

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037396**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.03.24**

(21) Номер заявки  
**201790763**

(22) Дата подачи заявки  
**2013.01.09**

(51) Int. Cl. *A61L 24/10* (2006.01)  
*C07K 14/78* (2006.01)  
*C08J 9/28* (2006.01)  
*C08L 89/00* (2006.01)  
*C08L 89/06* (2006.01)

---

(54) **МОДИФИЦИРОВАННЫЙ КОЛЛАГЕН**

---

(31) **12150527.5; 1220868.2**

(32) **2012.01.09; 2012.11.20**

(33) **EP; GB**

(43) **2017.07.31**

(62) **201491278; 2013.01.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ИННОКОЛЛ ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ  
ЛИМИТЕД (IE)**

(72) Изобретатель:  
**Дитрих Александра (DE), Майерс  
Майкл (US)**

(74) Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

(56) WO-A2-2001079342  
US-A-4097234  
US-A1-20020153632  
WO-A2-2010052694

(57) Изобретение относится к созревшему коллагену, который получен путем обеспечения выделенного коллагена; замораживания выделенного коллагена; обезвоживания замороженного коллагена и созревания обезвоженного коллагена, при этом созревание включало хранение обезвоженного коллагена при температуре по меньшей мере 40°C в течение периода по меньшей мере двух недель. Также представлены композиция коллагена для лечения или предупреждения хирургических рубцов, содержащая указанный созревший коллаген, и композиция для доставки лекарственного средства, содержащая указанный созревший коллаген и активное вещество.

**B1**

**037396**

**037396**

**B1**

### **Область техники**

Настоящее изобретение относится к модифицированному коллагену, который получен путем обеспечения выделенного коллагена; замораживания выделенного коллагена; обезвоживания замороженного коллагена; и созревания обезвоженного коллагена. Описаны также композиции, содержащие такой коллаген.

### **Уровень техники**

В данной области техники хорошо известны процессы получения коллагеновых материалов для применения в медицине и ветеринарии с помощью высушивания или лиофилизации водных дисперсий коллагена для создания мембран или губок. Известно также применение коллагеновых пленок или мембран в качестве временных, биоразлагаемых барьеров для разделения соединенных поверхностей травмированной ткани после операции для предотвращения или уменьшения образования послеоперационных рубцов.

Как правило, коллаген, используемый для дальнейшего производства коллагеновых материалов, сначала выделяют экстракцией из кожи или сухожилий млекопитающего, очищают, ферментативно обрабатывают для удаления неспиральных телопептидов, частично солибилизованных кислотой, и наконец, осаждают повышением pH с получением водной дисперсии очищенного, волокнистого коллагена. После выделения дисперсия коллагена может быть дополнительно переработана для незамедлительного производства коллагеновых материалов или, в противном случае, может храниться до дальнейшей переработки. Для удобства хранения в промышленном масштабе коллагеновую дисперсию обычно концентрируют, удаляя воду с помощью центрифугирования для снижения объема, получая посредством этого влажную массу. Влажная масса должна храниться в замороженном виде для сохранения коллагена и предотвращения бактериального роста. При необходимости производства коллагеновых материалов замороженную влажную коллагеновую массу обычно оттаивают и повторно диспергируют. Независимо от того, используется ли выделенный коллаген сразу или замораживается и оттаивается в виде влажной массы, коллагеновая дисперсия обычно является вязкой и трудной для переработки в коллагеновые мембраны или лиофилизированные губки в промышленном масштабе. Необходим способ снижения вязкости коллагеновой дисперсии без дополнительного разбавления, поскольку уменьшение концентрации коллагена в дисперсии лишь увеличивает количество воды, которую необходимо удалить при последующем высушивании или лиофилизации, что является неэффективным и затратным в промышленном масштабе.

Следовательно, цель настоящего изобретения заключается в модификации выделенного коллагена таким образом, чтобы снизить вязкость дисперсии без ухудшения свойств коллагеновых материалов, изготавливаемых из нее. Предпочтительно, дополнительная цель настоящего изобретения заключается в модификации коллагена таким образом, чтобы снизить вязкость дисперсии и улучшить свойства коллагеновой мембраны, изготовленной из нее, для применения в качестве послеоперационного противовоспалительного барьера.

Эти задачи решены в соответствии с настоящим изобретением посредством обеспечения модифицированного коллагена, который облегчает эффективное производство коллагеновых материалов в промышленном масштабе и улучшает потенциальную эффективность этих материалов в области медицины и ветеринарии.

### **Краткое описание изобретения**

В соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, представлен созревший коллаген, который получен путем обеспечения выделенного коллагена, замораживания выделенного коллагена, обезвоживания замороженного коллагена и созревания обезвоженного коллагена, при этом созревание включало хранение обезвоженного коллагена при температуре по меньшей мере 40°C в течение периода по меньшей мере двух недель.

Под термином "дисперсия" понимается смесь, в которой частицы коллагена диспергированы в текучей среде, необязательно в жидкости, дополнительно необязательно в водной среде. Частицы коллагена могут включать молекулы коллагена или их агрегаты; которые диспергированы в текучей среде, необязательно в жидкости, дополнительно необязательно в водной среде. Необязательно, коллагеновые частицы, будучи диспергированными в текучей среде, необязательно в жидкости, дополнительно необязательно в водной среде, имеют длину (или максимальный размер) по меньшей мере один микрометр.

Под "созреванием" понимается переработка обезвоженного коллагена в условиях, подходящих для обеспечения созревания обезвоженного коллагена без существенного разложения или загрязнения.

Необязательно, стадия обеспечения включает стадию удаления текучей среды, необязательно жидкости, дополнительно необязательно водной среды; перед указанной стадией обеспечения. Дополнительно необязательно, стадия обеспечения включает стадию удаления по меньшей мере части текучей среды, необязательно жидкости, дополнительно необязательно водной среды; перед указанной стадией обеспечения. Дополнительно необязательно, стадия обеспечения включает стадию удаления по меньшей мере части текучей среды, необязательно жидкости, дополнительно необязательно водной среды; перед указанной стадией получения; с получением дисперсии выделенного коллагена.

Необязательно, стадия обеспечения включает стадию удаления текучей среды, необязательно жидкости, дополнительно необязательно водной среды; перед указанной стадией обеспечения с получением



необязательно по меньшей мере трех недель, дополнительно обязательно по меньшей мере четырех недель, дополнительно обязательно по меньшей мере пяти недель, дополнительно обязательно по меньшей мере шести недель.

Необязательно, стадию созревания выполняют в течение периода по меньшей мере двух месяцев, обязательно по меньшей мере четырех месяцев, дополнительно обязательно по меньшей мере шести месяцев, дополнительно обязательно по меньшей мере двенадцати месяцев.

Необязательно, стадию созревания выполняют в течение периода двух недель, дополнительно обязательно трех недель, дополнительно обязательно четырех недель.

Необязательно, стадия созревания включает хранение обезвоженного коллагена при температуре по меньшей мере 40°C в течение периода по меньшей мере четырех недель. Дополнительно обязательно, стадия созревания включает хранение обезвоженного коллагена при температуре 40°C в течение периода шести недель.

Необязательно, стадию созревания выполняют при относительной влажности 75%.

Под "относительной влажностью" понимается мера максимального количества воды в смеси газа и водяных паров, обязательно при данной температуре газа и атмосферном давлении, обязательно при постоянном атмосферном давлении, обязательно выраженная в процентах от максимального количества водяных паров в газе при данной температуре газа и атмосферном давлении. Для целей настоящего описания, термин "относительная влажность" предназначен для обозначения меры количества водяных паров в смеси окружающего воздуха и водяных паров, в которой выполняют стадию созревания, при постоянном атмосферном давлении, и выраженной в процентах. Для целей настоящего описания, понимается, что атмосферное давление составляет от около 980 до около 1040 миллибар.

