

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034053**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.23

(21) Номер заявки
201592073

(22) Дата подачи заявки
2014.05.29

(51) Int. Cl. *A61K 47/02* (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)
A61K 9/70 (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 8/00 (2006.01)

**(54) ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ КОЛЛАГЕН И
ГИАЛУРОНАТ НАТРИЯ**

(31) MI2013A000883

(32) 2013.05.30

(33) IT

(43) 2016.05.31

(86) PCT/IB2014/061816

(87) WO 2014/191955 2014.12.04

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ФИДИА ФАРМАЧЕУТИЧИ С.П.А.;
ЭУРОРИСЕЧ С.Р.Л. (IT)

(72) Изобретатель:
Дженнари Джованни, Панфило Сузи,
Скалешани Хуан Франсиско (IT)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2012066447

L. Kollenberg: "A New Topical Antibiotic Delivery System", World Wide Wounds, 28 June 1998 (1998-06-28), pages 1-20, XP055097633, Internet Retrieved from the Internet: URL: <http://www.worldwidewounds.com/1998/july/Topical-Antibiotic-Delivery-System/topical-antibiotic-delivery-system.html> [retrieved on 2014-01-21], page 2, lines 7-9

DATABASE WPI, Week 201307, Thomson Scientific, London, GB; AN 2012-K72120, XP002719127, -& CN 102552968 A (JIANGSU TIANLIN BIO-MEDICAL TECHNOLOGY), 11 July 2012 (2012-07-11), abstract

DATABASE WPI, Week 200170, Thomson Scientific, London, GB; AN 2001-609890, XP002719128, -& JP 2001, 226286 A (RAINBOW KK), 21 August 2001 (2001-08-21), abstract

(57) Изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим коллаген и гиалуроновую кислоту и необязательно содержащим серебро. Упомянутые композиции могут иметь форму гидрогеля или повязки, свободных от швистелей. Изобретение также относится к способу получения упомянутых композиций в форме повязки, свободной от швистелей. В довершение ко всему, изобретение относится к применению композиций для лечения повреждений кожи.

B1

034053

034053

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим коллаген и гиалуронат натрия и необязательно серебро, в форме повязки или в форме гидрогеля, свободных от сшивателей, которые применяются для лечения повреждений кожи.

Изобретение также относится к способу получения композиций в форме повязки, свободной от сшивателей.

Уровень техники

Гиалуриновая кислота (ГК) представляет собой один из полимеров, наиболее широко используемых в общем случае в области повязок для ран и повреждений; она является гетерополисахаридом, состоящим из чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина.

Она представляет собой прямоцепочечный полимер, имеющий молекулярную массу в диапазоне от 50000 до 13×10^6 Да в зависимости от источника, из которого ее получают, и использующихся способов получения.

В природе она присутствует в перицеллюлярных жидкостях, в основном веществе соединительной ткани позвоночных животных (в котором она является одним из основных компонентов), в синовиальной жидкости суставов, жидкости стекловидного тела и пуповине.

Кислота ГК играет главную роль во многих соединительных тканях, регулируя уровень содержания воды в них и их механические функции.

Поэтому кислота ГК играет важную роль в биологическом организме, в особенности в качестве механической опоры для клеток многих тканей, таких как кожа, сухожилия, мышцы и хрящ.

Как также известно, кислота ГК благодаря ее рецептору мембраны клетки CD44 модулирует множество различных процессов, относящихся к физиологии и биологии клетки, таких как пролиферация, миграция, дифференцировка и ангиогенез клеток, а также осуществляет другие функции, такие как гидратация тканей и смазывание суставов.

Как было продемонстрировано, кислота ГК играет критическую роль в процессе восстановления тканей как со структурной точки зрения (при организации экстрацеллюлярного матрикса и контроле его гидратации), так и в качестве вещества, которое стимулирует прохождение широкого диапазона процессов, в которые оно непосредственно и опосредованно вовлечено (тромбообразование, фагоцитарная активность, пролиферация фибробластов, неоваскуляризация, реэпителиализация и тому подобное) (Weigel P. et al., J. Theoretical. Biol., 1986:219-234; Abatangelo G. et al., J. Surg. Res., 1983, 35:410-416; Goa K. et al., Drugs, 1994, 47:536-566).

Эти широко известные свойства давно используют для получения повязок, применяющихся при уходе за ранами, язвами и повреждениями кожи различного происхождения и при всех повреждениях кожи, на которые благотворное воздействие оказывает ускоренная реэпителиализация.

