(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 33 692 T2** 2005.03.10

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 731 812 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 692.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/13706**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 904 174.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/015343**
(86) PCT-Anmeldetag: **01.12.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **08.06.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **18.09.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **07.04.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.03.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C08B 37/08**
C12P 19/26

(30) Unionspriorität:
160569 **01.12.1993** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Marine Polymer Technologies, Inc., Danvers, Mass., US

(74) Vertreter:
HUBER & SCHÜSSLER, 81825 München

(72) Erfinder:
VOURNAKIS, N., John, Hanover, US; FINKIELSZTEIN, Sergio, Chestnut Hill, US; PARISER, R., Ernest, Belmont, US; HELTON, Mike, Memphis, US

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON POLY-BETA-1-4-N-ACETYLGLUKOSAMIN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

1. EINFÜHRUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Reinigung von erfindungsgemäßen p-GlcNAc aus Mikroalgen, vorzugsweise Kieselalgen, als Ausgangsquellen. Weiterhin betrifft die Erfindung Verfahren zur Derivatisierung und Umformulierung des p-GlcNAc. Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von reinem p-GlcNAc, seinen Derivaten und/oder seinen Umformulierungen.

2. HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Es gibt heutzutage eine umfangreiche Literatur bezüglich der Eigenschaften, Wirkungen und Verwendungen von Polysacchariden, die teilweise aus p-GlcNAc bestehen: Eine Klasse solcher Materialien wird allgemein als „Chitin" bezeichnet, während deacetylierte Chitinderivate als „Chitosan" bezeichnet werden. Als diese Begriffe zuerst (etwa um 1823) verwendet wurden, ging man davon aus, dass Chitin und Chitosan in der Natur immer als eindeutige, gut abgegrenzte, einzigartige und unveränderliche chemische Art vorkamen, wobei Chitin vollständig acetylierte und Chitosan vollständig deacetylierte Zusammensetzungen waren. Allerdings wurde erst etwa ein Jahrhundert später entdeckt, dass die Begriffe „Chitin" und „Chitosan" tatsächlich sehr zweideutig sind. Anstatt gut abgegrenzte Verbindungen zu betreffen, beziehen sich diese Begriffe in Wirklichkeit auf eine Familie von Verbindungen, die stark differierende physikalische und chemische Eigenschaften zeigen. Diese Unterschiede sind eine Folge des variierenden Molekulargewichts der Produkte, des variierenden Acetylierungsgrads und der vorhandenen Verunreinigungen, wie beispielsweise kovalent gebundene, artspezifische Proteine, einzelne Aminosäuren und anorganische Verunreinigungen. Selbst heute werden die Begriffe „Chitin" und „Chitosan" zweideutig benutzt und beziehen sich eigentlich auf schlecht abgegrenzte Gemische aus vielen verschiedenen Verbindungen.

[0003] Zum Beispiel variieren die Eigenschaften von „Chitinen", die aus herkömmlichen Quellen, wie beispielsweise Außenpanzer von Krustentieren und Pilzmycelmatten, isoliert sind, in unberechenbarer Weise. Solche Variationen sind nicht nur auf Artunterschiede zurückzuführen sondern auch auf unterschiedliche Auswirkungen durch Umwelt und Jahreszeiten, die einige der biochemischen Charakteristika der „Chitin" erzeugenden Arten bestimmen. In der Tat ist die unberechenbare Veränderlichkeit des Rohstoffs zum großen Teil für das langsame Wachstum der auf Chitin gründenden Industrien verantwortlich.

[0004] Es gibt heutzutage in der wissenschaftlichen Literatur keine Berichte, die die Isolierung und Herstellung von reinem, vollständig acetyliertem p-GlcNAc aus Materialquellen beschreiben, d.h. ein Produkt oder Produkte, die durch organische oder anorganische Verunreinigungen nicht kontaminiert werden. Während McLachlan u.a. (McLachlan, A.G. u.a., 1965, Can. J. Botany 43:707–713) über die Isolierung von Chitin berichtet haben, wurde in nachfolgenden Untersuchungen gezeigt, dass die erhaltene „reine" Substanz in Wirklichkeit Proteine und andere Verunreinigungen enthielt.

[0005] Falk u.a., Canadian J. of Chemistry, Bd. 44, Seite 2269–2281 (1966) beschreiben Untersuchungen an Chitan- (ß-(1->4)-verbundenes 2-Acetamido-2-desoxy-D-glucan) Fasern der Kieselalge Thalassiosira Fluviatilis Hustedt.

[0006] Groboillot u.a., Biotechnology and Bioengineering, Bd. 42, Seite 1157-1163 (1993) beschreiben die Membranbildung durch grenzflächige Quervernetzung von Chitosan zur Mikroverkapselung von Lactococcus lactis.

[0007] Die EP-A-0 543 572 beschreibt ein Verfahren zum Einschließen von aktivem Material in Chitosan.

[0008] Thanoo u.a., J. Pharm. Pharmacol., Bd. 44, Seite 283–286 (1992) beschreiben quervernetzte Chitosan-Mikrokügelchen und ihre Herstellung und Beurteilung als Matrix für die kontrollierte Freisetzung von Arzneimitteln.

[0009] Die US-A-5,071,977 beschreibt ein gereinigtes Oligosaccharid, das aus Hexasaccharid mit einem nativen Molekulargewicht von 959 besteht und aus der Zellwand von Streptococcus sanguis isoliert werden kann.

[0010] Deacetylierte und teilweise deacetylierte Chitinpräparate zeigen potentiell vorteilhafte chemische Eigenschaften, wie beispielsweise eine hohe Reaktionsfähigkeit, dichte kationische Ladungen, eine starke Metallchelatbildungsfähigkeit, die Fähigkeit Proteine kovalent anzulagern und die Löslichkeit in vielen wässrigen

Lösungsmitteln. Die unberechenbare Veränderlichkeit dieser Präparate schränkt aber, wie oben beschrieben, die Brauchbarkeit dieser heterogenen Verbindungen stark ein. Zum Beispiel verursachen die gegenwärtig verfügbaren „Chitine" und „Chitosane" nicht reproduzierbare Daten und unannehmbar umfangreiche Variationen bezüglich der Versuchsergebnisse. Darüber hinaus sind die verfügbaren Präparate nicht ausreichend homogen oder rein, und die Präparatbestandteile sind für diese Präparate nicht so reproduzierbar, dass sie zur Benutzung bei Anwendungen, insbesondere bei medizinischen, akzeptabel sind. Daher gibt es zurzeit keine wirklichen, gereinigten Präparate von Chitin und Chitosan, deren Eigenschaften im großen Umfang reproduzierbar sind und die leicht herzustellen sind, obwohl dies äußerst wünschenswert wäre.

3. ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0011] Das erfindungsgemäße p-GlcNAc ist ein Polymer mit hohem Molekulargewicht, dessen Bestandteil Monosaccharide in der ß-1→4-Konformation angelagert sind und das frei von Proteinen, im Wesentlichen frei von anderen organischen Verunreinigungen und im wesentlichen frei von anorganischen Verunreinigungen ist.

[0012] Die Bedeutung der vorliegenden Erfindung beruht auf der Tatsache, dass das Problem einer unberechenbaren Rohstoffveränderlichkeit überwunden wurde. Es ist zum ersten Mal möglich, mit einfachen Mitteln und im industriellen Umfang biomedizinisch reines p-GlcNAc mit hohem Molekulargewicht und gleich bleibenden Eigenschaften herzustellen. Das in der vorliegenden Erfindung hergestellte Material ist stark kristallin und wird aus sorgfältig kontrollierten, aseptischen Kulturen von einer aus einer Anzahl von marinen Mikroalgen, vorzugsweise Kieselalgen, die in einem festgelegten Medium wachsen gelassen wurden, hergestellt.

[0013] Die vorliegende Erfindung beschreibt Derivate und Umformulierungen von p-GlcNAc sowie Verfahren zur Herstellung solcher Derivate und Umformulierungen. Derartige Derivatisierungen können Polyglucosamin und seine Derivate umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt, und derartige Umformulierungen können Membranen, Filamente, nicht gewebte Textilien, Schwämme und dreidimensionale Matrizen umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt. In erster Linie betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren zur Reinigung von erfindungsgemäßem p-GlcNAc aus Mikroalgen, vorzugsweise Kieselalgen, als Quellen. Darüber hinaus bezieht sich die vorliegende Erfindung auf Verwendungen des gereinigten p-GlcNAc, seiner Derivate und/oder seiner Umformulierungen. Zu diesen Verwendungen zählen neue kommerzielle Anwendungen, die solche Industrien, wie beispielsweise die biomedizinische, pharmazeutische und kosmetische Industrie betreffen, die alle Ausgangsmaterialien mit höchstem Reinheitsgrad benötigen. Zum Beispiel können die erfindungsgemäßen p-GlcNAc-Materialien so formuliert sein, dass sie kontrollierbare biologische Zersetzungseigenschaften zeigen, und weiter können sie als Teil von Systemen zur langsamen Freisetzung von Medikamenten, als Zellverkapselungssysteme und als Behandlung zum Verhindern von postoperativen Adhäsionen verwendet werden.

4. KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0014] **Fig.** 1: Chemischer Aufbau von 100% GlcNAc. „n" betrifft eine ganze Zahl, die im Bereich von etwa 4.000 bis etwa 150.000 liegt, wobei der Bereich von etwa 4.000 bis etwa 15.000 bevorzugt ist.

[0015] **Fig.** 2: Kohlenhydratanalyse von p-GlcNAc, Gaschromatographie-Massenspektroskopie-Daten. Die schwarzen Quadrate stellen p-GlcNAc dar, das unter Anwendung der Säurebehandlungs/Neutralisationsvariation des chemischen/biologischen Verfahrens gereinigt ist, wie unten im Abschnitt 5.3.2 beschrieben.

[0016] **Fig.** 3A: Zirkulardichroismusspektren von festen Membranen aus reinem p-GlcNAc.

[0017] **Fig.** 3B: Zirkulardichroismusspektren von festen Membranen aus deacetyliertem p-GlcNAc. Das Verschwinden des 211 nm Minimums und 195 nm Maximums, das in reinem p-GlcNAc (**Fig.** 3A) beobachtet wird, zeigt die vollständige Deacetylierung unter den angewendeten Bedingungen an, wie unten im Abschnitt 5.4 beschrieben.

[0018] **Fig.** 4A: Infrarot-Spektralanalysen von dünnen Membranen von reinem Kieselalgen-p-GlcNAc, hergestellt durch das Reinigungsverfahren mittels mechanischer Kraft (oben) und das chemische/biologische Reinigungsverfahren (unten).

[0019] **Fig.** 4B: Infrarot-Spektralanalysen von zwei Präparaten kommerziellen „Chitins", die zu Membranen nach den unten im Abschnitt 5.5 näher erläuterten Verfahren vergossen sind.

[0020] **Fig.** 4C: Infrarot-Spektralanalysen von reinem p-GlcNAc, das durch Wärmedenaturierung (oben) und

durch chemische Deacetylierung (unten) modifiziert wurde, und zwar gemäß den unten im Abschnitt 5.4 näher erläuterten Verfahren.

[0021] **Fig.** 4D: Infrarot-Spektralanalyse von einer p-GlcNAc-Membran, die von der Kieselalge Thallasiosira fluviatilis stammt, unter Verwendung eines chemischen/biologischen Reinigungsverfahrens, wie unten im Abschnitt 5.3.2 näher ausgeführt ist.

[0022] **Fig.** 4E: Infrarot-Spektralanalyse einer p-GlcNAc-Membran, hergestellt durch das Reinigungsverfahren mittels mechanischer Kraft, wie unten im Abschnitt 5.3.1 beschrieben, und anschließendes Autoklavieren.

[0023] **Fig.** 5A: NMR-Analyse von p-GlcNAc, gereinigt unter Verwendung des chemischen/biologischen Reinigungsverfahrens, wie unten im Abschnitt 5.3.2 beschrieben. Das Diagramm zeigt die Peakamplituden, Bereiche und Verhältnisse bezüglich der Vergleichskontrollen. Verhältnis der gesamten Peakbereiche.

[0024] **Fig.** 5B: NMR-Analyse von p-GlcNAc, gereinigt unter Verwendung des chemischen/biologischen Reinigungsverfahrens, wie im Abschnitt 5.3.2 beschrieben. Das Schaubild zeigt die Verhältnisse der gesamten Peakbereiche.

[0025] **Fig.** 6A–6B: Transmissionselektronenmikroaufnahmen (TEM) einer p-GlcNAc-Membran, die durch das Reinigungsverfahren mittels mechanischer Kraft hergestellt wurde, wie unten im Abschnitt 5.3.1 beschrieben. Vergrößerung: 6A: 4190x; 6B: 16.250x.

[0026] **Fig.** 7A–7B: Transmissionselektronenmikroaufnahmen (TEM) einer p-GlcNAc-Membran durch HF-Behandlung, wie in der Erörterung des chemischen/biologischen Reinigungsverfahrens unten im Abschnitt 5.3.2 beschrieben. Vergrößerung: 7A: 5270x; 7B: 8150x.

[0027] **Fig.** 8A–8B: Transmissionselektronenmikroaufnahmen (TEM) einer p-GlcNAc-Membran, hergestellt durch die Säurebehandlungs/Neutralisationsvariation des chemischen/biologischen Reinigungsverfahrens, wie unten im Abschnitt 5.3.2 beschrieben. Vergrößerung: 8A: 5270x; 8B:16.700x.

[0028] **Fig.** 9A: Rasterelektronenmikroaufnahme, die eine p-GlcNAc-Membran zeigt, welche durch die Säurebehandlungs/Neutralisationsvariation des chemischen/biologischen Reinigungsverfahrens hergestellt ist, wie unten im Abschnitt 5.3.2 beschrieben. Vergrößerung: 200x.

[0029] **Fig.** 9B: Rasterelektronenmikroaufnahme, die eine p-GlcNAc-Membran zeigt, welche durch die Säurebehandlungs/Neutralisationsvariation des chemischen/biologischen Reinigungsverfahrens hergestellt ist, wie unten im Abschnitt 5.3.2 beschrieben. Vergrößerung: 1000x.

[0030] **Fig.** 9C: Rasterelektronenmikroaufnahme, die eine p-GlcNAc-Membran zeigt, welche durch die Säurebehandlungs/Neutralisationsvariation des chemischen/biologischen Reinigungsverfahrens hergestellt ist, wie unten im Abschnitt 5.3.2 beschrieben.

[0031] **Fig.** 9D: Rasterelektronenmikroaufnahme, die eine p-GlcNAc-Membran zeigt, welche durch die Säurebehandlungs/Neutralisationsvariation des chemischen/biologischen Reinigungsverfahrens hergestellt wird, wie unten im Abschnitt 5.3.2 beschrieben. Vergrößerung: 10.000x.

[0032] **Fig.** 9E: Rasterelektronenmikroaufnahme, die eine p-GlcNAc-Membran zeigt, welche durch die Säurebehandlungs/Neutralisationsvariation des chemischen/biologischen Reinigungsverfahrens hergestellt wurde, wie unten im Abschnitt 5.3.2 beschrieben. Vergrößerung: 20.000x.

[0033] **Fig.** 10A–10B: Rasterelektronenmikroaufnahme einer reinen p-GlcNAc-Membran, hergestellt aus einem Material, das anfänglich unter Verwendung des unten im Abschnitt 5.3 beschriebenen Zellauflösungs/Neutralisations-Reinigungsverfahrens hergestellt, in Dimethylacetamid/Lithiumchlorid aufgelöst und in H_2O in eine Matte wieder ausgefällt wurde, wie unten im Abschnitt 5.5 beschrieben. Vergrößerung: 10A: 1000x; 10B: 10.000x.

[0034] **Fig.** 11A–11B: Rasterelektronenmikroaufnahmen einer deacetylierten p-GlcNAc-Matte. Vergrößerung: 11A: 1.000x; 11B: 10.000x.

[0035] **Fig.** 12A–12B: Photoaufnahmen von Kieselalgen. Beachtenswert sind die p-GlcNAc-Fasern, die sich

von den Kieselalgen-Zellkörpern erstrecken.

[0036] Fig. 13: Schema, das einige der möglichen p-GlcNAc und deacetylierten p-GlcNAc-Derivate der Erfindung zeigt. (adaptiert von S. Hirano, „Production and Application of Chitin and Chitosan in Japan", in „Chitin and Chitosan", 1989, Skjak-Braek, Anthonsen, and Sanford, Hrsg., Elsevier Science Publishing Co., Seite 37–43).

[0037] Fig. 14: Zellwachstumsfähigkeitsuntersuchung von Zellen, die bei Anwesenheit oder Abwesenheit von p-GlcNAc-Membranen gewachsen sind. Schwarzer Kreis (•): Zellen, die auf einer p-GlcNAc-Matrix gewachsen sind; weißer Kreis (o): Zellen, die bei Abwesenheit der Matrix gewachsen sind.

[0038] Fig. 15A–15B: REM-Mikroaufnahmen von transformierten Mausfibroblastzellen, die auf p-GlcNAc-Membranen gewachsen sind. Vergrößerung: 15A: 1.000; 15B: 3.000x.

[0039] Fig. 16A: Rasterelektronenmikroaufnahme (REM) von Kontrollmaterial allein aus Kollagen, hergestellt gemäß dem unten im Abschnitt 13.1 beschriebenen Verfahren. Vergrößerung 100x.

[0040] Fig. 16B: Rasterelektronenmikroaufnahme (REM) eines Kollagen/p-GlcNAc-Hybridmaterials, das nach dem unten im Abschnitt 13.1 beschriebenen Verfahren hergestellt ist. Das Verhältnis von Kollagensuspension : p-GlcNAc-Suspension ist gleich 3:1, mit Endkonzentrationen von 7,5 mg/ml Kollagen und 0,07 mg/ml p-GlcNAc. Vergrößerung 100x.

[0041] Fig. 16C: Rasterelektronenmikroaufnahme (REM) eines Kollagen/p-GlcNAc-Hybridmaterials, das nach dem unten im Abschnitt 13.1 beschriebenen Verfahren hergestellt ist. Das Verhältnis von Kollagensuspension : p-GlcNAc-Suspension ist gleich 1:1, mit Endkonzentrationen von 5,0 mg/ml Kollagen und 0,12 mg/ml p-GlcNAc. Vergrößerung 100x.

[0042] Fig. 16D: Rasterelektronenmikroaufnahme (REM) eines Kollagen/p-GlcNAc-Hybridmaterials, das nach dem unten im Abschnitt 13.1 beschriebenen Verfahren hergestellt ist. Das Verhältnis von Kollagensuspension : p-GlcNAc-Suspension ist gleich 2:2, mit Endkonzentrationen von 10,0 mg/ml Kollagen und 0,25 mg/ml p-GlcNAc. Vergrößerung 100x.

[0043] Fig. 16E: Rasterelektronenmikroaufnahme (REM) eines Kollagen/p-GlcNAc-Hybridmaterials, das gemäß dem unten im Abschnitt 13.1 beschriebenen Verfahren hergestellt ist. Das Verhältnis von Kollagensuspension : p-GlcNAc-Suspension ist gleich 1:3, mit Endkonzentrationen von 2,5 mg/ml Kollagen und 0,25 mg/ml p-GlcNAc. Vergrößerung 100x.

[0044] Fig. 17A: REM von Maus-3T3-Fibroblastzellen, die auf dem rein kollagenen Kontrollmaterial der obigen **Fig.** 16A kultiviert wurden. Vergrößerung 100x.

[0045] Fig. 17B: REM von Maus-3T3-Fibroblastzellen, die auf dem Kollagen/p-GlcNAc-Material der obigen **Fig.** 16B kultiviert wurden. Vergrößerung 100x.

[0046] Fig. 17C: REM von Maus-3T3-Fibroblastzellen, die auf dem Kollagen/p-GlcNAc-Material der obigen **Fig.** 16C kultiviert wurden. Vergrößerung 100x.

[0047] Fig. 17D: REM von Maus-3T3-Fibroblastzellen, die auf dem Kollagen/p-GlcNAc-Material der obigen **Fig.** 16D kultiviert wurden. Vergrößerung 100x.

[0048] Fig. 18: Transformierte NMR-Datenkurven, die dazu verwendet wurden, um Bereiche für jedes Kohlenstoffatom zu erhalten und dann die Verhältnisse von CH3(-Bereich) zu C-Atombereich) zu berechnen.

[0049] Fig. 19: Typisches p-GlcNAc C^{13}-NMR-Spektrum. Die einzelnen Peaks stellen den Betrag zu dem Spektrum von jedem einzelnen Kohlenstoffatom in dem Molekül dar.

[0050] Fig. 20: Transformierte NMR-Spektrumsdaten, die Werte darstellen, die für Verhältnisse von CH3(-Bereich) zu C-Atombereich) berechnet wurden. Oben: graphische Darstellung von Daten; unten: numerische Darstellung von Daten.

[0051] Fig. 21A–G: Dreidimensionale p-GlcNAc Matrizen, die in verschiedenen Lösungsmitteln hergestellt

wurden. Insbesondere wurden die p-GlcNAc-Matrizen in destilliertem Wasser (**Fig.** 21A, **Fig.** 21D), 10 % Methanol in destilliertem Wasser (**Fig.** 21B), 25 % Methanol in destilliertem Wasser (**Fig.** 21C), 10 % Ethanol in destilliertem Wasser (**Fig.** 21E), 25 % Ethanol in destilliertem Wasser (**Fig.** 21F) und 40 % Ethanol in destilliertem Wasser (**Fig.** 21G) hergestellt. Vergrößerung: 200x. Eine Meßmarkierung von 200 µm ist jeder dieser Figuren beigegeben.

[0052] **Fig.** 22A–G. Fibroblastzellen, die auf dreidimensionalen p-G1cNAc-Matrizen gewachsen sind, welche durch Lyophilisierung von p-GlcNAc in destilliertem Wasser hergestellt wurden. Vergrößerung: 100x (**Fig.** 22A, 22E), 500x (**Fig.** 22B), 1000x (**Fig.** 22C, 22F), 5000x (**Fig.** 22D, 22G). Eine Messmarkierung von 5, 20, 50 oder 200 µm, wie angegeben, ist bei jeder der Figuren vorhanden.

[0053] **Fig.** 23: Eine typische Standardkurve, die unter Verwendung des unten im Abschnitt 18.1 beschriebenen Verfahrens erhalten wurde. Eine Standardkurve, wie diese, wurde in der auch unten im Abschnitt 18.1 beschriebenen Lysozym-Chitinase-Untersuchung verwendet.

[0054] **Fig.** 24: p-GlcNAc Lysozymverdau-Daten. Die hier dargestellte Kurve zeigt die Anhäufung von N-Acetylglucosamin im Verlauf der Zeit, wenn die p-GlcNAc-Membranen mit Lysozym verdaut werden. Die Kurve vergleicht die Abbaurate von vollständig acetyliertem p-GlcNAc zu teilweise (50 %) deacetyliertem p-GlcNAc und zeigt, dass die Abbaurate für das teilweise deacetylierte p-GlcNAc wesentlich höher war als das des vollständig acetylierten p-GlcNAc-Materials.

[0055] **Fig.** 25: p-GlcNAc Lysozymverdau-Daten. Die hier dargestellte Kurve zeigt die Anhäufung von N-Acetylglucosamin im Verlauf der Zeit, wenn die p-GlcNAc-Membranen mit Lysozym verdaut werden. Die Kurve vergleicht die Abbaurate von zwei teilweise deacetylierten p-GlcNAc-Membranen (insbesondere eine zu 25% und eine zu 50 % deacetylierte p-GlcNAc-Membran). Die Daten zeigen, dass die Abbaurate steigt, wenn die prozentuale Deacetylierung steigt, wobei die Abbaurate für die zu 50 % deacetylierte p-GlcNAc-Membran wesentlich höher ist als die zu 25 % deacetylierte p-GlcNAc-Membran.

[0056] **Fig.** 26A–26E: Daten für die biologische Abbaubarkeit von p-GlcNAc in vivo. Die **Fig.** 26A–26C zeigen Ratten, denen eine Membran vom Prototyp 1 (vollständig acetyliertes p-GlcNAc) abdominal implantiert worden war, wie unten im Abschnitt 18.1 beschrieben. Die **Fig.** 26A zeigt eine Ratte am Tag 0 der Implantation; die **Fig.** 26B zeigt eine Ratte am Tag 14 nach der Implantation; die **Fig.** 26C zeigt eine Ratte am Tag 21 nach der Implantation. Die **Fig.** 26D–26E zeigen Ratten, denen der Prototyp 3A (lyophilisiert und teilweise deacetylierte p-GlcNAc-Membran) abdominal implantiert worden war, wie unten im Abschnitt 18.1 beschrieben. Die **Fig.** 26D zeigt eine Ratte am Tag 0 der Implantation; die **Fig.** 26E zeigt eine Ratte am Tag 14 nach der Implantation.

[0057] **Fig.** 27: Die hier gezeigte Kurve veranschaulicht Daten, die den prozentualen Anstieg der Tumorgröße von Tieren zeigt, die entweder nicht behandelt wurden (●) oder mit p-GlcNAc-Lactat/5'-Fluorouracil (FU) (O) behandelt wurden wie unten im Abschnitt 20.1 beschrieben.

[0058] **Fig.** 28: Die hier gezeigte Kurve veranschaulicht Daten, die den prozentualen Anstieg der Tumorgröße von Tieren veranschaulicht, die entweder nur p-GlcNAc-Lactat allein erhielten (●) oder -GlcNAc-Lactat/5'-fluorouracil (FU) (O) erhielten, wie unten im Abschnitt 20.1 beschrieben.

[0059] **Fig.** 29: Die hier gezeigte Kurve veranschaulicht Daten, die den prozentualen Anstieg der Tumorgröße von Tieren betreffen, die entweder nicht behandelt wurden (●) oder -GlcNAc-Lactat/Mitomycin (mito) (O) erhielten, wie unten im Abschnitt 20.1 beschrieben.

[0060] **Fig.** 30: Die hier gezeigte Kurve veranschaulicht Daten, die den prozentualen Anstieg der Tumorgröße von Tieren betreffen, die entweder nur p-GlcNAc-Lactat erhielten (●) oder -GlcNAc-Lactat/5'-Mitomycin (mito) (O) erhielten wie unten im Abschnitt 20.1 beschrieben.

[0061] **Fig.** 31: Das hier gezeigte Balkendiagramm veranschaulicht die durchschnittliche prozentuale Änderung der Tumorgröße pro Tier von Tieren, die mit p-GlcNAc/5'FU in hoher Dosis (Balken 1), p-GlcNAc/5'FU niedrige Dosis (Balken 2), p-GlcNAc-Membran allein (Balken 3) behandelt und nicht behandelt (Balken 4) wurden. N=4 für die Balken 1 und 2, n=2 für die Balken 3 und 4.

5. AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0062] Zuerst wird nachfolgend eine Beschreibung der physikalischen Merkmale der erfindungsgemäßen gereinigten p-GlcNAc-Art, der p-GlcNAc-Derivate und ihrer Umformulierungen gegeben. Als Nächstes werden Verfahren zur Reinigung von erfindungsgemäßen p-GlcNAc-Arten aus Mikroalgen, vorzugsweise Kieselalge, als Ausgangsquellen beschrieben. Drittens werden Derivate und Umformulierungen von p-GlcNAc und Verfahren zur Herstellung von solchen Derivaten und Umformulierungen dargestellt. Schließlich werden Verwendungen für erfindungsgemäße p-GlcNAc, p-GlcNAc-Derivate und/oder p-GlcNAc-Umformulierungen dargestellt.

5.1 p-GlcNAc

[0063] Bei der erfindungsgemäßen p-GlcNAc-Polysaccharid-Art handelt es sich um ein Polymer mit hohem Molekulargewicht im Bereich vom Gewichtsmittel von etwa 800.000 Dalton bis etwa 30 Millionen Dalton, auf der Grundlage der Gelpermeationschromatographiemessungen. Ein solcher Molekulargewichtsbereich stellt eine p-GlcNAc-Art mit etwa 4.000 bis etwa 150.000 N-Acetylglucosaminmonosaccharide dar, die in einer ß-1→4-Konfiguration angelagert sind, wobei etwa 4.000 bis etwa 15.000 N-Acetylglucosaminmonosaccharide bevorzugt sind (**Fig.** 1).

[0064] Die Veränderlichkeit des erfindungsgemäßen p-GlcNAc ist sehr gering und seine Reinheit ist sehr hoch, wobei beide durch chemische und physikalische Kriterien bewiesen werden. Darunter fallen die chemische Zusammensetzung und Nicht-polysaccharid-Verunreinigungen. Zuerst werden die Daten der chemischen Zusammensetzung für das p-GlcNAc, das unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Reinigungsverfahren hergestellt wurde, die beide unten im Abschnitt 5.3 beschrieben sind, unten in der Tabelle I gezeigt. Wie zu sehen ist, liegt die chemische Zusammensetzung des durch beide Verfahren hergestellten p-GlcNAc in demselben Rahmen des Versuchsfehlers wie die Formelzusammensetzungen von p-GlcNAc. Zweitens ist, wie auch in der Tabelle I gezeigt ist, das produzierte p-GlcNAc frei von nachweisbaren Proteinverunreinigungen, im Wesentlichen frei von anderen organischen Verunreinigungen, wie beispielsweise freien Aminosäuren, und ist im Wesentlichen frei von anorganischen Verunreinigungen, wie beispielsweise Asche und Metallionen (das erfindungsgemäße p-GlcNAc kann bis zu etwa 0,05 % Spurenmetalle enthalten). Weiter zeigt das erfindungsgemäße p-GlcNAc einen sehr niedrigen Prozentsatz an gebundenem Wasser.

TABELLE 1

CHEMISCHE ANALYSEDATEN (Gew.-%)

Theoretische Werte für ein reines p-GlcNAc:

Kohlenstoff	-	47,29
Wasserstoff	-	6,40
Stickstoff	-	6,89
Sauerstoff	-	39,41
Protein	-	0,00

Versuchsdaten auf p-GlcNAc-Matten:
(wobei die Zahl der Versuchsansätze für jeden Membrantyp größer als 30 für jeden Membrantyp ist)

	VERFAHREN MITTELS MECHANISCHER KRAFT		CHEMISCHES/BIOLOGISCHES VERFAHREN	
	Normiert [1]	% Abweich.	Normiert [1]	% Abweichung
Kohlenstoff	47,21 ± 0,08	-0,17	47,31 ± 0,11	+0,04
Wasserstoff	6,45 ± 0,08	+0,78	6,34 ± 0,08	-0,94
Stickstoff	6,97 ± 0,18	+0,87	6,94 ± 0,16	+0,73
Sauerstoff	39,55 ± 0,36	+0,36	39,41 ± 0,10	0,00

	Durchschnittliche Werte	durchschnittliche Werte
Protein	0,00	0,00
Asche	1,30	0,98
Feuchtigkeit	2,0	1,2

---

1 unaufbereitete Analysedaten sind normiert worden, um den Asche- und Feuchtigkeitsgehalt der Proben zu ergeben.

[0065] Das reine erfindungsgemäße p-GlcNAc zeigt ein Kohlenhydratanalyseprofil, das im Wesentlichen ähnlich dem in der **Fig.** 2 gezeigten ist. Das primäre Monosaccharid des reinen erfindungsgemäßen p-GlcNAc

ist N-Acetylglucosamin. Weiter enthält das reine erfindungsgemäße p-GlcNAc kein Monosaccharidglucosamin.

[0066] Der Zirkulardichroismus (CD) und die scharfen Infrarotspektren (IR) des erfindungsgemäßen p-GlcNAc sind in den **Fig.** 3A bzw. den **Fig.** 4A und 4D gezeigt, die Materialanalysen vorstellen, welche unter Verwendung der unten im Abschnitt 5.3 beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Solche physikalischen Daten bestätigen, dass das efindungsgemäße p-GlcNAc von hoher Reinheit und Kristallinität ist. Die Verfahren, die zum Erzielen der CD- und IR-Daten verwendet werden, sind unten im Arbeitsbeispiel im Abschnitt 6 beschrieben.

[0067] Die NMR-Analyse des reinen erfindungsgemäßen p-GlcNAc zeigt ein Muster, das im Wesentlichen ähnlich dem in den **Fig.** 5A, 5B, 18A und 18B veranschaulichten ist. Ein solches NMR-Muster zeigt nicht nur Daten, die mit dem erfindungsgemäßen p-GlcNAc übereinstimmen, das ein vollständig acetyliertes Polymer ist, sondern veranschaulicht auch das Fehlen eines verunreinigenden organischen Stoffs in der p-GlcNAc-Art.

[0068] Der elektronenmikrografische Aufbau des erfindungsgemäßen p-GlcNAc, wie es unter Verwendung der unten im Abschnitt 5.3 beschriebenen Verfahren und unten im Abschnitt 8 und 9 in den Arbeitsbeispielen gezeigten Verfahren hergestellt wird, wird in **Fig.** 6A bis **Fig.** 9E gezeigt.

[0069] Das erfindungsgemäße p-GlcNAc zeigt einen hohen Grad an Biokompatibilität. Die Biokompatibilität kann durch eine Vielzahl von Techniken bestimmt werden, die solche Verfahren, wie den Elutionstest, die intramuskuläre Implantation oder inkutane oder systemische Injektion an Tieren einschließt, aber nicht darauf beschränkt ist. Kurz gesagt ist ein Elutionstest (U.S. Pharmacopeia XX!!, 1990, Seite 1415–1497; U.S. Pharmacopeia XXII, 1991, Ergänzung 5, Seite 2702–2703) so konstruiert, dass die Biokompatibilität von Testgegenstandextrakten bewertet wird, und untersucht die biologische Reaktionsfähigkeit einer Säugetierkulturlinie, die gegenüber extrahierbaren cytotoxischen Gegenständen (wie beispielsweise der L929-Zelllinie) in Ansprechung auf den Testgegenstand empfindlich ist. Das Arbeitsbeispiel, das unten im Abschnitt 10 dargestellt ist, zeigt die hohe Biokompatibilität des erfindungsgemäßen p-GlcNAc.

5.2 VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON MIKROALGENQUELLEN VON p-GlcNAc

5.2.1 MIKROALGENQUELLEN VON p-GlcNAc

[0070] Das erfindungsgemäße p-GlcNAc wird mittels Mikroalgen, vorzugsweise Kieselalgen, hergestellt und kann davon gereinigt werden. Die Kieselalgen von mehreren Gattungen können als p-GlcNAc-Ausgangsquellen verwendet werden. Jede dieser Kieselalgen erzeugt Fasern, die aus p-GlcNAc zusammengesetzt sind, die sich von ihren Zellkörpern aus erstrecken. Siehe die **Fig.** 12A–12B bezüglich der Fotoaufnahmen von solchen Kieselalgen. Die Kieselalgen, die als Ausgangsquellen zur Herstellung des erfindungsgemäßen p-GlcNAc verwendet werden können, umfassen Mitglieder der Coscinodiscus-Gattung, der Cyclotella-Gattung und der Thalassiosira-Gattung, wobei die Thalassiosira-Gattung bevorzugt ist, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0071] Von der Coscinodiscus-Gattung umfassen die Arten von Kieselalge, die zur Herstellung von erfindungsgemäßem p-GlcNAc verwendet werden können, die Concinnus- und Radiatus-Art, sind aber nicht darauf beschränkt. Die Kieselalgen der Cyclotella-Gattung, die verwendet werden können, umfassen die Caspia-, Cryptica- und Meneghiniana-Art, sind aber nicht darauf beschränkt. Die Thalassiosira-Kieselalgen, die zur Herstellung des Ausgangsmaterials für das efindungsgemäße p-GlcNAc verwendet werden können, umfassen die Nitzschoides-, Aestivalis-Antarctica-, Deciphens-, Eccentrica-, Floridana-, Fluviatilis-, Gravida-, Guillardii-, Hyalina-, Minima-, Nordenskioldii-, Oceanica-, Polychorda-, Pseudonana; Rotula-, Tubifera-, Tumida- und Weissflogii-Arten, sind aber nicht darauf beschränkt, wobei die Fluviatilis- und Weissflogii-Art bevorzugt sind.

[0072] Kieselalgen, wie beispielsweise die oben beschriebenen, können zum Beispiel aus der Kultursammlung des Bigelow Laboratory for Ocean Sciences, Center for Collection of Marine Phytoplankton (McKown Point, West Boothbay Harbor, Maine, 04575, USA), erhalten werden.

5.2.2 VERFAHREN ZU WACHSENLASSEN VON KIESELALGEN

[0073] Jede der oben im Abschnitt 5.2.1 beschriebenen Verfahren können zum Beispiel unter Verwendung der in diesem Abschnitt beschriebenen Verfahren wachsen gelassen werden. Neue Kieselalgenkulturen werden durch Beimpfen von Nährmedium unter sterilen Bedingungen mit einem Aliquot einer reifen Kieselalgenkultur angeregt. Das Nährmedium muss frei von allen anderen Mikroorganismen sein, und daher müssen alle

Materialien, einschließlich Wasser, organische Komponenten und anorganische Komponenten, die zur Herstellung des Nährmediums verwendet werden, steril sein. Darüber hinaus, ist es obligatorisch, dass alle Verfahren, die in diesem Vorgang eingeschlossen sind, unter streng sterilen Bedingungen durchgeführt werden, d.h. alle Behälter, jede Substanzübertragung von einem Gefäß zu einem anderen usw. sind in einer sterilen Umgebung durchzuführen. Die Menge des auf einmal herzustellenden Nährmediums sollte nicht die Menge, die zum Beginnen einer neuen Kultur notwendig ist, überschreiten. Zum Beispiel können Fernbach-Kolben, die eine Oberfläche von etwa einen Quadratfuß (929 cm^2) haben, als Gefäße für die Kieselalgenkulturen verwendet werden, und solche Gefäße erfordern für ein optimales Wachstum des Kieselalgenorganismus einen Liter Nährmedium.

[0074] Die Herstellung von Nährmedium umfasst die folgenden Vorgänge:

a) Anschaffung und Verarbeitung von Meerwasser,
b) Herstellung von destilliertem und entionisiertem Wasser,
c) Herstellung von primären Nährstoff-Ansatz,
d) Herstellung von Nährstoff-Arbeitsansatz,
e) Herstellung des endgültigen Nährmediums.

[0075] Filtriertes Meerwasser kann zum Beispiel vom Marine Biology Laboratory (Woods Hole, Massachusetts, USA) erhalten werden. Meerwasserbehälter sollten bei 5°C gelagert werden. Falls erforderlich kann das notwendige Wasservolumen durch eine Buchner Filtrationseinheit filtriert werden, und zwar unter Verwendung einer Nitrocellulosefiltermembran mit einer Porengröße von 0,45 µm (Millipore, Inc.). Das Meerwasser wird dann in einem Autoklav zum Beispiel bei 121 °C 15 Minuten lang pro Liter sterilisiert. Nach Beendigung des Sterilisationsverfahrens werden die verschlossenen Behälter sofort gekühlt, vorzugsweise durch Befördern in einen kalten Raum, in dem die Lösungen eine Temperatur von etwa 5°C erreichen können. Zur Verwendung kann man die Lösungen auf Raumtemperatur bringen.

[0076] Leitungswasser wird destilliert und unter Verwendung einer Standardapparatur und Standardverfahren entionisiert und gesammelt sowie in sterilen, zuverlässig verschlossenen Behältern, vorzugsweise aus Glas, gelagert.

[0077] Nachfolgend sind Formeln angegeben, an die man sich zur Herstellung der Ansatzlösungen, die zur Herstellung des Nährmediums notwendig sind, halten kann. Es wird davon ausgegangen, dass, obwohl solche Formeln als Richtlinie verwendet werden sollen, routinemäßige Variationen von solchen Formeln, die zur Herstellung einer Nährmediums beitragen, das ein Mikroalgen-Diatomeenwachstum unterhalten kann, das für die präparativen, hier beschriebenen p-GIcNAc-Verfahren ausreicht, auch im Rahmen der vorliegenden Erfindung liegen sollen.

I. Spurenmetall-Pimäransätze (TMPS)

a. 39 mM $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (Kupfer(II)-sulfatpentahydrat) (9,8 g Kupfer(II)-sulfat/Liter)
b. 7,5 mM $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (Zinksulfatheptahydrat) (22 g Zinksulfat/Liter)
c. 42 mM $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (Cobalt(II)-chloridhexhydrat) (10 g Cobalt(II)-chlorid/Liter)
d. 91 mM $MnCL_2 \cdot 4H_2O$ (Mangan(II)-chloridtetrahydrat) 18 g Mangan(II)-chlorid/Liter)
e. 26 mM $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ (Natriummolybdatdihydrat) 6,3 g Natriummolybdat/Liter)
f. 153,5 mM H_2SeO_3 (Selenigsäure) (12,9 g Selenigsäure/Liter).

[0078] Jeden Nährstoff mit einem Filter mit einer Porengröße von nicht mehr als 0,2 mm steril filtrieren.

II. Vitamin-Primäransätze (VPS)

a. 1 mg/ml Vitamin B12
b. 0,1 mg/ml Biotin

[0079] Beide Ansätze mit einem Filter mit einer Porengröße von nicht mehr als 0,2 mm steril filtrieren.

III. Natriumsalz-Arbeitsansätze (SSWS)

a. Natriumnitrat-Arbeitsansatz: 0,88 M (75 g $NaNO_3$/Liter)
b. Natriumphosphat-monobasischer Monohydrat-Arbeitsansatz: 36,2 mM $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ (5 g

$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$/Liter)
c. Natriummetasilicatnonahydrat-Arbeitsansatz: 0,11 M $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ (30 g $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$/Liter)

[0080] Jeden der SSWS mit einem Filter mit einer Porengröße von nicht mehr als 0,2 mm steril filtrieren.

IV. Spurenmetall-Arbeitsansätze (TMWS)

11,7 mM Na_2EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalzdihydrat) 4,36 g/Liter)
11,7 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Eisen(III)-chloridhexahydrat (3,15 g/Liter)

[0081] 1 ml/l von jedem der oben angeführten sechs primären Spurenmetallansätze. Mit einem Filter mit einer Porengröße von nicht mehr als 0,2 mm steril filtrieren. Es ist zu beachten, dass der Spurenmetall-Arbeitsansatz jedes Mal neu hergestellt werden muss, wenn ein neues Nährmedium zusammengesetzt wird.

V. Vitamin-Arbeitsansatz (VWS)

1,0 µg/ml Biotin (1,0 ml primärer Biotinansatz/100 ml)
1,0 µg/ml Vitamin B12 (0,1 ml Vitamin B12 primärer Ansatz/100 ml)
20 mg Thiamin-HCl (Thiaminhydrochlorid/100 ml).

[0082] Mit einem Filter mit einer Porengröße von nicht mehr als 0,2 mm steril filtrieren. Es ist zu beachten, dass ein neuer Vitamin-Arbeitsansatz jedes Mal neu hergestellt werden sollte, wenn ein neues Nährmedium zusammengesetzt wird.

[0083] Es werden nachfolgend Verfahren beschrieben, denen zur Herstellung von Nährmedium und Kultivierung von Kieselalgen gefolgt werden kann. Es wird davon ausgegangen, dass zusätzlich zu diesen Verfahren jede routinemäßige Variation in den Formeln und/oder hier beschriebenen Verfahren, die zu einem Nährmedium führen, und in Verfahren, die das Kieselalgenwachstum für die präparativen, hier beschriebenen Verfahren in ausreichendem Maß unterhalten können, im Rahmen der vorliegenden Erfindung liegen soll.

[0084] Das Nährmedium kann zum Beispiel wie folgt hergestellt werden: Zu jedem Liter filtriertem und sterilisiertem Meerwasser kann 1 ml $NaNO_3$-Arbeitsansatz, 1 ml $NaH_2PO4 \cdot H_2O$-Arbeitsansatz, 1 ml Spurenmetall-Arbeitsansatz und 1 ml $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$-Arbeitsansatz gegeben werden. Gleichzeitig mit der Zugabe von $Na_2SiO_3 \cdot 9H_2O$ können 2 ml 1 N HCl zugesetzt werden, und die Lösung kann zu einem Gemisch verschüttelt werden. Als Nächstes kann 1,5 ml 1 N NaOH zugesetzt werden, und die Lösung kann wieder zu einem Gemisch verschüttelt werden. Schließlich können 0,5 ml Vitamin-Arbeitsansatz zugegeben werden.

[0085] Um eine neue Kieselalgenkultur wachsen zu lassen, können 7 ml einer reifen Kultur (mit eine Zelldichte von ungefähr 1×10^5 Zellen/ml) auf einen sterilen Behälter mit 100 ml sterilem Nährmedium übertragen werden, das nach den oben beschriebenen Verfahren hergestellt werden kann. Die beimpfte Kultur kann dann 8 Tage lang unter den folgenden Bedingungen inkubiert werden:

Temperatur: 20 Grad Celsius
Konstante Beleuchtung.
Rühren: sanftes Herumwirbeln der Kolben einmal 2 oder 3 Sekunden lang jeden Morgen und jeden Abend.

[0086] Nach 8 Tagen Inkubation können 80 ml dieser inkubierten Kultur unter sterilen Bedingungen auf 1000 ml Nährmedium übertragen werden, das zum Beispiel in einem 2,8 l Fernbach-Kolben enthalten sein kann, geschützt durch einen Baumwollstopfen, welcher mit einem Baumwollstoff bedeckt ist. Eine solche Kultur kann inkubieren und bis zu der gewünschten Zelldichte wachsen gelassen werden oder kann alternativ dazu verwendet werden, neue Kieselalgenkulturen zu beimpfen. Sobald eine Kultur eine gewünschte Zelldichte erreicht, können die p-GlcNAc-Fasern der Kultur geerntet werden und das erfindungsgemäße p-GlcNAc kann unter Verwendung von Verfahren, wie beispielsweise den unten im Abschnitt 5.3 beschriebenen, gereinigt werden.

[0087] CO_2 kann in der Kulturlösung gelöst werden, um einen Kultur-pH-Wert von ungefähr 7 bis 8 aufrechtzuerhalten, wobei ungefähr 7,4 bevorzugt ist. Das Aufrechterhalten einer solchen neutralen pH-Umgebung erhöht stark die p-GlcNAc-Ausbeute, die von jeder Kieselalgenkultur erhalten werden kann.

5.3 VERFAHREN ZUR ISOLATION, REINIGUNG UND KONZENTRATION VON p-GlcNAc-FASERN

[0088] In diesem Abschnitt werden Verfahren vorgestellt, die zur Herstellung von p-GlcNAc-Fasern aus Kieselalgenkulturen, wie beispielsweise den oben im Abschnitt 5.2 beschriebenen, verwendet werden können.

[0089] Während jede der unten beschriebenen Verfahren zur Reinigung von p-GlcNAc aus Mikroalgen, vorzugsweise Kieselalgen, als Ausgangsquellen sehr reines, unverfälschtes, kristallines p-GlcNAc erzeugt, erhält man mit jedem der Verfahren ein p-GlcNAc mit spezifischen Merkmalen und vorteilhaften Eigenschaften. Zum Beispiel erzeugt das erfindungsgemäße p-GlcNAc, das mit dem Verfahren mittels mechanischer Kraft gereinigt wird, das unten im Abschnitt 5.3.1 vorgestellt ist, eine p-GlcNAc-Membran, die ein überragendes Substrat zum Anlagern von Zellen an das p-GlcNAc zur Verfügung stellt. Das zweite Verfahren, das unten im Abschnitt 5.3.2 beschrieben ist, das chemische/biologische Verfahren, erzeugt eine viel höhere durchschnittliche Ausbeute als es die durchschnittliche p-GlcNAc-Ausbeute ist, die durch das Verfahren mittels mechanischer Kraft erhalten wird. Darüber hinaus erzeugt die Säurebehandlungs/Neutralisationsvariation, die als Teil des chemischen/biologischen Verfahrens unten im Abschnitt 5.3.2 beschrieben ist, extrem lange p-GlcNAc-Fasern, wobei einige Fasern über 100 um aufweisen, mit sehr hohem Molekulargewicht von bis zu 20–30 Millionen Dalton.

5.3.1 VERFAHREN MITTELS MECHANISCHER KRAFT ZUR HERSTELLUNG VON REINEM p-GlcNAc

[0090] Die p-GlcNAc-Fasern können von den Kieselalgen-Zellkörpern durch Unterwerfen des Kulturinhalts einer geeigneten mechanischen Kraft getrennt werden. Eine solche mechanische Kraft kann eine Scherkraft, die zum Beispiel durch eine Kolloidmühle, ein Ultraschallgerät oder einen Blasengenerator erzeugt wird, oder eine Schneidkraft, die zum Beispiel durch einen Waring-Mischer erzeugt wird, umfassen.

[0091] Die sich ergebende Suspension von Kieselalgen-Zellkörpern und p-GlcNAc-Fasern werden dann getrennt. Zum Beispiel kann die Suspension einer Reihe von Zentrifugierungsschritten unterworfen werden, die die p-GlcNAc-Fasern von den Zellkörpern trennen, was zu einem klaren Überstand führt, der wenig, wenn überhaupt, sichtbares Flockungsmaterial zeigt. Ein Winkelrotor und eine Temperatur von etwa 10°C sind für die Zentrifugierungsschritte bevorzugt. Die Drehzahl, Dauer und Gesamtzahl der erforderlichen Zentrifugierungsschritte kann variieren, zum Beispiel je nach dem verwendeten Zentrifugationsrotor, aber die Festlegung der Werte für solche Parameter ist dem Fachmann klar.

[0092] Die p-GlcNAc-Fasern in dem Überstand können dann unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren konzentriert werden. Solche Verfahren können Saug- und Filtrationseinrichtungen aufweisen, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0093] Schließlich werden die konzentrierten p-GlcNAc-Fasern zum Beispiel mit destilliertem entionisierten Wasser, HCl und Ethanol oder anderen geeigneten Lösungsmitteln, vorzugsweise Lösungsmitteln, wie beispielsweise Alkoholen, in denen sich sowohl organische als auch anorganische Materialien lösen, gewaschen.