Следует понимать, что при выполнении стадии созревания параметры температуры, времени, давления и относительной влажности обязательно являются взаимоисключающими, и специалистам в данной области понятно, что при варьировании одного параметра, соответственно, могут также варьироваться один или оба других параметра.

Необязательно, стадия созревания включает хранение обезвоженного коллагена при температуре по меньшей мере 40°C и при относительной влажности 75% в течение периода шести недель, двух месяцев, четырех месяцев или шести месяцев. Дополнительно обязательно, стадия созревания включает хранение обезвоженного коллагена при температуре по меньшей мере 40°C и при относительной влажности 75% в течение периода по меньшей мере шести недель.

Необязательно, выделенный коллаген представляет собой волокнистый коллаген. Дополнительно обязательно, выделенный коллаген выбран из коллагена I типа, коллагена II типа, коллагена III типа и их смеси. Дополнительно обязательно, выделенный коллаген представляет собой коллаген I типа.

Необязательно, получение созревшего коллагена дополнительно включает стадию механического разрушения модифицированного коллагена перед стадией созревания. Обязательно, стадия механического разрушения включает измельчение. Дополнительно обязательно, стадия механического разрушения выбрана из помолы, крошения, растирания и их смеси.

Необязательно, выделенный коллаген заморожен. Дополнительно обязательно, выделенный коллаген заморожен при температуре менее -20°C. Обязательно, замороженный выделенный коллаген оттаивают перед получением модифицированного коллагена.

В соответствии со вторым аспектом настоящего изобретения, представлена композиция коллагена, содержащая созревший коллаген в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, для применения при лечении или предупреждении хирургических рубцов.

Необязательно, применение включает введение композиции в биологическую мембрану, обязательно биологическую ткань. Дополнительно обязательно, применение включает введение композиции в биологическую мембрану, обязательно биологическую ткань, в полости тела. Дополнительно обязательно, применение включает введение композиции в биологическую мембрану, обязательно биологическую ткань, в полости тела, такой как брюшинная полость, перикардиальная полость, полость матки или синовиальная полость.

Необязательно, применение включает локальное введение композиции в биологическую мембрану, обязательно биологическую ткань. Дополнительно обязательно, применение включает локальное введение композиции в биологическую мембрану, обязательно биологическую ткань, в полости тела. Дополнительно обязательно, применение включает локальное введение композиции в биологическую мембрану, обязательно биологическую ткань, в полости тела, такой как брюшинная полость, перикардиальная полость, полость матки или синовиальная полость.

Необязательно, композиция содержит созревший коллаген в количестве от 0,4 до 1,5% (мас./мас.).

Необязательно, композиция имеет pH около 4,0±0,2.

В соответствии с третьим аспектом настоящего изобретения, представлена композиция для доставки лекарственного средства, содержащая созревший коллаген в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения и активное вещество.

Дополнительно обязательно, активное вещество выбрано из гентамицина ((3R,4R,5R)-2-{{(1S,2S,3R,4S,6R)-4,6-диамино-3-{{(2R,3R,6S)-3-амино-6-[(1R)-1-(метиламино)этил]оксан-2-ил}окси}-2-

гидроксициклогексил]окси}-5-метил-4-(метиламино)оксан-3,5-диол) или его соли; и бупивакаина ((RS)-1-бутил-N-(2,6-диметилфенил)пиперидин-2-карбоксамид) или его соли.

Дополнительно необязательно, композиция для доставки лекарственного средства находится в форме губки гентамицин сульфат-коллаген с размерами 2,5×2,5×0,5 см, содержащей 50 мг коллагена и 50 мг гентамицина сульфата.

Дополнительно необязательно, композиция для доставки лекарственного средства находится в форме губки бупивакаин HCl-коллаген с размерами 5×5×0,5 см, содержащей 75 мг коллагена и 100 мг бупивакаина HCl.

Дополнительно необязательно, композиция для доставки лекарственного средства находится в форме губки бупивакаин HCl-коллаген с размерами 10×10×0,5 см, содержащей 300 мг коллагена и 100 мг бупивакаина HCl.

#### **Краткое описание чертежей**

Варианты реализации настоящего изобретения будут описаны далее со ссылкой на следующие не ограничивающие примеры и сопровождающие чертежи, на которых "усы" представляют собой средне-квадратические отклонения, среди которых:

Фиг. 1 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую характеристики вязкости композиций, полученных из свежего коллагена, замороженного коллагена и обезвоженного замороженного коллагена, который оставили созреть при условиях окружающей среды на 3 года (старый лиофилизированный измельченный коллаген).

Фиг. 2А представляет собой диаграмму, иллюстрирующую характеристики водопоглощения композиций, полученных из свежего коллагена, замороженного коллагена и обезвоженного замороженного коллагена, который оставили созреть при условиях окружающей среды на 3 года (старый лиофилизированный измельченный коллаген).

Фиг. 2В представляет собой диаграмму, иллюстрирующую характеристики набухания композиций, содержащих свежий коллаген, замороженный коллаген и обезвоженный замороженный коллаген, который оставили созреть при условиях окружающей среды на 3 года (старый лиофилизированный измельченный коллаген).

Фиг. 3А представляет собой диаграмму, иллюстрирующую характеристики растворимости гентамицин-содержащих композиций, полученных из замороженного коллагена и обезвоженного замороженного коллагена, который оставили созреть при условиях окружающей среды на 3 года (старый лиофилизированный измельченный коллаген).

Фиг. 3В представляет собой диаграмму, иллюстрирующую характеристики растворимости бупивакаин-содержащих композиций, полученных из замороженного коллагена и обезвоженного замороженного коллагена, который оставили созреть при условиях окружающей среды на 3 года (старый лиофилизированный измельченный коллаген).

Фиг. 4 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую характеристики вязкости композиций, полученных из свежего коллагена, замороженного коллагена, обезвоженного замороженного коллагена, который оставили созреть при условиях окружающей среды на 3 года (старый лиофилизированный измельченный коллаген), обезвоженного замороженного коллагена (несозревший ЛИК) и модифицированного коллагена в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, созревшего в течение 2, 4 и 6 недель (созревший ЛИК).

Фиг. 5 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую характеристики вязкости композиций, полученных из обезвоженного замороженного коллагена (несозревший лиофилизированный измельченный коллаген) и модифицированного коллагена в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения (созревший ЛИК).

Фиг. 6 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую относительную способность к набуханию композиций, полученных из замороженного коллагена (ЗВК) и обезвоженного замороженного коллагена, который оставили созреть при условиях окружающей среды на 3 года (старый ЛИК); замороженного коллагена (ЗВК) и модифицированного коллагена в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения (созревший ЛИК); и обезвоженного замороженного коллагена (несозревший ЛИК) и модифицированного коллагена в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения (созревший ЛИК).

Фиг. 7 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую характеристики разрушения композиций, полученных из обезвоженного замороженного коллагена (несозревший ЛИК) и модифицированного коллагена в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения (созревший ЛИК).

Фиг. 8А представляет собой диаграмму, иллюстрирующую характеристики растворимости гентамицин-содержащих композиций, полученных из замороженного коллагена (ЗВК), обезвоженного замороженного коллагена (несозревший ЛИК) и модифицированного коллагена в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения (созревший ЛИК).

Фиг. 8В представляет собой диаграмму, иллюстрирующую характеристики растворимости бупивакаин-содержащих композиций, полученных из обезвоженного замороженного коллагена, который оставили созреть при условиях окружающей среды на 3 года (старый ЛИК), и обезвоженного заморожен-

ного лик (несозревший ЛИК).

Фиг. 9 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую характеристики вязкости модифицированного коллагена в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, созревшего в течение 4 недель (созревший ЛИК).

