

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 281**

51 Int. Cl.:

A61L 27/24	(2006.01)
A61L 27/38	(2006.01)
A61L 27/36	(2006.01)
C07K 14/78	(2006.01)
C07K 1/14	(2006.01)
C07K 1/34	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.12.2014 PCT/KR2014/012176**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.05.2016 WO16080578**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2014 E 14906285 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3222299**

54 Título: **Método para producir colágeno a alta concentración para su uso como material médico**

30 Prioridad:

21.11.2014 KR 20140163800

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.11.2020

73 Titular/es:

**SEWONCELLONTECH CO., LTD. (100.0%)
(Yeouido-dong, SIMPAC building) 52,
Gukjegeumyung-ro, Yeongdeungpogu
Seoul 07330, KR**

72 Inventor/es:

**CHANG, CHEONG HO;
JEONG, HYEONG WOO;
YOO, JI CHUL;
YEO, SE KEN y
SUH, DONG SAM**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 791 281 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 para producir colágeno a alta concentración para su uso como material médico

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método de producción de colágeno a alta concentración adecuado para su uso como material médico, y más particularmente a un método de producción de colágeno a alta concentración, en el que el colágeno puede prepararse a diversas concentraciones para que sea adecuado para su uso como material médico, y especialmente el colágeno a alta concentración puede presentar un rendimiento superior para un fin correspondiente y puede almacenarse fácilmente en comparación con colágeno a baja concentración. Además, la presente invención permite mejoras en la calidad y fiabilidad de los productos para satisfacer de ese modo diversas necesidades de los consumidores, que son los usuarios de los mismos, y es por tanto muy útil.

15 Técnica anterior

El colágeno es una proteína que se distribuye en diversos tejidos de animales y constituye aproximadamente el 30% del peso total de proteína de los mismos.

20 Normalmente, el colágeno es una proteína fibrosa y es una de las proteínas que constituyen la piel, los huesos y los tendones. Se distribuye principalmente en los tejidos conjuntivos del cuerpo, y los cuerpos humanos contienen aproximadamente el 20% de proteínas, constituyendo el colágeno aproximadamente el 30% de las mismas. El colágeno tiene una estructura molecular de triple hélice configurada de manera que tres cadenas de polipéptido se enrollan una alrededor de otra y se unen mediante enlaces de hidrógeno. El colágeno que tiene una estructura de este tipo desempeña un papel en la presentación de adhesión de células, soporte del cuerpo y los órganos, activación de funciones celulares, proliferación celular, hemostasia e inmunidad, y además el colágeno es responsable de funciones orgánicas del cuerpo al tiempo que forma el mismo, y por tanto es una proteína que es esencial para el cuerpo.

30 El colágeno, gracias a las propiedades anteriores, se utiliza actualmente como material o aditivo en diversos campos incluyendo los de belleza, bebidas saludables, alimentos saludables, medicamentos y cosméticos, y las aplicaciones del mismo están expandiéndose gradualmente en virtud de las propiedades funcionales del mismo.

35 Tal como se describió anteriormente, con el fin de separar el colágeno del tejido después de recoger huesos y cuero de ganado vacuno y cerdos, puede obtenerse colágeno como un material insoluble mediante extracción con un disolvente orgánico, tratamiento ácido/base, y luego adición de tripsina y hialuronidasa, pero el peso molecular del mismo es alto y, por tanto, es difícil de digerir y absorber en el cuerpo humano, y la pureza del colágeno disminuye debido a diversas impurezas contenidas en el mismo, y el campo de uso del mismo es limitado, lo que no es deseable.

40 Actualmente se conocen aproximadamente 20 tipos de colágeno, entre los cuales el colágeno tipo 1 es el más abundante, está presente morfológicamente como un sólido fibroso y está configurado de tal manera que los polipéptidos tricatenarios se retuercen mediante unión por enlaces de hidrógeno, con un peso molecular de aproximadamente 300 kDa.

45 El colágeno se disuelve en un álcali o ácido diluido y, por tanto, puede prepararse en una fase líquida, y su viscosidad aumenta con un aumento en la concentración del mismo.

50 El colágeno es adecuado para biotejido y es un material biodegradable, y por tanto se usa de manera diversa como uno de materiales médicos tales como agentes de reparación de tejidos, injertos de piel, injertos óseos y cultivos celulares.

55 Mientras tanto, el colágeno extraído de diversos materiales y preparado en una fase líquida se filtra normalmente con el fin de servir como material médico mediante la eliminación de impurezas y microorganismos del mismo.

60 Un proceso de filtración típico se realiza de una manera en la que la presión y el flujo de fluido se forman perpendiculares entre sí sobre una membrana de filtración, mediante lo cual se filtran materiales más grandes que el tamaño de poro de la membrana de filtración y se hacen pasar materiales pequeños. Durante un proceso de filtración de este tipo, el objetivo de filtración se hace pasar inmediatamente, mientras que el material que no se hace pasar puede acumularse sobre la membrana de filtración. La eficacia de filtración puede disminuir con un aumento en la cantidad de filtración, y la membrana de filtración se obstruye en última instancia. El proceso de filtración típico depende de la capacidad del objetivo de filtración y del área de la membrana, y está limitado porque la concentración de filtración es baja.

