

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 445**

51 Int. Cl.:

C07K 14/78 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2006 E 06716299 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 1856272**

54 Título: **Método de separación de colágeno de tejido animal, método de fabricación de una solución de colágeno y producto manufacturado usando dicho método**

30 Prioridad:

11.03.2005 KR 20050020367

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.01.2014

73 Titular/es:

**SEWON CELLONTECH CO., LTD. (100.0%)
10, 11TH., GOODMORNING-SHINHAN TOWER 23-
2, YOIDO-DONG
YOUNGDEUNGPO-GU, SEOUL 150-712, KR**

72 Inventor/es:

**YU, JI-CHUL;
JANG, JAE-DEOG;
CHANG, CHEONG-HO;
LEE, SAE-BOM;
YEO, SE-GEUN y
KO, CHANG-KWON**

74 Agente/Representante:

GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro

ES 2 439 445 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de separación de colágeno de tejido animal, método de fabricación de una solución de colágeno y producto manufacturado usando dicho método.

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para la separación de colágeno de diversos tejidos animales, un método para preparar una solución de colágeno y un producto manufacturado usando dicho método. Más específicamente, la presente invención se refiere a un método para la separación eficaz de colágeno de tejidos óseo y cartilaginoso, tejidos cutáneos y tejidos tendinosos/ligamentosos animales, un método para preparar una solución de colágeno a partir de dichos tejidos aislados y una matriz de colágeno y solución de colágeno altamente concentrada usando dicho método.

10

Técnica antecedente

Tal como se conoce en general, el colágeno es una proteína de la clase de escleroproteínas que constituye huesos, cartílago, dientes, tendones y piel de animales y también escamas de los peces. El colágeno está presente como un sólido similar a una fibra y muestra la intrincada estructura periódica estriada transversalmente al examinarlo con un microscopio electrónico.

15

El colágeno es una proteína estructural que se encuentra de la forma más frecuente en todo tipo de mamíferos, y comprende aproximadamente el 30% del peso total de todas las proteínas en el cuerpo. Actualmente, se conocen 20 especies de colágeno y el colágeno de tipo I es la forma de colágeno más abundante. El colágeno tiene una estructura en la que proteínas monoméricas que tienen un peso molecular de aproximadamente 300 kDa se reticulan entre sí mediante enlaces covalentes en sitios específicos. Por lo tanto, el colágeno maduro forma una forma similar a una fibra característica que tiene insolubilidad en agua y resistencia a la tracción elevada. El colágeno se compone de aminoácidos constituyentes tales como glicina, prolina, hidroxiprolina, alanina y ácido glutámico, y se caracteriza particularmente por un alto contenido de hidroxiprolina que no se encuentra habitualmente en otras formas de proteínas.

20

25

Mientras tanto, dicho colágeno tiene una estructura en la que tres cadenas polipeptídicas están enrolladas en espiral unas alrededor de otras, mediante puentes de hidrógeno. El colágeno no se descompone en agua, ácidos diluidos y álcalis diluidos, pero la ebullición del colágeno da como resultado la conversión del mismo en una estructura de una sola cadena de gelatina que es soluble. A diferencia de la gelatina, el colágeno puede adquirir una viscosidad adecuada sin calentarlo y, por lo tanto, puede prepararse convenientemente cuando es sometido a gelificación. Además, debido a su peso molecular más elevado que la gelatina, el colágeno es más biocompatible con tejidos biológicos y muestra una elevada actividad fisiológica. Por lo tanto, cuando se usa para tratar heridas, el colágeno facilita un proceso de cicatrización, que contrasta con la tendencia en la que la gelatina interfiere en la generación tisular. Además, el colágeno es altamente flexible incluso cuando está endurecido, y reticula rápidamente en un corto periodo de tiempo, dando como resultado de este modo un tiempo de gelificación reducido. El colágeno no es susceptible a la acción de enzimas proteolíticas tales como tripsina, pepsina, ficina, papaína y elastinasa, mientras que es susceptible a la descomposición por colagenasa. La separación de colágeno de tejidos implica extracción con disolvente orgánico, tratamiento con ácido/álcali, seguido por acción de enzimas proteolíticas tales como tripsina, pepsina, ficina, papaína y elastinasa, obteniendo de este modo colágeno.

30

35

40

Además, para aplicaciones *in vivo*, el colágeno obtenido de este modo se disuelve en disolventes no tóxicos biológicamente, por ejemplo tampones tales como agua, solución salina fisiológica y tampón borato, o soluciones acuosas que contienen sales, por ejemplo cloruro sódico, proteínas, sacáridos y grasas.

45

Actualmente se están realizando muchos estudios para el desarrollo de un método eficaz para separar colágeno. Para garantizar cantidades suficientes de colágeno para uso médico, grandes cantidades de materias primas son necesarias y también se requiere un avance significativo en un método de separación de colágeno.

En particular, se sabe que el colágeno no solamente desempeña un papel en un incremento de una concentración de plaquetas y la agregación de plaquetas pero también sirve para activar las plaquetas mediante la deformación de formas o estructuras bioquímicas de plaquetas, y por lo tanto el colágeno se usa ampliamente como hemostático.

50

Se han conocido numerosos métodos para separar colágeno desde la década de 1950, pero existe una dificultad en la separación de colágeno puro en una forma no desnaturalizada. Por lo tanto, sigue existiendo un requisito para el desarrollo de un método que es capaz de separar colágeno de diversos tejidos y en grandes cantidades, para usar colágeno en diversos campos.

Sin embargo, los métodos de separación de colágeno conocidos actualmente se basan principalmente en la separación de colágeno de la piel o de tendones de mamíferos (murino, bovino, porcino y similares). Desafortunadamente, aún no existe ningún método capaz de separar el colágeno de los tejidos óseos.

