



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl.: **A 61 L 24/10**

(21) Patentansøgning nr: **PA 1987 03428**

(22) Indleveringsdag: **1987-07-03**

(24) Løbedag: **1987-07-03**

(41) Alm. tilgængelig: **1988-01-06**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2002-12-09**

(30) Prioritet: **1986-07-05 DE 3622642**

(73) Patenthaver: **Aventis Behring Gesellschaft mit beschränkter Haftung, Postfach 1230, D-35002 Marburg, Tyskland**

(72) Opfinder: **Peter Fuhge, Am Feiselberg 2, D-3551 Lahntal, Tyskland**
Hansjörg Ronneberger, Pappalweg 22, D-3550 Marburg, Tyskland
Norbert Heimburger, Sonnenhang 10, D-3550 Marburg 1, Tyskland

(74) Fuldmægtig: **Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark**

(54) Benævnelse: **Vævsklæber og fremgangsmåde til fremstilling deraf**

(57) Sammendrag:

En vævsklæber indeholder i vandig opløsning fibrinogen, faktor XIII, en thrombininhibitor, prothrombinfaktorer og calciumioner samt eventuelt en plasmininhibitor.

Denne vævsklæber kan ud fra en lyofiliseret form rekonstitueres med vand. Den kan indeholde alle de virksomme stoffer på pasteuriseret form og er derved fri for risiko for en hepatitis- og HTLV III-overførsel.

Opfindelsen angår en vævsklæber, der indeholder fibrinogen, faktor XIII, en thrombininhibitor, prothrombinfaktorer, calciumioner og eventuelt en plasmininhibitor. Vævsklæberen er ejendommelig ved det i krav 1's kendetegnende del angivne, og den kan fremstilles ved en fremgangsmåde, der er ejendommelig ved det i krav 6's kendetegnende del angivne. Ved hjælp af naturligt forekommende acceleratorer på det sår, der skal tilklæbes, frigøres der fra klæberens prothrombin det til klæbningen nødvendige thrombin.

10 Som resultat af de fysiologiske processer ved reparationen af læsioner af menneskeligt eller animalsk væv udfældes der fibrin i det beskadigede område. Dette udløses ved, at der ud fra de beskadigede celler udstrømmer thromboplastin, som ved kontakt med plasmafaktoren VII
15 danner faktor X-aktivatoren, som dernæst sammen med faktor V og i komplekset med phospholipider og calcium omdanner prothrombin til thrombin. Under den derpå følgende virkning af thrombin dannes der ud over fraspaltningen af fibrinopeptiderne A og B fra fibrinogenet fibrinmonomerer,
20 som ved aggregering danner fibrinstrengene, der med faktor XIIIa, en transglutaminase, som ligeledes aktiveres af thrombin, tværbindes covalent under dannelse af isopeptidbindinger. En inhibitor, nemlig α_2 -antiplasminet, bindes af faktor XIII til fibrinstrengene og beskytter disse
25 inden nedbrydningen med plasmin.

Dette forløb af hæmostasen og sårhelingen viser, at der ud over fibrinogenet som substrat kræves to enzymer, nemlig thrombin og faktor XIII.

Det er herved thrombinets opgave at aktivere såvel
30 fibrinogenet som faktor XIII, dvs. at omdanne disse til deres reaktionsdygtige form. Denne er i tilfælde af fibrinogenet fibrinmonomeren og i tilfælde af faktor XII den katalytisk aktive transglutaminase (faktor XIIIa).

Fra EP patentskrift nr. 0.068.047 kendes der en be-
35 riget plasmafraktion, der er egnet som sårlukning og indeholder fibrinogen, en fibrinolyse-inhibitor og thrombin

eller prothrombin i et vandfrit system. Denne klæber kan ikke opløses i vand, men kun påføres i form af et pulver, hvilket er en ulempe ved anvendelsen. Når blandingen opløses i vand, reagerer komponenterne med hverandre, og der dannes 5 et koagel. Ud fra de almene angivelser findes der ingen tilskyndelse til løsning af den her stillede opgave.

Det er til en énkomponent-klæber med vand som opløsningsmiddel vanskeligt at kombinere de virksomme stoffer således og i sådanne mængdeforhold, at der under fremstilling- 10 en af klæberen, rekonstitutionen med et opløsningsmiddel og klarholdelsen til anvendelsen ikke sker nogen utidig og uønsket aktivering, men på den anden side efter påføringen på klæbestedet forholdsvis hurtigt opnås en tilstrækkelig høj styrke.