### Примеры

#### Пример 1. Выделение коллагена.

Коллаген может быть выделен из многих источников, например, шкур животных и сухожилий животных. В предпочтительном варианте реализации коллаген выделяют из сухожилий животных, например, сухожилий лошадей или быков; хотя специалисты в данной области могут использовать любой известный источник коллагена, включая волокнистую ткань, необязательно соединительную ткань. Предпочтительно, коллаген выделяют из сухожилий лошадей. В этом способе выделения сухожилия лошадей измельчали для разрушения источника коллагена. Измельченные сухожилия лошадей обрабатывали рядом реагентов, включая 1н. гидроксид натрия (NaOH) для удаления микробиологических загрязнений, таких как прионы, в начале процесса. Выполняли стадии обработки перекисью водорода и стадии промывания при различных значениях pH, затем выполняли стадию измельчения, которую использовали для увеличения поверхности для следующей стадии обработки. Молекулярный вес источника коллагена дополнительно уменьшали обработкой протеолитическим ферментом пепсином приблизительно при pH 2,5. pH регулировали с помощью водного раствора 1н. HCl. Пепсин использовали для разложения компонентов, загрязняющих сыворотку, таких как сывороточный альбумин лошадей (ESA), что приводит к отрыву неспиральных частей молекулы коллагена (телопептидов). Во время этого процесса коллагеновый материал также частично солибилизировали в кислотной среде. После фильтрации уровень pH повышали с 2,5 до 7,5 добавлением 1н. гидроксида натрия (NaOH). Такая регулировка pH приводит к осаждению волокнистого коллагена из раствора, который затем концентрировали центрифугированием с получением дисперсии коллагена, имеющей концентрацию около 3-30% (мас./мас.). Полученный материал назвали свежим коллагеном. Свежий коллаген может быть переработан несколькими способами.

Свежий коллаген может быть упакован в подходящие порции и заморожен до  $-20^{\circ}\text{C}$ , чтобы храниться в холодильнике до необходимого применения. Полученный материал назвали замороженным коллагеном (ЗВК). Замороженный коллаген оттаивают перед использованием таким же образом, что и свежий коллаген.

Альтернативно, замороженный коллаген может быть высушен замораживанием (лиофилизирован), а затем необязательно измельчен. Для этой цели замороженный коллаген вручную распределяли на плоской поверхности, например, полистирольной форме, толщина слоя замороженного коллагена составляла от около 5 мм до около 10 мм. Формы, наполненные коллагеном, переносили на полки промышленного сублиматора (Christ Epsilon) и замораживали до температуры около  $-38^{\circ}\text{C}$  со скоростью от 0,3 до  $1,5^{\circ}\text{C}$ . После периода уравнивания в течение около 30 минут, создали вакуум, а температуру полки постепенно повышали от около  $-38^{\circ}\text{C}$  до около  $+30^{\circ}\text{C}$  со скоростью около  $0,5^{\circ}\text{C}$  в минуту. Комбинация вакуума и постепенного повышения температуры полки от около  $-38^{\circ}\text{C}$  до около  $+30^{\circ}\text{C}$  облегчает сублимацию льда из замороженного коллагена до достижения коллагеном температуры  $0^{\circ}\text{C}$ . Для обеспечения равномерности повышения температуры коллагена выполняли по меньшей мере одну стадию уравнивания, на которой температуру полки выдерживали при постоянной заданной температуре в течение около 30 минут или до достижения коллагеном заданной температуры. Например, стадию уравнивания выполняли каждые  $10^{\circ}\text{C}$  между температурами от  $-20$  до  $+30^{\circ}\text{C}$  для обеспечения равномерности повышения температуры коллагена. Стадия уравнивания, например, при  $-20^{\circ}\text{C}$  включает выдерживание температуры полки при постоянной температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение около 30 мин. После сублимационного удаления льда и достижения коллагеном температуры  $0^{\circ}\text{C}$ , содержание остаточной воды дополнительно уменьшали продолжением постепенного повышения температуры полки до около  $+30^{\circ}\text{C}$  со скоростью около  $0,5^{\circ}\text{C}$  в минуту. Лиофилизированный коллаген затем измельчали, используя промышленную режущую мельницу (Rotorplex, Hosokawa Alpine). Полученный материал назвали несозревшим лиофилизированным измельченным коллагеном (несозревший ЛИК).

Необязательно, несозревший лиофилизированный измельченный коллаген оставляли созревать при хранении в полиэтиленовых контейнерах (мешках) при условиях окружающей среды около  $2-8^{\circ}\text{C}$  при атмосферном давлении в течение периода около 1-3 лет до необходимого использования. Полученный материал назвали старым лиофилизированным измельченным коллагеном (старый ЛИК).

Альтернативно, несозревший лиофилизированный измельченный коллаген (несозревший ЛИК) оставляли созревать при хранении в полиэтиленовых контейнерах (мешках), как описано в настоящем документе, до необходимого применения, например, хранили при  $40^{\circ}\text{C}$  в течение 2-6 недель. Полученный материал назвали созревшим лиофилизированным измельченным коллагеном (созревший ЛИК).

#### Пример 2. Процесс и оборудование компаундирования.

Водную дисперсию модифицированного коллагена готовили в емкости из нержавеющей стали, используя предварительно нагретую ( $35-42^{\circ}\text{C}$ ) очищенную воду, которую довели до pH  $4,0\pm 0,2$ . Для разрушения массы модифицированного коллагена потребовалось перемешивание с большими сдвиговыми усилиями и воздействие на волокна коллагена кислотной среды. Смесь с высокими сдвиговыми уси-

лиями (гомогенизатор) включал головку ротора/статора, предназначенную для создания высоких сдвиговых усилий за счет выталкивания модифицированного коллагена через вращающуюся головку гомогенизатора и прижатия модифицированного коллагена к ближней неподвижной головке статора. Такая конструкция обеспечивает высокие сдвиговые усилия, необходимые для отделения массы волокнистого коллагена в начале приготовления водной дисперсии. Однако может быть использовано другое сравнимое смешивающее оборудование; и оно может быть выбрано специалистами в данной области. Например, может быть использован смеситель IKA Ultra-Turrax с высокой скоростью в течение от около 2 до около 5 мин.

При необходимости, хотя и не обязательно, полученная водная дисперсия может быть отфильтрована и дегазирована, например, с помощью 250 микронных фильтров и подходящих способов дегазирования, например, обработки ультразвуком.

Концентрация коллагена в готовой водной дисперсии может быть в диапазоне от 0,4 до 1,5%, а pH может быть в диапазоне  $4,0 \pm 0,2$ . Готовая водная суспензия затем может быть перенесена в закрытую емкость из нержавеющей стали с рубашкой, температура рубашки которой необязательно установлена на  $37^\circ\text{C}$ , и водную дисперсию медленно перемешивают, используя настройку на слабые сдвиговые усилия.

Дисперсией наполняли, например,  $10 \times 10$  см блистерные лотки или формы для лиофилизации с помощью, например, поршневого насоса прямого вытеснения. Насос может быть бесклапанным насосом, необязательно имеющим керамические плунжеры. Альтернативно, также может быть использован перистальтический насос. Вес наполнения коррелировали на основании содержания коллагена в водной дисперсии для достижения заданного содержания коллагена на единицу площади, например, от около 0,1 до около  $10,0 \text{ мг/см}^2$ , необязательно около  $4 \text{ мг/см}^2$ . После завершения процесса наполнения, заполненные блистеры или формы помещали в камеру конвективной сушки. Для этого процесса высушивания использовали промышленную сушильную камеру (LabAir; Bleymehl) при  $31^\circ\text{C}$ . Для стадии высушивания обычно может потребоваться от 1 до 3 дней для удаления избытка воды, в результате чего получают готовую композицию, например, мембрану, содержащуюся в блистерах или формах.