65 Por tanto, con el fin de filtrar un colágeno proteico polimérico, tiene que prepararse en una fase líquida a baja concentración. En el caso de la filtración estéril para eliminar microorganismos, el colágeno tiene que prepararse a

una concentración de aproximadamente 5 mg/ml o menos con el fin de pasar a través de una membrana de filtración que tiene un tamaño de poro pequeño de 0,22 ~ 0,45 µm.

5 En cuanto a los métodos para concentrar altamente la disolución de colágeno preparada a baja concentración, un proceso típico de concentración por evaporación es problemático porque existe una preocupación por la degradación térmica del colágeno y se requiere un largo período de tiempo para realizar el proceso de fabricación, y también, un proceso de concentración usando un disolvente volátil no es adecuado para la preparación de materiales médicos porque el disolvente restante tiene que eliminarse adicionalmente.

10 Lista de menciones

(Documento de patente 1) Publicación de solicitud de patente japonesa n.º 2001-200000, que da a conocer un método de producción de colágeno derivado de organismos marinos, en el que el tejido cutáneo de un organismo marino se limpia, se extrae el colágeno con un ácido orgánico, la disolución resultante se hace pasar a través de una membrana de purificación para eliminar impurezas y la disolución, extraída usando una proteasa, se somete a filtración usando una membrana de purificación, un proceso de concentración usando una membrana de concentración y un proceso de filtración estéril, produciendo de ese modo colágeno concentrado.

20 (Documento de patente 2) Publicación de solicitud de patente coreana n.º 2014-0091435, que da a conocer un método de preparación de colágeno que comprende realizar un proceso de concentración usando un dispositivo de filtración de flujo tangencial, concentración del colágeno concentrado usando una centrífuga y concentración del colágeno concentrado usando un liofilizador.

25 (Documento de patente 3) Patente estadounidense n.º 4894441, que da a conocer un método de preparación de colágeno que comprende extraer tejido biológico de la piel de un animal usando un ácido orgánico, añadir al tejido extraído cloruro de sodio para extraer el colágeno y preparar colágeno a través de filtración tangencial.

30 (Documento de patente 4) Publicación de solicitud de patente japonesa n.º 2011-201837, que da a conocer un método de preparación de un hidrolizado de colágeno usando una membrana de fibras huecas porosa que tienen paredes tubulares formadas por una combinación de un polímero hidrófobo y un polímero hidrófilo.

35 (Documento de patente 5) (Documento de patente internacional 5) Un método de preparación de una proteína que tiene una estructura de triple hélice que comprende concentrar colágeno usando un proceso de filtración de flujo cruzado y luego purificar el colágeno a través de la centrifugación.

El documento US 2006/110370 A1 da a conocer un método para tratar biomaterial en el que un tejido biológico se pone en contacto con una disolución de tratamiento anticalcificación en condiciones eficaces para hacer que el biomaterial sea resistente a la calcificación *in vivo* tras su implantación en un animal huésped.

40 El documento KR 101 105 603 B1 da a conocer un método para preparar una disolución de colágeno mediante un procedimiento de concentración de compresión por precipitación de sal

Divulgación

45 Problema técnico

La presente invención se ha realizado teniendo en cuenta los problemas encontrados en la técnica relacionada, y se extrae colágeno, que es una proteína que tiene baja antigenicidad y alta biodegradabilidad y biocompatibilidad, de diversos tejidos animales y puede por tanto utilizarse ampliamente no solo como material médico para dispositivos médicos y medicamentos, sino también como material para cosméticos o alimentos.

La realización de la presente invención se refleja en la reivindicación independiente 1.

55 Las realizaciones preferidas de la presente invención se reflejan en las reivindicaciones dependientes 2 a 5.

Con el fin de usar colágeno como material médico, tiene que garantizarse la seguridad biológica del mismo. Cuando se extrae colágeno del tejido de un animal, tienen que eliminarse o inactivarse virus derivados del animal para impedir la transferencia de los mismos, y además, tienen que eliminarse apropiadamente microorganismos.

60 Normalmente, un virus se elimina destruyéndolo a una alta temperatura o a través de filtración usando un filtro que tiene poros de tamaño nanométrico. Sin embargo, puede degradarse colágeno a altas temperaturas de 37°C o más y por tanto la estructura de hebras de triple hélice puede desenredarse en tres hebras individuales dando por tanto gelatina, perdiendo indeseablemente las propiedades fundamentales del colágeno y haciendo difícil hacer pasar una proteína polimérica que tiene un tamaño de 300 nm a través de un filtro para la eliminación de virus.

65 Durante la extracción de colágeno, tienen que eliminarse materiales de bajo peso molecular tales como enzimas o

cloruro de sodio para garantizar su idoneidad para uso médico.

5 Cuando se usa generalmente colágeno como forma de dosificación líquida para aplicaciones médicas, se requiere que tenga una alta concentración de 30 ~ 60 mg/ml con el fin de aumentar el tiempo de retención del colágeno o para mantener el volumen del mismo. Cuando se prepara colágeno para dar una forma de dosificación sólida a través de liofilización, se requiere que tenga una alta concentración con el fin de reducir la capacidad de un liofilizador y el tiempo de funcionamiento del mismo. Con el fin de satisfacer los criterios de los consumidores para un material médico, el colágeno tiene que prepararse a una alta concentración de 60 mg/ml o más.