15 Der er nu på overraskende måde blevet fundet frem til betingelser, der muliggør en reproducerbar fremstilling af en i praksis håndterbar énkomponent-klæber i et fysiologisk miljø.

Forudsætningen for fremstillingen og forarbejdnings- 20 dygtigheden af en sådan énkomponent-klæber er optimalt efter hverandre afstemte koncentrationer af fibrinogen, plasmininhibitor, faktor XIII, prothrombinkoncentrat, thrombininhibitor og calciumioner. Dette gælder i særlig grad for AT III som thrombininhibitor og calciumioner, eftersom cal- 25 ciumionerne er essentielle for aktiveringen af koagulationsfaktorerne. Høje koncentrationer fremmer thrombindannelsen, medens lave koncentrationer forsinker denne. En optimal koncentration af calciumioner er således påkrævet. Da der ved en sådan ikke kan udelukkes en dannelse af thrombin, er kom- 30 binationen med en thrombininhibitor, fortrinsvis AT III, hensigtsmæssig. På den ene side skal der ved fremstillingen af klæberen udelukkes dannelse af thrombin, og på den anden side skal klæberen hurtigt danne et fast koagel, når koagulationen, dvs. udskillelsen af en fibrinfilm, udløses ved kon- 35 takt med såroverflader. Som følge heraf er fremstillingen af en thrombin-holdig énkomponent-klæber og dennes anvendelse

i vandig opløsning ikke tænkkelig, og også prothrombin lader sig kun anvende under betingelser, der hindrer en aktivering til thrombin under fremstillingen og forberedelsen til anvendelsen. Hertil hører indstillingen af bestemte koncentrationer af thrombininhibitor og calciumioner.

Opfindelsen angår således en vævsklæber, der i vandig opløsning indeholder fibrinogen, faktor XIII, en thrombininhibitor, prothrombinfaktorer, calciumioner og eventuelt en plasmininhibitor.

Det er overraskende, at fibrinogen sammen med prothrombin som en såkaldt hyperkoagulabil opløsning, der yderligere indeholder calciumioner og AT III, kan aftappes og anvendes som vævsklæber.

En sådan klæber ifølge opfindelsen kan bringes på en fast form, f.eks. ved lyofilisering eller frysetørring, og rekonstitueres med vand. Den kan indeholde alle virksomme stoffer på pasteuriseret form, og er derefter fri for risiko for en hepatitis- og HTLV III-overførsel.

Blandingsforholdet mellem de virksomme stoffer fibrinogen, plasmininhibitor, faktor XIII, prothrombinfaktorer, calciumioner og AT III er således beskaffet, at der ikke optræder nogen aktivering i utide, men at blandingen ved kontakt med såroverflader spontant koagulerer og udskiller fibrin.

Den tid, i løbet af hvilken dette finder sted, svarer til de kliniske krav. Enkomponent-klæberen ifølge opfindelsen adskiller sig i sin virkning ikke fra tokomponent-systemerne ifølge teknikkens kendte stadi.

De virksomme stoffer er blandet således i denne klæber, at koncentrationen af fibrinogen i anvendelsesopløsningen ligger ved 70-90 mg pr. ml, og at koncentrationen af prothrombinfaktorerne ligger mellem 10 og 30 enheder pr. ml, beregnet på faktor II. Koncentrationen af calciumioner, der i klæberen til dels foreligger bundet til protein, skal i anvendelsesopløsningen ligge ved 0,5-1 mmol pr. liter. Som thrombininhibitor, f.eks. AT III, hirudin eller heparin, anvendes der fortrinsvis AT III i en koncentration på

0,1-1 enhed pr. ml vævsklæber. I denne koncentration hindrer den ved de ovennævnte koncentrationer af prothrombin-faktorer og calciumioner en fibrindannelse i utide. På den anden side kan denne imidlertid begunstiges, når dette på 5 baggrund af indikationen synes ønskværdigt. Til dette formål kan man opløse den lyofiliserede klæber i en højere calciumion-slutkoncentration end 0,5-1 mmol pr. liter. Dette kræver imidlertid en hurtig anvendelse efter rekonstitutionen.

