



[B] (11) **KUULUTUSJULKAISU**
UTLÄGGNINGSSKRIFT 79554

(45) **Patentti- ja rekisterihallitus**
Patent- och registerstyrelsen

(51) Kv.lk./Int.Cl.⁴ C 12 P 19/04, C 08 B 37/08

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patentihakemus – Patentansökning 843990
(22) Hakemispäivä – Ansökningsdag 11.10.84
(24) Alkupäivä – Giltighetsdag 11.10.84
(41) Tullut julkiseksi – Blivit offentlig 12.04.85
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. –
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 29.09.89
(86) Kv. hakemus – Int. ansökan
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus – Begärd prioritet 11.10.83
09.10.84 Italia-Italien(IT) 49143 A/83, 48979 A/84
Toteennäytetty-Styrkt

- (71) Fidia S.p.A., Via Ponte della Fabbrica, 3/A, Abano Terme, Italia-Italien(IT)
(72) Francesco della Valle, Padova, Aurelio Romeo, Roma, Silvana Lorenzi, Padova,
Italia-Italien(IT)
(74) Seppo Laine Ky
(54) Menetelmä farmaseuttisen aktiivisuuden omaavien hyaluronihappofraktioiden valmis-
tamiseksi - Förfarande för framställning av hyaluronsyrafraktioner med farmaceutisk
aktivitet

(57) Tiivistelmä:

Keksinnön kohteena on menetelmä olennaisesti puhtaan hyaluronihappofraktioiden valmistamiseksi. Menetelmän mukaan dehyd-
rataa kudosta, joka sisältää saatavissa olevan määrän hyaluronihappoa, alistetaan saatu dehydrattu kudos entsyymaatti-
seen hajotukseen ja alistetaan näin saatu seos molekyylisuoda-
tukseen. Keksinnön mukaan molekyylisuodatus suoritetaan
edullisesti ensin sellaista kalvoa käyttäen, jonka molekyylipainon mukainen eksklusioraja on n. 30 000, jonka jälkeen
kalvolla pidätetty seos alistetaan toiseen molekyylisuoda-
tukseen, jossa käytetään kalvoa, jonka eksklusioraja on n.
200 000. Tällä tavalla saadaan kaksi hyaluronihappofraktio-
ta, joiden keskimääräiset molekyylipainot ovat n. 50 000 -
n. 100 000 ja vastaavasti n. 500 000 - n. 730 000.
Keksinnön mukaan eristetyt hyaluronifraktiot ovat farmaseut-
tisesti aktiivisia. Aiemman molekyylipainon omaava fraktio
on käyttökelpoinen haavojen parantamisessa, ja korkeamman
molekyylipainon omaava fraktio vastaavasti intraokulaaris-
sa ja intra-artikulaarisissa injektioissa.

(57) Sammandrag

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av en väsentligen ren hyaluronsyrafraktion. Enligt uppfinningen dehydrerar man vävnad, som innehåller en tillgänglig mängd hyaluronsyra, varefter den dehydrerade vävnaden underkastas enzymatisk sönderdelning och den sålunda erhållna blandningen molekylfiltrering. Enligt uppfinningen utför man molekylfiltreringen företrädesvis först genom användning av en membran, vars exklusionsgräns enligt molekylvikt är ca 30 000, varefter man underkastar den blandning som retenterats på membranen en andra molekylfiltrering, varvid man använder en membran med en exklusionsgräns på ca 200 000. På detta sätt erhåller man två hyaluronsyrafraktioner, vilkas medelmolekylvikter är ca 50 000 - ca 100 000 respektive ca 500 000 - ca 730 000. Hyaluronfraktionerna som isolerats enligt uppfinningen är farmaceutiskt aktiva. Fraktionen med lägre molekylvikt är användbar vid botande av sårnader och fraktionen med högre molekylvikt på motsvarande sätt i intraokulära och intraartikulära injektioner.

Menetelmä farmaseuttisen aktiivisuuden omaavien hyaluronihappofraktioiden valmistamiseksi

Tämän keksinnön kohteena ovat eräät sellaiset hyaluronihapon (tämän jälkeen HA:n) molekyylipainofraktiot, joita voidaan käyttää terapeuttisesti ja joilla tällöin ei ole tulehduksia aiheuttavia ominaisuuksia. Erästä tämän keksinnön mukaista HA-fraktiota voidaan käyttää haavojen parantumisen edistämiseen, toinen HA-fraktio taas sopii käyttäväksi intraokulaarisesti (silmän sisäisesti) endobulbaaristen nesteiden korvaamiseen tai intra-artikulaarisessa (nivelensisäisessä) injektiossa hoidettaessa vahingoittuneita luuliitoksia. HA-fraktioiden on edelleen todettu olevan käyttökelpoisia apuaineina silmälääkkeissä, jolloin saadaan aikaan valmisteita, jotka ovat yhteensopivia sarveiskalvoepiteelin kanssa ja parantavat silmälääkkeiden aktiviteettiä.

Hyaluronihappo on luonnossa esiintyvä heteropolysakkaridi, joka koostuu D-glukuronihapon ja N-asetyyli-D-glukosamiinin vuorottelevista tähteistä. HA on lineaarinen polymeeri, jolla on korkea molekyylipaino, yleisesti noin 8 - 13 miljoonaa, ja sitä on löydetty solukuorissa, selkärankaisten sidekudosten solun ulkopuolisessa aineessa, nivelten nivelvoide-nesteessä, silmän endobulbaarisisissa nesteissä, ihmisen napanuorakudoksessa ja kukon heltoissa.

Aikaisemmat HA:n käytön tutkimukset sisältyvät Balazsin työhön, US-patentti 4,141,973, ja niiden kohteena on HA:n fraktio, jota voidaan käyttää endobulbaaristen nesteiden korvaamiseksi samoin kuin muihin terapeuttisiin sovellutuksiin. Mainittu patentti koskee kuitenkin erityisesti HA-fraktiota, jonka keskimääräinen molekyylipaino on suurempi kuin noin 750.000 ja mieluummin suurempi kuin noin 1.200.000. Balazs esittää nimenomaan, että HA:n fraktiot, joiden keskimääräinen molekyylipaino on alle 750.000, eivät ole terapeuttisesti käyttökelpoisia niiden tulehduksellisen aktivitee-

tin johdosta. Balazs hylkää nämä HA:n alhaisemman molekyyli-painon omaavat fraktiot. Kuitenkin tämä saa aikaan sen, että noin 90 % koko käytettävissä olevan HA:n määrästä, jotka voidaan saada lähdekudoksista, hylätään ja siten käytetään vain pieni määrä (noin 10 %) käytettävissä olevasta HA:sta.

Päinvastoin kuin Balazsin opit esillä olevan hakemuksien ha-kija on todennut, että HA:n alhaisemman molekyyli-painon omaavilla fraktioilla on todella käyttökelpoinen farmaseut-tinen aktiviteetti. Siten esillä olevan keksinnön mukaisesti käytetään noin 80 % erilaisista lähteistä saatavaa HA:ta. Etenkin hakija on löytänyt yhden HA:n fraktion, jota voidaan käyttää haavan parantumisen stimuloimiseen, ja toisen HA:n fraktion, jota voidaan käyttää intraokulaarisissa injekti-oissa endobulbaaristen nesteiden korvaamiseksi silmässä ja intra-artikulaarisissa injektioissa vahingoittuneiden lii-tosten hoitamiseksi.

Kuvio 1 on kaavio, joka esittää ne hyaluronihapon eri frak-tiot, jotka keksijät ovat tunnistaneet.

Kuten yllä on esitetty, HA:n aikaisemmat tutkimukset, kuten esimerkkinä esitetty Balazsin patentti, ovat kohdistuneet niiden korkean molekyyli-painon omaavien fraktioiden käyt-töön, joiden keskimääräisenä molekyyli-painona on yli 750.000. Hakija on eristänyt ja karakterisoinut kaksi uutta HA:n fraktiota, joista toisella on alhainen molekyyli-paino ja toisella on keskikokoa oleva keskimääräinen molekyyli-pai-no ja joiden katsotaan olevan olennaisesti puhtaita, koska niillä on suuri puhtausaste eikä niillä ole tulehduksia ai-heuttavaa aktiviteettiä. Nämä uudet HA:n fraktiot voidaan saada erilaisista sidekudoksista, jotka sisältävät uutetta-vissa olevia määriä hyaluronihappoa. Keksinnön fraktiot erotetaan molekyylisuodatustekniikkojen avulla.

Hakijan eristämää ensimmäistä fraktiota kutsutaan nimellä HYALASTIINI ja sen keskimääräinen molekyyli-paino on noin 50.000 - noin 100.000. Tämän HYALASTIINI-fraktion on to-

dettu soveltuvan ihmisiin ja eläimiin kohdistuvaan terapeutiseen käyttöön sen haavoja parantavan aktiviteetin johdosta. Hakijan eristämää toista fraktiota kutsutaan nimellä HYALEKTIINI ja sen keskimääräinen molekyylipaino on noin 500.000 - noin 730.000. Tämä HYALEKTIINI-fraktio sopii käytettäväksi silmäkirurgiassa endobulbaaristen nesteiden korvaamiseksi ja eläinten ja ihmisten terapiaan nivelten traumaattisissa ja degeneratiivisissä sairauksissa.

HYALASTIINIA voidaan antaa joko intradermaalisenä (ihon sisäisenä) injektiona tai sitä voidaan käyttää paikallisena aineena haavojen parantamiseksi. HYALEKTIINI on toisaalta sopiva intraokulaariseen ja intra-artikulaariseen injektioon.

Tämän keksinnön hakija on intensiivisesti tutkinut HA:n erilaisia fraktioita ja on etenkin määrittänyt huomattavasti tarkemmalla tavalla kuin aikaisemmin HA:n terapeuttisesti käyttökelpoiset fraktiot ja HA:n tulehduksia aiheuttavat ja käyttökelvottomat fraktiot. Näiden tutkimusten tuloksena hakija on tunnistanut HA-fraktioiden kaksi erityistä ominaisuutta ja tutkinut niitä, nimittäin solumobilisaation aktiviteettiä ja sisäistä viskositeettiä. Solumobilisaatio, etenkin fibroblastien mobilisaatio, edistää eläinten haavojen parantumisprosessia. Toisaalta solumobilisaatio- tai uudiskasvuaktiviteettiä (so. mytosis) on vältettävä suoritettaessa kirurgisia toimenpiteitä silmämunassa. Näin on etenkin kun suoritetaan leikkauksia verkkokalvon irtoamisen korjaamiseksi, jolloin lisääntyneellä parantumisnopeudella voi olla vahingollisia vaikutuksia.