10 Además, con el objetivo de preparar un producto médico de colágeno en forma líquida a alta concentración, puede usarse polvo de colágeno, pero la esterilización en una fase de polvo al tiempo que se mantienen las propiedades inherentes y la estructura del colágeno es imposible, y se requieren equipamiento aséptico y un largo periodo de tiempo para su disolución en un líquido, esterilización y concentración.

15 Solución técnica

El tejido de un mamífero se trata con alcohol etílico al 70% durante al menos 72 h y entonces se hace reaccionar con pepsina durante al menos 72 h en una disolución titulada hasta un pH de 1,5 - 2,5 realizando de ese modo la inactivación de virus. Además, se eliminan microorganismos a través de filtración usando un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,22 µm, garantizando por tanto la seguridad.

20 Se prepara colágeno altamente puro a través de extracción de colágeno usando pepsina, adición de cloruro de sodio, filtración, filtración de flujo tangencial y neutralización del pH.

25 Además, a través de procedimientos de concentración usando filtración de flujo tangencial, neutralización del pH y centrifugación, se concentra sumamente el colágeno hasta 120 mg/ml, y puede mezclarse homogéneamente para fabricar por tanto diversos productos en forma líquida, de esponja o de polvo.

30 Efectos ventajosos

Tal como se describió anteriormente en el presente documento, con el tejido de un mamífero puede producirse colágeno líquido aséptico adecuado para uso médico a través de inactivación de virus, eliminación de materiales de bajo peso molecular tales como enzimas o cloruro de sodio usando filtración de flujo tangencial y filtración usando un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,22 µm. Además, se realizan filtración de flujo tangencial, neutralización del pH y centrifugación, mediante lo cual puede concentrarse colágeno líquido a alta concentración de 120 mg/ml y puede usarse como material para diversos productos médicos de colágeno al tiempo que se mantienen la fase líquida y propiedades asépticas del mismo.

40 Las realizaciones preferidas de la presente invención para lograr tales efectos se describen en detalle a continuación con referencia a los dibujos adjuntos.

Descripción de los dibujos

45 La figura 1 muestra un proceso de filtración de colágeno usando un dispositivo de filtración de flujo tangencial (TFF) según la presente invención;

la figura 2 muestra una membrana de filtración de flujo tangencial según la presente invención;

50 la figura 3 muestra la estructura de un tanque de neutralización según la presente invención; y

la figura 4 muestra una mezcladora.

Descripción de los números de referencia en los dibujos

55 10: dispositivo de membrana de filtración de flujo tangencial 11: tanque de almacenamiento

12: bomba 13: membrana de filtración de flujo tangencial

60 14: válvula 15: manómetro

16: recuperación de material que no ha pasado 17: descarte de material que ha pasado

18: agua purificada

65 21: dirección de flujo de la disolución 22: dirección de presión

23: membrana de filtración de flujo tangencial 24: material que no ha pasado

25: material que ha pasado 31, a: junta

5 32, b: abrazadera 33: entrada de disolución de titulación del pH

34: electrodo de pH c: dispositivo de sellado del eje rotatorio

d: electrodo de pH

10 **Mejor modo**

La presente invención se caracteriza porque se extrae colágeno líquido a alta concentración, cuya seguridad biológica se garantiza y que tiene alta pureza, a partir del tejido de un mamífero para usarse como material médico.

15 Específicamente, el tejido de un mamífero se lava con agua limpia y alcohol y luego se mantiene congelado. Como tal, el agua es preferiblemente agua purificada de la cual se han eliminado microorganismos e iones, y el alcohol es alcohol etílico al 70% para desinfección.

20 Antes de la extracción, el tejido animal se trata previamente de una manera de trituración fina del tejido usando una trituradora y luego sumergiendo el tejido en alcohol etílico al 70% durante al menos 72 h.

El tejido animal tratado previamente se enjuaga con agua purificada y luego se extrae.

25 Para la extracción primaria, se realiza tratamiento enzimático colocando el tejido y una proteasa en agua purificada a un pH de 1,5 a 2,5 y luego realizando agitación durante 72 h o más.

30 En este caso, la titulación del pH puede llevarse a cabo usando cualquier disolución ácida tal como ácido fosfórico o ácido clorhídrico, y la proteasa es preferiblemente pepsina, que es capaz de eliminar el extremo terminal del colágeno para provocar una respuesta inmunitaria en el cuerpo humano sin dañar la estructura de triple hélice del colágeno.

35 Si el pH para el tratamiento enzimático es menor de 1,5, no es adecuado para la resistencia química de un filtro para su uso en el proceso de filtración posterior. Por otro lado, si el pH excede de 2,5 o el tiempo de reacción es menor de 72 h, el efecto de inactivación de virus puede disminuir.

40 El proceso de pretratamiento que incluye inmersión en alcohol etílico durante 72 h o más y el proceso de tratamiento enzimático a un pH de 2,5 o menos durante 72 h o más permiten la inactivación de virus que pueden estar presentes en el tejido animal, garantizando por tanto la seguridad biológica.