После завершения процесса высушивания блистеры или формы вынули из сушильной камеры. Полученную композицию, например мембрану, разрезали до заданного размера, например, с помощью пневматического штампа. Процесс упаковки представлял собой двухстадийный процесс, включающий введение во внутренний и внешний пакет упаковки (этиленоксид; тип ЭО; PMS MEDICAL LTD) с последующей пневматической тепловой сваркой. Одна сторона внешнего пакета включала прозрачный пленочный ламинат из сложного полиэфира или полиэтилена низкой плотности (ПЭНП) с ленточным уплотнением из полиэтилена высокой плотности (ПЭВП). Другая сторона представляла собой непрозрачный полиэфирный или ПЭНП ламинат. Может быть использован другой материал для внешнего пакета упаковки, включая оксид алюминия, покрытый полиэтиленовыми материалами, или, в случае использования для стерилизации облучения ионным пучком, может быть использован алюминиевый внешний пакет. Пневматический запайщик пакетов облегчает формирование непрерывного сварного шва с открытого конца пакета. Верхняя часть пакета включала два отверстия или полоски, отмеченных ленточным уплотнением из полиэтилена высокой плотности (ПЭВП). Эти отверстия / окошки специально предназначены для процесса стерилизации газообразным ЭО и проницаемы только для газа. Проницаемость отверстия облегчает проникновение газообразного ЭО во время окончательного процесса ЭО стерилизации. После стерилизации и вентиляции внешний пакет повторно запечатывали под газопроницаемыми отверстиями / окошками, а затем эту газопроницаемую (верхнюю) часть отделяли от пакета. В результате получали полностью герметичный внешний пакет, содержащий окончательно стерилизованную готовую композицию, например, мембрану.

Этиленоксид (ЭО;  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ ) представляет собой газ, который, при соответствующих температурах эксплуатации, стерилизует за счет своего действия в качестве мощного алкилирующего агента. При правильных условиях клеточные составляющие организмов, такие как комплексы нуклеиновых кислот, функциональные белки и ферменты, взаимодействуют с этиленоксидом, вызывая добавление алкильных групп. В результате алкилирования предотвращается репродукция клетки и наступает гибель клетки. Стерилизатор, используемый в Примерах настоящего документа, представлял собой DMB 15009 VD (DMB Apparatebau GmbH, Германия). В качестве стерилизующего газа использовали ЭО/ $\text{CO}_2$  в соотношении 15:85 в течение периода 6 ч при давлении 4 бар. Для успешного завершения этого процесса необходимо, чтобы содержание влаги в продукте составляло не менее 9%, что может быть достигнуто его выдерживанием в зоне с контролируемыми условиями окружающей среды. После процесса ЭО стерилизации продукт проветривают не менее 3-4 недель для уменьшения содержания остаточного газообразного этиленоксида и любых остатков композиции, например, мембраны, и упаковочных материалов.

Пример 3. Характеристика.

Все композиции (мембраны) получили из 0,6% дисперсии по способу, описанному выше в настоящем документе. Все испытания на дисперсии коллагена выполнили в течение 1 дня после компаундирования; и все характеристические эксперименты с мембранами были выполнены в течение 1 месяца после производства мембраны с помощью нестерилизованных мембран.

Вязкость дисперсии.

Значения вязкости 0,9% дисперсий коллагена, полученных из каждого из: свежего коллагена, замороженного коллагена, несозревшего лиофилизированного измельченного коллагена и созревшего лиофилизированного измельченного коллагена в соответствии с примером 2, измерили с помощью вискозиметра Brookfield (цифровой реометр DV-III+ с присоединенной баней с циркуляцией TC-501). Значения вязкости измеряли при постоянной сдвиговой скорости ( $15 \text{ c}^{-1}$ ) и в диапазоне температур от 25 до 40°C с приращениями 5°C. Усреднили 60 измерений для каждой температуры для получения достоверных результатов.

Вязкость дисперсии зависит от температуры и снижается при нагревании дисперсии. Профили вязкости свежего и замороженного коллагена в испытанном диапазоне температур сравнимы. Лيوфилизированный измельченный коллаген, который хранили при температуре 2-8°C в течение 3 лет перед компаундированием (старый ЛИК), продемонстрировал значительно более низкую вязкость при всех исследованных температурах, по сравнению со свежим коллагеном и замороженным коллагеном (см. фиг. 1.) Лيوфилизированный измельченный коллаген, который компаундировали без хранения, несозревший ЛИК, продемонстрировал более низкую вязкость при всех исследованных температурах, по сравнению со свежим коллагеном и замороженным коллагеном (см. фиг. 4). Лيوфилизированный измельченный коллаген, который оставили созревать (хранили при температуре 40°C перед компаундированием; созревший ЛИК), продемонстрировал более низкую вязкость, по сравнению с несозревшим ЛИК (см. фиг. 4) и сравнимую вязкость со старым лиофилизированным измельченным коллагеном.

Как можно видеть на фиг. 5, созревание лиофилизированного измельченного коллагена, как описано в настоящем документе, приводит к улучшенной вязкости при всех исследованных температурах, по сравнению с несозревшим лиофилизированным измельченным коллагеном, который не подвергали стадии созревания, описанной в настоящем документе.

Разница в вязкости представляет собой преимущество для переработки мембран. Коллаген с более низкой вязкостью легче дегазировать и наполнять или заливать; снижается также время высушивания, поскольку могут быть переработаны коллагены, имеющие более высокие концентрации. Модифицированный коллаген настоящего изобретения обеспечивает улучшенные характеристики вязкости, по сравнению со свежим коллагеном и замороженным коллагеном; а стадия созревания обеспечивает сравнимые характеристики вязкости, по сравнению с лиофилизированным измельченным коллагеном, который хранили при температуре 2-8°C в течение 3 лет перед компаундированием (старый ЛИК), обеспечивая посредством этого улучшенные характеристики вязкости созревшего коллагена (старый ЛИК) без увеличения периода созревания.

Водопоглощение и набухание.

Из 5 мембран, полученных из каждого из: свежего коллагена, замороженного коллагена, старого лиофилизированного измельченного коллагена и созревшего лиофилизированного измельченного коллагена, вырезали три прямоугольных образца (размером 1,5×4 см). Каждый из этих образцов пропитывали водой ВДИ (вода для инъекций) в течение 10 мин и анализировали в отношении водопоглощения (влажный вес - сухой вес) и набухания (влажная толщина - сухая толщина). Толщину образца измеряли с помощью микрометра Mitutoyo IP54.

Мембраны, полученные из лиофилизированного измельченного коллагена, который хранили при температуре 2-8°C в течение 3 лет перед компаундированием (старый ЛИК), продемонстрировали более низкое водопоглощение и набухание, чем мембраны, приготовленные из свежего коллагена и из замороженного коллагена (см. фиг. 2a и 2b). Вариабельность результатов была значительно ниже для мембран, полученных из лиофилизированного измельченного коллагена, который хранили при температуре 2-8°C в течение 3 лет перед компаундированием (старый ЛИК), чем для мембран, полученных из свежего коллагена и из замороженного коллагена.

Как можно видеть на фиг. 6, изменение толщины для каждой испытанной коллагеновой мембраны демонстрирует, что улучшенные характеристики водопоглощения и набухания мембран, полученных из созревшего лиофилизированного измельченного коллагена, по сравнению с мембранами, полученными из лиофилизированного измельченного коллагена, который хранили при температуре 2-8°C в течение 3 лет до компаундирования (старый ЛИК), сравнимы с улучшенными характеристиками водопоглощения и набухания для мембран, полученных из созревшего лиофилизированного измельченного коллагена, по сравнению с мембранами, полученными из замороженного коллагена.

Сниженные характеристики набухания мембран, полученных из созревшего лиофилизированного измельченного коллагена, являются преимуществом, поскольку эти мембраны могут быть имплантированы в ограниченные анатомические пространства с меньшим риском сдавливания и потенциального повреждения жизненно важных органов. Следовательно, для применения при лечении или предупреждении хирургических рубцов, мембраны, полученные из модифицированного коллагена, могут быть использованы в большем количестве вариантов анатомических геометрий и хирургических операций.