Divulgación de la invención

5 Problema técnico

Por lo tanto, la presente invención se ha realizado en vista de los problemas anteriores, y es un primer objeto de la presente invención proporcionar un método para la separación y la utilización de colágeno de diversos tejidos de animales.

10 Para este propósito, un segundo objeto de la presente invención es proporcionar un método para la separación eficaz de colágeno de tejidos óseos y cartilagosos, tejidos cutáneos y tejidos de tendinosos/ligamentosos de animales.

Un tercer objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar una solución de colágeno a partir de dichos tejidos separados.

15 Un cuarto objeto de la presente invención es proporcionar una matriz de colágeno y una solución de colágeno altamente concentrada usando la solución de colágeno anterior.

Un quinto objeto de la presente invención es proporcionar un método para separar colágeno de diversos tejidos de animales, un método para preparar una solución de colágeno y un producto manufacturado usando dicho método, que son adecuados para mejorar la satisfacción del cliente mediante una calidad y fiabilidad del producto notablemente mejoradas.

20 Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, los anteriores y otros objetos pueden conseguirse mediante la provisión de un método para preparar una solución de colágeno a partir de diversos tejidos de un animal, que comprende, en el momento del tratamiento final de colágeno, tratar una solución de colágeno que tiene una concentración predeterminada en condiciones neutras a una baja temperatura, seguido por tratamiento durante una noche a una temperatura de 30 a 35°C; concentrar colágeno mediante centrifugado; y disolver el colágeno concentrado de este modo en disolvente débilmente ácido refrigerado o solución salina tamponada con fosfato (PBS), preparando de este modo una solución que tiene una concentración de colágeno de 1 a 5 mg/ml.

Breve descripción de los dibujos

30 Los anteriores y otros objetos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es una fotografía que muestra patrones y resultados de SDS-PAGE de colágeno aplicado a la presente invención, en base a la separación por tamaños de proteína;

La figura 2 es un gráfico y una fotografía que muestran resultados del análisis de colágeno aplicado a la presente invención, usando un analizador de imágenes;

35 La figura 3 es una fotografía de un producto de matriz fabricado usando colágeno de acuerdo con la presente invención; y

La figura 4 es una fotografía de un producto de solución de colágeno altamente concentrada fabricado usando colágeno de acuerdo con la presente invención.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

40 Las realizaciones preferidas de la presente invención para conseguir los objetos mencionados anteriormente se describirán ahora en más detalle en referencia a los dibujos adjuntos.

Un método para separar colágeno de diversos tejidos de animales, un método para preparar una solución de colágeno y un producto manufacturado usando dicho método, que se aplican a la presente invención, se constituyen tal como se muestra en las figuras 1 a 4.

45 En relación con la descripción de la presente invención en lo sucesivo en el presente documento, si se considera que la descripción de funciones o construcciones conocidas relacionadas con la presente invención puede hacer al asunto de la presente invención poco claro, la descripción detallada de las mismas se omitirá.

Los términos que se describirán en lo sucesivo en el presente documento se establecen teniendo en consideración funciones en la presente invención y pueden variar de acuerdo con la intención del fabricante o una práctica habitual

en la técnica relacionada. Por lo tanto, los términos usados en el presente documento deben definirse en base al contenido de la memoria descriptiva de la presente invención.

5 La presente invención se refiere a un método mejorado para separar eficazmente colágeno de diversos tejidos, particularmente un método para separar colágeno de tejidos óseos, y un método de aplicación del colágeno separado.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "colágeno separado" se refiere a aquel a partir del cual péptidos que tienen una fuerte antigenicidad se retiraron tratando colágeno, extraído de diversos animales, con ácidos o enzimas tales como pepsina, tripsina, quimotripsina, papaína y ficina.

10 El colágeno de acuerdo con la presente invención muestra solubilidad a una temperatura de 4 a 10°C en condiciones de pH ácido, pero insolubilidad a una temperatura de 30 a 37°C en condiciones de pH neutro. Además, cuando el colágeno a una concentración predeterminada se mantiene a una temperatura de 30 a 37°C con respecto a cambios de acidez de un valor de pH ácido a un valor de pH neutro, el colágeno de acuerdo con la presente invención muestra una forma de gel. La aplicación de cierto estímulo al colágeno da como resultado un cambio de la forma de gel a la forma similar a una fibra insoluble.

15 En un método al que se le aplican temperatura y pH apropiados, la valoración de colágeno a un pH neutro mientras se mantiene la condición de temperatura de 4°C puede conservar propiedades de la fase de solución durante un periodo de tiempo predeterminado incluso en condiciones neutras.

Adicionalmente, se pretende que la separación de colágeno se lleve a cabo aprovechando las diferencias de cambios de pH y temperaturas, diferencias de concentraciones de sal diferenciales y precipitación en etanol.

20 Además, la presente invención se usará como un método para concentrar colágeno manteniendo una solución de colágeno a una temperatura de 30 a 37°C en condiciones neutras durante un periodo de tiempo predeterminado para inducir la separación en capas, y precipitar el colágeno mediante centrifugado.

25 Tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, el colágeno incrementa una concentración de plaquetas y causa la agregación de plaquetas, y también deforma las formas o las estructuras bioquímicas de plaquetas, activando de este modo las plaquetas. Por lo tanto, el colágeno también se usa ampliamente como hemostático.

Se sabe que la viscosidad de colágeno con respecto al pH es mayor en un intervalo de pH de 5,0 a 6,0.

30 Para esto, en el momento del tratamiento final de colágeno de acuerdo con la presente invención, una solución de colágeno que tiene una concentración predeterminada se trata a una baja temperatura en condiciones neutras y se trata a continuación a una temperatura de 30 a 35°C durante una noche mientras se aplica una agitación predeterminada. Después del tratamiento durante una noche, el colágeno se concentra mediante centrifugado y el colágeno concentrado de este modo se disuelve en disolvente débilmente ácido o solución salina tamponada con fosfato (PBS), que se mantuvo en almacenamiento en frío, preparando de este modo una solución de colágeno que tiene una concentración de 1 a 5 mg (de colágeno)/ml.

