetében a kollagén koncentrációjának viszonylag alacsonynak, körülbelül 1-2%-nak kell lennie.

A filmképző szivacsok a liofilezés után csomagolhatók egyenként, dupla csomagolásban vagy buborékcsomagolásban, amit hővel lehet lezárni. Ezeknek az alakja lehet négyszög, háromszög vagy kerek, és oldalhosszuk vagy átmérőjük a felhasználástól függően 1-30 cm.

Az előzőekben említett két száraz forma hatása hasonlít a már ismertetett folyékony forma hatásához. A filmképző szivacsnak azonban mechanikai hatása is van, ami gyakran létfontosságú hemorrágia és vérömlenyek esetében, főleg a hasüregben.

A ragasztóanyag, bármilyen is a formája, azaz lehet viszkózus folyadék, pszeudo-szilárd, filmképző szivacs vagy por, kombinálható aktív adalékanyagokkal, pontosabban gyógyszerészetileg aktív adalékanyagokkal, azaz például véralvadás faktorokkal, amik a hemosztázis gyorsításában játszanak szerepet (azaz például a trombin, fibrinogén, XII-es faktor, stb.), vagy egy másik



változat szerint antibiotikumokkal, pontosabban a csontsebészet esetében.

Ha véralvadási faktorokat tartalmaz, akkor ez a ragasztóanyag előnyösen kombinálható stabilizálószerekkel, azaz például poliolokkal (például glicerinnel vagy polialkilén glikollal, amiben az alkiléngyök 1-4 szénatomot tartalmaz, mint például a polietilén-glikol vagy polipropilén-glikol), vagy mono-, di- vagy poliszacharidokkal (azaz például glükózzal vagy szacharózzal).

Ami a jelen találmány szerinti eljárás 1. variánsának megfelelő módszerrel kapott viszkózus folyadék formájú más készítményeket illeti, az alábbiakat említhetjük meg:

Egy pszeudo-szilárd tapasz, extradermális lokális alkalmazás aktív adalékanyaga hordozójaként, vagy egy másik változat szerint egy sebgyógyító permet, ami bizonyos, harmadfokú égési sebeket kapott betegek esetében használható, vagy hidratáló maszk kozmetikai alkalmazásokban.

A tapasz tartalmazhat egy vagy több antibiotikumot, gyulladáscsökkentő ágénst, antiszeptikumokat, antibakteriális ágenseket, gombaellenes ágenseket és antimikotikus ágenseket, valamint más fiziológiásan és gyógyszerészetileg elfogadható aktív adalékanyagokat, pontosabban szalicilsavat vagy nikotint. Ezeket az aktív adalékanyagokat 40 °C-nál magasabb hőmérsékleten adjuk hozzá, amíg homogén elegyet kapunk. Az elegyet gázmentesítjük, majd nyomás alatti rendszerrel, például adagoló szivattyúval mozgatjuk, majd lezáró csomagolásba mérjük szét (például buborék vagy polietilén filmek vagy hasonlók). A folyadék

szobahőmérsékletre való lehűtése után a csomagolást hővel zárjuk le.

A tapasztokban használt kollagén koncentráció 1-8%, előnyösen 2-5%.

Amikor jelen vannak a keverékben, akkor az antibiotikumok koncentrációja mg antibiotikum/mg kollagén egységben:

Gentamicin: 0,01 – 2 mg/mg, de jobb a 0,1 – 0,7 mg/mg, előnyösen 0,15 mg/mg – 0,5 mg/mg között

Vankomicin: 0,01 – 2 mg/mg, de jobb a 0,1 – 0,7 mg/mg, előnyösen 0,15 mg/mg – 0,5 mg/mg között

Pefloxacin: 0,01 – 2 mg/mg, de jobb a 0,05-0,5 mg/mg, előnyösen 0,075 mg/mg-0,25 mg/mg között.

A tapaszt vastagsága 1-5 mm, vagy vastagabb lehet. Azonban az 1,5-2,5 mm vastag tapasztokat részesítjük előnyben.

A hosszt és a szélességet az elképzelt hasznosításnak megfelelően állítjuk be.

A jelen találmány szerint előállított tapaszt pseudo-szilárd formájú, flexibilis, erős és erősen hidratált (víztartalma több mint 80%), és áttetsző megjelenési formájú.

Könnyen alkalmazható belső vagy külső szövetfelszínekre, attól függően, hogy károsodottak-e vagy egészségesek. A külső epidermális felhasználások esetében a tapaszt rögzíthetjük egy átjárhatatlan hipoallergén ragasztóanyagra, ami lehetővé teszi, hogy a szövet felszínére tapadjon, és ott is maradjon.

A maszk, amit úgy kapunk, hogy a kollagént önmagában, vagy egy aktív adalékanyaggal, azaz például vitaminokkal (C, E,

stb.), felületaktív anyaggal, azaz például benzalkónium-kloriddal vagy nedvesítő szerekkel, azaz például glicerinnel kombinálva például egy lassan mozgó szállítoszalagra öntjük, ami lehetővé teszi, hogy egyenlő vastagságú, homogén filmet kapjunk. Lehűtés után megfelelő méretű, pszeudo-szilárd formájú darabokra vágjuk fel, majd hermetikusan lezárt zacskókba tesszük (például belső polietilén borítással rendelkező alumíniumból készült zacskóba).

Egy ilyen maszk előállításánál jól használható kollagén koncentráció általában 0,2-3% között van, még jobb, ha 0,5-2% között, és előnyösen 1-1,5% között.

Az alakokat és a méreteket nem korlátozzuk. Egy arcmaszk hagyományos alakja és mérete egy A4-es lap (21×29,7 cm). A vastagság 0,5-3 mm között változik, előnyösen 1-1,5 mm között van.

A maszk pszeudo-szilárd formájú, nagyon flexibilis, lágy érintésű és áttetsző, erősen hidratált (víztartalma nagyobb mint 97%). Nagyon könnyen felvihető a bőrre. A kollagénnel kompatibilis egy vagy több festéket és más aktív adalékanyagot adhatunk hozzá.

A permet a kollagént és az aktív adalékanyagokat ugyanabban a koncentrációban és ugyanabban a kombinációban tartalmazza, mint amit az előzőekben a tapasztarra ismertettünk. Előnyösen egy dózist (5-25 ml) tartalmazó ampulákba vagy permetezőkből csomagolható, amik előnyösen üvegből vagy polietilénből készülnek.

Felhasználás előtt a kollagént, ami szobahőmérsékleten polimerizálódva van, vízfürdőben vagy egy inkubátorban 2-3 percig az eredeti csomagolásában melegítve elfolyósítjuk. A kollagént adott távolságról permetezzük a szövet felszínére, mielőtt megdermed.

Az így permetezett kollagén a szövet felszínére tapad és ezen a felszínen gyorsan polimerizálódik, ezzel homogén hemosztatikus és sebgyógyító filmet képez. Egy ilyen permet különösen akkor használható, ha a cél a sebgyógyító hatás, és/vagy az aktív adalékanyagok (azaz például az antibiotikumok, antiszeptikumok, antimikotikus ágensek, gyulladáscsökkentő ágensek, stb.) szabályozott felszabadulása.

Ennek a berendezésnek, amivel egy adott távolságból lehet permetezni, megvan az az előnye, hogy a működtető semmiképpen nem érintkezik a károsodott szövet felszínével, és ezzel minden fertőzésveszélyt el lehet kerülni.

Ennek a permetezőnek az egyik alkalmazása, ami különösen előnyös és a jelen találmány szerinti kollagén specifikus tulajdonságai teszik lehetővé, a betegek egy részének fontos, akiknek harmadfokú égési sérüléseik vannak, és akiknek a sterilitás garantálása, valamint a kezelés gyorsasága szükséges.