На современном уровне техники уже известны повязки на основе коллагена, являющегося высокохарактеристическим волокнистым белком, который относится к группе склеропротеинов и в больших количествах присутствует в многоклеточных организмах в качестве важнейшего компонента тканей, подобных сухожилиям, коже, хрящу, кости и множеству других. Белок имеет молекулярную массу, составляющую приблизительно 285 кДа. Его синтез в клетке характеризуется образованием аминокислотных цепей, свитых друг с другом с образованием сверхспирали; вне клетки цепи собираются в жесткие полимерные структуры, известные под наименованием фибрилл и волокон, которые придают тканям, их содержащим, характеристики эластичности, прочности и твердости.

В общем случае использующийся коллаген является коллагеном бычьего происхождения.

В довершение ко всему, в композициях для местного применения часто используют серебро вследствие его противобактериального действия, которое развивается после окисления серебра до иона металла; процесс очень легко протекает при контакте с влажной средой раны, на которую его наносят. Серебро доступно на рынке в форме солей, коллоидного металла (то есть ассоциированного с малыми белками, которые улучшают его стабильность) или, в довершение ко всему, в форме микронизированного металла. Последняя зачастую является предпочтительной, поскольку она не окрашивает кожу или одежду, в особенности после воздействия солнечного света, не окрашивает рану в коричневый цвет при наличии экссудата и является более простой в обращении на стадиях получения некоторых желательных лекарственных форм. Серебро исполняет функцию противобактериального средства вне зависимости от его исходной формы.

Из уровня техники известна комбинация кислоты ГК и коллагена для создания трехмерных устройств, которые промотируют заживление ран и реэпителиализацию; например, известны устройства, которые содержат коллаген, связанный с химически модифицированными производными кислоты ГК, (US6737072, US5939323).

В общем случае они представляют собой препараты, где кислоту ГК, присутствующую в очень больших количествах, присоединяют к коллагеновой матрице в результате проведения реакции химического сшивания в целях связывания молекул кислоты ГК с коллагеновыми волокнами, на практике создавая новую химическую структурную единицу.

Поэтому сшивание приводит к увеличению компактности и прочности устройства. Сшивание про-

водят при использовании специальных химических веществ, известных под наименованием сшивателей, которые делают возможным получение "цепей" между выбранными полимерами, связывая их ковалентными связями. Характеристический признак сшивателей заключается в наличии у них высокорекреационноспособных функциональных групп, способных специфически связываться с другими группами, в общем случае присутствующими в основной цепи белков, пептидов и полимеров. Наиболее широко используемые сшиватели представляют собой карбодиимидные производные, дивинилсульфон и эфир БДДЭ (1,4-бутандиолдиглицидиловый простой эфир), которые вследствие своей реакционной способности являются несколько токсичными (например, дивинилсульфон: <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9925422>; эфир БДДЭ: <https://www.spectrumchemical.com/MSDS/TCI-B0964.pdf>). Вследствие их активного вовлечения в химический процесс образования цепей между полимерами и возможности их сохранения в качестве спейсеров (как в случае, например, эфира БДДЭ) в полученной новой химической структурной единице конечные препараты могут сохранять остатки химических веществ, использованных в реакции химического сшивания, которые поэтому вмешиваются в тонкий процесс заживления раны. Остатки сшивателей также могут высвободиться во время стадии ферментативного разложения, которой устройством физиологически подвергается после нанесения. Сшивание также может быть осуществлено при использовании фотореактивных веществ, которые полимеризуются при связывании с исходными молекулами и облучении при использовании УФ-излучения, создавая сетку. Длительность существования продуктов реакции в конечном продукте во всех данных случаях должна быть оценена с точки зрения их уровней токсичности. В случае сшивателей, например, возможно высвобождаемые остатки являются все еще высокорекреационноспособными и могут вмешиваться в хрупкое равновесие, которое лежит в основе заживления раны, на которую нанесли устройство. В случае использования данных веществ обычной практикой будет проведение для конечного продукта многочисленных стадий промывания, которые, с одной стороны, промотируют достижение безопасности продукта, а с другой стороны, усложняют способ производства, что делает его менее эффективным и более дорогостоящим.

Для удовлетворения растущей потребности в более безопасных и быстрых заживлении ран и восстановлении тканей в последние годы произвели несколько медицинских устройств.

В их числе разработка повязок на коллагеновой основе, без сомнения, сыграла ключевую роль при гарантировании получения наилучших материалов для каркасов для регенерации тканей, более пористых матриц для миграции клеток и лучшей переносимости аллергии для ткани организма-хозяина. В общем случае упомянутые устройства состоят из трехмерных каркасов, разработанных для имитирования способности экстрацеллюлярного матрикса направлять и инкапсулировать мигрирующие клетки.

Экстрацеллюлярный матрикс формирует определенный тип опорной конструкции для всех соединительных тканей животных, которая заполняет межклеточные пространства высокогидратированными гелями полисахаридов и волоконистых белков.