45 Para la extracción y purificación secundarias, la disolución sometida a tratamiento enzimático experimenta un proceso de tratamiento con sal de una manera tal que se hace reaccionar con cloruro de sodio a una concentración de 0,5 ~ 0,9 M. Esto es porque cada proteína es capaz de agregarse a una concentración de sal específica y también porque el colágeno puede agregarse y flotar a la concentración de sal superior, mediante lo cual las otras impurezas no agregadas se descartan aumentando por tanto la pureza del colágeno.

El colágeno agregado se disuelve de nuevo en agua purificada para realizar un proceso de filtración.

50 Para la purificación terciaria, la disolución se filtra en primer lugar usando un filtro que tiene un tamaño de poro de 2,0 ~ 0,5 μm , y luego se trata usando un dispositivo de TFF de modo que materiales de bajo peso molecular tales como pepsina, cloruro de sodio, etc. pueden eliminarse de la disolución.

55 El dispositivo de TFF incluye preferiblemente una membrana de filtración de corte de peso molecular (MWCO) de 50 ~ 150 kDa. La membrana de filtración de MWCO de 150 kDa o menos funciona impidiendo la pérdida de colágeno de aproximadamente 300 kDa, y la membrana de filtración de MWCO de 50 kDa o más funciona eliminando pepsina de aproximadamente 35 kDa.

60 El proceso de filtración usando el dispositivo de TFF se realiza usando un tanque de almacenamiento 11, una bomba 12, una membrana de filtración 13, un manómetro 15 y una válvula 14. La disolución en el tanque de almacenamiento se transfiere a la membrana de filtración por medio de la bomba de modo que colágeno mayor que el tamaño de poro de la membrana de filtración no se hace pasar sino que se recupera en el tanque de almacenamiento y también de modo que impurezas menores que el tamaño de poro se hacen pasar a través de los poros y por tanto se eliminan. Se añade el agua purificada en una cantidad correspondiente a la cantidad de las impurezas eliminadas a través de los poros en la membrana de filtración. Este procedimiento se repite, mediante lo cual la pureza del colágeno puede aumentarse al tiempo que se mantiene la fluidez de la disolución de colágeno en el tanque de almacenamiento (figuras 1 y 2). Los resultados de la purificación usando el dispositivo de TFF pueden

confirmarse a través de diversos métodos, entre los cuales puede encontrarse la eliminación de cloruro de sodio a través de medición osmótica (ejemplo 3).

El dispositivo de TFF se usa para un proceso de concentración, además del proceso de purificación. Cuando se repite la filtración sin la adición de agua purificada en un punto de tiempo en el que la eliminación de impurezas se completa, el agua se elimina por medio de los poros, y por tanto la cantidad de colágeno en el tanque de almacenamiento aumenta. Por consiguiente, la cantidad de colágeno puede concentrarse hasta 10 mg/ml, y el colágeno así obtenido puede utilizarse en campos que no requieren alta concentración, tales como los de materiales cosméticos.

Sin embargo, puesto que la viscosidad del colágeno aumenta con un aumento en la concentración del mismo, cuando se lleva a cabo un proceso de concentración hasta 10 mg/ml o más, puede acumularse colágeno sobre la membrana de filtración, y la fluidez de la disolución de colágeno puede disminuir significativamente, disminuyendo por tanto el rendimiento y requiriendo un tiempo de procesamiento largo. Con el fin de producir colágeno para uso médico, se concentra hasta 5 mg/ml o menos, garantizando de ese modo la fluidez y viscosidad adecuadas para la filtración estéril.

Tras la finalización de la purificación y concentración usando el dispositivo de TFF, la disolución resultante se filtra a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,22 μm y luego se transfiere a un tanque de neutralización. En este caso, el filtro estéril y el tanque de neutralización deben estar en un estado estéril. En particular, el tanque de neutralización debe ser capaz de sellarse usando una junta 31 y una abrazadera 32 y debe incluir una entrada de disolución de titulación del pH, un electrodo de medición del pH y una camisa para ajustar la temperatura de la disolución (figura 3).

La disolución de colágeno de la que se han eliminado microorganismos a través de filtración estéril se purifica y se concentra una vez más usando un proceso de neutralización. El proceso de neutralización se realiza de una manera en la que el pH de la disolución de colágeno se ajusta a 6,0 ~ 8,0 usando una disolución de titulación del pH tal como hidróxido de sodio o ácido clorhídrico y la temperatura de la disolución se ajusta a 25 ~ 35°C para de ese modo agregar el colágeno.

Durante el proceso de neutralización, si el pH de la disolución desciende del intervalo anterior o la temperatura de la disolución es baja, el colágeno puede no agregarse suficientemente. Por otro lado, si la temperatura de la disolución es alta, la estructura de triple hélice puede desenredarse debido a degradación térmica.

El colágeno se agrega a través del proceso de neutralización, y la disolución, que no se agrega, se elimina, mediante lo cual la cantidad de un objetivo de concentración puede disminuirse antes de un proceso de concentración usando centrifugación, haciendo fácil separar agua y colágeno entre sí, y el proceso de concentración puede realizarse en el plazo de un tiempo corto usando una baja fuerza centrífuga, construyendo en última instancia un aparato que permite la producción en masa a un coste relativamente bajo.