[0094] Das unten im Abschnitt 7 vorgestellte Arbeitsbeispiel zeigt die Anwendung dieses Verfahrens zur Reinigung von p-GlcNAc.

5.3.2 CHEMISCHES/BIOLOGISCHES VERFAHREN ZUR REINIGUNG VON p-GlcNAc

[0095] Bei diesem Verfahren werden die p-GlcNAc-Fasern von den Kieselalgen-Zellkörpern getrennt, indem sie chemischen und/oder biologischen Mitteln unterworfen werden, wie nachfolgend näher beschrieben ist.

[0096] Kieselalgenkulturen können mit einer Chemikalie behandelt werden, die die Zellwände der Kieselalge schwächen kann, was zu einem Freisetzen der p-GlcNAc-Fasern führt, ohne dass ihr Aufbau geändert wird. Eine solche Chemikalie kann Flusssäure (HF) umfassen, ist aber nicht darauf beschränkt. Alternativ kann eine reife Kieselalgenkultur mit einem biologischen Mittel behandelt werden, das in der Lage ist, ein biologisches Verfahren zu ändern, das dazu verwendet werden kann, eine p-GlcNAc-Fasersynthese zu verhindern, und so die bereits vorhandenen Fasern freizusetzen. Zum Beispiel kann ein solches Mittel Polyoxin-D, einen Inhibitor des Enzyms N-Acetylglucosaminyl-P-transferase, aufweisen, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0097] Die Zellkörper und p-GlcNAc enthaltenden Fasern der Kieselalgenkulturen, die mit einem Bestandteil der oben beschriebenen chemischen oder biologischen Mittel behandelt sind, werden dann getrennt. Zum Beispiel kann man den Inhalt von behandelten Kieselalgenkulturen sich setzen lassen, so dass der Inhalt der Kulturen zwei unterschiedliche Schichten bilden kann. Die obere Schicht enthält hauptsächlich die p-GlcNAc-Fa-

sern, während die untere Schicht die Zellkörper enthält. Die obere p-GlcNAc-Fasern enthaltende Schicht kann abgehebert werden, wobei das abgesetzte Zellmaterial der unteren Schicht zurückbleibt.

[0098] Die abgeheberte p-GlcNAC-Fasern enthaltende Schicht kann dann weiter gereinigt werden, um Protein und andere nicht erwünschte Teilchen durch Behandeln mit einem Detergens, das die p-GlcNAc-Fasern nicht zerstört, zu entfernen. Ein solches Detergens kann Natriumdodecylsulfat (SDS) aufweisen, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0099] Wenn die Säurebehandlung, wie beispielsweise die HF-Behandlung, dazu verwendet wird, um p-GlcNAc-Fasern von Kieselalgen-Zellkörpern zu trennen, kann ein Schritt zur Ausbreitung der Fasern mit aufgenommen werden. Ein solcher Schritt kann die Verwendung von mechanischer Kraft für die Faserausbreitung umfassen, wie beispielsweise einen Schritt, bei dem die Fasern einer Waring-Mischer-Ausbreitung unterworfen werden, ist aber nicht darauf beschränkt.

[0100] Alternativ kann die mit Säure behandelte Suspension in einem wahlweisen Schritt vor einer weiteren Reinigung durch Behandlung mit Detergenzien neutralisiert werden. Eine solche Neutralisation wird im Allgemeinen den pH-Wert der Suspension von etwa 1,8 auf etwa 7,0 ändern und kann zum Beispiel durch den Zusatz eines geeigneten Volumens an 1 M Tris (pH 8,0) oder den Zusatz eines geeigneten Volumens an Natriumhydroxid (NaOH) erzielt werden. Die Neutralisation liefert im Allgemeinen reine pGlcNAc-Fasern mit einer wesentlich größeren Länge als die anderen hier erörterten Reinigungsverfahren.

[0101] Die gereinigten pGlcNAc-Fasern können unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren konzentriert werden, wie beispielsweise durch Verwendung einer Saug- und Filtrationseinrichtung. Schließlich werden die p-GlcNAc-Fasern in einer Reihe von Schritten mit destilliertem, deionisiertem Wasser, HCl und Ethanol oder anderen geeigneten Lösungsmitteln, vorzugsweise Lösungsmitteln, wie beispielsweise Alkoholen, in denen sich sowohl organische als auch anorganische Materialien lösen, gewaschen.

[0102] Das unten im Abschnitt 8 angeführte Arbeitsbeispiel zeigt die erfolgreiche Anwendung eines solchen Reinigungsverfahrens.

5.4 Derivatisierung von pGlcNAc

[0103] Das reine, vollständig acetylierte, erfindungsgemäße p-GlcNAc kann unter Verwendung einer Vielzahl von kontrollierten Zuständen und Verfahren in eine Vielzahl unterschiedlicher Verbindungen derivatisiert werden. Siehe **Fig.** 13 bezüglich eines Schemas, das einige dieser Verbindungen zeigt. Solche derivatisierten Verbindungen können teilweise oder vollständig deacetyliertes pGlcNAc, das mittels chemischer und/oder enzymatischer Mittel, wie unten näher beschrieben, modifiziert wurde, aufweisen, sind aber nicht darauf beschränkt.

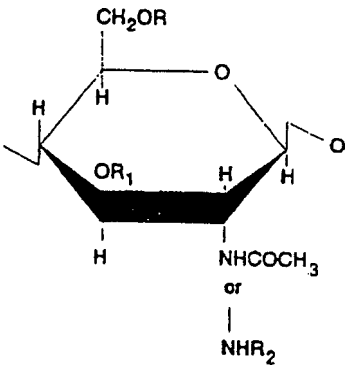
[0104] Darüber hinaus kann p-GlcNAc oder sein deacetyliertes Derivat durch Sulfatierung, Phosphorylierung und/oder Nitrierung derivatisiert werden. Weiter können, wie unten näher ausgeführt ist, O-Sulfonyl, N-Acyl, O-Alkyl, N-Alkyl, Deoxyhalogen und N-Alkyliden und N-Aryliden und andere Derivate aus dem p-GlcNAc oder deacetylierten p-GlcNAc der Erfindung hergestellt werden. Das deacetylierte, erfindungsgemäße p-GlcNAc kann auch dazu verwendet werden, eine Vielzahl von organischen Salzen und/oder Metallchelaten herzustellen. Weiter kann das erfindungsgemäße p-GlcNAc oder eines seiner Derivate entweder kovalent oder nicht kovalent eines aus einer Vielzahl von Molekülen angelagert haben. Außerdem kann das erfindungsgemäße p-GlcNAc oder eines seiner Derivate kontrollierten Hydrolysebedingungen unterworfen werden, die Molekülgruppen mit einheitlichen und definierten Molekulargewichtseigenschaften ergeben.

[0105] Eine oder mehrere Monosaccharideinheiten des erfindungsgemäßen p-GlcNAc können deacetyliert sein, um eine Poly-ß-1→4-N-glucosamin-Art zu bilden. Eine Poly-ß-1→4-N-glucosamin-Art der Erfindung, bei der jede der Monosaccharideinheiten der Poly-ß-1→4-N-acetylglucosamin-Art der Erfindung deacetyliert wurde, hat ein Molekulargewicht von etwa 640.000 Dalton bis etwa 24 Millionen Dalton, wobei etwa 640.000 Dalton bis etwa 2,4 Millionen Dalton bevorzugt sind. Eine Art mit einem solchen Molekulargewichtsbereich stellt eine Art dar, die etwa 4.000 bis etwa 150.000 Glucosaminmonosaccharide kovalent in einer ß-1→4-Konfiguration angelagert hat, wobei etwa 4.000 bis etwa 15.000 Glucosaminmonosaccharide bevorzugt sind. Mindestens eines der Monosaccharideinheiten der Poly-ß-1→4-N-glucosamin-Art kann acetyliert bleiben, wobei etwa 25 % bis etwa 75 % Acetylierung bevorzugt sind und etwa 30 % Acetylierung besonders bevorzugt sind.

[0106] Das erfindungsgemäße p-GlcNAc kann durch Behandlung mit einer Base deacetyliert werden, um

Glucosamine mit freien Aminogruppen zu ergeben. Dieses Hydrolyseverfahren kann mit Lösungen von konzentriertem Natriumhydroxid oder Kaliumhydroxid bei erhöhten Temperaturen durchgeführt werden. Um das Ausmaß der Deacetylierung genau zu steuern und einen Abbau der Haupt-Kohlenhydratkette des Polysaccharidmoleküls zu verhindern, ist es aber bevorzugt, dass ein enzymatisches Verfahren, das ein Chitindeacetylaseenzym verwendet, für die p-GlcNAc-Deacylierung verwendet wird. Ein solches enzymatisches Deacetylaseverfahren ist dem Fachmann bekannt und kann wie im (US-Patent Nr. 5,219,749) durchgeführt werden, das hier durch Bezug in seiner Gesamtheit mit eingeschlossen ist.

[0107] Eine oder mehrere Monosaccharideinheiten des erfindungsgemäßen p-GlcNAc können derivatisiert werden, so dass sie mindestens eine Sulfatgruppe enthalten, oder können alternativ wie unten gezeigt phosphoryliert oder nitriert werden:



worin R und/oder R_1, anstelle eines Wasserstoffs, und/oder R_2, anstelle von $-COCH_3$, eine Sulfatgruppe ($-SHO_3$), eine Phosphatgruppe ($-P(OH)_2$) oder eine Nitratgruppe ($-NO_2$) sein können.

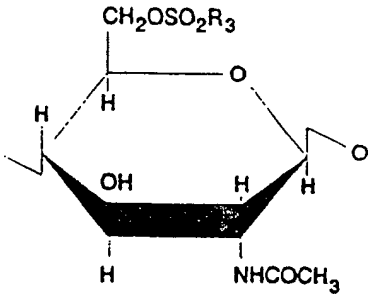
[0108] Nachfolgend werden Verfahren beschrieben, mit denen solche p-GlcNAc-Derivate hergestellt werden können. Vor dem Durchführen von Verfahren, wie beispielsweise den in diesem Abschnitt beschriebenen, kann es vorteilhaft sein, das p-GlcNAc-Ausgangsmaterial zuerst zu lyophilisieren, in flüssigem Stickstoff einzufrieren und zu pulverisieren.

[0109] Sulfatierte p-GlcNAc-Derivate können zum Beispiel in einem Zwei-Stufen-Verfahren erzeugt werden. Im ersten Schritt kann O-Carboxymethyl-p-GlcNAc aus p-GlcNAc und/oder p-GlcNAc-Derivativen der Erfindung zum Beispiel unter Verwendung von Verfahren, wie beispielsweise den von Tokura u.a. beschriebenen (Tokura, S. u.a., 1983, Polym. J. 15:485), hergestellt werden. Als zweites kann der Sulfatierungsschritt zum Beispiel mit N,N-Dimethylformamidschwefeltrioxid gemäß dem Fachmann bekannter Verfahren, wie sie beispielsweise von Schweiger (Schweiger, R.G., 1972, Carbohydrate Res. 21:219) beschrieben werden, durchgeführt werden. Das sich ergebende Produkt kann als Natriumsalz isoliert werden.

[0110] Erfindungsgemäße phosphorylierte p-GlcNAc-Derivate können zum Beispiel unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren, wie zum Beispiel den von Nishi u.a. (Nishi, N. u.a., 1986, in „Chitin in Nature and Technology, Muzzarelli u.a., Hrsg. Plenum Press, New York, Seite 297–299) beschriebenen, hergestellt werden. Kurz kann das p-GlcNAc/Methansulfonsäure-Gemisch mit Phosphorpentoxid (in einem etwa 0,5 bis 4,0 Mol Äquivalent) unter Rühren bei einer Temperatur von etwa 0°C bis etwa 5°C behandelt werden. Die Behandlung kann etwa 2 Stunden dauern. Das sich ergebende Produkt kann dann ausgefällt und unter Verwendung von Standardverfahren, die dem Fachmann bekannt sind, gewaschen werden. Zum Beispiel kann die Probe mit einem Lösungsmittel, wie beispielsweise Ether, ausgefällt, zentrifugiert, mit einem Lösungsmittel, wie beispielsweise Ether, Aceton oder Methanol gewaschen und getrocknet werden.

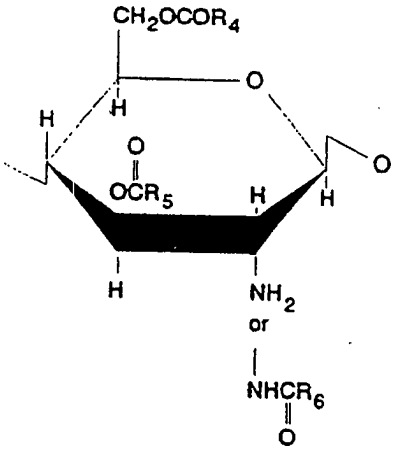
[0111] Nitrierte p-GlcNAc-Derivate können unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren, wie beispielsweise den von Schorigin und Halt (Schorigin, R. und Halt, E., 1934, Chem. Ber. 67:1712) beschriebenen, hergestellt werden. Kurz kann das p-GlcNAc und/oder ein p-GlcNAc-Derivat mit konzentrierter Salpetersäure behandelt werden, um ein stabiles nitriertes Produkt zu bilden.

[0112] Eine oder mehrere Monosaccharideinheiten des erfindungsgemäßen p-GlcNAc können eine Sulfonylgruppe enthalten, wie nachstehend veranschaulicht:



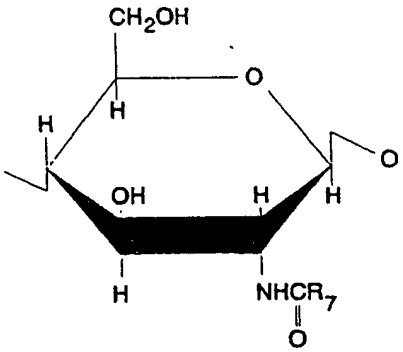
worin R_3 eine Alkyl-, eine Aryl-, eine Alkenyl- oder eine Alkynylkomponente ist. Ein solches Derivat kann durch bekannte Verfahren, wie beispielsweise das in Kurita u.a. beschriebene Verfahren (Kurita, K. u.a., 1990, Polym. Prep [Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.] 31:624–625), erzeugt werden. Kurz gesagt kann eine wässrige p-GlcNAc-Alkalilösung mit einer Chloroformlösung von Tosylchlorid reagiert werden, und die Reaktion kann dann bei niedrigen Temperaturen gleichmäßig fortschreiten gelassen werden.

[0113] Eine oder mehrere Monosaccharide des erfindungsgemäßen p-GlcNAc oder sein deacetyliertes Derivat können eine oder mehrere O-Acylgruppe enthalten, wie nachfolgend veranschaulicht:



worin R_4 und/oder R_5 anstelle des Wasserstoffs, eine Alkyl-, eine Alkenyl oder eine Alkynylkomponente sein können und R_6 eine Alkyl-, eine Alkenyl- oder eine Alkynylkomponente sein kann. Ein Beispiel für ein solches Derivat kann durch bekannte Verfahren, wie beispielsweise den von Komai (Komai, T. u.a., 1986, in „Chitin in Nature and Technology", Muzzarelli u.a., Hrsg. Plenum Press, New York, Seite 497–506) beschriebenen, gebildet werden. Kurz kann das p-GlcNAc mit einer Anzahl von geeigneten Acylchloriden in Methansulfonsäure reagiert werden, um p-GlcNAc-Derivate zu ergeben, die Caproyl-, Capryl- Lanroyl- oder Benzoylderivate aufweisen, aber nicht darauf beschränkt sind.

[0114] Eine oder mehrere Monosaccharide des erfindungsgemäßen deacetylierten p-GlcNAc kann eine N-Acylgruppe enthalten, wie nachfolgend veranschaulicht:

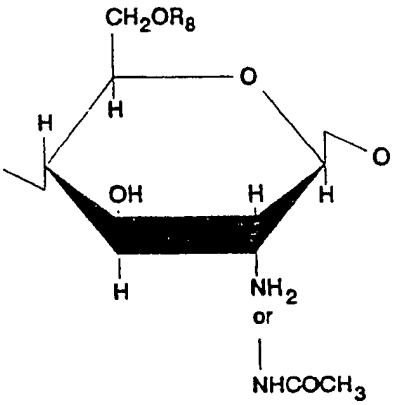


worin R_7 eine Alkyl-, eine Alkenyl- oder eine Alkynylkomponente sein kann. Eine solche Derivatisierung kann unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren, wie beispielsweise dem in Hirano u.a. beschriebenen Verfahren (Hirano, S. u.a., 1976, Carbohydrate Research 47:315–320), erhalten werden.

[0115] Deacetyliertes p-GlcNAc ist in einer Anzahl von wässrigen Lösungen von organischen Säuren löslich.

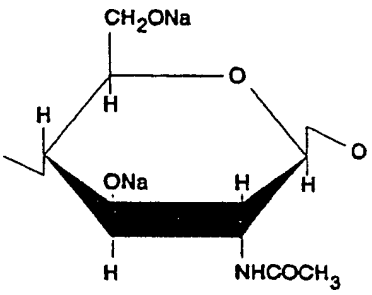
Das Hinzufügen von ausgewählten Carbonsäureanhydriden, wie beispielsweise p-GlcNAc enthaltenden Lösungen, in wässriger methanolischer Essigsäure, führt zur Bildung von N-Acyl-p-GlcNAc-Derivaten.

[0116] Eine oder mehrere Monosaccharide des erfindungsgemäßen deacetylierten p-GlcNAc oder seines deacetylierten Derivats können eine O-Alkylgruppe enthalten, wie nachfolgend veranschaulicht:



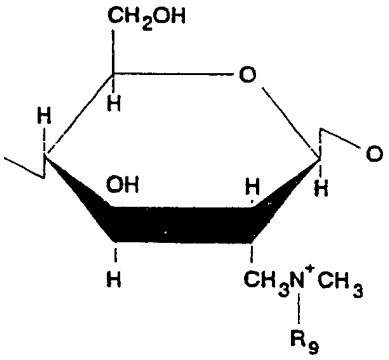
worin R_8 eine Alkyl- und eine Alkenyl- oder eine Alkynylkomponente sein kann. Eine solche Derivatisierung kann unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden, zum Beispiel dem von Maresh u.a. beschriebenen Verfahren (Maresh, G. u.a., in „Chitin and Chitosan", Skjak-Braek, G. u.a., Hrsg., 1989, Elsevier Publishing Co., Seite 389–395). Kurz gesagt kann deacetyliertes p-GlcNAc in Dimethoxyethan (DME) dispergiert werden und mit einem Überschuss an Propylenoxid reagiert werden. Die Reaktionsdauer kann 24 Stunden betragen, und die Reaktion findet in einem Autoklav bei 40 bis 90°C statt. Das Gemisch kann dann mit Wasser verdünnt und filtriert werden. Das DME kann durch Destillation entfernt werden. Schließlich kann das Endprodukt mittels Lyophilisierung isoliert werden.

[0117] Eine oder mehrere Monosaccharideinheiten des erfindungsgemäßen p-GlcNAc können ein Alkaliderivat sein, wie nachfolgend veranschaulicht:



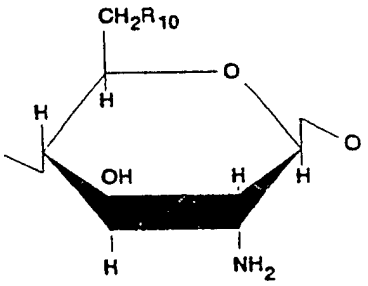
[0118] Ein solches Derivat kann unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Zum Beispiel kann ein Verfahren, wie beispielsweise das von Noguchi u.a. (Noguchi, J. u.a., 1969, Kogyo Kagaku Zasshi 72:796–799) beschriebene, verwendet werden. Kurz gesagt kann p-GlcNAc im Vakuum in NaOH (vorzugsweise 43 %) für eine Dauer von ungefähr zwei Stunden bei etwa 0°C eingeweicht werden. Überschüssiges NaOH kann dann zum Beispiel mittels Zentrifugation in einer Trommelzentrifuge und durch mechanisches Pressen entfernt werden.

[0119] Eine oder mehrere Monosaccharideinheiten des deacetylierten Derivats von p-GlcNAc nach der Erfindung kann eine N-Alkylgruppe enthalten, wie nachfolgend veranschaulicht ist:



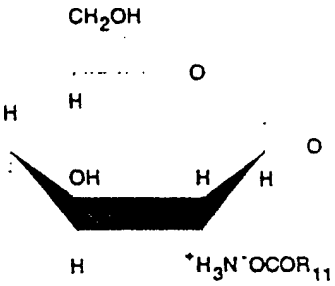
worin R_9 eine Alkyl-, eine Alkenyl- oder eine Alkynylkomponente sein kann. Eine solche Derivatisierung kann zum Beispiel unter Verwendung eines Verfahrens, wie beispielsweise dem von Maresh u.a. (Maresh, G. u.a., in „Chitin and Chitosan", Skjak-Brack,. G. u.a., Hrsg. 1989, Elsevier Publishing Co., Seite 389–395) beschriebenen, wie oben für die Herstellung von O-Alkyl-p-GlcNAc-Derivaten beschrieben, erhalten werden.

[0120] Eine oder mehrere Monosaccharideinheiten des deacetylierten Derivats des p-GlcNAc nach der Erfindung können mindestens ein Deoxyhalogenderivat enthalten, wie nachfolgend veranschaulicht:



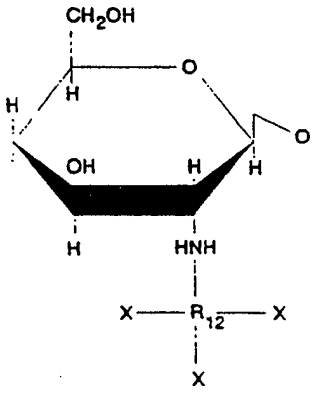
worin R_{10} F, Cl, Br oder I sein kann, wobei I bevorzugt ist. Ein solches Derivat kann unter Verwendung von Techniken erhalten werden, die dem Fachmann bekannt sind. Zum Beispiel kann ein Verfahren, wie beispielsweise das von Kurita u.a. beschriebene (Kurita, K. u.a., 1990, Polym. Prep. [Am. Chem. Soc. Div. Polym. Chem] 31:624–625), verwendet werden. Kurz gesagt wird ein tosyliertes p-GlcNAc mit einem Natriumhalogenid in Dimethylsulfoxid reagiert, was zu einem Deoxyhalogenderivat führt. Die p-GlcNAc-Toxylierung kann durch Reaktion einer wässrigen p-GlcNAc-Alkalilösung mit einer Chloroformlösung von Tosylchlorid durchgeführt werden. Eine solche Reaktion kann gleichmäßig bei niedrigen Temperaturen fortschreiten.

[0121] Eine oder mehrere Monosaccharideinheiten des deacetylierten Derivats des p-GlcNAc nach der Erfindung kann ein Salz bilden, wie nachfolgend veranschaulicht:



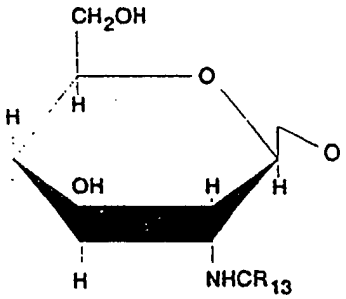
worin R_{11} eine Alkyl-, eine Alkenyl- oder eine Alkynylkomponente sein kann. Eine solche Derivatisierung kann unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Zum Beispiel kann ein Verfahren, wie beispielsweise das von Austin und Sennett beschriebene (Austin, P.R. und Sennett, S., in „Chitin in Nature and Technolgy", 1986, Muzzarelli, R.A.A. u.a., Hrsg. Plenum Press, Seite 279–286) verwendet werden. Kurz gesagt kann deacetyliertes p-GlcNAc in einem organischen Medium, wie zum Beispiel Ethylacetat oder Isopropanol, dem eine geeignete organische Säure, wie beispielsweise Ameisen-, Essig-, Glycol- oder Milchsäure zugesetzt werden kann, suspendiert werden. Das Gemisch kann für einen Zeitraum (zum Beispiel 1 bis 3 Stunden) stehen gelassen werden. Die Reaktions- und Trocknungstemperatur kann von etwa 12° bis etwa 35°C variieren, wobei 20° bis 25°C bevorzugt ist. Die Salze können dann durch Filtration getrennt, mit frischem Medium gewaschen und das restliche Medium verdampft werden.

[0122] Eine oder mehrere Monosaccharideinheiten des deacetylierten Derivats des p-GlcNAc nach der Erfindung können ein Metallchelat bilden, wie nachfolgend dargestellt:



worin R_{12} ein Metallion, insbesondere eines der Übergangsmetalle, sein kann und X die dative Bindung ist, die durch die Stickstoffelektronen erfolgt, die in den in dem deacetylierten p-GlcNAc vorkommenden Amino- und substituierten Aminogruppen vorhanden sind.

[0123] Eine oder mehrere Monosaccharideinheiten des deacetylierten Derivats des p-GlcNAc nach der Erfindung können eine N-Alkyliden- oder eine N-Arylidengruppe enthalten, wie nachfolgend dargestellt:



worin R_{13} eine Alkyl-, eine Alkenyl-, eine Alkynyl- oder eine Arylkomponente sein kann. Eine solche Derivatisierung kann unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren erhalten werden. Zum Beispiel kann ein Verfahren, wie beispielsweise das von Hirano u.a. beschriebene (Hirano, S. u.a., 1981, J. Biomed. Mat. Res. 15:903–911), verwendet werden. Kurz gesagt kann eine N-Substitutionsreaktion von deacetyliertem p-GlcNAc mit Carbonsäureanhydriden und/oder Arylaldehyden durchgeführt werden, um Acyl- und/oder Arylidenderivate zu ergeben.

[0124] Weiter kann das erfindungsgemäße p-GlcNAc oder sein deacetyliertes Derivat kontrollierten Hydrolysezuständen unterworfen werden, die Molekülgruppen mit gleichförmigen, definiertem Molekulargewicht und andere physikalische Eigenschaften ergeben. Solche Hydrolysezustände können zum Beispiel die Behandlung mit dem Enzym, Lysozym aufweisen. p-GlcNAc kann für unterschiedliche Zeitdauern dem Lysozym ausgesetzt sein, um den Umfang der Hydrolyse zu kontrollieren. Darüber hinaus kann die Hydrolyserate als Funktion des Umfangs, zu dem das p-GlcNAc, das mit Lysozym behandelt wird, deacetyliert worden ist, kontrolliert werden. Die Deacetylierungsbedingungen können wie oben in diesem Abschnitt beschrieben sein. Je vollständiger das p-GlcNAc-Molekül deacetyliert wurde, desto vollständiger wird das Molekül hydrolysiert. Änderungen der physikalischen Eigenschaften zusätzlich zu dem Verringern des Molekulargewichts können durch Hydrolyse und/oder Deacetylierungsbehandlungen hervorgerufen werden. Eine umfangreiche Hydrolyse bewirkt eine Verflüssigung von p-GlcNAc. Die Ergebnisse eines Hydrolyse/Deacetylierungs-Verfahrens sind nachfolgend in dem Arbeitsbeispiel des Abschnitts 9 dargestellt.

[0125] Weiter kann eine Wärmedenaturierung so funktionieren, dass der kristalline Aufbau von p-GlcNAc modifiziert wird. Eine solche Modifikation des kristallinen Aufbaus des p-GlcNAc-Produkts kann vorteilhaft zum Beispiel die Reaktionsfähigkeit von p-GlcNAc beeinflussen.

[0126] Weiter kann eine Vielzahl von Molekülen kovalent oder nicht kovalent funktionell an den deacetylierten Derivaten des p-GlcNAc nach der Erfindung angelagert sein. Solche Moleküle können solche Polypeptide, wie Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise Nervenwachstumsfaktoren, Proteasen, sie beispielsweise Pepsin, Hormone oder Peptiderkennungssequenzen, wie beispielsweise RGD-Sequenzen, Fibronectin, Erkennungs-

sequenzen, Laminin, Integrine, Zelladhäsionsmoleküle und dergleichen aufweisen, sind aber nicht darauf beschränkt. Die kovalente Anlagerung von Molekülen an die ungeschützten primären Amine von deacetyliertem p-GlcNAc kann zum Beispiel durch chemische Anlagerung unter Verwendung von bifunktionalen Verknüpfungsreagenzien erzielt werden, die als chemische Abstandshalter für bestimmte Längen agieren. Solche Verfahren sind dem Fachmann bekannt und können zum Beispiel den Verfahren von Davis und Preston (Davis, M. und Preston, J.F. 1981, Anal. Biochem. 116:404–407) und Staros u.a. ähneln (Staros, J.V. u.a., 1986, Anal. Biochem. 156:220–222). Kurz gesagt können Karbonsäurereste auf dem an das deacetylierte oder teilweise deacetylierte erfindungsgemäße p-GlcNAc anzulagernde Peptid aktiviert und dann mit dem p-GlcNAc vernetzt werden. Die Aktivierung kann zum Beispiel durch das Hinzufügen einer Lösung, wie beispielsweise Carbodiimid EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) zu einer Peptidlösung in einem Phosphatpuffer erzielt werden. Vorzugsweise enthält diese Lösung zusätzlich ein Reagens, wie beispielsweise Sulfo-NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid), um die Kopplung zu verstärken. Das aktivierte Peptid kann mit dem deacetylierten p-GlcNAc durch Mischen in einem Puffer mit hohem pH, wie beispielsweise einem Carbonatpuffer (pH 9,0–9,2), vernetzt werden.

[0127] Alternativ können solche Moleküle, wie beispielsweise die oben beschriebenen, nicht kovalent an das deacetylierte p-GlcNAc unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren angelagert werden. Zum Beispiel kann ein Molekül oder Moleküle nach Wahl vor der Lyophilisierung mit einer deacetylierten p-GlcNAc-Lösung gemischt werden.

[0128] Alternativ können Hybride, die p-GlcNAc und/oder p-GlcNAc-Derivate umfassen, gebildet werden. Solche Hybride können zusätzlich zu dem p-GlcNAc und/oder den p-GlcNAc-Derivaten irgendeine aus einer Anzahl von natürlichen und/oder synthetischen Materialien enthalten. Zum Beispiel können Hybride aus p-GlcNAc und/oder p-GlcNAc-Derivaten plus einem oder mehreren extrazellulären Matrix(ECM)-Komponenten gebildet werden. Solche ECM-Komponenten können Kollagen, Fibronectin, Glycosaminoglycane und/oder Peptidoglycane aufweisen, sind aber nicht darauf beschränkt. Hybride können auch aus p-GlcNAc und/oder p-GlcNAc-Derivaten plus einem oder mehreren synthetischen Materialien, wie beispielsweise Polyethylen, gebildet sein. Ein solches p-GlcNAc/Polyethylen oder p-GlcNAc-Derivat/Polyethylenhybrid kann durch thermisches Verbinden der Hybridkomponenten zum Beispiel mittels Autoklavieren hergestellt sein.

[0129] Darüber hinaus kann zur Herstellung von neuen Kunststoffmaterialien ein Iod-p-GlcNAc-Derivat zum Beispiel mit Styrol copolymerisiert sein. Iod-p-GlcNAc kann durch ein Verfahren mittels Tosylierung und Iodierung von p-GlcNAc hergestellt werden, das ähnlich dem von Kurita und Inoue beschriebenen ist (Kurita, K. und Inoue, S., 1989, in „Chitin und Chitosan", Skjak-Braek u.a., Hrsg., Elsevier Science Publishing Co., Inc., Seite 365). Das Iodderivat von p-GlcNAc kann dann in Nitrobenzol dispergiert und mit Styrol reagiert werden, wobei Zinn(IV)chlorid als Katalysator verwendet wird.

[0130] In dem Fall eines Kollagen/-p-GlcNAc-Hybrids können kurz gesagt eine p-GlcNAc-Suspension und eine Kollagensuspension gemischt und lyophilisiert sowie vernetzt werden, vorzugsweise dehydrothermisch vernetzt werden. Die Kollagenarten von solchen Hybriden können nativ oder synthetisch sein und können menschlichen Ursprungs oder nicht menschlichen Ursprungs, wie beispielsweise von Rindern, sein. p-GlcNAc/Kollagen- und/oder p-GlcNAc-Derivat/Kollagen-Hybridmaterialien zeigen gleichförmige Eigenschaften und bilden ein poröse Matrix, die zum Beispiel als effiziente dreidimensionale Matrix zum Anlagern und Wachsen von Zellen wirken. Das im nachfolgenden Abschnitt 13 dargestellte Arbeitsbeispiel zeigt die Bildung, Eigenschaften und den Nutzen eines solchen p-GlcNAc/Kollagen-Hybrids.

[0131] Hybride, die Kombinationen von deacetyliertem p-GlcNAc und solchen Verbindungen wie zum Beispiel Heparin, Natriumalginat und Carboxymethyl-p-GlcNAc umfassen, können unter Verwendung von Verfahren, wie beispielsweise den hier beschriebenen, formuliert werden. Solche Kombinationen können zum Beispiel zu Membranen und Fasern gebildet oder umgebildet werden.

[0132] Komplexe von deacetyliertem p-GlcNAc mit Polyanionen, wie beispielsweise Polyacrylsäure oder Pectin, die sowohl positive als auch negative Ladungen besitzen, können formuliert werden. Die Bildung solcher Komplexe kann gemäß einem Verfahren ähnlich dem von Mireles u.a. beschriebenen erzielt werden (Mireles, C. u.a., 1992, in „Advances in Chitin and Chitosan", Brine, C.J. u.a., Hrsg., Elsevier Publishers, Ltd.). Deacetyliertes p-GlcNAc und Polyacrylsäure, Karragheen oder Pektin beispielsweise werden in HCl bzw. NaCl gelöst, und die Reaktionspartnerlösungen, die den gleichen pH-Wert aufweisen, werden gemischt. Dieser Vorgang erzeugt wirksame ausflockende Moleküle, die sowohl positive als auch negative Merkmale besitzen und zum Beispiel zum Verarbeiten von Abwässern nützlich sind.

5.5. Umformulierungen

[0133] Das erfindungsgemäße p-GlcNAc sowie seine deacetylierten Derivate und/oder deren Derivatisierungen, wie beispielsweise die oben in Abschnitt 5.4 beschriebenen, können gelöst und anschließend in eine Vielzahl von Formen und Konfigurationen umformuliert werden.

[0134] Die Lösung des erfindungsgemäßen p-GlcNAc kann durch Behandeln mit Dimethylacetamid (DMA)/Lithiumchlorid erreicht werden. p-GlcNAc kann sofort durch Rühren in einer DMA-Lösung, die 5 % LiCl (pro Gewicht des DMA) enthält, gelöst werden. Wasserlösliche p-GlcNAc-Derivate, wie beispielsweise p-GlcNAc-Salze, können in Wasser gelöst werden. p-GlcNAc, das mindestens zu etwa 75 % deacetyliert wurde, kann zum Beispiel in einer milden sauren Lösung, wie beispielsweise 1 %ige Essigsäure, gelöst werden. p-GlcNAc-Derivate, die wasserunlöslich sind, können in organischen Lösungsmitteln gelöst werden.

[0135] Die Derivatisierung von p-GlcNAc in DMA:LiCl mit Phenylisocyanaten kann dazu verwendet werden, Carbanilate zu erzeugen. Weiter kann die Derivatisierung von p-GlcNAc in DMA:LiCl mit Toluol-p-sulfonylchlorid dazu verwendet werden, Toluol-p-Sulfonat zu erzeugen.

[0136] Das erfindungsgemäße p-GlcNAc, seine deacetylierten Derivate und/oder deren Derivatisierungen in Lösung können dann ausgefällt und in Formen umformuliert werden, die Matten, Schnüre, Seile, Mikrokügelchen, Mikroperlen, Membranen, Fasern, Pulver und Schwämme aufweisen, aber nicht darauf beschränkt sind. Weiter können ultradünne (d.h. weniger als etwa 1 µm dick) gleichförmige Membranen formuliert werden.

[0137] Solche Umformulierungen können zum Beispiel durch Vorteilnahme der Tatsache erreicht werden, dass reines p-GlcNAc in Lösungen, wie beispielsweise Wasser und Alkohol, vorzugsweise Ethanol, unlöslich ist. Die Einführung durch herkömmliche Mittel, wie beispielsweise durch Injektion des p-GlcNAc enthaltenden DMA/LiCl-Gemischs in ein solches Wasser oder eine solche Alkohollösung, vorzugsweise Ethanollösung, bringt die erneute Ausfällung, und Umformulierung, des gelösten p-GlcNAc zustande. Eine solche reine p-GlcNAc-Umformulierung wird in dem nachfolgend im Abschnitt 11 dargestellten Arbeitsbeispiel gezeigt. Im Fall der löslichen p-GlcNAc-Derivate können Umformulierungen durch erneute Ausfällung in organischen Lösungsmitteln, wie beispielsweise Ethylacetat oder Isopropanol, erreicht werden. Umformulierungen von p-GlcNAc, das mindestens zu etwa 75 % deacetyliert wurde, kann durch erneute Präzipitation in einer Alkalilösung erreicht werden. Wasser unlösliche p-GlcNAc-Derivate können durch erneute Ausfällung in wässrigen Lösungen, wie beispielsweise Wasser, umformuliert werden.

[0138] Deacetyliertes p-GlcNAc in Verbindung mit oxidierter Cellulose können formuliert werden, um p-GlcNAc/Cellulose-Hybridmaterialien herzustellen, die die Naßfestigkeit von Papierprodukten verbessern. Die deacetylierte p-GlcNAc-Kette, die eine flache bandartige Form hat, ähnlich zu der von Baumwolle, kann sich einem oxidierten Baumwollsubstrat stark annähern. Eine solche Nähe maximiert den Beitrag der Van-der-Waals-Kräften zu den Kräften, die die Adsorption fördern, wodurch die Nassfestigkeitseigenschaften der Hybrid-p-GlcNAc-Cellulose-Materialien erhöht werden.

[0139] p-GlcNAc-Membranen und dreidimensionale p-GlcNAc-Matrizen können mittels Verfahren hergestellt werden, die die Bildung von kontrollierten durchschnittlichen Porengrößen entweder in den Membranen oder den Matrizen vorsehen. Die Porengröße kann in Membranen und Matrizen durch Variieren der Menge an verwendetem p-GlcNAc-Material und durch das Hinzufügen von bestimmten Lösungsmitteln, wie beispielsweise Methanol oder Ethanol, wobei Ethanol bevorzugt ist, in bestimmten Mengen, die im Bereich von etwa 5 % bis etwa 40 % liegen, vor der Bildung von Membranen und/oder Matrizen kontrolliert werden. Im Allgemeinen ist die durchschnittliche, gebildete Porengröße je kleiner, desto größer der prozentuale Anteil an Lösungsmittel ist. Das nachfolgend in Abschnitt 15 veranschaulichte Beispiel zeigt die Synthese und Charakterisierung von solchen porösen p-GlcNAc-Strukturen.

5.6. Anwendungen

[0140] Das erfindungsgemäße p-GlcNAc sowie seine deacetylierten Derivate und ihre Derivatisierungen, wie die oben im Abschnitt 5.4 beschriebenen, und Umformulieren, wie die oben im Abschnitt 5.5 beschriebenen, weisen eine Auswahl von Anwendungen auf. Zum Beispiel eignen sich die nicht toxischen, nicht pyrogenen, biologisch abbaubaren und biokompatiblen Merkmale der erfindungsgemäßen Moleküle zusätzlich zu den vorteilhaften Eigenschaften des p-GlcNAc und seiner Derivate, wie hier beschrieben, für Anwendungen in so unterschiedlichen Gebieten wie der Landwirtschaft, Kosmetik, Biomedizin-Industrie, Tiernahrung und -gesundheit, und Nahrungsmittelindustrie, chemischen, fotografischen und pharmazeutischen Industrie.

5.6.1 Biomedizinische Verwendungen von p-GlcNAc-Materialien

5.6.1.1 Verwendung für Medikamenten-Immobilisierung/Abgabe

[0141] Biomedizinische Verwendungen von p-GlcNAc-Material können zum Beispiel Enzym- und/oder Medikamenten-Immobilisierungs/Abgabe-Verfahren aufweisen. Zum Beispiel kann das erfindungsgemäße p-GlcNAc oder seine Derivate interessante, an diese kovalent angelagerte Peptide (zum Beispiel Wachstumsfaktoren) haben, wie oben im Abschnitt 5.4 beschrieben. Peptid enthaltendes p-GlcNAc kann einem Patienten unter Anwendung von Standardverfahren, die dem Fachmann bekannt sind, verabreicht werden, die die Injektion, Implantation, arthroskopische, laparoskopische oder ähnliche Mittel aufweisen, aber nicht darauf beschränkt sind. Nach dem Einnehmen des Peptid enthaltenden p-GlcNAc durch einen Patienten baut sich das erfindungsgemäße p-GlcNAc biologisch ab, so dass die angelagerten Peptide langsam in den Blutstrom des Patienten freigegeben werden, wodurch ein Verfahren für die kontrollierte Medikamentenabgabe zur Verfügung gestellt wird.

[0142] Deacetylierte oder teilweise deacetylierte p-GlcNAc-Arten können mit einer vorhersagbaren Rate an biologischer Abbaubarkeit hergestellt werden. Zum Beispiel beeinflusst der prozentuale Anteil der Deacetylierung die Rate, bei der die p-GlcNAc-Art abgebaut wird. Im Allgemeinen ist der prozentuale Anteil der Deacetylierung je höher, desto schneller die Rate der biologischen Abbaubarkeit und Resorption ist. Daher können der Grad an biologischer Abbaubarkeit von p-GlcNAc und die in vivo Resorptionsrate während der p-GlcNAc-Herstellung kontrolliert werden. Beispiele für die Herstellung und Merkmale von solchen p-GlcNAc-Materialien sind unten im Abschnitt 18 vorgestellt. p-GlcNAc-Materialien mit solchen kontrollierbaren biologischen Abbaubarkeitsraten können zu Membranen, Gelen, Schwämmen, Mikrokügelchen, Fasern und dergleichen aufgebaut werden. Diese p-GlcNAc-Produkte haften und formen sich an Geweben – sowohl an weichen als auch harten Geweben – im menschlichen Körper an, ohne dass ein Nahtmaterial erforderlich ist. Die p-GlcnNAc-Materialien können zum Beispiel während einer allgemeinen oder minimal invasiven Operation, wie beispielsweise einer laparoskopischen Operation, angewendet werden.

[0143] p-GlcNAc-Materialien mit einer kontrollierbaren Rate an biologischer Abbaubarkeit können zum Beispiel nützlich sein, um eine Hämostase bei blutenden Geweben, Organen und Blutgefäßen zu fördern, um periodontale Barrieren für die Trennung von weichen und harten Geweben während des Reparaturverfahrens nach einer periodontalen Operation vorzusehen, um operative Raumfüller vorzusehen, um eine Zunahme des weichen Gewebes, insbesondere in der Haut, zur Reduzierung von Hautfalten zu fördern und als eine Zunahme des Harnsphinkters zum Kontrollieren der Inkontinenz. Das unten im Abschnitt 19 vorgestellte Beispiel zeigt die Verwendung von solchen p-GlcNAc-Materialien bei einer dieser Anwendungen, nämlich zur Förderung der Hämostase.

[0144] Darüber hinaus können die erfindungsgemäßen Moleküle als Medikamentenabgabeträger mit langsamer Freisetzung dienen, wobei das interessante Medikament durch das p-GlcNAc oder eines seiner Derivate eingeschlossen wurde. Eine Medikamenten/p-GlcNAc-Einschließung kann zum Beispiel durch Befolgen einer Modifikation der Säurebehandlungs/Neutralisationsvariation des chemischen/biologischen, oben im Abschnitt 5.3.2 vorgestellten Reinigungsverfahrens erzeugt werden. Anstatt den pH-Wert der p-GlcNAc-Lösung auf etwa einen neutralen pH-Bereich zu erhöhen (d.h. etwa 7,4), kann man eine basische pH-Umgebung erzeugen, indem man den pH-Wert auf etwa 9,0 erhöht, nachdem die Reinigung des pGlcNAc vollendet ist. Bei einem basischeren pH-Wert, nimmt der Aufbau des erfindungsgemäßen p-GlcNAc oder eines seiner Derivate eine dreidimensionalere oder „offene" Konfiguration an. Wenn der pH-Wert gesenkt wird, kehrt die Molekülkonfiguration zu einer kompakteren „geschlossen" Konfiguration zurück. Daher kann ein interessantes Medikament einem p-GlcNAc bei einem hohen pH-Wert zugegeben werden und dann der pH-Wert der p-GlcNAc/Medikamenten-Suspension reduziert werden, wodurch das interessante Medikament in einer p-GlcNAc-Matrix „gefangen" oder eingeschlossen wird.

[0145] Solche p-GlcNAc-Einschließungen können einem Patienten unter Verwendung von Standardverfahren, die dem Fachmann bekannt sind, verabreicht werden, so dass nach der Verabreichung das eingeschlossene Medikament langsam in das System des Patienten abgegeben wird, wenn sich das p-GlcNAc der Einschließung abbaut.

[0146] Die Gele und Membranen auf p-GlcNAc-Basis haben eine Auswahl von Anwendungen als therapeutische Medikamentenabgabesysteme. Solche Anwendungen weisen zum Beispiel Zytostatikaabgabesysteme auf. Die hier beschriebenen Medikamentenabgabesysteme sind zur Verwendung mit jedem Zytostatikum durchführbar. Solche Medikamente sind dem Fachmann bekannt und können zum Beispiel in p-GlcNAc-Gele

oder -Membranen konfektioniert werden, um so eine ortsgebundene Abgabe mit langsamer Freisetzung direkt zum Tumor oder der Region, die von dem Tumor nach der Operation befreit ist, vorzusehen. Solche p-GlcNAc-Zytostatikaabgabesysteme sind besonders nützlich zur Behandlung von Tumoren, die durch eine Operation vollständig oder teilweise unerreichbar sind, wie beispielsweise im Fall von bestimmten Gehirntumoren.

[0147] Zusätzliche Ziele für die p-GlcNAc-Antitumorsysteme weisen Tumoren der Haut, des Magendarmtrakts, Pankreas, der Lungen, Brust, Harnwege und Gebärmutter und mit HIV in Zusammenhang stehende Kaposi-Sarcoma auf, sind aber nicht darauf beschränkt.

[0148] Zytostatika, die Strahlungsverstärker sind, werden für Fälle bevorzugt, bei denen eine Strahlentherapiebehandlung vorgeschrieben werden soll, entweder anstelle einer oder nach einer Operation. Beispiele für solche Medikamente weisen zum Beispiel 5'-Fluorouracil, Mitomycin, cis-Platin und die Derivate, Taxol, Adriamycin, Actinomycin, Bleomycine, Daunomycine und Methamycine auf.

[0149] Dosisbereiche für Zytostatika können niedriger als, gleich oder höher als die typischen täglichen Dosen, die für systemische Behandlung von Patienten vorgeschrieben sind, sein. Höhere Dosen können toleriert werden, insofern als die Medikamente örtlich an den Ort eines Tumors abgegeben werden. Andere Gewebe, die Blutzellen aufweisen, werden daher nicht so schnell den Medikamenten ausgesetzt. Die Dosen von solchen Medikamenten sind dem Fachmann bekannt und können alternativ routinemäßig unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Standardverfahren bestimmt werden, wie beispielsweise unten am Ende dieses Abschnitts beschrieben.

[0150] Die erfindungsgemäßen p-GlcNAc/Medikamentenabgabesysteme können darüber hinaus zur Behandlung von Infektionen verwendet werden. Für eine solche Anwendung können Antibiotika, die entweder wasserlöslich oder wasserunlöslich sind, in Materialien auf p-GlcNAc-Grundlage, wie beispielsweise Gelen und Membranen, immobilisiert/formuliert werden. Antibiotika sind dem Fachmann bekannt und weisen zum Beispiel Penicilline, Cephalosporine, Tetracycline, Ampicillin, Aureothicin, Bacitracin, Chloramphenicol, Cycloserin, Erythromcyin, Gentamicin, Gramacidine, Kanamycine, Neomycine, Streptomycine, Tobramcyin und Vancomycin auf. Dosen von solchen Medikamenten sind dem Fachmann bekannt und können alternativ routinemäßig unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Standardverfahren bestimmt werden, wie beispielsweise unten am Ende dieses Abschnitts beschrieben.

[0151] Solche p-GlcNAc-Antibiotikaprodukte können dazu verwendet werden, bakterielle Infektionen zu behandeln, die entweder äußerlich, z.B. auf der Haut, Kopfhaut, Hautgeschwüren oder Augen auftreten, oder innerlich, z.B. lokalisierte Infektionen des Gehirns, der Muskeln, des Abdomen, auftreten. Eine hervorstechende Anwendung ist die Behandlung von mit HIV in Zusammenhang stehenden opportunistischen Infektionen.

[0152] Die erfindungsgemäßen p-GlcNAc/Medikamentenabgabesysteme können mit entzündungshemmenden Medikamenten formuliert sein, um eine funktionsstörende Wirkung der entzündlichen und Immunprozesse zu kontrollieren. Zum Beispiel kann p-GlcNAc mit nicht steroidalen entzündungshemmenden Medikamenten (NSAID) formuliert werden und zur Reduzierung von lokalem Schmerz und einer Entzündung verwendet werden, die durch Krankheiten, wie beispielsweise rheumatische Arthritis, Osteoarthritis und systemischer Lupus, um nur ein paar zu nennen, hervorgerufen wird. Die lokalisierte Abgabe von solchen NSAID unter Verwendung der erfindungsgemäßen p-GlcNAc-Gel- oder -Membran/Medikamentenabgabesysteme kann dazu dienen, die Nebenwirkungen von NSAID zu reduzieren, zu denen Magenreizung, Azotämie, Thrombozytendysfunktion und Leberfunktionsstörungen gehören. NSAID sind dem Fachmann bekannt und weisen Inhibitoren von Cycloxygenase, wie beispielsweise Aspirin, Etodolac, Fenoprofen und Naproxen auf. Andere entzündungshemmende Medikamente können als Teil der erfindungsgemäßen p-GlcNAc/Medikamentenabgabesysteme verwendet werden, wie beispielsweise Inhibitoren von entzündlichen Lipidmediatoren, wie beispielsweise Leukotrienen. Die Dosen für solche Medikamente sind dem Fachmann bekannt und können alternativ routinemäßig unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Standardverfahren bestimmt werden, wie beispielsweise unten am Ende dieses Abschnitts beschrieben.