Данная важная структура делает возможным эффективное противодействие соединительной ткани набуханию или сдавливанию вследствие наличия вариаций напряжения и/или температуры, обусловленных воздействием окружающей среды.

В случае изменения экстрацеллюлярного матрикса вследствие наличия ожогов, пролежней или хронического дегенеративного артрита нанесение повязок на коллагеновой основе на поврежденные эпидермальные области или соединительную ткань будет способствовать восстановлению первоначальных нативных условий.

В то же самое время это приводит к уменьшению воспаления и формирует эффективный барьер для инфекции.

В принципе коллагеновые препараты должны соответствовать нескольким условиям. Протезный коллаген должен впитываться тканью заживляющейся раны и возможно разлагаться под действием ферментативной системы организма-хозяина.

Дополнительные преимущества препаратов на коллагеновой основе заключаются в их способности впитывать любую сочащуюся жидкость, увлажнять ткань и улучшать получение коллагена, вновь синтезируемого фибробластами организма-хозяина.

Все еще имеет место потребность в идентификации альтернативных фармацевтических композиций для лечения повреждений кожи, демонстрирующих характеристики, превосходящие соответствующие характеристики, известные в настоящее время, с точки зрения безопасности (отсутствие возможных токсичных остатков), эффективности (лучшее заживление раны) и, в довершение ко всему, удобства для промышленности.

Настоящее изобретение разрешает проблему, существующую на современном уровне техники, благодаря описанным ниже препаратам, полученным при использовании способа, который прост в осуществлении и не использует каких-либо веществ, которые промотируют достижение стабильности для комбинации кислота ГК-коллаген.

Описание чертежа

Чертеж демонстрирует рост фибробластов на повязках из коллагена и гиалуроната натрия в сопоставлении с тем, что имеет место для повязок, содержащих только коллаген. Рост фибробластов представ-

ляет собой показатель процесса реэпителиализации, на фоне которого развивается рана.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим коллаген и гиалуроновую кислоту в форме натриевой соли, необязательно включающим серебро.

Упомянутые композиции могут иметь форму гидрогеля или повязки.

Повязка обладает пористой структурой, которая может быть разрезана и профилирована для ее адаптации к раневой поверхности и получается без использования химических сшивателей, как это описывается ниже.

Использующийся коллаген относится к коллагену типа I конского происхождения. Его структура тройной спирали аналогична тому, что имеет место для тканевого коллагена, что делает его в особенности хорошо подходящим для использования в соответствии с настоящим изобретением.

В композициях в форме гидрогеля коллаген может быть использован в форме микронизированного порошка; в композициях в форме повязки он может быть использован в форме геля при 1% (мас./мас.) в водном носителе, содержащем органическую кислоту, предпочтительно уксусную кислоту, в соответствии с получением при использовании способа экстрагирования из сухожилия лошади и последующей очистки.

Фармацевтическая композиция также содержит гиалуроновую кислоту в форме натриевой соли с концентрацией, находящейся в диапазоне от 0,1 до 4% (мас./мас.), предпочтительно от 2 до 3% (мас./мас.), а еще более предпочтительно составляющей 2,5% (мас./мас.).

Гиалуроновая кислота, используемая в настоящем изобретении, может быть произведена из любого источника; например она может быть получена в результате экстрагирования из петушиных гребней (EP 138572 B1), в результате ферментации (от организмов *Streptococcus equi* или *zooepidemicus*) или в результате биосинтеза (от организма *Bacillus*, WO2012032154, WO201232153).

Гиалуроновая кислота имеет среднюю молекулярную массу (ММ) в диапазоне от 130 до 500 кДа, в частности от 160 до 230 кДа.

Гиалуроновая кислота, используемая в настоящем изобретении, характеризуется средней ММ от 160 до 230 кДа; данный последний интервал ММ будет сокращенно обозначаться как "средняя ММ 200 кДа".

Ссылки на молекулярную массу в соответствии с настоящим изобретением относятся к среднemasовой молекулярной массе, рассчитанной при использовании метода "характеристической вязкости" (Terbojevich et al., Carbohydr. Res., 1986, 363-377).

В соответствии с одним предпочтительным аспектом изобретения композиции также могут включать серебро в целях получения противобактериального и противомикробного действия.

Серебро может присутствовать в количествах в диапазоне от 0,001 до 5% (мас./мас.), предпочтительно от 1 до 2% (мас./мас.).

Серебро может иметь форму соли, предпочтительно цитрата серебра, коллоидную металлическую форму или форму микронизированного металла; предпочтительно используют солевую или коллоидную металлическую форму серебра, поскольку они являются водорастворимыми.

В композициях в форме гидрогеля использующийся носитель представляет собой воду.