El colágeno, que se agrega a través de neutralización, se coloca en un recipiente de centrifugación esterilizado, y entonces se concentra durante 5 min a una aceleración gravitacional de 4.000 ~ 6.000 g usando una centrífuga.

Si el proceso anterior se realiza usando una fuerza centrífuga inferior o durante un tiempo más corto, el rendimiento de colágeno puede disminuir o el valor de concentración final puede disminuir. Por otro lado, si se aplica una aceleración gravitacional superior durante un largo tiempo, se requiere una centrífuga cara de alto rendimiento adecuada para lo mismo, y el tiempo de producción puede aumentar.

El colágeno así concentrado se coloca en una mezcladora (figura 4) que tiene una estructura cerrada y luego se mezcla homogéneamente, obteniendo por tanto colágeno a alta concentración para su uso en un material médico. En este caso, la concentración de colágeno puede ajustarse añadiendo agua de la que se han eliminado microorganismos y materiales exotérmicos, dependiendo de los fines deseados, y puede obtenerse colágeno que tiene una alta concentración de 120 mg/ml en las condiciones anteriores.

Durante el proceso de mezclado anterior, se añade una disolución ácida tal como ácido clorhídrico como disolución de titulación del pH, de modo que el pH de la disolución se ajusta a 1,5 ~ 5,5. La disolución que tiene un pH ajustado puede almacenarse de manera estable en un estado homogéneo durante un largo periodo de tiempo. Si el pH de la misma es demasiado bajo, es difícil titular el pH hasta un valor neutro con el fin de preparar un producto médico. Por otro lado, si el pH de la misma es superior a 5,5, puede agregarse el colágeno de nuevo, haciendo difícil mantener una concentración uniforme.

Dependiendo de las necesidades, el colágeno, obtenido a través de procesos de extracción, purificación, concentración y mezclado, puede mezclarse y diluirse con un disolvente de mezclado tal como agua, una disolución isotónica, plasma rico en plaquetas (PRP) o ácido hialurónico para dar por tanto un producto líquido, y el colágeno concentrado puede proporcionarse en forma de un producto sólido a través de liofilización.

En particular, un producto líquido puede proporcionarse en un estado en el que se garantiza la seguridad biológica en ausencia de virus y microorganismos dentro de una instalación de sala limpia mínima que permite el mezclado, llenado y envasado.

5 **Ejemplo 1 (Ejemplo de referencia)**

En la presente invención el tejido triturado se sumerge en alcohol etílico al 70% durante al menos 72 h.

Preparación y uso de colágeno médico usando tejido cutáneo de cerdo

- 10 1) Se lava tejido cutáneo de cerdo con agua purificada y alcohol y luego se mantiene congelado a -20°C o menos.
- 2) El tejido cutáneo de cerdo se tritura finamente.
- 15 3) El tejido cutáneo triturado se sumerge en alcohol etílico al 70% durante 24 h.
(Inactivación de virus primaria)
- 20 4) El tejido se enjuaga colocándolo en agua purificada, se titula hasta un pH ácido (pH 1,5 ~ 2,5) usando ácido fosfórico y luego se hace reaccionar con agitación durante 72 h o más mediante la adición de pepsina.
(Inactivación de virus secundaria)
- 25 En este caso, la cantidad de pepsina es de $1/4 \sim 1/10$ del peso del tejido cutáneo.
- 5) Se añade al colágeno cloruro de sodio a una concentración de 0,5 ~ 0,9 M, se agita y se agrega, tras lo cual se elimina la disolución no agregada.
- 30 6) El colágeno agregado se disuelve en agua titulada a un pH de 1,5 ~ 4,0 y luego se filtra usando un filtro que tiene un tamaño de poro de 2,0 ~ 0,5 μm .
- 7) Con el fin de obtener colágeno adecuado para uso médico, se eliminan materiales de bajo peso molecular tales como pepsina y cloruro de sodio de la disolución usando un dispositivo de TFF.
- 35 El dispositivo de TFF incluye preferiblemente una membrana de filtración de MWCO de 50 ~ 150 kDa, y se añade agua purificada en una cantidad correspondiente a la cantidad eliminada a través de los poros de la membrana de filtración de modo que la cantidad de la disolución de colágeno en el tanque de almacenamiento se mantiene para garantizar así la fluidez.
- 40 8) Tras la finalización de la eliminación de materiales de bajo peso molecular tales como pepsina y cloruro de sodio, se detiene el suministro de agua purificada y se mantiene la TFF, y por tanto se lleva a cabo un proceso de concentración. Como tal, la concentración de colágeno se ajusta a 5 mg/ml o menos para que pase a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,22 μm .
- 45 9) Para eliminar microorganismos, se realiza filtración usando un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,22 μm .
- 50 10) La disolución de la que se han eliminado los microorganismos se transfiere a un tanque de neutralización esterilizado. El tanque de neutralización tiene que esterilizarse y tiene que tener una estructura sellada capaz de mantener un estado estéril, e incluye una entrada de disolución de titulación del pH y un electrodo de medición del pH.
- 55 11) Para agregar el colágeno, se permite que la disolución de colágeno repose durante un periodo de tiempo que oscila entre 4 h y un día en la condición en la que se titula hasta un pH aproximadamente neutro (pH 6,0 ~ 8,0) usando ácido clorhídrico (HCl) y una disolución de hidróxido de sodio (NaOH) y la temperatura de la misma se ajusta a 25 ~ 35°C.
- 60 12) La disolución no agregada se descarta y el colágeno agregado se coloca en un recipiente de centrifugación y luego en una centrifuga, y se centrifuga a una aceleración gravitacional de 4.000 ~ 6.000 g, concentrando de ese modo el colágeno.
- 65 13) Se decanta el agua del recipiente de centrifugación y el colágeno concentrado, que se ha separado del agua, se coloca en una mezcladora y luego se agita, obteniendo así colágeno que tiene una concentración de aproximadamente 120 mg/ml.
- Como tal, el colágeno así obtenido se mezcla con una disolución ácida tal como ácido clorhídrico para ajustar el pH