[0153] Die erfindungsgemäßen p-GlcNAc/Medikamentenabgabesysteme können zusätzlich mit antimykotischen Mitteln unter Verwendung der oben beschriebenen Verfahren zur Behandlung von spezifischen Pilzerkrankungen formuliert werden. Antimykotische Mittel sind dem Fachmann bekannt und können zum Beispiel Amphotericin, Anisomycin, Antifungon, Blastomycin, Griseofulvine und Nystatin aufweisen. Die Dosen von solchen Medikamenten sind dem Fachmann bekannt und können alternativ routinemäßig unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Standardverfahren bestimmt werden, wie sie beispielsweise unten am Ende dieses

Abschnitts beschrieben sind.

[0154] Die erfindungsgemäßen p-GlcNAc/Medikamentenabgabesystem können auch mit protozoenvernichtenden Mitteln unter Verwendung der oben beschriebenen Verfahren zur Behandlung von spezifischen, Protozoen betreffenden Infektionen formuliert werden. Protozoenvernichtende Mittel sind dem Fachmann bekannt und können zum Beispiel Antiamoebin, Antiprotozin, Monomycin, Paromomycin und Trichomycin aufweisen. Die Dosen von solchen Medikamenten sind dem Fachmann bekannt und können alternativ routinemäßig unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Standardverfahren bestimmt werden, wie beispielsweise unten am Ende dieses Abschnitts beschrieben.

[0155] Die erfindungsgemäßen p-GlcNAc-Medikamentenabgabesysteme können mit spermiziden Verbindungen unter Verwendung von Verfahren formuliert werden, wie sie beispielsweise oben beschrieben sind, um wirksame Verhütungsmittel herzustellen. Geeignete Spermizide sind dem Fachmann bekannt. Die Dosen solcher Spermizide sind dem Fachmann bekannt und können alternativ routinemäßig unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Standardverfahren bestimmt werden, wie sie beispielsweise unten am Ende dieses Abschnitts beschrieben sind.

[0156] Die erfindungsgemäßen p-GlcNAc-Medikamentenabgabesysteme können außerdem unter Verwendung von Proteintherapeutika formuliert werden. Solche Formulierungen können zum Beispiel unter Verwendung von Verfahren hergestellt werden, wie sie oben beschrieben sind. Unter Anwendung von solchen therapeutischen p-GlcNAc-Proteinsystemen ist es möglich, bestimmte Proteine direkt an die gewünschten Zielorte abzugeben und eine langsame Freisetzung der Proteine an diesen Stellen zu bewirken. Beispiele für mögliche Proteine umfassen Insulin, monoklonale Antikörper, Brustkrebsantitoxin, Tumornekrosefaktor, Interferone, menschliches Wachstumshormon, Lymphokine, Kolonie stimulierender Faktor, Interleukine und Humanserumalbumin. Die Dosen von solchen Proteintherapeutika sind dem Fachmann bekannt und können alternativ routinemäßig unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Standardverfahren bestimmt werden, wie sie beispielsweise unten am Ende dieses Abschnitts beschrieben sind.

[0157] Weil die erfindungsgemäßen p-GlcNAc-Materialien selbst immunneutral sind, insofern als sie beim Menschen keine Immunantwort hervorrufen, können solche p-GlcNAc-Mittel, wie sie oben beschrieben sind, die p-GlcNAc-Membranen, poröse 3D-Matrizen und/oder Gele, die immobilisierte Medikamente beherbergen, diese Medikamente in einer Weise abgeben, dass keine Immunantwort erfolgt. Bestimmte zusätzliche Materialien, wie beispielsweise natürliche Alginate und synthetische Polymere können in einigen Fällen verwendet werden, um solche Mittel in Kombination mit dem p-GlcNAc-Material zu konstruieren.

[0158] Die therapeutisch wirksamen Dosen von jedem der oben beschriebenen Medikamente oder Mittel in Verbindung mit den hier beschriebenen Systemen auf p-GlcNAc-Basis können routinemäßig unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Verfahren bestimmt werden. Eine „therapeutisch wirksame" Dosis bezieht sich auf die Menge an Verbindung, die ausreicht, um zu einer Besserung der Symptome der hier beschriebenen Prozesse und/oder Erkrankungen zu führen.

[0159] Die Toxizität und therapeutische Wirksamkeit der Medikamente kann durch pharmazeutische Standardverfahren mit Zellkulturen oder Versuchstieren bestimmt werden, z.B. zum Bestimmen von LD_{50} (der Dosis, die für 50 % der Population tödlich ist) und ED_{50} (der Dosis, die bei 50 % der Population therapeutisch wirksam ist). Das Dosisverhältnis zwischen toxischer und therapeutischer Wirkung ist der therapeutische Index und kann als das Verhältnis LD_{50}/ED_{50} ausgedrückt werden. Verbindungen, die große therapeutische Indizes zeigen, sind bevorzugt. Während Verbindungen, die toxische Nebenwirkungen zeigen, verwendet werden können, ist Sorge zu tragen, dass ein Abgabesystem konstruiert wird, das solche Verbindungen auf die Stelle des geschädigten Gewebes richtet, um einen potentiellen Schaden für nicht infizierte Zellen zu minimieren und dadurch die Nebenwirkungen zu verringern.

[0160] Die von den Zellkulturassays und Tierstudien erhaltenen Daten können zur Formulierung eines Dosisbereichs zur Anwendung beim Menschen verwendet werden. Die Dosis von solchen Verbindungen liegt vorzugsweise im Bereich von kursierenden Konzentrationen, die die ED50 mit wenig oder keiner Toxizität einschließen. Die Dosis kann in diesem Bereich je nach der verwendeten Dosisform und dem verwendeten Verabreichungsweg variieren. Für jede in dem Verfahren der Erfindung verwendete Verbindung kann die therapeutisch wirksame Dosis zuerst anhand der Zellkulturassays geschätzt werden. Eine Dosis kann bei Tiermodellen formuliert werden, um einen zirkulierenden Plasmakonzentrationsbereich zu erzielen, der den IC50 (d.h. die Konzentration der Testverbindung, mit der eine halbmaximale Inhibierung der Symptome erzielt wird) aufweist, wie in der Zellkultur bestimmt. Solche Informationen können verwendet werden, um die nützlichen Do-

sen beim Menschen genauer zu bestimmen. Plasmaniveaus können zum Beispiel durch Hochleistungsflüssigchromatographie gemessen werden.

5.6.1.2. p-GIcNAc-ZELLVEINSCHLIESSUNGSANWENDUNGEN

[0161] Von p-GIcNAc eingeschlossene Zellen können formuliert werden, und solche von p-GIcNAc eingeschlossene Zellen können einem Patienten über Standardverfahren, die dem Fachmann bekannt sind, verabreicht werden. Siehe beispielsweise die oben im Abschnitt 5.6.1.1 beschriebenen Verabreichungsverfahren. Alternativ siehe beispielsweise Aebisher u.a. (Aebisher, P. u.a., in „Fundamentals of Animal Cell Encapsulation and Immobilization", 1993, CRC Press, Seite 197–224), die hier durch Bezugnahme insgesamt aufgenommen wird. Zellen können durch, an oder in p-GIcNAc- oder teilweise, deacetylierten p-GIcNAc-Membranen, dreidimensionalen porösen p-GIcNAc-Matrizen oder p-GIcNAc-Gelen eingeschlossen sein.

[0162] Dreidimensionale Matrizen können mit Zellen besät werden und in bestimmten Anwendungen ohne weitere Verkapselung verwendet werden. Alternativ können Zellen in Mikrokügelchen oder Tröpfchen von Polymergelen auf p-GIcNAc-Basis, wie beispielsweise einem p-GIcNAc-Lactatpolyelektrolytpolymer (ein polykationisches Polymer) eingeschlossen werden. Gele, Tröpfchen oder Mikrokügelchen, in die Zellen eingeschlossen wurden, können dann mit einem zweiten Polyelektrolyt von gegensätzlicher Ladung überzogen werden (z.B. mit einem Polyanion, wie beispielsweise einem Alginat), um eine äußere Kapsel zu bilden, die eine Immunisolierung für die eingeschlossenen Zellen vorsieht, um so das Risiko einer Immunabstoßung durch den Wirtsorganismus zu verringern.

[0163] Darüber hinaus können Zellen, die in p-GIcNAc-Gelen, dreidimensionalen p-GIcNAc-Matrizen oder beiden eingeschlossen sind, in thermoplastische Kapseln mit noch einem anderen Formulierungsverfahren eingefüllt werden. Kapseln auf thermoplastischer Grundlage können auch dazu verwendet werden, einen Immunschutz für implantierte Zellen in einem Wirtsorganismus vorzusehen. Solche thermoplastischen Kapseln sind aus Materialien, wie beispielsweise Hydroxyethylmethylacrylat-methylmethacrylat-Copolymer (HEMA-MMA), hergestellt. Mikrokapseln, die von einem Thermoplast stammen, werden zum Beispiel durch Coextrusion einer Lösung von HEMA-MMA in Polyethylenglycol und der Zellen enthaltenden p-GIcNAc-Matrix und/oder Gelmedium zu einem geeigneten organischen Lösungsmittel, wie beispielsweise Hexadecan, gebildet. Siehe zum Beispiel das von Aebisher u.a. beschriebene Verfahren (Aebisher, P. u.a., in „Fundamentals of Animal Cell Encapsulation and Immobilization", 1993, CRC Press, Seite 197–224).

[0164] Die p-GIcNAc-Zelleneinschließungen weisen eine Auswahl von Anwendungen auf. Zuerst können sie zur Abgabe von therapeutischen Verbindungen verwendet werden, die durch Zellen, die an die Membranen, Matrizen oder Gele angelagert und darin eingeschlossen sind, synthetisiert und sekretiert wurden. Zum Beispiel können – ohne einschränkend zu sein – die p-GIcNAc/Zell-Einschließungen zur Abgabe von Insulin zur Behandlung von Diabetes, Nervenwachstumsfaktor zur Behandlung von Alzheimer, Faktor VIII und anderen Gerinnungsfaktoren zur Behandlung von Hämophilie, Dopamin zur Behandlung von Parkinson, Enkephaline über adrenale chromaffine Zellen zur Behandlung von chronischen Schmerzen, Dystrophin zur Behandlung von muskulärer Dystrophie und menschlichem Wachstumshormon zur Behandlung von abnormalem Wachstum verwendet werden.

[0165] Weiter ist es, weil die erfindungsgemäßen p-GIcNAc-Materialien selbst immunneutral sind, da sie keine Immunantwort beim Menschen hervorrufen, möglich, Mittel zu entwickeln und zu konstruieren, die aus p-GIcNAc-Membranen, dreidimensionalen porösen p-GIcNAc-Matrizen und/oder p-GIcNAc-Gelen bestehen, die angehaftete Zellen beherbergen, die Therapeutika auf Zell-Basis abgeben können, so dass die Zellen immunisoliert sind, d.h. es wird keine Antizellwirtsimmunantwort hervorgerufen. Bestimmte zusätzliche Materialien, wie beispielsweise natürliche Alginate und synthetische Polymere können dazu verwendet werden, solche Mittel zusätzlich zu dem p-gIcNAc-Material selbst zu konstruieren.

[0166] p-GIcNAc/Zelleinschließungszusammensetzungen können darüber hinaus zur Abgabe von Zellen zur Förderung der Geweberegeneration verwendet werden. Anwendungen spezifischer Zellarten, die zum Fördern von Zellwachstum eingeschlossen sind, das zur Geweberegeneration an der Stelle einer Verletzung führt, können die Regenerierung von Haut, Knorpel, Nerven, Knochen, Leber und Blutgefäßen umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt. Die Geweberegenerationsanwendungen von Zellen, die in p-GIcNAc-Materialien eingeschlossen sind, sind teilweise wegen der Fähigkeit des p-GIcNAC-Materials an verletztem Gewebe anzuhaften, um ein Substrat für das Wachstum von Säugetierzellen vorzusehen, und um während des Geweberegerationsprozesses an der verletzen Stelle eine Bioresorption durchzumachen, die mit dem Wachstum von neuem gesunden Gewebe übereinstimmt, von Vorteil. Beispiele weisen die Regeneration von Haut-, Knochen-, Knor-

pel-, Leber-, Sehnen- und Bändergewebe auf, sind aber nicht darauf beschränkt.

5.6.1.3 VERWENDUNG VON p-GlcNAc-MATERIALIEN ZUM VERHINDERN VON POSTOPERATIVEN ADHÄSIONEN

[0167] Darüber hinaus können p-GlcNAc-Membranen dazu verwendet werden, eine biologisch abbaubare, biokompatible mechanische Barriere vorzusehen, um postoperative Adhäsionen zu verhindern. Das unten im Abschnitt 17 vorgestellte Beispiel zeigt eine solche p-GlcNAc-Anwendung. Festes p-GlcNAc oder p-GlcNAc-Derivate, die zu Membranen oder Schwämmen formuliert sind, können für eine solche Anwendung verwendet werden. Bevorzugte Membranen sind dünn, im Allgemeinen weniger als etwa 1 mm dick. Bevorzugte p-GlcNAc-Derivate sind p-GlcNAc-Derivate, die zu etwa 50 – 80 % deacetyliert sind. Solche p-GlcNAc-Derivate werden generell ungefähr 7–21 Tage nach der Implantation resorbiert.

[0168] Flüssige p-GlcNAc-Derivate sind auch dazu geeignet, postoperative Adhäsionen zu verhindern. Bevorzugte flüssige p-GlcNAc-Derivate für eine solche Anwendung sind deacetylierte p-GlcNAc-Salzderivate und Carboxymethyl-p-GlcNAc-Derivate. Ein p-GlcNAc-Derivat, das besonders zum Verhindern von postoperativen Adhäsionen bevorzugt ist, ist ein p-GlcNAc-Lactatderivat, insbesondere ein p-GlcNAc-Lactatgelderivat. Solche p-GlcNAc-Lactatderivate können unter Verwendung von Propylenglycol und Wasser formuliert werden, wie beispielsweise im Abschnitt 17.1 beschrieben. Es können p-GlcNAc-Lactatderivate mit hohen und niedrigen Viskositäten hergestellt werden, was es ermöglicht, das verwendete p-GlcNAc auf die spezifische interessante Indikation zuzuschneiden. Zum Beispiel kann es nützlich sein, ein p-GlcNAc-Produkt mit einer niedrigen Viskosität zur Abgabe durch eine Spritze oder über ein Spray zu verwenden, während es wünschenswert sein kann, ein p-GlcNAc-Produkt mit einer höheren Viskosität und daher stärkeren Gleitmitteleigenschaften zu verwenden, wenn es sich um eine orthopädische Indikation handelt.

[0169] Zum Verhindern von postoperativen Adhäsionen sind feste p-GlcNAc-Formulierungen für klar umschriebene Wundstellen geeignet. Solche p-GlcNAc-Formulierungen sollten nach der Operation angewendet werden, und das Material sollte das traumatisierte Gewebe vollständig abdecken. Es kann entweder in Verbindung mit allgemeinen oder minimal invasiven (z.B. laparoskopischen) Operationsverfahren angewendet werden. Die festen p-GlcNAc-Formulierungen können geschnitten und unter Anwendung von üblichen Operationsverfahren und üblicher instrumenteller Ausstattung, die dem Fachmann bekannt sind, verwendet werden.

[0170] Die flüssigen p-GlcNAc-Formulierungen können zum Verhindern von postoperativen Adhäsionen in größeren Gebieten, die dazu neigen, solche postoperativen Adhäsionen zu bilden, angewendet werden. Das p-GlcNAc-Lactatgel kann zum Beispiel vor der Operation angewendet werden, um eine zusätzliche Schmierung vorzusehen und so die Menge an traumatisiertem Gewebe zu reduzieren. Alternativ kann die flüssige p-GlcNAc-Formulierung, wie beispielsweise p-GlcNAc-Lactat, nach der Operation angewendet werden, um eine physikalische Barriere zu bilden und so eine postoperative Adhäsionsbildung zu verhindern.

[0171] Das p-GlcNAc-Material kann auf die verwundete Stelle aufgestrichen, gesprayt oder von einer Spritzeneinrichtung aufgetropft werden. Bei laparoskopischen Verfahren können zum Beispiel Materialien mit niedriger Viskosität mit üblichen Saug-Bewässerungs-Einrichtungen abgegeben werden. Materialien mit höherer Viskosität benötigen Druck, um das Ziel zu erreichen. Der Druck kann durch einen mittels Kompressionsgas betriebenen Kolben oder eine Spritzeneinrichtung zur Verfügung gestellt werden.

[0172] Die Menge an flüssiger p-GlcNAc-Formulierung, wie beispielsweise die p-GlcNAc-Lactatgelformulierung, die zum Verhindern von postoperativen Adhäsionen erforderlich ist, ist proportional zu dem Umfang an traumatisiertem Gewebe.

[0173] Das verabreichte p-GlcNAc-Material sollte im Bereich von 0,1 mm bis 1,5 mm pro cm^2 der Oberfläche angewendet werden.

5.6.1.4 ANDERE BIOMEDIZINISCHE ANWENDUNGEN VON p-GlcNAc-MATERIALIEN

[0174] Andere biomedizinische Anwendungen von p-GlcNAc-Materialien beinhalten zum Beispiel die Verwendung von solchen Materialien wie Zellkultursubstraten. Zum Beispiel wirkt, wie in dem unten im Abschnitt 12 vorgestellten Arbeitsbeispiel gezeigt, das erfindungsgemäße p-GlcNAc als sehr wirksames Substrat für Säugetierzellen, die gezüchtet werden. Weiter können dreidimensionale Konfigurationen von p-GlcNAc als eine Mediumskomponente verwendet werden, die ein dreidimensionales Zellkulturwachstum ermöglicht.

[0175] Die Zellsubstratfähigkeiten von erfindungsgemäßem p-GlcNAc können auch in vivo verwendet werden. Hier kann das erfindungsgemäße p-GlcNAc oder ein Derivat davon, wie hier beschrieben, so wirken, dass es die Geweberegeneration erleichtert (z.B. die Regeneration von Bindegewebe, das Zähne in der Nähe der Zahnfleischlinie bedeckt, vaskuläre Transplantate, Bänder-, Sehnen-, Knorpel-, Knochen-, Haut-, Nervengewebe). Die erfindungsgemäßen p-GlcNAc-Moleküle können daher zum Beispiel ausgedehnte Anwendungen in der plastischen Chirurgie haben.

[0176] Deacetyliertes p-GlcNAc wird zur Verwendung als Abdichtungsmittel von vaskulären Transplantationen bevorzugt. Deacetylierte p-GlcNAc-Derivate, wie beispielsweise mittels N-Carboxymethyl und N-Carboxybutyl deacetyliertes p-GlcNAc, sind als Geweberegenerationsreagenzien bevorzugt. Mittels N-Carboxymethyl deacetyliertes p-GlcNAc kann zum Beispiel in die Hornhaut des Auges inokuliert werden, um Neovaskularisierungen zu bewirken.

[0177] Weitere biomedizinische Anwendungen des erfindungsgemäßen p-GlcNAc oder seiner Derivate können, wie hier beschrieben, die Verwendung von Molekülen für Wundversorgung, Wundheilungssalben und Operationsnähte, Schwämme und dergleichen beinhalten.

[0178] Außerdem können solche Moleküle zum Beispiel zur Behandlung von Osteoarthritis, zur Reduzierung des Blutserumcholesterinniveaus, als antivirale Mittel, als antibakterielle Mittel, als Immunmodulatoren, als Antikoagulantien, als Dialyse- und Ultrafiltrationsmembranen, als Zytostatika, als Kontaktlinsenmaterial und als orale Adsorptionsmittel für „iremic toxins" bei Verabreichung an Patienten mit Nierenversagen verwendet werden. Mikrokristalline p-GlcNAc-Suspensionen oder wasserlösliche p-GlcNAc-Derivate sind zur Behandlung von Arthritis zum Beispiel durch Injektion direkt in arthritische Gelenke bevorzugt.

[0179] p-GlcNAc umfasst zusätzliche Anwendungen als Komponente von künstlicher oder Spenderhaut. Zum Beispiel kann p-GlcNAc, vorzugsweise als nicht gewebte p-GlcNAc-Folien, so verwendet werden, dass es dicke Hautspenderstellen spaltet, wobei diese zum Beispiel über Spenderdermis zu liegen kommen.

[0180] Deacetyliertes p-GlcNAc, an das eine Protease, wie beispielsweise Pepsin, angelagert wurde, kann zum kontrollierten Aufschluss von Proteinen in Kontakt mit solchen p-GlcNAc/Protaseverbindungen verwendet werden.

[0181] Bestimmte Derivatisierungen von erfindungsgemäßem p-GlcNAc oder seiner Derivate können für spezifische Anwendungen bevorzugt sein. (Derivatisierungen sind oben im Abschnitt 5.4 beschrieben.) Zum Beispiel können sulfatierte, phosphorylierte und/oder nitrierte p-GlcNAc-Derivate als Antikoagulierungsmittel oder als Lipoproteinlipaseaktivatoren bevorzugt sein. N-Acyl-p-GlcNAc-Derivate können zusätzlich dazu, dass sie zum Beispiel zur Verwendung bei der Herstellung von künstlichen Blutgefäßen, antiviralen Verbindungen, Antitumor- (insbesondere Krebszellanhäufungsverbindungen), Dialyse- und Ultrafiltrationsmembranen bevorzugt sind, und bei der Herstellung von Abgabesystemen für die kontrollierte Freisetzung von Medikamenten auch für Antikoagulierungsmittel bevorzugt sein. O-Alkyl-p-GlcNAc und seine deacetylierten Derivate können auch bei der Herstellung von Abgabesystemen zur kontrollierten Freisetzung von Medikamenten bevorzugt sein. N-Alkyl-p-GlcNAc-Derivate können als antibakterielle Mittel bevorzugt sein. Oxido-entaminierte Derivate können als Antikrebsmittel, insbesondere ihre Verwendung in Verbindung mit einer Immuntherapie bei Krebszellen, bevorzugt sein. Deacetylierte p-GlcNAc-Derivate können als Wundheilungsmittel bevorzugt sein. N-Alkyliden- und N-Aryliden-p-GlcNAc-Derivate können für die Enzymimmobilisierungsanwendungen bevorzugt sein.

5.6.2 LANDWIRTSCHAFTLICHE VERWENDUNGEN VON p-GlcNAc-MATERIALIEN

[0182] Das erfindungsgemäße p-GlcNAc oder seine Derivate kann auch bei verschiedenen landwirtschaftlichen Anwendungen benutzt werden. Solche Anwendungen weisen Insektizide, fungizide, bakterizide und nematozide Anwendungen auf, sind aber nicht darauf beschränkt. Mittels N-Carboxymethyl deacetylierte p-GlcNAc-Derivate sind zur Verwendung als wirksame bakteriostatische Reagenzien bevorzugt. N-Alkyl-p-GlcNAc-Derivate können für fungizide Anwendungen bevorzugt sein. Darüber hinaus können die Moleküle der Erfindung in verschiedenen Bodenbehandlungsanwendungen verwendet werden, die Düngerzusammensetzungen umfassen, aber nicht darauf beschränkt sind. Weiter kann die kontrollierte Freisetzung von Agrochemikalien durch Einschließen solcher Chemikalien über die Immobilisierung, Verkapselung und andere oben in diesem Abschnitt beschriebene Verfahren erreicht werden. Weiterhin können zum Beispiel Analoge von Rhizobium-Nodulationsfaktoren und/oder Stickstofffixationsinduzierungsmittel auf p-GlcNAc und/oder p-GlcNAc-Derivaten der Erfindung immobilisiert und darüber verabreicht werden.

5.6.3 ANWENDUNGEN VON p-GlcNAc-MATERIALIEN IN DER NAHRUNGSMITTELINDUSTRIE

[0183] Das erfindungsgemäße p-GlcNAc und seine Derivate ermöglichen, wie hier beschrieben, außerdem Anwendungen auf dem Gebiet von tierischer und menschlicher Ernährung. Zum Beispiel können die erfindungsgemäßen Moleküle als Futterbestandteile verwendet werden. Verfahren, wie beispielsweise die oben in diesem Abschnitt beschriebenen, können zur Herstellung von Produkten mit kontrollierter Freisetzung in Tiersystemen verwendet werden. Darüber hinaus können die biomedizinischen Anwendungen, die oben beschrieben sind, durch Einführen von Routinemodifikationen, die dem Fachmann bekannt sind, in Tiersysteme verwendet werden.

[0184] Die Anwendungen von erfindungsgemäßem p-GlcNAc und seiner Derivate in der Nahrungsmittelindustrie, wie hier beschrieben, können Anticholesterin (d.h. hypocholesterinämische Verbindungen), Fett bindende Verbindungen, Emulgatoren, Träger, Konservierungsstoffe, Würzmittel und Nahrungsmittelnachbehandler zusätzlich zu Obstbeschichtungsmittel und Nahrungsmittelverpackungsprodukten, aufweisen, sind aber nicht darauf beschränkt.

5.6.4 KOSMETISCHE ANWENDUNGEN VON p-GlcNAc-MATERIALIEN

[0185] Kosmetische Anwendungen von erfindungsgemäßem p-GlcNAc können die Herstellung von Produkten für Haar- und Hautpflege aufweisen, sind aber nicht darauf beschränkt. Hautpflegeprodukte können zum Beispiel Kosmetika, die deacetylierte p-GlcNAc-Salze, Carboxymethyl-p-GlcNAc enthaltende Produkte verwenden, und kosmetische Packungen, die deacetyliertes p-GlcNAc und solche Derivate wie Hydroxypropyl-, N-Succinyl- und quaternäre p-GlcNAc-Derivate enthalten, aufweisen. Haarprodukte können zum Beispiel Carboxymethyl-p-GlcNAc enthaltende Produkte und filmbildende p-GlcNAc-Derivate enthalten.

5.6.5 VERFAHRENSTECHNISCHE ANWENDUNGEN VON p-GlcNAc-MATERIALIEN

[0186] Das erfindungsgemäße pGLcNAc und seine Derivate umfassen eine Auswahl von Anwendungen, die für die verfahrenstechnische Industrie nützlich sind. Zum Beispiel kann p-GlcNAc als Haftmittel zur Adhäsion von Metallen an Polymeren angewendet werden, Membranen, die durch Glycol-p-GlcNAc gebildet werden, können für Entsalzungsanwendungen verwendet werden und Membranen, die durch andere p-GlcNAc-Derivate gebildet werden, können zum Transport von Halogenionen verwendet werden. Andere Anwendungen können die Herstellung von Flammschutzmittel und die Herstellung von Metallchelierungverbindungen und Verbindungen betreffen, die in der Lage sind, Spuren- und Schwermetalle von Flüssigkeiten sowie wasserlösliche industrielle Verunreinigungen, wie beispielsweise PCB, zu entfernen. p-GlcNAc kann und/oder p-GlcNAc-Derivate können für photographische Anwendungen benutzt werden. Zum Beispiel kann die Fähigkeit von p-GlcNAc und/oder p-GlcNAc-Derivaten zur Chelierung von Metallen, wie beispielsweise Silberhalogeniden, durch Kontaktieren von photographischen Lösungen zum Umgießen von Matten, wie beispielsweise dünnen Membranen, von p-GlcNAc und/oder p-GlcNAc-Derivaten verwendet werden.

6. BEISPIEL: PHYSIKALISCHE CHARAKTERISIERUNG VON REINEN p-GlcNAc-PRÄPARATEN

[0187] In diesem Beispiel werden Zirkulardichroismus (CD) und Infrarotspektral(IR)-Analysen von p-GlcNAc und deacetylierten p-GlcNAc-Membranen vorgestellt.

6.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN p-GlcNAc und herkömmliche „Chitin"-Präparate:

[0188] Das in den CD-Studien verwendete p-GlcNAc wurde unter Verwendung von dem oben in Abschnitt 5.3.1 beschriebenen Reinigungsverfahren mittels mechanischer Kraft hergestellt.

[0189] Herkömmliches „Chitin" wurde von NovaChem, Ltd., PO Box 1030 Armdale, Halifax, Nova Scotia, Canada B3L 4K9 gekauft.

[0190] Die in den IR-Studien verwendeten p-GlcNAc-Membranen wurden entweder durch das Reinigungsverfahren mittels mechanischer Kraft, wie oben im Abschnitt 5.3.1 beschrieben, oder durch das chemisch/biologische Reinigungsverfahren, wie oben im Abschnitt 5.3.2 beschrieben, hergestellt, wie angegeben.

[0191] Die im Handel erhältlichen „p-GlcNAc"-Präparate wurden zu Membranen gegossen, und zwar durch Lösen in einer Dimethylacetamidlösung mit 5 % Lithiumchlorid und Überschichten auf destilliertem, entionisiertem Wasser bis zum Ausfällen von Membranen.

[0192] p-GlcNAc-Derivate und Behandlungen: Das deacetylierte p-GlcNAc , das sowohl für die CD- als auch IR-Studie verwendet wurde, wurde durch Behandeln des p-GlcNAC mit 50 % NaOH bei 50°C 2 Stunden lang hergestellt. Die mittels Wärme denaturierten p-GlcNAc-Membranen, die bei den IR-Studien verwendet wurden, wurden durch Kochen in 0,2 mM EDTA für 3 Minuten modifiziert. Autoklaviertes p-GlcNAc wurde 30 Minuten bei 122°C autoklaviert.

[0193] CD-Verfahren: Festkörper-CD-Verfahren wurden im Wesentlichen gemäß Domard durchgeführt (Domard, A., 1986, Int. J. Macromol. 8:2343–246).

6.2. ERGEBNISSE

6.2.1 CD-ANALYSE

[0194] Bei den CD-Spektren, die von unbehandelten p-GlcNAc (**Fig.** 3A) erhalten wurden, wurden die erwarteten n-π^* und n-π^{**} optisch aktiven elektronischen Übergänge (220 – 185 nM) aufgrund des Vorhandenseins der Carbonylgruppe in der Acetylkomponente von p-GlcNAc beobachtet. Solche Peaks fehlen völlig in dem CD-Spektrum, das von dem deacetylierten p-GlcNAc-Produkt erhalten wurde, wie in der **Fig.** 3B gezeigt.

6.2.2 IR-SPEKTRALANALYSE

[0195] Die in dieser Studie erhaltenen IR-Spektren stimmen mit dem chemischen Aufbau von p-GlcNAc überein. Darüber hinaus weist die scharte Abgrenzung von jedem IR-Peak auf das Vorhandensein eines bestimmten und regelmäßigen (d.h. pseudokristallinen) Aufbaus in den p-GlcNAc-Fasern hin. Siehe **Fig.** 4A für das IR-Spektrum von p-GlcNAC, das mittels des Reinigungsverfahrens mit mechanischer Kraft gereinigt wird, und **Fig.** 4D für das IR-Spektrum von p-GlcNAc, das mittels des chemischen/biologischen Verfahrens gereinigt wurde. Zum Vergleich siehe **Fig.** 4B, das das IR-Spektrum eines im Handel erhältlichen „-Chitin"-Präparats zeigt.

[0196] Das von dem autoklavierten p-GlcNAc-Material erhaltene IR-Spektrum (**Fig.** 4E) unterscheidet sich sichtbar nicht von dem IR-Spektrum, das in der **Fig.** 4A beobachtet wird. Diese Daten weisen darauf hin, dass das p-GlcNAc-Material durch Autoklavieren ohne Verlust des Polymeraufbaus sterilisiert werden kann.

7. BEISPIEL 7: REINIGUNG VON p-GlcNAC UNTER VERWENDUNG DES REINIGUNGSVERFAHRENS MITTELS MECHANISCHER KRAFT

[0197] In diesem Abschnitt wurde das p-GlcNAc unter Verwendung des oben im Abschnitt 5.3.1 beschriebenen Verfahrens mittels mechanischer Kraft gereinigt.

7.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN/ERGEBNISSE

[0198] Kieselalgenkulturbedingungen: Die Kieselalgenart Thallasiosira fluviatilis wurde in einer Kultur gemäß den oben im Abschnitt 5.1 und 5.2 beschriebenen Verfahren wachsen gelassen.

[0199] REM-Verfahren: Die hier angewendeten REM-Verfahren sind wie die unten im Abschnitt 12.1 beschrieben.

[0200] p-GlcNAc-Reinigungsverfahren: p-GlcNAC wurden von der Kieselalgenkultur unter Verwendung des oben im Abschnitt 5.3.1 beschriebenen Verfahrens mittels mechanischer Kraft gereinigt. Insbesondere wurden die p-GlcNAc-Fasern von den Kieselalgenzellkörpern getrennt, indem der Inhalt der Kultur drei kurzen Bursts auf der höchsten Mischstufe in einem Waning-Mischer unterworfen wurden. Die Gesamtzeit der drei Bursts betrug etwa eine Sekunde. Die sich ergebende Suspension wurde bei 3500 U^{-1} in einem Sorvall GS-4 Winkelrotor 20 Minuten lang bei etwa 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und wieder zentrifugiert, dieses Mal bei 4000 U^{-1} in einem Sorvall GS-4 Winkelrotor für 20 Minuten bei etwa 10°C. Der Überstand wurde noch einmal dekantiert und bei 4000 U^{-1} bei 10°C zentrifugiert. Der abschließende Überstand der dritten Zentrifugation war klar, mit wenigen – bis keinen – sichtbaren Flocken, die in der Flüssigkeit schwammen. Der klare Überstand wurde in eine Buchner-Filtrationseinheit mit Nitrocellulose mit einer Porengröße von ,0,8 µm dekantiert, danach wurde abgesaugt und die Flüssigkeit wurde aus der Fasersuspension filtriert, wodurch sich die Fasern auf der Membran sammelten. Die gesammelten Fasern wurden mit 1 Liter destilliertem entionisiertem H_2O bei 70°C gewaschen. Nachdem fast das gesamte Wasser abgelassen war, wurden die Fasern unter Absaugung mit 1 Liter 1 N HCl bei 70°C gewaschen. Nachdem der Hauptteil der Säurelösung abgelassen war,

wurden die Fasern mit 1 Liter destilliertem entionisiertem H_2O bei 70°C unter Verwendung einer Absaugung gewaschen. Als das meiste Waschwasser abgelassen war, wurden die Fasern mit 1 Liter 95 % Ethanol bei Raumtemperatur gewaschen, und es wurde ein Vakuum angelegt. Die Filtermembran, auf der sich die weiße Fasermembran angesammelt hatte, wurde dann von der Filtrationseinheit entfernt, und die Membran und ihr Membranträger wurden in einem Trockenofen bei 58°C 20 Minuten lang getrocknet, wonach die Membran und ihr Träger für 16 Stunden in einen Exsikkator gegeben wurden.

[0201] Nach diesem Reinigungsverfahren betrug die p-GlcNAc-Ausbeute von einer 1000 ml Kultur 6,85 Milligramm pro Liter Kieselalgenkultur. REM-Fotos der Membran, die durch das Sammeln der p-GlcNAC-Fasern mit diesem Verfahren gebildet wurden, ist in den **Fig.** 6A bis 6B gezeigt.

8. BEISPIEL: REINIGUNG VON p-GlcNAC UNTER VERWENDUNG DES BIOLOGISCHEN/CHEMISCHEN REINIGUNGSVERFAHRENS

[0202] In diesem Abschnitt wurde das p-GlcNAc unter Verwendung von zwei der chemischen/biologischen, oben im Abschnitt 5.3.2 beschriebenen Verfahren gereinigt. p-GlcNAc wurde mittels HF-Behandlung in einem Fall und in dem zweiten Fall mittels Säurebehandlung/Neutralisation gereinigt.

8.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN/ERGEBNISSE

[0203] Kieselalgenkulturbedingungen: Die Kieselalgenart Thallasiosira fluviatilis wurde in einer Kultur gemäß den oben im Abschnitt 5.1 und 5.2 beschriebenen Verfahren wachsen gelassen.

[0204] REM-Verfahren: Die in dieser Studie verwendeten Verfahren waren wie unten im Abschnitt 12.1 beschrieben.

[0205] Reinigungsverfahren: Zuerst wurde p-GlcNAc mittels HF-Behandlung gereinigt, wobei die Ergebnisse in den **Fig.** 7A–7B gezeigt sind. Insbesondere unter einem Abzug wurde 2,42 ml einer 49-%igen (29 N) HF-Lösung zu dem Kieselalgeninhalt der Kultur bei Raumtemperatur pro 1000 ml des Volumens der ursprünglichen Zellkultur gegeben, was zu einer HF-Lösung mit 0,07 M führte. Das Gemisch wurde dann kräftig für etwa 30 Sekunden geschüttelt, was zu einem hartnäckigen Schaum über der Flüssigkeit führte. Der Behälter wurde dann ungestört für 5–6 Stunden stehen gelassen, damit sich schwere Teilchen absetzen konnten. Am Ende dieser Zeit hatte sich eine Schaumschicht gebildet, während die Flüssigkeit selbst in zwei Schichten geteilt war: zuerst eine schmale, stark dunkelgrüne Schicht, die auf dem Boden des Behälters unter einer zweiten, viel heller gefärbten, graugrünen und trüben Phase ruhte, die vielleicht 85–90 % des gesamten Volumens der Flüssigkeit darstellte. Die Schaumschicht wurde dann unter Verwendung eines Kapillarglasröhrchens und mittels Vakuumabsaugung sorgfältig abgehebert. Der gräuliche, trübe Überstand wurde dann abgehebert, wobei darauf geachtet wurde, dass die dunkle Bodenschicht, die hauptsächlich aus abgesetzten Zellkörpern bestand, nicht zerstört wurde und auf einen separaten Kunststoffbehälter übertragen wurde. Der gräuliche trübe Überstand wurde ungestört für weitere 16 Stunden stehen gelassen. Die Flüssigkeit war anfänglich fast farblos, hellgrau, aber nicht transparent. Nach 16 Stunden Absetzzeit verblieb eine kleine Menge an Schaum oben auf dem Hauptkörper der Flüssigkeit und eine kleine Menge an grüner Materie hatte sich am Boden des Behälters abgesetzt. Die Flüssigkeit war farblich heller aber noch nicht transparent. Der Schaum oben auf der Flüssigkeit wurde wie zuvor abgehebert. Der Hauptkörper der Flüssigkeit wurde dann sorgfältig abgehebert, wodurch die kleine Menge an abgesetztem grünem Material am Boden des Behälters zurückblieb. Die so isolierte Flüssigkeit enthielt den Hauptteil der p-GlcNAc-Fasern und einige Verunreinigungen.

[0206] Um Proteine und andere unerwünschte Stoffe zu entfernen, die aus den Kieselalgen in den vorangehenden Schritten des Verfahrens von der Faser enthaltenden Flüssigkeit freigesetzt wurden, wurde die Suspension aus Fasern und Zellresten mit Natriumdodecylsulfat (SDS) gewaschen. Insbesondere wurde das notwendige Volumen einer 20%-igen SDS-Lösung zugesetzt, um eine Endkonzentration der Flüssigkeit von 0,5 Vol.-% SDS zu ergeben. Der Behälter, der die Flüssigkeit enthielt, wurde versiegelt, in einer horizontalen Lage auf einer Schüttelmaschine gesichert und 24 Stunden lang bei etwa 100 Schüttelbewegungen pro Minute gerührt. Bald nach dem Beginn des Schüttelns tauchten große Flocken von weißen p-GlcNAc-Fasern in der Suspension auf, und eine beträchtliche Menge an Schaum sammelte sich im Kopfraum des Behälters an. Am Ende der SDS-Waschung wurde der Inhalt der Behälter auf eine Buchner-Filtrationsapparatur mit einer 0,8 µm (Supor Filter, Gelman) Filtermembran übertragen. Die Flüssigkeit wurde unter Absaugen filtriert, und die p-GlcNAc-Fasern in der Flüssigkeit wurden auf der Filtermembran gesammelt.

[0207] Die p-GlcNAc-Fasern, die auf der Filtermembran gesammelt wurden, wurden dann weiter gewaschen.

Zuerst wurden die Fasern mit heißem (70°C), destilliertem, entionisiertem H_2O unter Verwendung von dreimal dem Volumen der ursprünglichen Suspension gewaschen. Mit einem Wasserstrahl wurden unter Verwendung von destilliertem entionisiertem H_2O die weißen Faserklumpen, die auf der Filtermembran des Buchner-Filters gesammelt wurden, in einen Waring-Mischer gegeben, und die Faserklumpen wurden mit etwa 10 kurzen Mischbursts aufgeschlossen. Die Suspension der aufgeschlossenen Fasern wurde auf einen Buchner-Filtertrichter übertragen, der mit einer Nitrocellulosefiltermembran, wie oben beschrieben, ausgestattet war, und die Flüssigkeit wurde unter Absaugen entfernt. Die gesammelten Fasern wurden mit 1000 ml heißem (70°C) 1 N HCl-Lösung gewaschen und anschließend weiter mit 1000 ml heißem (70°C) destilliertem, entionisiertem H_2O gewaschen. Schließlich wurden die Fasern mit 1000 ml 95%igem Ethanol bei Raumtemperatur gewaschen und zur Trockene filtriert. Die Fasermembran und die die Fasermembran tragende Filtermembran wurden dann in einem Trockenofen bei 58°C 20 Minuten lang getrocknet. Die Membran und der Membranträger wurden dann 16 Stunden lang in einen Exsikkator untergebracht. Die Membran wurde dann sorgfältig von der Filtermembran abgenommen.

[0208] Zweitens wurde das p-GlcNAc unter Verwendung des oben im Abschnitt 5.3.2 beschriebenen Säurebehandlungs/Neutralisationsverfahrens gereinigt. Insbesondere wurde das p-GlcNAc, wie zuvor in diesem Abschnitt beschrieben, bis vor dem SDS-Waschschritt verarbeitet, zu diesem Zeitpunkt wurde durch Hinzufügen einer 2,9 M Tris-Lösung die Lösung auf einen pH-Wert von etwa 7,0 neutralisiert. Die pGlcNAc-Ausbeute von diesem Reinigungsverfahren betrug 20,20 Milligramm pro Liter Kieselalgenkultur. Im Durchschnitt werden ungefähr 60 Milligramm pro Liter Kieselalgenkultur erhalten. REM-Mikroaufnahmen von Membranen, die während des Reinigungsverfahrens gebildet werden, sind in den **Fig.** 8A–8B und 9A–9E gezeigt.

9. BEISPIEL: p-GlcNAc-DEACETYLIERUNG

[0209] Eine p-GlcNAc-Membran wurde in einer 50 % NaOH enthaltenden Lösung suspendiert. Die Suspension wurde bei 80°C 2 Stunden lang erwärmt. Die sich ergebende, deacetylierte Membran wurde getrocknet und durch Rasterelektronenmikroskopie untersucht, wie in den **Fig.** 11A–11B gezeigt.

10. BEISPIEL: p-GlcNAc-BIOKOMPATIBILITÄT

[0210] Bei diesem Beispiel wird gezeigt, dass das erfindungsgemäße p-GlcNAc keine erfassbare biologische Reaktivität zeigt, wie mittels Elutionstests, intramuskulärer Implantation in Kaninchen, intrakutaner Injektion in Kaninchen und systemischer Injektionen bei Mäusen untersucht.

10.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN

10.1.1 ELUTIONSTEST

[0211] Bedingungen für den Elutionstest waren an die Richtlinien in der U.S. Pharmacopeia XXII, 1990, Seite 1415–1497 und der U.S. Pharmacopeia XXII, Ergänzung 5, 1991, Seite 2702–2703 angepasst.

[0212] Zellkultur: Es wurde die Zelllinie Mausfibroblast L929 (American Type Culture Collection Rockville, MD; ATCC Nr. CCL1, NCTC Klon 929) verwendet. Eine 24-stündige konfluente Monoschicht von L929-Zellen wurde in komplettem Minimum Essential Medium (MEM) verbreitet.

[0213] GlcNAc: Eine feste p-GlcNAc-Membran, die nach dem Reinigungsverfahren mittels mechanischer Kraft, wie oben im Abschnitt 5.3.1 beschrieben, hergestellt worden war, wurde in 20 ml mittels Serum ergänztem MEM nach den Anforderungen von U.S. Pharmacopeia XXII (1990) extrahiert.

[0214] Kontrollen: Naturkautschuk wurde als positive Kontrolle verwendet, und Silikon wurde als negative Kontrolle verwendet. Die Kontrollen wurden auf dieselbe Weise wie der Testgegenstand, p-GlcNAc, getestet.

[0215] Extrakte: Die Extrakte wurden bei 37°C in einer angefeuchteten Atmosphäre mit 5 % Kohlendioxid 24 Stunden lang hergestellt. Die Extrakte wurde auf eine Änderung des pH-Wert bewertet, und es wurden Einstellungen vorgenommen, um den pH-Wert auf innerhalb +/– 0,2 pH-Einheiten des ursprünglichen Mediums zu bringen. Die Einstellungen wurden mit einem niedrigeren HCl-Extrakt-pH zusammen mit $NaHCO_3$ gemacht, um den pH-Wert des Extrakts zu erhöhen. Die Extrakte wurden durch Leiten durch ein 0,22 µm Filter sterilfiltriert, bevor sie auf die Zellmonoschicht aufgebracht wurden.

[0216] Dosierung: 3 ml p-GlcNAc oder Kontrollextrakte wurden verwendet, um das Medium der Zellkulturen

zu ersetzen. Alle Extrakte wurden doppelt getestet.

[0217] Bewertungskriterien: Das Ansprechen der Zellmonoschicht wurde entweder visuell oder unter einem Mikroskop bewertet. Die biologische Reaktionsfähigkeit, d.h. die zellulare Degeneration und/oder Fehlbildung, wurde auf einer Skala von 0 bis 4 bewertet, wie unten gezeigt. Das Testsystem ist geeignet, wenn keine Zeichen einer zellularen Reaktivität (Wert 0) für den negativen Kontrollgegenstand beobachtet wurden, und der positive Kontrollgegenstand zeigt eine stärkere als milde Reaktionsfähigkeit (Wert 2). Der Testgegenstand (d.h. p-GlcNAc) erfüllt den Biokompatibilittätstest, wenn keine der Kulturen, die mit dem Testgegenstand behandelt wurden, eine stärker als milde Reaktionsfähigkeit zeigen.

Wert	Reaktions-fähigkeit	Beschreibung der Reaktionsfähigkeitszone
0	keine	definiertes intracytoplasmatisches Granulat; keine Zelllyse
1	leicht	nicht mehr als 20 % der Zellen sind rund, lose angelagert und ohne intracytoplasmatisches Granulat; gelegentlich sind lysierte Zellen vorhanden
2	mild	nicht mehr als 50 % der Zellen sind rund und ohne intracytoplasmatisches Granulat; ausgedehnte Zelllyse und leere Gebiete zwischen den Zellen
3	moderat	nicht mehr als 70 % der Zellschichten enthalten gerundete Zellen und/oder sind lysiert
4.	stark	fast vollständige Zerstörung der Zellschichten

10.1.2 INTRAMUSKULÄRE IMPLANTATIONEN

[0218] Tiere: Gesunde, weiße Neuseeland-Kaninchen, männlich und weiblich (Eastern Rabbit Breeding Laboratory, Taunton MA) wurden verwendet. Die Kaninchen wurden einzeln unter Verwendung von aufgehängten Käfigen aus rostfreiem Stahl untergebracht. Nach dem Empfang wurden die Tiere 8 Tage lang unter denselben Bedingungen, wie für den eigentlichen Test in Quarantäne gehalten. Hartholzspäne (Sani-chps™, J.P. Murphy Forest Products, Montvale, NJ) wurden als nicht kontaktierende Streu unter den Käfigen verwendet. Die Tierbehausung wurde bei einer Temperatur von 68° +/– 3°F mit einer relativen Feuchtigkeit von 30–70 %, einem Minimum von 10-13-fachem vollständigem Luftaustausch pro Stunde und einer 12-stündigen Hell/dunkel-Zyklus unter Verwendung der Vollspektrums-Fluoreszenzlichtern gehalten. Die Tiere erhielten im Handel erhältliches Futter (Agway ProLab, Waverly, NY) unter kontrollierten Bedingungen und Leitungswasser aus dem öffentlichen Wassernetz ad libitum. Es waren keine bekannten Verunreinigungen in dem Futter, der Streu oder dem Wasser vorhanden, die erwartungsgemäß die Testergebnisse störten. Die für die Studie ausgewählten Tiere wurden aus einer größeren Gruppe von Tieren ausgewählt. Die Kaninchen wurden auf die nächsten 10 g gewogen und einzeln durch eine Tätowierung im Ohr identifiziert.

[0219] p-GlcNAc: Das verwendete p-GlcNAc war wie oben im Abschnitt 10.1.1 beschrieben.