Композиция в форме гидрогеля также может включать вспомогательные вещества, такие как реологические добавки, обладающие гелеобразующим действием, смачивающие добавки, консерванты, антиоксиданты, хелатообразователи, регуляторы величины pH и тому подобное.

Один дополнительный предмет настоящего изобретения представляет собой способ получения упомянутых фармацевтических композиций в форме повязки, свободной от сшивателей.

Способ включает следующие этапы:

a) гомогенизация коллагена типа I конского происхождения в виде 1% (мас./мас.) геля в присутствии органической кислоты;

b) получение водного раствора гиалуроната натрия;

c) добавление водного раствора гиалуроната натрия к коллагену конского происхождения в форме гомогенизированного геля с получением смеси;

d) выдерживание смеси, полученной на этапе c), при легком перемешивании вплоть до получения гомогенной смеси без помощи сшивателей;

g) выдерживание получающейся в результате смеси при легком перемешивании в течение 15-60 мин вплоть до получения геля;

h) выдерживание геля при отсутствии перемешивания в течение 5-20 мин для обеспечения осаждения каких-либо включений;

i) лиофильная сушка геля для получения лиофилизованной повязки с удалением остатков органической кислоты с помощью варьирования температуры при содержании коллагена в количестве, не менее чем 90% (мас./мас.);

j) резка лиофилизованной повязки на повязки желательного размера.

После этого повязка, полученная при использовании способа, соответствующего изобретению, может быть вставлена в первичную упаковку, а впоследствии во вторичную упаковку. В довершение ко

всему, упакованный продукт может быть стерилизован.

Получение повязки явно не требует использования какого-либо сшивателя, поскольку комбинацию коллаген-гиалуронат натрия получают инновационным образом при использовании физико-химических двух полимеров.

Коллаген солибилизируют в кислотной среде, предпочтительно в присутствии уксусной кислоты; в данном конкретном случае исходный коллагеновый гель предпочтительно демонстрирует рН ~3,5.

Гиалуронат натрия солибилизируют в очищенной воде, которая демонстрирует рН ~5,5, что превышает величину рКа (константу диссоциации) гиалуроновой кислоты (~3); это означает то, что в растворе карбоксилы кислоты ГК будут иметь форму COO^- , что на практике превращает гиалуронат в основание Льюиса. При перемешивании раствора гиалуроната натрия с коллагеновым гелем данные карбоксилы взаимодействуют с аминогруппами протонированного коллагена в существенно кислотной среде, что приводит к возникновению электростатических взаимодействий, таких как водородные мостики и ван-дер-Ваальсовы взаимодействия; результат заключается в образовании сетки между различными молекулами, дополнительно промотированной сложностью структуры как коллагена, так и гиалуроната. Поэтому именно физико-химическое взаимодействие не требует использования каких-либо вспомогательных химических добавок.

Поэтому в настоящем изобретении гиалуронат натрия физически перемешивают с коллагеном. Поскольку никаких сшивателей какого-либо типа не используют, для исключения избыточных сшивателей не требуются стадии промывания и последующего высушивания, и, как это прежде утверждалось, конечные продукты являются более безопасными, поскольку они полностью свободны от всех загрязнителей данного типа. Поэтому способ производства является в особенности безопасным, простым, экономичным и удобным для промышленности.

Кроме того, во время конечной стадии лиофильной сушки предпочтительные рабочие условия являются такими, чтобы размер пор повязки мог бы быть подстроен. Это критический параметр, поскольку повязка должна быть способна вмещать фибробласты, присутствующие на поверхности повреждения, что таким образом промотирует их жизнеспособность и развитие: в случае чрезмерно малых пор клетки не будут обладать способностью проходить через них, а избыточно крупные поры будут предотвращать прилипание повязки к волокнам и, следовательно, предотвращать последующую пролиферацию.

Фармацевтические композиции, соответствующие изобретению, могут быть использованы для лечения повреждений кожи и старения кожи, обусловленных, например, возрастом, избыточным воздействием солнечного света или нарушением обмена веществ, что оказывает неблагоприятное воздействие на питание дермы.

В соответствии с одним предпочтительным аспектом изобретения повреждения кожи могут представлять собой пролежневые язвы, артериальные сосудистые язвы, венозные сосудистые язвы, васкулитные сосудистые язвы, язвы диабетической стопы, послеоперационные и травматические раны и ожоги первой и второй степеней.

Упомянутые повреждения могут иметься в виде острых или хронических, при наличии экссудирования в диапазоне от умеренного до высокого, на стадии грануляции или эпителиализации.

Комбинация из коллагена и гиалуроната натрия делает повязку прочной, но гибкой, улучшает адгезию клеток и последующую пролиферацию фибробластов и улучшает ремоделирование раны под действием вновь полученного коллагена.