de la misma a 1,5 ~ 5,5, mediante lo cual el colágeno puede almacenarse a una concentración homogénea.

14) El colágeno, del que se han eliminado los microorganismos y que tiene alta pureza, se prepara en un estado en el que las propiedades del colágeno se mantienen, usando el método anterior, y es por tanto adecuado para uso médico, y puede tener una alta concentración de 120 mg/ml y puede por tanto aplicarse a diversos productos.

Por ejemplo, puede proporcionarse colágeno en forma de un producto que puede inyectarse en el cuerpo de una manera en la que el colágeno se mezcla con un aditivo para presentar la misma composición que la solución salina en el cuerpo humano al tiempo que se mantiene una fase líquida y luego se carga en una jeringa prellenada.

Ejemplo 2

Verificación de la inactivación de virus

El proceso de inactivación de virus durante el procedimiento de producción del ejemplo 1 se realizó a través de tres simulaciones para verificar así la inactivación de virus.

Se adoptaron como virus indicadores VDEP (virus de la diarrea epidémica porcina), RVP (rotavirus porcino), PVP (parvovirus porcino) y virus de la pseudorrabia, dependiendo de los genotipos, presencia o ausencia de envuelta lipídica y resistividad.

La cuatro clases adoptadas de virus se inoculan en el tejido de cerdo triturado y luego se incuban en alcohol etílico al 70% durante 24 h y en una disolución ácida que tiene un pH de 2,5, ajustado mediante el uso de ácido fosfórico, durante 72 h con el fin de reproducir los procedimientos de tratamiento previo y tratamiento enzimático del método de preparación real.

Las muestras en las que se reprodujo el proceso de inactivación de virus se comparan antes y después del tratamiento a través de análisis viral cuantitativo.

Los resultados de tres simulaciones en las mismas condiciones fueron iguales. Todos los virus se detectaron hasta un umbral de detección o menos, y se midió que el factor de reducción logarítmica para cada proceso de inactivación de virus era un factor de reducción de 2 log o más correspondiente a un patrón típico que se considera eficaz para la inactivación de virus. Los factores de reducción logarítmica acumulada máxima de VDEP, RVP, PVP y virus de la pseudorrabia por proceso fueron $\geq 6,75$, $\geq 9,75$, $\geq 8,75$ y $\geq 8,75$, respectivamente, a partir de lo cual puede concluirse que se han presentado fuertes efectos de inactivación de virus.

[Tabla 1]

Proceso de preparación	Factor de reducción ($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}$)			
	VDEP	RVP	PVP	Virus de la pseudorrabia
Pretratamiento (alcohol etílico al 70%, 24 h)	$\geq 4,05$	$\geq 5,55$	$\geq 5,05$	$\geq 5,05$
Tratamiento enzimático (pH 2,5, 72 h)	$\geq 2,70$	$\geq 4,20$	$\geq 3,70$	$\geq 3,70$
Factor de reducción logarítmica acumulada máxima	$\geq 6,75$	$\geq 9,75$	$\geq 8,75$	$\geq 8,75$

Ejemplo 3

Eliminación de cloruro de sodio usando TFF

Después del tratamiento enzimático, tratamiento con cloruro de sodio y filtración usando un filtro que tenía un tamaño de poro de 2,0 ~ 0,5 μm del ejemplo 1, se realizó TFF usando una membrana de filtración de MWCO de 100 kDa.

En este caso, se añadió agua purificada en una cantidad correspondiente a la cantidad eliminada a través de los poros en la membrana de filtración, y se repitió este procedimiento, mediante lo cual se garantizó la fluidez de la disolución de colágeno en el tanque de almacenamiento y se eliminaron materiales de bajo peso molecular tales como pepsina y cloruro de sodio, y la cantidad total de agua purificada que se añadió fue cinco veces la cantidad inicial de la disolución de colágeno.

Se repitió el proceso de TFF anterior tres veces y los resultados de la eliminación de materiales de bajo peso molecular se verificaron midiendo la presión osmótica usando cloruro de sodio, elegido porque es un material típico.

En consecuencia, las tasas de eliminación individuales fueron del 96,2%, el 96,1% y el 96,4%, y se determinó que la tasa de eliminación promedio era del 96,2%. De ese modo, la eliminación de materiales de bajo peso molecular por medio de TFF es eficaz, y el cloruro de sodio muestra una presión osmótica de 31 ~ 33 mOsm, que es inferior a 285

mOsm, que es la presión osmótica del plasma, y puede usarse como material médico en una mezcla con una disolución isotónica, según sea necesario.