HA-fraktion ominaisviskositeetti on myös tärkeä parametri, joka on otettava huomioon arvioitaessa fraktion hyödyllisyyttä. Korkean ominaisviskositeetin omaava fraktio sopii edullisesti kirurgiseen käyttöön, luonteeltaan traumaattisten tai degeneratiivisten nivelten sairauksien terapiaan ja endobulbaaristen nesteiden korvaamiseen. Korkea viskositeetti ei toisaalta ole toivottava ominaisuus sellaisissa frak-

tioissa, joita käytetään lääkeaineina haavojen paranemisen edistämiseksi. Haavojen parantamiseen käytettävillä fraktioilla tulisi itse asiassa olla alhainen viskositeetti niin, että ne ovat helpommin käytettävissä käytännön sovellutuksissa.

Hakijan tunnistamalla HYALASTIINI-fraktiolla on todettu olevan hyvä mobilisaatio- tai solujen uudiskasvuaktiiviteetti ja alhaiset viskositeettiominaisuudet. Siten HYALASTIINILLA on ominaisuudet, joita toivotaan materiaalilta, jota voidaan käyttää haavojen parantumisen edistämiseen.

Samat ominaisuudet tekevät HYALASTIINI-fraktiosta ei-toivot-tavan intraokulaarisissa tai intra-artikulaarisissa injektio-hoidoissa tapahtuvaan käyttöön.

Hakijan tunnistamalla HYALEKTIINI-fraktiolla on todettu olevan merkityksetön solumobilisaatio- tai uudiskasvuaktiivisuus, kun taas samalla sillä on korkea viskositeetti. Tästä syystä nämä ominaisuudet tekevät HYALEKTIINI-fraktiosta käyttökelpoisen intraokulaarisiin ja intra-artikulaarisiin injektio- ja hoitoihin. Toisaalta HYALEKTIINI ei kuitenkaan ole käyttökelpoinen haavojen parantamiskäsittelyissä, koska tällä fraktiolla ei ole solumobilisaatioaktiivisuutta.

Eristettäessä hyaluronihapon käyttökelpoisia fraktioita on myös tärkeää saada ne fraktiot, joilla ei ole tulehduksia aiheuttavaa (eli inflammatorista) aktiivisuutta. Balazsin yllä mainitussa patentissa esitetään, että kun halutaan saada hyaluronihappofraktiot, joilla ei ole inflammatorista aktiivisuutta, on käytettävä yksinomaan fraktioita, joiden keskimääräinen molekyylipaino on yli 750.000. Siten Balazs hylkää ne fraktiot, joiden keskimääräinen molekyylipaino on alle 750.000, katsoen niiden olevan käyttökeltottomia inflammatorisen aktiivisuutensa vuoksi. Päinvastoin kuin mitä Balazsin julkaisussa on esitetty, esillä olevan hakemuksen hakija on todennut, että se inflammatorinen aktiivisuus,

jonka Balazs väittää johtuvan fraktiosta, joiden keskimääräinen molekyylipaino on alle 750.000, johtuu itseasiassa epäpuhtauksista, joiden keskimääräinen molekyylipaino on alle 30.000. Esillä oleva keksintö saa siten aikaan menetelmän, joka käsittää useita molekyylisuodatusmenetelmiä yhdistettynä kemiallisiin menetelmiin ja jolla voidaan poistaa inflammatorinen fraktio, jonka molekyylipaino on alle 30.000.

Keksinnön mukaisilla menetelmillä on mahdollista saada hyaluronihapon käyttökelpoisia fraktioita, joilla ei ole inflammatorista aktiivisuutta ja jotka muodostavat yhdessä noin 80 %:n kokonaissaannon siitä hyaluronihappomäärästä, joka voidaan saada kyseeseen tulevista lähtöaineista. Tämä käytettävissä olevan hyaluronihapon 80 %:n saanto käsittää yhdistetyn fraktion, joka on HYALEKTIINI- ja HYALASTIINI-fraktioiden yhdistelmä ja jonka keskimääräinen molekyylipaino on noin 250.000 - noin 350.000. Etenkin HYALEKTIINI-fraktiota saadaan noin 30 %:n saantona käytettävissä olevasta HA:sta ja HYALASTIINI-fraktiota saadaan noin 50 %:n saantona käytettävissä olevasta HA:sta lähtökudoksista. Tämä tekijä on tärkeä parannus verrattuna yllä esitetyn Balazsin patentin menetelmään siinä, että esillä olevan keksinnön keksijät ovat havainneet, että käytettävissä olevan hyaluronihapon merkittävästi suuremmat määrät ovat farmaseuttisesti käyttökelpoisia. Käyttämällä vain fraktiota, jonka keskimääräinen molekyylipaino on yli 750.000, Balazsin menetelmä antaa vain noin 10 %:n saannon alkuperäisestä eläinten elimistä peräisin olevasta hyaluronihaposta ja hylkää noin 90 % käytettävissä olevasta hyaluronihaposta. Siten esillä olevan keksinnön mukaisesti koko hyaluroniuutteen käyttökelpoisuus on lisääntynyt huomattavasti.

Suhteellisten saantojen vertailu hyaluronihapon eri fraktioiden uuttamisesta on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1

Hyaluronihappo- tyyppi	g/100 g tuoretta kudosta	%	Viite
Kukonheltoista saatava koko hyaluronihappo	0,8	100	Swann D.A. 1968, Biochim, Biophys. Acta <u>156</u> , 17-29
HA (Balazsin esittämä tyyppi)	0,08	10	US-patentti 4,141,973
HYALEKTIINI + HYALASTIINI	0,6	80	esillä oleva keksintö
HYALEKTIINI	0,2	30	esillä oleva keksintö
HYALASTIINI	0,4	50	esillä oleva keksintö
Inflammatorinen fraktio	0,16	20	esillä oleva keksintö

Kuvio 1 esittää graafisesti eri HA-fraktioita, jotka tämän hakemuksen hakija on tunnistanut. Kuvion 1 yhtenäisellä viivalla piirretty kellonmuotoinen käyrä esittää lähtökudoksesta saatavien HA-fraktioiden likimääräistä jakautumista. Kuvion 1 alue "B" esittää HA-fraktiota, jonka Balazs on tunnistanut US-patentissa 4,141,973 farmaseuttisesti käyttökelpoiseksi. Kuvion 1 alueet "A", I ja II ovat fraktiot, jotka tämän hakemuksen hakija on tunnistanut, jolloin alue A on inflammatorinen fraktio, jonka keskimääräinen molekyylipaino on alle 30.000; alue I on HYALASTIINI-fraktio ja alue II on HYALEKTIINI-fraktio. Tästä kaaviosta voidaan nähdä, että Balazsin menetelmä hylkää suurimman osan käytettävissä olevasta uutettavasta HA:sta eliminoimalla HA-fraktiot, joiden keskimääräinen molekyylipaino on alle 750.000. Esillä oleva keksintö sallii toisaalta käytettävissä olevan HA:n suuren osuuden farmaseuttisen käytön, koska alhaisen molekyylipainon omaava hyaluronihapon fraktio, jonka keskimää-

räinen molekyylipaino on alle 30.000, saa aikaan inflammatorisen aktiivisuuden, jota aikaisemmat tutkijat eivät ole havainneet HA:n erilaisilla uutteilla.

Esillä olevan hakemuksen hakija on havainnut, että suuri prosenttimäärä käytettävissä olevaa HA:ta voidaan itse asiassa käyttää terapeuttisiin tarkoituksiin, jos se erotetaan tämän keksinnön oppien mukaisesti aina terapeuttisen sovellutuksen mukaan. Vaikka Balazsin patentti esittää erityisesti vain käytettävissä olevan HA:n noin 10 %:n käyttöä, esillä oleva keksintö sallii käytettävissä olevan HA:n noin 80 %:n käytön joko HYALASTIINI-fraktion muodossa haavan parantamissovellutuksissa tai HYALEKTIINI-fraktion muodossa intraokulaarisiin ja intra-artikulaarisiin käyttötarkoituksiin tai yhdistetyn HYALASTIINI ja HYALEKTIINI-fraktion muodossa, jota voidaan myös käyttää haavan parantamistarkoituksiin.

Tunnistettujen fraktioiden kemiallisia ja fysikaalisia ominaisuuksia on myös tutkittu esillä olevan hakemuksen hakijan toimesta ja nämä ominaisuudet on esitetty taulukossa 2.

TAULUKKO 2 - KEMIAALLISET JA FYSIKAALLISET OMINAISUUDET

Fraktiot	Molekyyli- paino	Dynaaminen viskosi- teetti 20°C:ssa	Tiitteri hyaluronihappoa %:na kuivasta jauheesta	Proteiini- pitoisuus naudan al- bumiinina	Sulfuroitujen mukopolysakka- ridien pitoisuus
HYALASTIINI					
+					
HYALEKTIINI	250.000-350.000	100 mP.s. (kons. 1% p/til.)	> 96% ^x	< 0,5%	< 1%
HYALASTIINI	50.000-100.000	600 mP.s. (kons. 5% p/til.)	> 96%	< 0,5%	< 1%
HYALEKTIINI	500.000-730.000	170 mP.s. (kons. 1% p/til.)	> 96%	< 0,5%	< 1%

^x Esittävät HA:n tiitteriä vedessä suoritettun eliminoinnin jälkeen. Esimerkiksi 96%:n tiitteri esittää, että veden eliminoinnin jälkeen jauhe sisältää 4% epäpuhtauksia ja 96% hyaluronihappoa

Biologisen ja farmaseuttisen aktiivisuuden arviointi

1. Hyaluronihappofraktioiden solumobilisaation biologinen aktiivisuus:

Menetelmää, joka koostuu fibroblastien kiinnitysaktiivisuuden määrittämisestä viljelyssä, käytettiin menetelmänä HA-fraktioiden solumobilisaatioaktiivisuuden määrittämiseksi.