35 El colágeno de acuerdo con la presente invención puede aplicarse en forma de una matriz o una solución altamente concentrada.

Es decir, tal como se muestra en la figura 3, la matriz se prepara inyectando aire puro filtrado en colágeno a una concentración y un pH adecuados para formar de este modo poros predeterminados, seguido por liofilización y secado por calor seco.

40 En este caso, la matriz de colágeno está hecha de una solución de colágeno que tiene una concentración de colágeno de 3 a 5 mg/ml. Específicamente, aire puro filtrado se inyecta en la solución de colágeno a un pH de 5,0 a 6,0, formando de este modo poros predeterminados. La solución de colágeno con poros formados a continuación se liofiliza, se envasa mediante tratamiento térmico y se esteriliza con óxido de etileno (EO) gaseoso o irradiación con rayos gamma (rayos γ), formando de este modo una matriz de colágeno. La matriz puede construirse en diversas formas dependiendo de los tipos de moldes usados. La matriz construida de este modo puede usarse como hemostático, soporte y similares, y diversas formas de los hemostáticos y soportes de colágeno están actualmente disponibles en el mercado. Además, la matriz de colágeno puede incluir otros componentes tales como fibrinógeno y trombina para potenciar efectos de colágeno como hemostático. Dicha matriz de colágeno también puede usarse como apósitos adhesivos hemostáticos.

50 Para utilizar una solución de colágeno altamente concentrada, tal como se muestra en la figura 4, la presente invención prepara una solución de colágeno esterilizando colágeno a una concentración de 1 mg/ml a través de un filtro de 0,22 micrómetros y concentrando el colágeno esterilizado para obtener una solución de colágeno del 3 al 7%. La solución de colágeno altamente concentrada se usa como relleno para eliminar arrugas en la piel, y está también disponible en el mercado como en producto correspondiente. Además, usando la solución de colágeno

altamente concentrada que contiene sustancias antibióticas o factores de crecimiento, es posible inducir efectos de regeneración tisular en heridas y regiones dañadas pulverizando la solución de colágeno sobre ellas.

Modo para la invención

EJEMPLOS

5 A continuación, la presente invención se describirá en más detalle en referencia a los siguientes ejemplos. Estos ejemplos se proporcionan solamente para ilustrar la presente invención y no debe interpretarse que limitan el alcance y espíritu de la presente invención.

Ejemplo 1

10 Tejido óseo porcino se preparó en un polvo que tenía un tamaño de partícula de 1 a 500 micrómetros y se trató con ácido con HCl 0,5 N. A continuación, el tejido óseo tratado con ácido se trató repetidamente con pepsina (de 2 a 5 veces) durante un largo periodo de tiempo (de 3 a 7 días) para separar colágeno de tipo I que a continuación se sometió a tratamiento con sal para fraccionamiento y tratamiento con etanol, obteniendo de este modo colágeno a del 5 al 10% del peso del tejido inicial. Específicamente, este procedimiento se describirá en más detalle en lo sucesivo en el presente documento:

- 15 1. Tejido óseo aislado porcino se lavó exhaustivamente con agua destilada, etanol, acetona y similares.
2. El tejido óseo se cortó en forma de rosquilla y se almacenó a -20°C.
3. Para separar el colágeno del tejido óseo, el tejido óseo se preparó en un polvo que tenía un tamaño de partícula de 1 a 500 micrómetros.
4. El tejido óseo pulverizado se lavó con etanol y agua destilada.
- 20 5. El polvo óseo lavado de este modo se trató durante una noche con HCl 0,5 N mientras se agitaba a de 10 a 100 rpm.
6. Después del tratamiento durante una noche, el polvo óseo se trató con pepsina (la pepsina se trató en una relación de 10 a 50:1 del tejido:pepsina, y se disolvió en HCl 0,1 N antes del uso).
7. El tratamiento con pepsina se repitió de 2 a 5 veces durante de 3 a 7 días.
- 25 8. La solución de polvo óseo tratado con pepsina se centrifugó a 4°C y 12.000 g durante 30 minutos, y un sobrenadante se separó y se almacenó y un precipitado se devolvió a la etapa 7.
9. Una concentración final de NaCl de 0,5 a 0,8 M se aplicó al sobrenadante separado y almacenado que, a continuación, se trató a 44°C durante de 4 horas a 1 día.
10. Después del centrifugado (12.000 g, 30 minutos y 4°C), se retiró un precipitado y se recogió un sobrenadante.
- 30 11. El sobrenadante se valoró en condiciones neutras y se preparó una concentración final de la solución de NaCl 1,6 M.
12. La solución resultante se trató a 4°C durante de 4 horas a 1 día y se centrifugó, y se retiró de nuevo un precipitado y se recogió un sobrenadante.
- 35 13. Adicionalmente se añadió NaCl al sobrenadante recogido a una concentración final de NaCl 2,6 M, seguido por un periodo de reposo a 4°C durante de 4 horas a 1 día.
14. Se llevó a cabo centrifugado para retirar un sobrenadante, y el precipitado resultante se lavó una o dos veces con etanol al 95% y se resuspendió en agua destilada.
15. Se añadió HCl 1 N a la solución resuspendida en una cantidad de relación de 1ml:100 ml para conseguir la resuspensión completa y se valoró de nuevo a 4°C en condiciones neutras.
- 40 16. La solución valorada de este modo se dejó reposar a una temperatura de 30 a 37°C durante de 4 horas a 1 día y a continuación se centrifugó, y
17. El colágeno precipitado de este modo se resuspendió a una concentración de 1 a 30 mg/ml en disolvente débilmente ácido o PBS, y se almacenó a 4°C.