#### **Разрушение коллагеназой**

Испытания разрушения выполнили, используя 4-5 мембран на каждую партию каждого из: свежего коллагена, замороженного коллагена, старого лиофилизированного измельченного коллагена и созревшего

шего лиофилизированного измельченного коллагена. Одну мембрану (размером 4,5×4,5 см) поместили в кювету и покрыли 15 мл 0,2н. фосфатного буфера (pH 7,4 с CaCl<sub>2</sub>). Коллагеназу (коллагеназа типа IA-S, стерильная, 50 мг, SIGMA, REF C5894) восстановили с помощью 5 мл ВДИ, а 0,5 мл полученного раствора добавили к смеси. Раствор в кювете перемешивали с помощью водяной бани со встряхиванием (Julabo SW 22) при 37°C (120 об./мин.) в течение 60 мин. Разрушение записывали, делая фотографии образцов каждые 5 мин. Результаты представлены в табл. 1. Мембраны, полученные из лиофилизированного измельченного коллагена, разрушались быстрее всех, без остатка, тогда как мембраны, приготовленные из свежего коллагена и замороженного коллагена, разлагались существенно медленнее, и в них осталось небольшое количество волокнистых агломератов.

Таблица 1. Разрушение мембран из коллагена лошадей в присутствии коллагеназы

	<b>Свежий коллаген</b>	<b>Замороженный влажный коллаген</b>	<b>Старый лиофилизированный измельченный коллаген</b>
Растворение [мин.]	50	50	25

В следующем исследовании образцы мембран размером 3,1×3,1 см погрузили в 15 мл буфера, описанного выше; к которому добавили 100 мкл раствора восстановленной коллагеназы. 1 мл образцов взяли через 5, 10, 15, 25, 40, 60 и 90 мин; образцы отфильтровали через 0,45 мкм шприцевой фильтр, а аликвоту 100 мкл разбавили 1:30.

Измеряли спектры УФ абсорбции от 210 до 230 нм (приращения 2 нм) относительно раствора сравнения, с помощью УФ-видимого фотометра Specord 205 (Analytic Jena). Разрушенную фракцию в каждой точке времени рассчитывали по максимальной абсорбции относительно 90-минутного периода времени (определенной как 100%). Результаты можно видеть на фиг. 7, которые иллюстрируют, что мембраны, полученные из созревшего лиофилизированного измельченного коллагена, разрушались быстрее, чем мембраны, полученные из лиофилизированного измельченного коллагена.

Композиция для применения при лечении или предупреждении хирургических рубцов, например, мембрана для применения в качестве противоспаечного барьера, должна оставаться невредимой в течение определенного времени, чтобы эффективно замедлять адгезию. Длительное присутствие мембраны может привести к повышенному риску инфекции, поскольку известно, что коллаген является средой для бактериального роста. Эти *in vitro* эксперименты демонстрируют, что мембраны, полученные из созревшего лиофилизированного измельченного коллагена, разрушаются быстрее, чем мембраны, полученные из старого лиофилизированного измельченного коллагена, и еще быстрее, чем мембраны, полученные из свежего коллагена и замороженного коллагена, что позволяет предположить, то этот эффект также верен для *in vivo* поведения. Соответственно, композиция, содержащая модифицированный коллаген в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения, для применения при лечении хирургических рубцов, может снижать вероятность инфекций как неблагоприятных эффектов от применения противоспаечного барьера.

Все вместе, примеры, представленные в настоящем документе, демонстрируют, что композиция, содержащая модифицированный коллаген в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения - например, мембраны, полученные из созревшего лиофилизированного коллагена, - демонстрируют измененные свойства, по сравнению с мембранами, сделанными из свежего коллагена, замороженного коллагена или незревшего лиофилизированного измельченного коллагена. Стадия созревания обеспечивает измененные свойства созревшего коллагена без увеличения периода созревания; и поэтому может быть особенно пригодной в производстве композиций для применения при предотвращении или лечении хирургических рубцов.

Пример 4. Растворимость.

Получение композиций, содержащих гентамицин.

Для испытания растворимости приготовили композиции (губки), содержащие гентамицина сульфат (Fujian Fukang Pharmaceuticals Co. Ltd, Китай), из 1,6% масс./масс. дисперсии коллагена с помощью модифицированной версии способа, описанного выше в настоящем документе. Каждая губка имела размер 2,5×2,5×0,5 см и содержала 50 мг коллагена и 50 мг гентамицина сульфата. Вкратце, гентамицина сульфат (1,6% мас./вес.) и 1н. уксусную кислоту добавили к воде для инъекций (ВДИ) и перемешивали до получения прозрачного раствора. К раствору добавили коллаген (1,6% масс./масс.), как в виде замороженного коллагена (оттаянный непосредственно перед производством); или в виде модифицированного коллагена в соответствии с настоящим изобретением (созревший ЛИК). Смесь гомогенизировали с помощью промышленного смесителя с высоким сдвиговым усилием (Ultraturrax, IKA, Германия), в течение от 1 до 5 мин при температуре от 38 до 42°C до получения однородной вязкой дисперсии. Дисперсию отфильтровали через 250 мкм сито и перемешивали в течение около 30 мин. Аликвотами дисперсии наполнили блистеры и поместили на полки подходящего сублиматора, и лиофилизировали. Блистеры, заполненные дисперсией, перенесли на полки промышленного сублиматора и заморозили до температуры

около  $-38^{\circ}\text{C}$  со скоростью от 0,3 до  $1,5^{\circ}\text{C}$ . После периода уравнивания в течение около 30-60 мин, создали вакуум, а температуру полки постепенно повысили от  $-38^{\circ}\text{C}$  до около  $+30^{\circ}\text{C}$  со скоростью около  $0,5^{\circ}\text{C}$  в минуту. Комбинация вакуума и постепенного увеличения температуры полки от около  $-38^{\circ}\text{C}$  до около  $+30^{\circ}\text{C}$  облегчает сублимацию льда из замороженной дисперсии до достижения продуктом температуры  $0^{\circ}\text{C}$ . Для обеспечения равномерности повышения температуры, выполняли по меньшей мере одну стадию уравнивания, на которой температуру полки выдерживали при постоянной заданной температуре в течение по меньшей мере 30 мин или до достижения коллагеном заданной температуры. Губчатую пористую композицию вынули из блистерных углублений и упаковали в пакеты, как описано выше, в примере 2 настоящего документа.

Получение композиций, содержащих бупивакаин.

Композиции (губки), содержащие бупивакаин HCl, получили для испытания растворимости, по такому же способу, как описан выше. Губки получили из замороженного коллагена (ЗВК) и обезвоженного замороженного коллагена, который оставили созревать при условиях окружающей среды на 3 года (старый ЛИК). Каждая губка имела размер  $5 \times 5 \times 0,5$  см и содержала 75 мг коллагена и 100 мг бупивакаина HCl (см. фиг. 3). Губки получили также из обезвоженного замороженного коллагена, который оставили созревать при условиях окружающей среды на 3 года (старый ЛИК), и обезвоженного замороженного коллагена (несозревший лик), которые имели размер  $10 \times 10 \times 0,5$  см и содержали 100 мг бупивакаина HCl и 300 мг коллагена (см. фиг. 8B). Вкратце, 1н. уксусную кислоту добавили к ВДИ и быстро перемешали. К раствору добавили коллаген (0,6% масс./масс; либо замороженный коллаген; либо лиофилизированный измельченный коллаген; либо созревший ЛИК). Смесь гомогенизировали с помощью промышленного смесителя с высоким сдвиговым усилием (Ultraturrax, ИКА, Германия), в течение от 1 до 5 мин при температуре от  $38$  до  $42^{\circ}\text{C}$  до получения однородной вязкой дисперсии. Дисперсию отфильтровали через 250 мкм сито. Бупивакаин HCl (0,8% масс./масс.) растворили в небольшом количестве ВДИ и добавили к дисперсии коллагена. Смесь перемешивали в течение около 30 мин. Аликвотами дисперсии наполнили формы и перенесли на полки промышленного сублиматора, и заморозили до температуры около  $-38^{\circ}\text{C}$  со скоростью от 0,3 до  $1,5^{\circ}\text{C}$ . После периода уравнивания в течение около 30-60 мин, создали вакуум, а температуру полки постепенно повысили от  $-38^{\circ}\text{C}$  до около  $+30^{\circ}\text{C}$  со скоростью около  $0,5^{\circ}\text{C}$  в минуту. Комбинация вакуума и постепенного увеличения температуры полки от около  $-38^{\circ}\text{C}$  до около  $+30^{\circ}\text{C}$  облегчает сублимацию льда из замороженной дисперсии до достижения продуктом температуры  $0^{\circ}\text{C}$ . Для обеспечения равномерности повышения температуры, выполняли по меньшей мере одну стадию уравнивания, на которой температуру полки выдерживали при постоянной заданной температуре в течение по меньшей мере 30 мин или до достижения коллагеном заданной температуры. Губчатую пористую композицию вынули из форм и упаковали в пакеты, как описано выше, в примере 2 настоящего документа.