[0220] Implantationstest: Es wurden für jeden Implantationstest zwei Kaninchen verwendet. Am Tag des Tests wurde die Haut der Tiere an beiden Seiten der Wirbelsäule kahl geschoren. Jedes Tier wurde betäubt, um eine Muskelbewegung zu verhindern. Unter Verwendung von sterilen subkutane Nadeln und Sonden wurden vier Streifen des Test-p-GlcNAc (1 mm × 1 mm × 10 mm) in den paravertebralen Muskel an einer Seite der Wirbelsäule von jedem der beiden Kaninchen implantiert (2,5 bis 5 cm von der Mittellinie, parallel zu der Wirbelsäule und etwa 2,5 cm voneinander). Auf ähnliche Weise wurden zwei Streifen des USP-negativen Kontrollkunststoffs RS (1mm × 1 mm × 10 mm) in den gegenüberliegenden Muskel jedes Tiers implantiert. Die Tiere wurden über eine Dauer von 7 Tagen erhalten. Am Ende des Beobachtungszeitraums wurden die Tiere gewogen und durch ein injizierbares Barbiturat, Euthanasia-5 (Veterinary Laboratories, Inc. Lenexa, KS), euthanasiert. Es wurde ausreichend Zeit verstreichen gelassen, damit das Gewebe ohne Bluten geschnitten werden

konnte. Das Gebiet des Gewebes, das den Mittelabschnitt jedes Implantationsstreifen umgab, wurde makroskopisch unter Verwendung eines Vergrößerungsglases untersucht. Blutung, Nekrose, Entfärbungen und Infektionen wurden unter Verwendung der folgenden Skala bewertet: 0 = Normal, 1 = mild, 2 = mäßig und 3 = stark. Die Verkapselung, so weit vorhanden, wurde durch Messen der Breite der Kapsel (d.h. der Abstand von dem Rand des Implantats zu dem Rand der Kapsel), auf die nächsten 0,1 mm gerundet, bewertet. Die Verkapselung wurde wie folgt bewertet:

Kapselbreite	Bewertung
Keine	0
bis zu 0,5 mm	1
0,6 – 1,0 mm	2
1,1 – 2,0 mm	3
größer als 2,0 mm	4

[0221] Der Unterschied zwischen der durchschnittlichen Bewertung für das p-GlcNAc und den positiven Kontrollgegenstand wurde berechnet. Der Test wird als negativ angesehen, wenn bei jedem Kaninchen der Unterschied zwischen der durchschnittlichen Bewertung für jede Kategorie von biologischer Reaktion für das p-GlcNAc und die positiven Kontrollkunststoffimplantatstellen 1,0 nicht übersteigt; oder wenn der Unterschied zwischen der mittleren Bewertung für alle Kategorien von biologischer Reaktion für jeden p-GlcNAc-Gegenstand und die durchschnittliche Bewertung für alle Kategorien bei nicht mehr als einem der vier p-GlcNAc-Streifen für die positiven Kontrollkunststoffimplantatstellen 1,0 nicht übersteigt.

10.1.3 INTRAKUTANE INJEKTIONEN

[0222] Tiere: Es wurden weiße Neuseeland-Kaninchen verwendet und wie oben im Abschnitt 10.1.2 beschrieben gehalten.

[0223] p-GlcNAc: Eine feste p-GlcNAc-Membran, die gemäß dem oben im Abschnitt 5.3.1 beschriebenen Reinigungsverfahren mittels mechanischer Kraft hergestellt worden war, wurde in einen Extraktionskolben gelegt, dem 20 ml des geeigneten Mediums zugesetzt waren. Die Extraktionen wurden durch Erwärmen auf 70° 24 Stunden lang durchgeführt. Nach diesem Verfahren wurden die Extrakte auf Raumtemperatur gekühlt. Jede Extraktionsflasche wurde vor der Verabreichung kräftig geschüttelt.

[0224] Intrakutaner Test: Am Tag des Tests wurden die Tiere an der dorsalen Seite geschoren. Ein Volumen von 0,2 ml jedes p-GlcNAc-Extrakts wurde intrakutan an fünf Stellen auf einer Seite der beiden Kaninchen injiziert. Mehr als ein p-GlcNAc-Extrakt wurde pro Kaninchen verwendet. An fünf Stellen auf der anderen Seite von jedem Kaninchen wurde 0,2 ml der entsprechenden Kontrolle injiziert. Die Injektionsstellen wurden 24, 48 und 72 nach der Injektion auf Zeichen von Erythem, Ödem und Nekrose untersucht. Die Beobachtungen wurden gemäß der Draize-Skala für die Bewertung einer Hautreaktion (USP Pharmacopeia XXII, 1990, 1497–1500; USP Pharmacopeia XXII, Ergänzung 5, 1991, 2703–2705) wie unten in der Tabelle II gezeigt, bewertet:

TABELLE II

Draize-Skala zum Bewertung von Hautreaktionen

	WERT
Erythem und Schorfbildung	
Kein Erythem	0
Sehr leichtes Erythem (kaum wahrnehmbar)	1
Gut abgegrenztes Erythem	2
Mäßiges bis starkes Erythem	3
Starkes Erythem (starke Rötung) bis leichte Schorfbildung (tiefgehende Verletzungen)	4
Insgesamt mögliche Erythembewertung = 4	
Ödembildung	
Kein Ödem	0
Sehr leichtes Ödem (kaum wahrnehmbar)	1
Leichtes Ödem (Ränder sind durch eine eindeutige Schwellung klar abgegrenzt)	2
Mäßiges Ödem (Schwellung etwa 1 mm und über den Expositionsbereich hinaus)	3
starkes Ödem (Schwellung mehr als 1 mm über den Expositionsbereich hinaus)	4
insgesamt mögliche Ödenbewertung = 4	

[0225] Alle Erythem- und Ödembewertungen bei 24, 48 und 72 Stunden wurden getrennt addiert und durch 12 geteilt (d.h. 2 Tiere × 3 Bewertungszeiten × 2 Bewertungskategorien), um die mittlere Gesamtbewertung für das p-GlcNAc gegenüber der entsprechenden Kontrolle zu bestimmen. Die Tiere wurden am Ende des Beobachtungszeitraums gewogen und durch Injizieren eines Barbiturats, Euthanasia-5 (Veterinary Laboratories, Inc. Lenexa, KS) euthanasiert. Die Ergebnisse des Tests werden erreicht, wenn der Unterschied zwischen dem p-GlcNAc und den Kontrollmittelreaktionsbewertungen (Erythem/Ödem) 1,0 oder weniger ist.

10.1.4 SYSTEMISCHE INJEKTIONEN

[0226] Tiere: Schweizer Albinomäuse (Mus musculus), weiblich (Charles River Breeding Laboratories, Wilmington, MA) wurden verwendet. Gruppen von 5 Mäusen wurden in Polypropylenkäfigen untergebracht, die mit Deckeln aus rostfreiem Stahl ausgestattet waren. Hartholzspäne (Sani-chips™, J.P. Murphy Forest Products, Montvale, NJ) wurde als Kontaktstreu in den Käfigen verwendet. Die Tierbehausung wurde als Gebiet mit beschränktem Zugang gehalten. Die Tierräume wurden bei einer Temperatur von 68 +/– 3°F, mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 30–70 %, einem Minimum des 10-13-fachem vollständigen Luftaustauschs pro Stunde und einem 12-stündigen Hell/dunkel-Zyklus unter Verwendung von Vollspektrums-Fluoreszenzlichtern gehalten. Die Mäuse erhielten im Handel erhältliches Futter und Leitungswasser aus dem öffentlichen Wassernetz ad libitum. Es waren keine bekannten Verunreinigungen in dem Futter, der Streu oder dem Wasser vorhanden, die erwartungsgemäß die Testergebnisse störten. Die für die Studie ausgewählten Tiere wurden aus einer größeren Gruppe von Tieren ausgewählt, die Mäuse auf die nächsten 0,1 g gewogen und einzeln durch

und einzeln durch Ohrklips identifiziert.

[0227] p-GlcNAc: Die verwendeten Proben waren wie oben im Abschnitt 10.1.1 beschrieben. Es wurden Extrakte wurden gemäß den oben im Abschnitt 10.1.3 beschriebenen Verfahren hergestellt.

[0228] Systemischer Injektionstest: Gruppen von 5 Mäusen wurde entweder p-GlcNAc-Extrakt oder ein entsprechender Kontrollgegenstand in denselben Mengen und auf dieselbe Weise, wie nachstehend aufgeführt, injiziert:

Testgegen-Stands- oder Kontroll-Gegenstands-extrakte	Dosierungsweg	Dosis/kg	Injektionsrate
0,9 % Natrium-chloridinjektion, USP (0,9 % NaCl)	intravenös	50 ml	0,1 ml/sec
1 in 20 Alkohol in 0,9 % Natrium-chloridinjektion USP (EtOH:NaCl)	intravenös	50 ml	0,1 ml/sec
Polyethylenglycol 400 (PEG 400)	intraperitoneal	10 g	-
baumwollöl (CSO)	intraperitoneal	50 ml	-

[0229] Extrakte des mit PEG 400 hergestellten p-GlcNAc und die entsprechende Kontrolle wurden mit 0,9 % NaCl verdünnt, um 200 mg PEG 400 pro ml zu erhalten. Für den intrakutanen Test wurde PEG 400 mit 0,9 % NaCl verdünnt, um 120 mg PEG 400 pro ml zu erhalten.

[0230] Die Tiere wurden direkt nach der Injektion, 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden nach der Injektion beobachtet. Die Tiere wurden am Ende des Beobachtungszeitraums gewogen und durch das Ausgesetztsein einem Kohlendioxidgas euthanasiert. Die Anforderungen für die Tests sind erreicht, wenn keines der Tiere, die mit dem p-GlcNAc behandelt wurden, eine wesentlich größere biologische Reaktionsfähigkeit als die Tiere zeigt, die mit dem Kontrollgegenstand behandelt worden waren.

10.2 ERGEBNISSE

10.2.1 ELUTIONSTEST

[0231] Die Reaktion der Zellmonoschicht auf den p-GlcNAc-Testgegenstand wurde visuell und unter einem Mikroskop bewertet. Es wurde für diese Bewertung keine cytochemischen Färbemittel verwendet. Es wurden 48 Stunden nach dem Aussetzen des negativen Kontrollgegenstands oder des p-GlcNAc keine Zeichen einer zellulären biologischen Reaktionsfähigkeit (Wert 0) beobachtet. Eine starke Reaktionsfähigkeit (Wert 4) wurde für den positiven Kontrollgegenstand festgestellt, wie unten in der Tabelle III gezeigt:

TABELLE III

Reaktionsfähigkeitswerte

Zeit	p-GlcNAc		Kontrollgegenstände negativ		positiv	
	A	B	A	B	A	B
0 Stunden	0	0	0	0	0	0
24 Stunden	0	0	0	0	4	4
48 Stunden	0	0	0	0	4	4

[0232] Das erfindungsgemäße p-GlcNAc erfüllt daher die Anforderungen des Elutionstest bezüglich der Biokompatibilität und ist so nicht cytotoxisch.

10.2.2 INTRAMUSKULÄRE IMPLANTATIONEN

[0233] Beide getesteten Kaninchen (A und B) nahmen an Gewicht zu und zeigten keine Anzeichen einer Toxizität. Siehe Tabelle IV bezüglich der Daten. Darüber hinaus gab es keine offenkundigen Zeichen einer Toxizität, die in beiden Tieren festgestellt wurden. Die makroskopische Bewertung der Test- und Kontrollgegenstands-Implantatstellen zeigten keine Entzündung, Verkapselung, Blutung, Nekrose oder Entfärbung. Siehe Tabelle IV bezüglich der Ergebnisse. Der Test zeigt daher, dass das untersuchte p-GlcNAc keine biologischen Reaktionsfähigkeiten zeigt, insofern als bei jedem Kaninchen der Unterschied zwischen den durchschnittlichen Bewertungen für alle Kategorien biologischer Reaktion für alle p-GlcNAc-Implantatstellen und die durchschnittliche Bewertung für alle Kategorien für alle Kontrollimplantatstellen 1,0 nicht überstieg.

TABELLE IV

IMPLANTATIONSTEST

(makroskopische Beobachtungen)

Testgegenstand: p-GlcNAc

Tierart: Kaninchen

Tier #: A

Gewebestelle:	T1	T2	T3	T4	Testdurch-schnitt	C1	C2	Kontroll-durchschnitt
Entzündung	0	0	0	0	0	0	0	0
Verkapselung	0	0	0	0	0	0	0	0
Blutung	0	0	0	0	0	0	0	0
Nekrose	0	0	0	0	0	0	0	0
Entfärbung	0	0	0	0	0	0	0	0
Gesamt	0	0	0	0		0	0	
Mittl. Bewertg. (insges./5)	0	0	0	0		0	0	

DURCHSCHNITTLICHER KONTROLLWERT : 0

DE 694 33 692 T2 2005.03.10

Fortsetzung **TABELLE IV**

Tier #: B

Gewebestelle:	T1	T2	T3	T4	Testdurch-schnitt	C1	C2	Kontroll-durchschnitt
Entzündung	0	0	0	0	0	0	0	0
Verkapselung	0	0	0	0	0	0	0	0
Blutung	0	0	0	0	0	0	0	0
Nekrose	0	0	0	0	0	0	0	0
Entfärbung	0	0	0	0	0	0	0	0
Gesamt	0	0	0	0		0	0	
Mittl. Bewertg. (insges./5)	0	0	0	0		0	0	

DURCHSCHNITTLICHER KONTROLLWERT: 0

DE 694 33 692 T2 2005.03.10

10.2.3 INTRAKUTANER TEST

[0234] Alle Tiere nahmen an Gewicht zu. Siehe Tabelle IV bezüglich der Daten. Es wurden keine Anzeichen eines Erythems oder Ödems an den p-GIcNAc- oder Kontrollgegenstandsstellen beobachtet. Offene Zeichen von Toxizität wurden bei keinem Tier beobachtet. Weil der Unterschied zwischen den mittlern Reaktionsbewertungen des p-GIcNAc- und Kontrollgegenstands (Erythem/Ödem) weniger als 1,0 betrug, erfüllt das p-GIcNAc die Anforderungen des intrakutanen Tests. Siehe die Tabelle IV bezüglich der Ergebnisse. Daher zeigt das p-GIcNAc keine biologische Reaktionsfähigkeit bei einer Untersuchung mit diesem Test.

TABELLE V

Intrakutaner und Implantatstest

Körpergewicht und klinische Beobachtungen

Testgegenstand: p-GlcNAc Tierart: Kaninchen

			Körpergewicht (kg)			
Gruppe	Tier #	Geschlecht	Tag 0	Tag 3	Gewichtsänderung	Anzeichen von Toxizität*
0.9 % NaCl & CSO	23113	männlich	2,51	2,55	0,04	keine
0,9 % NaCl & CSO	23114	weiblich	2,43	2,46	0,03	keine
EtoH: NaCl & PEG 400	23115	männlich	2,47	2,50	0,03	keine
EtoH: NaCl & PEG 400	23116	weiblich	2,59	2,63	0,04	keine
			Tag 0	Tag 7		
Implantat	A	männlich	2,74	2,80	0,06	keine
	B	weiblich	2,66	2,74	0,08	keine

* Zusammenfassung der Beobachtungen von Tag 0 bis Tag 7 (Implantat) und Tag 0 bis Tag 3 (intrakutan).

TABELLE VI

INTRAKUTANER TEST DRAIZE-BEWERTUNG

Testgegenstand: p-GlcNAc

(T = Test, C = Kontrolle) Tierart: Kaninchen

NaCl-Extrakt

Tier ID #	STELLENNUMMER						BEWERTUNG (ER/ED)				DURCHSCHNITT		
	Träger	T-1	C-1	T-2	C-2	T-3	C-3	T-4	C-4	T-5	C-5	Zeit:	T	C
23113	NaCl	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 h	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	48 h	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	72 h	0/0	0/0
	gesamt	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	0/0
23114	NaCl	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 h	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	48 h	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	72 h	0/0	0/0
	gesamt	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	0/0

Fortsetzung **TABELLE VI**

CSO-Extrakt

Tier ID #	STELLENNUMMER							BEWERTUNG (ER/ED)				DURCHSCHNITT		
	Träger	T-1	C-1	T-2	C-2	T-3	C-3	T-4	C-4	T-5	C-5	Zeit:	T	C
23113	cso	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 h	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	48 h	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	72 h	0/0	0/0
	gesamt	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	0/0
23114	cso	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 h	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	48 h	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	72 h	0/0	0/0
	gesamt	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	0/0

Fortsetzung **TABELLE VI**

NaCl/EtOH-Extrakt

Tier ID #	STELLENNUMMERN							BEWERTUNG (ER/ED)				DURCHSCHNITT		
	Träger	T-1	C-1	T-2	C-2	T-3	C-3	T-4	C-4	T-5	C-5	Zeit:	T	C
2311%	NaCl	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 h	0/0	0/0
	EtOH	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	48 h	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	72 h	0/0	0/0
	gesamt	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	0/0
2311&	NaCl	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 h	0/0	0/0
	EtOH	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	48 h	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	72 h	0/0	0/0
	gesamt	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	0/0

Fortsetzung **TABELLE VI**

PEG-Extrakt

Tier ID #	STELLE ZAHLEN							BEWERTUNG (ER/ED)				DURCHSCHNITT		
	Träger	T-1	C-1	T-2	C-2	T-3	C-3	T-4	C-4	T-5	C-5	Zeit:	T	C
23115	PEG	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 h	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	48 h	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	72 h	0/0	0/0
	gesamt	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	0/0
23116	PEG	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	24 h	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	48 h	0/0	0/0
		0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	72 h	0/0	0/0
	gesamt	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	0/0

DE 694 33 692 T2 2005.03.10

10.2.4 SYSTEMISCHER TEST

[0235] Alle mit dem p-GIcNAc-Extrakt oder dem Kontrollgegenstand behandelten Mäuse nahmen an Gewicht zu. Siehe Tabelle VII bezüglich der Daten. Darüber hinaus gab es keine offenkundigen Anzeichen einer Toxizität, die bei dem p-GIcNAc- oder Kontrolltier beobachtet wurden. Siehe Tabelle VI bezüglich der Ergebnisse. Es wird daher geschlossen, dass keines der p-GIcNAc-Testtiere eine signifikant größere biologische Reaktionsfähigkeit als die mit dem Kontrollgegenstand behandelten Tiere zeigten.

TABELLE VII

TIERGEWICHTE UND KLINISCHE BEOBACHTUNGEN

Gruppe	Geschlecht	Dosis (ml)	Tier #	Körpergewicht (g) Tag 0	Tag 3	Gewichtsänderung	Zeichen einer Toxiztät *
NaCl:	weiblich	1,03	I.	20,6	22,8	2,2	keine
EtOH	weiblich	1,06	II.	21,1	23,4	2,3	keine
Test	weiblich	1,02	III.	20,4	22,6	2,2	keine
50ml/kg	weiblich	1,11	IV.	22,2	24,5	2,3	keine
	weiblich	1,05	V.	21,0	23,2	2,2	keine
			Mittel	21,1	23,3		
			SD +/-	0,7	0,7		
NaCl:	weiblich	1,04	VI.	20,7	23,2	2,5	keine
EtOH	weiblich	1,04	VII.	20,8	23,5	2,7	keine
Kontrolle	weiblich	1,02	VIII.	20,3	22,3	2,0	keine
50ml/kg	weiblich	0,91	IX.	18,2	20,6	2,4	keine
	weiblich	0,94	X.	18,7	20,9	2,2	keine
			Mittel:	19,7	22,1		
			SD +/-	1,2	1,3		
PEG	weiblich	1,02	XI.	20,3	22,7	2,4	keine
Test	weiblich	0,96	XII.	19,2	21,4	2,2	keine
10ml/kg	weiblich	0,95	XIII.	18,9	21,6	2,7	keine
	weiblich	1,05	XIV.	20,9	22,7	1,8	keine
	weiblich	0,94	XV.	18,7	21,2	2,5	keine
			Mittel	19,6	21,9		
			SD +/-	1,0	0,7		
PEG	weiblich	1,01	XVI.	20,1	22,3	2,2	keine
Kontrolle	weiblich	0,99	XVII.	19,8	22,0	2,2	keine
10g/kg	weiblich	1,10	XVIII.	22,0	24,3	2,3	keine
	weiblich	1,07	XIX.	21,4	23,6	2,2	keine
	weiblich	1,03	XX.	20,6	22,4	1,8	keine
			Mittel	20,8	22,9		
			SD +/-	0,9	1,0		

* Zusammenfassung der Beobachtungen – 0, 4, 24, 48 und 72 h nach der Injektion

11. BEISPIEL: p-GIcNAc-UMFORMULIERUNGEN

[0236] In dem in diesem Abschnitt vorgestellten Arbeitsbeispiel wurde eine p-GIcNAc-Membran (16,2 mg) in 1 ml Dimethylacetamidlösung mit 5 % LiCl gelöst. Die p-GIcNAc enthaltende Lösung wurde in eine Spritze gegeben und in 50 ml reinem Wasser extrudiert, um eine Faser auszufällen. Die sich ergebende Faser wurde mit Rasterelektronenmikroskopie untersucht, wie in den **Fig.** 10A–10B gezeigt.

12. BEISPIEL: ZELLANLAGERUNG AN p-GIcNAc

[0237] Bei diesem Arbeitsbeispiel wird gezeigt, dass p-GIcNAc ein wirksamen Substrat für die Zellanlagerung und das Wachstum in Kultur dargestellt.

12.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN

[0238] Zellen: Die transformierte Maus-3T3-Fibroblastzelllinie wurde verwendet und. in DMEM, das mit 10 fötalem Rinderserum (FBS) ergänzt war, wachsen gelassen.

[0239] p-GIcNAC-Membranen: p-GIcNAc wurde nach den oben im Abschnitt 5.3.1 und 8 beschriebenen Verfahren hergestellt.

[0240] p-GIcNAc-Membranen wurden anfänglich an einem Corning Deckglas #1 (18 mm) unter Verwendung eines Tropfens Wasser angeheftet und durch Autoklavieren bei 121 °C 30 Minuten lang angelagert. Die auf diese Weise hergestellten Membranen wurden dann in Kulturlöchern von 6-Loch-Kulturplatten gegeben.

[0241] Zellzählungen: Die Zellzahlen wurden in den Medien durch direktes Zählen mit einem Hämozytometer und auf der Matrix durch ein erstes Spülen der Membranen mit frischem Medium DMEM + 10 % FBS) und anschließender Behandlung mit Trypsin (10 %, bei 37°, 5 Minuten lang) vor dem Zählen bestimmt.

[0242] REM-Betriebsbedingungen: Ein Zeiss 962 Instrument wurde mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kv und einem Arbeitsabstand von 15 mm verwendet.

[0243] Polaroid Typ 55 p/n (u4) wurde bei verschiedenen Vergrößerungen verwendet, wie angegeben. Probenbelag: Kohlenstoffbelag (100 Å) & 100 Å aupd.

[0244] Probenherstellung: Für die erste Fixierung wurde das Kulturmedium mit 2 % Glutaraldehyd in Eagles DMEM ohne Serum gegeben. Es wurden mehrere Änderungen durchgeführt, um einen vollständigen Übergang von den Wachstumsmedien zum Fixativ sicherzustellen. Die Fixierung schritt 0,5 Stunden bei Raumtemperatur voran. Es wurden Abdeckstreifen auf neue Glasfläschchen aufgebracht, die 2 % Glutaraldehyd in 0,1 M Na Cacodylat, pH 7,2, mit 0,1 M Sucrose übertragen und für weitere 1,5 Stunden bei Raumtemperatur fixiert wurden.

Dehydrierung, CPD, Beschichten mittels Anbringen und Aufstäuben:

[0245] Die Proben wurden in 0,1 M Na Cacodylat, pH 7,2, gewaschen und die Abdeckstreifen wurden auf einen CPD-Halter übertragen. Die Dehydrierung wurde in Ethanolreihen (30 %, 50 %, 74 %, 85 %, 95 % und 3 × 100 %, jeweils 5 min.) durchgeführt, und Proben wurden „Kritischer-Punkt" getrocknet. Die Abdeckstreifen wurden dann auf Al-Nasen aufgebracht, mit Kohlenstoff unter Verwendung eines Vakuum-Verdampfers (@ 100 Å) beschichtet und mit 100 Å AuPd aufgestäubt.

12.2 Ergebnisse

[0246] Die p-GIcNAc-Membranen wurden auf ihre Fähigkeit, ein Substrat zu bilden, auf dem Zellen in Kultur wachsen gelassen werden können, geprüft. Mausfibroblastzellen wurden in Löchern mit oder ohne p-GIcNAc-Membranen wachsen gelassen, und es wurden täglich Zellzählungen durchgeführt, um die Lebensfähigkeit der Kulturen zu untersuchen. Die Ergebnisse einer solchen Reihe von Zellzählungen sind in der **Fig.** 14 gezeigt. Wie angezeigt, waren bis Tag 5 nach der Plattierung nur die Löcher, die p-GIcNAc-Membranen enthielten, in der Lage, weiterhin lebensfähige Zellen zu erhalten, was zeigt, dass die p-GIcNAc-Membranen in der Lage sind, als wirksame Substrate für das fortgesetzte Wachsen von Zellen in einer Kultur zu wirken.

[0247] Weiter zeigen die REM-Mikroaufnahmen, die in den **Fig.** 15A–15B dargestellt sind, gesunde Zellen,

die stark an den p-GlcNAc-Membranen anhaften.

13. BEISPIEL: p-GlcNAc/KOLLAGEN-HYBRIDE

[0248] In diesem Arbeitsbeispiel wird die Bildung und Charakterisierung eines p-GlcNAc/Kollagen-Hybrid-Materials gezeigt.

13.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN

[0249] Materialien: Zur Herstellung der in dieser Untersuchung beschriebenen Hybride wurde Rinderkollagen vom Typ 1 verwendet. p-GlcNAc wurde nach dem oben im Abschnitt 5.3.2 beschriebenen Verfahren mittels mechanischer Kraft hergestellt.

[0250] Hybridherstellung: Suspensionen von Kollagen (10 Milligramm/ml) und p-GlcNAc (0,25 Milligramm/ml) wurden in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt, in flüssigem N_2 eingefroren (–80°C), 4 Stunden lang thermisch eingeweicht bei –9°C und lyophilisiert. Das Material wurde dehydrothermisch im Vakuum (ungefähr 0,030 Torr) bei 60°C 3 Tage lang vernetzt.

[0251] Zellkultur: Maus-3T3-Fibroblastzellen wurden auf den hergestellten Kollagen/p-GlcNAc-Hybriden wachsen gelassen. Es folgten Standardkulturverfahren und REM-Mikroaufnahmen wurden nach 8 Tagen in der Kultur angefertigt.

13.2 ERGEBNISSE

[0252] Kollagen- und p-GlcNAc-Suspensionen wurden in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt (nämlich 3:1, 1:1, 2:2 und 1:3 Kollagen:p-GlcNAc-Suspensionsverhältnisse), eingefroren, lyophilisiert und vernetzt. Ein solches Verfahren ergab Kollagen/p-GlcNAc-Platten. REM-Mikroaufnahmen der sich ergebenden Materialien sind in den **Fig.** 16B–E gezeigt. Die **Fig.** 16A zeigt ein reines Kollagen-Kontrollmaterial. Die poröse Struktur des Hybridmaterials ist zu beachten.

[0253] Die erfindungsgemäßen Kollagen/p-GlcNAc-Hybride liefern eine wirksame dreidimensionale Struktur für das Anhaften und Wachsen von Zellen, wie in den REM-Mikroaufnahmen der **Fig.** 17A–D gezeigt ist.

14. BEISPIEL: NMR-CHARAKTERISIERUNG VON REINEN p-GlcNAc-PRÄPARATEN

[0254] In diesem Beispiel wird eine NMR-Analyse (Nuklearmagnetische Resonanz) von reinen p-gIcNAc-Präparaten vorgestellt.

14.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN

[0255] p-GlcNAc-Präparate: Das in den NMR-Untersuchungen verwendete, hier beschriebene p-GlcNAc wurde unter Verwendung des oben im Abschnitt 5.3.2 beschriebenen chemischen Reinigungsverfahrens mit Flusssäure die als chemisches Reagens verwendet wurde, hergestellt.

[0256] NMR-Verfahren: Festkörper-NMR-Daten wurden unter Verwendung eines Bruker 500 MH NMR-Spektrometers erhalten. Es wurde eine Computerbildanalyse vorgenommen, um die rohen NMR-Spektrumsdaten zu transformieren und so den Hintergrund zu eliminieren und die Basislinien zu normalisieren. Ein Beispiel für solche transformierte Daten ist in der **Fig.** 18 gezeigt. Transformierte NMR-Kurven, wie beispielsweise die in der **Fig.** 18, wurden dazu verwendet, Bereiche für jeden Kohlenstoffatomtyp zu erhalten und dann die Verhältnisse CH3(bereich) zu C-Atombereich) zu berechnen. Solche Werte, die wie beschrieben erhalten wurden, sind in der **Fig.** 20 vorgestellt.

14.2 ERGEBNISSE

[0257] Die Festkörper-NMR-Daten wurden durch Messen des C^{13}-NMR-Spektrums einer 500 mg p-GlcNAc-Probe erhalten. Ein typisches NMR-Spektrum ist in der **Fig.** 19 gezeigt. Die individuellen Peaks stellen den Beitrag jedes einzelnen Kohlenstoffatoms in dem Molekül zu dem Spektrum dar. Die relative Prozentzahl für jeden Kohlenstoffatomtyp in dem Molekül wurde bestimmt, indem der Bereich des Peaks, der durch diese Kohlenstoffart erzeugt wurde, durch die Gesamtsumme der Bereiche unter allen in dem Spektrum erhaltenen NMR-Peaks bestimmt wurde. Daher war es möglich, das Verhältnis von jedem der Atome des Moleküls,

die durch ein Vergleichsatom gemessen wurden, zu berechnen. Alle p-GIcNAc-Moleküle bestehen aus N-acetylierten Glucosaminresten mit C1, C2, C3, C4, C5 und C6-Atomen per definitionem. Das Verhältnis des Bereichs des N-Acetyl-CH3-Kohlenstoffatompeaks zu den Bereich von allen Kohlenstoffatompeaks des Glucosaminrests oben sollte 1.0 betragen, wenn alle Glucosaminreste in dem Polymer N-acetyliert sind. Die Daten wie die in **Fig.** 20 wurden dazu verwendet, Werte für die CH3(bereichs)-Verhältnisse zu erhalten.

[0258] Die berechneten Verhältnisse in der **Fig.** 20 sind in vielen Fällen gleich oder nahezu gleich 1,0 im Bereich des experimentellen Fehlers, z.B. CH3/C2=1,097, CH3/C6=0,984, CH3/C5=1,007, CH3/C1=0,886. Diese Ergebnisse stimmen mit dem Schluss überein, dass das erfindungsgemäße p-GIcNAc-Material frei von Verunreinigungen und vollständig acetyliert ist (d.h. im Wesentlichen 100 % der Glucosaminreste sind N-acetyliert).

15. BEISPIEL: SYNTHESE UND BIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG VON DREIDIMENSIONALEN p-GIcNAc-MATRIZEN KONTROLLIERTER PORENGRÖSSE

[0259] Nachstehend werden Verfahren zur Herstellung von dreidimensionalen porösen Matrizen auf der Grundlage von p-GIcNAc und mit kontrollierter durchschnittlicher Porengröße beschrieben. Solche Matrizen haben eine Vielzahl von wichtigen Anwendungen, insbesondere zum Beispiel als Mittel für die Verkapselung von Zellen. Solche Zellverkapselungszusammensetzungen sind nützlich als transplantierbare Therapeutika auf Zell-Grundlage und in anderen zell- und gewebetechnischen Anwendungen, wie beispielsweise zur Knorpelregeneration. Die Fähigkeit, die Morphologie und die Dimensionalität der p-GIcNAc-Materialien zu manipulieren, wie hier gezeigt, liefert ein mächtiges Mittel zum Expandieren der potentiellen Anwendungen des erfindungsgemäßen p-GIcNAc-Materials.

15.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN

[0260] p-GLcNAc-Ausgangsmaterial: p-GIcNAc wurde unter Verwendung des oben im Abschnitt 5.3.2 beschriebenen chemischen Reinigungsverfahrens mit Flusssäure, die als chemisches Reagens verwendet wurde, hergestellt

[0261] Matrixbildung: Suspensionen (5 ml), enthaltend 20 mg p-GIcNAc-Proben, wurden in den unten im Abschnitt 15.2 gelisteten Lösungsmitteln vor der Lyophilisierung hergestellt. Die Proben wurden denn in Löcher von Gewebekulturplatten gegossen und bei –20°C eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden dann zur Trockene lyophilisiert, und die sich ergebenden dreidimensionalen Matrizen wurden entfernt.

[0262] Rasterelektronenmikroskopieverfahren: Die hier verwendeten Verfahren wurden wie oben im Abschnitt 12.1 beschrieben durchgeführt. Die in den **Fig.** 21A–G beschriebenen Bilder sind 200-fache Vergrößerungen des Matrixmaterials, und eine Messmarkierung von 200 µm ist auf jeder dieser Figuren angegeben.

15.2 ERGEBNISSE

[0263] Die p-GIcNAc-Proben wurden von jedem der folgenden Lösungsmittel erhalten, wie oben im Abschnitt 15.1 beschrieben:

A. Destilliertes Wasser
B. 10 % Methanol in destilliertem Wasser
C. 25 % Methanol in destilliertem Wasser
D. nur destilliertes Wasser
E. 10 % Ethanol in destilliertem Wasser
F. 25 % Ethanol in destilliertem Wasser
G. 40 % Ethanol in destilliertem Wasser

[0264] Proben der Matrix, die unter Verwendung von jedem der Lösungsmittel gebildet wurden, wurde einer Rasterelektronenmikroskop(REM)-Analyse unterzogen, wie in den **Fig.** 21A–G gezeigt. Die Figuren offenbaren, dass die durchschnittliche Matrixporengröße abnimmt, wenn entweder die Prozentzahl von Methanol oder Ethanol in jeder Suspension steigt.

[0265] Insbesondere nähert sich der Porendurchmesser in den beiden Wassersuspensionen (**Fig.** 21A und 21D) im Durchschnitt 200 µm an. Die Porengröße in den Proben, die in den **Fig.** 21C und 21F (25 % Methanol bzw. Ethanol) veranschaulicht sind, liegt im Durchschnitt zwischen 30 und 50 µm.

[0266] Die hier gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass obwohl sowohl Ethanol als auch Methanol erfolgreich zur Steuerung der p-GlcNAc-Porengröße verwendet werden können, Ethanol wirksamer als Methanol bei der Steuerung der p-GlcNAc-Matrixporengröße sein kann.

16. BEISPIEL: ZELLWACHSTUM AUF DREIDIMENSIONALEN PORÖSEN p-GlcNAc-MATRIZEN

[0267] In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse beschrieben, die die erfolgreiche Verwendung von dreidimensionalen porösen p-GlcNAc-Matrizen als Substrate zum Züchten von Zellen zeigen.

16.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN

[0268] p-GlcNAc-Ausgangsmaterial: p-GlcNAc wurde unter Verwendung des oben im Abschnitt 5.3.2 beschriebenen chemischen Reinigungsverfahrens mit Flusssäure, die als chemisches Reagens verwendet wurde, hergestellt.

[0269] Matrixbildung: Dreidimensionale p-GlcNAc-Matrizen wurden durch Lyophilisierung von p-GlcNAc-Suspensionen in Wasser, Wasser-Ethanol- oder Wasser-Methanol-Gemischen hergestellt.

[0270] 20 mg p-GlcNAc enthaltende Suspensionen (5 ml) wurden in den folgenden Lösungsmitteln von der Lyophilisierung hergestellt:

1. nur destilliertes Wasser
2. 10 % Methanol in destilliertem Wasser
3. 25 % Methanol in destilliertem Wasser
4. nur destilliertes Wasser
5. 10 % Ethanol in destilliertem Wasser
6. 25 % Ethanol in destilliertem Wasser
7. 40 % Ethanol in destilliertem Wasser

[0271] Proben wurden in runde Löcher von Kunststoffgewebekulturplatten gegossen und bei –20°C eingefroren. Die gefrorenen Proben wurden dann zur Trockene lyophilisiert, und die sich ergebenden dreidimensionalen Matrizen wurden entfernt. Die Proben von jeder Matrix wurden einer Rasterelektronenmikroskop(REM)-Analyse unterworfen.

[0272] Zellen: Die Mausembryo BALBC/3T3 Fibroblastzelllinie (Klon A31), erhalten von der ATCC, wurden zur Kultivierung auf den dreidimensionalen porösen p-GlcNAc-Matrizen verwendet.

[0273] Kulturbedingungen: 1 cm^2 Proben poröser Matrizen wurde in Gewebekulturlöcher gegeben und mit einem Standardgewebekulturwachstumsmedium bedeckt. Jedes Loch wurde besät und Zellen wurden 6 Tage lang bei 37°C in einem CO_2-Inkubator (5 % CO_2) kultiviert.

[0274] REM-Verfahren: Die Matrixproben wurden fixiert und einer wie oben im Abschnitt 12.1 beschriebenen REM-Analyse unterzogen. Die Matrizen wurden durch Lyophilisierung von p-GlcNAc in destilliertem Wasser hergestellt. Die Bilder variieren in ihrer Vergrößerung von 100X bis 5000X, wie in den Figurenlegenden angegeben (**Fig.** 22A–G).

16.2 ERGEBNISSE

[0275] REM-Fotos von p-GlcNAc-Matrizen, die angelagerte Mausfibroblastzellen enthalten, sind in den **Fig.** 22A–G gezeigt. Diese Fotos veranschaulichen, dass die dreidimensionalen p-GlcNAc-Matrizen angelagerte Mausfibroblastzellen enthalten. Weiter offenbaren die Fotos, dass es eine enge Wechselwirkung und Verbindung zwischen den Zellen und dem p-GlcNAc-Matrixmaterial gibt. Es ist auch festzustellen, dass die Zellen eine gerundete dreidimensionale Morphologie aufweisen, die sich von der flachen, ausgebreiteten Form der Zellen, die direkt auf den Kunststoffkulturplatten gezüchtet werden, unterscheidet. Es wurde festgestellt, dass Lebensfähigkeit der Zellen größer als 95 % war.

17. BEISPIEL: p-GlcNAc VERHINDERT ERFOLGREICH POSTOPERATIVE ADHÄSIONEN

[0276] Das hier vorgestellte Beispiel zeigt die erfolgreiche Verwendung von p-GlcNAc-Materialien, insbesondere einer p-GlcNAc-Membran und Gelformulierung, um die Bildung von postoperativen Adhäsionen in einer

Reihe von Tiermodellen für solche Adhäsionen zu verhindern.

17.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN

[0277] Synthese-p-GlcNAc-Lactat: Das p-GlcNA-Membran-Ausgangsmaterial wurde durch das oben im Abschnitt 5.3.2 beschriebene Verfahren mit Flusssäure, das als chemisches Reagens verwendet wurde, hergestellt.

[0278] Das p-GlcNAc wurde durch das folgende Verfahren zu deacetyliertem p-GlcNA umgewandelt. (Es ist zu beachten, dass ungefähr 1,4 g p-GlcNAc notwendig sind, um je 1 g p-GlcNAc-Lactat bei dem erwarteten Massenverlust von ungefähr 15 %, der nach der Deacetylierung auftritt, herzustellen.) Ungefähr 200 mg p-GlcNAc-Membranmaterial wurde kräftig mit ungefähr 200 ml 60 % NaOH gemischt. Das kräftige Schütteln diente dazu, das p-GlcNAc-Membranmaterial bis zum möglichen Umfang zu trennen. Die verwendete NaOH-Lösung wurde mindestens 12 Stunden vor ihrer Verwendung hergestellt. Die Proben wurden 6 Stunden lang in ein 80°C Wasserbad unter periodischem Schütteln gegeben, um das p-GlcNAc-Material zu trennen und zu benetzen. Nach 6 Stunden wurden die Proben aus dem Wasserbad genommen und die NaOH-Lösung wurde sofort entfernt. Die Membranmaterialien wurden mit ddH_2O bei Raumtemperatur gewaschen, bis ein pH-Wert von 7 erreicht war. Die Membranen wurden aus dem Wasser entfernt und auf einer Teflonfolie getrocknet.

[0279] Zu diesem Zeitpunkt wurde eine 2 mg Probe für die C-, H-, N-Analyse gesammelt, um den Umfang der Deacetylierung zu bestimmen. Weiter wurde die Löslichkeit in 1 %iger Essigsäure geprüft, wobei eine Löslichkeit von 1 mg/ml anzeigte, dass das p-GlcNAc-Material in geeigneter Weise deacetyliert war.

[0280] Das teilweise deacetylierte pGlcNAc wurde dann zu pGlcNAc-Lactat unter Anwendung des folgenden Verfahrens umgewandelt: Ausreichend 2-Propanol (mit 10 % Wasser) wurde, um das ganze teilweise deacetylierte p-GlcNAc-Material zu benetzen und ein Rühren zu ermöglichen, zu 1 g des teilweise deacetylierten p-GlcNAc in einen 250 ml Erlenmeyer-Kolben gegeben. (Ungefähr 30 ml 2-Propanol waren notwendig.) 2-Propanol muss Analysenqualität haben und vor jeder Synthese frisch sein. Unter Rühren wurde 1,1 ml einer 50 % wässrigen Milchsäurelösung hergestellt. Die Milchsäure sollte eine Analysenqualität haben und ist zu analysieren, um die genaue Konzentration von verfügbarer (d.h. nicht veresterter) vorhandener Milchsäure zu bestimmen. Dies wird allgemein durch Titration mit 0,1 N NaOH zu dem Phenophtalein-Endpunkt (pH 7,0) erreicht. Die Konzentration der verwendeten Milchsäure musste konstant sein, d.h. musste +/– 1 Prozent für jede p-GlcNAc-Synthese betragen. Das Gemisch wurde für mindestens zwei Stunden gerührt. Es ist möglich, eine geringe Wärme zuzuführen, um die Reaktionsrate zu erhöhen. Die Reaktionszeit kann ausgedehnt werden oder die Menge an 50 % wässriger Milchsäure kann erhöht werden, so dass die Reaktion vervollständigt wird. Nach dem Rühren wurde der Inhalt des Kolbens durch einen Buchner-Trichter unter Verwendung von quantitativem aschelosem Filterpapier gegossen. Das Material wurde mit 15 ml wasserfreiem 2-Propanol gewaschen. Das Material wurde an der Luft in einem Abzug 2 Stunden trocknen gelassen und dann über Nacht bei 40°C in einen Ofen gestellt. Für jedes Gramm teilweise deacetylierten p-GlcNAc-Ausgangsmaterials sollte ein abschließendes p-GlcNAc-Lactatgewicht von ungefähr 1,4 g (d.h. ein Gewichtsanstieg von 40 %) erhalten werden.

[0281] Die Formulierung von p-GlcNAc-Lactat als Gel: Das p-GlcNAc-Lactatmaterial wurde wie folgt zu einem Gel formuliert: p-GlcNAc-Lactat-Ausgangsmaterial wurde in dd-entionisiertem Wasser auf eine Konzentration von 0,1 – 4, 0 % p-GlcNAc-Lactat, bezogen auf das Gewicht, gelöst. Propylenglycol in Analysequalität (2-Proandiol) wurde dann zu einer Endpropylenglycolkonzentration von 1 – 10 % zugesetzt. In einigen Fällen wurde ein Konservierungsstoff zugegeben, um eine bakterielle und/oder Pilzverunreinigung des Produkts zu verhindern. Typischerweise wurden Konzentrationen von p-GlcNAc-Lactat von 0,1 % – 4,0 % hergestellt. Die Viskosität dieser Präparate erhöht sich dramatisch, wenn der p-GlcNAc-Lactatprozentgehalt steigt, so dass Formulierungen mit 0,5 % oder mehr p-GlcNAc-Lactat sich wie Gele benehmen.

Tiermodelle:

[0282] Sprague-Dawley-Ratten: Adhäsionen werden bei diesem Modell durch Abschürfen oder Reizen der serösen Oberfläche des Blinddarms und Anlagern desselben an einen Bereich des parietalen Peritoneums erzeugt. Die Erfolgsrate zum Bewirken von Adhäsionen bei Kontrolltieren mit diesem Verfahren soll durchschnittlich 80 % betragen.

[0283] Insbesondere beinhaltete das operative Verfahren zur Induktion von postoperativen Adhäsionen bei

diesen Ratten folgendes. Die Tiere wurden dorsal gelegt und für eine aseptische Operation entsprechend präpariert und drapiert. Die Bauchhöhle wurde durch einen Mittellinienschnitt freigelegt. Ein Bereich des parietalen Peritoneums von ungefähr 0,5 cm × 1,0 cm an der linken Abdominalwand wurde sorgfältig herausgeschnitten, und eine dünne Muskelschicht wurde zusammen mit dem Peritoneum entfernt.

[0284] Der Blinddarm wurde dann angehoben und isoliert. Ein Bereich von ungefähr 0,5 cm × 1,0 cm an der lateralen Oberfläche des proximalen Endes des Blinddarms wurde durch 10-maliges Rubbeln mit einer trockenen Gaze abgeschürft. Der Blinddarm wurde dann mit einem Skalpellmesser angekratzt, um winzige petechiale Blutungen zu bewirken. Die Abschürfung des Blinddarms und der peritoneale Schnitt wurden für 15 Minuten freigelegt.

[0285] Nach 15 Minuten wurde der Testgegenstand (d.h. das p-GlcNAc-Material) oder der Kontrollgegenstand auf die Blinddarmwunde appliziert. Die Blinddarmabschürfung und die peritoneale Wunde wurden dann einander gegenübergelegt und für weitere 15 Minuten mit einer Allis-Gewebezange miteinander in Kontakt gehalten.

[0286] Der Blinddarm wurde dann so in den Bauch gelegt, dass der abgeschürfte Bereich des Blinddarms benachbart zu der peritonealen Stelle lag. Der Bauchschnitt wurde verschlossen und das Tier durfte sich von der Anästhesie erholen.

[0287] 14 Tage nach der Operation wurden die Tiere euthanasiert und der abgeschürfte Bereich wurde auf die Bildung von postoperativen Adhäsionen hin untersucht. Wenn Adhäsionen vorhanden waren, wurde der gesamte an der Adhäsion beteiligte Bereich (d.h. Körperwand, Test- oder Kontrollgegenstand und innere Organe) von dem Tier befreit.

[0288] Das Ausmaß der Beteiligung und Hartnäckigkeit der Adhäsionen wurde gemäß der folgenden Skala bewertet:

Bewertung des Beteilungsumfangs:

0 keine Adhäsion
1 Adhäsion <= 25 % des Bereichs
2 Adhäsion <= 50 % des Bereichs
3 Adhäsion <= 75 % des Bereichs
4 Adhäsion > 25 % des Bereichs

Hartnäckigkeitsbewertung:

0 keine Adhäsion
1 befreite Adhäsion mit stumpfer Auftrennung
2 befreite Adhäsion mit aggressiver Auftrennung
3 Adhäsion, die eine Inzision erfordert

[0289] Zusätzliche Tiermodelle: Tierdickdarmmodelle von Schweinen und Pferden wurden verwendet, um die Verhinderung von peritonealen Adhäsionen zu bewerten.

[0290] Operative Maßnahme: Die Tiere wurden dorsal gelegt und für eine aseptische Operation entsprechend präpariert und drapiert. Die Bauchhöhle wurde durch einen Mittellinienschnitt freigelegt. Der Dünndarm wurde angehoben und ein Abschnitt von 2 cm × 2 cm wurde identifiziert, ausgedehnt abgeschürft (ungefähr 200-mal unter Verwendung eines Skalpells) und 10 Minuten trocknen gelassen. Der Testgegenstand (d.h. das p-GlcNAc-Material) oder der Knotrollgegenstand wurde dann auf die abgeschürfte Wunde appliziert, und der verletzte Abschnitt des Dünndarms wurde wieder in den Bauch gelegt. Bei einem solchen Dickdarm-Tiermodell liefern sechs Wunden, die jeweils durch 4 Zoll Darm von der benachbarten Wunde getrennt sind, eine Umgebung, die stark zur Bildung von Adhäsionen neigt. Nach der letzten Wunde wird der Bauchschnitt verschlossen und das Tier kann sich von der Anästhesie erholen.

[0291] Analyse der peritonealen Adhäsionen: 21 Tage nach der Operation wurden die Tiere euthanasiert und der abgeschürfte Bereich wurde untersucht, wobei eine Adhäsionsbildung nach einem Verfahren ähnlich dem des Sprague-Dawley-Rattenblinddarmmodells bewertet wurde.

17.2 ERGEBNISSE

[0292] Wenn eine Verletzung auftritt, setzt der Körper einen komplexen Satz von Reaktionen in Gang, die so aufgebaut sind, dass sie das verletze Gebiet wiederherstellen. In den abschließenden Stufen der Heilung bildet sich an der Wundstelle Bindegewebe, um den Körperaufbau zu regenerieren und das betroffene Gebiet vor weiterem Schaden zu schützen. In manchen Fällen arbeitet diese Kaskade von Ereignissen nicht angemessen und kann zu lebensbedrohlichen Zuständen führen.

[0293] Zum Beispiel kann, wenn ein viszerales Organ nach einer Operation heilt, ein Fibrinklümpchen, das während der Operation gebildet wurde, in die Oberfläche von benachbarten Organen eindringen, wodurch eine Verbindung gebildet wird, die eine Fibroblastenmigration ermöglicht. Diese Migration führt zu einer Kollagenablagerung und Gewebewachstum, was wiederum bewirkt, dass die beteiligten Organe aneinander anhaften.

[0294] Solche Adhäsionen, die als postoperative Adhäsionen bezeichnet werden, können Schmerzen verursachen, einen Verschluss und eine Funktionsstörung durch eine Distorsion des beteiligten Organs oder der beteiligten Organe. Immobilisierte Gelenke, Darmverschluss und Unfruchtbarkeit sind oft mit der Bildung von postoperativen Adhäsionen verbunden. Weiterhin verkompliziert und verlängert eine postoperative Adhäsion zukünftige Operationen in dem umgebenden Bereich und dehnt sie aus. Dieser letzte Punkt ist von besonderer Wichtigkeit bei Operationen am offenen Herzen und Kaiserschnittentbindungen, wo zusätzliche Operationen erforderlich sein können. Die Bildung von Adhäsionen ist oft üblich nach abdominalen, kardiovaskularen und orthopädischen Operationen.