Ejemplo 2

45 Tejido cartilaginoso porcino se preparó en un polvo y se trató con ácido con HCl 0,5 N. A continuación, el tejido cartilaginoso tratado con ácido se trató repetidamente con pepsina para separar colágeno de tipo II que, a

continuación, se sometió a tratamiento con sal para fraccionamiento y tratamiento con etanol, obteniendo de este modo colágeno a del 5 al 10% del peso del tejido inicial. Específicamente, este procedimiento se describirá con más detalle en lo sucesivo en el presente documento:

1. Tejido cartilaginoso aislado porcino se lavó exhaustivamente con agua destilada, etanol, acetona y similares.
- 5 2. Para separar el colágeno del tejido cartilaginoso, el tejido cartilaginoso se preparó en un polvo que tenía un tamaño de partícula de 1 a 500 micrómetros.
3. El tejido cartilaginoso pulverizado se lavó con etanol y agua destilada.
4. El tejido cartilaginoso lavado de este modo se trató durante una noche con una solución de guanidina-HCl (guanidina-HCl 4 M, Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5).
- 10 5. El polvo de cartílago tratado durante una noche se lavó una o dos veces con HCl 0,1 N.
6. El polvo de cartílago se trató durante una noche con HCl 0,5 N mientras se agitaba a de 10 a 100 rpm.
7. Después del tratamiento durante una noche, el polvo de cartílago se trató con pepsina (la pepsina se trató en una relación de 10 a 50:1 del tejido:pepsina, y se disolvió en HCl 0,1 N antes del uso).
8. El tratamiento con pepsina se repitió de 2 a 5 veces durante de 3 a 7 días.
- 15 9. La solución de polvo de cartílago tratado con pepsina se centrifugó a 4°C y 12.000 g durante 30 minutos, y un sobrenadante se separó y se almacenó y un precipitado se devolvió a la etapa 8.
10. Una concentración final de NaCl de 0,5 a 0,8 M se aplicó al sobrenadante separado y almacenado que a continuación se trató a 4°C durante de 4 horas a 1 día.
11. Después del centrifugado (12.000 g, 30 minutos y 4°C), se retiró un precipitado y se recogió un sobrenadante.
- 20 12. El sobrenadante se valoró en condiciones neutras y se preparó una concentración final de la solución de NaCl 2,6 M.
13. La solución resultante se trató a 4°C durante de 4 horas a 1 día y se centrifugó, y se retiró de nuevo un precipitado y se recogió un sobrenadante.
14. Adicionalmente se añadió NaCl al sobrenadante recogido a una concentración final de NaCl de 3,5 a 4,0 M, seguido por un periodo de reposo a 4°C durante de 4 horas a 1 día.
- 25 15. Se llevó a cabo centrifugado para retirar un sobrenadante, y el precipitado resultante se lavó una o dos veces con etanol al 95% y se resuspendió en agua destilada.
16. Se añadió HCl 1 N a la solución resuspendida en una cantidad de relación de 1 ml:100 ml para conseguir la resuspensión completa y se valoró de nuevo a 4°C en condiciones neutras.
- 30 17. La solución valorada de este modo se dejó reposar a una temperatura de 30 a 37°C durante de 4 horas a 1 día y a continuación se centrifugó, y
18. El colágeno precipitado de este modo se resuspendió a una concentración de 1 a 30 mg/ml en disolvente débilmente ácido o PBS, y se almacenó a 4°C.

Ejemplo 3

- 35 Tejido cutáneo porcino se preparó en una sección (de 500 micrómetros a 5 mm de grosor), y la sección tisular se colocó en una red que tenía un tamaño de malla de 200 a 500 micrómetros y (se trató con ácido con HCl 0,1 N. A continuación, el tejido tratado con ácido) se trató repetidamente con pepsina para separar colágeno de tipo I que, a continuación, se sometió a tratamiento con sal para fraccionamiento y tratamiento con etanol, obteniendo de este modo colágeno a del 10 al 15% del peso del tejido inicial. Específicamente, este procedimiento se describirá con más detalle en lo sucesivo en el presente documento:
- 40 1. Tejido cutáneo aislado porcino se lavó exhaustivamente con agua destilada, etanol y similares, y se almacenó a -20°C.
2. Para separar el colágeno, del tejido cutáneo, el tejido cutáneo se preparó en una sección que tenía un grosor de 500 micrómetros a 5 mm.
- 45 3. La sección tisular se colocó en una red que tenía un tamaño de malla de 200 a 500 micrómetros y se lavó con etanol y agua destilada.

4. La sección tisular lavada de este modo se trató con pepsina (la pepsina se trató en una relación de 10 a 50:1 del tejido:pepsina, y se disolvió en HCl 0,1 N antes del uso).
5. El tratamiento con pepsina se repitió de 2 a 3 veces durante de 2 a 3 días.
- 5 6. La solución de tejido cutáneo tratado con pepsina se centrifugó a 4°C y 12.000 g durante 30 minutos, y un sobrenadante se separó y se almacenó y un precipitado se devolvió a la etapa 5.
7. Una concentración final de NaCl de 0,5 a 0,8 M se aplicó al sobrenadante separado y almacenado que a continuación se trató a 4°C durante de 4 horas a 1 día.
8. Después del centrifugado (12.000 g, 30 minutos y 4°C), se retiró un precipitado y se recogió un sobrenadante.
- 10 9. El sobrenadante se valoró en condiciones neutras y se preparó una concentración final de la solución de NaCl 1,6 M.
- 10 10. La solución resultante se trató a 4°C durante de 4 horas a 1 día y se centrifugó, y se retiró de nuevo un precipitado y se recogió un sobrenadante.
11. Adicionalmente se añadió NaCl al sobrenadante recogido a una concentración final de NaCl 2,6 M, seguido por un periodo de reposo a 4°C durante de 4 horas a 1 día.
- 15 12. Se llevó a cabo centrifugado para retirar un sobrenadante, y el precipitado resultante se lavó una o dos veces con etanol al 95% y se resuspendió en agua destilada.
13. Se añadió HCl 1 N a la solución resuspendida en una cantidad de relación de 1 ml:100 ml para conseguir la resuspensión completa y se valoró de nuevo a 4°C en condiciones neutras.
- 20 14. La solución valorada de este modo se dejó reposar a una temperatura de 30 a 37°C durante de 4 horas a 1 día y a continuación se centrifugó, y
15. El colágeno precipitado de este modo se resuspendió a una concentración de 1 a 30 mg/ml en disolvente débilmente ácido o PBS, y se almacenó a 4°C.