В дополнение к преимуществам, описанным для повязки, гидрогелю свойственно дополнительное преимущество, заключающееся в пригодности для использования при нанесении на полостные раны; гидрогели на основе коллагена и гиалуроната натрия также характеризуются превосходной растекаемостью и отсутствием запаха.

Примеры, представленные ниже, дополнительно иллюстрируют изобретение.

Примеры

Пример 1. Получение 100 г гидрогеля на основе коллагена (3% (мас./мас.)) и натриевой соли гиалуроновой кислоты (2,5% (мас./мас.)).

Гиалуронат натрия, средняя ММ 200 кДа:	2,5 г
Коллаген (типа I конского происхождения):	3 г
Гидроксиэтилцеллюлоза:	0,8 г
Пропиленгликоль:	5 г
Гликоль MP-Diol:	2,5 г
Symdiol 68:	0,5 г
Очищенная вода:	Количество, достаточное для доведения до 100 г

Коллаген и гиалуронат натрия солибилизируют в воде при перемешивании при 40°C. К смеси последовательно добавляют пропиленгликоль, гликоль MP-Diol и продукт Symdiol. После этого смесь ох-

лаждают до температуры окружающей среды и при перемешивании добавляют гидроксипропилцеллюлозу вплоть до полного диспергирования. Смесь выдерживают при температуре окружающей среды, время от времени проводя перемешивание вплоть до достижения гелеобразования. Ампулы заполняют таким образом полученным гелем и упакованный продукт стерилизуют при использовании γ -излучения.

Пример 2. Получение 100 г гидрогеля на основе коллагена (3% (мас./мас.)) и натриевой соли гиалуроновой кислоты (2,5% (мас./мас.)).

Гиалуронат натрия, средняя ММ 200 кДа:	2,5 г
Коллаген (типа I конского происхождения):	3 г
Ксантановая камедь:	0,8 г
Пропиленгликоль:	10 г
Полигексанид (ПГМБ):	0,2 г
Очищенная вода:	Количество, достаточное для доведения до 100 г

Коллаген и гиалуронат натрия солибилизируют в воде при перемешивании при 40°C. К смеси добавляют полигексанид ПГМБ вплоть до его солибилизации. В смеси при интенсивном перемешивании диспергируют ксантановую камедь и проводят охлаждение до температуры окружающей среды, время от времени проводя перемешивание вплоть до образования геля. В данный момент при перемешивании вводят пропиленгликоль вплоть до достижения гомогенности. Ампулы заполняют таким образом полученным гелем и упакованный продукт стерилизуют при использовании γ -излучения.

Пример 3. Получение 100 г гидрогеля на основе коллагена (3% (мас./мас.)), натриевой соли гиалуроновой кислоты (2,5% (мас./мас.)) и цитрата серебра (2%).

Гиалуронат натрия, средняя ММ 200 кДа:	2,5 г
Коллаген (типа I конского происхождения):	3 г
Цитрат серебра:	2 г
Ксантановая камедь:	0,8 г
Глицерин:	10 г
Очищенная вода:	Количество, достаточное для доведения до 100 г

Коллаген и гиалуронат натрия солибилизируют в воде при перемешивании при 40°C, а после этого добавляют цитрат серебра. В смеси при интенсивном перемешивании диспергируют ксантановую камедь и проводят охлаждение до температуры окружающей среды, время от времени проводя перемешивание вплоть до образования геля. В данный момент при перемешивании вводят пропиленгликоль вплоть до достижения гомогенности. Ампулы заполняют таким образом полученным гелем и упакованный продукт стерилизуют при использовании γ -излучения.

Пример 4. Получение 100 г гидрогеля на основе коллагена (3% (мас./мас.)), натриевой соли гиалуроновой кислоты (2,5% (мас./мас.)) и коллоидного металлического серебра (2%).

Гиалуронат натрия, средняя ММ 200 кДа:	2,5 г
Коллаген (типа I конского происхождения):	3 г
Коллоидное металлическое серебро:	2 г
Карбомер:	1 г
Гидроксид натрия:	Количество, достаточное для доведения до pH 6
Пропиленгликоль:	10 г
Полигексанид (ПГМБ):	0,1 г
Эдетат натрия:	0,1 г
Очищенная вода:	Количество, достаточное для доведения до 100 г

Карбомер диспергируют в воде при перемешивании при 45°C и солибилизируют коллаген и гиалуронат натрия. После этого солибилизируют серебро с последующей солибилизацией полигексанида ПГМБ и эдетата натрия. Затем при перемешивании добавляют гидроксид натрия для доведения до pH 6 вплоть до получения геля и после этого проводят охлаждение до температуры окружающей среды. В

довершение ко всему, при перемешивании вводят пропиленгликоль вплоть до достижения гомогенности. Ампулы заполняют таким образом полученным гелем и упакованный продукт стерилизуют при использовании γ -излучения.