A kollagén viszkózus formájából a jelen találmány szerinti eljárás 1. variánsa szerint kapott többi készítményhez hasonlóan az alábbiakat említhetjük meg: egy polietilén szalagra öntött filmek és membránok, szellőztetett inkubátorban vagy csökken-



tett nyomáson levegőn való szárítás után. A működési hőmérséklet 10-35 °C, előnyösen 20-25 °C.

Ahhoz, hogy olyan filmeket kapjunk, amiknek a vastagsága 1 mm-nél kisebb, előnyösen 25 μm – 250 μm közötti a kollagén oldatokat 2-5%-os koncentráció-tartományban használjuk, előnyösen a 2,5-3,5%-os koncentráció-tartományban. A szárítás időtartama 1-120 óra lehet. A szárítás időtartama előnyösen 24 óra. A megfigyelésünk az, hogy a legjobb eredményeket akkor kapjuk, ha a szárítás viszonylag lassú, és a levegőnek viszonylag kicsi az áramlási sebessége.

Az így kapott filmek vagy membránok víztartalma 1-15% között van, előnyösen 5-10% között. Aszeptikus körülmények között vágjuk fel őket, kézzel vagy géppel, és lepecsételt, át nem eresztő csomagolásba tesszük.

Az előzőekben említett formákhoz hasonlóan, a filmek vagy a membránok tartalmazhatnak aktív adalékanyagokat, azaz például antibiotikumokat, antiszeptikumokat vagy gyulladáscsökkentő ágenseket, stb. Előállíthatjuk savas (alacsony pH) vagy semleges kollagénből is.

Ezeket külsőleg vagy belsőleg használják sebgyógyításra és/vagy egy aktív adalékanyag, például egy gyógyszer felszabadítására. Egy hemorrágiás nedves felülettel való érintkezés hatására beálló elaszticitásuk miatt előnyösen egy burkot képezhetnek, ami a károsodott szövet területére tapad.

A szemészeti alkalmazásokban ezeket kollagénből állítjuk elő, előnyösen pH=6,8-7,2 között. Ebben az esetben a filmek vagy



membránok felvehetik egy tároló henger, vagy egy áttetsző kontaktlencse alakját például azzal a céllal, hogy aktív adalékanyagok lokálisan vagy szabályozott módon szabaduljanak fel. Ha arra van szükség, hogy a kollagénnek ezeket a prezentációit folyékony formában (cseppek/szemmosó folyadék) használjuk, akkor a kollagént kapszulákban vagy más egyszeri dózist tartalmazó csomagolásban tartjuk, amit a felhasználás előtt fel kell melegíteni.

A szemészeti felhasználásokban a kollagén koncentrációk semleges pH-n, a membránokhoz vagy a lencsékhez 1-2,5% között vannak, előnyösen 0,5-2% között, és a szemcseppek esetében semleges pH-n a kollagén koncentrációja 0,1-1,5% között változik, előnyösen 0,2-0,5% között.

A jelen találmány tárgyát képezik továbbá az előzőekben említett készítmények, amiknek esetében illusztrálás céljából néhány lehetséges gyógyszerészeti formát megemlítettünk.

A jelen találmány szerinti eljárás második variánsa szerint, a kivonatot az említett, hőmérséklet-szabályozóval ellátott keverőben való mechanikai kezelés előtt egy megfelelő enzimmel (kollagenáz kivételével), azaz például tripszinnel, papainnal vagy pepszinnel, előnyösen pepszinnel, korlátozott proteolízisnek vetjük alá, az alábbiakban ismertetett módon. A kivonatban a kollagén koncentrációja általában 0,1-2% között változik, még jobb, ha 0,2-1% között van, a legelőnyösebb, ha 0,3-0,5% között van.

Az említett pepszinezett (tisztított, szolubilizált) kivonatot azután az alábbiak szerint kezeljük:



- Tisztító szűréseket végzünk, egymás után, különböző porozitású membránokkal, azaz például 100-50, majd 20 μm -es, 1 μm -es, egészen 0,45 μm -es pórusméretű membránokig.
- Ezután egy új tisztítási lépést hajtunk végre alkálifém sókkal, azaz például nátrium-kloriddal, előnyösen nátrium-kloriddal végzett differenciáló kicsapással, adott esetben ezt követően KH_2PO_4 és Na_2HPO_4 pufferrekkel szemben végzett dialízissel, majd végezetül centrifugálásokkal, hogy kinyerjük a kicsapódott kollagént.
- Az így kapott üledéket homogenizáljuk, enyhén kevertetve tisztított vízben, a kollagén koncentrációja 1-30%, majd 2-3-szor mossuk tisztított vízben való reszuszpendálás előtt, majd 48 óra hosszat 0-20 °C-on, előnyösen 0-10 °C-on kevertetjük.
- Ezt a szuszpenziót centrifugáljuk, majd centrifugálásos szárítással dekantáljuk. A kollagént 10^{-2} mol/l citromsavas oldatban gyűjtjük össze alacsony, 2-5-ös pH-n, előnyösen 2,5-3,5-ös pH-n, aminek a térfogatát a választott végső kollagén koncentráció függvényében határozzuk meg.
- Az üledéket ebben a savas oldatban hagyjuk állni, keverés nélkül, alacsony hőmérsékleten, azaz 0-10 °C között, 2-48 óra hosszat, előnyösen 12-24 óra hosszat. A kollagén üledék megduzzad, elveszti fehér elszíneződését, így áttetszővé válik.
- Az üledéket dupla transzverzális késekkel ellátott keverőbe visszük át, azaz például a már említett DITO-SAMA daraboló/keverőbe, majd a keverést és a nyírást fokozatosan emeljük, anélkül hogy meghaladnánk a 10000 per perc fordulat-



számot, ameddig elérjük az 1000-5000 per perc fordulatszámot, még jobb, ha a 2500 per perc fordulatszámot, ugyanakkor 2-10 °C-onként, előnyösen 3-5 °C-onként szabályozzuk a hőmérséklet emelkedését, hogy ne haladja meg a 35 °C-t, előnyösen a 25 °C-t, ameddig elérjük a teljes szolubilizálást. A kapott odat tiszta.

A kollagént itt is kollagén-kivonatból állítjuk elő, ami előnyösen főleg I-es típusú.

Eszerint a 2. variáns szerint az így előállított természetes kollagén előnyösen abszolút szűrővel (0,22 µm-es pórusméretű membrán) végzett sterilizáción megy át, az eljárás hőmérsékletén, azaz eszerint a variáns szerint előnyösen 20-25 °C-on, vagy egy másik változat szerint perecetsavat adunk hozzá olyan körülmények között, amik azonosak az előzőekben említettekkel, vagy a sterilizációt ionizáló sugárzással hajtjuk végre (2,5 Mrad; $2,5 \times 10^{-5}$ Gy)) egy előszárított formán, amit adott esetben arra szántunk, hogy steril folyékony közegben legyen szolubilizálva, azzal a céllal, hogy egy steril készítményben kombináljuk olyan aktív adalékanyagokkal, amik érzékenyek az ionizáló sugárzásokra, és amiket ebben a leírásban említett terápiás osztályokból választ-hatunk ki.

Az opcionális semlegesítést előnyösen a sterilizációs lépés után hajtjuk végre, szobahőmérsékleten. Szobahőmérsékleten az figyelhető meg, hogy a semlegesítés második órájától kezdve csapadék kezd képződni. Ezért különösen előnyös, ha a kollagént 0-8 °C-on tartjuk, majd elkészítjük a kollagén és más aktív adalékanyagok - amik alacsony pH-n (1-6,5 között) inkompatibilisek



- kombinációit vagy keverékeit, a semlegesítés utáni első két órában, előnyösen az első órában, de még jobb, ha 30 percen belül, majd elkezdjük kivitelezni az opcionális műveleteket, azaz például a fagyasztást, liofilezést vagy szárítást, levegőn vagy csökkentett nyomáson.