[0295] Wenn Adhäsionen pathologisch werden und ernsthaft die Organfunktion stören, dann ist eine operative Adhäsiolyse (Inzision oder stumpfe Auftrennung der Adhäsion in Verbindung mit sorgfältigen operativen Verfahren) die Behandlung, die gegenwärtig dazu verwendet wird, um Adhäsionen zu eliminieren. 1991 wurden etwa 500.000 Adhäsiolyseverfahren durchgeführt. Dieses Verfahren ist allerdings bekanntermaßen wirkungslos, weil die Häufigkeit des Wiederauftretens einer Adhäsionsbildung mit 90 % angegeben wird. Weiter hat sich kein anderes Verfahren und keine andere Zusammensetzung als wirkungsvoll beim Verhindern von solchen postoperativen Adhäsionen gezeigt.

[0296] Die hier vorgestellten Ergebnisse sind daher signifikant, insofern als sie die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen p-GlcNAc-Materialien für das Verhindern von postoperativen Adhäsionen zeigen. Insbesondere zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse die Wirksamkeit von p-GlcNAc auf der Grundlage von festen und flüssigen Formulierungen als Barrieren hinsichtlich der Bildung von abdominalen postoperativen Adhäsionen in anerkannten Tiermodellsystemen mit Ratten und Schweinen:

[0297] Eine der anerkannten Tiermodelle, die zur Untersuchung der Adhäsionsbildung verwendet werden, wendet viszeral-parietale peritoneale Adhäsionen in Sprague-Dawley-Ratten an. Sowohl die teilweise deacetylierten p-GlcNAc-Membranen als auch die p-GlcNAc-Lactatgelformulierungen verhinderten und/oder reduzierten beträchtlich eine Adhäsionsbildung im Vergleich zu den entweder nicht behandelten Kontrollen oder den mit InterCEED™ (Johnson & Johnson) behandelten, dem einzigen im Handel erhältlichen Produkt für diese Indikation.

[0298] Insbesondere wurden insgesamt 18 Ratten zum Testen der p-GlcNAc-Lactatgelformulierungen verwendet. 12 Tiere wurden als Kontrollen verwendet, wobei 6 keine Behandlung erhielten und 6 InterCeed™ erhielten. 6 Tiere erhielten 0,25 % p-GlcNAc-Lactatgel, 10 % Propylenglycol, Wasser. Tiere, die die p-GlcNAc-Lacatgelbehandlung erhielten, zeigten ein signifikant reduziertes Auftreten einer postoperativen Adhäsionsbildung im Vergleich zu den beiden Kontrollen, wie unten in der Tabelle VIII gezeigt.

TABELLE VIII

	Ausmaß der Beteiligung	Hartnäckigkeit
Kontrolle (keine Behandlung)	1 +/- 2,1	1 +/- 1,5
InterCEED™	1 +/- 1,8	1 +/- 1,5
p-GlcNAc-Lactatgel	0 +/- 0,8	1 +/- 1,2

[0299] Teilweise deacetylierte p-GlcNAc-Membranen wurden auch auf ihre Fähigkeit hin getestet, das Auftre-

ten von postoperativen Adhäsionen beim Tiermodell mit Ratten zu verhindern. Insgesamt wurde für die Untersuchung 22 Raten verwendet. 12 Tiere dienten als Kontrolle, wobei 6 keine Behandlung und 6 InterCEED™ erhielten. 10 Tiere erhielten jeweils eine 1 cm × 1 cm Membran einer ungefähr zu 60 % deacetylierten p-GlcNAc-Formulierung. Die Tiere, die die teilweise deacetylierte p-GlcNAc-Membran erhielten, zeigten eine signifikante Verringerung des Auftretens von postoperativen Adhäsionen im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrollen und InterCEED™, wie unten in der Tabelle IX gezeigt.

TABELLE IX

	Ausmaß der Beteiligung	Hartnäckigkeit
Kontrolle (keine Behandlung)	3 +/- 1,8	1 +/- 0,6
InterCEED™	3 +/- 1,6	1 +/- 0,4
p-GlcNAc-Membran	1 +-/ 0,8	1 +/- 0,3

[0300] Dickdarmtiermodelle zum Verhindern von peritonealen Adhäsionen wurden auch durchgeführt, um p-GlcNAc-Zusammensetzungen zu testen. Insbesondere wurden sechs Schweine und ein Pferd verwendet, um sowohl die teilweise deacetylierte p-GlcNAc-Membran als auch das p-GlcNAc-Lactatgel zu untersuchen. Die teilweise deacetylierte p-GlcNAc-Membran bestand aus einem 2 cm × 2 cm Stück 60 % deacetylierte p-GlcNAc-Membran, während das p-GlcNAc-Lactatgel aus 0,25 % p-GlcNAc-Lactat, formuliert mit 10 % Propylenglycol und Wasser, bestand. Die Kontrolltiere erhielten keine Behandlung der verwundeten Stelle.

[0301] Die Ergebnisse dieser Dickdarm-Tierstudien zeigten, dass, obwohl die Kontrollstellen vielfältige Adhäsionen und Narbengewebe an der umgebenden Stelle ausbildeten, sowohl die p-GlcNAc-Membran als auch die Gelformulierungen die Bildung von Adhäsionen wirksam verhinderten.

[0302] Proben der Kontrollstellen und behandelten Stellen wurden darüber hinaus mittels REM untersucht, was eine erhöhte Menge an Fibrose an den Kontrollstellen im Vergleich zu den behandelten Geweben zeigte.

18. BEISPIEL: BIOLOGISCHE ABBAUBARKEIT VON p-GlcNAc-MATERIALIEN

[0303] Das in diesem Abschnitt vorgestellte Beispiel zeigt, dass erfindungsgemäße p-GlcNAc-Materialien hergestellt werden können, die eine kontrollierbare in vitro und in vivo biologische Abbaubarkeit und kontrollierbare Resorptionsraten zeigen.

18.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN

[0304] p-GlcNAc-Materialien: Der Prototyp I wurde durch das oben im Abschnitt 5.3.2 beschriebene Verfahren mittels des chemischen Verfahrens hergestellt, wobei Flusssäure als chemisches Reagens verwendet wurde. Der Prototyp I stellte 100 % acetyliertes p-GlcNAc dar.

[0305] Das p-GlcNAc-Ausgangsmaterial des Prototyps 3A wurde durch das oben im Abschnitt 5.3.2 beschriebene Verfahren mittels des chemischen Verfahrens hergestellt, wobei Flusssäure als chemisches Reagens verwendet wurde. Das p-GlcNAc-Material wurde dann durch das oben im Abschnitt 5.4 beschriebene Verfahren deacetyliert. Insbesondere wurde das p-GlcNAc-Material mit einer 40 % NaOH-Lösung 30 Minuten lang bei 60°C behandelt. Es wurde festgestellt, dass der sich ergebende Prototyp 3A zu 30 % deacetyliert war.

[0306] Das p-GlcNAc-Ausgangsmaterial des Prototyps 4 wurde durch das oben im Abschnitt 5.3.2 beschriebene Verfahren mittels des chemischen Verfahrens hergestellt, wobei Flusssäure als chemisches Reagens verwendet wurde. Das p-GlcNAc-Material wurde dann durch Behandeln mit einer 40 % NaOH-Lösung 30 Minuten lang bei 60°C deacetyliert. Als Nächstes wurden die Fasern in destilliertem Wasser suspendiert, bei –20°C gefroren und zur Trockene lyophilisiert. Es wurde auch festgestellt, dass der Prototyp 4 zu 30 % deacetyliert war.

[0307] Abdominales Imglantationsmodell: Sprague-Dawley-Albinoratten wurden für die abdominalen Implantationsmodellstudien verwendet. Die Tiere wurden anästhetisiert und für die Operation hergerichtet und es wurde eine Inzision in die Haut und Abdomenmuskeln vorgenommen. Der Blinddarm wurde lokalisiert und herausgehoben. Eine 1 cm × 1 cm Membran p-GlcNAc-Material wurde auf den Blinddarm gelegt und der Schnitt mit

Nylon geschlossen. Die Kontrolltiere waren die, bei denen kein Material auf den Blinddarm gelegt wurde.

[0308] Die Tiere wurden am 14. und 21. Tag nach der Implantation geöffnet. Es wurden Bilder während des Implantations- und Explantationsverfahren gemacht (**Fig.** 23A–E). Die Blinddarmproben wurden für die Histopathologie nach dem Explantationsverfahren präpariert.

[0309] p-GlcNAc in vitro-Abbau-Lysozym-Chitinase-Assay: Der Assay ist ein kolorimetrischer Assay für N-Acetylglucoamin und wurde wie folgt durchgeführt: 150 µl einer Reaktionsprobe wurde in 13 × 100 mm wegwerfbare Reagenzgläser aus Glas zweifach pipettiert. 25 µl 0,25 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,1) wurde zu jedem Reagenzglas zugegeben und anschließend 35 µl 0,8 M Kaliumboratlösung (pH 9,8) zugesetzt. Die Gläser wurden sofort für mindestens 2 Minuten in ein Eisbad eingetaucht. Die Proben wurden dann aus dem Eisbad entfernt, 1 ml neu präpariertes DMAB-Reagens wurde hinzugefügt und die Proben verwirbelt. DMAB (Dimethylaminobenzaldehyd)-Reagens wurde durch Zusetzen von 70 ml Eisessig und 10 ml 11,6 N (konzentriertes) HCl zu 8 g p-Dimethylaminobenzaldehyd hergestellt. Die Proben wurden dann 20 Minuten lang bei 37°C inkubiert.

[0310] Um eine Standardkurve herzustellen, wurde das folgende Verfahren verwendet. Eine GlcNAc-Ansatzlösung wurde auf 0,1 mg/ml mit 0,010 M Natriumacetatpuffer (pH 4,5) verdünnt, und 0 µl, 20 µl, 30 µl, 90 µl oder 120 µl der verdünnten GlcNAc-Lösung wurde zu einer Reihe von Reagenzgläsern gegeben. Danach erfolgte die Zugabe von 150 µl, 130 ml, 60 µl bzw. 30 µl 0,010 M Natriumacetatpuffer (pH 4,5) zu den Reagenzgläsern. Als Nächstes wurde 25 µl 0,25 M Natriumphosphatpuffer (pH 7,1) und 35 µl 0,8 M Kaliumboratpuffer (pH 9,8) zu jedem Reagenzglas gegeben. Ein doppelter Satz Reagenzgläser wird durch dasselbe Verfahren präpariert.

[0311] Die Reagenzgläser werden verschlossen und genau 3 Minuten lang bei 100°C gekocht. Die Gläser werden dann in ein Eisbad getaucht. Die Gläser werden aus dem Eisbad entnommen und 1 ml DMAB-Reagens, das gemäß dem oben im Abschnitt beschriebenen Verfahren frisch hergestellt wurde, wird jedem Reagenzglas zugegeben. Die Gläser werden 20 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die Absorptionsfähigkeit des Inhalts von jedem Reagenzglas wird bei 585 nM abgelesen. Die Absorptionsfähigkeit sollte so schnell wie möglich abgelesen werden. Die Standardkurve wird auf Kurvenpapier gezeichnet und dazu verwendet, um die Konzentration von N-Acetylglucosamin in den Reaktionsproben zu bestimmen. Eine typische Standardkurve ist in der **Fig.** 23 gezeigt.

18.2 ERGEBNISSE

[0312] Die biologische in vitro Abbaubarkeit von p-GlcNAc-Materialien wurde in Experimenten untersucht, die die relative Empfindlichkeit der p-GlcNAc-Membranmaterialien für den Abbau durch Lysozym untersuchten. Die p-GlcNAc-Membranen wurden einem Überschuss an Lysozym in einem 10 mM Acetatpuffer ausgesetzt und die nachfolgende Freisetzung von N-Acetylglucosamin wurde unter Verwendung des oben im Abschnitt 18.1 beschriebenen Assays bestimmt.

[0313] Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten, dass teilweise deacetylierte Membranen empfindlicher für Lysozymverdau sind (siehe **Fig.** 24) und weiter dass die Lysozymabbaurate in direktem Bezug zu dem Ausmaß der Deacetylierung steht (siehe **Fig.** 25, die die Abbauraten von einer 50 % bis zu einer 25 % deacetylierten p-GlcNAc-Membran vergleicht).

[0314] Darüber hinaus wurden Experimente durchgeführt, die sich mit der biologischen in-vivo-Abbaubarkeit von p-GlcNAc-Materialien befassten. Solche Experimente verwendeten ein abdominales Implantationsmodell. Drei p-GlcNAc-Materialien, wie unten aufgelistet, wurden getestet.

Getestete p-GlcNAc-Materialien:

1) p-GlcNAc, vollständig acetyliert (als Prototyp 1 bezeichnet);
2) teilweise acetylierte p-GlcNAc-Membran (als Prototype 3A bezeichnet); und
3) lyophilisierte und teilweise deacetylierte p-GlcNAc-Membran (als Prototyp 4 bezeichnet).

[0315] Das vollständig acetylierte p-GlcNAc (Prototyp 1) wurde innerhalb von 21 Tagen resorbiert, wie in den **Fig.** 26A–26C gezeigt. Die teilweise deacetylierte p-GlcNAc-Membran (Prototyp 3A) wurde vollständig innerhalb von 14 Tagen resorbiert, wie in den **Fig.** 26D–26E gezeigt. Die lyophilisierte und teilweise deacetylierte p-GlcNAc-Membran (Prototyp 4) war 21 Tage nach der Implantation noch nicht vollständig resorbiert.

[0316] Die Histopathologieanalysen zeigten, dass es, sobald das p-GlcNAc-Material absorbiert war, keine histologischen feststellbaren Unterschiede zwischen Gewebeproben, die aus den behandelten und den Kontrolltieren erhalten wurden, gab.

19. BEISPIEL: p-GlcNAc-Hämostaseuntersuchungen

[0317] Die hier beschriebenen Experimente untersuchen die Wirksamkeit der erfindungsgemäßen p-GlcNAc-Materialien zur Kontrolle von Blutungen. Der Erfolg der p-GlcNAc-Materialien beim Kontrollieren von Blutungen wird weiter mit im Handel erhältlichen blutstillenden Produkten verglichen.

19.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN

[0318] p-GlcNAc- und Kontrollmaterialien: Es wurden teilweise deacetylierte (ungefähr zu 70 %) p-GlcNAc-Membranen unter Verwendung des chemischen, oben im Abschnitt 5.3.2 beschriebenen Trennverfahrens, wobei Flusssäure als chemisches Reagens verwendet wurde, und der oben im Abschnitt 5.4 beschriebenen Verfahren hergestellt. 2 cm × 1 cm Stücke wurden verwendet. p-GlcNAc-Lactatgel (4 % p-GlcNAc-Lactat, formuliert in Propylenglycol und Wasser) wurde nach den oben im Abschnitt 17.1 beschriebenen Verfahren formuliert. Das für die Studie einer Blutung in Milz und Leber verwendete Kontrollmaterial war Gelfoam™ (Upjohn Company). Gelfoam™ und Avitene™ (Mechem Products, Inc.) waren die Kontrollmaterialien, die in der Studie bezüglich kleiner Blutgefäßblutung verwendet wurden.

[0319] Versuchstiere: Weiße Neuseeland-Kaninchen wurden verwendet. 3 Tiere erhielten zwei Wunden in der Milz und eine Wunde in der Leber. 4 Tiere erhielten fünf Operationswunden der Blutgefäße ähnlicher Größe in das kaudale mesenteriale Arteriensystem.

[0320] Operationsvorbereitung: Die Tiere wurden mit Ketamin-HCl und Xylazin anästhetisiert. Die Tiere wurden dorsal gelegt und das ganze Haar wurde vom Bauch entfernt. Der Bauch wurde dann mit Povidon-Iod und 70% Isopropylalkohol geschrubbt und für eine aseptische Operation hergerichtet.

[0321] Leber/Milz-Operationen: Es erfolgte ein Mlttellinienschnitt und entweder die Milz oder die Leber wurden nach außen verlagert und in feuchte Wickelschwämme gepackt. Es wurde ein Korkenbohrung (cork bore) von 3 – 4 mm Durchmesser verwendet, um eine kreisrunde Wunde von etwa 2 mm Tiefe an dem einen Ende des Organs zu erzielen. Sobald das Milzgewebe entfernt war, wurde ein vorgewogener 4" × 4" Gazeschwamm dazu verwendet, das ganze Blut, das aus der Milzwunde verloren ging, für eine Zeit von einer Minute zu absorbieren. Der Schwamm wurde wieder gewogen, um die Menge verlorenen Bluts aus der speziellen Wunde zu wiegen. Das Testtier wurde dann durch Applizieren von einem der Behandlungsmaterialien auf die Wunde behandelt. Die Zeit bis zur Hämostase und die verlorene Blutmenge vor der Hämostase wurden aufgezeichnet.

[0322] Nachdem in der ersten Wunde eine Hämostase erreicht war, erfolgte eine zweite Wunde in der Milz und eine Wunde in der Leber nach demselben Verfahren.

[0323] Operation kleiner Blutgefäße: Ein Mittelinienschnitt wurde vorgenommen und der Dünndarm wurde nach außen verlagert, wodurch das kaudale mesenteriale Arteriensystem freigelegt wurde. Der Darm wurde in feuchte Überlappungsschwämme gepackt und fünf Blutgefäße von etwa gleicher Größe wurden identifiziert. Ein Skalpell wurde dazu verwendet, eine Wunde von etwa 1 mm Tiefe an einem der Gefäße vorzunehmen. Ein zuvor gewogener 4" × 4" Gazeschwamm wurde dazu verwendet, das ganze Blut, das aus der Gefäßwunde verloren ging, für einen Zeitraum von einer Minute zu absorbieren. Der Schwamm wurde erneut gewogen, um die Menge an Blut zu quantifizieren, die aus dieser Wunde verloren ging. Das Tier wurde dann durch Applizieren von einem der Behandlungsmaterialien auf der Wunde behandelt. Es wurde die Zeit bis zur Hämostase und die verlorene Blutmenge vor der Hämostase aufgezeichnet.

[0324] Nachdem eine Hämostase in der ersten Wunde erreicht war, wurden vier weitere Wunden nach demselben Verfahren vorgenommen.

19.2 ERGEBNISSE

[0325] p-GlcNAc-Materialien wurden auf ihre Fähigkeit getestet, die Blutung in der Milz und Leber von Rattentiermodellen zu kontrollieren. Die getesteten p-GlcNAc-Materialien waren: 1) teilweise acetyliertes (ungefähr 70 %) p-GlcNAc; und 2) p-GlcNAc-Lactatgel (4 % p-GlcNAc-Lactat, formuliert in Propylenglycol und Wasser). Die Wirksamkeit dieser p-GlcNAc-Materialien wurde mit Gelfoam™ (Upjohn Company) verglichen.

[0326] Jedes Material wurde dreimal getestet (zweimal in der Milz und einmal in der Leber). Beide Materialien auf p-GlcNAc-Grundlage zeigten eine Wirksamkeit beim Kontrollieren der Blutung in der ersten Minute nach der Applikation, die vergleichbar mit der von Gelfoam™ war.

[0327] Die Materialien auf p-GlcNAc-Grundlage haben zusätzliche Vorteile. Insbesondere müssen die p-GlcNAc-Materialien während des Verfahrens nicht an ihrem Platz gehalten werden, können im Körper verbleiben, wo sie innerhalb von zwei bis drei Wochen resorbiert werden (Gelfoam™ ist für diesen Zweck nicht geeignet), sind sowohl mit den allgemeinen als auch minimal invasiven Operationsverfahren kompatibel.

[0328] Als Nächstes wurde die Wirksamkeit von Materialien auf p-GlcNAc-Grundlage bei der Kontrolle einer Blutung in den kleinen Blutgefäßen untersucht und mit den im Handel erhältlichen hämostatischen Produkten verglichen.

[0329] Jedes Material wurde 5-mal getestet (zweimal in einem der Tiere und einmal in den anderen drei Tieren). Die p-GlcNAc-Membran- und Gelformulierungen wurden leicht auf die Stelle appliziert und die Blutung innerhalb von 2 Minuten kontrolliert. Gelfoam™, das an seinem Platz gehalten werden musste, um seine Funktion zu erfüllen, erreichte eine Hämostase innerhalb desselben 2 Minutenbereichs wie das p-GlcNAc-Materialien. Avitene™, ein fibröses Material, das aus Kollagen hergestellt ist, war schwer zu handhaben, und es waren 5 Minuten erforderlich, um die Blutung zu kontrollieren.

[0330] Daher zeigen die hier beschriebenen Ergebnisse, dass die hier getesteten p-GlcNAc-Materialien wirksame, angenehme hämostatische Mittel darstellen.

20. BEISPIEL: p-GlcNAc-MEDIKAMENTENABGABESYSTEME

[0331] Hier sind Studien beschrieben, die die erfolgreiche Verwendung von p-GlcNAc-Materialien zur Abgabe von Zytostatika an die Stelle von bösartigen Hautkrebs- und Darmkrebstumoren zeigen, so dass die abgegebenen Zytostatika eine therapeutische Wirkung auf die Tumoren haben.

20.1 MATERIALIEN UND VERFAHREN

p-GlcNAc-Lactatmedikamentenabgabezusammensetzungen:

[0332] Gemische aus 5'-Fluorouracil (5'-FU) und p-GlcNAc-Lactat wurden wie folgt formuliert: 0,5 ml 5'-FU (50 mg/ml) wurde mit 0,5 ml Propylenglycol gemischt, und 2,0 ml 4 % p-GlcNAc-Lactat wurde zugesetzt und gemischt. Das p-GlcNAc-Lactat wurde unter Verwendung der oben im Abschnitt --- beschriebenen Verfahren hergestellt. Selbst nach umfangreichem Mischen war das 5'Fu nicht vollständig in dem p-GlcNAc-Lactatgel gelöst. Von einer vollständigen Vermischung ausgehend, wäre die Endkonzentration von 5'-Fu 6,25 mg/ml.

[0333] Die Gemische von Mitomycin (Mito) und p-GlcNAc-Lactat wurden wie folgt formuliert: 0,5 mg Mito (lyophilisiertes Pulver) wurde in 5 ml Propylenglycol gelöst und 0,5 ml der Mito-Lösung wurde mit 0,5 ml MPT 4 % p-GlcN-Lactatpräparat gemischt, um eine Mito-Endkonzentration von 0,2 mg/ml und eine abschließende p-GlcNAc-Lactatkonzentration von 2 % zu erhalten. Die Materialien waren kompatibel, wobei sich das Mito leicht in dem p-GlcNAc-Lactatgel löste.

p-GlcNAc-Membran 5'FU-Abgabezusammensetzungen:

[0334] Die Proben von 5'-Fluorouracil (5'-FU) wurden in Scheiben von reinem p-GlcNAc-Membranmaterial immobilisiert, das unter Verwendung des chemischen, oben im Abschnitt 5.3.2 beschriebenen Trennungsverfahrens erzeugt wurde, wobei die Flusssäure als chemisches Reagens verwendet wurde. Jede hier beschriebene Scheibe hatte einen Durchmesser von 1,5 cm, wie hier beschrieben.

[0335] Für die Herstellung der Hochdosis(HD)-Scheiben wurde 0,64 ml eines 50 mg/ml Lösung von 5'-FU mit Suspensionen gemischt, die ungefähr 8 mg reines p-GlcNAc enthielten. Die Gemische wurden mehrere Stunden stehen gelassen, um die Absorption von 5'-FU in das p-GlcNAc zu unterstützen, und wurden dann bei 55°C 3,5 Stunden lang getrocknet. Die sich ergebenden HD-Scheiben enthielten insgesamt 32 mg 5'-FU, was gleich etwa dem Zweifachen der normalen 14-Tage-Gesamtdosis von 5'-FU, die typischerweise einem Krebspatienten gegeben wird, ist.

[0336] Eine niedrige Dosis (LD) 5'-FU, die p-GlcNAc-Scheiben enthielt, wurde auf dieselbe Weise hergestellt,

mit der Ausnahme, dass die LD-Scheiben 17 mg 5'-FU enthielten, ein Menge, die gleich der normalen menschlichen Gesamtdosis für einen Zeitraum von 14 Tagen ist, und zwar normalisiert auf das Gewicht der Versuchsmäuse auf der Grundlage der typischen Dosis von 5'-FU pro kg Körpergewicht für den Menschen.

[0337] Versuchstiere: Für die 5'FU-Studie wurden Mäuse mit SCID (schwerer kombinierter Immunschwäche) mit subkutanen Injektionen mit HT-29-Darmkrebszellen (ATCC; 1×10^5 Zellen von Inokulum) in die Flanken inokuliert, die durch Standardgewebekulturverfahren erhalten wurden, um HT-29-Darmkrebstumoren zu erzeugen. Diese Injektionen führten zu palpierbaren Tumoren, die in 14–21 Tagen gesammelt wurden. Die Tumoren wurden seziert, und nekrotisches Gewebe wurde weggeschnitten. Die HT-29-Darmkrebstumoren wurden in 3×3×3 mm Stücke geschnitten.

[0338] Die experimentellen SCID-Mäuse wurden mittels intraperitonealer Injektionen mit einer Standarddosis von Avetin anästhetisiert, und eine Scheibe HT-29 Darmkrebstumor wurde auf den Blinddarm jeder Maus implantiert. Insbesondere wurde jede Maus operativ geöffnet, um ihren Bauch freizulegen, und der Blinddarm wurde lokalisiert und mit einem Skalpell eingekerbt, um einen kleinen Schnitt zu machen. Eine Tumorscheibe von 3×3×3 mm wurde über den Schnitt auf den Blinddarmwandung mit0 Seidennahtmaterial genäht. Der Brauch wurde dann unter Verwendung von Clay-Adams-Klammern verschlossen.

[0339] Alle Mäuse waren einzeln in Käfigen untergebracht und 2 Wochen lang gefüttert. Alle Mäuse waren gesund und keine litt am Ende der 2 Wochen an verstopftem Darm.

[0340] Am 14. Tag wurde jede Maus anästhetisiert und ihr Bauch wurde wieder geöffnet. Die wachsenden Tumoren wurden gemessen (Länge und horizontale Abmessungen). Die Tumoren wurden dann mit dem p-GlcNAc/Antitumor-Medikament behandelt oder wurden als Kontrollen verwendet.

[0341] Sechs Mäuse wurden für die p-GlcNAc-Lactat-5'FU-Studie benutzt und 15 Mäuse wurden für die p-GlcNAc-Membran-5'FU-Studie verwendet.

[0342] Für die Mitomycin-Untersuchung wurden neun SCID-Mäuse mit subkutanen Injektionen von A431 squamöse Hautkrebszellen (ATCC, 1×10^5 Zellen pro Inokulum)inokuliert. In allen Mäusen entwickelten sich innerhalb von 14 Tagen Tumoren.

[0343] Behandlungen: Für die p-GlcNAc-Lactat-5'FU-Untersuchung wurden die Tiere einmal täglich durch „Aufstreichen" des 5'-Fluorouracil (5'-FU) enthaltenden p-GlcNAc-Gelgemischs auf der Hautfläche über der Tumormasse behandelt. Die Messungen der Tumorgröße wurden täglich durchgeführt. Die Kontrolltiere umfassten Tiere, die nur mit p-GlcNAc ohne 5'-FU behandelt wurden, und Tiere, die keine Behandlung erhielten.

[0344] Für die p-GlcNAc-Membran-5'FU-Untersuchung wurden die HT29-Darmtumoren in den SCID-Mäusen durch operatives Implantieren von Scheiben des Medikamenten enthaltenden p-GlcNAc-Membranmaterials direkt auf ihre Oberfläche behandelt, nachdem der Tumor auf dem Darm 14 Tage lang wachsen durfte. Die Mäuse wurden 14 Tage nach dem Implantieren geopfert. Die Messungen der Tumorvolumen wurden direkt vor dem Implantieren der Medikamente enthaltenden p-GlcNAc-Membranen am Tag 0 und bei Beendigung des Experiments am 14. Tag vorgenommen. Die Kontrolltiere umfassten solche, die mit der p-GlcNAc-Membran ohne 5'-FU behandelt wurden, und Kontrollen, die keine Behandlung erhielten. Darüber hinaus erhielten zwei Tiere täglich systemische Injektionen von 5'-FU in Dosen, die den HD- und LD-Dosierungsschema entsprachen.

[0345] Für die p-GlcNAc-Lactat-Mito-Untersuchung wurden die Tiere täglich wie in der p-GlcNAc-Lactat-5'-FU-Untersuchung behandelt, wobei 3 Tiere mit dem Mito enthaltenden Gemisch behandelt wurden. Außerdem wurden 3 Tiere mit p-GlcNAc ohne Mito behandelt, 2 Tiere erhielten keine Behandlung und 1 Tier erhielt Propylenglycol.

20.2 ERGEBNISSE

20.2.1 p-GlcNAc-LACTAT-5'FU

[0346] Die Experimente, die dazu dienten, die Wirkung von p-GlcNAc-Lactat-5'FU-Medikamentenabgabesysteme auf die Tumorgröße zu untersuchen, wurden wie oben im Abschnitt 20.1 durchgeführt.

[0347] Die größte Längen- und Breitenabmessungen wurden für jeden Tumor gemessen und der Quer-

schnittsbereich wurde unter Verwendung dieser Abmessungen berechnet. Die Querschnittsflächenwerte sind unten in der Tabelle X gezeigt.

Tabelle X

Tier #	Behandlung	Tumorgröße (cm^2)			
		Tag 0	Tag 4	Tag 11	Tag 15
1	CL + 5FU	63	90	168	156
2	CL + 5FU	48	56	70	88
3	CL Kontrolle	21	36	88	108
4	CL Kontrolle	58	110	150	195,30
5	nichts	40	64	132	234
6	nichts	28	42	100	132
		% Größenzunahme			
		Tag 0	Tag 4	Tag 11	Tag 15
1	CL + 5FU	0	43	167	147
2	CL + 5FU	0	17	47	84
3	CL Kontrolle	0	71	319	414
4	CL Kontrolle	0	90	160	289
5	nichts	0	61	232	488
6	nichts	0	48	253	366

[0348] Die Daten, die die mit p-GlcNAc-Lactat 5'FU behandelten Tiere mit den Kontrollen vergleichen, sind in den **Fig.** 27–28 gezeigt. Die Daten, die in der Tabelle X und den **Fig.** 27–28 zusammengefasst sind, zeigen deutlich, dass die subkutanen HT-29-Tumoren bei den mit den 5'-Fu enthaltenden p-GlcNAc-Lactatgelen behandelten Ratten eine signifikant verzögerte Wachstumsrate im Vergleich zu den Kontrollen aufweisen. Ihr Wachstum ist um das 2,5-Fache im Vergleich zu den p-GlcNAc-Lactatgelkontrollen und um das 4-Fache im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrollen verlangsamt.

20.2. p-GlcNAc-LACTAT-MITO

[0349] Die Experimente, die dazu dienten, die Wirkung von p-GlcNAc-Lactat 5'FU-Medikamentenabgabesysteme auf Tumorgröße zu untersuchen, wurden auch wie oben im Abschnitt 20.1 beschrieben durchgeführt.

[0350] Die größten Längen- und Breitenabmessungen wurden für jeden Tumor gemessen, und die Querschnittsfläche wurde unter Verwendung dieser Abmessungen berechnet. Die Querschnittsflächenwerte waren wie unten in Tabelle XI gezeigt.

Tabelle XI

Tier #	Behandlung	Tumorgröße (cm^2)			
		Tag 0	Tag 3	Tag 5	Tag 8
1	p-GlcN-L + Mito	23	23	42	49
2	p-GlcN-L + Mito	23	16	54	63
3	p-GlcN-L + Mito	72	99	"Term"	"Term"
4	pGlcN-L Kontrolle	27	54	140	203
5	pG.cN-L Kontrolle	30	54	96	140
6	pGlcN-L Kontrolle	30	58	200	221
7	nichts	48	75	126	300
8	nichts	44	80	207	tot
9	Propylenglycol	49	86	180	216
		% Größenzunahme			
		Tag 0	Tag 3	Tag 5	Tag 8
1	pGlcN-L + Mito	0	0	83	135
2	pGlcN-L + Mito	0	-30	135	174
3	pGlcN-L + Mito	0	38	"Term"	"Term"
4	pGlcN-L Kontrolle	0	100	419	652
5	pGlcN-L Kontrolle	0	80	220	367
6	pGlcN-L Kontrolle	0	93	567	637
7	nichts	0	56	163	525
8	nichts	0	82	370	tot
9	Propylenglycol	0	76	267	341

[0351] Die Daten, die die mit p-GlcNAc-Lactat-Mito behandelten Tiere mit den Kontrollen vergleichen, sind in den **Fig.** 29–30 gezeigt. Die Daten, die in der Tabelle XI und den **Fig.** 29–30 zusammengefasst sind, veran-

schaulichen deutlich, dass die Tumoren, die bei den mit den Mitomycin enthaltenden p-GlcNAc-Lactatgelen behandelten Tieren wachsen, eine signifikant verzögerte Wachstumsrate haben. Ihr Wachstum ist im Vergleich zu den p-GlcNAc-Lactatgelkontrollen 4-mal und im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrollen 4-mal so langsam.

20.2.3 p-GlcNAc-MEMBRAN 5'FU

[0352] Als Nächstes wurden die Versuche, die dazu dienten, die Wirkung von p-GlcNAc-Membran-5'FU-Medikamentenabgabesystemen auf die Hautkrebstumorgröße zu untersuchen, wie oben im Abschnitt 20.1 beschrieben durchgeführt.

[0353] Die Tumorvolumendaten, die während der Untersuchung erhalten wurden, einschließlich die prozentuale Änderung des Volumens, die durch die unterschiedlichen Behandlungen bewirkt wurde, ist unten in der Tabelle XII zusammengefasst. Es wurde davon ausgegangen, dass die Tumoren eine zylindrische Form hatten. Ihre Volumen wurden durch Messen ihrer Breite und Länge bestimmt und unter Verwendung der folgenden Gleichung: $V = \pi r^2 l$, worin der Radius r 0,5-mal der Breite und 1-mal der Länge entspricht.

Tabelle XII

p-GlcNAc-Membran + 5'-Fluorouracil-Tierdaten

Tier #	Behandlung	Tumorvolumen Vorbehandlung (mm^3)	Tumorvolumen Nachbehandlung (mm^3)	% Änderung	Bemerkungen
A. 5'-FU hohe Dosis:					
1.	5'-FU HD	393	283	-28,0	
2.	5'-FU HD	785	308	-60,8	
3.	5'-FU HD	98,1	62,8	-36,0	
4.	5'-FU HD	785	550	-30,0	
Durchschnitt pro Tier				**-38,7**	
B. 5'-FU niedrige Dosis					
5.	5'-FU LD	603	170	-71,9	
6.	5'-FU LD	603	615	2,0	
7.	5'-FU LD	269	198	-26,0	
8.	5'-FU LD	169	226	33,3	
Durchschnitt pro Tier				**-15,7**	
C. p-GlcNAc- Kontrolle:					
9.	p-GlcNAc Kontrolle	170	550	320,0	
10.	p-GLcNAc Kontrolle				am 12. Tag verstorben
Durchschnitt pro Tier				**320,0**	

DE 694 33 692 T2 2005.03.10

Tabelle XII (Fortsetzung)

D. nicht behandelte Kontrolle:				
11. nicht behandelt	402	864	215,0	... Tumoren
12. nicht behandelt	21,2	572	2700,0	... Tumoren
Durchschnitt pro Tier			**1457,0**	
E. 5'-FU über intravenöse Injektion – Kontrolle:				
13. niedrige Dosis	402	703	175,0	
14. niedrige Dosis	402	402	0,0	am 13. Tag verstorben
15. hohe Dosis	402	132	-67,0	am 13. Tag verstorben

[0354] Die **Fig.** 31 fasst einen Teil der Daten, die oben in der Tabelle XII vorgestellt sind, zusammen. Wie in

der **Fig.** 31 gezeigt ist, legen die Daten deutlich nahe, dass die mit den hohe Dosen (HD) 5'-FU enthaltenden p-GlcNAc-Membranen behandelten Tumoren aufgehört haben zu wachsen und in allen Fällen tatsächlich deutlich kleiner geworden sind. Die Polymermaterialien mit niedriger Dosis (LD) führten zu einem stabilen Krankheitszustand und einen leichten Rückgang der Tumorgröße. Dagegen wurden die Tumoren in den Kontrolltieren weiter rasch größer. Es ist interessant festzustellen, dass zwei von drei Kontrolltieren, die mittels IV behandelt wurden, während der Untersuchung starben, was anzeigt, dass die systemische Abgabe der entsprechenden Menge an 5'-FU tödlich ist, während die ortsgerichtete Abgabe für das p-GlcNAc-Polymer wirksam ist, das Tier von der Krankheit zu befreien.

20.3 SCHLUSS

[0355] Die in diesem Abschnitt vorgestellten Daten legen deutlich nahe, dass die ortsgerichtete Abgabe von Zytostatika einen positiven Effekt auf die Verzögerung und Umkehr des Tumorwachstums hat. Erfolgreiche Ergebnisse wurden unter Verwendung von p-GlcNAc-Medikamentenabgabezusammensetzungen erhalten, die mit zwei unterschiedlichen Formulierungen hergestellt wurden, nämlich mit p-GlcNAc-Lactat- und p-GlcNAc-Membranformulierungen. Weiterhin wurden erfolgreiche Ergebnisse unter Verwendung von zwei unterschiedlichen Zytostatika erhalten, 5'-FU und Mito. Daher zeigen die erfindungsgemäßen p-GlcNAc-Medikamentenabgabesysteme eine Antitumoraktivität, die zum Beispiel für die Abgabe von Medikamenten speziell an die Stelle der interessanten Tumorzellen nützlich ist.

[0356] Es ist offensichtlich, das viele Modifikationen und Variationen der vorliegenden Erfindung, wie hier dargestellt, gemacht werden können, ohne von dem Geist und dem Umfang derselben abzuweichen. Die speziellen, oben beschriebenen Ausführungsformen werden nur beispielhaft gegeben und die Erfindung ist nur durch die Begriffe der beigefügten Ansprüche begrenzt.

Patentansprüche

1. Verfahren zum Isolieren von Poly-ß-1->4-N-acetylglucosamin mit 4.000 – bis 150.000 N-Acetylglucosaminmonosacchariden, die kovalent in einer ß-1->4-Konformation anhaften, und einem Molekulargewicht von 800,000 Dalton bis 30 Millionen Dalton, umfassend:
(a) das Züchten einer Mikroalge, umfassend einen Zellkörper und eine Poly-ß-1->4-N-acetylglucosaminfaser, um so eine Mikroalgenzellkultur zu erzeugen;
(b) das Behandeln der Mikroalgenzellkultur von Schritt (a) mit einem chemischen Mittel, das in der Lage ist, die Mikroalgenzelle zu schwächen, in einer Konzentration, die die Zellkörper für eine ausreichend lange Zeit nicht zerstört, so dass die Poly-ß-1->4-N-glucosaminfaser aus den Zellkörpern freigesetzt wird, wobei das chemische Mittel Flusssäure in einer Endkonzentration von ungefähr 0,07 M ist;
(c) das Abspalten der Poly-ß-1->4-N-acetylglucosaminfasern aus den Zellkörpern.

2. Verfahren zum Isolieren von Poly-ß-1->4-N-acetylglucosamin mit 4.000 bis 150.000 N-Acetylglucosaminmonosacchariden, die kovalent in einer ß-1->4-Konformation anhaften, und einem Molekulargewicht von 800.000 Dalton bis 30 Millionen Dalton, umfassend:
(a) das Züchten einer Mikroalge, umfassend einen Zellkörper und eine Poly-ß-1->4-N-acetylglucosaminfaser, um so eine Mikroalgenzellkultur zu erzeugen;
(b) das Behandeln der Mikroalgenzellkultur von Schritt (a) mit einem biologischen Mittel, das in der Lage ist, die Poly-ß-1->4-acetylglucosaminfasersynthese für eine ausreichend lange Zeit zu verhindern, so dass die Poly-ß-1->4-N-glucosaminfaser aus den Zellkörpern freigesetzt wird, wobei das biologische Mittel Polyoxin-D ist;
(c) das Abspalten der Poly-ß-1->4-N-acetylglucosaminfasern aus den Zellkörpern. Verfahren nach Anspruch 1, weiter umfassend nach Schritt (c)
(d) das Entfernen des ganzen Proteins, im Wesentlichen aller anderen organischen kontaminierenden Substanzen und im Wesentlichen aller anorganischen kontaminierenden Substanzen aus der abgespaltenen Poly-ß-1->4-N-acetylglucosaminfaser, so dass die Poly-ß-1->4-N-acetylglucosamin-Art isoliert wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, weiter umfassend nach Schritt (c):
(d) das Entfernen des ganzen Proteins, im Wesentlichen aller anderen organischen kontaminierenden Substanzen und im wesentlichen aller anorganischen kontaminierenden Substanzen aus der abgespaltenen Poly-ß-1->4-N-acetylglucosaminfaser, so dass die Poly-ß-1->4-N-acetylglucosamin-Art abgetrennt wird.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–4, wobei die Mikroalge eine Kieselalge ist.

5. Verfahren nach Anspruch 5, wobei die Kieselalge zur Gattung Thalassiosira gehört.

6. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Kieselalge der Gattung Thalassiosira Thalassiosira fluviatilis oder Thalassiosira weissflogi ist.

7. Verfahren nach Anspruch 3, weiter umfassend das Neutralisieren der abgespaltenen Poly-ß-1->4-N-acetylglucosaminfaser vor Schritt (d).

8. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, weiter umfassend nach Schritt (d): (e) das Anordnen der isolierten Poly-ß-1->4-N-acetylglucosamin-Art in einer Umgebung mit basischem pH.

9. Verfahren nach Anspruch 9, weiter umfassend:
(f) das Hinzufügen eines Medikaments zu der isolierten Poly-ß-1->4-N-acetylglucosamin-Art, so dass das Medikament und die Art sich in der Umgebung mit basischem pH befinden, und
(g) das Verringern des pH-Werts der Umgebung mit basischem pH, so dass das Medikament in der Poly-ß-1->4-N-acetylglucosamin-Art eingeschlossen wird.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–10, wobei das isolierte Poly-ß-1->4-N-acetylglucosamin 4.000 bis 15.000 N-Acetylglucosaminmonosaccharide umfasst, die kovalent in einer ß-1->4-Konformation anhaften, und 800.000 bis 3 Millionen Dalton aufweist.

11. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, umfassend nach Schritt (c) einen zusätzlichen Deacetylierungsschritt durch Behandeln von in Schritt (c) erhaltenem p-G1cNAc mit einer Base oder einem Deacetylaseenzym.

12. Verfahren nach Anspruch 12, wobei mindestens ein N-Acetylglucosaminmonosaccharid deacetyliert wurde.

13. Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei mindestens ungefähr 25 % bis ungefähr 75 % der N-Acetylglucosaminmonosaccharide deacetyliert wurde.

14. Verfahren nach Anspruch 12, 13 oder 14, wobei mindestens ungefähr 70 % der N-Acetylglucosaminmonosaccharide deacetyliert wurde.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 12–15, wobei die deacetylierte Art 4.000 bis 150.000 Glucosaminmonosaccharide umfasst, die kovalent in einer ß-1->4-Konformation anhaften, und ein Molekulargewicht von 640.000 bis 24 Millionen Dalton aufweist.

16. Verfahren nach Anspruch 16, wobei die deacetylierte Art 4.000 bis 15.000 Glucosaminmonosaccharide umfasst, die kovalent in einer ß-1->4-Konformation anhaften, und ein Molekulargewicht von 640.000 bis 2.4 Millionen Dalton aufweist.

17. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine therapeutisch wirksame Menge der Poly-ß-1->4-N-acetylglucosamin-Art aus Mikroalge, die durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1–11 erhältlich ist, wobei die Art 4.000 bis 150.000 N-Acetylglucosaminmonosaccharide umfasst, die kovalent in einer ß-1->4-Konformation anhaften, frei von Protein ist, im Wesentlichen frei von anderen organischen verunreinigenden Substanzen ist und ein Molekulargewicht von 800.000 Dalton bis 30 Millionen Dalton aufweist, und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.

18. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 18, wobei das Poly-ß-1->4-N-Acetylglucosamin aus Mikroalge aus einer Kieselalge stammt.

19. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 19, wobei die Kieselalge zur Gattung Thalassiosira gehört.

20. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 20, wobei die Kieselalge der Gattung Thalassiosira Thalassiosira fluviatilis oder Thalassiosira weissflogi ist.

21. Verwendung der Poly-ß-1->4-N-acetylglucosamin-Art aus Mikroalge, die durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1–11 erhältlich ist, wobei die Art 4.000 bis 150.000 N-Acetylglucosaminmonosaccharide umfasst, die kovalent in einer ß-1->4-Konformation anhaften, frei von Protein ist, im Wesentlichen frei von anderen organischen verunreinigenden Substanzen ist und ein Molekulargewicht von 800.000 Dalton bis 30 Millionen Dalton aufweist, zum Herstellen einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die dazu geeignet ist, Hä-

mostase zu fördern.

22. Verwendung nach Anspruch 22, wobei das Poly-ß-1->4-acetylglucosamin aus Mikroalge aus einer Kieselalge stammt.

23. Verwendung nach Anspruch 23, wobei die Kieselalge zur Gattung Thalassiosira gehört.

24. Verwendung nach Anspruch 24, wobei die Kieselalge der Gattung Thalassiosira Thalassiosira fluviatilis oder Thalassiosira weissflogi ist.

25. Verwendung nach einem der Ansprüche 22–25, wobei die Form oder Konfiguration der pharmazeutischen Zusammensetzung ein Gel, Schwamm oder eine Membran ist.

26. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine therapeutisch wirksame Menge eines Medikaments und die Poly-ß-1->4-N-acetylglucosamin-Art aus Mikroalge, erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1–11, wobei die Art 4.000 bis 150.000 N-Acetylglucosaminmonosaccharide umfasst, die kovalent in einer ß-1->4-Konformation anhaften, frei von Protein ist, im Wesentlichen frei von anderen organischen verunreinigenden Substanzen ist und ein Molekulargewicht von 800.000 Dalton bis 30 Millionen Dalton aufweist, als pharmazeutisch annehmbaren Träger.

27. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 27, wobei das Poly-ß-1->4-N-acetylglucosamin aus Mikroalge aus einer Kieselalge stammt.

28. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 28, wobei die Kieselalge der Gattung Thalassiosira angehört.

29. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 29, wobei die Kieselalge der Gattung Thalassiosira Thalassiosira fluviatilis oder Thalassiosira weissflogi ist.

30. Isolierte Poly-ß-1->4-acetylglucosamin-Art, erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 1–11, wobei die Art 4.000 bis 150.000 N-Acetylglucosaminmonosaccharide umfasst, die kovalent in einer ß-1->4-Konformation anhaften, frei von Protein ist, im Wesentlichen frei von anderen organischen verunreinigenden Substanzen ist und ein Molekulargewicht von 800.000 Dalton bis 30 Millionen Dalton aufweist, wobei die Art eine Poly-ß-1->4-glucosaminlactat-Art ist.

31. Isolierte Poly-ß-1->4-N-acetylglucosamin-Art, erhältlich durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 12-16, wobei die Art 4.000 bis 150.000 Glucosaminmonosaccharide umfasst, die kovalent in einer ß-1->4-Konformation anhaften, frei von Protein ist, im Wesentlichen frei von anderen organischen verunreinigenden Substanzen ist, im Wesentlichen frei von anorganischen verunreinigenden Substanzen ist und ein Molekulargewicht von 640.000 Dalton bis 24 Millionen Dalton aufweist, wobei die Art eine Poly-ß-1->4-glucoamsinlactat-Art ist.

32. Verwendung der Art von Anspruch 31 oder 32 zur Herstellung eines Präparats zur Verringerung postoperativer Adhäsionen.

