

161/97

21785

77606

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

63.326/RAZ

K I V O N A T

Kóros összenövést gátló szer

ASTRA AKTIEBOLAG, SÖDERTÄLJE, SE

A bejelentés napja: 1995.07.13.

Elsőbbsége: 1994.07.19., 9402529-3, SE

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/SE95/00856

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/02258

A találmány tárgya kitozánnak és egy, a heparin, heparán-szulfát és dextrán-szulfát közül választott, ionos vagy kovalens kötéssel rá immobilizált poliszacharidnak a felhasználása olyan ágens előállítására, amely képes megakadályozni vagy lényegesen csökkenteni a sebgyógyulás kapcsán a károsult szövetnek a szomszédos vagy környező szövetekkel való nem kívánatos összenövését.

Az ágens lehet film vagy membrán, tubus vagy tömlő, gél, por, aeroszol vagy oldat formájában.

A kitozán N-acetilezettségi foka legfeljebb körülbelül 90%, előnyösen legfeljebb körülbelül 50% legyen.

A találmány tárgyát képezi még a sebgyógyulás kapcsán a károsult szövetnek a szomszédos vagy környező szövetekkel való nem kívánatos összenövésének megakadályozására vagy lényeges csökkentésére szolgáló eljárás is, amelynél a sebgyógyulás helyére a fenti ágens valamelyik formáját helyezik.

Albisi Annamaria

161/97

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrásy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

21745

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A

63.326/RAZ

Kóros összenövést gátló szer

ASTRA AKTIEBOLAG, SÖDERTÄLJE, SE

Feltalálók:

HANSSON Hans-Arne,	HOVÅS,	SE
JOHANSSON-RUDEN Gunilla,	ASKIM,	SE
LARM Olle,	BROMMA,	SE

A bejelentés napja: 1995.07.13.

Elsőbbsége: 1994.07.19., 9402529-3, SE

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/SE95/00856

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/02258

A találmány tárgyát kóros összenövést gátló új szerek, vagyis olyan termékek képezik, amelyek képesek a sebgyógyulás során meggátolni a szövetek nem kívánt összenövését. A terméknek meg van az a képessége is, hogy javítja a gyógyulás minőségét a szövetek regenerálódásának stimulálásával.

A találmány a szövetek ilyen nem kívánatos összenövésének gátlására szolgáló eljárásra is vonatkozik.

Életünk minősége szempontjából rendkívül fontos, hogy képesek legyünk tetszés szerint és a kívánalmaknak megfelelően szabadon mozogni. Az izom-csontváz (muszkuloszkeletális) rendszer megfelelő funkciója, szoros együttműködésben főleg a bőrrel, nyálkahártyával és az idegi szövetekkel, előfeltétele mozgásképességünknek és önmagától igényli azt, hogy a különböző szerkezetek, így a csontok, izmok és inak egymáshoz képest szabadon tudjanak elmozdulni. Az ilyen ténykedések egymáson csúszó zónákat, minimális súrlódást és maximális elmozdulási szabadságot igényelnek. Az optimális működéshez így szükségesek például a szomszédos izmok és inak közötti, valamint a bőr és a szomszédos szövetek közötti elcsúszó rendszerek. Ugyanez vonatkozik a zsigeri szerkezetekre is, így a gasztrointesztinális csatornára, a szívre, tüdőre, agyra és a gerincagyra. Ezeket az egymáson elcsúszó rendszereket laza kötőszövetek vékony rétegei alkotják, amelyeket a hasban, a mellkas üregében, a szívburok térségében és az agyban és gerincagyban mezoteliális sejtek határolnak. A paratenonok hasonló szerkezetet mutatnak.