Ejemplo 4

- 25 Tejido tendinoso/ligamentoso porcino se preparó en una sección (de 500 micrómetros a 5 mm de grosor) y se trató con pepsina para separar colágeno de tipo I que, a continuación, se sometió a tratamiento con sal para fraccionamiento y tratamiento con etanol, separando de este modo colágeno a del 10 al 20% del peso del tejido inicial. Específicamente, este procedimiento se describirá con más detalle en lo sucesivo en el presente documento:
 1. Tejido tendinoso/ligamentoso aislado porcino se lavó exhaustivamente con agua destilada, etanol y similares, y se almacenó a -20°C.
 - 30 2. Para separar el colágeno del tejido tendinoso/ligamentoso, el tejido tendinoso/ligamentoso se preparó en una sección que tenía un grosor de 500 micrómetros a 5 mm.
 3. La sección tisular se lavó con etanol y agua destilada.
 4. La sección tisular lavada de este modo se trató con pepsina (una relación de 10 a 50:1 del tejido:pepsina, disuelta en HCl 0,1 N antes del uso).
 - 35 5. El tratamiento con pepsina se repitió de 2 a 3 veces durante de 2 a 3 días.
 6. La solución de tejido tendinoso/ligamentoso tratado con pepsina se centrifugó a 4°C y 12.000 g durante 30 minutos, y un sobrenadante se separó y se almacenó y un precipitado se devolvió a la etapa 5.
 7. Una concentración final de NaCl de 0,5 a 0,8 M se aplicó al sobrenadante separado y almacenado que, a continuación, se trató a 4°C durante de 4 horas a 1 día.
 - 40 8. Después del centrifugado (12.000 g, 30 minutos y 4°C), se retiró un precipitado y se recogió un sobrenadante.
 9. El sobrenadante se valoró en condiciones neutras y se preparó una concentración final de la solución de NaCl 1,6 M.
 10. La solución resultante se trató a 4°C durante de 4 horas a 1 día y se centrifugó, y se retiró de nuevo un precipitado y se recogió un sobrenadante.
 - 45 11. Adicionalmente se añadió NaCl al sobrenadante recogido a una concentración final de NaCl 2,6 M, seguido por un periodo de reposo a 4°C durante de 4 horas a 1 día.

12. Se llevó a cabo centrifugado para retirar un sobrenadante, y el precipitado resultante se lavó una o dos veces con etanol al 95% y se resuspendió en agua destilada.

13. Se añadió HCl 1 N a la solución resuspendida en una cantidad de relación de 1 ml:100 ml para conseguir la resuspensión completa y se valoró de nuevo a 4°C en condiciones neutras.

5 14. La solución valorada de este modo se dejó reposar a una temperatura de 30 a 37°C durante de 4 horas a 1 día y a continuación se centrifugó, y

15. El colágeno precipitado de este modo se resuspendió a una concentración de 1 a 30 mg/ml en disolvente débilmente ácido o PBS, y se almacenó a 4°C.

10 Mediante los efectos de los ejemplos 1 a 4 mencionados anteriormente, podía confirmarse a partir de los resultados del análisis por SDS-PAGE mostrados en la figura 1 que pesos moleculares de las bandas correspondientes eran de aproximadamente 140 kDa y 130 kDa, respectivamente.

15 Además, a partir de los resultados del análisis de imagen de colágeno mostrados en la figura 2, podía confirmarse que las características de colágeno de tipo I, es decir una relación de $\alpha 1:\alpha 2$ es 2:1 (un valor de resultados de ensayo). La figura 3 muestra una fotografía de un producto de matriz fabricado usando colágeno de acuerdo con la presente invención, y la figura 4 muestra una fotografía de un producto de solución de colágeno altamente concentrada fabricado usando colágeno de acuerdo con la presente invención.

Aplicabilidad industrial

20 Tal como es evidente a partir de la descripción anterior, la presente invención permite la separación y la utilización de colágeno de diversos tejidos de animales. Para este propósito, son objetos específicos de la presente invención proporcionar un método para separación eficaz de colágeno de tejidos óseo, cartilaginoso, cutáneo y tendinoso/ligamentoso de animales, preparación de una solución de colágeno a partir de dichos tejidos aislados, y preparación de una matriz y una solución altamente concentrada usando la solución de colágeno. Por lo tanto, la presente invención consigue una calidad y fiabilidad del producto notablemente mejoradas y, por lo tanto, es muy útil para mejorar la satisfacción del cliente.