Es folgen 56 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

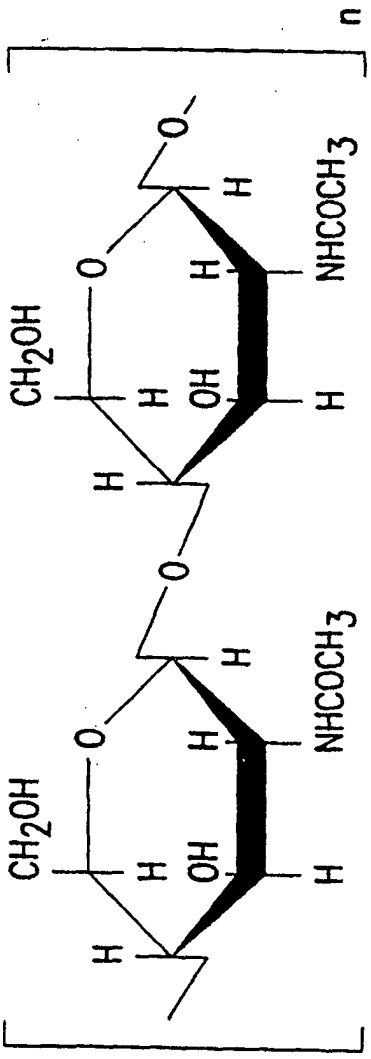


FIG. 1

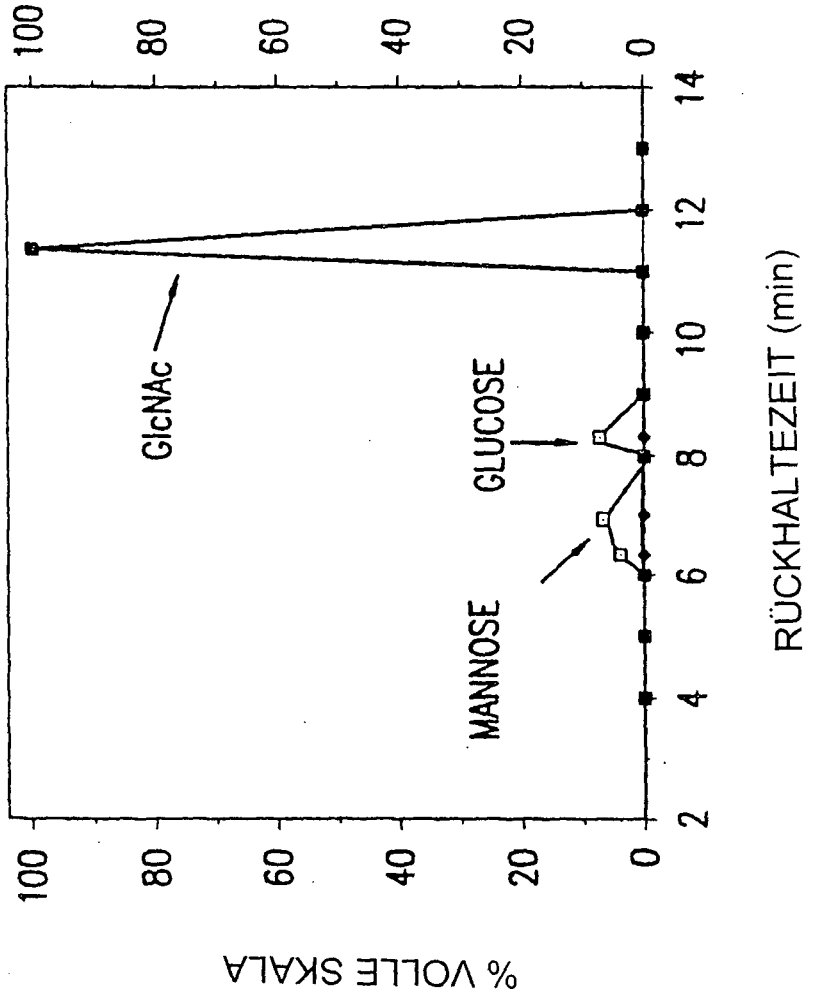

GlcNAc
GLUCOSE
MANNOSE
% VOLLE SKALA
RÜCKHALTEZEIT (min)
0
20
40
60
80
100
2
4
6
8
10
12
14

FIG.2

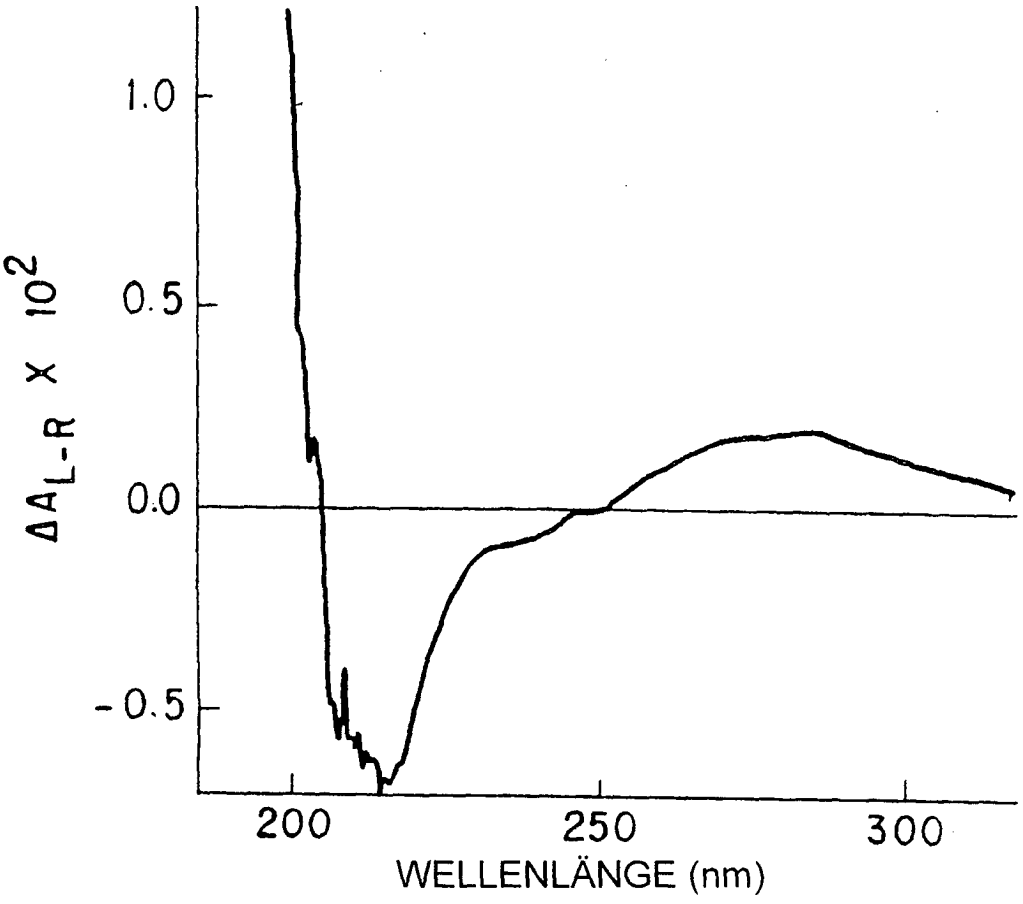


FIG. 3A

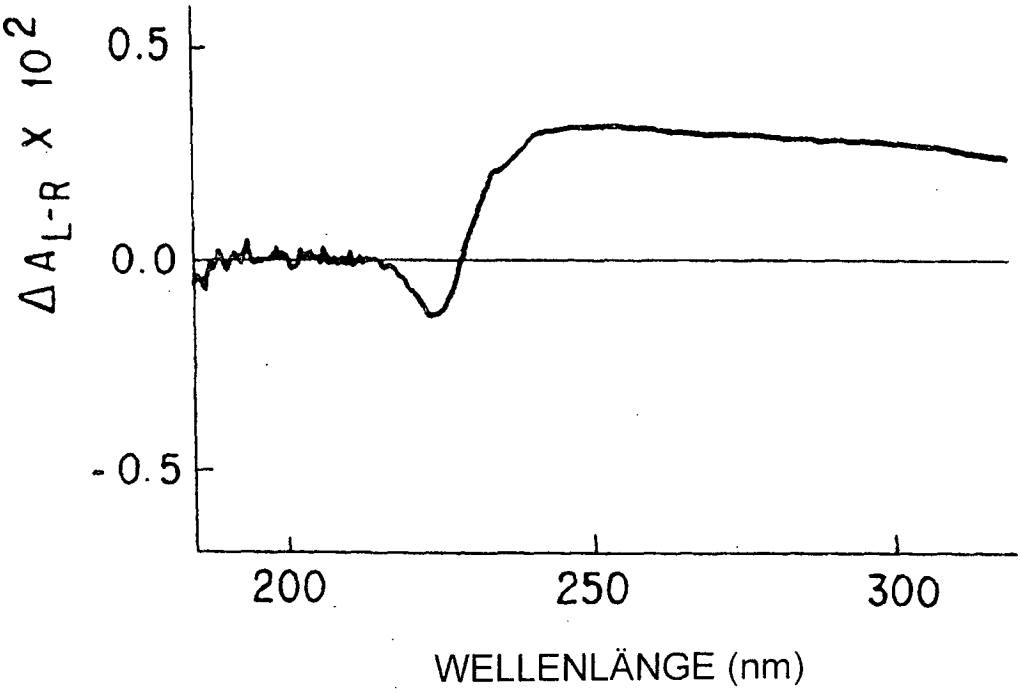


FIG. 3B

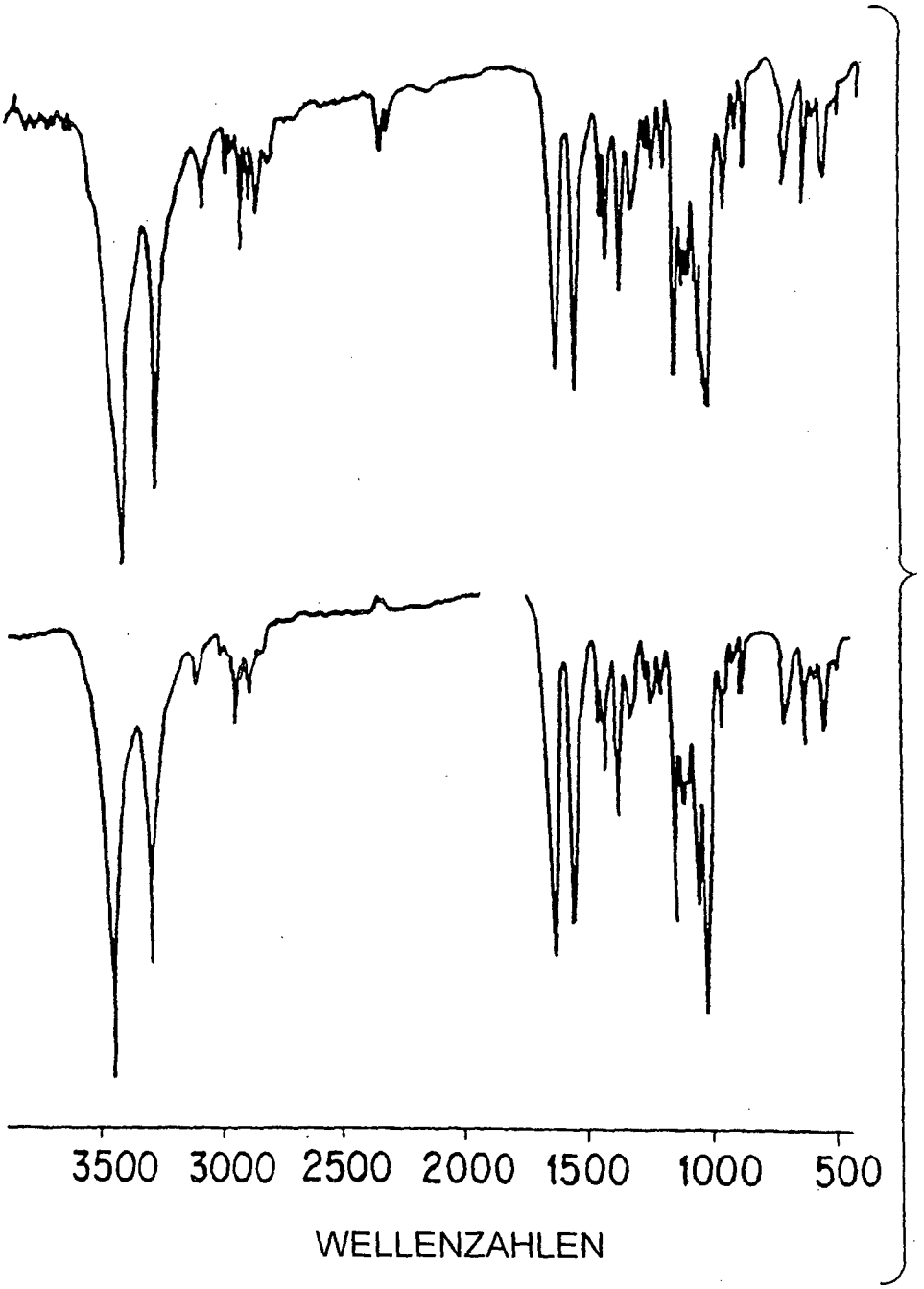


FIG. 4A

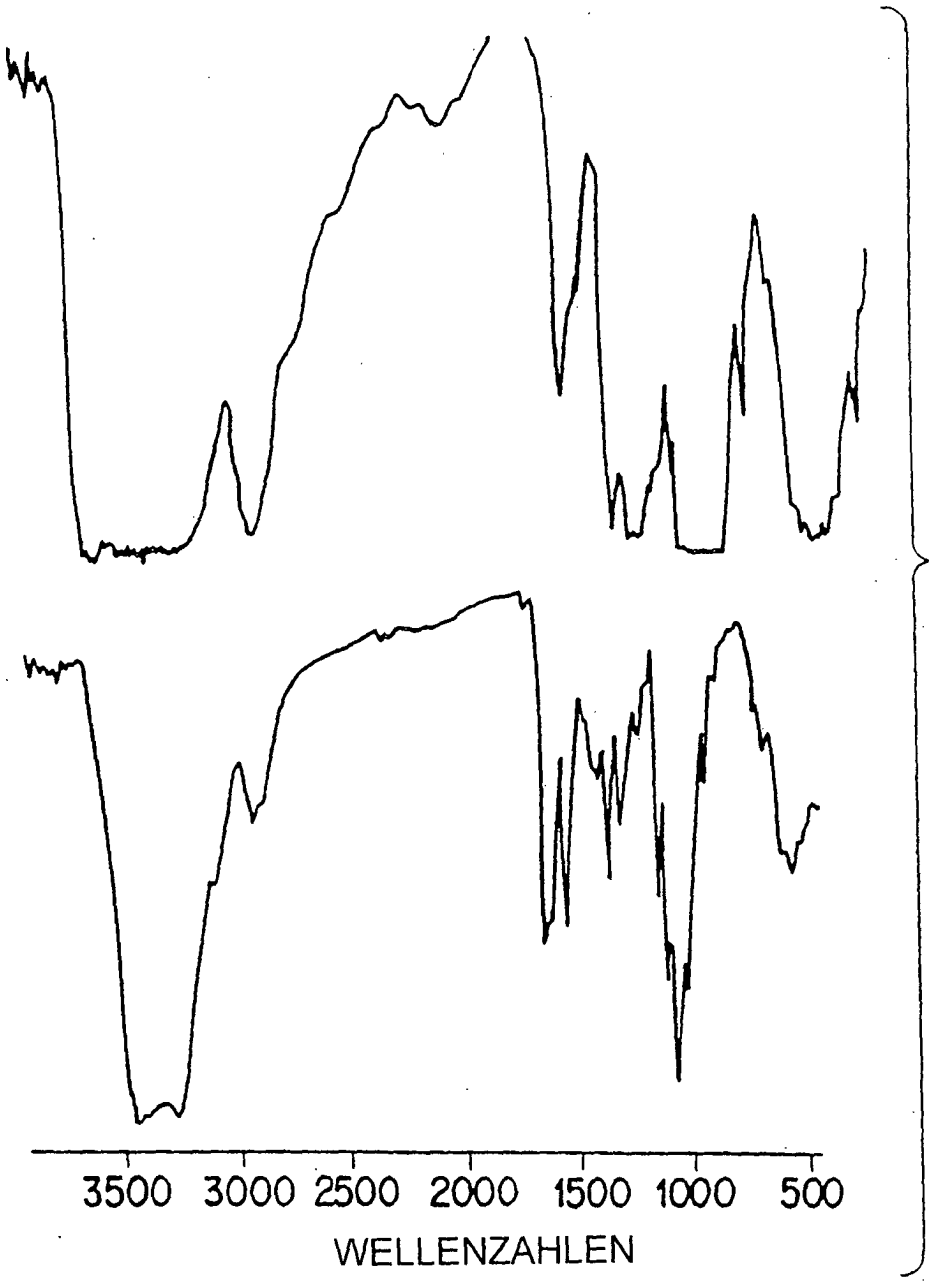


FIG. 4B

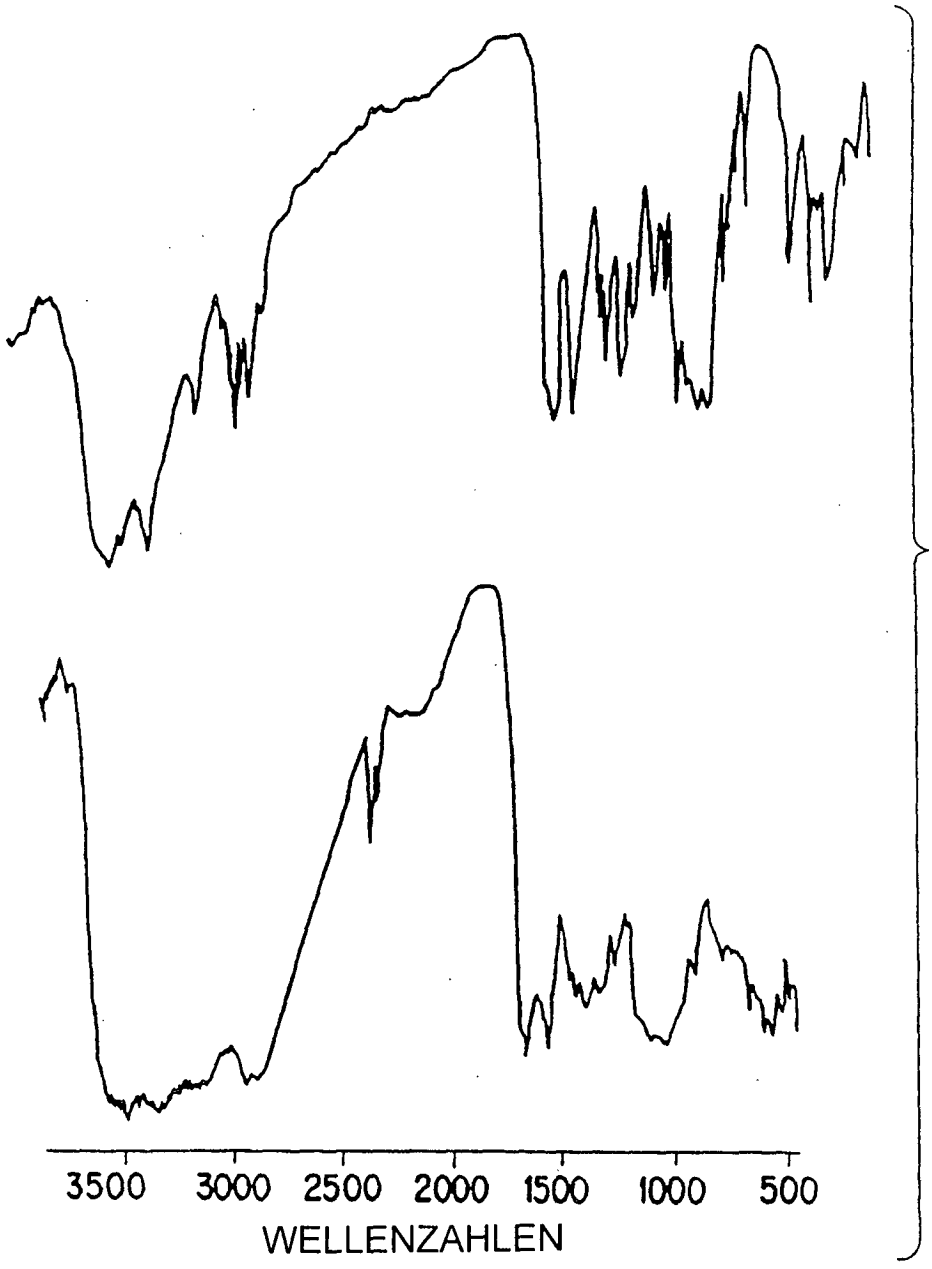


FIG. 4C

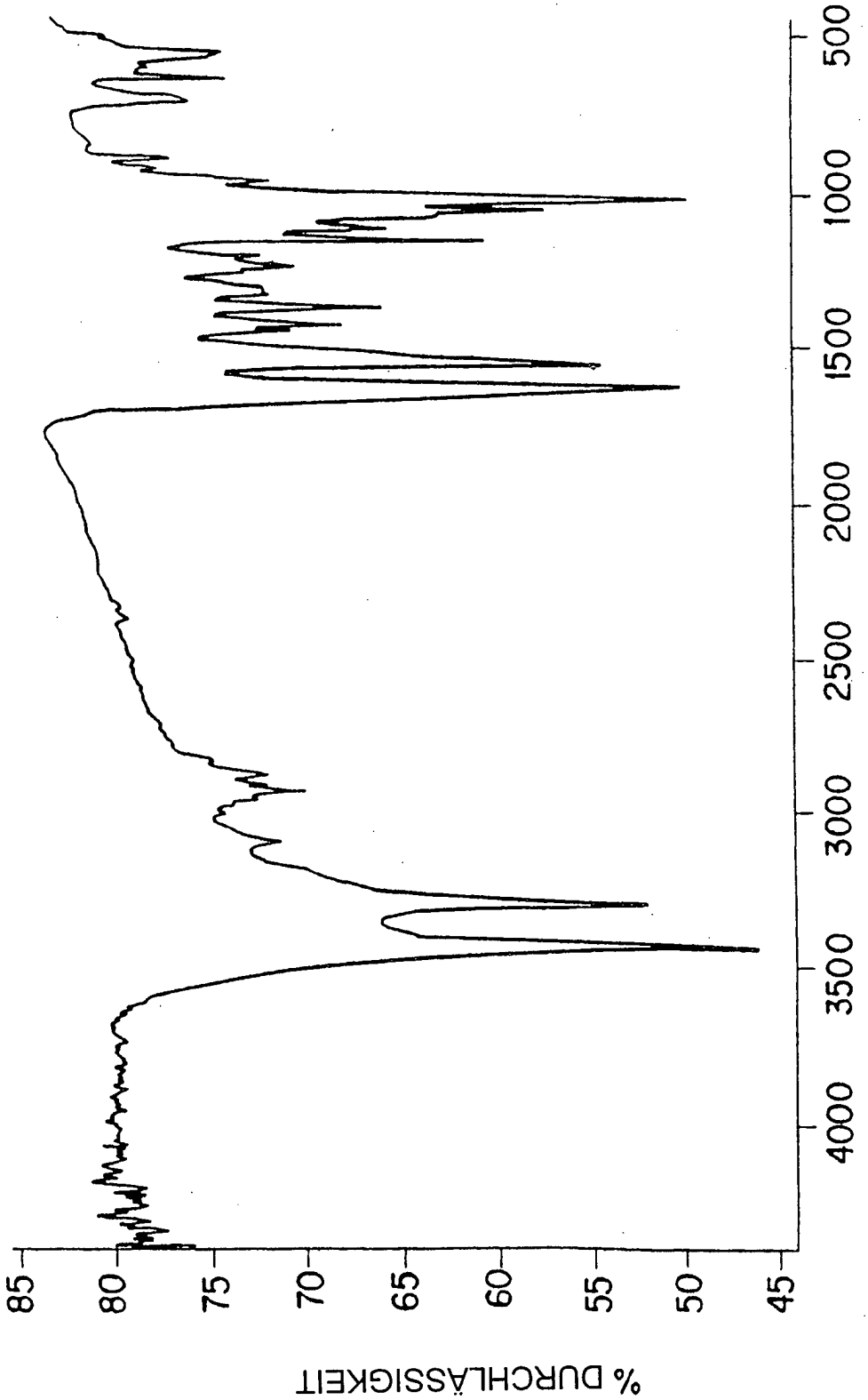

% DURCHLÄSSIGKEIT
85
80
75
70
65
60
55
50
45
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
WELLENZAHLEN

FIG. 4D

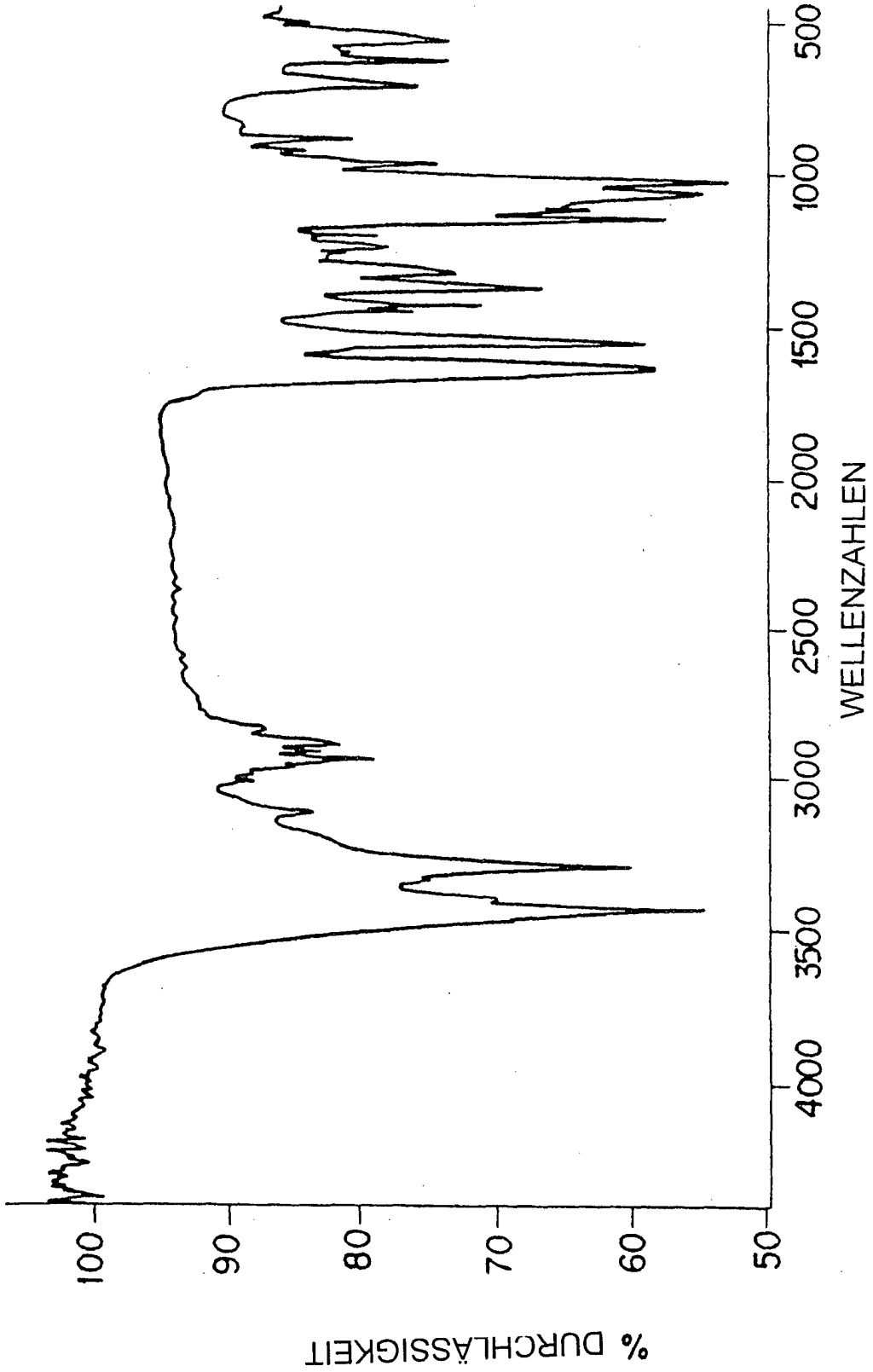

% DURCHLÄSSIGKEIT
100
90
80
70
60
50
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
WELLENZAHLEN

FIG. 4E

PEAK	%RF		AMPLITUDE	%SIGMA	BEREICH	% GES.		VERHÄLTNIS	VERHÄLTNIS
1	5	C=0	0,087	0,29	1,304	1,674			5,609
2	6	C=0	0,146	0,38	2,855	3,664	4,159	1,759	2,562
3	47	C1	0,563	0,38	11,153	14,314	11,153	0,656	0,656
4	59	C4	0,452	0,32	7,41	9,51	7,410	0,987	0,987
5	63	C5	0,311	0,49	7,906	10,147	7,906	0,925	0,925
6	64	C3	1,195	0,16	9,816	12,598			0,745
7	65	C3	0,533	0,4	11,11	14,259	20,926	0,350	0,658
8	72	C6	0,148	1,1	8,419	10,805			0,869
9	73	C6	0,21	0,18	1,98	2,541	10,399	0,703	3,694
10	74	C2	0,026	0,2	0,27	0,346			27,089
11	75	C2	0,227	0,72	8,38	10,755	8,650	0,846	0,873
12	94	CH3	0,377	0,38	7,314	9,387			1,000

FIG.5A

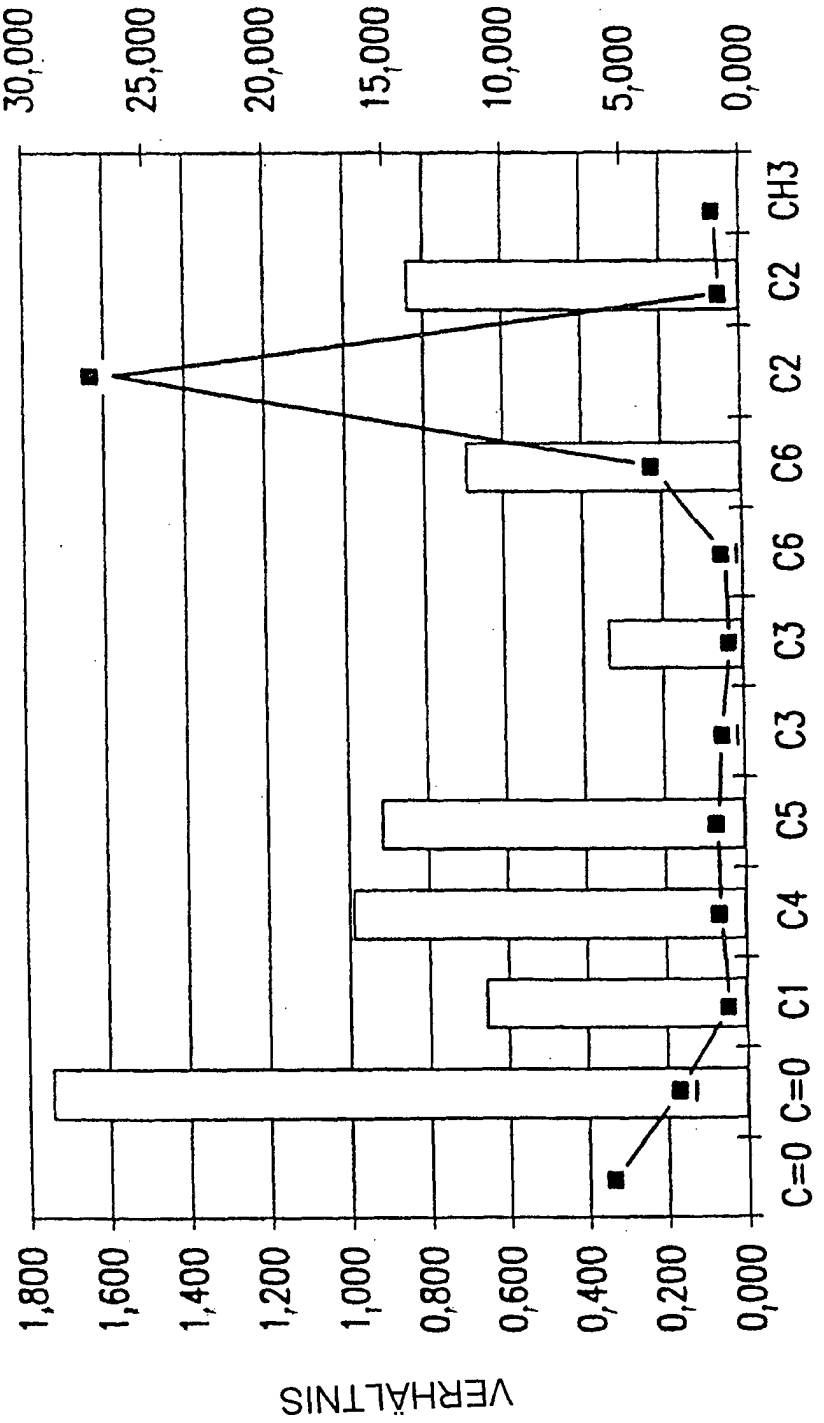

30,000
25,000
20,000
15,000
10,000
5,000
0,000
CH3
C2
C2
C6
C6
C3
C3
C5
C4
C1
C=0
C=0
1,800
1,600
1,400
1,200
1,000
0,800
0,600
0,400
0,200
0,000
VERHÄLTNIS