Испытания растворимости гентамицина.

Свойства растворимости композиций (губок), содержащих гентамицина сульфат, анализировали в двух экземплярах, используя оборудование для определения скорости растворения типа II (Distek Inc., США). Для предотвращения всплывания губок, их поместили в специально изготовленные балластины из нержавеющей стали. Взвешенные губки погрузили в 500 мл буфера PBS (фосфатно-солевой буферный раствор, pH 7,4, температура бани  $37^{\circ}\text{C}$ ) и перемешивали при 50 об./мин. в течение 24 часов. Образца по 4,0 мл брали через 5, 10, 30, 45, 60, 120, 180, 240 и 1440 мин. Образцы подвергли реакции химической дериватизации с фталальдегидом (4 мл образца + 1,6 мл раствора, содержащего 1% фталальдегида + 4,4 мл метанола) при  $60^{\circ}\text{C}$  в течение 15 мин (разбавление 4/10). Полученные растворы отфильтровали и анализировали в системе ВЭЖХ (Shimadzu Corp., Япония) по инструкциям производителя. Использовали ВЭЖХ колонку ОФ-18 и подвижную фазу, содержащую ВДИ, метанол, уксусную кислоту и Na-1-гептансульфонат, со скоростью потока 0,5 мл/мин. Интегрировали пики гентамицина C1, C2 и C2a при 330 нм, и рассчитали концентрацию гентамицина по площади под кривой образцов и эталонного стандарта, который приготовили по такому же способу получения образца.

Испытания растворимости бупивакаина.

Свойства растворимости композиций (губок), содержащих бупивакаин HCl, анализировали в двух экземплярах, используя оборудование для определения скорости растворения типа II (Distek Inc., США), как описано выше. Для предотвращения всплывания губок, их поместили в специально изготовленные балластины из нержавеющей стали. Вкратце, взвешенные губки погрузили в 500 мл буфера PBS (фосфатно-солевой буферный раствор, pH 6,8, температура бани  $37^{\circ}\text{C}$ ) и перемешивали при 50 об./мин. в течение 24 ч. Образца по 4,0 мл брали через 5, 10, 30, 45, 60, 120, 180, 240 и 1440 мин. Образцы разбавили 1:1 PBS буфером, отфильтровали и анализировали в системе ВЭЖХ (Shimadzu Corp., Япония). Использовали ВЭЖХ колонку ОФ-18 и подвижную фазу, содержащую фосфатный буфер с pH 4,5 и ацетонитрил, со скоростью потока 0,5 мл/мин. Интегрировали пик бупивакаина при 230 нм, и рассчитали концентрацию бупивакаина по площади под кривой образцов и эталонного стандарта.

Результаты испытаний растворимости иллюстрированы на фиг. 3А, 3В, а также 8А и 8В.

Результаты этих испытаний растворимости демонстрируют, что модифицированный коллаген в со-

ответствии с настоящим изобретением обеспечивает композицию для доставки лекарства, в которой скорость высвобождения биологически активных веществ из коллагеновой композиции снижена относительно композиций, сделанных из выделенного коллагена без модификации, посредством этого обеспечивая композицию для доставки лекарства, обладающую более устойчивым действием доставки лекарства (см. фиг. 3А и 3В).

Более того, как можно видеть из фигур 8А и 8В, созревший ЛИК обеспечивает композицию для доставки лекарства, которая демонстрирует существенно сниженную скорость высвобождения биологически активных веществ, по сравнению с композициями, полученными из незрелого лиофилизированного ЛИК или замороженного коллагена; посредством этого обеспечивая композицию для доставки лекарства, обладающую более устойчивым действием доставки лекарства.

Это пролонгированное высвобождение может быть преимущественным для коллагеновых продуктов, содержащих активные фармацевтические ингредиенты (АФИ) с хорошей растворимостью в воде. Замедление кинетики высвобождения для этой комбинации в противном случае труднодостижимо без химического поперечного сшивания композиции для доставки лекарства. Как для локального, так и для имплантируемого введения пролонгированное высвобождение указанного ингредиента из композиции для доставки лекарства может приводить к более продолжительному терапевтическому действию и улучшенной локальной эффективности.

Пример 5. Хранение.

Несозревший лиофилизированный измельченный коллаген (несозревший ЛИК) получили так, как описано в примере 1; и выполнили созревание при хранении в полиэтиленовых контейнерах (мешках), как описано в настоящем документе, в течение до 4 недель. Полученный материал обозначили созревшим лиофилизированным измельченным коллагеном (созревший ЛИК).

Значения вязкости измерили в каждый из указанных периодов времени (1, 2, 3 и 4 недели хранения), как описано в примере 3. Вкратце, значения вязкости измерили с помощью вискозиметра Brookfield (цифровой реометр DV-III+ с присоединенной баней с циркуляцией TC-501) при постоянной сдвиговой скорости ( $15 \text{ s}^{-1}$ ) и в диапазоне температур от 30 до  $65^\circ\text{C}$ . Измерили значения вязкости созревшего лиофилизированного измельченного коллагена, имевшего низкое содержание влаги 1-2% и высокое содержание влаги 13-15%.

Как можно видеть на фиг. 9, в общем, на вязкость созревшего лиофилизированного измельченного коллагена не влияет содержание влаги в созревшем лиофилизированном измельченном коллагене. Более того, увеличение температуры хранения ускоряет снижение вязкости созревшего лиофилизированного измельченного коллагена. Несомненно, созревание лиофилизированного измельченного коллагена, как описано в настоящем документе, приводит к улучшенной вязкости при всех исследованных периодах хранения. При низкой температуре хранения время, необходимое для достижения заданной вязкости, увеличивается.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Созревший коллаген, полученный путем обеспечения выделенного коллагена, замораживания выделенного коллагена, обезвоживания замороженного коллагена и созревания обезвоженного коллагена, при этом созревание включало хранение обезвоженного коллагена при температуре по меньшей мере  $40^\circ\text{C}$  в течение периода по меньшей мере двух недель.

2. Созревший коллаген по п.1, отличающийся тем, что хранение обезвоженного коллагена осуществляли при температуре по меньшей мере  $40^\circ\text{C}$  в течение периода по меньшей мере четырех недель.

3. Созревший коллаген по п.1, отличающийся тем, что хранение обезвоженного коллагена осуществляли при температуре по меньшей мере  $40^\circ\text{C}$  в течение периода по меньшей мере шести недель.

4. Созревший коллаген по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что хранение обезвоженного коллагена осуществляли при температуре  $40^\circ\text{C}$  и при относительной влажности 75% в течение периода шести недель, двух месяцев, четырех месяцев или шести месяцев.

5. Созревший коллаген по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что хранение обезвоженного коллагена осуществляли при относительной влажности 75%.

6. Композиция коллагена для лечения или предупреждения хирургических рубцов, содержащая созревший коллаген по любому из пп.1-5 и воду.

7. Композиция по п.6, содержащая от 0,4 до 1,5% мас./мас. созревшего коллагена.