25

REIVINDICACIONES

1. Un método para separar colágeno de un tejido animal,
obteniendo de este modo colágeno a del 5 al 10% del peso del tejido inicial, que comprende
- 5 1. lavar exhaustivamente un tejido óseo aislado porcino con agua destilada, etanol y acetona;
2. cortar el tejido óseo en forma de rosquilla y almacenarlo a -20°C;
3. procesar el tejido óseo a un polvo que tiene un tamaño de partícula de 1 a 500 micrómetros, para separar el colágeno del tejido óseo;
4. lavar el polvo de tejido óseo con etanol y agua destilada;
- 10 5. tratar el polvo óseo lavado de este modo durante una noche con HCl 0,5 N mientras se agitaba a de 10 a 100 rpm;
6. tratar el polvo óseo con pepsina (relación de 10 a 50:1 del tejido:pepsina, y disuelta en HCl 0,1 N antes del uso), después del tratamiento durante una noche;
7. repetir el tratamiento con pepsina de 2 a 5 veces durante de 3 a 7 días;
- 15 8. centrifugar la solución de polvo óseo tratado con pepsina a 4°C y 12.000 g durante 30 minutos, y a continuación separar y almacenar un sobrenadante y devolver un precipitado a la etapa 7;
9. aplicar una concentración final de NaCl de 0,5 a 0,8 M al sobrenadante separado y almacenado, seguido por tratamiento a 4°C durante de 4 horas a 1 día;
10. retirar un precipitado y recoger un sobrenadante, después del centrifugado (12.000 g, 30 minutos y 4°C);
- 20 11. valorar el sobrenadante en condiciones neutras y añadir NaCl para preparar una concentración final de la solución a NaCl 1,6 M;
12. tratar la solución resultante a 4°C durante de 4 horas a 1 día, seguido por centrifugado, y retirar de nuevo un precipitado y recoger un sobrenadante;
- 25 13. adicionalmente añadir NaCl al sobrenadante recogido a una concentración final de NaCl 2,6 M, seguido por un periodo de reposo a 4°C durante de 4 horas a 1 día;
14. centrifugar para retirar un sobrenadante, y lavar el precipitado resultante una o dos veces con etanol al 9,5%, seguido por resuspensión en agua destilada;
15. añadir HCl 1 N a la solución resuspendida en una cantidad de relación de 1 ml:100 ml para conseguir la resuspensión completa, seguido por valoración a 4°C en condiciones neutras;
- 30 16. dejar reposar a la solución valorada de este modo a una temperatura de 30 a 37°C durante de 4 horas a 1 día, seguido por centrifugado; y
17. resuspender el colágeno precipitado de este modo a una concentración de 1 a 30 mg/ml en disolvente débilmente ácido o PBS, seguido por almacenamiento a 4°C.
2. Un método para separar colágeno de un tejido animal,
obteniendo de este modo colágeno a del 5 al 10% del peso del tejido inicial, que comprende
- 35 1. lavar exhaustivamente un tejido cartilaginoso aislado porcino con agua destilada, etanol y acetona;
2. procesar el tejido cartilaginoso a un polvo que tiene un tamaño de partícula de 1 a 500 micrómetros, para separar el colágeno del tejido cartilaginoso;
3. lavar el polvo de tejido cartilaginoso con etanol y agua destilada;
- 40 4. tratar el tejido cartilaginoso lavado de este modo durante una noche con una solución de guanidina-HCl (guanidina-HCl 4 M, Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5);
5. lavar el polvo de cartílago tratado durante una noche una o dos veces con HCl 0,1 N;

6. tratar el polvo de cartílago lavado de este modo durante una noche con HCl 0,5 N mientras se agitaba a de 10 a 100 rpm;
7. tratar el polvo de cartílago con pepsina (relación de 10 a 50:1 del tejido:pepsina, y disuelta en HCl 0,1 N antes del uso), después del tratamiento durante una noche;
- 5 8. repetir el tratamiento con pepsina de 2 a 5 veces durante de 3 a 7 días;
9. centrifugar la solución de polvo de cartílago tratado con pepsina a 4°C y 12.000 g durante 30 minutos, y a continuación separar y almacenar un sobrenadante y devolver un precipitado a la etapa 8;
10. aplicar una concentración final de NaCl de 0,5 a 0,8 M al sobrenadante separado y almacenado, seguido por tratamiento a 4°C durante de 4 horas a 1 día;
- 10 11. retirar un precipitado y recoger un sobrenadante, después del centrifugado (12.000 g, 30 minutos y 4°C);
12. valorar el sobrenadante en condiciones neutras y añadir NaCl para preparar una concentración final de la solución a NaCl 2,6 M;
13. tratar la solución resultante a 4°C durante de 4 horas a 1 día, seguido por centrifugado, y retirar de nuevo un precipitado y recoger un sobrenadante;
- 15 14. adicionalmente añadir NaCl al sobrenadante recogido a una concentración final de NaCl de 3,5 a 4,0 M, seguido por un periodo de reposo a 4°C durante de 4 horas a 1 día;
- 15 15. centrifugar para retirar un sobrenadante, y lavar el precipitado resultante una o dos veces con etanol al 95%, seguido por resuspensión en agua destilada;
- 20 16. añadir HCl 1 N a la solución resuspendida en una cantidad de relación de 1 ml:100 ml para conseguir la resuspensión completa, seguido por valoración a 4°C en condiciones neutras;
17. dejar reposar a la solución valorada de este modo a una temperatura de 30 a 37°C durante de 4 horas a 1 día, seguido por centrifugado; y
18. resuspender el colágeno precipitado de este modo a una concentración de 1 a 30 mg/ml en disolvente débilmente ácido o PBS, seguido por almacenamiento a 4°C.
- 25 3. Un método para separar colágeno de un tejido animal, obteniendo de este modo colágeno a del 10 al 15% del peso del tejido inicial, que comprende
 1. lavar exhaustivamente un tejido cutáneo aislado porcino con agua destilada y etanol, seguido por almacenamiento a -20°C;
 - 30 2. procesar el tejido cutáneo en una sección que tiene un grosor de 500 micrómetros a 5 mm, para separar el colágeno del tejido cutáneo;
 3. colocar la sección tisular en una red que tiene un tamaño de malla de 200 a 500 micrómetros y lavar con etanol y agua destilada;
 4. tratar el tejido cutáneo lavado de este modo con pepsina (relación de 10 a 50:1 del tejido:pepsina, y disuelta en HCl 0,1 N antes del uso);
 - 35 5. repetir el tratamiento con pepsina de 2 a 3 veces durante de 2 a 3 días;
 6. centrifugar la solución de tejido cutáneo tratado con pepsina a 4°C y 12.000 g durante 30 minutos, y a continuación separar y almacenar un sobrenadante y devolver un precipitado a la etapa 5;
 7. aplicar una concentración final de NaCl de 0,5 a 0,8 M al sobrenadante separado y almacenado, seguido por tratamiento a 4°C durante de 4 horas a 1 día;
 - 40 8. retirar un precipitado y recoger un sobrenadante, después del centrifugado (12.000 g, 30 minutos y 4°C);
 9. valorar el sobrenadante en condiciones neutras y añadir NaCl para preparar una concentración final de la solución a NaCl 1,6 M;
 10. tratar la solución resultante a 4°C durante de 4 horas a 1 día, seguido por centrifugado y retirar de nuevo un precipitado y recoger un sobrenadante;