FIG.5B

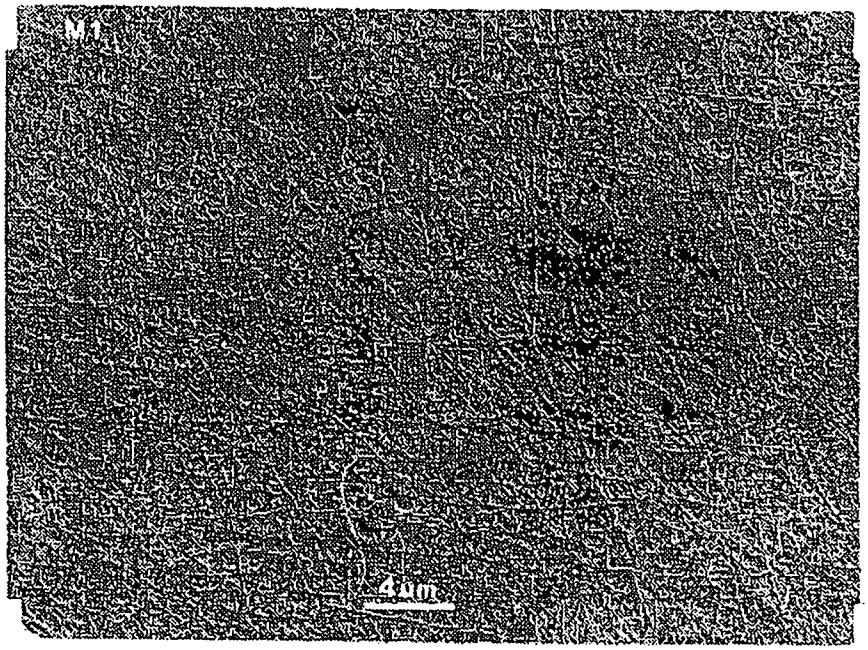


FIG.6A

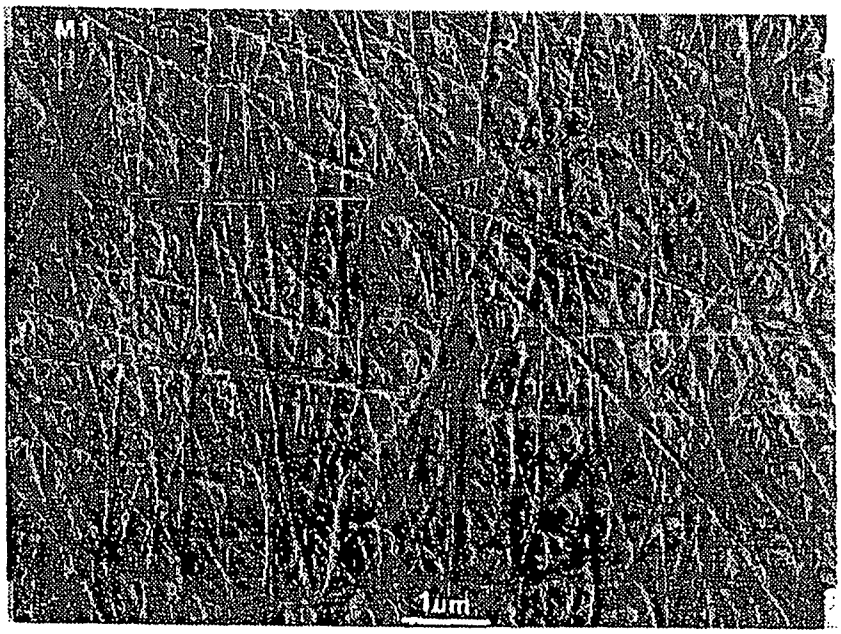


FIG.6B

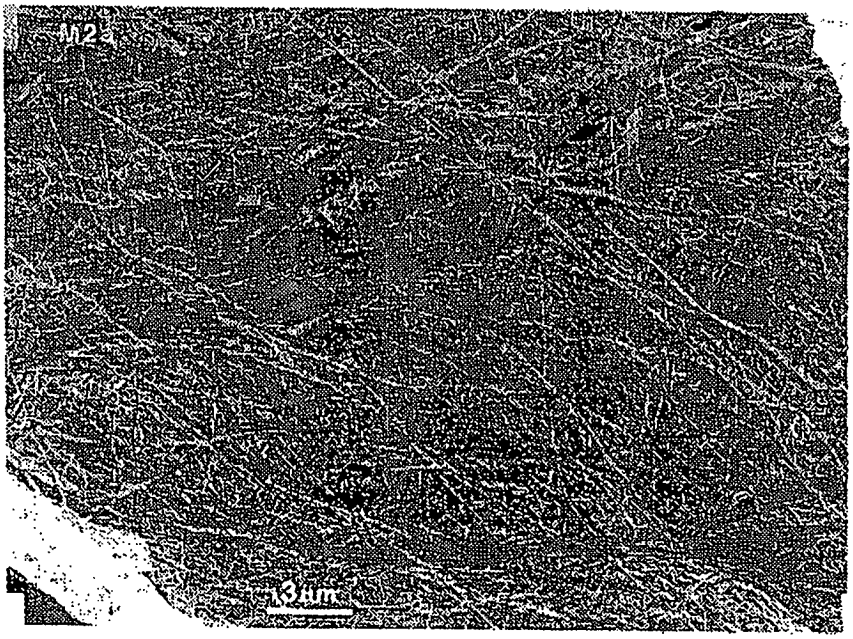


FIG.7A

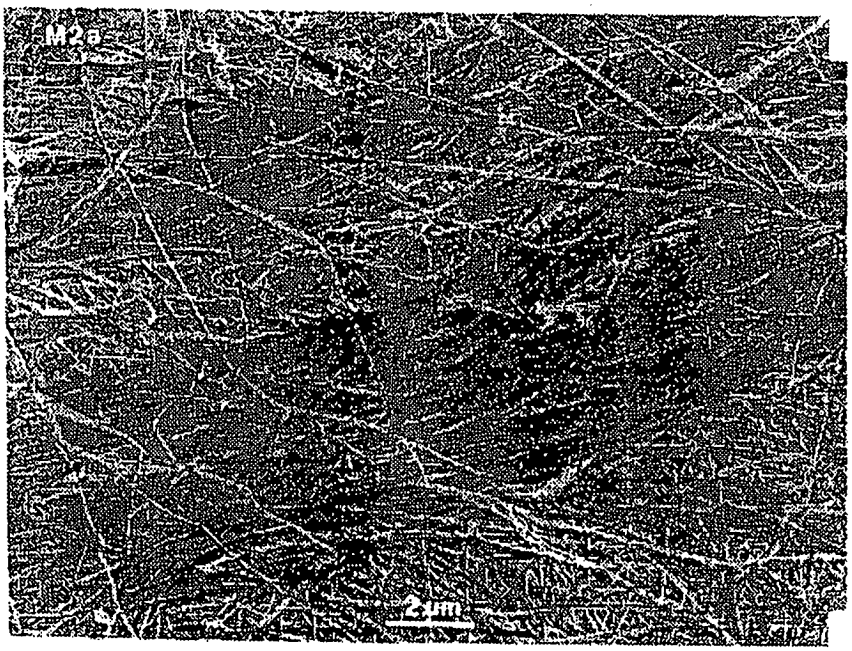


FIG.7B

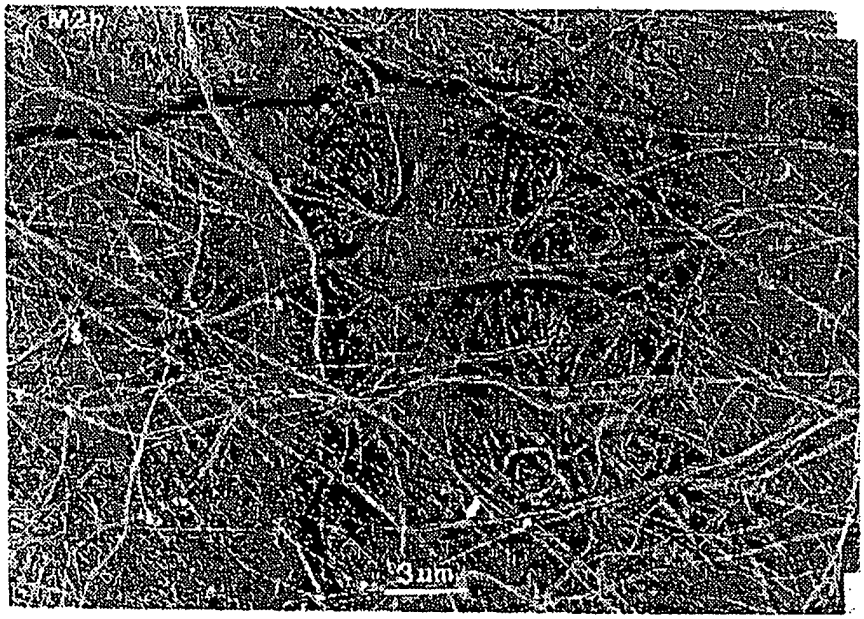


FIG.8A

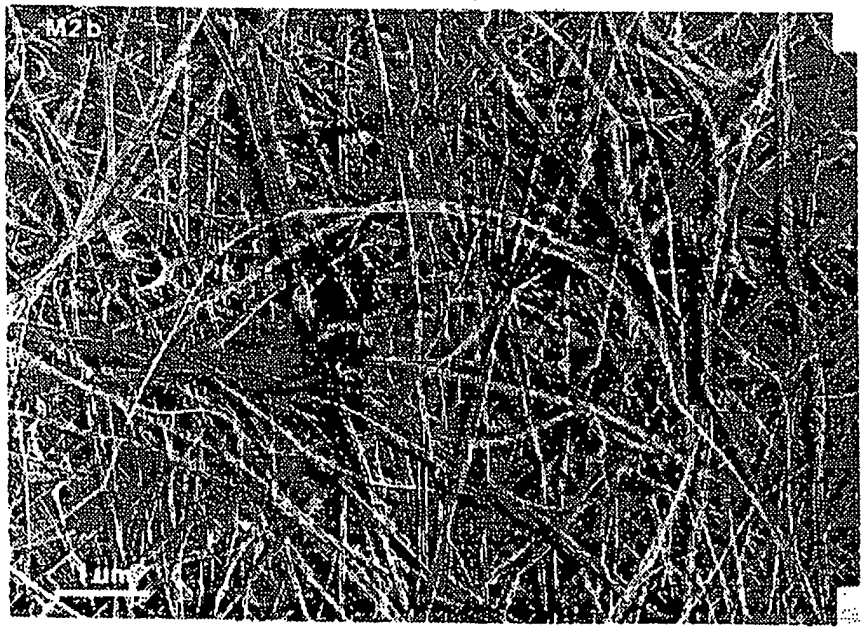


FIG.8B

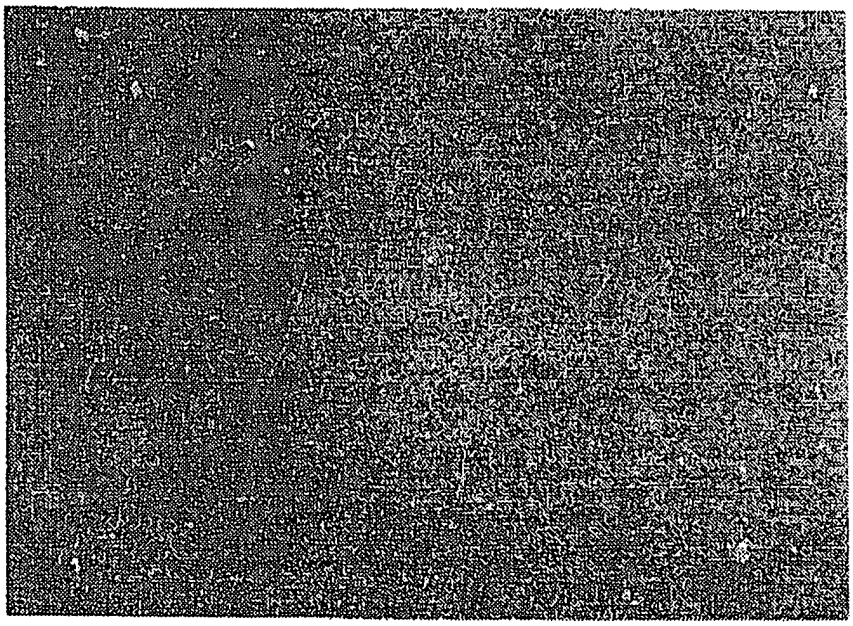


FIG.9A

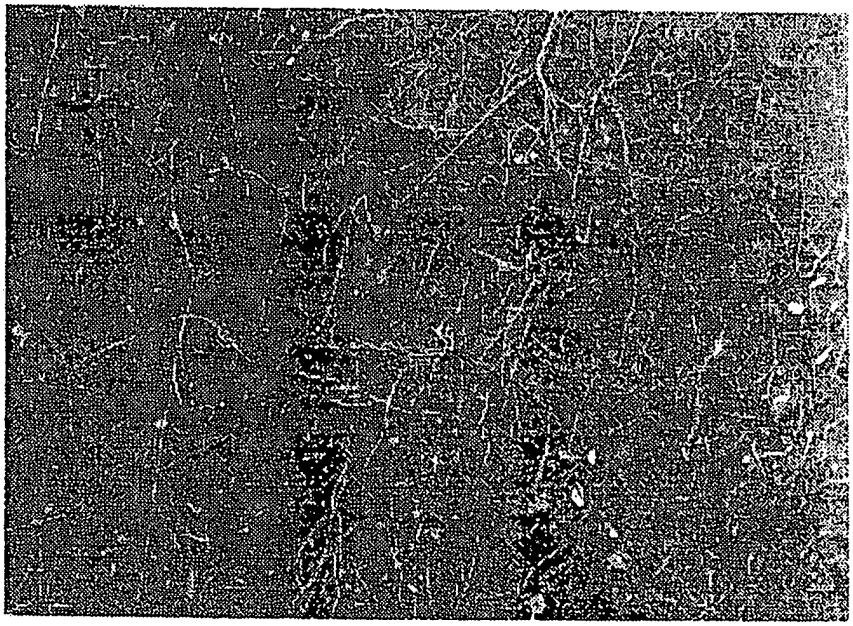


FIG.9B

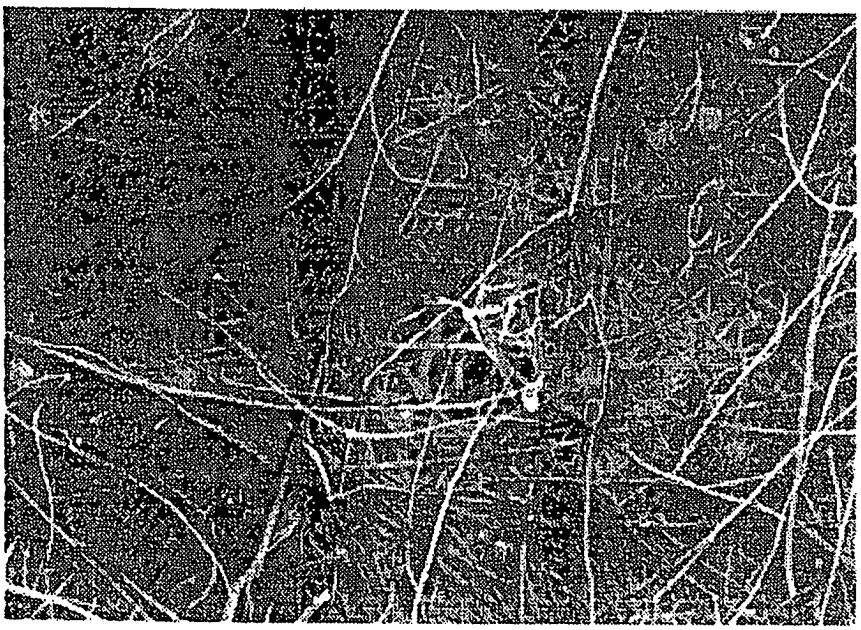


FIG.9C



FIG.9D

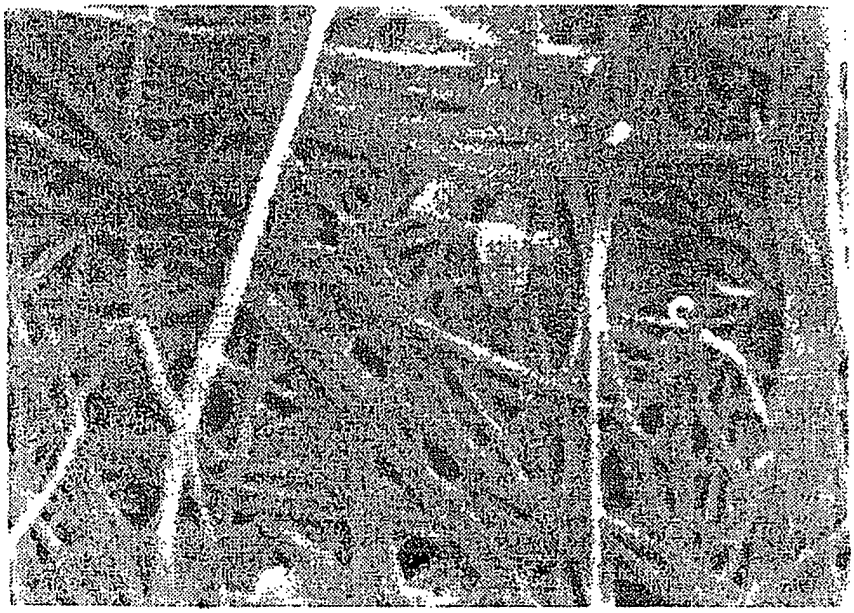


FIG.9E



FIG.10A

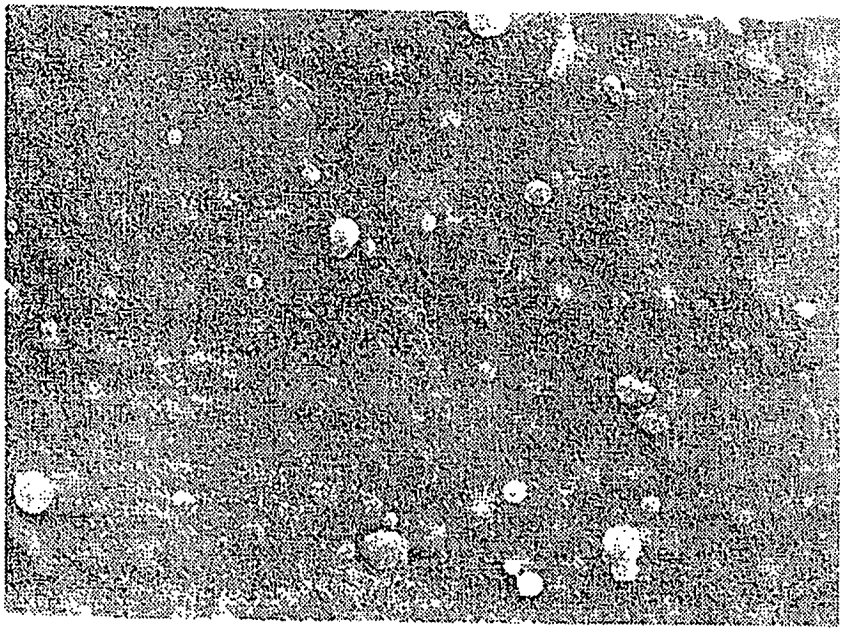


FIG.10B

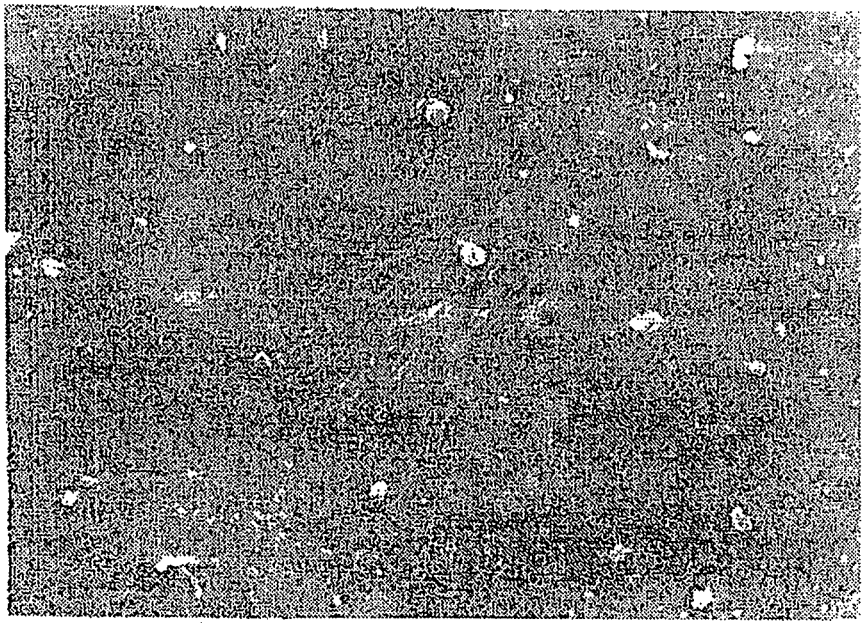


FIG.11A

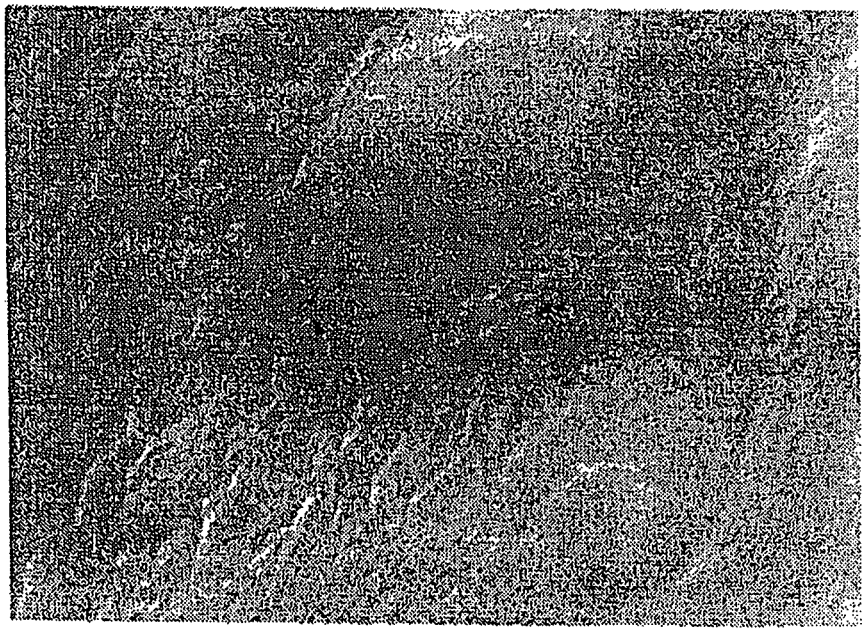


FIG.11B

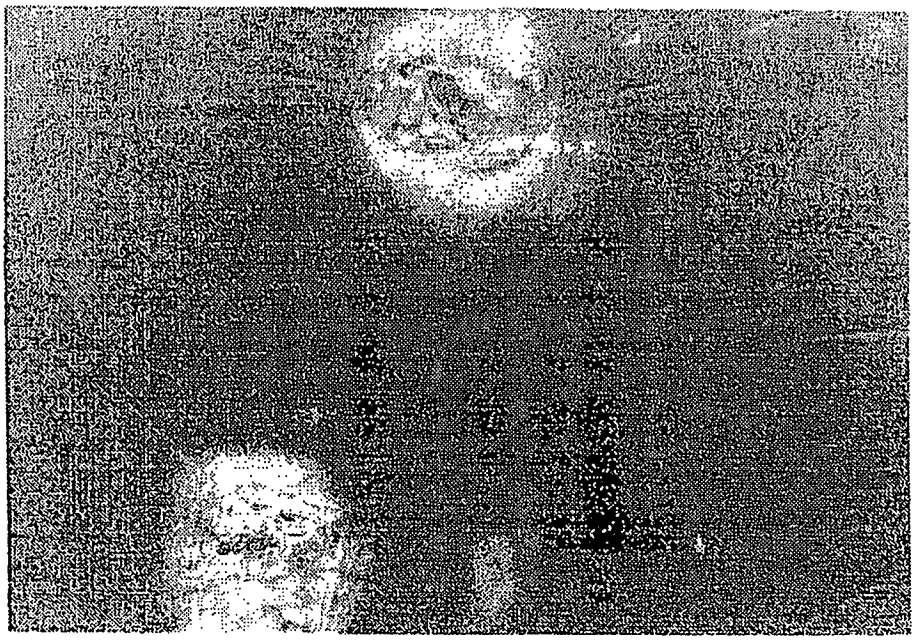


FIG.12A

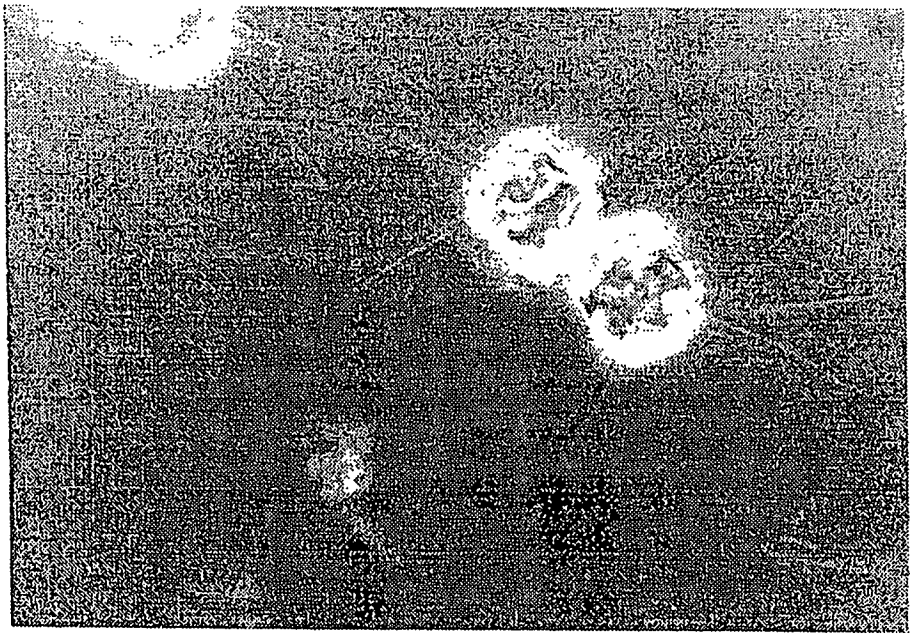


FIG.12B

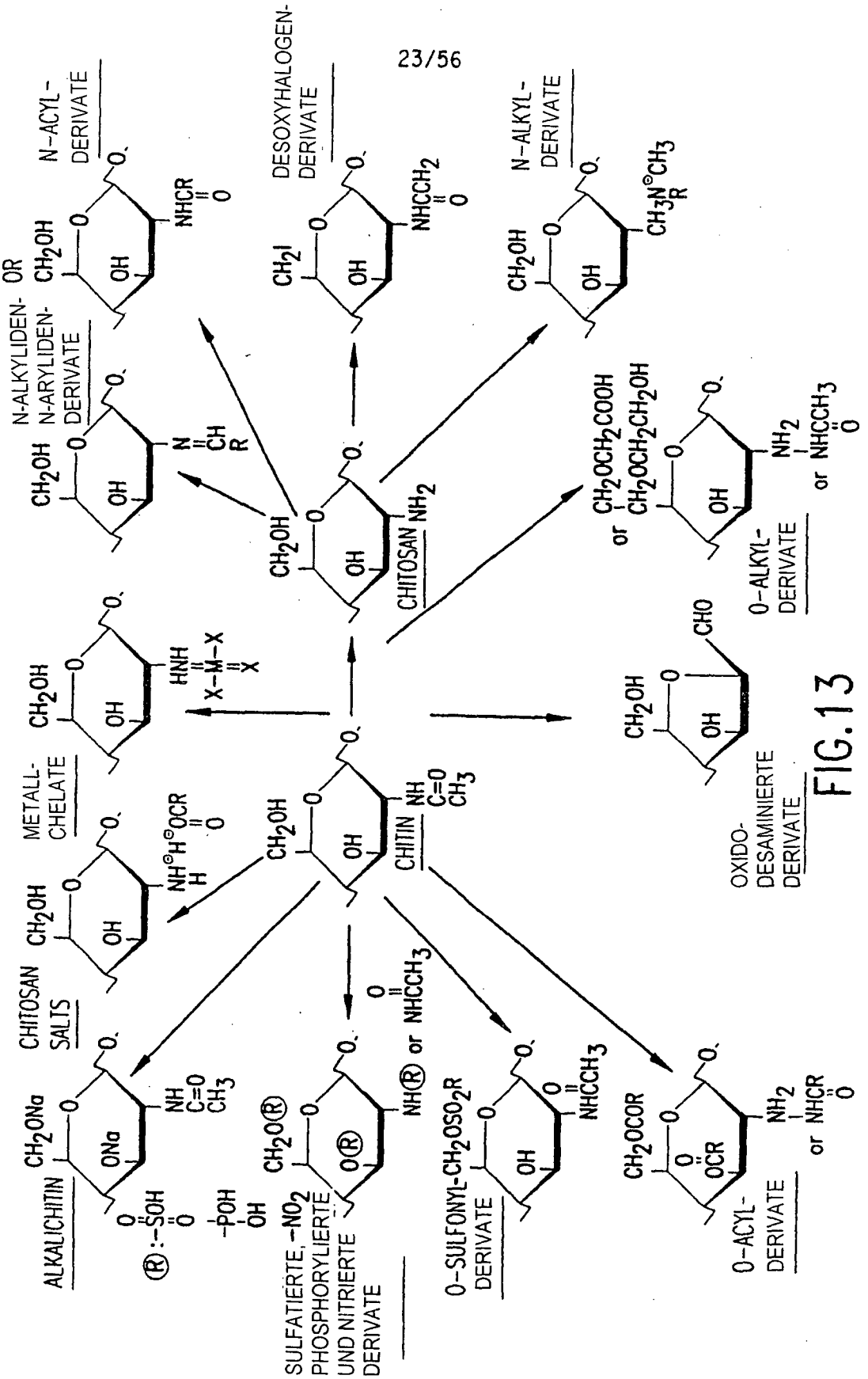

CHITOSAN SALTS
METALL-CHELATE
N-ALKYLIDEN- OR N-ARYLIDEN-DERIVATE
N-ACYL-DERIVATE
DESOXYHALOGEN-DERIVATE
N-ALKYL-DERIVATE
CHITOSAN
CHITIN
ALKALICHITIN
SULFATIERTE, -NO2 PHOSPHORYLIERTE UND NITRIERTE DERIVATE
O-SULFONYL-CH2OSO2R DERIVATE
O-ACYL-DERIVATE
OXIDO-DESAMINIERTE DERIVATE
O-ALKYL-DERIVATE

FIG.13

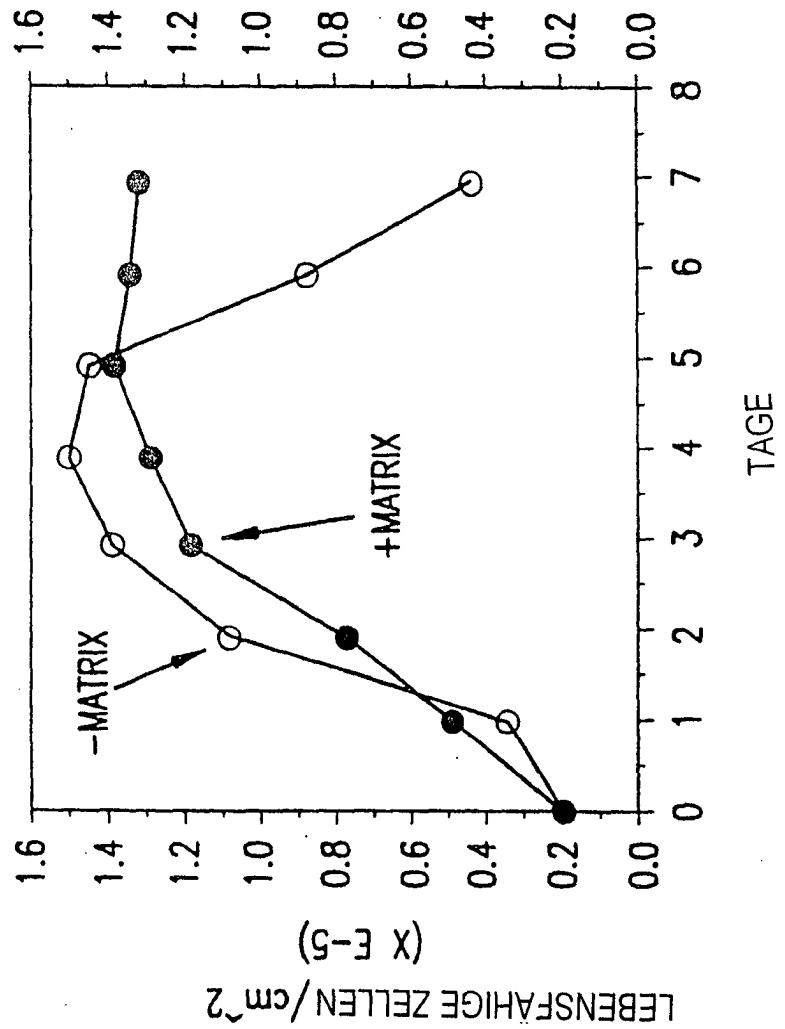

LEBENSFÄHIGE ZELLEN/cm^2
(X E-5)
TAGE
-MATRIX
+MATRIX
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
0
1
2
3
4
5
6
7
8

FIG.14

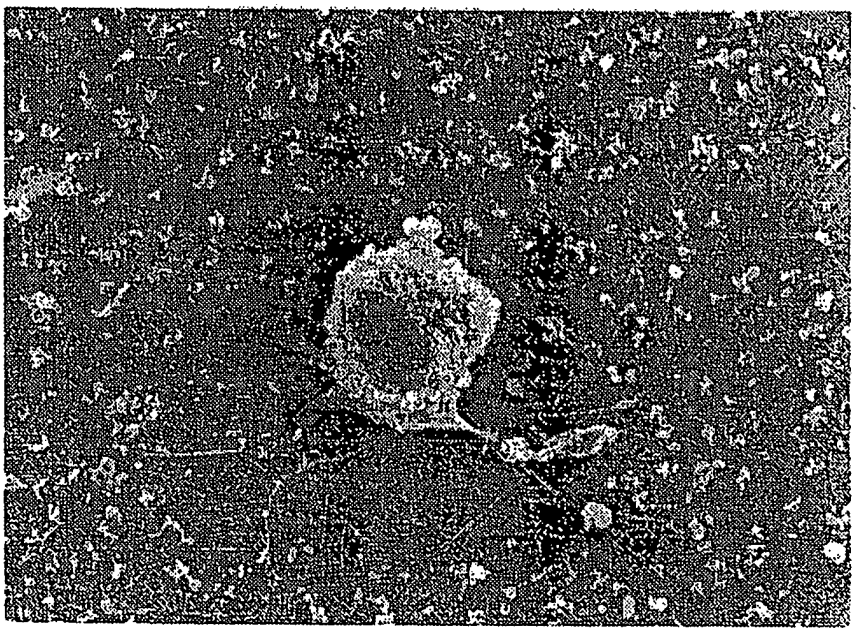


FIG.15A

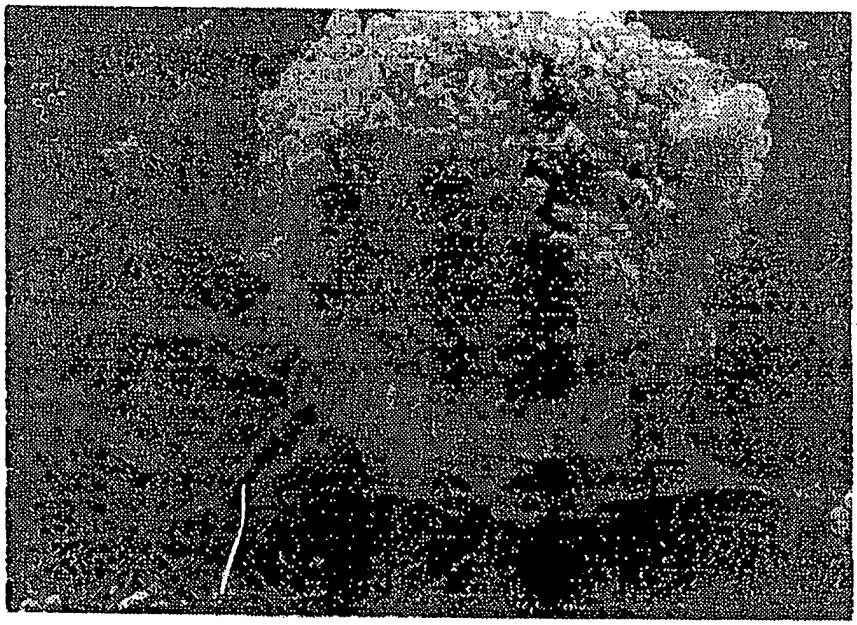


FIG.15B

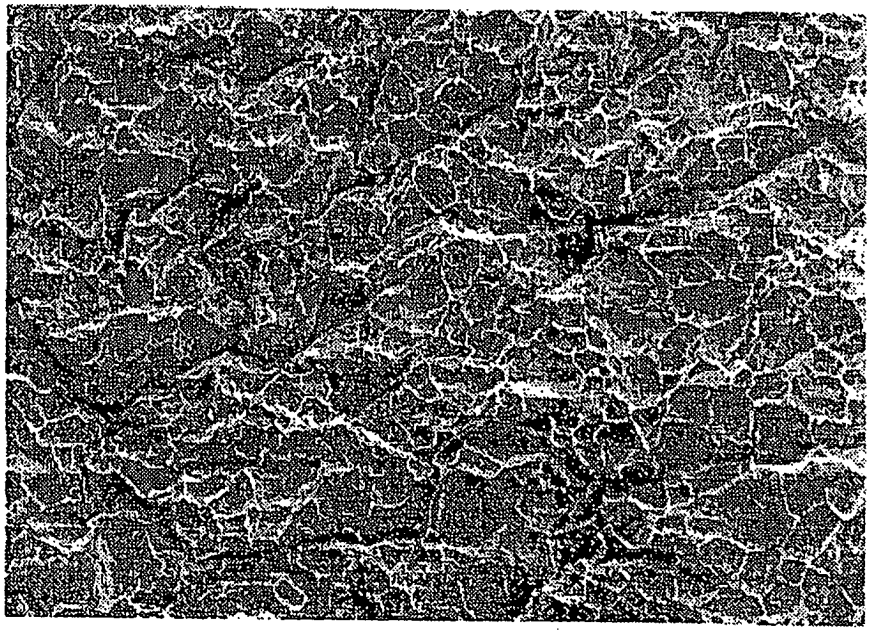


FIG.16A

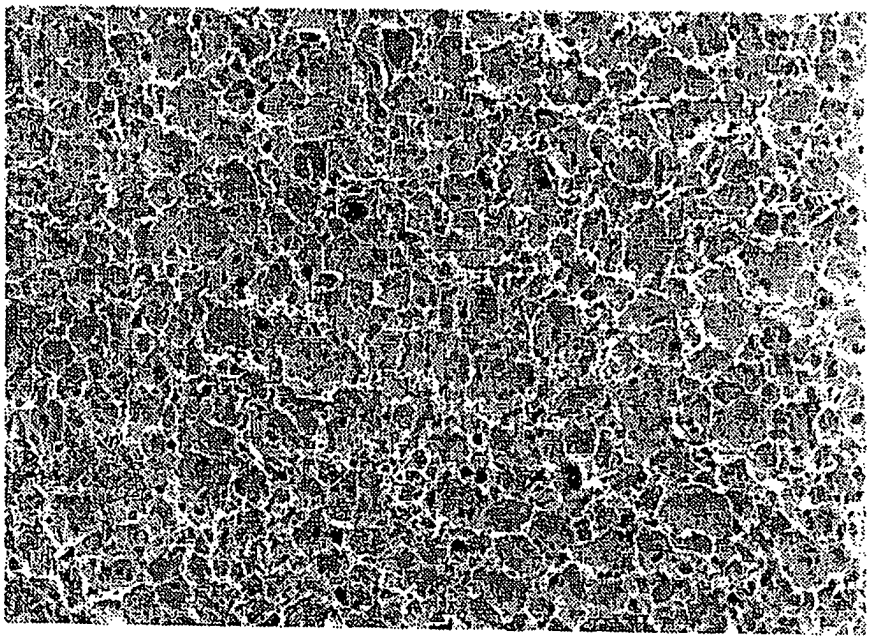


FIG.16B

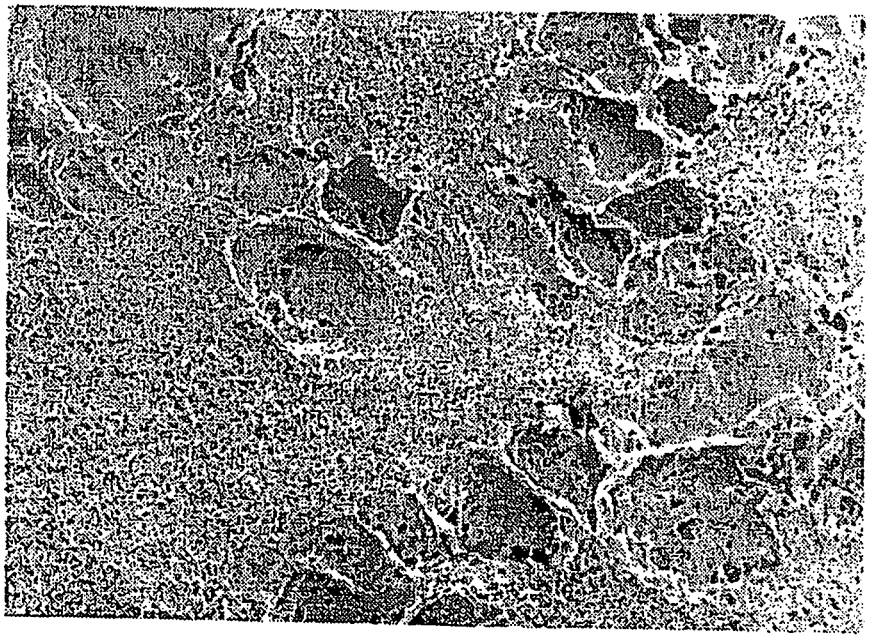


FIG.16C

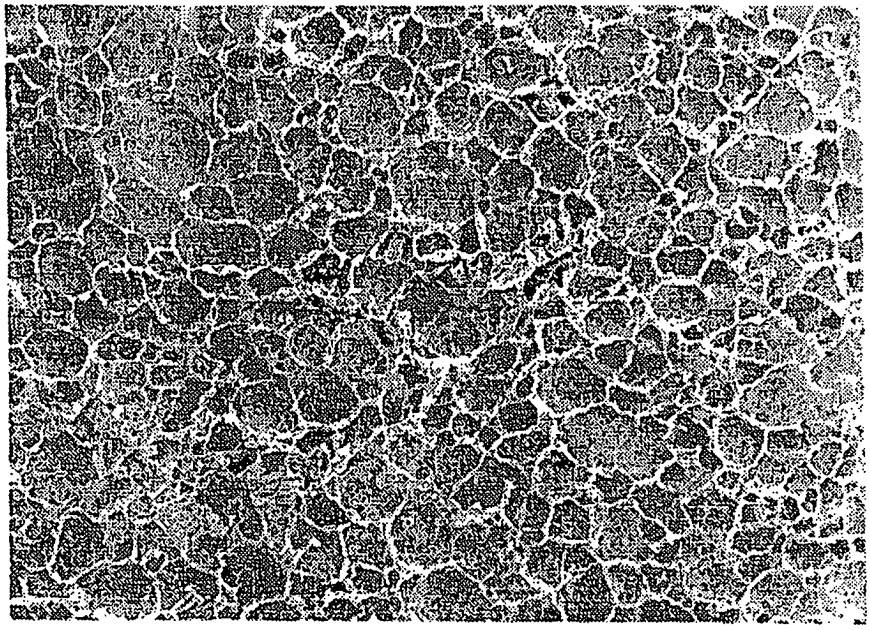


FIG.16D

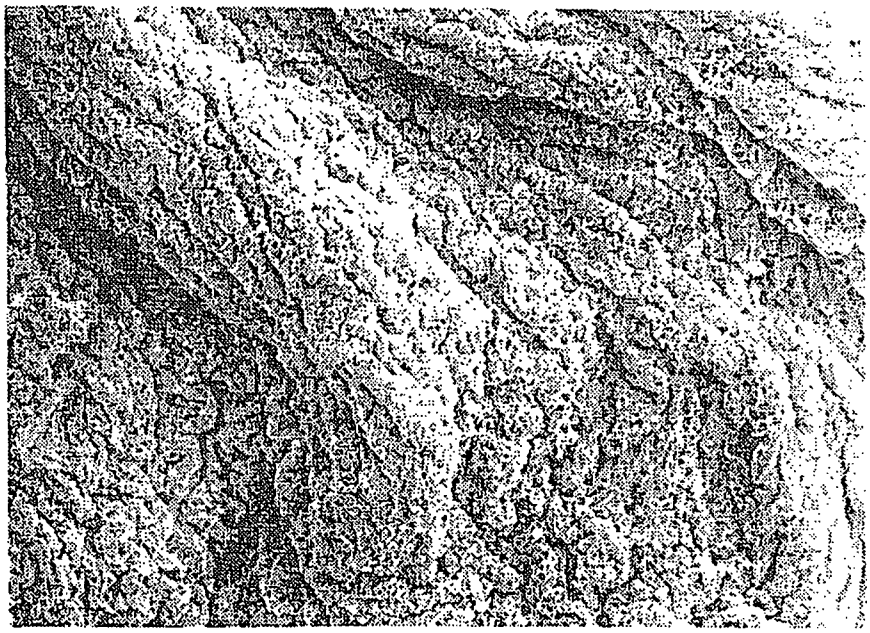


FIG.16E

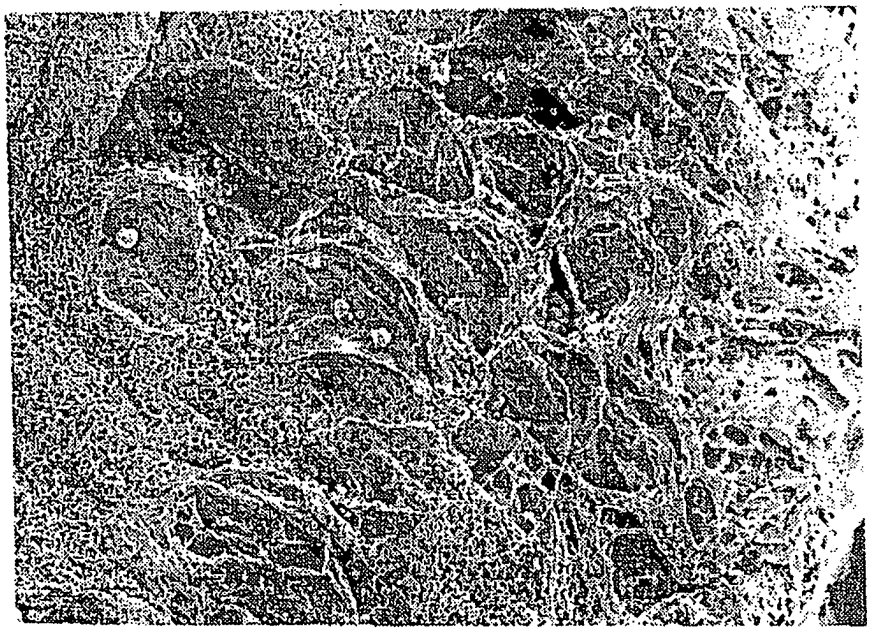


FIG.17A

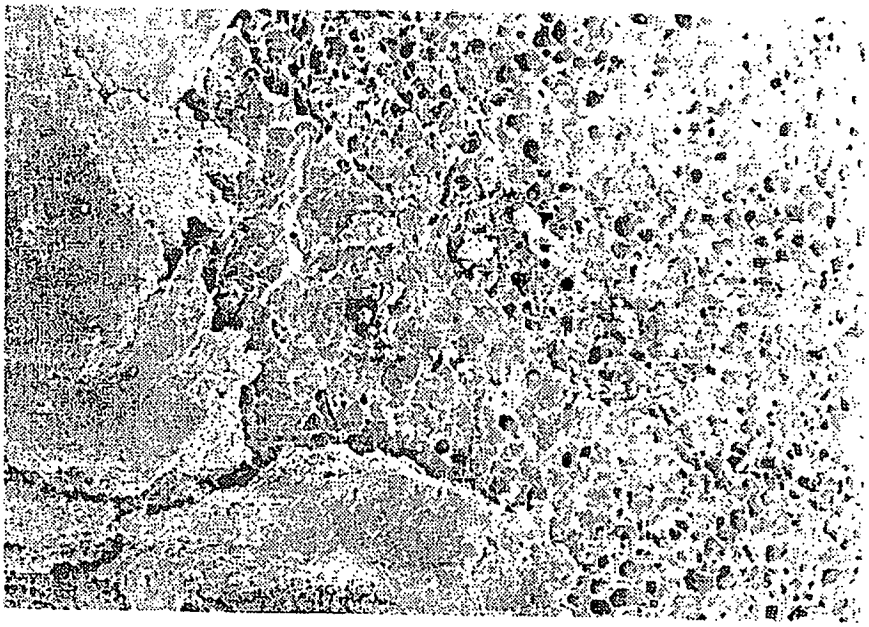


FIG. 17B

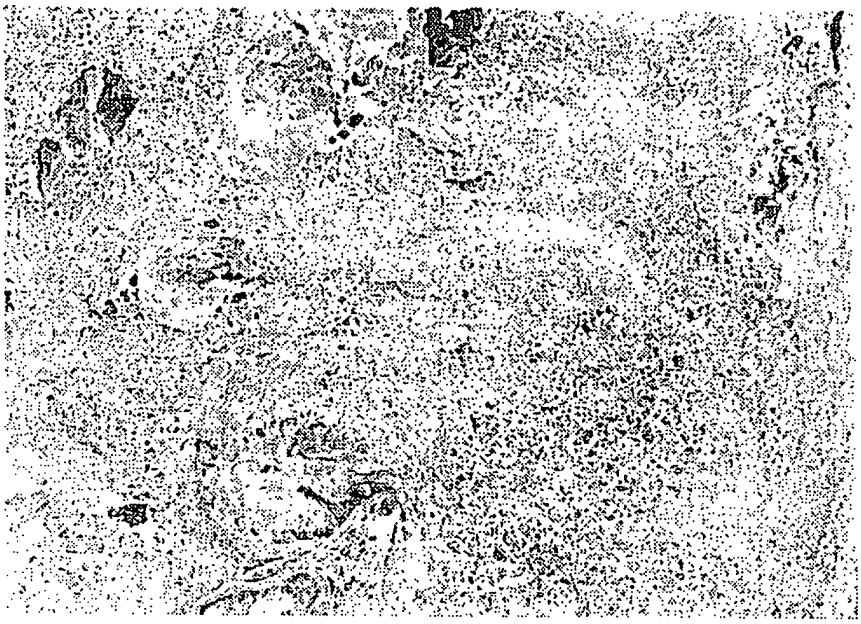


FIG.17C

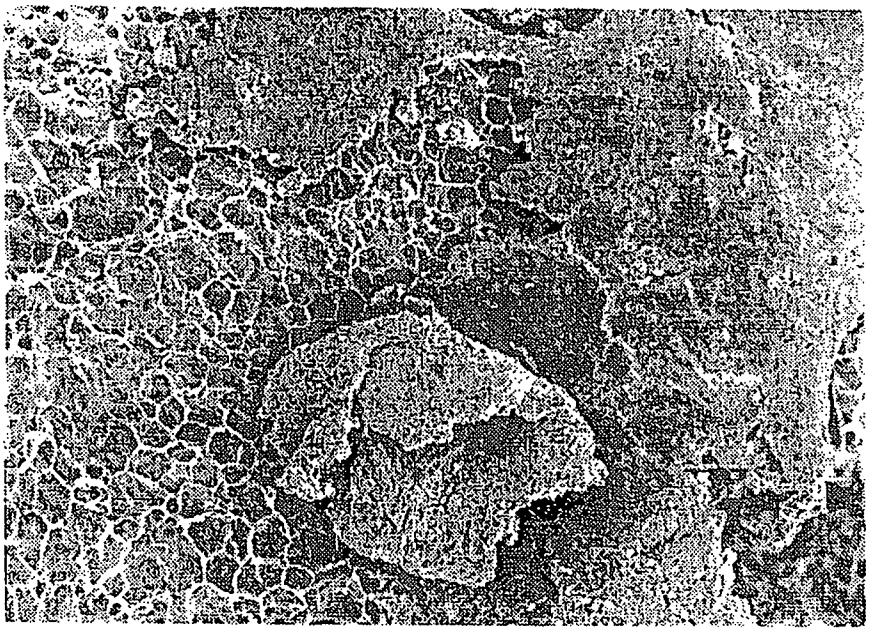


FIG.17D

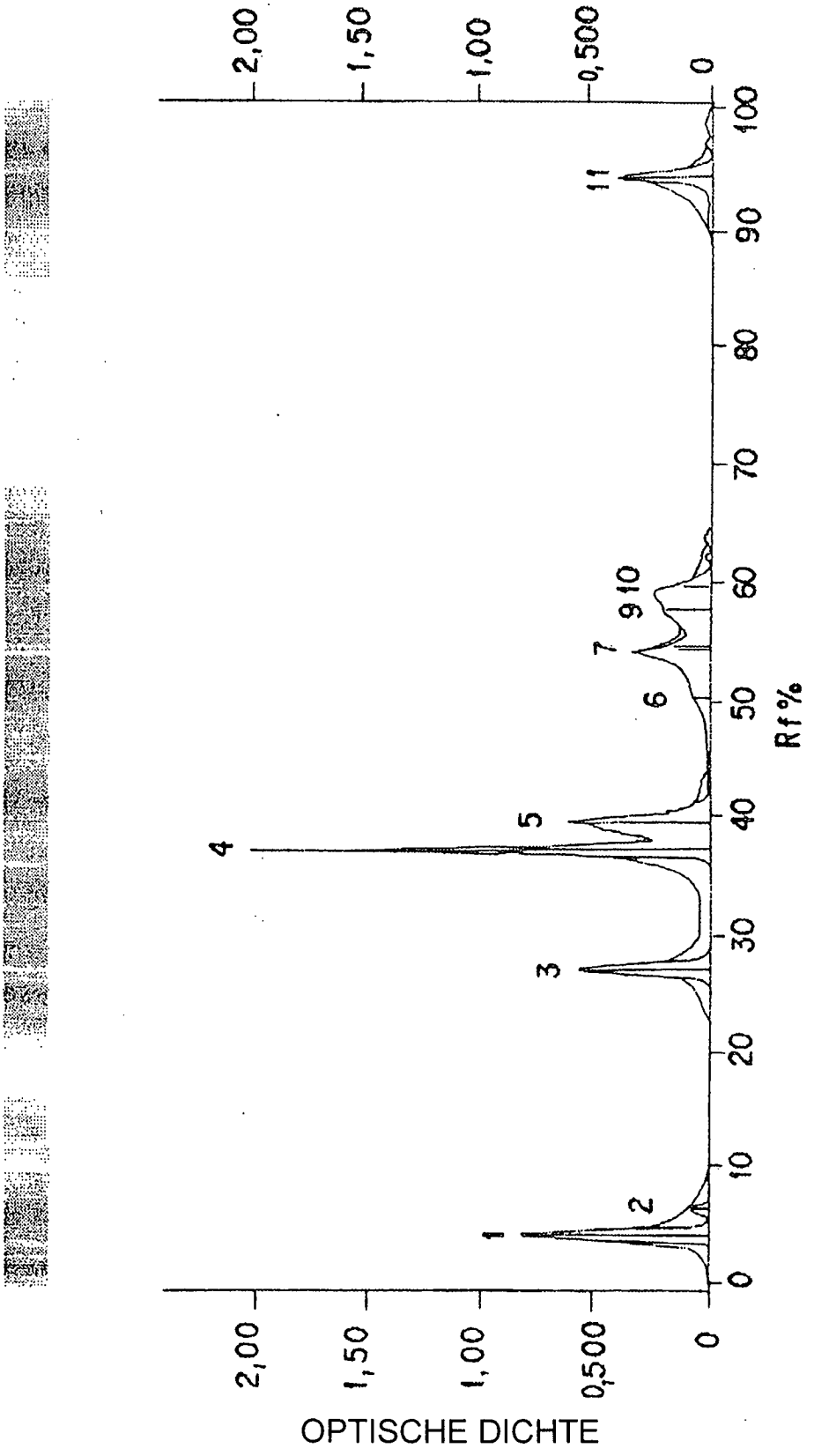

2,00
1,50
1,00
0,500
0
OPTISCHE DICHTE
Rf %
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
1
2
3
4
5
6
7
9
10
11

FIG.18

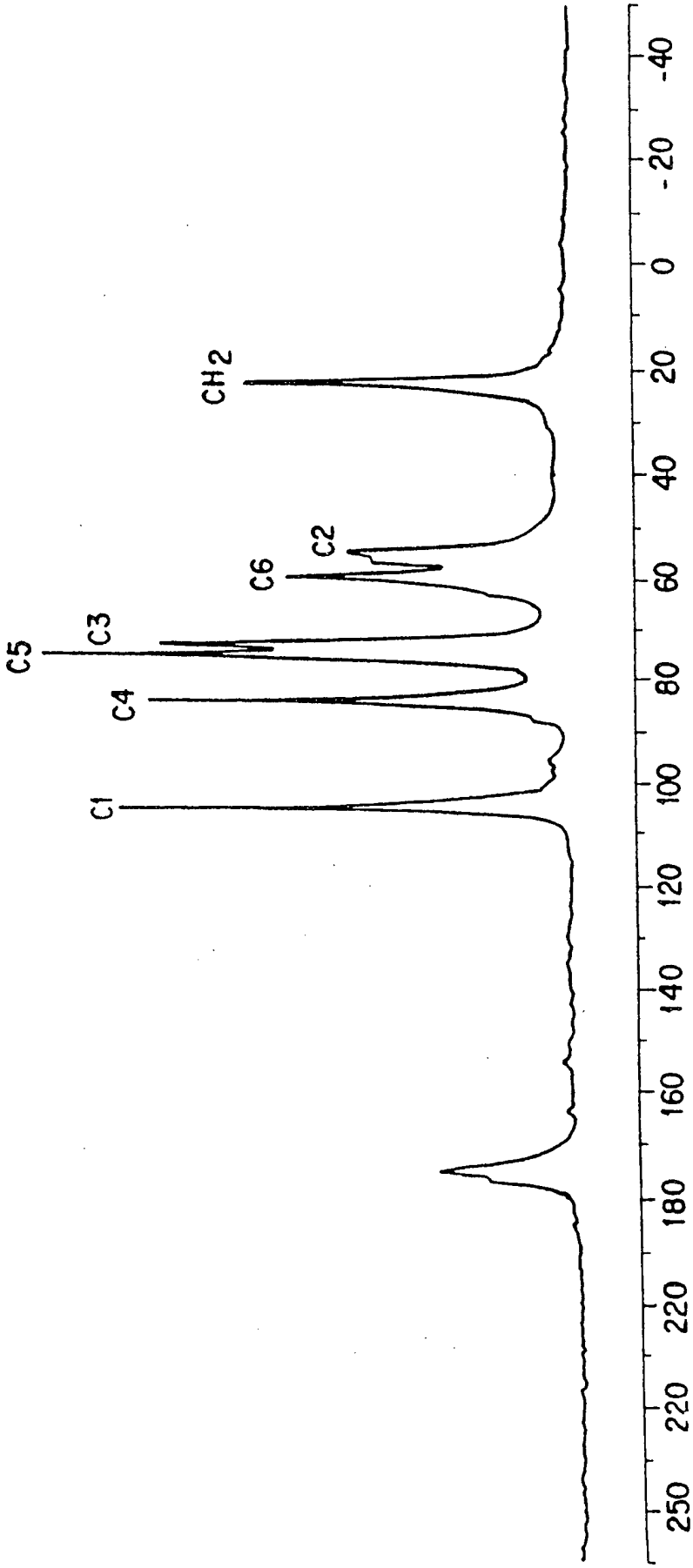
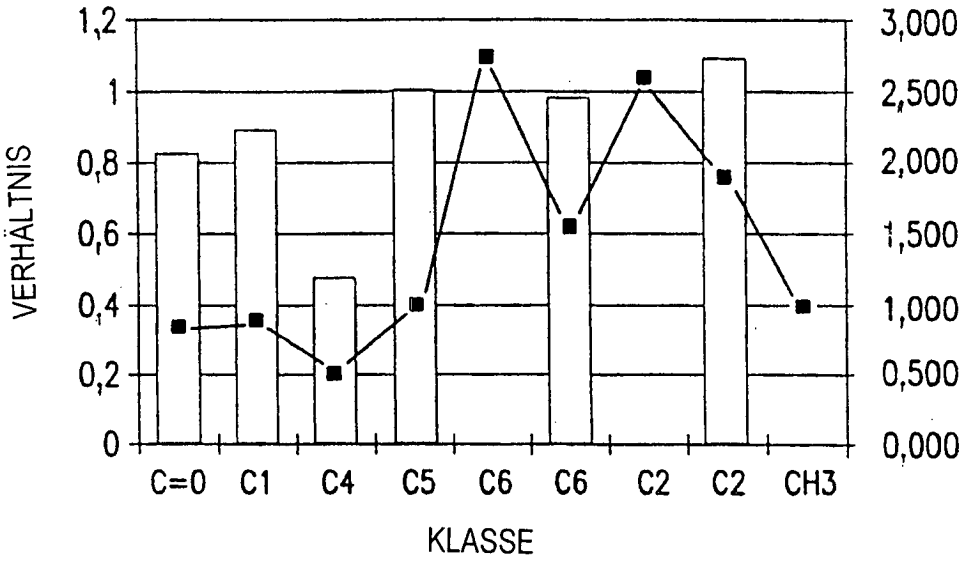

CH2
C2
C6
C3
C5
C4
C1
-40
-20
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
220
220
250
PPM

FIG. 19



PEAK	%RF		AMPLITUDE	%SIGMA	BEREICH	% GES.		VERHÄLTNIS	VERHALTNIS
1	4	C=0	0,803	0,42	18,08	14,5	18,080	0,8308	0,831
2	27	C1	0,594	0,53	16,959	13,6	16,959	0,8857	0,886
3	37	C4	2,073	0,28	30,787	24,68	30,787	0,4879	0,488
4	39	C5	0,581	0,48	14,915	11,96	14,915	1,007	1,007
5	51	C6	0,096	1,06	5,504	4,413			2,729
6	54	C6	0,324	0,56	9,767	7,831	15,271	0,9836	1,538
7	57	C2	0,197	0,55	5,848	4,689			2,568
8	59	C2	0,226	0,64	7,843	6,289	13,691	1,0971	1,915
9	95	CH3	0,363	0,77	15,02	12,04	15,020		1,000