Пример 5. Получение 100 г гидрогеля на основе коллагена (3% (мас./мас.)), натриевой соли гиалуроновой кислоты (2,5% (мас./мас.)) и микронизированного металлического серебра (1%).

Гиалуронат натрия, средняя ММ 200 кДа:	2,5 г
Коллаген (типа I конского происхождения):	3 г
Микронизированное металлическое серебро:	1 г
Карбомер:	1 г
Гидроксид натрия:	Количество, достаточное для доведения до pH 6
Пропиленгликоль:	10 г
Полигексанид (ПГМБ):	0,1 г
Эдетат натрия:	0,1 г
Очищенная вода:	Количество, достаточное для доведения до 100 г

Карбомер диспергируют в воде при перемешивании при 45°C и затем солюбилизируют коллаген и гиалуронат натрия. После этого солюбилизируют полигексанид ПГМБ и эдетат натрия. Затем при перемешивании добавляют гидроксид натрия для доведения до pH 6 вплоть до получения геля и после этого проводят охлаждение до температуры окружающей среды. В довершение ко всему, при перемешивании вводят пропиленгликоль и серебро вплоть до достижения гомогенности. Ампулы заполняют таким образом полученным гелем и упакованный продукт стерилизуют при использовании γ -излучения.

Пример 6. Получение лиофилизованной повязки с размерами 5×5 см на основе коллагена конского происхождения и гиалуроната натрия при 2,5% (мас./мас.).

1. Композиция.

Коллаген конского происхождения в 1000 г (что равно 10 г в виде геля при 1% (мас./мас.) коллагена) гиалуронат натрия, средняя ММ 200 кДа 0,25 г.

2. Получение нерасфасованного готового продукта.

В стерильной комнате согласно документу ISO 7 чистый контейнер, изготовленный из нержавеющей стали AISI 316, заполняют рассчитанным количеством коллагена конского происхождения в виде 1%-ного геля и начинают гомогенизацию при использовании системы перемешивания. Требуемое количество порошкообразного гиалуроната натрия растворяют в очищенной воде в отдельном контейнере. После получения раствора гиалуроната натрия его вводят в контейнер, содержащий коллаген конского происхождения в форме геля. После этого раствор слегка перемешивают в течение 30 мин. По истечении еще 10 мин без перемешивания какие-либо включения будут осаждаться.

По завершении данной стадии нерасфасованный готовый продукт анализируют в соответствии с техническими требованиями для анализа.

3. Распределительные кюветы.

В стерильной комнате согласно документу ISO 7 полученный гель при использовании перистальтического насоса распределяют на пластине, расположенной на калиброванной взвешивающей системе.

4. Методика лиофильной сушки.

В стерильной комнате согласно документу ISO 7 нерасфасованный готовый продукт, распределенный на кюветах, замораживают при -35°C в течение приблизительно 4 ч, а после этого располагают в высоком вакууме на приблизительно 17 ч. В течение данного периода высушивание начинается при достижении температурой приблизительно 25°C; по истечении приблизительно 16 ч кюветы нагревают до 60°C и данную температуру выдерживают в течение приблизительно 2 ч для удаления всех следовых количеств уксусной кислоты, содержащейся в коллагене конского происхождения. Полный цикл лиофильной сушки занимает приблизительно 22 ч.

Конечный продукт содержит 97,5% конского коллагена и 2,5% гиалуроната натрия при расчете на массу.

5. Получение повязки с размерами 5×5 см и первичная упаковка.

После этого лиофилизованную повязку, полученную в кювете, разрезают на повязки с размерами 5×5 см с применением подходящей для использования машины; затем ее с применением подходящей для использования машины вставляют в первичную упаковку в виде блистерной упаковки, образованной слоем полимеров ПЭТФ или ПВХ на одной стороне и покрытой лаком алюминиевой фольгой на другой. Проводят визуальный осмотр (100%) блистерной упаковки.

6. Вторичная упаковка.

Вторичная упаковка состоит из картонных коробок.

7. Стерилизация.

После упаковывания нестерильный конечный продукт в его конечной конфигурации стерилизуют при использовании методики стерилизации под действием γ -излучения.

Пример 7. Получение лиофилизованной повязки с размерами 5×5 см на основе коллагена конского происхождения, гиалуроната натрия при 2,5% (мас./мас.) и коллоидного металлического серебра при 2% (мас./мас.).

1. Композиция:

коллаген конского происхождения в виде геля при 1 % (масс./масс.)	1000 г (что равно 10 г коллагена)
гиалуронат натрия, средняя ММ 200 кДа	0,25 г
коллоидное металлическое серебро	0,2 г

2. Получение нерасфасованного готового продукта.