11. adicionalmente añadir NaCl al sobrenadante recogido a una concentración final de NaCl 2,6 M, seguido por un periodo de reposo a 4°C durante de 4 horas a 1 día;
12. centrifugar para retirar un sobrenadante, y lavar el precipitado resultante una o dos veces con etanol al 95%, seguido por resuspensión en agua destilada;
- 5 13. añadir HCl 1 N a la solución resuspendida en una cantidad de relación de 1 ml:100 ml para conseguir la resuspensión completa, seguido por valoración a 4°C en condiciones neutras;
14. dejar reposar a la solución valorada de este modo a una temperatura de 30 a 37°C durante de 4 horas a 1 día, seguido por centrifugado; y
- 10 15. resuspender el colágeno precipitado de este modo a una concentración de 1 a 30 mg/ml en disolvente débilmente ácido o PBS, seguido por almacenamiento a 4°C.
4. Un método para separar colágeno de un tejido animal, obteniendo de este modo colágeno a del 10 al 20% del peso del tejido inicial, que comprende
1. lavar exhaustivamente un tejido tendinoso/ligamentoso aislado porcino con agua destilada y etanol, seguido por almacenamiento a -20°C;
- 15 2. procesar el tejido tendinoso/ligamentoso en una sección que tiene un grosor de 500 micrómetros a 5 mm, para separar el colágeno del tejido tendinoso/ligamentoso;
3. lavar la sección tisular con etanol y agua destilada;
4. tratar el tejido tendinoso/ligamentoso lavado de este modo con pepsina (relación de 10 a 50:1 del tejido:pepsina, y disuelta en HCl 0,1 N antes del uso);
- 20 5. repetir el tratamiento con pepsina de 2 a 3 veces durante de 2 a 3 días;
6. centrifugar la solución de tejido tendinoso/ligamentoso tratado con pepsina a 4°C y 12.000 g durante 30 minutos, y a continuación separar y almacenar un sobrenadante y devolver un precipitado a la etapa 5;
7. aplicar una concentración final de NaCl de 0,5 a 0,8 M al sobrenadante separado y almacenado, seguido por tratamiento a 4°C durante de 4 horas a 1 día;
- 25 8. retirar un precipitado y recoger un sobrenadante, después del centrifugado (12.000 g, 30 minutos y 4°C);
9. valorar el sobrenadante en condiciones neutras y añadir NaCl para preparar una concentración final de la solución a NaCl 1,6 M;
10. tratar la solución resultante a 4°C durante de 4 horas a 1 día, seguido por centrifugado, y retirar de nuevo un precipitado y recoger un sobrenadante;
- 30 11. adicionalmente añadir NaCl al sobrenadante recogido a una concentración final de NaCl 2,6 M, seguido por un periodo de reposo a 4°C durante de 4 horas a 1 día;
12. centrifugar para retirar un sobrenadante, y lavar el precipitado resultante una o dos veces con etanol al 95%, seguido por resuspensión en agua destilada;
- 35 13. añadir HCl 1 N a la solución resuspendida en una cantidad de relación 1 ml:100 ml para conseguir la resuspensión completa, seguido por valoración a 4°C en condiciones neutras;
14. dejar reposar a la solución valorada de este modo a una temperatura de 30 a 37°C durante de 4 horas a 1 día, seguido por centrifugado; y
15. resuspender el colágeno precipitado de este modo a una concentración de 1 a 30 mg/ml en disolvente débilmente ácido o PBS, seguido por almacenamiento a 4°C.
- 40 5. Un método para preparar una solución de colágeno a partir de un tejido animal, que comprende, durante el tratamiento final del colágeno:
- tratar una solución de colágeno tal como preparada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 que tiene una concentración predeterminada en condiciones neutras a 4°C, seguido por tratamiento durante una noche a una temperatura de 30 a 35°C;
- 45 concentrar el colágeno mediante centrifugado; y

ES 2 439 445 T3

disolver el colágeno concentrado de este modo en disolvente débilmente ácido refrigerado o

solución salina tamponada con fosfato (PBS), preparando de este modo colágeno que tiene una concentración de 1 a 5 mg/ml.