Hiiren BALB 3T3-soluja kasvatettiin Dulbeccon modifioidussa Eagle-väliaineessa, jota oli täydennetty 10 %:sella vasikanseerumilla, penisilliinillä (250 yksikköä/ml) ja streptomysiinillä (0,25 mg/ml), ja inkuboitiin kostutetussa 5 %:sessa CO₂:ssa, 95 %:sessa ilmassa 37°C:ssa. Koetarkoituksia varten solut istutettiin rutiininmukaisesti läpimitaltaan 60 mm oleviin muovikudosviljelymaljoihin (6x10⁵ solua/malja).

3T3-solujen yhtyvät yksiatomiset filmikerrokset dekantoitiin ja lisättiin tuoretta väliainetta, joka sisälsi 2,0 mg/ml HA:n eri fraktioita. Määrätyin välein tutkittiin soluirtoamista sekä mikroskooppisesti että laskemalla liikkuneet solut Coulter-laskimessa.

Irtoamisanalyysi: Irtoamiskinematiikan mittaamiseksi solut istutettiin muovimaljoihin ja niiden annettiin kasvaa 24 tuntia. Tämän ajan jälkeen viljelyväliaine dekantoitiin ja lisättiin tuoretta väliainetta, joka sisälsi 2,0 mg/ml HA:ta. Joka 24 tunnin kuluttua dekantoitiin kaksi maljaa, yksi testiviljely ja yksi kontrolliviljely ja sekä supernatantissa olevat solut että kiinnittyneet solut laskettiin Coulter-laskimessa.

Taulukko 3 esittää tuloksia, jotka on saatu testeillä käytettäessä valmistusesimerkeissä 1 - 3 saatuja fraktioita.

Taulukko 3

Mobilisaatiotutkimusten tulokset

Fraktio	Konsentraatio (mg/ml)	Irronneiden solujen mää- rä verrattuna kontrolleihin	% tehokkuus (verrattuna vertailun fraktioon)
Vertailu		2×10^6	
HYALEKTIINI			
+	2	$3,5 \times 10^6$	75
HYALASTIINI			
HYALEKTIINI	2	$2,1 \times 10^6$	5
HYALASTIINI	2	5×10^6	150

Taulukon 3 arvot osoittavat, että HYALASTIINI-fraktiolla on korkea solumobilisaatioaktiivisuus ja tätä fraktiota voidaan käyttää haavojen parantamiseksi. HYALASTIINIin tämä mobilisaatioaktiivisuus stimuloi uusien solujen migraatiota ja uudiskasvua, kun fraktion farmaseuttista valmistetta käytetään vaurioituneella kudosalueella.

Toisaalta HYALEKTIINI-fraktiolla on hyvin vähän solumobilisaatioaktiivisuutta eikä sitä voida siitä syystä käyttää haavojen parannuksessa. HYALEKTIINI-fraktio on kuitenkin sen korkean keskimääräisen molekyylipainon ja luonteenomaisen viskositeetin johdosta käyttökelpoinen okulaarisissa ja intra-artikulaarisissa injektioissa ja huomattavan solumobilisaatioaktiivisuuden puute on hyvin tärkeä HYALEKTIINI-fraktion ominaisuus, mikä tekee siitä erittäin käyttökelpoisen intraokulaarisissa ja intra-artikulaarisissa injektioissa.

2. Hyaluronihappofraktioiden biologinen inflammatorinen aktiivisuus:

Tätä arviointia varten käytetään invasiivisen solulaskennan menetelmää, kun fraktioita on annettu intraokulaarisesti kaneilla.

Menetelmä

Tässä testissä käytettiin viittä New Zealand- tai California-kania, jotka painoivat noin 2 kg ja joilla on varmistettu täydellinen näkö. Kanien ulkosilmä tarkistetaan inflammatoristen prosessien suhteen makroskooppisella tasolla ja sisäsilmiä tarkastetaan oftalmoskoopilla. Jos silmänpohja on selvästi nähtävissä ja normaali, testi voi edetä.

Valitut eläimet alistetaan paikallispuudutukseen oftalmologiaa varten tiputtamalla muutama pisara sopivaa steriiliä puudutusainetta. Samoin tiputetaan muutama pisara oftalmologisessa liuoksessa olevaa atropiinia.

Testi suoritetaan steriileissä olosuhteissa. Silmämuna saatetaan työntymään esiin paineen avulla, kunnes on mahdollista injisoida kovakalvon läpi noin 5 - 6 mm reunuksesta lasiaisontelon keskikohdassa 100 µl liuosta käyttämällä 26 G neulaa. Toinen silmä otetaan kontrolliksi. Kaksi pisaraa antibioottista liuosta tiputetaan käsiteltyyn silmään ja eläimet sijoitetaan sitten yksittäisiin häkkeihin.

50 - 60 tunnin kuluttua testiä voidaan jatkaa. Silmät tarkistetaan samalla tavalla kuin yllä eläimien valintaa varten. Eläimet tapetaan Pentothalin intravenöosisellä injeksiolla. Sitten ensin kerätään vesipitoinen neste (noin 0,2 ml) insuliiniruiskun avulla 26 G neulalla. Silmämunat poistetaan sitten, vapautetaan kaikesta vieraasta aineesta, pestään suolaliuoksessa, kuivataan billbolous-paperilla ja leikataan ja avataan petrilevyissä, erottamalla lasiaisneste ja keräämällä se steriilillä ruiskulla (noin 0,7 ml). Lasiaisneste sijoitetaan pieniin polyetyleenitestiputkiin ja lisätään 50 µl hyaluronidaasia (100 U NF/ml). Seos pidetään sitten 37°C:n lämpötilassa noin 3 tuntia liuoksen pitämiseksi vähemmän viskoosina.

Leukosyyttilaskenta suoritetaan mikroskoopilla vaihekontrastilla (120 x) Burkner-kammiossa. Laskentojen sarja suoritetaan jokaisella näytteellä laskemalla keskiarvo ja esittämällä tulos leukosyyttien määränä per mm^3 .

Testi katsotaan positiiviseksi, kun

- 1) tutkituissa silmissä ei ole mitään vahingoittumismerkkejä ja
- 2) leukosyyttien määrä käsittelyn 5 silmän vähintään neljän keskiarvo ei ole yli $200/\text{mm}^3$ ja jokaisen kontrollisilmän leukosyyttien keskimäärä ei ole yli $50/\text{mm}^3$.

Taulukossa 4 on esitetty tästä arvioinnista saadut tulokset käytettäessä yllä valmistusesimerkeissä 1 - 3 saatuja HA-fraktioita.

Taulukko 4

Inflammatorisen aktiivisuuden tutkimustulokset

<u>Fraktio</u>	<u>Invasiivisien solujen määrä</u>
Kontrolli	25
HYALASTIINI + HYALEKTIINI	32
HYALASTIINI	20
HYALEKTIINI	22
Inflammatorinen fraktio (keskim. molek.paino 30.000)	150
Kukon heltoista saatu koko hyaluronihappo (RF. Swann D.A. 1968, B.B.A. <u>156</u> , 17-29)	120

Taulukossa 4 esitetyt tulokset esittävät, että HYALASTIINI- ja HYALEKTIINI-fraktioilla ei ole inflammatorista aktiivisuutta yli kontrollin ja yhdistetyillä HYALASTIINI- ja HYALEKTIINI-fraktioilla on vain mitätön inflammatorisen aktiivisuuden kasvu verrattuna kontrolliin. Siten HYALASTIINI- ja

HYALEKTIINI-fraktiot ovat farmaseuttisesti käyttökelpoisia ilman että niillä on ei-toivottuja inflammatorisia sivuvaikutuksia. Nämä tulokset vahvistavat myös edelleen hakijan havainnon, että HA-fraktio, jolla on alhainen noin alle 30.000 oleva keskimääräinen molekyylipaino, on vastuussa HA-valmisteiden inflammatorisesta aktiivisuudesta. Kukonheltoista saadulla hyaluronihapolla, joka on valmistettu kirjallisuudessa esitetyllä Swannin menetelmällä (Swann D.A. 1968, B.B.A. 156, 17-29) on huomattava inflammatorinen aktiivisuus.

Siten on esitetty, että HYALASTIINI-fraktiolla, jonka keskimääräinen molekyylipaino on noin 50.000 - 100.000, on korkea solumobilisaatioaktiivisuus ja se on siten käyttökelpoinen haavanparannussovellutuksissa, ilman että sillä on ei-toivottuja inflammatorisia reaktioita. HYALEKTIINI-fraktio, jonka keskimääräinen molekyylipaino on noin 500.000 - 730.000, on todettu sopivaksi okulaariseen ja intra-artikulaariseen injektioon sen korkean molekyylipainon ja luonteenomaisen viskositeetin johdosta ja samanaikaisesti se ei stimuloi solumobilisaatioaktiivisuutta eikä inflammatorisia reaktioita, jotka ovat ei-toivottuja sivuvaikutuksia, joita tulee välttää farmaseuttisissa sovellutuksissa.

Etenkin HYALASTIINI-fraktio on todettu käyttökelpoiseksi haavanparannusvalmisteissa seuraavien ominaisuuksien johdosta.

1. Valmiste edistää huomattavasti lyhentynyttä parantumisaikaa verrattuna tavanomaiseen terapiaan, jolloin vahingoittunut alue tasoittuu nopeasti, haavan reunat tulevat säännöllisiksi, jyväiskudos kehittyy voimakkaasti, makrofagien ja fibroblastien solumigraatio aktivoituu ja epitelisoituu aikaisin.
2. Valmiste edistää lisääntyneitä mukautuvuutta rekonstrukttiivisen kirurgian suhteen vakavammissa tapauksissa.
3. Arpikasvaimen tai kokoonvetäytyneen arpimuodostuksen

puuttuminen, jolloin lopullinen arpisen kudoksen uudelleenmuotoutuminen tuottaa hyvät kosmeettiset ja toiminnalliset tulokset.