В стерильной комнате согласно документу ISO 7 чистый контейнер, изготовленный из нержавеющей стали AISI 316, заполняют рассчитанным количеством коллагена конского происхождения в виде 1%-ного геля и начинают гомогенизацию при использовании системы перемешивания. Требуемое количество порошкообразного гиалуроната натрия растворяют в очищенной воде в отдельном контейнере. После получения раствора гиалуроната натрия его вводят в контейнер, содержащий коллаген конского происхождения в форме геля. После этого раствор слегка перемешивают в течение 30 мин. Коллоидное металлическое серебро солибилизируют в воде, получающийся в результате раствор добавляют к смеси из коллагена конского происхождения и гиалуроната натрия и получающуюся в результате смесь слегка перемешивают в течение 30 мин. По истечении еще 10 мин без перемешивания какие-либо включения будут осаждаться.

После этого осуществляют этапы, описанные в позициях 3, 4, 5, 6 и 7 из примера 6, для получения конечного продукта, который содержит 95,5% конского коллагена, 2,5% гиалуроната натрия и 2% серебра при расчете на массу.

Пример 8. Получение лиофилизованной повязки с размерами 5×5 см на основе коллагена конского происхождения, гиалуроната натрия при 2,5% (мас./мас.) и цитрата серебра при 1% цитрата (мас./мас.).

1. Композиция:

коллаген конского происхождения в виде геля при 1 % (масс./масс.)	1000 г (что равно 10 г коллагена)
гиалуронат натрия, средняя ММ 200 кДа	0,25 г
цитрат серебра	0,1 г

2. Получение нерасфасованного готового продукта.

В стерильной комнате согласно документу ISO 7 чистый контейнер, изготовленный из нержавеющей стали AISI 316, заполняют рассчитанным количеством коллагена конского происхождения в виде 1%-ного геля и начинают гомогенизацию при использовании системы перемешивания. Требуемое количество порошкообразного гиалуроната натрия растворяют в очищенной воде в отдельном контейнере. После получения раствора гиалуроната натрия его вводят в контейнер, содержащий коллаген конского происхождения в форме геля. После этого раствор слегка перемешивают в течение 30 мин. Цитрат серебра солибилизируют в воде, получающийся в результате раствор добавляют к смеси из коллагена конского происхождения и гиалуроната натрия и смесь слегка перемешивают в течение 30 мин. По истечении еще 10 мин без перемешивания какие-либо включения будут осаждаться.

После этого осуществляют этапы, описанные в позициях 3, 4, 5, 6 и 7 из примера 6, для получения конечного продукта, который содержит 96,5% конского коллагена, 2,5% гиалуроната натрия и 1% серебра при расчете на массу.

Пример 9.

При использовании способа, описанного в примере 6, получают два рассматриваемых материала - первый, содержащий коллаген и гиалуронат натрия, и второй, содержащий только коллаген.

Материалы в стерильном вытяжном шкафу разрезают на куски с размерами 1×1 см, укладывают на устройство Multiwell-24 и пропитывают средой для культивирования в течение 24 ч перед посевом. Данная методика необходима для обеспечения проведения однородной оценки прилипания и роста клеток для каждого образца.

На обоих материалах проводят посев для 100000 фибробластов (3Т3), суспендированных в их среде для культивирования.

Пролиферацию клеток оценивают по истечении 1, 3 и 5 дней после посева при использовании МТТ-анализа. Говоря вкратце, в упомянутом анализе количественно измеряют наличие активности сукцинатдегидрогеназы у культивируемых клеток; упомянутую активность, которая имеется только у митохондриальных жизнеспособных клеток, обычно используют в качестве маркера для проверки в отношении метабо-

лической активности, жизнеспособности и, следовательно, роста культивируемых клеток. Анализ базируется на переходе окраски азольевого красителя МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия) от желтой к синей под действием сукцинатдегидрогеназы. Количество синего красителя (формазана), определенное спектрофотометрически, пропорционально присутствию сукцинатдегидрогеназы в клеточной культуре и, следовательно, пропорционально количеству жизнеспособных клеток.

Клетки инкубируют совместно с раствором красителя МТТ при 0,5 мг/мл в течение 3 ч. По завершении инкубирования краситель экстрагируют из клетки при использовании экстрагирующего раствора (90% изопропанола, 10% сульфоксида ДМСО) и производят снятие показаний в области длины волны 540/660 нм.

Результаты продемонстрированы на чертеже.