8. Композиция по п.6 или 7, отличающаяся тем, что pH композиции составляет  $4,0 \pm 0,2$ .

9. Композиция для доставки лекарственного средства, содержащая созревший коллаген и активное вещество, причем созревший коллаген получен путем обеспечения выделенного коллагена, замораживания выделенного коллагена, обезвоживания замороженного коллагена и созревания обезвоженного коллагена, при этом созревание включало хранение обезвоженного коллагена при температуре по меньшей мере  $40^\circ\text{C}$  в течение периода по меньшей мере двух недель.

10. Композиция для доставки лекарственного средства по п.9, отличающаяся тем, что активное вещество представляет собой гентамицин, бупивакаин или их соль.

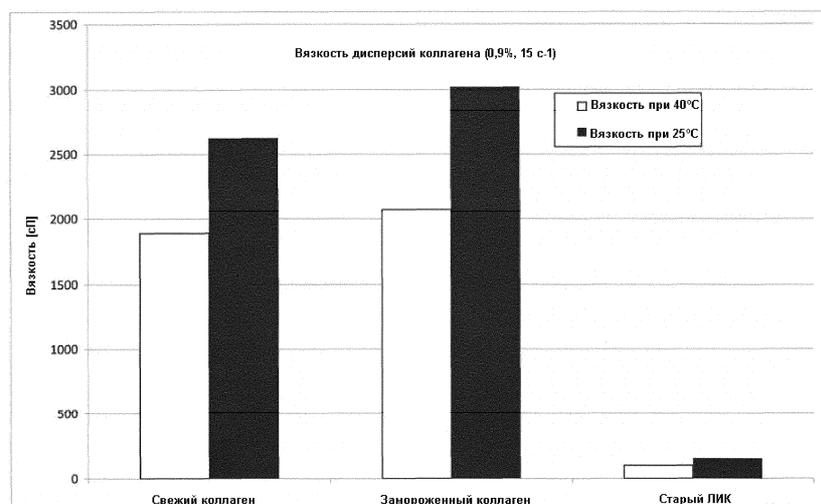
11. Композиция для доставки лекарственного средства по п.10, отличающаяся тем, что композиция находится в форме губки гентамицин сульфат-коллаген с размерами 2,5×2,5×0,5 см, содержащей 50 мг коллагена и 50 мг гентамицина сульфата.

12. Композиция для доставки лекарственного средства по п.10, отличающаяся тем, что композиция находится в форме губки бупивакаин HCl-коллаген с размерами 5×5×0,5 см, содержащей 75 мг коллагена и 100 мг бупивакаина HCl.

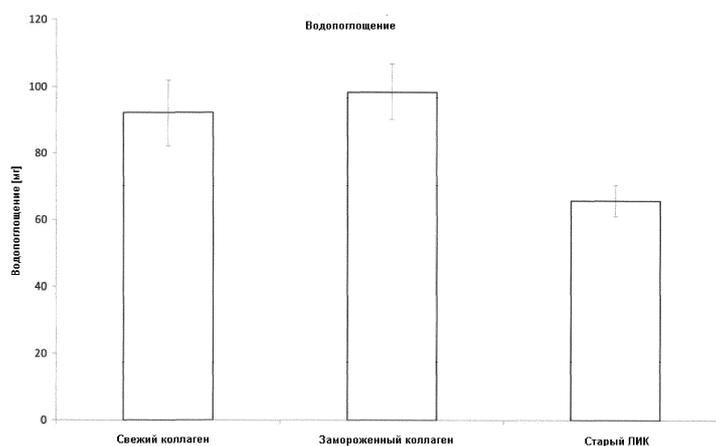
13. Композиция для доставки лекарственного средства по п.10, отличающаяся тем, что композиция находится в форме губки бупивакаин HCl-коллаген с размерами 10×10×0,5 см, содержащей 300 мг коллагена и 100 мг бупивакаина HCl.

14. Композиция для доставки лекарственного средства по любому из пп.9-13, отличающаяся тем, что хранение коллагена осуществляли при 40°C и при относительной влажности 75% в течение периода шести недель, двух месяцев, четырех месяцев или шести месяцев.

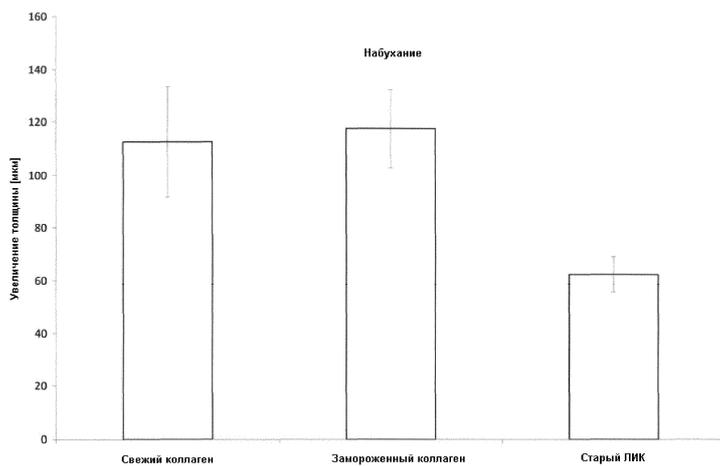
15. Композиция для доставки лекарственного средства по любому из пп.9-13, отличающаяся тем, что хранение коллагена осуществляли при 40°C и при относительной влажности 75% в течение по меньшей мере шести недель.