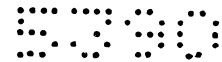
A 2. variánsnak megfelelően kapott kollagén jellemzői:

Az így előállított atelozeptid kollagén steril és megőrizte trihelikális struktúráját. Formája tiszta oldat, aminek alacsony a viszkozitása, azaz 2-40 cps (2×10^{-3} – 40×10^{-3} Pa·s) és aminek a pH-ja savas, vagy ha kell akkor semleges.

Az így előállított kollagén más jellemzői az alábbiak:

- kollagén, ami 90%, vagy még több I-es típusú kollagént tartalmaz, azaz az $\alpha_2(I)_1/\alpha_1(I)_2$ arány 0,48-0,52 között van.
- denaturációs csúcs: 38 – 45 °C, differenciáló termografiával (DSC) mérve
- össz-nitrogén: 17,0-18,7%-ig
- hidroxiprolin: 12-13,9%
- mentes triptofántól, aminoglikánoktól és 95000 daltonnál kisebb molekulásúlyú polipeptidektől
- lipid: <1%
- szulfáthamu <2%

Tehát a jelen találmány tárgya egy atelozeptid steril natív kollagén.

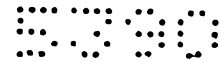


A 2. variáns szerint előállított kollagén alapján készített készítmények, és azok felhasználása. Példaként az alábbiakat említjük meg:

- Módosítás nélkül használva folyékony formában, savas pH-n, szövet-hidratálóként vagy készítményekben kombinálva kozmetikailag aktív adalékanyagokkal, például 0,1-3%-ban; sebgyógyító terápiás készítményekben kombinálva, például dermatológiailag aktív adalékanyagok azaz például gyulladáscsökkentő ágensek, lokális antiszeptikumok, antibakteriális ágensek, gombaellenes ágensek, szalicilsav, stb. jelenlétében. Ezek a készítmények krém, gél, hab vagy kenőcs formájúak külső használatához, a kollagén koncentrációja ezekben 1-3%. Ezeknek a formája külső használat esetében lehet folyadék vagy permet, amikben a kollagén koncentrációja 0,1-1%. Az említett aktív adalékanyagokat az ismert terápiás dózisokban használjuk.

- Semleges pH-n való használat paszta vagy gél formájában, foszfátokkal és alkalikus sókkal (például nátrium-klorid) kombinálva, a kollagén koncentrációja például 2-7%, bőrpangások, azaz ráncok, finom vonalak kijavításában, vagy egy másik változat szerint simaizmok megerősítésére, azaz például vizelet-visszatartási problémák esetében, vagy végezetül szövet-helyettesítők, azaz például szívbillentyűk, vagy csont-helyettesítők előállításában a kollagén hidroxipapatittal vagy korallal van kombinálva.

- Semleges vagy savas pH-n való használat olyan hab előállítására, aminek alacsony a kollagén koncentrációja, és ami különösen jól használható a sebészetben vagy mikrosebészetben,



károsodott szövet helyreállítására, valamint annak biztosítására, hogy a szövetközi és parenchimális tér megmaradjon, és el lehet kerülni az anatomopatológias tapadásokat a károsodott vagy léziós szövetek között (előnyösen parenchimális, kardiovaszkuláris, mellkasi, plasztikai vagy ENT sebészetben). Ez a hab tartalmazhat aktív adalékanyagokat, pontosabban antibiotikumokat, antiszeptikumokat és gyulladáscsökkentő ágenseket, az előzőekben az 1. variáns szerint előállított készítményeknél említett koncentrációkban. Egy ilyen habot a későbbiekben részletesebben ismertetünk.

A 2. variáns szerinti steril kollagént használva az is lehetséges, hogy főleg liofilezéssel végzett szárítással állítsunk elő felszívódó hemosztatikus szivacsokat, amik különösen előnyösek a hemosztatikus hatásuk miatt, valamint azért, mert lokálisan juttatnak el egy vagy több aktív adalékanyagot, főleg fertőzés elleni ágenseket és/vagy véralvadási faktorokat.

Az ilyen kollagénből a 2. variáns szerint savas pH-n előállított szivacsok nagyon előnyösek, mivel azonnal oldódnak, mielőtt egy folyékony közeggel hozzuk érintkezésbe, ami lehetővé teszi egy vagy több aktív adalékanyag azonnali felszabadulását. Ugyanezek a szivacsok, amiket a 2. variáns szerint semleges pH-n kollagénből állítunk elő, amiknek a megjelenési formája mikrofibrilláris, lehetővé teszi a lassú felszabadulást, és előnyös mechanikai hatásuk van azon a hemorrágiás felszínen, amihez hozzátapad.



A savas vagy semleges pH-jú kollagén, 0,1-3%-os koncentrációban, előnyösen 0,2-2%-os koncentrációban, vagy még előnyösebben 0,5-1%-os koncentrációban használható ilyen szivacsok előállítására.

Amikor jelen vannak, akkor az alábbi antibiotikumokat: gentamicin, pefloxacin és vankomicin, használjuk az 1. variáns készítményeinél már említett koncentrációkban.

Más aktív adalékanyagok is lehetnek jelen, azaz például trombin, Nemzetközi Egység per mg kollagén koncentrációban kifejezve 0,1 NE/mg-20 NE/mg koncentrációban, előnyösen 0,5 NE/mg-10 NE/mg, és előnyösebben 1 NE/mg-5 NE/mg koncentrációban, vagy fibrinogén (mg fibrinogén per mg kollagén formában kifejezve) 0,1 mg/mg-20 mg/mg, előnyösen 0,1 mg/mg-10 mg/mg, és még előnyösebben 0,5-5 mg/mg koncentrációban. Más aktív adalékanyagokat is kombinálhatunk velük, azaz például más vérkészítményeket, főleg protrombint, Xa faktort, IXa faktort, XIII faktort, és a véralvadás belső és külső mechanizmusainak bármilyen más aktivátorait vagy proaktivátorait, adott esetben más fiziológiásan és farmakológiailag aktív anyagokkal azaz például a plazminogén vagy antifibrinolitikus ágensek aktivátoraival és inhibitoraival. Más anyagok is kombinálhatók ezekkel, például specifikus enzimek, amik szabályozzák a kollagén felszívódását, vagy egy másik változat szerint keresztkötéseket képező ágensek.

A jelen találmány szerinti kollagén és az előzőekben említett aktív adalékanyag(ok) keverékeit tárolóedényekben állítjuk elő,



amiket rozsdamentes acélból, üvegből vagy polietilénből állítunk elő 5-35 °C közötti hőmérsékleten, előnyösen 10-30 °C, még előnyösebben 15-20 °C közötti hőmérsékleten.

Amint azt már említettük, ha semleges a pH-ja, akkor a kollagént a semlegesítés után 2 órán belül fel kell használni. Az elegyet azután liofilező edényekbe mérjük szét, amikben rétegek alakulhatnak ki, előnyösen 1-20 mm, előnyösen 3-15 mm, még előnyösebben 5-8 mm vastagságúak. Ezeket a készítményeket azután monoréteg formájában liofilezhetjük, az alábbi eljárási paraméterek szerint: fagyasztási hőmérséklet -5 °C-tól -60 °C-ig, reszorpciós hőmérséklet 20 °C-tól 50 °C-ig, általában 25-40 °C között és előnyösen 30-35 °C között.

A szivacsok így liofilezett készítményeinek a színe fehér, homogén, szövött, bolyhos megjelenésű. Víztartalmuk 1-25% között van.

A jelen találmány szerinti szivacsok módosítás nélkül használhatók, vagy *in situ* lamináláson mehetnek át (a liofilező kamrájában), egyedileg nyomást fejtve ki rájuk, vagy azon kívül, aszeptikus körülmények között, egy forgó malmon átbecsátva. Ez a művelet teszi lehetővé, hogy növeljük az ilyen típusú szivacs erősségét.