[Tabla 2]

Caso	Presión osmótica (mOsm)		Tasa de eliminación
	Antes de TFF	Después de TFF	
1	840	32	96,2%
2	846	33	96,1%
3	861	31	96,4%
Promedio			96,2%

5

Ejemplo 4

Concentración de colágeno mediante proceso de concentración gradual

10 Según el método de preparación del ejemplo 1, se usaron 5 kg de piel de cerdo y 1 kg de pepsina, y se midió la concentración de colágeno para cada etapa cuando se realizó un proceso de concentración hasta 1/2 de la cantidad inicial tras TFF.

15 La concentración desde el proceso de tratamiento enzimático hasta el proceso de filtración usando un filtro que tenía un tamaño de poro de 2,0 ~ 0,5 µm disminuyó en el intervalo de 1,6 ~ 2,4 mg/ml para cada caso, y la concentración era de 3,2 ~ 4,8 mg/ml tras la eliminación de materiales de bajo peso molecular durante TFF.

20 Esto se realizó para comprender el paso a través de un filtro de filtración estéril que tiene un tamaño de poro de 0,22 µm tras TFF. Cuando la concentración se ajusta a 2 mg/ml o menos, la cantidad de la disolución de colágeno aumenta y por tanto el volumen del tanque de neutralización se amplía. Después del proceso de neutralización, se requiere un largo periodo de tiempo para realizar un proceso de concentración usando centrifugación, aumentando en última instancia los costes de producción. Por otro lado, cuando la concentración de la disolución de colágeno se ajustó a 5 mg/ml o más, la viscosidad aumenta, haciendo difícil que pase a través del filtro estéril que tiene un tamaño de poro de 0,22 µm, mediante lo cual el filtro estéril puede obstruirse tempranamente, provocando de manera no deseada la pérdida de colágeno y el uso de un filtro grande. Por este motivo, el valor de concentración antes de un proceso de filtración estéril se fija preferiblemente al intervalo de 2 ~ 5 mg/ml.

30 El agua, que no se agregó durante el proceso de neutralización, se eliminó principalmente, mediante lo cual el colágeno pudo concentrarse hasta 5,6 ~ 6,7 mg/ml a partir de 3,2 ~ 4,8 mg/ml. Por consiguiente, el colágeno se concentra de aproximadamente 1,4 a 1,8 veces en comparación con el valor de concentración antes del proceso de neutralización. Por tanto, durante el proceso de concentración usando centrifugación, la capacidad inicial puede reducirse, dando como resultado ventajosamente una aplicabilidad industrial en la que la capacidad de la centrifuga y el tiempo de procesamiento pueden reducirse.

35 Finalmente, la disolución de colágeno agregada después del proceso de neutralización se concentra usando centrifugación, mediante lo cual puede obtenerse colágeno a alta concentración en el intervalo de concentración de 114,6 ~ 122,3 mg/ml para cada caso, que es adecuado para su uso como material para un producto de colágeno líquido médico que tiene una concentración de 30 ~ 60 mg/ml y que también es capaz de reducir la capacidad de un liofilizador y el tiempo de funcionamiento del mismo cuando se produce una formulación sólida usando liofilización.

40

[Tabla 3]

Proceso de producción	Concentración de colágeno por proceso de producción (mg/ml)			
	A	B	C	D
Caso 1	1,6	3,2	5,6	114,6
Caso 2	2,4	4,8	6,7	122,3
Caso 3	2,1	4,1	5,9	121,1

* Nota) A: tratamiento enzimático ~ filtración (con un tamaño de poro de 2,0 ~ 0,5 µm)

B: filtración de flujo tangencial (proceso de concentración tras la eliminación de material de bajo peso molecular)

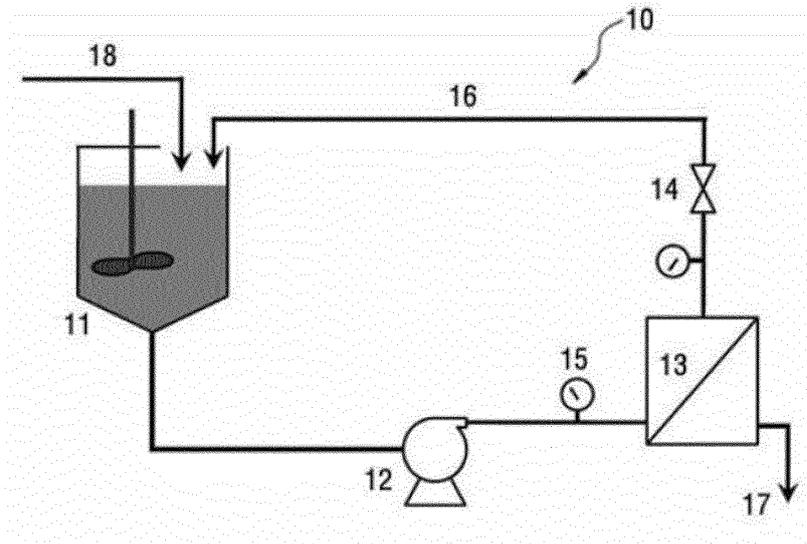
C: neutralización (tras eliminación de disolución no agregada)