HYALASTIINI-valmiste on todettu käyttökelpoiseksi hoidettaessa erilaisia haavoja mukaanlukien makuuhaavat, kudusravitsemukselliset haavat, palovammat, kivuttomat haavat, posttraumaattiset haavat, suonikohjuiset ja postplebiittiset haavat laskimoveritäplistä, radioneekroosi, ihovauriot, ihosiirränäiset ja herpes simplexin aiheuttamat ihovammat. Näitä haavanparannuskäsittelyjä varten HYALASTIINI-valmistetta tai sen natriumsuolaa voidaan antaa eri menetelmillä, kuten harsotyynyillä, voiteena, spraynä tai ampulleina intramediaalisia injektioita varten. Tooppisia sovellutuksia, kuten voiteena tai harsotyynyillä HYALASTIINI yhdistetään mieluummin emulgointiaineen kanssa, joka absorboi tulehdusnesteen paljaana olevalta alueelta ja antaa hyaluronihapon erinomaisen diffuusion, ja veteen dispergoituvan täyteaineen kanssa, niin että haavasidos on helposti poistettavissa.

HYALEKTIINI-fraktion on todettu olevan erittäin käyttökelpoinen hevosten, etenkin kilpahevosten hoitamisessa, joilla on nivelsairauksia ja -tauteja, jotka aiheutuvat akuutin tai kroonisen trauman, infektioiden ja toistettujen intra-artikulaaristen kortikosteroidisten injektioiden johdosta. Erityisiä HYALEKTIINillä käsiteltävien sairauksien esimerkkejä ovat osteoartroosi joko inflammatoristen ilmiöiden kanssa tai ilman, akuutti tai krooninen synoritis, degeneratiiviset prosessit nivelrustoissa ja kuiva niveltauti. Näiden sairauksien yleisimpiä symptomeja ovat yleisesti kipu, heikentynyt niveltoiminta ja vähentynyt niveltaipuminen. Keksinnön mukaisen HYALEKTIINI-fraktion on todettu edistävän tällaisten sairastavien hevosten parantumisajan huomattavaa lyhentymistä verrattuna tavanomaiseen terapiaan, edistävän niveltoiminnan aikaista ja kestävästä parannusta ja vähentävän kipua ja raajarikkoisuutta. Näitä kliinisesti edullisia vaikutuksia uskotaan edistettävän nivelvoidenesteen viskoelastisuuden normaalistumisen ja kudoksen korvautumisprosessien aktivoinnin ansiosta nivelrustoissa.

Lisäksi kaikkia yllä olevia edullisia vaikutuksia edistetään HYALEKTIINI-fraktiolla ilman paikallisia ja/tai systeemisiä toksisia vaikutuksia. Toistettu HYALEKTIINin antaminen ei aiheuta allergisia reaktioita eikä mitään haitallisia tai kestäviä vaikutuksia.

Lisätutkimuksessa on tutkittu hyaluronihapon kykyä ja tehokkuutta apuaineena erilaisia molekyylejä varten, etenkin sen käyttöä apuaineena silmälääkkeitä varten, jotka takaavat täydellisen siedettävyyden ja yhteensopivuuden (so. ilman herkistysilmiöitä) sarveiskalvoepiteelin kanssa. Hyaluronihappoa pidetään erittäin mielenkiintoisena oftalmisena apuaineena. Kuten edellä esitettiin, HA on glykosaminoglykaani, joka on läsnä erilaisissa sidekudoksissa ja biologisissa nesteissä (kuten nivelvoidenesteessä ja erityisesti lasiaisnesteessä), missä sillä on sen kemiallisen ja fysiokaalisen luonteen ja sen huomattavien visko-elastisten ominaisuuksien johdosta perusteellista laatua oleva rakenteellinen ja biologinen merkitys.

Siten suoritettiin tutkimus erilaisia molekyylipainoja omaavien HA-fraktioiden, etenkin hyalastiini- ja hyalektiini-fraktion ja niiden seoksen käytön tutkimiseksi erilaisten farmaseuttisten muotojen, kuten silmäveden, geelin, voiteiden, kiinnittimien tai kuivien jauheiden valmistamiseksi. Tästä syystä erityyppisiä silmälääkkeitä tutkittiin tämän biologisen polymeerin mahdollisen käytön selvittämiseksi sen erilaisina fraktioina apuaineena.

Tämän jälkeen esitettyjen tutkimusten tarkoituksena on määrittää, pystyvätkö täyteaineena hyaluronihappoa sisältävät valmisteet parantamaan apuainetta sisältävien lääkeaineiden bio-käyttökelpoisuutta tai tuottamaan synergistisen vaikutuksen yhdessä apuainetta sisältävien lääkeaineiden kanssa, etenkin lääkeaineiden kanssa, joilla on oftalmisen aktiivisuus tai käyttö.

Näitä mahdollisia HA:n kykyjä apuaineena tutkittiin kaniinin silmässä neljällä erityyppisellä ja erilaisen toiminnan

omaavilla silmälääkkeillä, etenkin pilokarpiininitraatilla, triamkinoliinillä, epidermaalisella kasvutekijällä (EGF) ja antibiootilla, kuten streptomysiinillä ja gentamysiinillä. Kaikkien näiden lääkkeiden tiedetään omaavan mioottinen, anti-inflammatorinen, parantava ja anti-mikrobiaalinen vaikutus. Lisäksi antibioottisen streptomysiinin aktiivisuuden arviointi, jossa on apuaineena hyaluronihappoa, on hyvin tärkeä, koska se on yksi laajimmin käytetyistä antibiooteista silmäinfektioissa.

Tutkitut kokeelliset mallit ja suoritettut tutkimukset olivat seuraavat:

- 1) apuaineena hyaluronihappoa sisältävän pilokarpiininitraatin mioottinen aktiivisuus kanin silmässä;
- 2) hyaluronihappoa apuaineena sisältävän triamkinolin anti-inflammatorinen vaikutus kanin silmässä dekstraanilla indusoidun tulehduksen mallissa;
- 3) hyaluronihappoa apuaineena sisältävän epidermaalisen kasvutekijän (EGF) parantava aktiivisuus kanin sarveiskalvon epiteelivammassa;
- 4) hyaluronihappoa apuaineena sisältävän streptomysiinin antimikrobinen aktiivisuus Bacillus subtilis 6633:a vastaan agar-levyissä.

I. Hyaluronihappoa apuaineena sisältävän pilokarpiininitraatin mioottinen aktiivisuus

Seuraavia aineita käytettiin pilokarpiinin täyteaineina erilaisia pilokarpiininitraatti-valmisteita varten:

- hyaluronihapponatriumsuolaa, hyalastiini-fraktiota (molekyylipaino noin 100.000) 10 mg/ml:n ja 20 mg/ml:n konsentraatiossa;
- hyaluronihapponatriumsuolaa, hyalektiini-fraktio (molekyylipaino 500.000 - 730.000) 10 mg/ml:n ja 20 mg/ml:n konsentraatiossa;
- 5%:sta polyvinyylialkoholia oftalmisena vertailutäyteaineena.

Erilaisia pilokarpiininitraatin 2%:n valmisteita (silmävettä tai geeliä) valmistettiin ja niihin lisättiin apuaineeksi HA-natriumsuolan kahta erilaista fraktiota 10 ja 20 mg/ml:n konsentraatiossa. Seuraavat liuokset valmistettiin:

Valmiste 1 - suolaliuos pilokarpiininitraatin (PiNO_3) (2%) kanssa, jota käytettiin vertailuna.

Valmiste 2 - PiNO_3 :n (2%) liuos, jossa on apuaineena 5%:sta polyvinyylialkoholia (käytettiin vertailuna).

Valmiste 3 - PiNO_3 :n liuos (2%), jossa on apuaineena hyalastiini-fraktion natriumsuolaa (10 mg/ml).

Valmiste 4 - PiNO_3 :n liuos (2%), jossa on apuaineena hyalastiini-fraktion natriumsuolaa (20 mg/ml).

Valmiste 5 - PiNO_3 :n liuos (2%), jossa on apuaineena hyalektiini-fraktion natriumsuolaa (10 mg/ml).

Valmiste 6 - PiNO_3 :n liuos (2%), jossa on apuaineena hyalektiini-fraktion natriumsuolaa (20 mg/ml).

Käytettiin Zealand-albiinokaneja (2 - 2,5 kg). Testattavat valmisteet tiputettiin yhteen silmään mikroinjektoruiskulla (10 μl), toinen silmä toimi vertailuna. Pupillin läpimitta mitattiin kaikissa tapauksissa sopivin aikavälein. Jokainen liuos testattiin vähintään 8 kanissa. Kumpikin silmä käsiteltiin korkeintaan kolme kertaa ja vähintään yhden viikon loppujaksoa tarkkailtiin jokaisen käsittelyn välillä.

Pupillin läpimitat mitattiin eri aikavälein mioottisen aktiivisuuden käyrän määrittämiseksi ajan suhteen. Seuraavat aktiivisuusparametrit laskettiin tämän jälkeen mioosi/aika-kaavioista:

I_{max} = maksimiero pupillin läpimitassa käsitellyn silmän ja vertailun välillä.

Huippuaika = aika I_{max} :in saavuttamiseksi.

Kesto = aika perusolosuhteiden palauttamiseksi. Tasanne =

absoluuttisen mioottisen aktiivisuuden kesto.

AUC = alue mioosi/aikakäyrän alapuolella.

Testien tulokset on esitetty taulukossa 5. Voidaan nähdä eri parametrien arvoista, jotka on määritetty kaikkien testattujen liuosten mioottisen aktiivisuuden aikakäyrästä, että hyaluronihapon lisäys 2%:seen pilokarpiininitraattiliuokseen lisää lääkkeen mioottista aktiivisuutta. Itse asiassa lääkkeen bio-käyttökelpoisuus voi olla jopa 2,7 kertaa suurempi kuin 2% pilokarpiininitraattia (valmiste 1) sisältävän vesipitoisen liuoksen.