Az említett készítmények előnyösen liofilezhetők egy vagy több rétegben. Ebben az esetben a rétegek közötti tapadás előnyösen a fagyasztási fázisban lép fel, -11 °C és -20 °C közötti hőmérsékleten, előnyösen -11 °C és -13 °C között. Ezután egy laminátumot kapunk, amiben a két alsó réteg például tartalmaz-

hat savas pH-jú kollagént, például trombinnal és fibrinogénnel kombinálva (lehetővé téve ezeknek a termékeknek a felszabadulását és biológiai ragasztóanyag képződését), és amikben a felső réteg például semleges pH-jú kollagént tartalmaz (ami lehetővé teszi a mechanikai hatást a hemorrágiás felszínen, amint azt már említettük). Az előzőekben említett forma lehetővé teszi, nagyon előnyösen, hogy a biológiai ragasztóanyagot minden előzetes kezelés nélkül eljuttathatjuk a helyére, az ismert ragasztóanyagokkal ellentétben. A semleges pH-jú réteg előnyösen tartalmaz antibiotikumokat, és lehetővé teszi a szabályozott felszabadulásukat, ami különösen előnyös a csontfertőzések esetében. A rétegek sorrendjének és számának megválasztása nem lényeges, az a szakterületen jártas szakember ismeretei közé tartozik, aki az utóbbit az előre látható felhasználásnak megfelelően állítja be.

Ezekben a jelen találmány szerinti kombinációkba stabilizálószeret is tehetünk, azaz például poliolokat, polialkilén glikolokat vagy poliszacharidokat, vagy egy másik változat szerint a kollagénnel kompatibilis aminosavakat vagy más aktív ágenseket, azaz például gyulladáscsökkentő ágenseket, vagy egy másik változat szerint az előzőekben említett módon keresztkötő ágenseket, azzal a céllal, hogy megnőjön, megint előnyösen, a felszívódási idejük. Az is lehetséges, hogy kombináljuk más felszívódó ágensekkel, amiknek mechanikai hatásuk van, és amik lehetővé teszik varratok készítését, például cellulózzal vagy



oxidált cellulóz szövetekkel vagy vicryl[®]-rel (ez az Ethnor vállalat terméke).

Emellett a még a jelen találmány szerinti eljárás 2. variánsának megfelelően kapott, savas vagy semleges pH-jú kollagén, esetleg más aktív adalékanyagokkal kombinálva képes hemosztatikus port adni liofilezés vagy szárítás után. A használt kollagén koncentrációja 1-3%.

A jelen találmány tárgyát képezik tehát az előzőekben ismertetett készítmények, amikre példaként megadtunk néhány lehetséges gyógyszerészeti készítményt, amik a 2. variánsnak megfelelően kapott nem-polimerizált kollagén készítményeit képviselik.

A továbbiakban a jelen találmány néhány tárgyára nem-korlátozó példákat adunk meg, az alábbi ábrákra való hivatkozással:

- Az 1. és 2. ábra poliakrilamid gélelektroforézis diagrammja, ami az I-es típusú kollagén elválasztását mutatja, a találmány szerinti mechanikai- és hőkezelés után (1. variáns).
- A 3. és 4. ábra a kollagén hővel való denaturálásának diagrammja, amik a kollagén natív (nem-denaturált) természetét mutatják, a mechanikai- és hőkezelés előtt (1. variáns) és után.

Példák

1. Példa

Eljárás polimerizálódó képességgel rendelkező kollagén előállítására (1. variáns: nem-pepszinezett kivonat)

Strucc Achilles inakból készített 10%-os kollagén kivonatot egy már említett, kettős transzverzális késekkel ellátott keverőbe viszünk át. A kevertetést és nyírást azután 1500 per perc fordulatszámmal, szobahőmérsékleten (20 °C) hajtjuk végre, 7 percig. Megfigyelhető, hogy a viszkozitás 1500 cps-re nő. A kivonat fehéres színű lesz, és elasztikus megjelenési formát vesz fel. Ezután hígításokat végzünk, amivel a kollagén koncentrációját 6%-ra állítjuk. Az egyes hígítások után a hőmérsékletet 4 °C-kal emeljük, majd a keverés sebességét lépésenként, 500 per perc fordulatszámmal növeljük, 3-4 percenként. Amikor a 3500 per perc fordulatszám keverési sebességet és a 35-36 °C-t elérjük, akkor ezeket a körülményeket körülbelül 3 percig tartjuk fenn, majd a keverést leállítjuk és a kivonatot 30 percig ugyanolyan, 35-36 °C-on hagyjuk állni. Ezután egy új (ötszörös) hígítást hajtunk végre, és a sebességet 5000 per perc fordulatszámra növeljük, majd a hőmérsékletet 3-4 perc alatt 42 °C-ra növeljük. A kollagén ekkor képlékeny, viszkozitása 17000-20000 cps (17-20 Pa×s). A hőmérsékletet 44 °C-ra növeljük. Azután ezeket a körülményeket 0,5-1 percig tartjuk fenn; a képlékeny kollagén gyorsan elfolyósodik, folyékony megjelenési formát vesz fel, viszkozitása 30-50 cps-re ($30 \times 10^{-5} \text{Pa} \times \text{s}$ – $50 \times 10^{-5} \text{Pa} \times \text{s}$) csökken.

Az elfolyósított kivonatot azonnal egy nyomás alatt működő szűrőberendezésbe visszük át, amit előzőleg hővel sterileztünk, és ami vízkeringéses kettős köpennyel rendelkezik, ami lehetővé teszi, hogy a hőmérsékletet 42-45 °C-on tartsuk. A kivonatot azután gondosan átszűrjük két sterilszűrő membránon, az első-

nek a pórusmérete $0,45\ \mu\text{m}$, a második pórusmérete $0,22\ \mu\text{m}$. A szűrletet egy nyomás alatt levő, duplafalú tartóedényben összegyűjtjük, és a hőmérsékletet $42\text{--}45\ ^\circ\text{C}$ -on tartjuk. Ezt a szűrletet azután abszolút szűrésnek vetjük alá, $0,22\ \mu\text{m}$ -es pórusméretű membránon keresztül.

A kapott kollagén steril, amit az Európai Gyógyszerkönyv szerint végzett bakteriológiai tesztekkel határozhatunk meg.

Emellett az így kapott kollagénnak a mechanikai- és hőkezelése előtt, alatt és után végzett elemzése azt mutatja, hogy a kollagén aminosav-összetétele nem változik. Emellett poliakrilamid gélelektroforézissel nem lehet kimutatni 95000 Daltonnál kisebb molekulasúlyú polipeptideket (1. és 2. ábra). Az is megjegyzésre érdemes, hogy az $\alpha_2(\text{I})_1/\alpha_1(\text{I})_2$ arány $0,49$, azaz a kapott kollagén több mint 95% I-es típusú kollagént tartalmaz.

A differenciál-termografiával (DSC) végzett termografiás elemzés (a Perkin Elmer Delta-Series DSC 7 modelljével, a mechanikai- és $40\text{--}50\ ^\circ\text{C}$ -os hőkezelés során végrehajtva) igazolja a kollagén denaturációs csúcsának az eltűnését, ami megfelel a molekula trihelikális struktúrájának. Ez az eltűnés azonban csak ideiglenes, mivel a denaturációs csúcs megjelenik a kollagén lehűtése és megdermedése után (3. és 4. ábra). Ez a bizonyíték arra, hogy a kollagén trihelikális struktúrájának elvesztése a jelen találmány szerinti hő- és mechanikus kezelés során reverzibilis természetű.

Ezek az eredmények igazolják, hogy a szekunder és terciér struktúra megmarad, és ezáltal az így előállított kollagén natív formájú.