10 Til fremstilling af klæberen fremstilles de virksomme stoffer først i mest mulig aktiv og eventuelt pasteuriseret, opløselig form. Fibrinogenkoncentrationen bør være så høj som muligt, da klæbestyrken tiltager med stigende koncentration. Fibrinogenet kan f.eks. fremstilles ifølge EP patent- 15 skrift nr. 0.103.196 og pasteuriseres og ifølge EP patent-skrift nr. 0.085.923 ved tilsætninger af typen urinstof- eller guanidingruppe-holdig forbindelse bringes på den ønskede opløselighed. Faktor XIII kan pasteuriseres ifølge EP patentskrift nr. 0.018.561 og prothrombinfaktorerne ifølge 20 EP patentskrift nr. 0.056.629.

De virksomme stoffer i den foretrukne klæber ifølge opfindelsen består i princippet af humanfibrinogen i en så høj koncentration som muligt, beriget med faktor XIII og faktorerne fra prothrombinkomplekset (faktor II, 25 VII, IX og X), calciumioner samt antithrombin III. Vævs-klæbestoffet indeholder endvidere en inhibitor, der inhiberer plasminogenaktivatorer og/eller plasmin og dermed beskytter det dannede fibrin mod en nedbrydning med plasmin. Denne inhibitor kan foreligge som ledsagestof for 30 det til klæbningen udvalgte fibrinogen, men sættes imidlertid fortrinsvis til klæberen i form af aprotinin. Til forbedring af vævsklæbestoffets rekonstitution efter lyofilisering kan dette indeholde albumin og/eller stoffer, der indeholder urinstof- eller guanidingruppen, samt eventuelt også en aminosyre med hydrofob sidekæde eller en 35 vandopløselig fedtsyre samt endvidere heparin.

Til fremstillingen af vævsklæbestoffet kommer fortrinsvis rensede fibrinogen i betragtning, som allerede indeholder faktor XIII. Desuden egner sig imidlertid også kryopræcipitat, i hvilket der erfaringsmæssigt foruden faktor XIII også foreligger α_2 -antiplasmin og humanalbumin. Et klæbestof med sammenlignelig virkning kan imidlertid også fremstilles ud fra de enkelte bestanddele ved blanding, nemlig: humanfibrinogen, faktor XIII (ud fra plasma eller placenta), plasmin-inhibitorer, prothrombinfaktorer (faktor II, VII, IX og X), albumin, AT III og calciumioner, en forbindelse med en urinstof- eller guanidingruppe eller en aminosyre med hydrofob sidekæde eller en vandopløselig fedtsyre.

Blandingen af de virksomme stoffer til klæberen foreligger med fordel på fast form, fortrinsvis som lyofilisat.

Vævsklæberen ifølge opfindelsen indeholder følgende mængder eventuelt pasteuriserede virksomme stoffer, beregnet på 1 ml anvendelsesopløsning:

65-115, fortrinsvis 70 - 90 mg humanfibrinogen, 40 - 80 enheder, faktor XIII,
1 - 30 IE PPSB (prothrombinfaktorer), beregnet på faktor II (prothrombin),
0 - 10.000 KIE aprotinin,
0,01 - 50, fortrinsvis 0,1 - 1 IE antithrombin III, og
0,1 - 5, fortrinsvis 0,1 - 1 mmol calciumioner pr. liter, fortrinsvis som calciumchlorid.

Som stabilisatorer og opløsningsformidlere kan klæbereren f.eks. indeholde glutaminat, L-isoleucin, L-arginin eller humanalbumin.

Blandingen af de faste virksomme stoffer i vævsklæbestoffet kan i løbet af kort tid ved 20°C opløses i vand eller et calciumionholdigt opløsningsmiddel. Klæbereren udvikler i løbet af en tilstrækkelig kort tid en høj klæbestyrke, når den anbringes på det væv, der skal bindes

sammen eller klæbes, uden at der som anden komponent kræves thrombin.

Klæberen kan således påføres i flydende form med en enkelt sprøjte, således at tilberedning, håndtering og anvendelse er simpel. Klæberen besidder forenelighed og resorberes fuldstændigt.