Tulisi myös huomata, että esiintyy statistisesti merkittävä aktiivisuuden kasvu, kun apuaineena käytetään hyaluronihapon hyalektiini-fraktiota sekä 10 että 20 mg/ml:n annoksessa (valmisteet 5 - 6) verrattuna polyvinyylialkoholia apuaineena sisältävään pilokarpiininitraattiliuokseen (valmiste 2).

Hyaluronihapon käyttö apuaineena on erittäin mielenkiintoinen, koska pilokarpiininitraatin mioottinen aktiivisuus kestää kauemmin, kun se sisältää tätä ainetta apuaineena. Tämä tarkoittaa, että hyaluronihappoa sisältävien valmisteiden kohdalla aika pupillin läpimitan palautumiseksi perustiloihin on korkeintaan 190 minuuttia (valmiste 6) verrattuna yksinään suolaliuoksessa olevan pilokarpiinin (valmiste 1) 110 minuuttiin.

II. Hyaluronihappoa apuaineena sisältävän triamkinolonin anti-inflammatorinen aktiivisuus

Seuraavia aineita käytettiin:

- hyaluronihapponatriumsuola-hyalektiini-fraktion liuos, molekyylipaino 500.000 - 730.000, 10 mg/ml suolaliuoksessa;
- triamkinolonin liuos (10% suolaliuoksessa).

Kokeet suoritettiin koiraspuolisilla New-Zealand-kaneilla (keskimääräinen paino 1,6 kg). 5 päivän sopeuttamisajan jälkeen intraokulaarinen tulehdus indusoitiin kaneissa injek-

toimalla intraokulaarisesti dekstraaniliuosta (10%, 0,1 ml).
Anto suoritettiin molempiin silmiin paikallispuudutuksessa
4%:sella novesinalla sovittamalla injektioruiskun neula 4 mm
etukammioon 2 mm:n etäisyydellä sarveiskalvon reunuksesta.
Testi suoritettiin 10 eläimellä.

Taulukko 5: Hyaluronihappoa^x apuaineena sisältävää pilokarpininitraattia sisältävien oftalmisten valmisteiden biologinen aktiivisuus

Valmiste	Apuaine	I _{max} [*] mm (+ LF 95%)	Huippuaika (minuutit)	Kesto (minuutit)	Tasanne (minuutit)	AUC, cm ² (+ LF 95%)	Suhteellinen AUC
1	suolaliuos	1,93 ± 0.35	20	110	-	117 ± 28	1
2	5%:nen polyvinyylialkoholi	2,33 ± 0.28	20	140	-	192 ± 32	1,64
3	hyalastiini (10 mg/ml)	2,50 ± 0.42	20	120	-	240 ± 40	2,05
4	hyalastiini (20 mg/ml)	2,58 ± 0.38	30	150	-	208 ± 41	1,78
5	hyalektiini (10 mg/ml)	2,50 ± 0.38	15	170	-	242 ± 48	2,06
6	hyalektiini (20 mg/ml)	2,70 ± 0.38	20	190	45	320 ± 45	2,73

^xEsitetyt arvot esittävät 8 jakson keskimäärää.

Käsittely suoritettiin jokaisessa eläimessä sekä oikeassa että vasemmassa silmässä tiputtamalla 3 pisaraa 3 kertaa päivässä kaikkiaan 6 päivän ajan seuraavasti:

- triamkinolonin liuos (10% suolaliuoksessa) vasemmassa silmässä (LE);
- hyaluronihapponatriumsuolan liuosta, hyalektiini-fraktio (10 mg/ml) + triamkinolonia (10%) oikeassa silmässä (RE).

Anti-inflammatorinen vaikutus dekstraanilla indusoituun flo-gistiseen (tulehdukselliseen) reaktioon arvioitiin tutkimalla silmää rakolampulla seuraavin välein: 0, 1, 3, 24, 48 tuntia, 3 päivää, 4 päivää, 5 päivää ja 6 päivää.

Aikaväleissä silmän tutkimuksessa tehtiin seuraavat havainnot:

- sarveiskalvon ja sidekalvon tila hypermian, turvotuksen mahdollisen esiintymisen suhteen ja etenkin iiriksen tutkimus, joka on normaalisti herkkä flo-gistisen tulehduksen suhteen inflammatoristen aineiden intraokulaarisen injektion jälkeen;
- Tyndall-vaikutus, jossa enemmän tai vähemmän intensiivinen sameus ("nubecula") on osoituksena hiukasmaisten (inflammatoristen) elementtien läsnäolosta etukammiossa.

Tutkimuksen tulos esitettiin subjektiivisena vaotuksena (0 - 3) suhteessa havaitun vaikutuksen asteittaisuuteen.

Taulukossa 6 esitetyistä tuloksista voidaan nähdä, että triamkinolonin antamisella on anti-inflammatorinen vaikutus iirikseen ja se saa aikaan sameuden (Tyndalla-ilmiö) häviämisen etukammiossa. Inflammatorinen prosessi, joka on selvä ensimmäisestä...kolmannesta tunnista kolmanteen...neljänteen päivään asti, vähenee asteittain, kunnes lähes normaalit olosuhteet ovat palautuneet, jolloin silmä on täysin kuukas 6. päivänä. Toisaalta hyaluronihapponatriumsuolan, hyalektiini-fraktion antaminen yhdessä triamkinolonin kanssa

vähentää yllä esitettyinä aikoina havaittua intraokulaarista tulehdusta suhteessa yksinään triamkinolonin antamiseen. Tämä tarkoittaa, että flogistisen iiriksessä esiintyvän prosessin ja etukammion sameuden nähdään vähentyneen 24. tunnissa, progressiivisen vähenemisen tapahtuessa 48 tunnissa ja inflammatorisen reaktion koko poistumisen tapahtuessa neljännestä päivästä alkaen.

Sidekalvossa ja sarveiskalvossa ei havaittu olennaisesti mitään huomattavia reaktioita dekstraanin intra-okulaarisen injektion jälkeen.

Siten triamkinolonin antaminen yhdessä hyaluronihappo-fraktion kanssa paransi lääkkeen aktiivisuutta kuten nähdään kanan silmän nopeammasta regeneroitumisesta.

Taulukko 6

HYALURONIHAPON JA TRIAMKINOLONIN YHDISTELMÄN VAIKUTUS
DEKSTRAANILLA INDUSOITUUN INTRAOKULAARISEEN TULEH-
DUKSEEN

Tarkkailuväli

	Tarkkailuväli											
	0	1 tunti	3 tuntia	24 tuntia	48 tuntia	3 päivää	4 päivää	5 päivää	6 päivää			
	LE	RE	LE	RE	LE	RE	LE	RE	LE	RE	LE	RE
Sidekalvo	0,0 0,0	0,2 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0
Sarveiskalvo	0,0 0,0	1,0 0,2	0,0 0,7	0,1 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0	0,0 0,0
Tyndall	0,0 0,0	1,0 1,2	3,0 3,0	3,0 2,1	3,0 1,2	3,0 0,2	2,2 0,0	1,2 0,0	0,4 0,0			
Iiris	0,0 0,0	0,5 0,7	2,7 2,7	3,0 2,5	3,0 1,2	3,0 0,4	2,4 0,0	1,5 0,0	0,5 0,0			

Arvioitu vaotus^x

LE = Vasen silmä, käsitelty triamkinolonilla.

RE = Oikea silmä, käsitelty triamkinolonilla ja hyalektiinilla.

^xJokainen arvo on 7 tarkkailun keskiarvo kaikkiaan 7 eläimes-
sä ja esitetty subjektiivisena vaotuksena nollan ja kolmen
välillä suhteessa tarkkaillun vaikutuksen asteittaisuuteen.

III. Hyaluronihappoa apuaineena sisältävän EGF:n parantava aktiivisuus

Käytettiin seuraavia aineita:

Valmiste A - EGF (epidermaalinen kasvutekijä) liuotettuna suolaliuokseen (0,5 mg/5 ml).

Valmiste B - hyaluronihapponatriumsuola, hyalastiini-fraktio (molekyylipaino noin 100.000) liuotettuna suolaliuokseen (10 mg/ml).

Kokeet suoritettiin koiraspuolisilla New Zealand-albiinokaneilla (keskimääräinen paino 1,8 kg). Eläimet alistettiin noin 5 päivän sopeuttamisjakson jälkeen sarveiskalvon epi-teeliseen vammaan sopivissa Novesinalla suoritettun paikallisuudutuksen olosuhteissa (4%). Vamma tehtiin leikkaamalla yhdestä silmästä pyöreä alue optisella alueella, joka aikaansatiin terävillä kulmilla varustetulla koverolla lasisylinterillä (Ø 3 mm).

Eläimet jaettiin ryhmiin, joissa kussakin oli 5 eläintä ja jotka alistettiin farmakologiseen käsittelyyn sidekalvotiputuksella seuraavasti:

Ryhmä	Käsittely
Ryhmä 1 (kontrolli)	Suolaliuos
Ryhmä 2	EGF-liuos (valmiste A)
Ryhmä 3	Hyaluronihapponatriumsuolan, hyalastiini-fraktion liuos + EGF-liuos - valmisteen A + valmisteen B yhdistelmä suhteessa 1:1 valmisteen C muodostamiseksi

Käsittely suoritettiin oikeaan silmään (RE) tiputtamalla sidekalvolle 2 pisaraa joka 8. tunti 3 koko antoa varten.

Sarveiskalvon epiteelin paraneminen arvioitiin tutkimalla silmää ja valokuvaamalla rakolampulla eri aikaväleihin leikkauksen jälkeen: 0, 8, 16, 24, 32, 40 ja 48 tuntia.

Taulukossa 7 esitetty oftalmologinen tutkimus 1 osoitti, että kontrolleissa (ryhmä 1) täydellinen paraneminen saatiin aikaan (5/5 eläintä) 48 tunnin kuluttua vamman jälkeen. EGF:llä käsitellyissä eläimissä (ryhmä 2) paranemisprosessi oli ilmeinen jo 24 tunnin kuluttua leikkauksen jälkeen huomattavalla tehokkuudella (4/5 eläintä). Valmisteella C, joka sisälsi hyaluronihapponatriumsuolaa, hyalastiini-fraktiota + EGF:ä, käsitellyissä eläimissä (ryhmä 3) paranemisprosessi oli täydellinen kaikissa eläimissä (5/5) jo 16 tunnin kuluttua leikkauksen jälkeen.