Az így kapott kollagén más fő jellemzői és tulajdonságai az alábbiak:

- víztartalom: 95%
- megjelenési forma: körülbelül 38 °C-nál magasabb hőmérsékleten viszkózus folyadék, ragadós tapintású, pszeudo-szilárd kompakt és homogén gélesedett tömeg körülbelül 38 °C-nál alacsonyabb hőmérsékleten
- viszkozitás: 45 cps ($45 \times 10^{-5} \text{Pa} \times \text{s}$) a folyadék formában
- össz-nitrogén: 17,9%
- hidroxiprolin: 128%
- mentes triptofántól, aminoglikánoktól és 95000 daltonnál kisebb molekulásúlyú polipeptidektől
- pH: 5,5
- lipid: <1%
- szulfáthamu <2%

Az előzőekben ismertetett steril kollagént korlátozott ideig 42-45 °C-on tartjuk, hogy módosulás nélkül gyorsan szét lehessen mérni megfelelő tartóedényekbe vagy csomagolásba, azaz például ampullákba, fecskendőkbe, buborék-csomagolóanyagba, stb., vagy más aktív adalékanyagokkal, azaz például véralvadási faktorokkal való keverés után, amely adalékanyagokat szükség esetén előzőleg sterileztünk.

Ha önmagában használjuk, akkor az így előállított kollagén kiváló hemosztatikus tulajdonságokkal rendelkező ragasztóanyag, amit az általános, parenchimális, kardiovaszkuláris, mellkasi, ortopédiai, ENT, urológiai, máj, zsigeri és szülészeti-nőgyógyászati, valamint transzplantációs és csontvelő sebészetben lehet használni; a mikrosebészetben, valamint bármilyen olyan orvosi területen, ahol szükség van ennek a gyógyszerformának a hatására, adott esetben más aktív adalékanyagokkal kombinálva.

Szobahőmérsékleten tartjuk, ahol megdermed.

Ez világosan megkülönbözteti a jelenleg piacon levő többi úgynevezett biológiai ragasztóanyagtól, azaz például a Tissucol[®]-tól (Immono-AG, Ausztria), vagy a Biocolle[®]-tól (Laboratoires des Fractionnements et des Biotechnologies, Franciaország), aminek a száraz formáját alacsony hőmérsékleten, körülbelül +4 °C-on kell tartani.

A jelen találmány szerinti kollagén alapú ragasztóanyagot felhasználás előtt folyadék formában kell elkészíteni. Ehhez 2-3 perces melegítés elég, például egy 40-45 °C-os inkubátorban vagy vízfürdőben, majd kézzel lassan kevertetve.

Tehát az előzőekben említett ismert ragasztóanyagokkal összehasonlítva a jelen találmány szerinti kollagénre alapuló ragasztóanyagnak, az előnyös tulajdonságai mellett, még az elkészítési ideje is körülbelül 10x gyorsabb.



Ha a véralvadási faktorok jelen vannak, akkor a kollagénhez való hozzáadás előtt az alább ismertetett módon elő kell készíteni őket.

2 NE/mg kollagénnek vagy 1 NE/mg kollagénnek megfelelő mennyiségű trombint vagy fibrinogént 40 mmol/l kalcium-klorid oldatban (azaz 1 ml kollagén 50 NE trombinhoz) és injekciós vízben (WFI) oldunk. A szűrést azután külön hajtjuk végre egy 0,22 μ m-es pórusméretű abszolút szűrőmembránon keresztül.

Ezután a trombint vagy a fibrinogént hozzáadjuk a steril kollagénhez, amit előzőleg semlegesítettünk (pH=7,0), az előzőekben ismertetett módon. Az elegyet homogenizáljuk és szétmérjük.

A szétmérést túlnyomás alatt, például egy adagoló szivattyúval végezzük, megfelelő tartóedényekbe, pontosabban üveg ampullákba vagy fecskendőkbe, például a biológiai ragasztóanyagok esetében; hővel lezárt buborékcsoomagolásba vagy zacskókba, például a tapaszok, filmek, hidratáló maszkok esetében, vagy egy másik változat szerint egy liofilező berendezés tálcáiba, hogy egy port vagy egy szivacsot, stb. kapjunk az előzőekben ismertetett módon.

2. Példa

Kollagént és trombint tartalmazó steril folyékony biológiai ragasztóanyag

Az 1. példában kapott termék steril folyadék formáját használva 2 ml 5%-os kollagént és 200 NE trombint tartalmazó készítményt állítunk elő üvegampullában.



Az egy hemorrágiás felszínen való használatának idején megdermed és a szövet felszínére tapad, ezzel lehetővé teszi a lézió vagy bemetszés lezárását, és kontakt hemosztatikus ágensként hat, ami leállítja a vérzést.

3. Példa

Steril kollagént + fibrinogént tartalmazó por

Az 1. példában kapott terméket használva, a fibrinogénnel kombinált kollagén liofilezése és őrlése után, steril porított formában, ampullánként 700 NE fibrinogént tartalmazó 360 mg kollagén steril polietilén ampullákba mérjük szét.

Ennek a pornak, ha permetezéssel egy hemorrágiás felszínre alkalmazzuk, különösen mikrosebészetben, olyan felületekre, amik nehezen hozzáférhetők, a hemosztatikus hatásával le lehet állítani a vérzést, a véralvadás külső és belső bioszintézis útjára gyakorolt hatásán keresztül, és hozzátapad a hemorrágiás felszínhez.

4. Példa

Steril kollagént és trombint tartalmazó szivacs

Az 1. példában előállított, majd semlegesített 35 ml 1%-os steril kollagénból indulunk ki, majd tálcákra vagy 5×7 cm-es buborék-csomagolásra mérjük szét. Ezután liofilezzük, majd a tálcákat vagy a buborék-csomagolásokat aszeptikus körülmények között lezárjuk, és steril dupla zacskókba csomagoljuk.



Az így előállított szivacs lehetővé teszi 35 cm²-es terület lefedését, és mennyisége 350 mg, 700 NE trombint tartalmazó kollagénnel felel meg.

Ennek a szivacsnak gyors hemosztatikus hatása van, ami a kollagén hatását kombinálja a trombinével és a véralvadás mechanizmusával, majd a hemorrágiás felszínhez tapad, ami lehetővé teszi, hogy jelentős mechanikai hatást fejtsen ki. A filmképző tulajdonságai lehetővé teszik, hogy nagy hemorrágiás területeket fedjen le.

5. Példa

Kollagént (pszeudo-szilárd) és metronidazolt tartalmazó tapasz

A metronidazol fertőzés-ellenes anyagot folyadék formában, sterilre szűrve hozzáadjuk az 1. példában folyadék formában kapott, 42-45 °C-os, az előzőekben említett módon semlegesített 2%-os kollagénnel, 0,05 mg/mg száraz kollagén arányban.

Lehűtés után a kollagént, ami 1 mm vastag tiszta és homogén pszeudo-szilárd gél, sterilizálásnak vetjük alá (besugárzás 2,6 Mrad béta-sugárzással, Laboratoires Caric Orsay, Franciaország).

Meglepő megfigyelés, hogy a jelen találmány szerinti kollagénből készített gél „nem törik meg”, azaz nem válik szét két fázisra, egy hagyományos géltől eltérő módon, ami ugyanazon a besugárzásos sterilizáción esik át.

Ennek a tapasznak, ha egy fertőzött sebre alkalmazzuk, topikális védő hatása van, a metronidazol jelenléte és felszabadulása miatt fertőtlenítő szerként hat.