Denne énkomponent-klæber adskiller sig hverken med hensyn til klæbetid eller overrivningsstyrke fra en tokomponent-klæber, hvilket har vist sig ved klæbeforsøg med en rottehud-udstansningssår-model og ved klæbning af små tarmanastomoser hos svin. Ved valget af en optimal calcium-ionkoncentration i opløsningen, ved hjælp af hvilken man opløser de lyofiliserede virksomme stoffer, kan man yderligere forøge klæbestyrken.

De følgende eksempler tjener til nærmere belysning af opfindelsen.

Eksempel 1

Til fremstilling af 500 ml vævsklæber opløses 580 g pasteuriseret, højrenset humanfibrinogen, der indeholder to calciumioner pr. mol og er fremstillet ifølge EP patentskrift nr. 0.103.196, i 580 ml puffer med en pH-værdi på 7,5 (dialysepuffer) med følgende sammensætning: 0,05 mol natriumchlorid pr. liter, 0,005 mol tri-natriumcitrat pr. liter og 0,3 g L-arginin-monohydrochlorid pr. 100 ml.

Den således fremstillede fibrinogenopløsning dialyseres to gange i 16 timer og én gang i 8 timer mod hver gang 36 liter puffer af den samme sammensætning ved +4°C.

Rumfanget af fibrinogenopløsningen andrager 1,53 liter efter dialysen. Opløsningen centrifugeres dernæst i 20 minutter ved 8000 G. Opløsningens optiske tæthed, målt ved 280 nm, andrager 47. Denne opløsning fortyndes med den ovennævnte puffer, hvortil de øvrige klæberbestanddele er tilsat, jf. nedenfor, til en optisk tæthed (280 nm) på 35-37, dvs. til ca. 20 g humanfibrinogen pr. liter.

I enkeltheder gås der herved frem på følgende måde:
Den dialyserede og centrifugerede humanfibrinogenopløsning (1,53 liter) filtreres ved 35-37°C i rækkefølge over filtre med porediametre på 0,65 og 0,2 μ . Til den fremkomne
5 sterile fibrinogenopløsning filtreres der 117,5 ml pasteuriseret faktor XIII-koncentrat, indeholdende 350 enheder faktor XIII pr. ml fysiologisk kogsaltopløsning, gennem et filter med en porevidde på 0,2 μ .

Derefter tilsættes der 515.000 KIE (kallikrein-in-
10 hibitorenheder) aprotinin, 5,13 g Na-glutaminat, 33,9 ml af en humanalbuminopløsning indeholdende 20 g pr. 100 ml, 6,78 g isoleucin og 10.000 enheder pasteuriseret PPSB-koncentrat (prothrombinfaktor-koncentrat; aktivitet i enheder beregnet på faktor II), 100 enheder AT III (pasteu-
15 riseret) og 3,1 ml 0,1 molær CaCl₂-opløsning.

Dernæst fyldes rumfanget op til 407,5 ml med dialysepuffer. Denne opløsning filtreres over et filter med en porevidde på 0,2 μ til den faktor XIII-holdige fibrinogenopløsning. Der fås ca. 2055 ml opløsning med en pH-værdi på 7,5 og følgende sammensætning:

	Humanfibrinogen	2,0	g/100 ml
	Humanalbumin	0,33	g/100 ml
25	Arginin	0,3	g/100 ml
	Na-glutaminat	2,5	g/l
	Isoleucin	3,3	g/l
	Faktor XIII	20.000	E/l
	Aprotinin	250.000	KIE/l
30	Prothrombin	5.000	E/l (beregnet som F II)
	Antithrombin III	50	E/l
	NaCl	0,05	mol/l
	Tri-natriumcitrat	0,005	mol/l
	Calciumchlorid	0,15	mmol/l.

Den sterile opløsning fyldes op til 4 ml og lyofiliseres. Der fås et farveløst, hurtigt opløseligt lyofilisat.

Til anvendelse som vævsklæber optages en aftapning 5 i 1 ml af opløsningsmidlet.

Eksempel 2

Til fremstilling af 125 ml vævsklæber opløses 100 g af en pasteuriseret, højrenset humanfibrinogen-fraktion, 10 udvundet ifølge EP patentskrift nr. 0.103.196, i 112 ml dialysepuffer og dialyseres tre gange, hver gang mod 10 liter af den samme puffer som i eksempel 1. Rumfanget af den koncentrerede fibrinogenopløsning andrager efter dialyse 269 ml. Den centrifugeres i 20 minutter 15 ved 8000 G. Opløsningens optiske tæthed ved 280 nm andrager 69,2. Med en puffer, hvis sammensætning svarer dialysepufferen, og hvortil alle andre klæbestanddele er tilblandet, fortyndes opløsningen således, at der opnås en optisk tæthed ved 280 nm på 35-37, beregnet på fi- 20 brinogenet.