Nämä tulokset osoittavat, että hyalastiini-hyaluronihappofraktion käyttö EGF:n apuaineena parantaa paranemisprosessia edistämällä nopeampaa tehokasta sarveiskalvovammojen paranemista.

Taulukko 7

SARVEISKALVON EPITEELIN VAMMOJEN PARANEMINEN

Ryhmä	Käsittely	Tuntia leikkauksen jälkeen				
		0	8	16	24	48
1	Suolaliuosta	+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
		+	+	+	+	-
2	EGF (Valmiste A)	+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
		+	+	+	-	-
		+	+	+	+	-
		+	+	+	-	-
3	Hyaluronihappoa + EGF (Valmiste C)	+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-
		+	+	-	-	-

+ = parantumaton silmä

- = parantunut silmä

IV. Hyaluronihappoa apuaineena sisältävän gentamysiinin antimikrobinen aktiivisuus

Seuraavia aineita käytettiin:

- suolaliuokseen liuotettua gentamysiiniä (50 mg/ml)
- hyaluronihapponatriumsuolaa, hyalektiini-fraktiota (2 mg/ml)

Septinen tulehdus aiheutettiin 11 kanin molempiin silmiin antamalla intraokulaarinen injektio titrattua Pseudomonas aeruginosa-suspensiota (0,1 ml). Septisen tulehduksen omaaville kaneille annettiin hyaluronihappoa, hyalektiini-fraktiota yhdessä gentamysiinin kanssa tiputtamalla oikeaan silmään ja vasempaan silmään annettiin gentamysiiniä puskuroidussa suolaliuosapuaineessa. Käsittely (3 pisaraa joka 6. tunti) aloitettiin välittömästi infektoivan aineen injektion jälkeen ja sitä jatkettiin, kunnes infektio oli hävinnyt. Kanien silmiä tutkittiin joka päivä rakolampulla.

Käsittely hyaluronihapon ja gentamysiinin yhdistelmällä tuotti septisen infektion nopeamman häviämisen verrattuna yksinään antibiootin antamiseen. Tämä päätelmä on selvä taulukossa 8 esitetyistä arvoista.

Taulukko 8

HYALURONIHAPON HYALEKTIINI-FRAKTIOTA APUAINEEN SISÄLTÄVÄN GENTAMYSIININ VAIKUTUS INTRAOKULAARISEEN SEPTISEEN TULEHDUKSEEN

Käsittely	Päivää tulehduksen käynnistämisestä						
	1	2	3	4	5	6	7
Gentamisiiniä + puskurisuola- liuosta	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	36,3	100
Gentamisiiniä + hyaluronihapon hyalektiini- fraktiota	0,0	0,0	9,0+	27,2+	72,7+	100	100

Arvot on esitetty prosenttimäärinä (tulehduksesta parantuneiden silmien määrä käsiteltyjen silmien määrän suhteen).

+ = merkittävä ero vs. puskuriapuaine (alle 0,05, Fischerin tarkka T-testi).

Silmälääkkeiden lisäesimerkkejä (vaikkakaan ei-rajoittavia), joita voidaan käyttää keksinnön mukaisten HA-fraktioiden kanssa, ovat seuraavat:

antibiootit:	kloramfenikoli neomysiini aureomysiini myksiini ja polymyksiini basitrasiini mysetiinit
hormonit:	nandroloni ja nandroloni-sulfaatti
puudutusaineet (paikalliset):	henoksinaatti ja sen hydrokloridi
antiviraaliset aineet:	jodideoksiuridiini jodideoksisytidiini
anti-inflammatoriset aineet:	deksametasoni ja sen fosfaatti
vasopressorit ja vasokonstriktorit:	synefriini ja neosynefriini

Perustuen yllä esitetyissä kokeissa saatuihin tuloksiin voidaan päätellä, että hyaluronihapponatriumsuolan liuoksia (sekä hyalastiini - että hyalektiini-fraktioidina) voidaan käyttää silmälääkkeiden apuaineena ja ne näyttävät olevan tehokkaita sellaisenaan erityyppisiä lääkeaineita varten, joilla on erilaisia biologisia vaikutuksia. Esimerkiksi lääkkeitä, jotka sisältävät anti-glaukooma-aineita, kuten pilokarpiininitraattia, antiallergisia ja anti-inflammatorisia aineita, kuten triamkinolonia, kudoksen parantamista ja solukasvua edistäviä aineita silmäkudoksen paranemisen edistämiseksi, kuten EGF:ä ja antibiootteja, kuten streptomysiiniä ja gentamysiiniä, joiden mioottista, anti-inflam-

matorista, parantavaa ja vastaavasti antimikrobista aktiivisuutta on selostettu, voidaan kaikkia antaa tehokkaasti käyttämällä apuaineena HA:ta.

Silmälääkkeiden valmisteet, joissa on apuaineena erilaisia molekyyllipainoja omaavia hyaluronihappofraktioita, ovat osoittautuneet tehokkaasti siedettäväksi ja ne sopivat yhteen sarveiskalvon epiteelin kanssa ilman, että ne aiheuttavat herkistymisilmiöitä.

On myös mahdollista todeta yllä esitetyistä arvoista, miten tämä biologinen tuote, hyaluronihappo, on tehokas apuaine, joka pystyy parantamaan apuainetta sisältävien lääkkeiden in vivo-biokäytettävyyttä ja voimistaa tällaisten lääkkeiden farmakologista aktiivisuutta. Hyaluronihappo-fraktioiden käyttö lääkeaineen apuaineena saa etenkin aikaan:

- pilokarpiininitraatin mioottisen aktiivisuuden kasvun pidentäen samalla lääkkeen aktiivisuusaikaa;
- triamkinolonin anti-inflammatorisen aktiivisuuden kasvun dekstraanilla indusoidussa tulehduksessa ja flogistisen prosessin palautumisen lyhemmissä ajoissa verrattuna yksinään triamkinolonilla saatuihin tuloksiin;
- epidermaalisen kasvutekijän (EGF) suojatoiminnan kasvun sarveiskalvon pintavammoissa ja selvän synergismin ja vähenemisen paranemisajoissa verrattuna yksinään EGF:llä saatuihin regeneroitumisaikoihin; ja
- antibioottien, kuten gentamysiinin in vivo biologisen aktiivisuuden kasvun.

Kuten yllä esitetyistä tuloksista käy ilmi voidaan tätä biologista polymeeriä, hyaluronihappoa, käyttää luonteeltaan ja vaikutusmekanismiltaan mitä erilaisimpien lääkeaineiden apuaineena. Tästä voidaan edelleen päätellä, että se soveltuu käytettäväksi apuaineena lukuisissa muissakin silmälääkkeissä.

Hyaluronihappofraktioiden valmistus

Esimerkki 1: Menetelmä sellaisten HYALASTIINI ja HYALEKTIINI-fraktioiden valmistamiseksi, joilla ei ole tulehduksia aiheuttavaa aktiivisuutta

Kananhelittoja, jotka ovat joko tuoreita tai pakastettuja (3000 g), hienonnetaan lihamyllyssä ja sitten ne homogenoidaan huolellisesti mekaanisessa homogenointilaitteessa. Näin saatu tahna sijoitetaan ruostumattomasta teräksestä (AISI 316) olevaan säiliöön tai lasisäiliöön, jossa on 10 tilavuusosaa vedetöntä asetonia. Koko sisältöä sekoitetaan sitten 6 tuntia nopeudella 50 kierrosta minuutissa ja se jätetään erottumaan 12 tunniksi, minkä jälkeen asetoni imetään lapolla pois ja poistetaan.

Tämä uuttamisprosessi toistetaan, kunnes poistettu asetoni on saavuttanut oikean kosteustason (Karl-Fischer-menetelmä).

Saatava aine sentrifugoidaan sitten ja tyhjökuivatetaan sopivassa lämpötilassa 5 - 8 tunnin ajan. Tällä menetelmällä saadaan noin 500 - 600 g kuivaa jauhetta kananheltoista.

300 g kuivaa jauhetta alistetaan sitten papaiinillä (0,2 g) suoritettavaan entsymaattiseen hajotukseen puskuroidussa vesipitoisessa väliaineessa, jossa on fosfaattipuskuria, kysteiinihydrokloridin sopivan määrän läsnäollessa. Tätä seosta sekoitetaan sitten 24 tuntia nopeudella 60 kierrosta minuutissa 60 - 65°C:n vakiolämpötilassa. Tämä koko massa jäähdytetään 25°C:seen lisäämällä 60 g Celite ®-tuotetta ja sekoitusta jatketaan vielä tunnin ajan.

Saatavaa seosta suodatetaan, kunnes saadaan kirkas neste. Tämä kirkas neste alistetaan sitten molekyyliultrasuodatukseen sellaisten kalvojen avulla, joiden molekyylien eksklusioraja on 30.000, niiden molekyylien pidättämiseksi kalvolle, joiden molekyylipaino on yli 30.000. 5 - 6 alkuperäis-tilavuusosaa ultrasuodatetaan samalla, kun tislattua vettä

lisätään jatkuvasti tuotteeseen. Tislatun veden lisäys keskeytetään ja tuotetta ultrasuodatetaan, kunnes sen tilavuus on vähentynyt yhteen kolmasosaan alkuperäisestä tilavuudesta.

Jäännösneuste asetetaan 0,1 molaariseksi lisäämällä natriumkloridia ja lämpötila saatetaan 50°C:seen. 45 g setyyli-pyridiniumkloridia lisätään samalla, kun tuotetta sekoitetaan nopeudella 60 kierrosta minuutissa. Tätä seosta sekoitetaan 60 minuuttia, minkä jälkeen lisätään 50 g Celite ®-tuotetta. Sekoitettaessa tuotteen lämpötilaa alennetaan 25°C:seen ja muodostunut sakka otetaan talteen sentrifugomalla. Näin saatu sakka suspentoidaan 0,01 molaariseen natriumkloridi-liuokseen (5 litraa), joka sisältää 0,05 % setyyli-pyridiniumkloridia. Sitä sekoitetaan vielä 60 minuuttia 50°C:ssa. Lämpötila alennetaan 25°C:seen ja sakka sentrifugoidaan.