Очевидно то, что присутствие гиалуроновой кислоты в форме натриевой соли приводит не только к лучшему прилипанию клеток посева к материалу (смотрите данные для дня 1), но также и интенсифицирует рост фибробластов в сопоставлении с тем, что имеет место для носителя, содержащего только коллаген. В данном последнем случае величины оптической плотности остаются, по существу, стабильными, демонстрируя то, что фибробласты являются живыми, но не пролиферирующими.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение фармацевтической композиции в форме повязки, свободной от сшивателей, содержащей коллаген типа I конского происхождения и гиалуроновую кислоту в форме натриевой соли, где гиалуроновая кислота имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 130 до 500 кДа и концентрацию в диапазоне от 0,1 до 4% (мас./мас.), а коллаген в фармацевтической композиции присутствует в количествах, не меньших чем 90% (мас./мас.), для лечения повреждений кожи, где повреждения кожи выбирают из группы, состоящей из пролежневых язв, артериальных сосудистых язв, венозных сосудистых язв, васкулитных сосудистых язв, язв диабетической стопы, послеоперационных и травматических ран и ожогов первой и второй степеней.

2. Применение фармацевтической композиции в форме гидрогеля, свободного от сшивателей, содержащего коллаген типа I конского происхождения и гиалуроновую кислоту в форме натриевой соли, где гиалуроновая кислота имеет среднюю молекулярную массу в диапазоне от 130 до 500 кДа и концентрацию в диапазоне от 0,1 до 4% (мас./мас.), а коллаген в фармацевтической композиции присутствует в количестве 3% (мас./мас.) для лечения повреждений кожи, где повреждения кожи выбирают из группы, состоящей из пролежневых язв, артериальных сосудистых язв, венозных сосудистых язв, васкулитных сосудистых язв, язв диабетической стопы, послеоперационных и травматических ран и ожогов первой и второй степеней.

3. Применение по любому из пп.1 или 2, где гиалуроновая кислота имеет молекулярную массу в диапазоне от 160 до 230 кДа, среднюю ММ 200 кДа.

4. Применение по любому из пп.1-3, где гиалуроновая кислота в форме натриевой соли имеет концентрацию в диапазоне от 2 до 3% (мас./мас.).

5. Применение по п.4, где гиалуроновая кислота в форме натриевой соли имеет концентрацию 2,5% (мас./мас.).

6. Применение по любому из пп.1-5, где композиция дополнительно содержит серебро в количестве от 0,001 до 5% (мас./мас.).

7. Применение по п.6, где серебро присутствует в количестве от 1 до 2% (мас./мас.).

8. Способ получения фармацевтической композиции для применения по любому из пп.1, 3-7 в форме повязки, свободной от сшивателей, включающий следующие этапы:

а) гомогенизация коллагена конского происхождения в виде 1% (мас./мас.) геля в присутствии органической кислоты;

б) получение водного раствора гиалуроната натрия;

с) добавление водного раствора гиалуроната натрия к коллагену конского происхождения в форме гомогенизированного геля с получением смеси;

д) выдерживание смеси, полученной на этапе с), при легком перемешивании вплоть до получения гомогенной смеси без помощи сшивателей;

г) выдерживание получающейся в результате смеси при легком перемешивании в течение 15-60 мин вплоть до получения геля;

h) выдерживание геля при отсутствии перемешивания в течение 5-20 мин для обеспечения осаждения каких-либо включений;

и) лиофильная сушка геля для получения лиофилизованной повязки с удалением остатков органической кислоты с помощью варьирования температуры при содержании коллагена в количестве, не меньшем чем 90% (мас./мас.);

ж) резка лиофилизованной повязки на повязки желательного размера.

9. Способ по п.8, где на этапе а) коллаген гомогенизируют при рН ~3,5.

10. Способ по п.8 или 9, где на этапе а) органическая кислота представляет собой уксусную кислоту.

11. Способ по любому из пп.8-10, где на этапе b) концентрация гиалуроната натрия составляет от 0,1 до 4% (мас./мас.).

12. Способ по п.11, где концентрация составляет от 2 до 3% (мас./мас.).

13. Способ по любому из пп.8-12, где на этапе g) полученную в результате смесь выдерживают при легком перемешивании в течение приблизительно 30 мин.

14. Способ по любому из пп.8-13, где на этапе h) гель выдерживают при отсутствии перемешивания в течение приблизительно 10 мин.

15. Способ по любому из пп.8-14, где на этапе i) температуру варьируют от -25 до 25°C и постепенно до 60°C.

16. Способ по любому из пп.8-15, где после этапа d) и до этапа g) осуществляют следующие этапы:

e) получение водного раствора коллоидального металлического серебра или соли серебра;

f) добавление водного раствора коллоидального металлического серебра или соли серебра к прежде полученной смеси.

17. Способ по п.16, где на этапе e) концентрация коллоидального металлического серебра или соли серебра составляет от 0,001 до 5% (мас./мас.).

18. Способ по п.17, где концентрация составляет от 1 до 2% (мас./мас.)

19. Фармацевтическая композиция в форме повязки, свободной от швистелей, полученная способом по любому из пп.8-18.