6. Un método para preparar una matriz de colágeno, que comprende:

5 inyectar aire puro filtrado en una solución de colágeno tal como preparada de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 a una concentración adecuada a de 3 a 5 mg/ml y pH para formar de este modo poros predeterminados; y

liofilizar la solución con poros formados para preparar una matriz,

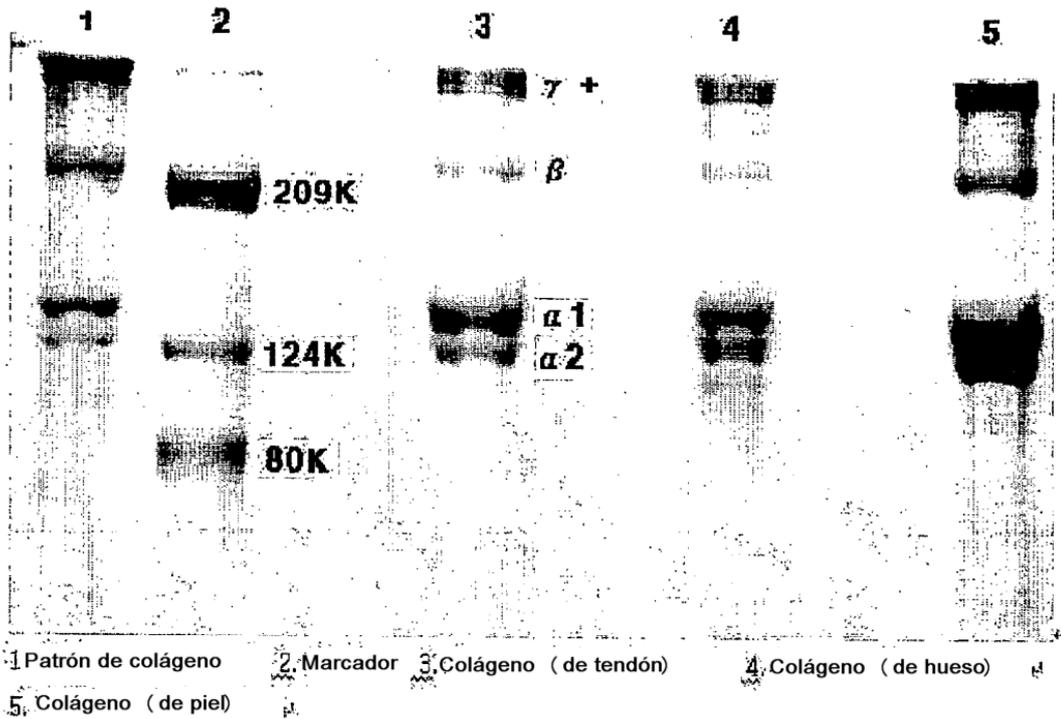
10 en el que la matriz se prepara a partir de una solución de colágeno que tiene una concentración de colágeno de 3 a 5 mg/ml, y se prepara inyectando aire puro filtrado en la solución de colágeno a un pH de 5,0 a 6,0,

para formar de este modo poros predeterminados,

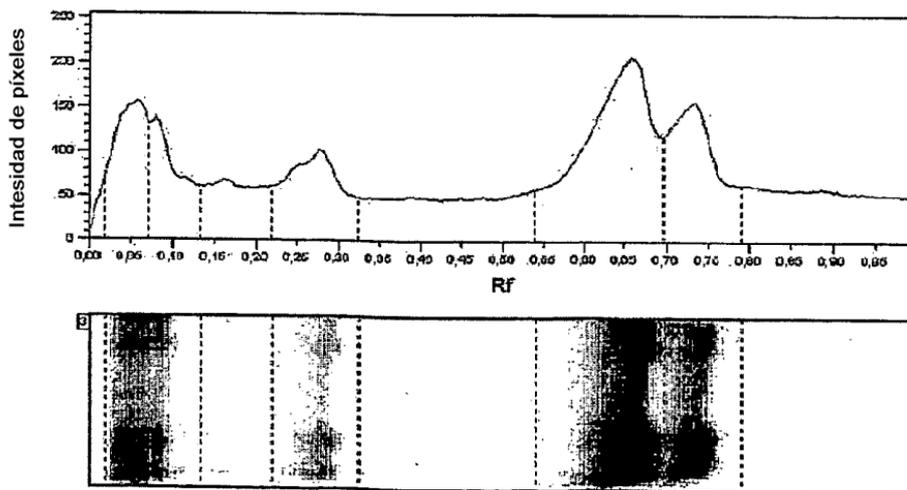
liofilizar la solución de colágeno con poros formados,

15 envasar los liofilizados resultantes mediante tratamiento térmico y esterilizarlos con óxido de etileno (EO) gaseoso o irradiación con rayos gamma (rayos γ) para preparar de este modo una matriz de colágeno.

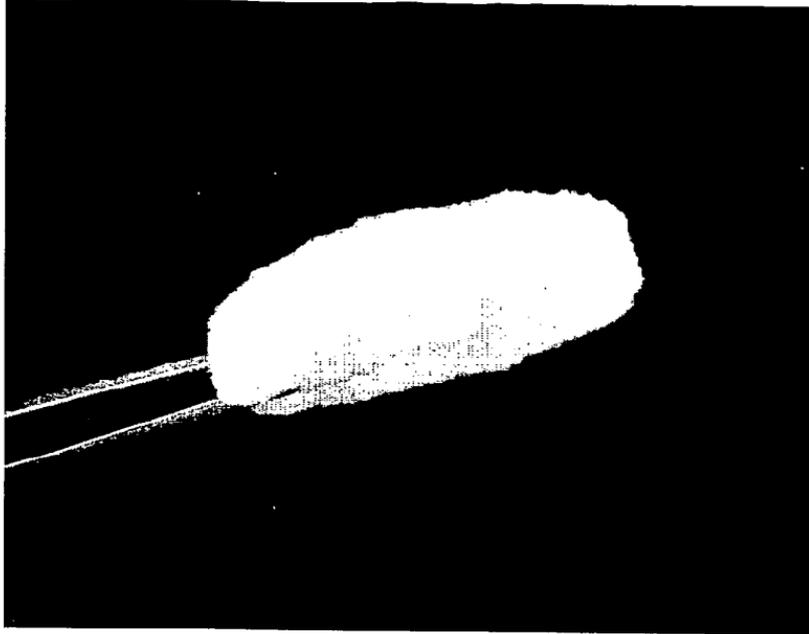
[Fig.1]



[Fig.2]



【Fig.3】



【Fig.4】