6. Példa

Atelozeptid kollagén, aminek polimerizálóképessége van (1. variáns)

Friss strucc Achilles ínból származó tisztított 10%-os kollagén kivonatot használva az alábbi eljárást hajtjuk végre:

- a kollagént meghigítjuk, 10^{-2} citromsavat adva hozzá (pH=2,5), ameddig az 1%-os koncentrációt elérjük.
- pepszint adunk hozzá, 1/10 tömeg/tömeg száraz kollagén arányban,
- szobahőmérsékleten (20 °C) 7 óra hosszat hagyjuk reagálni,
- a 7. napon a kollagént 30%-os nátrium-hidroxiddal semlegesítjük, a pH-t 7,2-re állítva. A kollagén kicsapódik, az oldatban maradt nem-kollagén fehérjéket és pepszin maradékot centrifugálással eltávolítjuk, például a Rousselet vállalat által forgalmazott RC40 berendezéssel,
- az üledéket ionmentesített vízzel mossuk, majd centrifugálással szárítjuk, a víz mennyisége tízszerese az üledék tömegének, majd a kollagén üledéket nedves szálak formájában kapjuk meg,
- ezt a műveletet háromszor megismételjük azonos körülmények között, így 70%-os víztartalmú kollagén fonalakat kapunk,
- az üledéket szolubilizáljuk 10^{-2} mol/l citromsavval (pH=2,5),

- az elegyet addig szolubilizáljuk, amíg a szolubilizáció teljes lesz, így kapunk egy 10%-os kollagén kivonatot, ami tiszta, viszkozitása 6000 cps ($6 \times 10^{-5} \text{Pa} \cdot \text{s}$),
- a kivonatot kettős transzverzális vágókkal ellátott keverőbe visszük át, majd az eljárást az 1. példában leírt módon addig folytatjuk, amíg körülbelül 5%-os kollagént kapunk.

Ez a steril, atelozeptid natív kollagén, aminek megvan a polimerizációs képessége, különösen előnyös a szemészeti alkalmazásokban, formája lehet lencse, flexibilis membrán vagy szemcsepp/szemöblítő, az előzőekben ismertetett módon. Emellett a potenciálisan immunogén telopeptidek hiánya különösen vonzóvá teszi.

7. Példa

Kollagén hab (2. variáns)

A habot nedves kollagén szálakból állítjuk elő, amiknek a víztartalma 70%, amit a már ismertetett 2. variáns szerint állítunk elő. Ezt az üledéket homogenizáljuk és 48 óra hosszat $+4^{\circ}\text{C}$ -on kevertetjük tisztított vízben. Centrifugálás után az üledéket 10^{-2} mmol/l citromsavban (pH=2,5) vesszük fel, a kollagén koncentrációját 2,5%-ra állítva. 24 óra hosszat 4°C -on hagyjuk állni, majd az üledéket dupla transzverzális vágókkal ellátott keverőbe visszük át. A keverési sebességet, a nyíróerőt és a hőmérsékletet fokozatosan növeljük, amíg a 2000 per perc fordulatszámot és a 25°C -t elérjük. A kivonatot azután egy $0,22\text{ }\mu\text{m}$ pórusméretű abszolút membrán szűrjük át, 25°C -on.

Benzalkónium-kloridot adunk az így kapott 2,5%-os steril kollagénhez, 1,5 g/l koncentrációban. Az elegyet kevertetjük, a keverés fordulatszámát fokozatosan 500 per perc fordulatszámról 2500 per perc fordulatszámra növelve atmoszférikus körülmények között, ekkor a kivonat viszkozitása megnő és fehéres színű lesz, így kapjuk a jelen találmány szerinti habot.

A habot 10 ml-es vagy nagyobb adagoló szivattyúval mérjük szét, ami katéterrel van ellátva, ami lehetővé teszi olyan helyekre való eljuttatását, amiket egyébként nehezen lehet elérni, ami gyakori eset a mikrosebészetben.

Így konzerválódva ez a hab szobahőmérsékleten tárolva legalább 24 hónapig stabil. Hőérzékeny aktív adalékanyag jelen-



létében az az előnyös, ha ennek az így előállított habnak a tárolási hőmérséklete 4-10 °C.

Ezt a habot előnyösen főleg a parenchimális és mellkasi sebeszetben használjuk. Különösen előnyös a szövetközi és parenchimális tér fenntartásában, és lehetővé teszi, hogy elkerüljük az anatómo-patológiás összetapadásokat a károsodott szövetek között.

8. Példa

Rétegzett vagy egyrétegű hemosztatikus szivacsok előállítása (2. variáns)

A szivacsokat a 7. példában leírt módon a 2. variánsnak megfelelően előállított kollagénből állítjuk elő, amit egy 0,22 µm-es pórusméretű membránon keresztül történő abszolút szűréssel sterilizünk.

Ahhoz, hogy egy egyrétegű szivacsot kapjunk, ami emellett tartalmaz például egy véralvadási faktort, az alábbi eljárást hajtjuk végre:

- 35 ml 1%-os koncentrációjú folyékony kollagént, amit előzőleg 700 NE steril trombinnal vagy 350 NE steril fibrinogénnel kevertünk össze majd semlegesítettünk, 5×7 cm-es buborékcsomagolásba mérünk szét,
- mindegyik előzőekben említett kollagén kombinációt (a fagyasztási és reszorpciós hőmérséklet -25 °C illetve 35 °C) hagyományos módon, külön liofilezzük.

Az így kapott semleges pH-jú szivacs bolyhos, enyhén fonalas megjelenési formájú, és fibrinogén valamint trombin jelenlétében fehér vagy krémszínű.

Ennek a szivacsnak hemosztatikus hatása van, ami a kollagénnak a véralvadás mechanizmusaira gyakorolt külső és belső hatásával áll kapcsolatban, amit tovább erősít a véralvadási faktorok, nevezetesen a trombin és a fibrinogén hemosztatikus hatása.

Továbbá, a 2. variánsnak megfelelően kapott semleges pH-jú kollagén, mivel oldhatatlan, mechanikai hatást fejt ki a hemorrágiás szövet felszínére, amit a véralvadási faktorok nem tudnak megtenni, ha önmagukban, liofilezett formában használjuk őket.

Emellett, amint azt az előzőekben már említettük, egy ilyen, a jelen találmány szerinti prezentációban a véralvadási faktorok aktivitása teljesen megőrződik, a hagyományos készítményekkel (azaz például a Tachocomb[®], Hafslund Nycomed, leírása megtalálható az EP-A-59265 számú szabadalmi leírásban) ellentétben. amikben az utóbbit ionizáló sugárzással sterilizik, és ezáltal részlegesen denaturálva van.

Ahhoz hogy rétegzett szivacsot kapjunk, az alábbi eljárást hajtjuk végre:

- 18 ml, pH 5-ös folyékony kollagént (koncentrációja 0,5%), amit előzőleg 700 NE trombinnal és 1 ml 40 mmol/l kalcium-kloriddal kevertünk össze, 5×7 cm-es buborécsomagolásokba osztunk szét, majd



- enyhe fagyasztás végzünk -10°C -on, majd 18 ml 0,5% os, pH 5-ös, előzőleg 350 NE fibrinogénnel összekevert folyékony kollagént adunk az első réteghez, majd

- ismét enyhe fagyasztást végzünk, az előzőekben említett körülmények között, majd egy végső, 1%-os kollagént, minek semleges a pH-ja, tartalmazó réteget adunk az így kapott második réteghez, és végül

- az előzőekben az egyrétegű szivacsra ismertetett módon liofilezzük.

Így tehát háromrétegű rétegzett szivacsot kapunk, ami az alábbi, figyelemre méltó tulajdonságokkal rendelkezik:

- * ha alkalmazzuk, akkor a kollagén savas pH-n azonnal oldatba megy, felszabadítva a véralvadási faktorokat, amik hemosztatikus ragasztóanyagot képeznek a hemorrágiás felszínen,

- * a külső réteg semleges pH-n szintén mechanikai hatást fejt ki, ezzel erősítve a hemosztatikus ragasztóanyag hatását, annál is inkább, mivel a hemorrágiás terület nagy.

Emellett, ez, a jelen találmány szerinti szivacs azzal az előnnyel is rendelkezik, hogy nem felhasználás előtt kell elkészíteni.

A hemosztatikus prezentációnak ez a típusa különösen alkalmas általában, parenchimális, kardiovaszkuláris, mellkasi, plasztikai, ortopédiai, ENT, urológiai, máj, zsigeri és szülészeti-nőgyógyászati műtétekhez, transzplantációs és csontvelő műtétekhez és a mikrosebészetben, valamint általában minden, ilyen hemosztatikus hatást igénylő területen.