Pesumenetelmä toistetaan kolme kertaa ja sakka kerätään lopuksi säiliöihin, jotka sisältävät 3 litraa 0,05 molaarista natriumkloridiliuosta, joka sisältää 0,05 % setyyli-pyridiniumkloridia. Tätä sekoitetaan nopeudella 60 kierrosta minuutissa 60 minuuttia ja pidetään 25°C:n vakio-lämpötilassa 2 tuntia. Emäliuos poistetaan sentrifugoinnin avulla.

Menetelmä toistetaan sitten useita kertoja 0,1 molaarisella natriumkloridiliuoksella, joka sisältää 0,05 % setyyli-pyridiniumkloridia. Tämä seos sentrifugoidaan ja emäliuos poistetaan. Sakka dispergoidaan 0,30 molaariseen natriumkloridiliuokseen, joka sisältää 0,05 % setyyli-pyridiniumkloridia (3 l). Seosta sekoitetaan ja sekä sakka että kirkas liuos otetaan talteen. Uuttaminen toistetaan sakalla vielä 3 kertaa, joka kerta käyttämällä 0,5 litraa samaa vesiliuosta.

Lopuksi jäännössakka poistetaan ja kirkkaat liuokset yhdistetään yhteen ainoaan säiliöön. Nestein lämpötila nostetaan 50°C:seen sekoittaen. Neste saatetaan sitten 0,23 molaariseksi natriumkloridilla. Lisätään 1 g setyyli-pyridiniumkloridia ja jatketaan sekoitusta 12 tuntia. Seos jäädytetään

25°C:seen, sitten se suodatetaan, ensin Celite ®-kerrosten ja sitten suodattimen (1 µm) läpi.

Saatava seos saatetaan sen jälkeen vielä molekyylimembraan-suodatukseseen, jolloin käytetään kalvoja, joiden molekyylimembraanraja on 30.000. Ultrasuodatetaan 3 alkutilavuusmäärää lisäämällä 0,33 molaarista natriumkloridiliuosta. Natriumkloridiliuoksen lisäys lopetetaan ja nesteen määrä vähennetään neljäsosaan sen alkumäärästä.

Näin konsentroitua liuos saostetaan kolmella tilavuusosalla 95 %:sta etanolia sekoittaen (60 kierrosta minuutissa) 25°C:n lämpötilassa. Sakka otetaan talteen sentrifugoimalla ja emäliuos poistetaan. Sakka liuotetaan 1 litraan 0,1 molaarista natriumkloridiliuosta ja saostamiskäsittely toistetaan kolmella tilavuusosalla 95 %:sta etanolia.

Sakka otetaan talteen ja pestään, ensin 75 %:lla etanolilla (kolme kertaa), sitten absoluuttisella asetonilla (kolme kertaa).

Näin saadun tuotteen (HYALASTIINI + HYALEKTIINI-fraktiot) keskimääräinen molekyylipaino on 250.000 - 350.000.

Hyaluronihapon saanto on 0,6 % alkuperäisestä tuoreesta kudeksesta.

Esimerkki 2 - Menetelmä HYALASTIINI-fraktion valmistamiseksi esimerkissä 1 esitetyllä menetelmällä saadusta seoksesta:

Esimerkissä 1 esitetyllä menetelmällä saatu seos liuotetaan pyrogeeni-vapaaseen tislattuun veteen, jolloin 1 ml:aan vettä annostellaan 10 mg tuotetta. Näin saatu liuos alistetaan molekyylimembraan-suodatukseseen käyttämällä kalvoja, joiden molekyylimembraanraja on 200.000, konsentrintiteknikalla ja lisäämättä vettä kalvolle. Kun ultrasuodatusprosessissa käytetään kalvoa, jonka sulkuraja on 200.000, molekyylipainoltaan yli 200.000 olevat molekyylit eivät pääse kalvon läpi, kun taas pienemmät molekyylit kulkevat sen läpi veden

kanssa. Suodatusprosessin aikana ei lisätä vettä kalvon yläpuolella olevaan osastoon. Tästä syystä tämän osaston liuosmäärä vähenee ja molekyylipainoltaan yli 200.000 olevien molekyylien konsentraatio kasvaa. Ultrasuodatusta jatketaan sitten kunnes tilavuusmäärä kalvolla on vähentynyt 10 %:iin alkutilavuudesta. Kaksi tilavuusmäärää pyrogeenivapaata kaksi kertaa tislattua vettä lisätään ja liuos ultrasuodatetaan taas, kunnes tilavuus on vähentynyt yhteen kolmasosaan. Käsittely toistetaan vielä kaksi kertaa.

Liuos, joka kulkee kalvon läpi, saatetaan 1,0 molaariseksi natriumkloridilla ja sitten se saostetaan neljällä tilavuusosalla 95 %:sta etanolia. Sakka pestään kolme kertaa 75 %:sella etanolilla ja sitten se tyhjökuivataan.

Näin saadun tuotteen (HYALASTIINI-fraktio) keskimääräinen molekyylipaino on 50.000 - 100.000.

Hyaluronihapon saanto on 0,4 % alkuperäisestä tuoreesta kudoksesta.

Esimerkki 3 - Menetelmä HYALEKTIINI-fraktion valmistamiseksi:

Esimerkissä 2 selostetulta ultrasuodatuskalvolta, jonka molekyyliekskluusioraja on 200.000, kerätty konsentroitunut liuos siirretään säilöön, jossa sitä laimennetaan vedellä, kunnes saadaan liuos, joka sisältää 5 mg/ml hyaluronihappoa määritettynä kvantitatiivisella glukuronihapon määritykseen perustuvalla analyysillä.

Liuokseen lisätään natriumkloridia kunnes se tulee 0,1 molaariseksi natriumkloridin suhteen ja sitten hyaluronihappo saostetaan 4 tilavuusosalla 95 %:sta etanolia. Sakka pestään kolme kertaa 75 %:sella etanolilla ja sitten se tyhjökuivataan.

Näin saadun tuotteen (HYALEKTIINI-fraktion) keskimääräinen molekyylipaino on 500.000 - 730.000. Tämä vastaa erittäin puhdasta hyaluronihapon fraktiota, jonka määritetty molekyyliketjun pituus on noin 2.500 - 3.500 sakkaridiyksikköä.

Hyaluronihapon saanto on 0,2 % alkuperäisestä tuoreesta kudoksesta.

Farmaseuttiset valmisteet

Hakemuksen yleisessä osassa annettu selostus on osoittanut, että HYALASTIINI- ja HYALEKTIINI-fraktioit soveltuvat aktiiviteetiltään hyvin farmaseuttisiin sovellutuksiin. Farmaseuttisia valmisteita voidaan valmistaa yhdistämällä keksijöiden löytämät HYALASTIINI- ja HYALEKTIINI-fraktiot tai niiden kalium- tai natriumsuolat farmaseuttisesti sopivien kantoaineiden, laimentimien tai täyteaineiden kanssa ja erilaisina annostuksina valmisteiden käytön mukaan.

Haavan parantamiseksi HYALASTIINI-fraktion valmisteet levitetään vahingoittuneelle ihoalueelle jossakin yllä esitetyssä annostusmuodossa, so. joko voiteena, spraynä, harsotyynyllä, kuivana jauheena tai intradermaalisena injektionä.

Intra-artikulaarista käyttöä varten HYALEKTIINI valmisteet annetaan yleensä kahden ml:n annostusnopeudella /nivel, joka otetaan joko valmistetusta pienpullosta tai esitäytetystä injektioruiskusta, kuten yllä on esitetty.

Hyaluronihapon, etenkin olennaisesti puhtaiden hyalektiini- ja hyalastiini-fraktioiden on todettu olevan tehokas apuaine tai täyteaine käytettäväksi yhdessä erilaisten, oftalmisen soveltuvuuden tai aktiivisuuden omaavien lääkeaineiden kanssa. HA-fraktioita lääkeaineen apuaineena sisältävät farmaseuttiset koostumukset ovat erittäin käyttökelpoisia, koska HA-fraktioilla on hyvä siedettävyyys silmän suhteen ja hyvä yhteensopivuus sarveiskalvon epiteelin kanssa. HA-fraktioiden käyttö saa lisäksi aikaan keinon silmälääkkeiden in vivo biologisen aktiivisuuden parantamiseksi todella. Erityisten hyalektiini- ja hyalastiini-HA-fraktioiden käyttö on lisäksi käyttökelpoista ja tärkeää, koska näillä fraktioilla ei ole ei-toivottuja inflammatorisia sivureaktioita käytettäessä niitä silmässä.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä olennaisesti puhtaan, ei-inflammatorisen hyaluronihappofraktion valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

- uutetaan molekyylipainoiltaan erilaisten hyaluronihappojen seos hyaluronihappoa sisältävästä kudoslähtö-aineesta, ja
- alistetaan saatava seos molekyylisuodatukseen sellaisen hyaluronihappofraktion saamiseksi, jonka keskimääräinen molekyylipaino on n. 50.000 - 100.000, n. 250.000 - 350.000 tai n. 500.000 - 730.000, jolloin mainittu fraktio on olennaisesti vapaa hyaluronihapoista, joiden molekyylipaino on alle 30.000.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hyaluronihapposeos alistetaan molekyylisuodatukseen, jossa käytetään kalvoa, jonka molekyylipainon mukainen ekskluusioraja on 30.000, niiden molekyyliden erottamiseksi, joiden molekyylipaino on yli 30.000, jolloin kalvolle jää ensimmäinen hyaluronihappofraktio, joka on olennaisesti vapaa hyaluronihapoista, joiden molekyylipaino on alle 30.000.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että saatavan ensimmäisen hyaluronihappofraktion keskimääräinen molekyylipaino on 250.000 - 350.000.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että

- ensimmäinen hyaluronihappofraktio alistetaan edelleen molekyyli-ultrasuodatukseen, jossa käytetään kalvoa, jonka molekyylipainon mukainen ekskluusioraja on 200.000, niiden molekyyliden erottamiseksi, joiden molekyylipaino on yli 200.000,
- ultrasuodatusta jatketaan kunnes ultrasuodatukseen alistettavan liuoksen tilavuus on pienentynyt 10 %:iin alkutilavuudesta, ja

- kalvon läpi kulkeva seos kerätään sellaisen toisen hyaluronifraktiotuotteen saamiseksi, jonka keskimääräinen molekyylipaino on 50.000 - 100.000.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kerätään ultrasuodatusvaiheen jälkeen kalvolle jäänyt seos kalvolla, jonka molekyylipainon mukainen ekskluusioraja patenttivaatimuksessa 4 on n. 200.000, jolloin saadaan kolmas hyaluronihappofraktiotuote, jonka keskimääräinen molekyylipaino on 500.000 - 730.000.