Der gås herved frem på følgende måde:

Til 127 ml puffer sættes der 8,2 ml humanalbuminopløsning, der indeholder 20 g humanalbumin pr. 100 ml opløsning, 25 6 ml aprotinin med 125.000 KIE og 50 ml prothrombinkoncentrat, indeholdende 2.500 enheder faktor II samt 25 enheder AT III. Deri opløses 1,65 g L-isoleucin og 1,25 g Na-glutaminat, hvorpå der tilsættes 40 ml faktor XIII-koncentrat, der indeholder 10.000 enheder faktor 30 XIII, hvorefter der blandes homogent, og opløsningens pH-værdi korrigeres til pH = 7,5.

Dernæst blandes denne opløsning homogent med den ovenfor beskrevne fibrinogenopløsning og 0,75 ml af en 0,1 M CaCl₂-opløsning og sterilfiltreres ved 35-37°C

over et filter med en porevidde på 0,2 μ . Der fås ca. 500 ml steril opløsning med en sammensætning som i eksempel 1. Denne opløsning aftappes i mængder på 4 ml og lyofiliseres. Der fås et farveløst, hurtigt opløseligt lyofilisat.

Til anvendelse som vævsklæber optages en aftapning i 1 ml opløsningsmiddel.

P A T E N T K R A V:

1. Vævsklæber indeholdende et fibrinogen, faktor XIII, en thrombininhibitor, prothrombinfaktorer og calcium-
5 ioner samt eventuelt en plasmidinhibitor, k e n d e t e g n e t ved, at den i 1 ml anvendelsesopløsning indeholder
65 - 115 mg humanfibrinogen,
40 - 80 enheder faktoror XIII,
1 - 30 IE PPSB (prothrombinfaktorer), beregnet på faktor II
10 (prothrombin),
0,01 - 50 IE antithrombin III og
0,1 - 5 mmol calciumioner pr. liter og eventuelt
a) 1-10.000 KIE aprotinin
b) 0-20 g Na-glutaminat pr. liter
15 c) 0-20 g isoleucin pr. liter.
2. Vævsklæber ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den er lyofiliseret.
3. Vævsklæber ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at de deri indeholdte virksomme stoffer er pasteuriserede.
20
4. Vævsklæber ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den i opløsning indeholder
70 - 90 mg humanfibrinogen pr. ml,
10 - 30 IE (beregnet på F II) prothrombinfaktorer pr. mol,
25 0,5 - 1 mmol calciumioner pr. mol og
0,1 - 1 IE antithrombin III pr. mol.
5. Vævsklæber ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den i 1 ml opløsning indeholder 1-10.000 KIE aprotinin.
- 30
6. Fremgangsmåde til fremstilling af en vævsklæber ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at man til en eventuelt pasteuriseret og eventuelt sterilfiltreret, vandig, isotonisk opløsning med en pH-værdi på 7,5, der mindst indeholder 16 g humanfibrinogen pr. liter, 2 gram-
35 atomer calcium pr. mol fibrinogen og 1-6 g L-arginin-mono-

hydrochlorid pr. liter, sætter så meget af en eventuelt pasteuriseret opløsning af human-faktor XIII, af human-albumin, af prothrombinkoncentrat, af antithrombin III og af aprotinin samt eventuelt Na-glutaminat og isoleucin, at den lyofiliserede opløsning efter rekonstitution i 1/4 af aftapningsrumfanget indeholder disse stoffer i følgende koncentrationsområder:

65 - 115 mg humanfibrinogen pr. ml,
40 - 80 enheder faktor XIII pr. ml,
10 4 - 40 mg human-albumin pr. ml,
1 - 30 IE PPSB (prothrombinfaktorer), beregnet på faktor II (prothrombin) pr. ml,
0,01 - 50 IE antithrombin III pr. ml
samt eventuelt 1-10.000 KIE aprotinin pr. ml og 0-20 g Na-glutaminat pr. liter og 0-20 g isoleucin pr. liter.

15