9. Példa

Szivacs + vankomicin (2. variáns)

Az alábbi eljárást hajtjuk végre:

- 6 liter, a jelen találmány szerinti eljárás 2. variánsa szerint kapott 1,4%-os kollagén oldatot steril tartóedénybe teszünk, majd nátrium-hidroxid hozzáadásával semlegesítjük, majd
- a semlegesítést követő egy órán belül 1 liter 42 g/l koncentrációjú vankomicin hidroklorid oldatot adunk a szobahőmérsékleten tartott kollagén oldathoz, majd
- az oldatot homogenizáljuk, majd adagoló szivattyúval a kapott elegyet egy 0,22 μm -es pórusméretű membránon nyomjuk át liofilező tartóedényekbe, 70 ml-t egy 10 cm-es tartóedénybe, majd
- $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra lefagyasztjuk, ezt követi a szublimálás majd a deszorpció $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ig,
- végül steril szivacsokat kapunk, amik 7 mm vastagok, és 8,4 mg kollagént valamint 4,2 mg vankomicin hidrokloridot tartalmaznak cm^2 -enként, vagy végül 1-2 mm vastag szivacsokat kapunk, automatikusan nyomást fejtve ki a liofilezőkben levő rétegekre, azért, hogy laminált szivacsot kapjunk, majd
- a buborékcsomagolást hővel lezárjuk és steril duplafalú zacskókba tesszük.

A jelen találmány szerint azonos szivacsokat állíthatunk elő, amik gentamicint, pefloxacint vagy más antibiotikumot vagy fertőtlenítőszert tartalmaznak a vankomicin helyett.

Ezek a szivacsok, amikből lokálisan, fokozatosan szabadul fel az aktív adalékanyag tartalmuk, különösen jól használhatók számos kór kezelésében, pontosabban csont, zsiger, traumatológiai és sebészeti kórosetekben, pontosabban a lehetséges mikrobiológiai szennyeződések megelőzésében vagy kezelésében.

Ezek a jelen találmány szerinti kollagént tartalmazó szivacsoknak, amellet, hogy kiváló a toleranciájuk és biológiai lebontóságuk, az a nagy előnyük, hogy vankomicint tartalmaznak, amit szűréssel sterileztünk, az előzőekben ismertetett módon, ami így a hagyományos készítményekkel ellentétben, amikben az antibiotikum részlegesen denaturálódik az ionizáló sugárzással végzett steriliz következtében, megőrzi minden aktivitását.



SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás kollagén előállítására egy szolubilizált és tisztított, adott esetben pepszinezett nem-steril kollagén kivonatból, azzal jellemezve, hogy az alábbi lépéseket alkalmazzuk:

- (i) az említett kivonatot egy transzverzális vágókésekkel ellátott keverőben kevertetjük és nyírjuk, miközben fokozatokban 10000 per perc fordulatszámig növeljük a keverési sebességet, a hőmérsékletet pedig 2-10 °C-ról, előnyösen 3-5 °C-ról növeljük hogy növeljük a kiindulási környezeti hőmérsékletet, a szabályozott maximális hőmérsékletig, előnyösen 50 °C-nál kisebb hőmérsékletig, majd
- (ii) az említett kivonatot folyékony állapotban sterilizzük, aminek eredményeképpen steril és natív formájú kollagént kapunk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amiben a szolubilizált és tisztított kivonatot nem pepszinezünk, azzal jellemezve, hogy az (i) lépésben a kivonatot minden olyan lépésben meghigítjuk, amikor az említett kivonat elér egy előre kiválasztott magas, 15-20 Pa×s közötti viszkozitást, és ha az említett maximális hőmérséklet 42-44 °C, akkor az említett kivonatot állni hagyjuk, közvetlenül a (ii) lépés előtt.

3. Az 1. és 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a (ii) lépés előtt az említett kivonatot alaposan megsűrjük

az említett szabályozott maximális hőmérsékleten, 0,45-0,22 μm -es pórusméretű membránokon keresztül.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás, amiben az említett szolubilizált és tisztított kivonatot pepszinezünk, azzal jellemezve, hogy az említett kivonatot az alábbiak szerint kezeljük:

- tisztító szűréseket végzünk kaszkádban, különböző pórusméretű membránokon keresztül, egészen 0,45 μm pórusméretig, majd
- a szűrlet differenciáló kicsapását hajtjuk végre nátrium-kloriddal.

és (i) lépésben az elért maximális hőmérséklet 35 °C, előnyösen 25 °C, és a keverési sebesség 1000-5000 per perc fordulatszám, előnyösen 2500 per perc fordulatszám.

5. A 3. és 4. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a (ii) lépésben egy abszolút szűrést hajtunk végre egy 0,22 μm -es pórusméretű membránon keresztül, vagy a kivonatot perecetsav hozzáadásával sterilizzük.

6. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy tartalmazza az említett kivonatnak a (ii) lépés előtti vagy utáni semlegesítési lépését.

7. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kollagén fonalas típusú, előnyösen főleg I-es típusú kollagén.

8. Az előző igénypontok bármelyike szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a kollagén kivonatot szőrmékből, kötőszövetek-

ből vagy állati inakból, főleg nyúl bőrből és strucc Achilles ínből állítjuk elő.

9. Natív I-es típusú kollagén, amit az 5-8. igénypontok bármelyike szerinti eljárással állíthatunk elő, és a következő jellemzőkkel vagy tulajdonságokkal rendelkezik:

- $\alpha_2(I)_1 / \alpha_1(I)_2$ aránya 0,48-0,52 között van
- az Európai Gyógyszerkönyv szabványai szerint steril
- össz-nitrogén: 17,0-18,7%-ig
- hidroxiprolin: 12-13,9%
- mentes triptofántól, aminoglikánoktól és 95000 daltonnál kisebb molekulásúlyú polipeptidektől
- lipid: <1%
- szulfáthamu <2%

10. Gyógyszerészeti és/vagy gyógyhatású és/vagy orvosi-sebészeti és/vagy szemészeti és/vagy kozmetikai készítmény, ami vagy csak a 9. igénypont szerinti kollagént tartalmazza, vagy legalább egy másik aktív adalékanyaggal van kombinálva.

11. Az előző igénypont szerinti készítmény, amiben az említett másik aktív adalékanyagot az alábbi csoportból választhatjuk ki: véralvadási faktorok, például trombin, fertőtlenítő szerek, pontosabban metronidazol, antibiotikumok, pontosabban makrolidok, azaz például gentamicin, glikopeptidek, mint például vancomycin, és fluorokinolinonok, azaz például pefloxacin szteroid vagy nem-szteroid gyulladáscsökkentő ágensek acilkarbonsavas vagy oxicam származékai, növekedési faktorok, főleg csontnövekedési faktorok, azaz például szomatotropin, és epidermális nö-

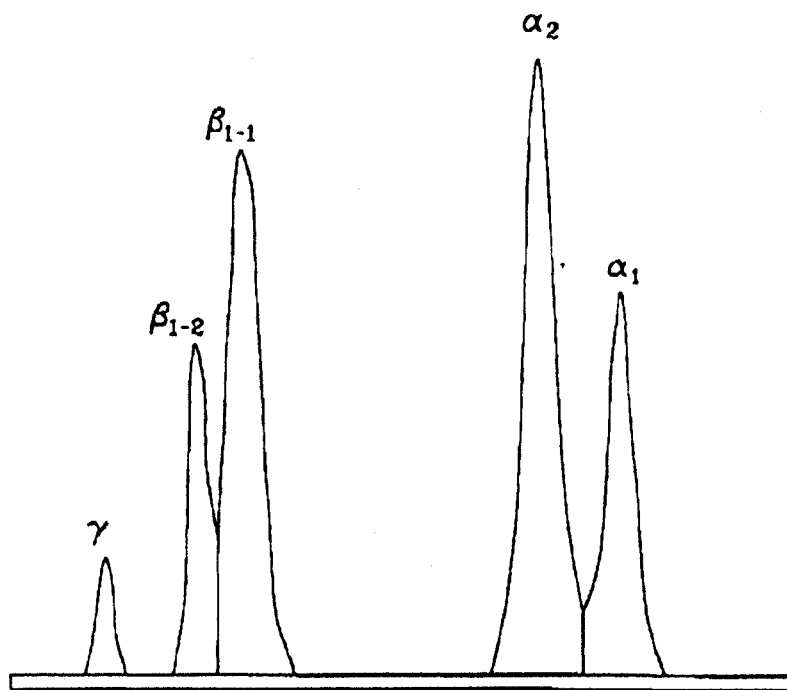
vekedési faktorok, azaz például EGF (epidermális növekedési faktor), felületaktív anyagok, hidratálók, stabilizálószeresek és vitaminok.