45 D: proceso de concentración usando centrifugación

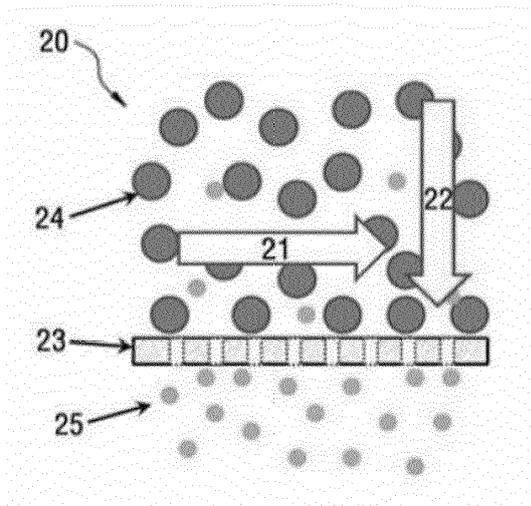
REIVINDICACIONES

1. Método de producción de colágeno a una concentración de 60 mg/ml o más para su uso como material médico, que comprende:
- 5 lavar tejido de un mamífero;
- someter el tejido lavado a trituración e inmersión en alcohol etílico, en el que el tejido triturado del mamífero se sumerge en alcohol etílico al 70% durante al menos 72 h y luego se hace reaccionar con pepsina durante al menos
- 10 72 h en una disolución titulada hasta un pH de 1,5 ~ 2,5 de modo que se inactiva un virus y se extrae colágeno;
- someter el tejido a tratamiento enzimático con agitación en agua purificada que contiene ácido fosfórico y pepsina;
- añadir cloruro de sodio al colágeno sometido a tratamiento enzimático, realizar agitación y agregar el colágeno;
- 15 disolver el colágeno agregado en agua purificada para dar una disolución de colágeno, que se filtra entonces usando un filtro y se concentra eliminando la pepsina, material de bajo peso molecular y cloruro de sodio de la disolución de colágeno usando un dispositivo de filtración de flujo tangencial;
- 20 someter el colágeno concentrado usando el dispositivo de filtración de flujo tangencial a filtración estéril, agregar el colágeno usando una disolución de pH en un tanque de neutralización y concentrar el colágeno eliminando una disolución no agregada; y
- 25 concentrar el colágeno concentrado usando una centrifuga y agitar el colágeno concentrado usando una mezcladora.
2. Método según la reivindicación 1, en el que al colágeno sometido a tratamiento enzimático se le añade cloruro de sodio a una concentración de 0,5 ~ 0,9 M y se agita para agregar así el colágeno, se elimina la disolución no agregada y se disuelve el colágeno agregado en agua purificada y luego se filtra usando un filtro que tiene un
- 30 tamaño de poro de 2,0 ~ 0,5 μm .
3. Método según la reivindicación 1, en el que el dispositivo de filtración de flujo tangencial comprende una membrana de filtración de corte de peso molecular de 50 ~ 150 kDa, se añade agua purificada en una cantidad correspondiente a la cantidad de la disolución que se elimina para mantener la fluidez, se eliminan materiales más pequeños que el tamaño de poro de la membrana de filtración y se concentra el colágeno hasta 5 mg/ml o menos
- 35 para que pase a través de un filtro que tiene un tamaño de poro de 0,22 μm .
4. Método según la reivindicación 1, en el que se permite que el colágeno concentrado usando el dispositivo de filtración de flujo tangencial repose durante 4 h ~ 24 h en una condición en la que el colágeno se ajusta a un pH neutro (6,0 ~ 8,0) y se mantiene a una temperatura de 25 ~ 35°C, mediante lo cual se recupera el colágeno agregado y se centrifuga usando una centrifuga, concentrándose de ese modo.
- 40
5. Método según la reivindicación 1, en el que el colágeno concentrado a través de neutralización se centrifuga a una aceleración gravitacional de 4.000 ~ 6.000 g, concentrándose de ese modo, y se agita usando una mezcladora,
- 45 obteniendo así colágeno a alta concentración de 120 mg/ml.

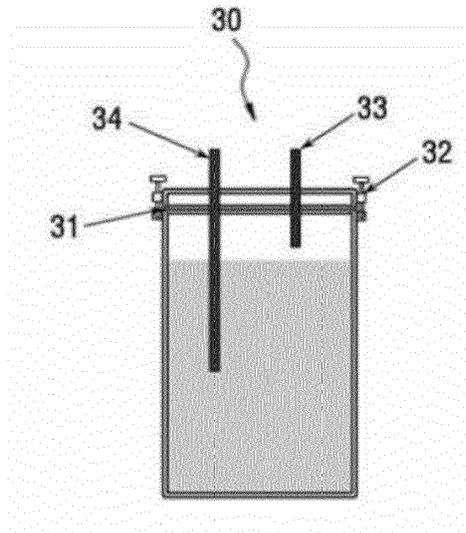
[Fig.1]



[Fig.2]



[Fig.3]



[Fig.4]