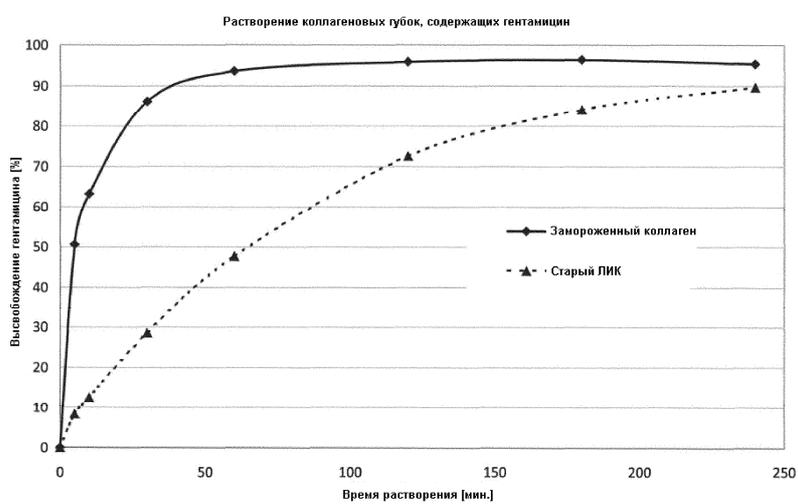
Фиг. 1



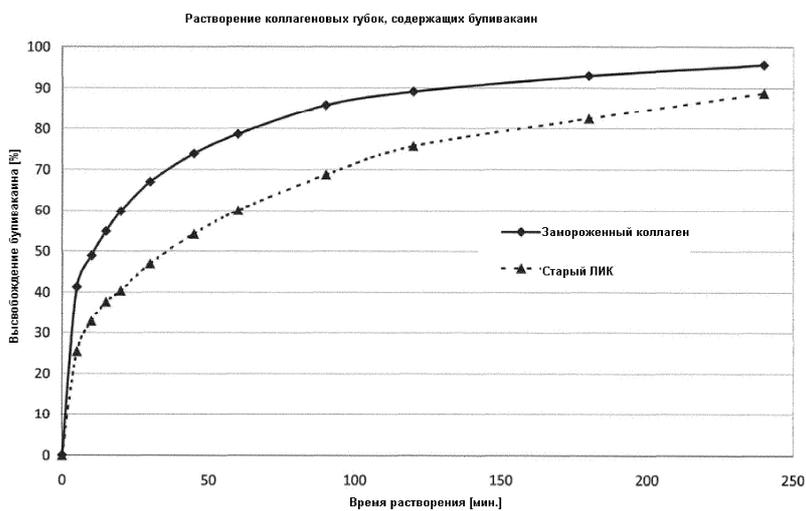
Фиг. 2А



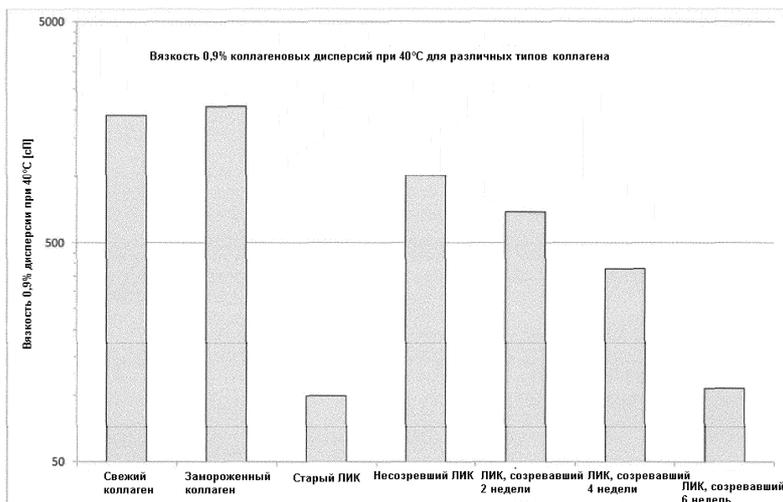
Фиг. 2В



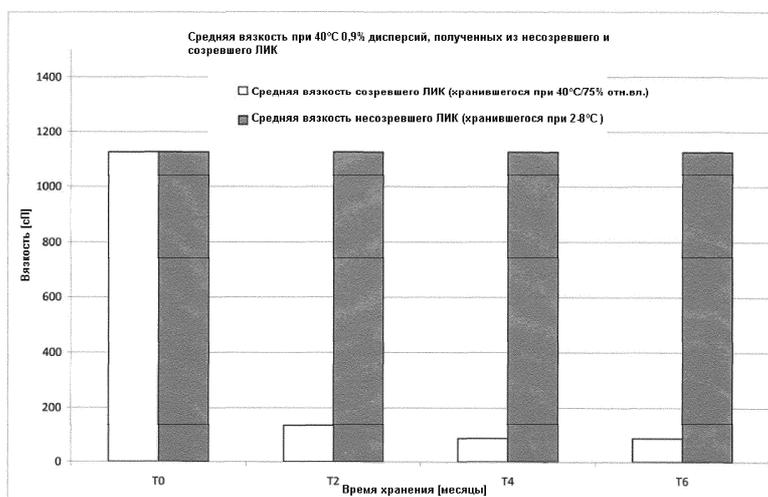
Фиг. 3А



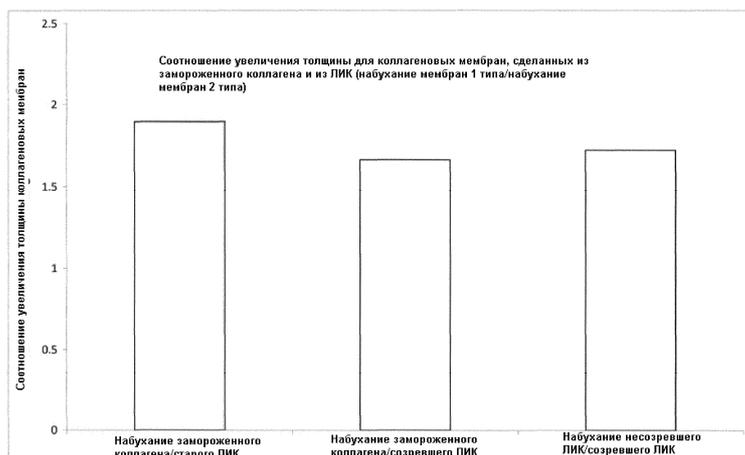
Фиг. 3В



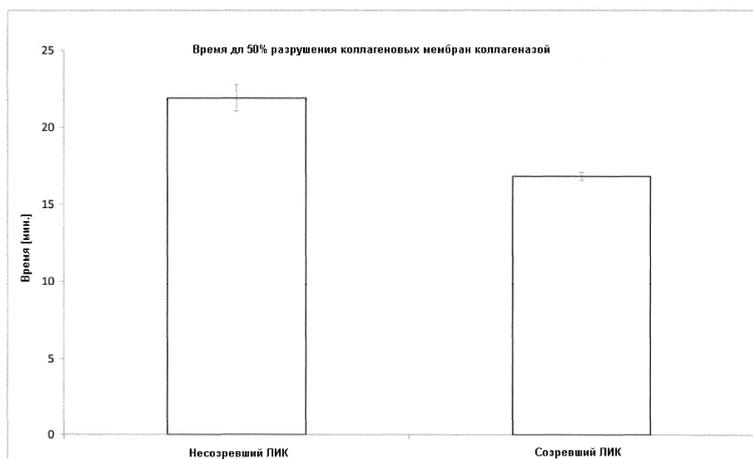
Фиг. 4



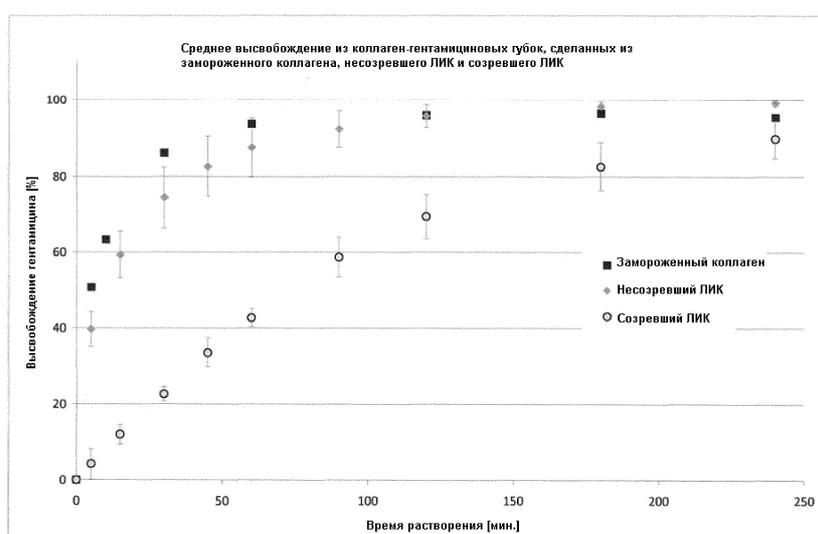
Фиг. 5



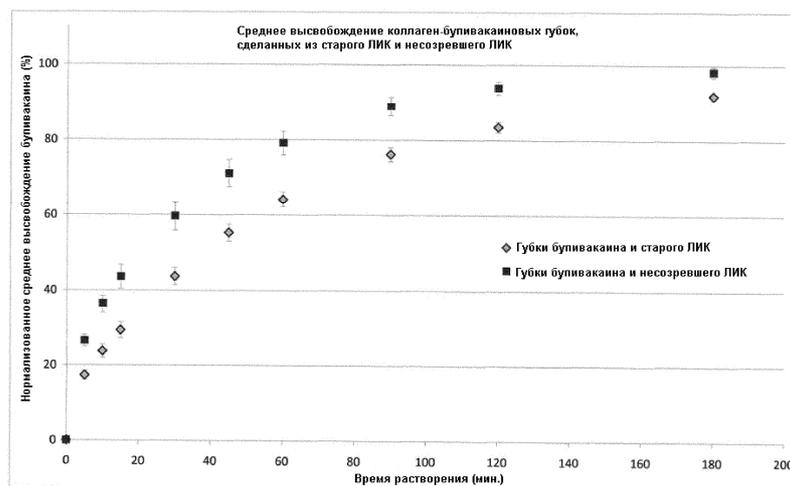
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8А



Фиг. 8В