6. Jonkin edellisen patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että hyaluronihapposeos saadaan alistamalla lähtökudosaine liuotinuuttoon, esim. asetonilla suoritettavaan liuotinuuttoon.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että saatava hyaluronihapposeos saatetaan sitten entsymaattiseen hajotukseen.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että entsymaattinen hajotus suoritetaan papaiinillä.

9. Menetelmä hyaluronihapposeoksen puhdistamiseksi tulehduksia aiheuttavista aineista, t u n n e t t u siitä, että hyaluronihappoa sisältävä seos alistetaan molekyylisuodatukseen sellaisen hyaluronihappofraktion tuottamiseksi, jonka keskimääräinen molekyylipaino on n. 50.000 - 100.000, n. 250.000 - 350.000 tai n. 500.000 - 730.000, joka on olennaisesti vapaa hyaluronihapoista, joiden molekyylipaino on alle 30.000, ja joka muodostaa olennaisesti puhtaan, ei-inflammatorisen hyaluronihappofraktion.

10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen puhdistusmenetelmä, t u n n e t t u siitä, että hyaluronihapposeos alistetaan molekyylisuodatukseen, jossa käytetään kalvoa, jonka molekyylipainon mukainen ekskluusioraja on 30.000, niiden molekyylien erottamiseksi, joiden molekyylipaino on yli 30.000, jolloin kal-

volle jää ensimmäinen hyaluronihappofraktio, joka on olennaisesti vapaa sellaisista hyaluronihapoista, joiden molekyylipaino on alle 30.000.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen puhdistusmenetelmä, tunnetaan siitä, että ensimmäisen hyaluronihappofraktion keskimääräinen molekyylipaino on 250.000 - 350.000.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen puhdistusmenetelmä, tunnetaan siitä, että ensimmäinen hyaluronihappofraktio alistetaan edelleen molekyyli-ultrasuodatukseen, jossa käytetään kalvoa jonka molekyylipainon mukainen ekskluusioraja on 200.000, niiden molekyyliden erottamiseksi, joiden molekyylipaino on yli 200.000, ultrasuodatusta jatketaan kunnes ultrasuodatukseen alistettavan liuoksen tilavuus on pienentynyt 10 %:iin alkutilavuudesta, ja kalvon läpi kulkeva seos kerätään sellaisen toisen hyaluronifraktiotuotteen saamiseksi, jonka keskimääräinen molekyylipaino on 50.000 - 100.000.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen puhdistusmenetelmä, tunnetaan siitä, että kerätään ultrasuodatusvaiheen jälkeen kalvolle jäänyt seos kalvolla, jonka molekyylipainon mukainen ekskluusioraja patenttivaatimuksessa 4 on n. 200.000, jolloin saadaan kolmas hyaluronihappofraktiotuote, jonka keskimääräinen molekyylipaino on 500.000 - 730.000.

Patentkrav:

1. Förfarande för framställning av en väsentligen ren, icke-inflammatorisk hyaluronsyrafraktion, k ä n n e - t e c k n a t av att

- en blandning av hyaluronsyror med olika molekyelviker extraheras från vävnadsutgångsämne som innehåller hyaluronsyra och
- den erhållna blandningen underkastas molekyelfiltrering för att erhålla en hyaluronsyrafraktion, vars molekylviktsmedelvärde är ca 50.000 - 100.000, ca 250.000 - 350.000 eller ca 500.000 - 730.000, varvid nämnda fraktion är väsentligen fri från hyaluronsyra, vars molekylvikt understiger 30.000.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t av att hyaluronsyrablandningen underkastas molekyelfiltrering med ett membran, vars molekylviktsexklusionsgräns är 30.000 för att avskilja de molekyler vars molekylvikt är över 30.000 och därigenom kvarhålla på membranet en första hyaluronsyrafraktion, som är väsentligen fri från hyaluronsyra, vars molekylvikt understiger 30.000.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, k ä n n e t e c k n a t av att den erhållna första hyaluronsyrafraktionen har ett molekylviktsmedelvärde på 250.000 - 350.000.

4. Förfarande enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a t av att

- den första hyaluronsyrafraktionen underkastas en ytterligare molekyultrafiltrering med ett membran, vars molekylviktsexklusionsgräns är 200.000 för att utesluta molekyler med en molekylvikt över 200.000,
- ultrafiltreringen fortsätts tills volymen av den blandning som underkastas ultrafiltrering är reducerad till 10 % av den ursprungliga volymen, och
- den blandning som passerat genom membranet samlas för att därigenom erhålla en andra hyaluronsyrafraktions-

produkt vars molekylviktsmedelvärde är 50.000 - 100.000.

5. Förfarande enligt patentkrav 4, k ä n n e t e c k n a t av att den blandning som kvarhållits på membranet samlas efter ultrafiltreringssteget med ett membran, vars molekylvikts-exklusionsgräns är ca 200.000 i krav 4, varvid en tredje hyaluronsyrafraktionsprodukt erhålles, vars molekylviktsmedelvärde är 500.000 - 730.000.

6. Förfarande enligt något av de föregående patentkraven, k ä n n e t e c k n a t av att hyaluronsyrablandningen erhålles genom att underkasta utgångsvävnadsmaterialet lösningsmedelsextraktion, till exempel lösningsmedels-extraktion utförd med aceton.

7. Förfarande enligt patentkrav 6, k ä n n e t e c k n a t av att den erhållna hyaluronsyrablandningen underkastas därefter enzymatisk sönderdelning.

8. Förfarande enligt patentkrav 7, k ä n n e t e c k n a t av att den enzymatiska sönderdelningen utförs med papain.

9. Förfarande för rening av en hyaluronsyrablandning från inflammatoriska ämnen, k ä n n e t e c k n a t av att
- en hyaluronsyrablandning underkastas molekylfiltrering för att erhålla en hyaluronsyrafraktion, vars molekylviktsmedelvärde är ca 50.000 - 100.000, ca 250.000 - 350.000 eller ca 500.000 - 730.000, varvid nämnda fraktion är väsentligen fri från hyaluronsyror, vars molekylvikt understiger 30.000, och som bildar en väsentligen icke-inflammatorisk hyaluronsyrafraktion.

10. Reningsförfarande enligt patentkrav 9, k ä n n e t e c k n a t av att hyaluronsyrablandningen underkastas molekylfiltrering med ett membran, vars molekylvikts-exklusionsgräns är 30.000, för att avskilja de molekyler vars molekylvikt är över 30.000 och därigenom kvarhålla på

membranet en första hyaluronsyrafraktion som är väsentligen fri från hyaluronsyra, vars molekylvikt understiger 30.000.

11. Reningsförfarande enligt patentkrav 10, k ä n n e - t e c k n a t av att den erhållna första hyaluronsyrafraktionen har ett molekylviktsmedelvärde på 250.000 - 350.000.

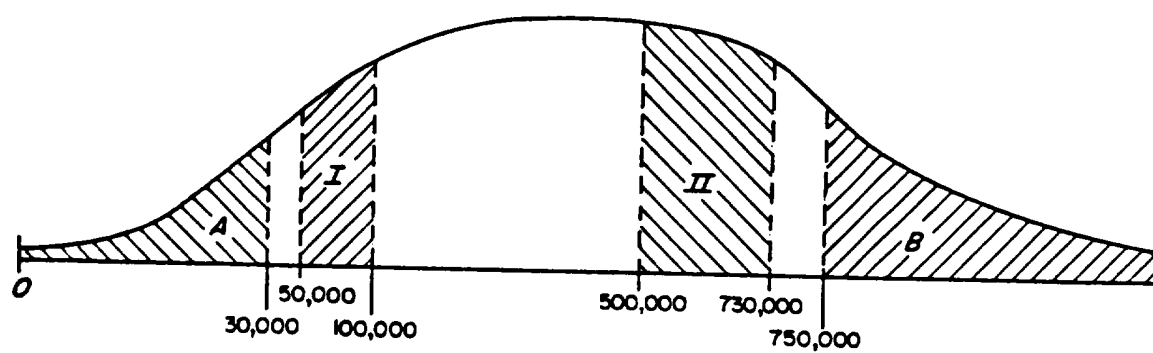
12. Reningsförfarande enligt patentkrav 4, k ä n n e - t e c k n a t av att den första hyaluronsyrafraktionen underkastas en ytterligare molekylultrafiltrering med ett membran, vars molekylviktsexklusionsgräns är 200.000 för att utesluta molekyler med en molekylvikt större än 200.000, ultrafiltreringen fortsätts tills volymen av den blandning som underkastas ultrafiltrering är reducerad till 10 % av den ursprungliga volymen, och den blandning som passerat genom membranet samlas för att därigenom erhålla en andra hyaluronsyrafraktionsprodukt vars molekylviktsmedelvärde är 50.000 - 100.000.

13. Förfarande enligt patentkrav 12, k ä n n e t e c k - n a t av att den blandning som kvarhållits på membranet samlas efter ultrafiltreringssteget med ett membran, vars molekylviktsexklusionsgräns är ca 200.000 i krav 4, varvid en tredje hyaluronsyrafraktionsprodukt erhålles, vars molekylviktsmedelvärde är 500.000 - 730.000.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

-

79554



HYALURONIHAPON KESKIMÄÄRÄINEN
MOLEKYYLIPAINO