FIG.20

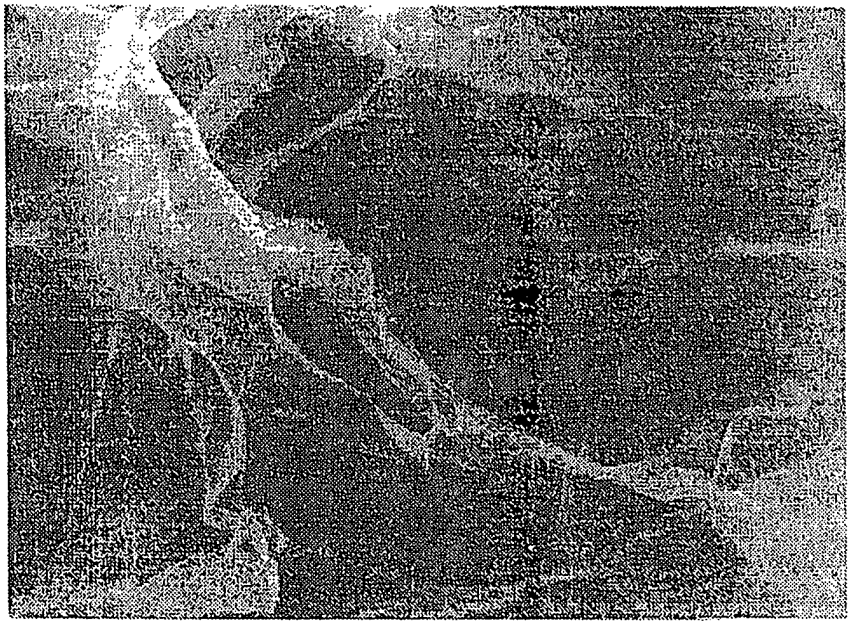


FIG.21A

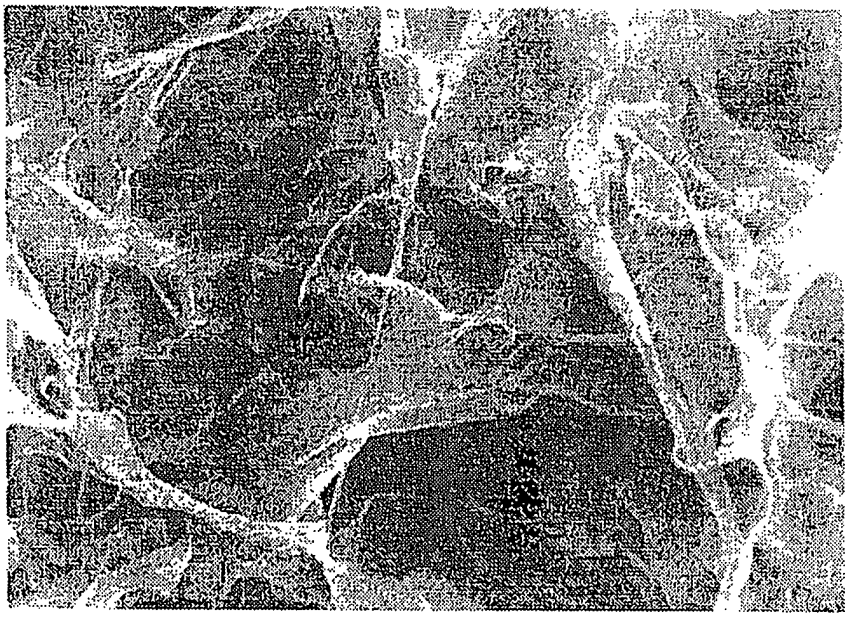


FIG.21B

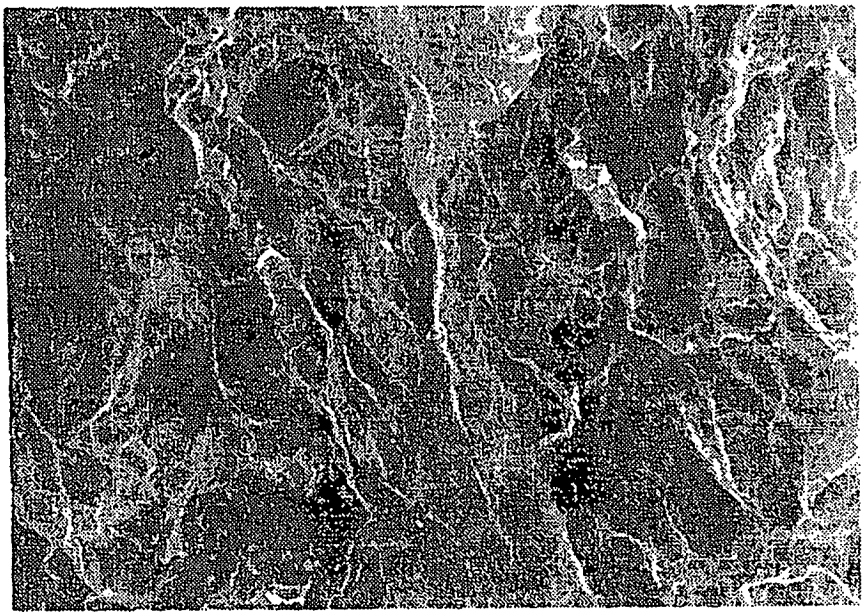


FIG.21C

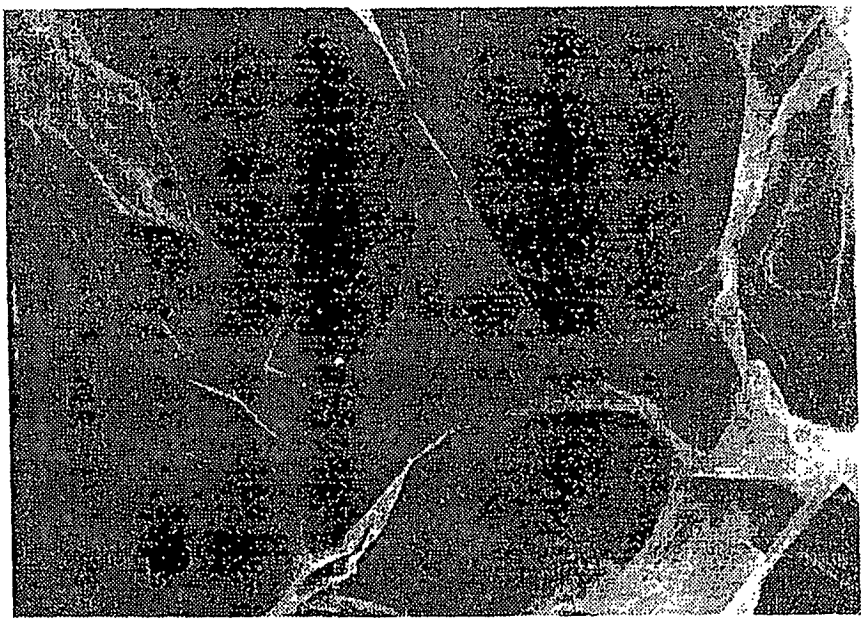


FIG.21D

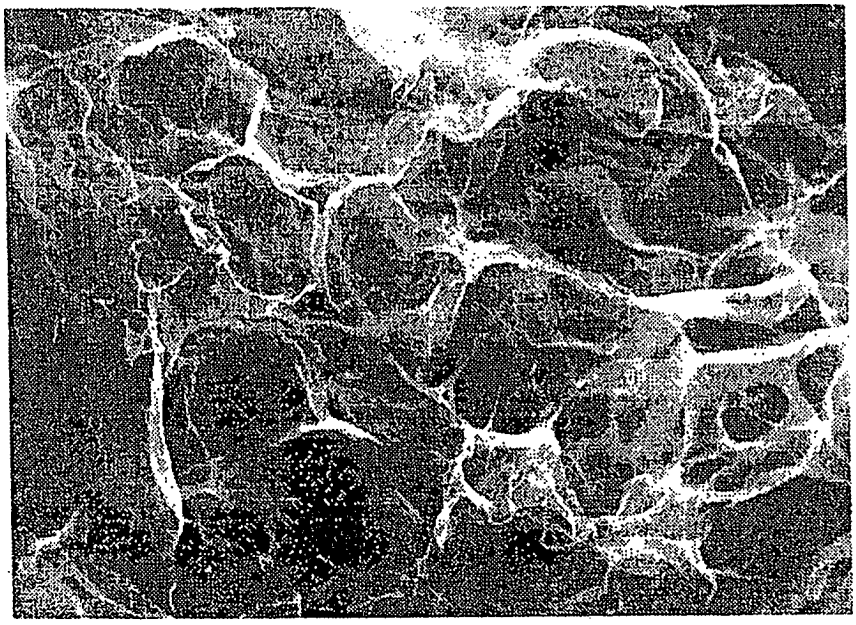


FIG.21E

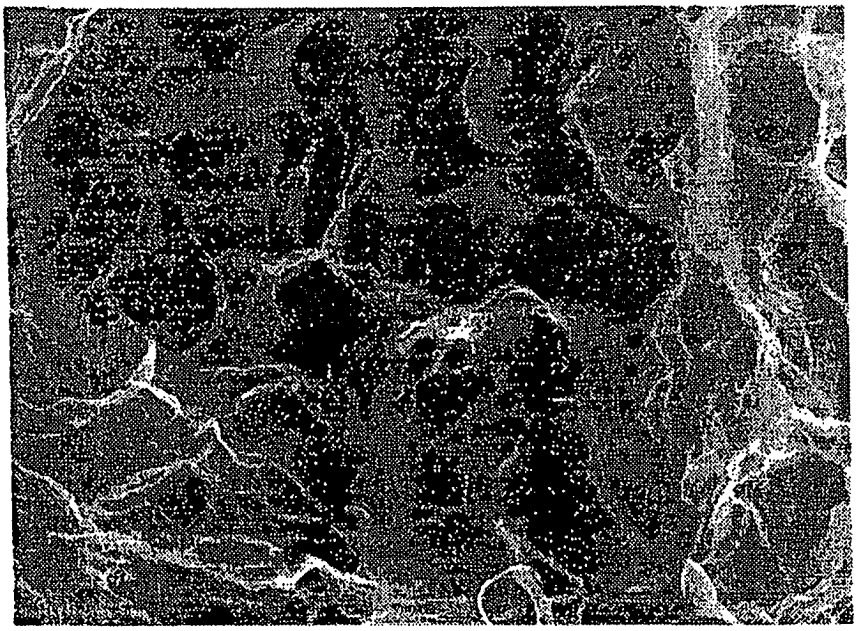


FIG.21F

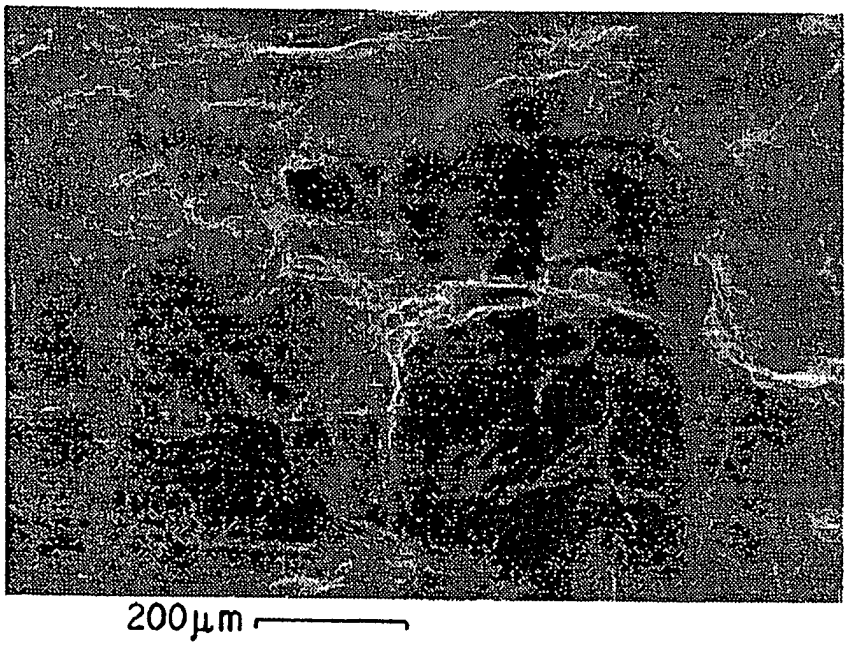


FIG.21G

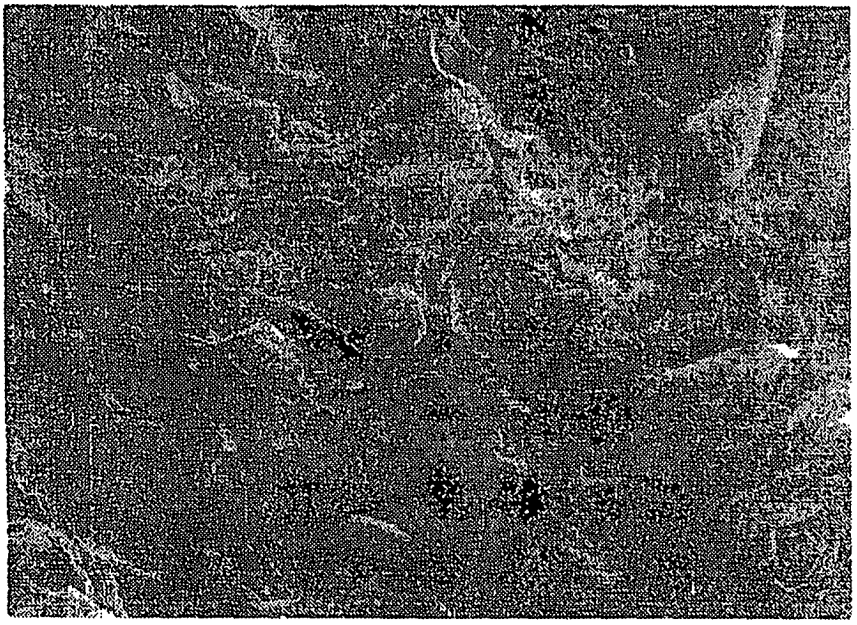


FIG.22A

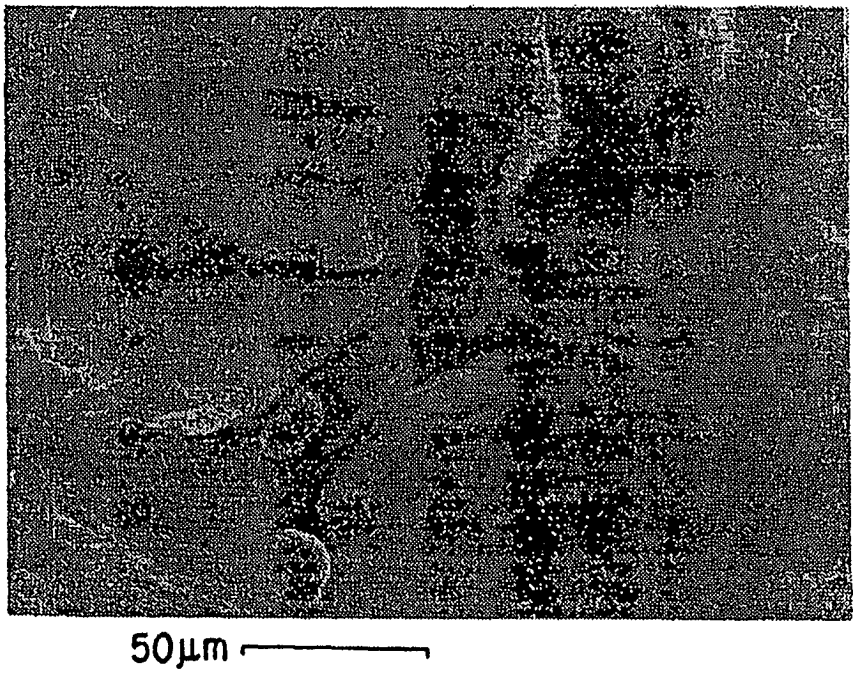


FIG.22B

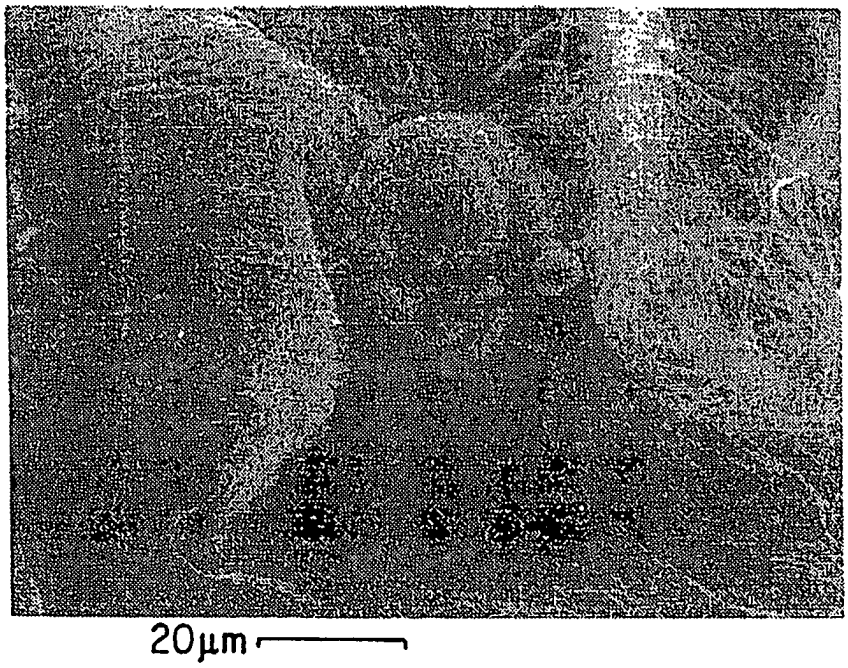


FIG.22C

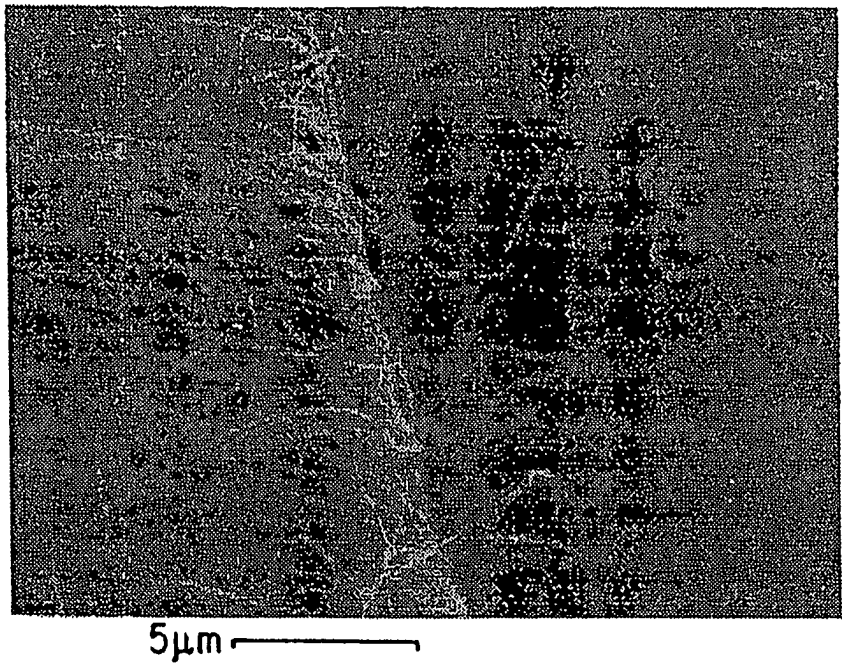


FIG.22D

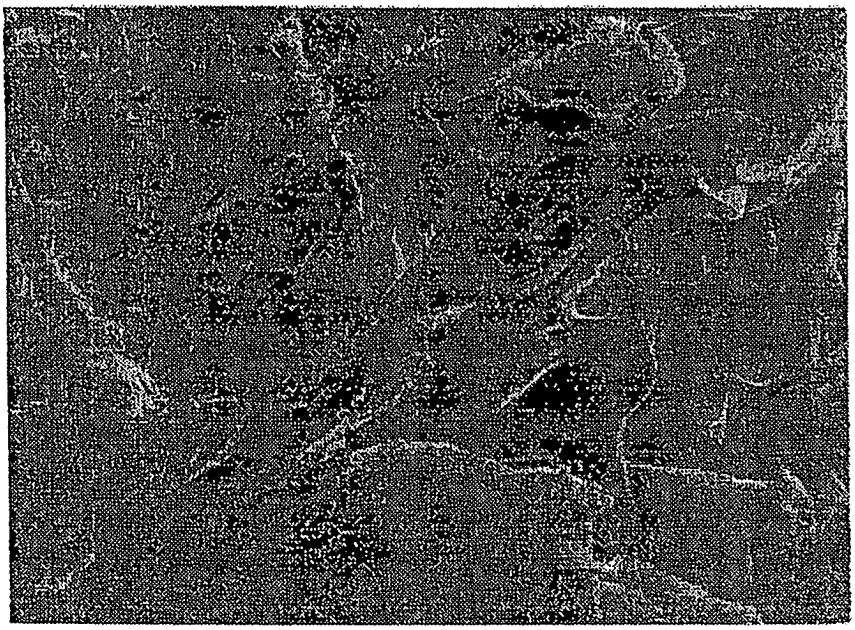


FIG.22E

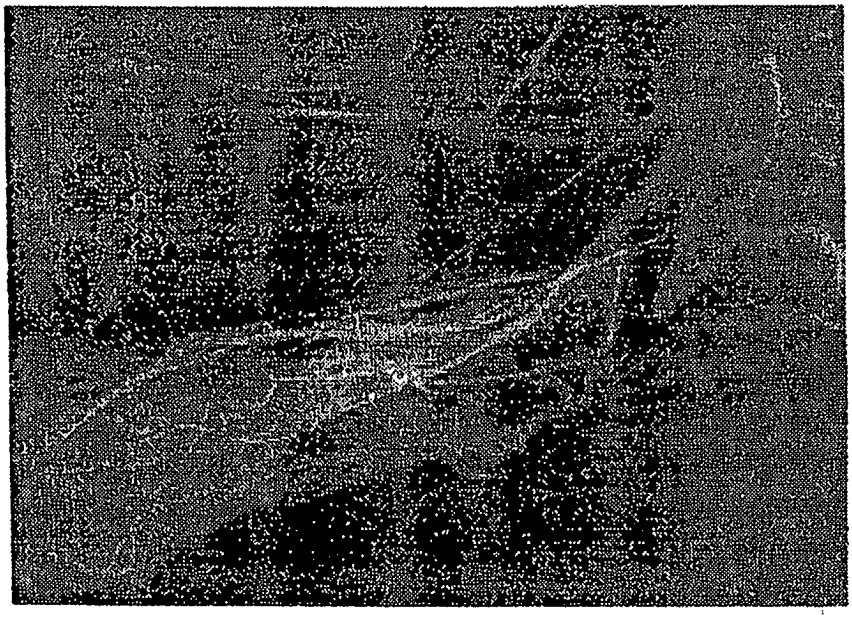


FIG.22F

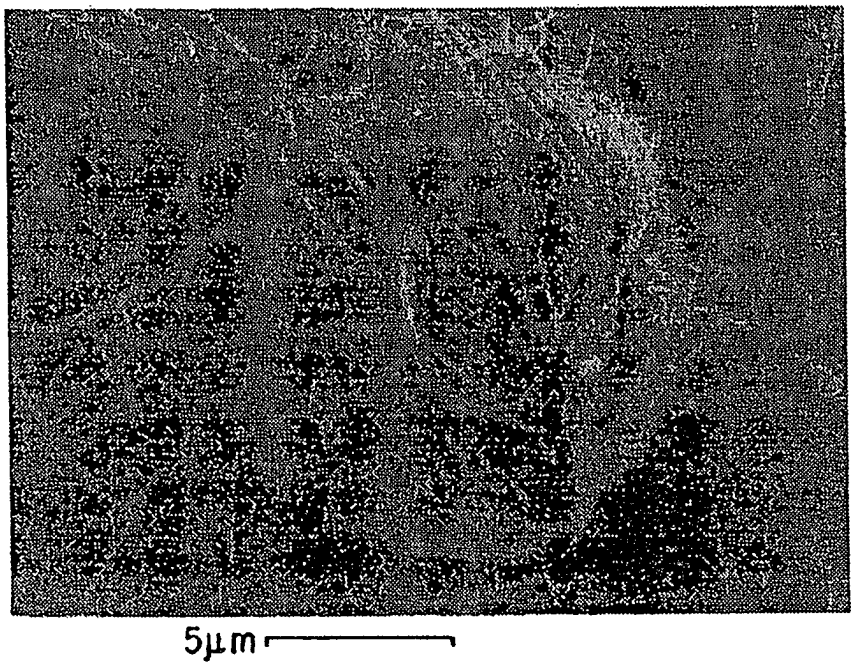


FIG.22G

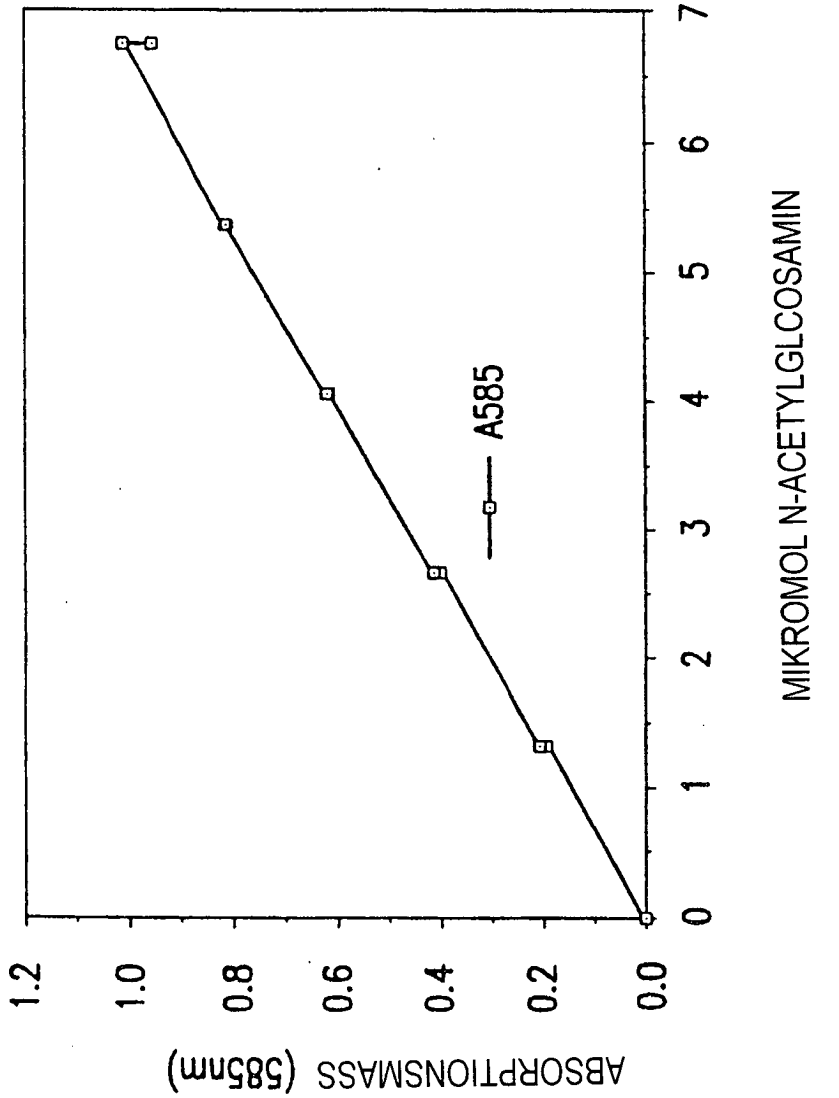

ABSORPTIONSMASS (585nm)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
1
2
3
4
5
6
7
A585
MIKROMOL N-ACETYLGLCOSAMIN

FIG.23

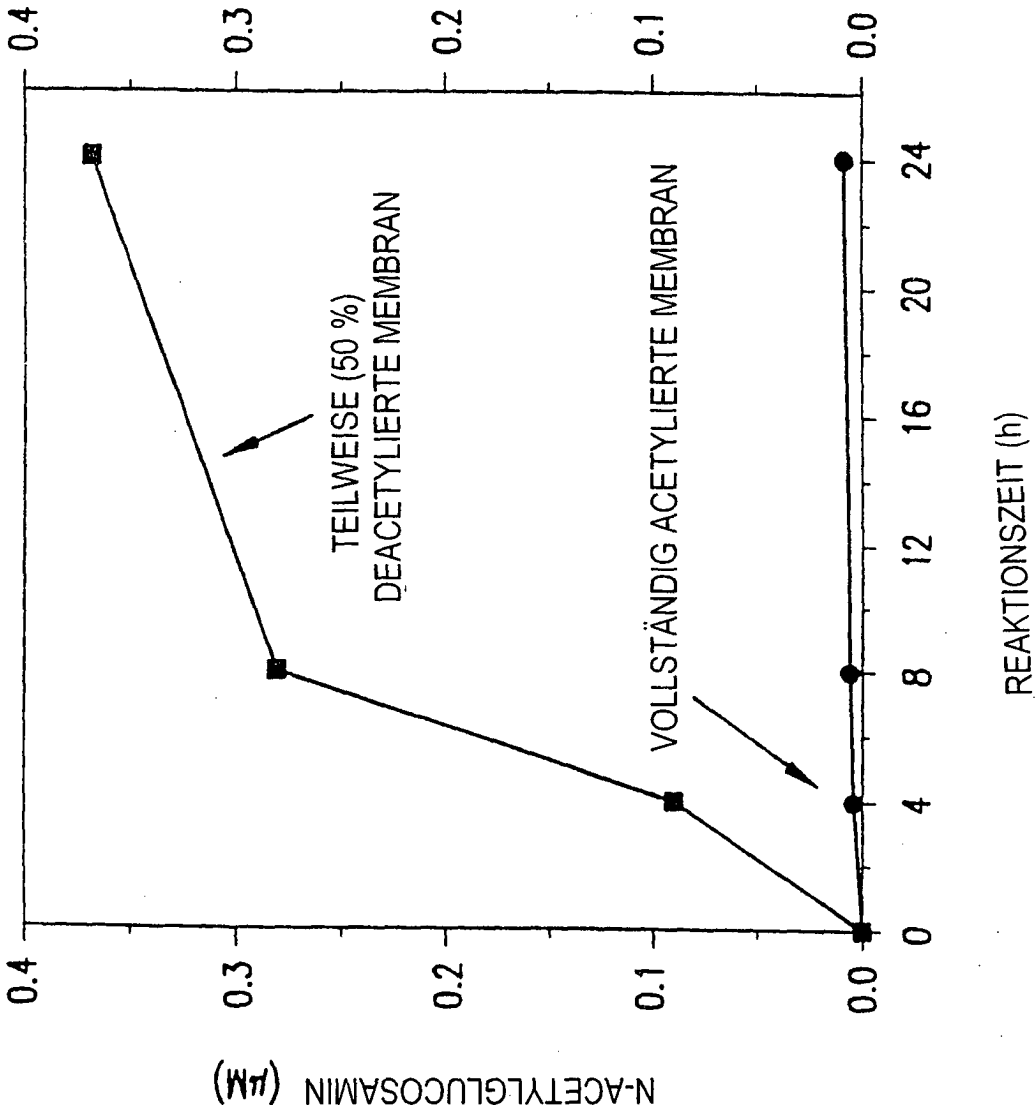

0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
TEILWEISE (50 %)
DEACETYLIERTE MEMBRAN
VOLLSTÄNDIG ACETYLIERTE MEMBRAN
0
4
8
12
16
20
24
REAKTIONSZEIT (h)
N-ACETYLGLUCOSAMIN (μM)

FIG.24

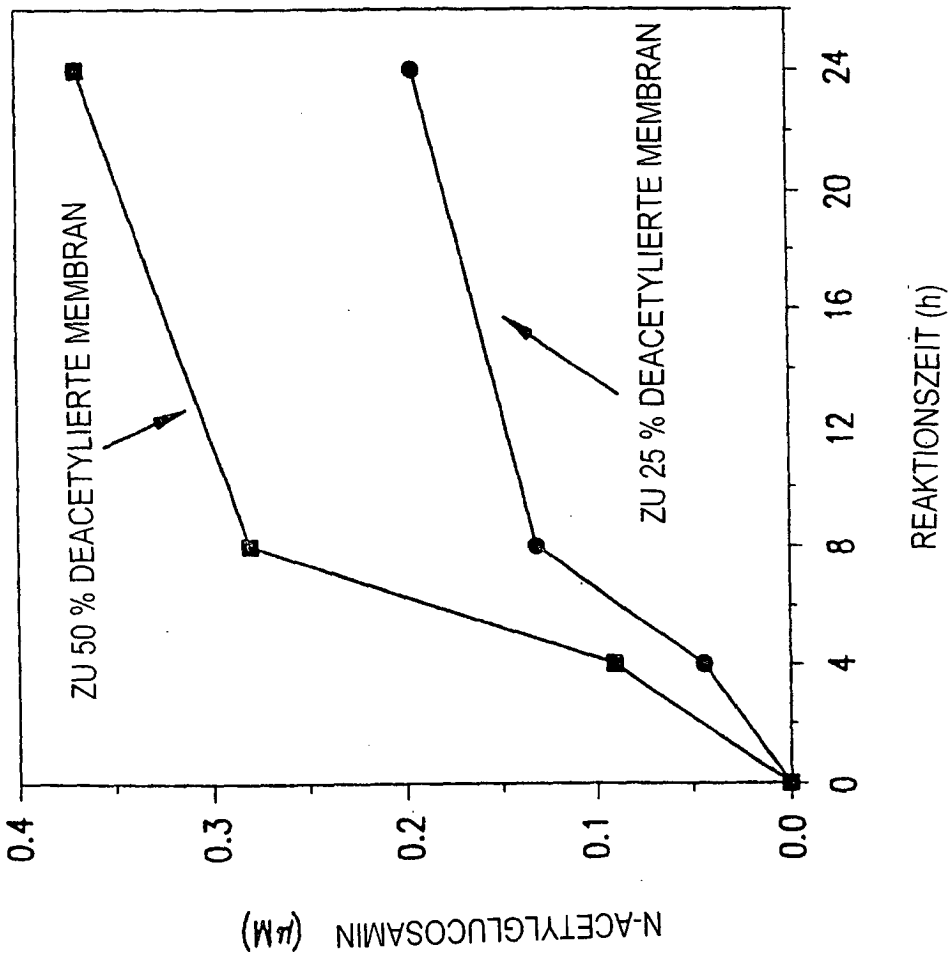

ZU 50 % DEACETYLIERTE MEMBRAN
ZU 25 % DEACETYLIERTE MEMBRAN
N-ACETYLGLUCOSAMIN (M)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0
4
8
12
16
20
24
REAKTIONSZEIT (h)

FIG.25

PROTOTYP 1: TAG 0

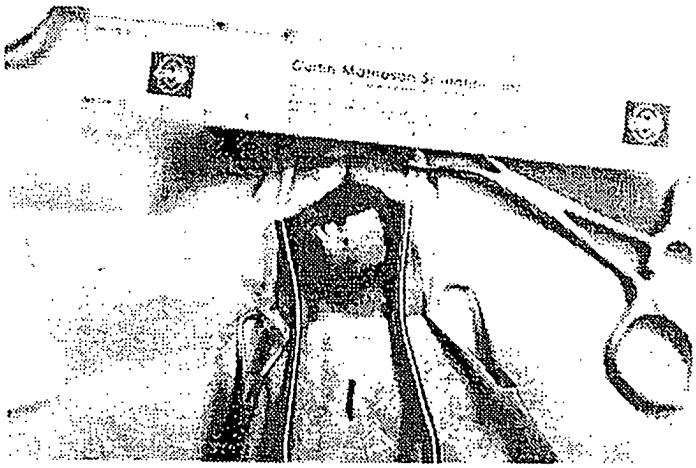


FIG.26A

PROTOTYP 1: TAG 14

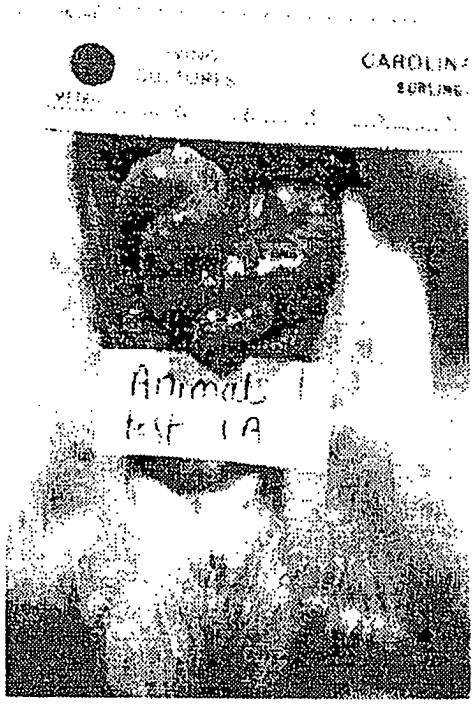


FIG.26B

PROTOTYP 1: TAG 21

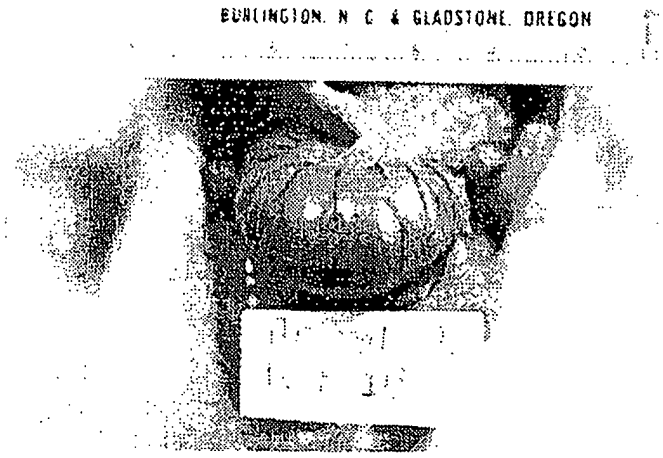


FIG.26C

PROTOTYP 3A: TAG 0

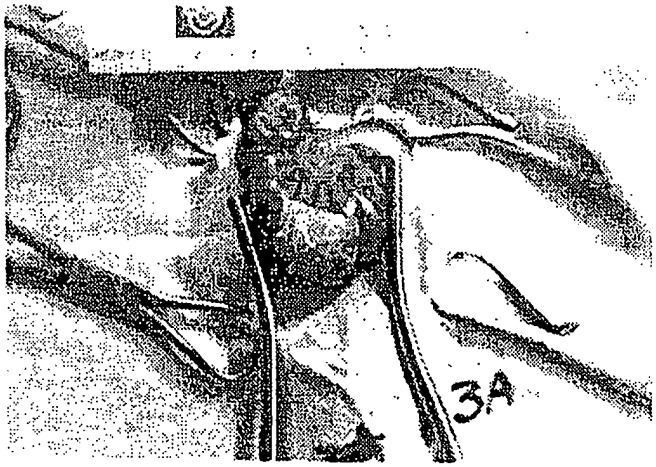


FIG.26D

PROTOTYP 3A: TAG 14

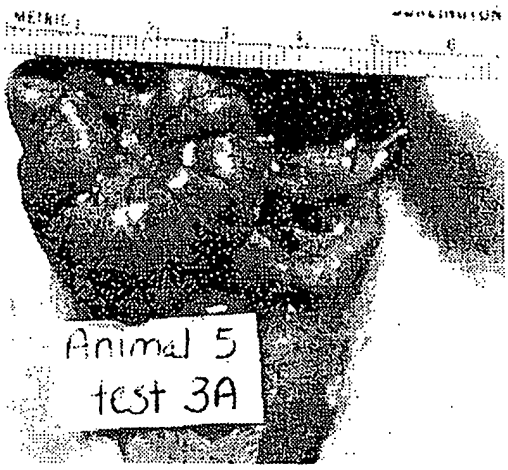


FIG.26E

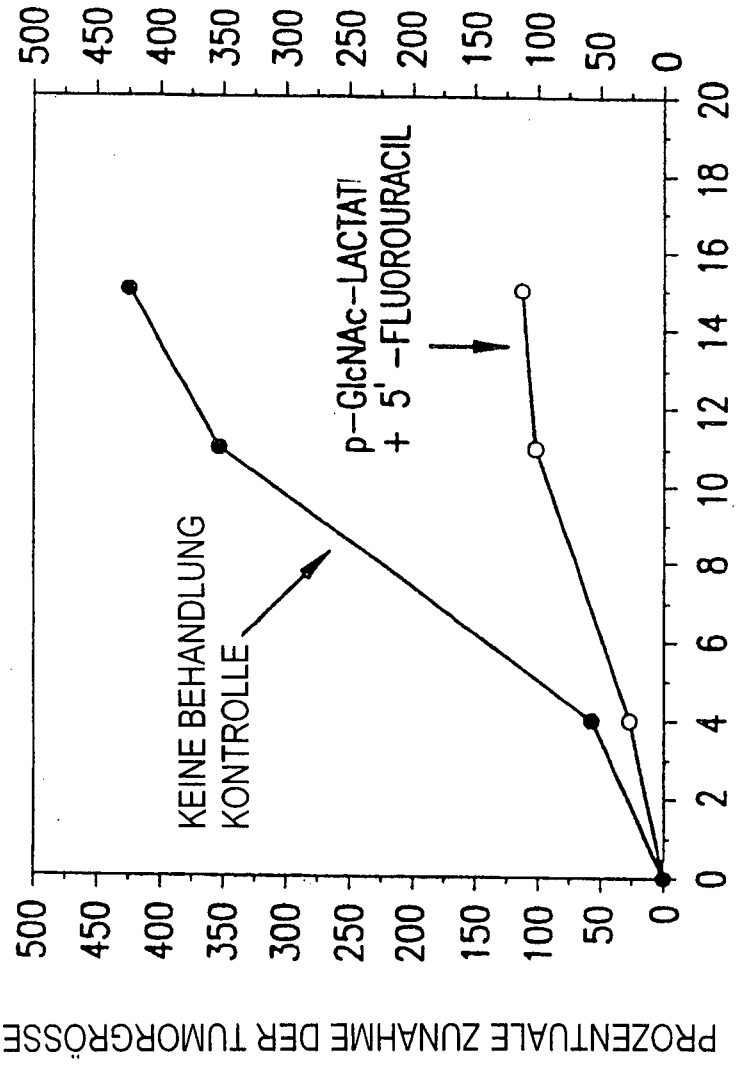

PROZENTUALE ZUNAHME DER TUMORGRÖSSE
TAG
KEINE BEHANDLUNG
KONTROLLE
p-GlcNAc-LACTAT
+ 5' -FLUOROURACIL
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20

FIG.27

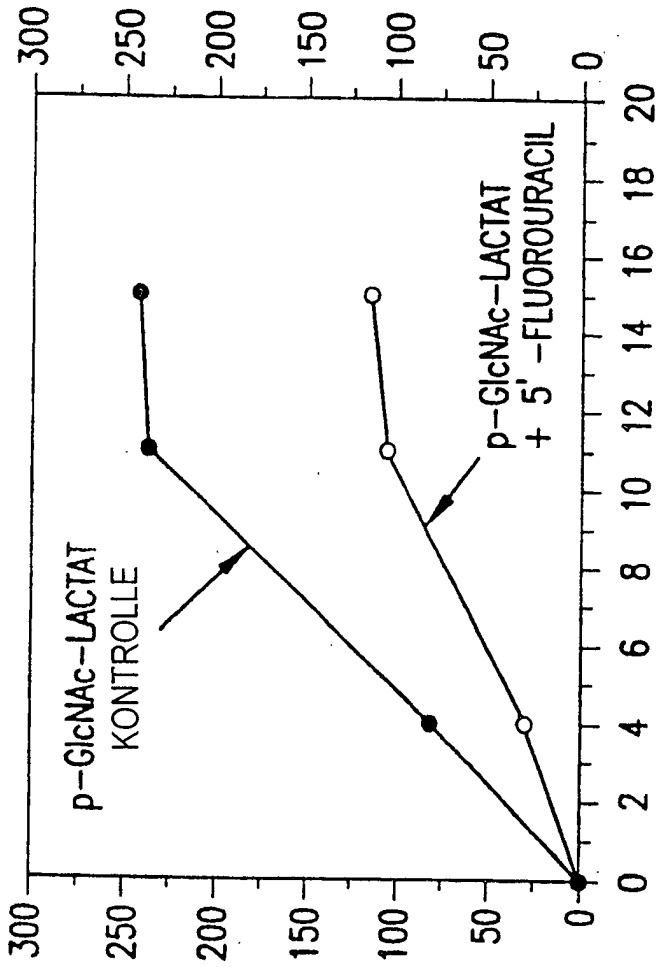

300
250
200
150
100
50
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
TAG
p-GlcNAc-LACTAT
KONTROLLE
p-GlcNAc-LACTAT
+ 5' -FLUOROURACIL

FIG.28

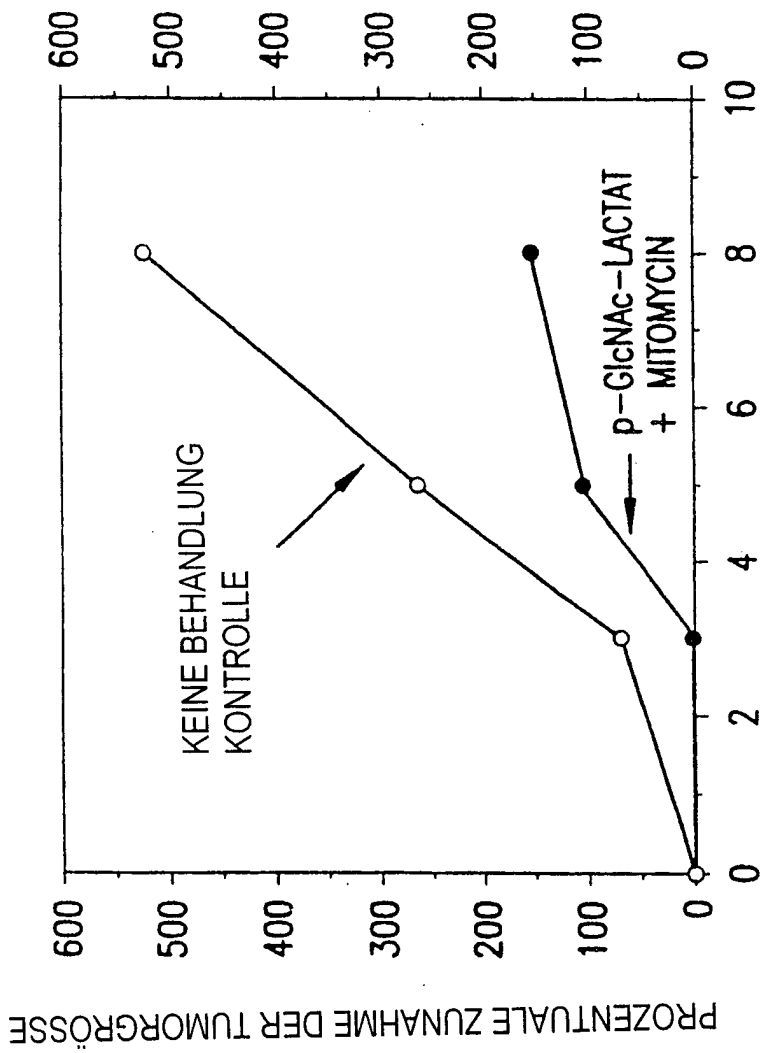

PROZENTUALE ZUNAHME DER TUMORGRÖSSE
600
500
400
300
200
100
0
0
2
4
6
8
10
TAG
KEINE BEHANDLUNG
KONTROLLE
p-GlcNAc-LACTAT
+ MITOMYCIN

FIG.29

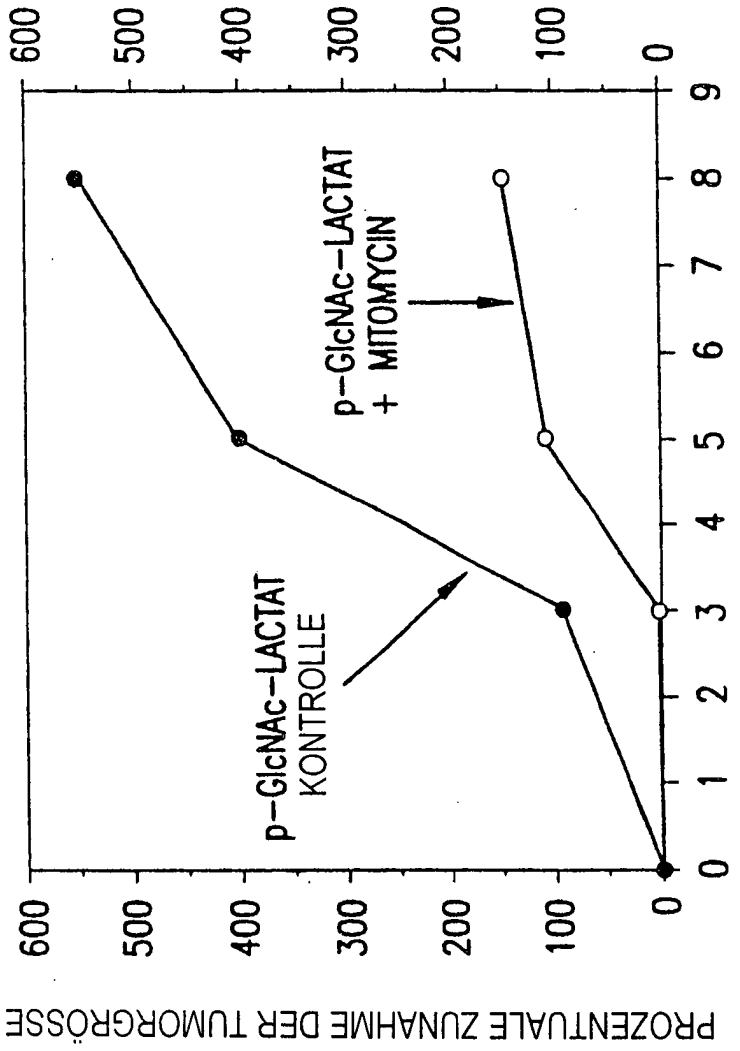

PROZENTUALE ZUNAHME DER TUMORGRÖSSE
600
500
400
300
200
100
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
TAG
p-GlcNAc-LACTAT
KONTROLLE
p-GlcNAc-LACTAT
+ MITOMYCIN

FIG.30

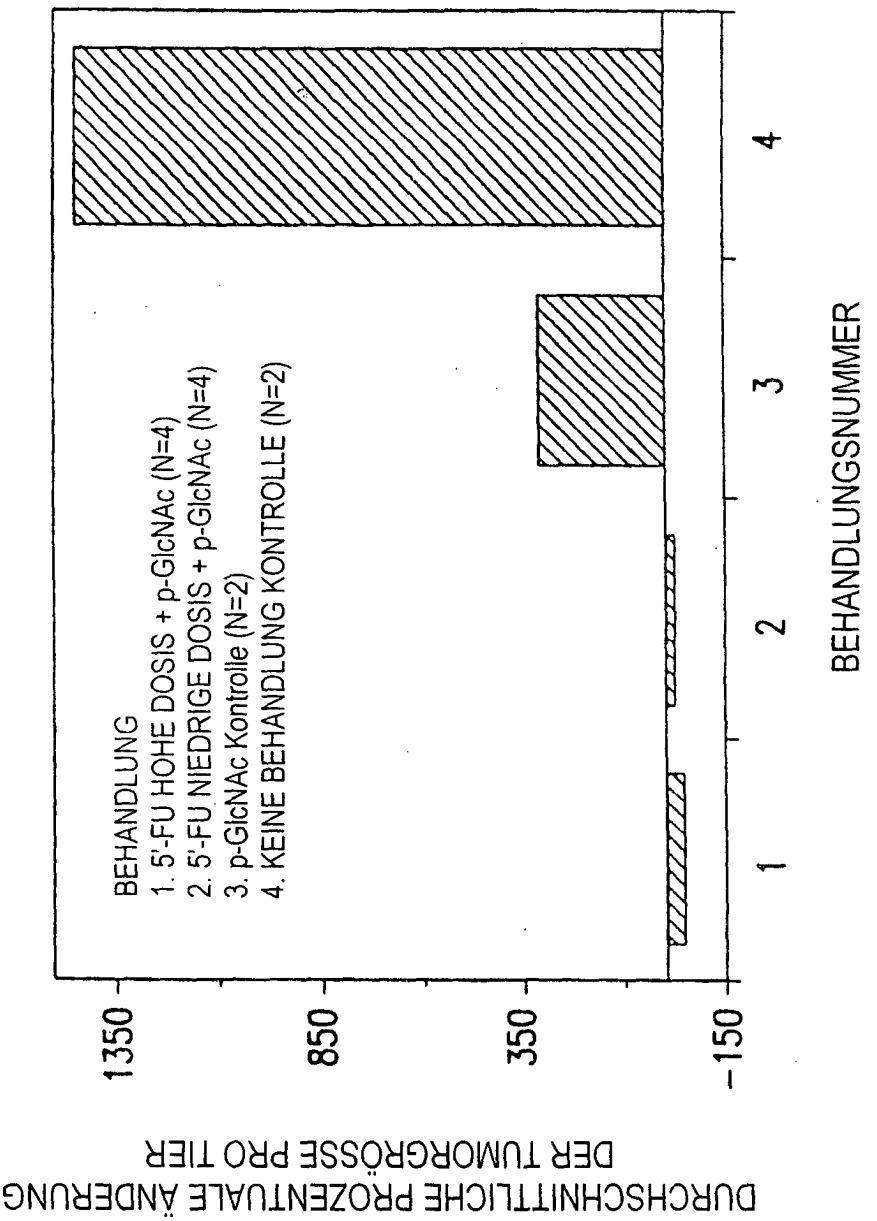

BEHANDLUNG
1. 5'-FU HOHE DOSIS + p-GlcNAc (N=4)
2. 5'-FU NIEDRIGE DOSIS + p-GlcNAc (N=4)
3. p-GlcNAc Kontrolle (N=2)
4. KEINE BEHANDLUNG KONTROLLE (N=2)
1350
850
350
-150
1
2
3
4
BEHANDLUNGSNUMMER
DURCHSCHNITTLICHE PROZENTUALE ÄNDERUNG
DER TUMORGRÖSSE PRO TIER

FIG.31