12. A 10. vagy 11. igénypont szerinti készítmény gyógyszerészeti kiszerelési formái, amiket az alábbi csoportból választhatunk ki: gélek, főleg injekciózható gélek és pszeudo-szilárd gélek, habok, szemöblítők, egyrétegű vagy rétegzett szivacsok, porok, lemezek vagy kötések, maszkok, permetek, filmek, membránok, lapok és fonalak, főleg varratok készítéséhez.

13. A 9. igénypont szerinti kollagén használata egy olyan készítmény előállításában, amit emberi vagy állati test gyógyszerészeti és/vagy gyógyhatású és/vagy orvosi-sebészeti és/vagy szemészeti és/vagy kozmetikai kezelésére szántunk.

ifj. Szentpéteri Ádám
szabadalmi ügyvéd
a S.B.V. & K. Nemzetközi
Szabadalmiroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950; Fax: 34-24-323

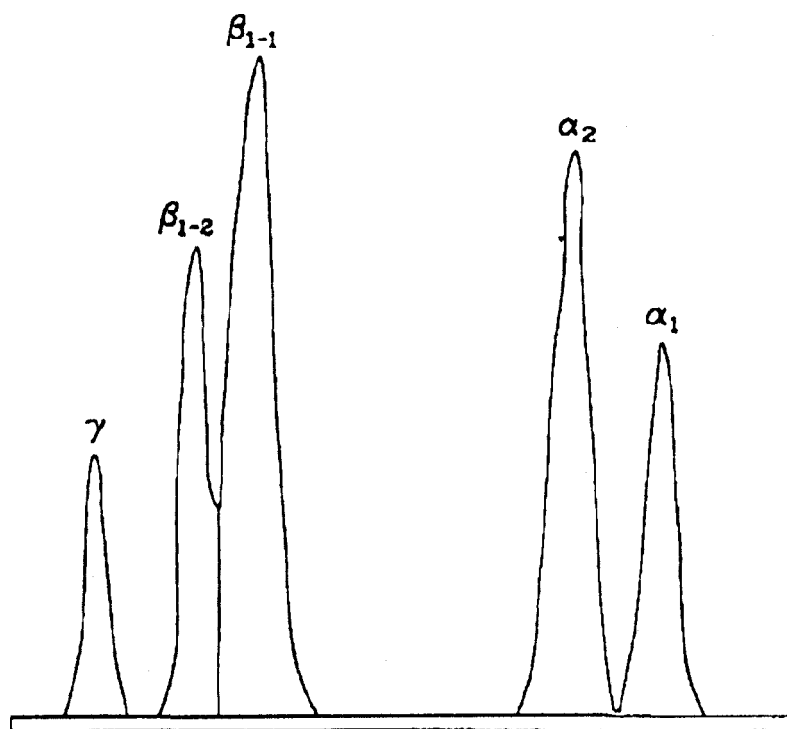
1. ábra



ELEKTROFORÉZIS DIAGRAMM

KÖZZÉTÉTEL PÉLDÁNY

2. ábra



ELEKTROFORÉZIS DIAGRAMM

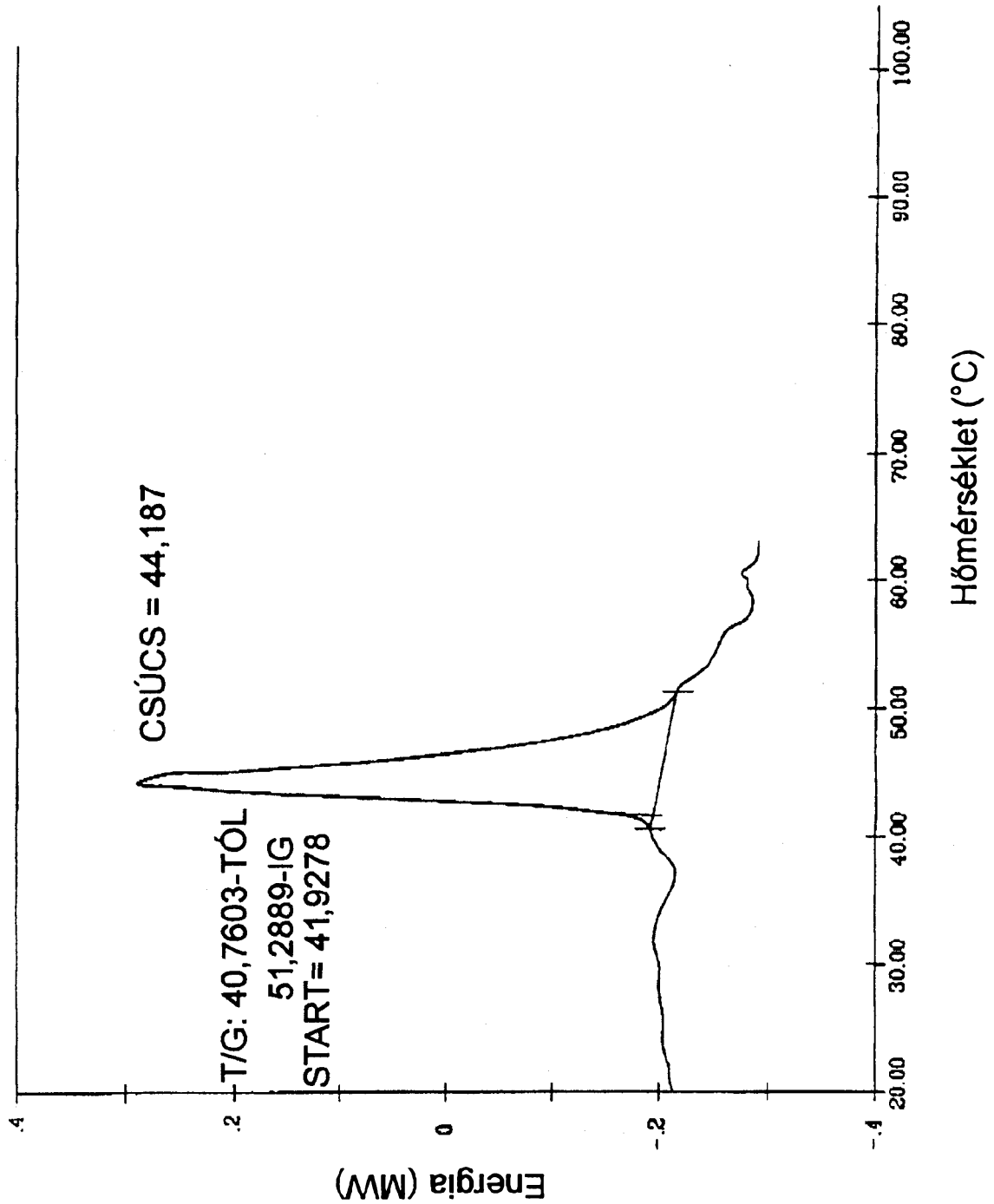
PO1 2575

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



3/4

3. ábra



901 2575

KÖZZÉTETELI
PÉLDÁNY



4/4

4. ábra