Ezek az egymáson elcsúszó rendszerek nagyon érzékenyek a

gyulladásra és sérülésekre. Könnyen képződnek forradásos szövetek, amelyek csökkent működést, sőt a működés hiányát eredményezhetik. Összenövések képződhetnek a hasüregben, vagyis rostok és a szomszédos és környezeti szerkezetek közötti egybeolvadások képződése esetleg bélelzáródást eredményezhet, ami az életet veszélyeztető állapot. A sérüléseket ellátó, daganatokat eltávolító vagy más rendellenességeket kezelő vagy helyreállítást végző sebészi beavatkozások mindig hegek képződésével járnak, és ezáltal a „természetes és eredeti” elcsúszó rendszerek többé-kevésbé kiterjedt károsodását okozák.

A bőr és a nyálkahártya-bevonatok sérüléseinek gyógyulása komplikált folyamat, egyrészt a kötőszövet korlátozott regenerálódóképessége, másrészt éretlen sarjadzó szövetek képződése miatt, amely utóbbiaknak korlátozott a normál szövetekhez hasonló érettség elérése iránti képessége. Így sérülés után a bőr (irharétege) kevés kivétellel sem a fiataloknál, sem a felnőtteknél nem újul meg. Az irha kismértékű és/vagy felszíni sérülései az elvesztett szövetnek a szomszédoshoz hasonló típusú szerkezetek képződésével és reaktív sarjadzó szövet képződésével történő pótlása által gyógyulnak. Kiterjedtebb szövetveszteségek, így a mély égések utáni, harmadfokú termális sérülések és az irha egy részének elvesztése utánia elkerülhetetlenül hegek képződésével, a szövet változó, de maradandó veszteségével és megmaradó deformációkkal gyógyulnak. A hegyszövet mechanikailag ellenálló komponensét nagyrészt rövid rostok és alacsonyabbrendű szerveződések III.

típusú kollagénje alkotja, és ezért a normális I. típusú kollagénhez képest alacsonyabbrendű mechanikai tulajdonságokkal rendelkezik. Az amorf, képlékeny alapanyag frakciója csökkent, akárcsak a szövet cellularitása. A vérerek száma idővel csökkent a normál szövetekéhez képest, és a vérerek eloszlása és típusa megváltozott. Gyakoriak a széles, vékony falú, a megfelelő normális vérerekhez képest gyengébb funkciójú vérerek, amilyenek az abnormális nyirokér-rendszerek. Az egymáson elcsúszó rendszereket így végül is merev, rostos kollagén kötőszövet váltja fel.

Egy további komplikáló, nagyon fontos tényezőt jelent a miofibroblasztok, vagyis az olyan „közönséges” kötőszöveti sejtek (fibroblasztok) megjelenése, amelynek, miként a makrofágok egy részének, megnövekedett számban vannak izomprotein citoplazma-kötegei, amelyek lehetővé teszik a sejtek számára, hogy lassan és erőteljesen összehúzódjanak, és ezt az összehúzódást hosszú ideig megtartsák. Ez olyan zsugorodásokat eredményezhet, amelyek tovább deformálhatják az érintett szövetet, és korlátozhatják annak funkcióit. A miofibroblasztok megnövekedett jelenléte észlelhető például a mellimplantátumok körül [szilikon protézis beültetése mellmegnagyobbítás vagy mellhelyreállítás céljából; részletesebb leírás található C.Lossig és H.A. Hansson cikkében: Plastic Reconstr. Surgery, 91, 1277-1286 (1993)] és sebészeti varratok és egyéb idegen anyagok implantátumai környékén. A miofibroblasztok megnövekedett gyakorisággal elterjedtek bizonyos reumatoid betegségekben az ízületek környékén, és

okozhatják az ujjak elgörbülését és néha kificamodását is. Ez a sejt az a patogén tényező, amely a Dupuytren-kontrakturás betegek kézdeformációit okozza. A miofibroblasztok, valamint a közönséges fibroblasztok a kollagén fonalakhoz specifikus heterodimer receptorok útján kapcsolódnak, amelyek egyik egységét mindig $\beta 1$ -integrin alkotja. Az integrinek blokkolása a zsugorodások megszüntetését eredményezi. A gyulladást csökkentő gyógyszerek befolyásolhatják az integrinek kifejeződését.

A laza kötőszövetben az egymáson elcsúszó rendszerek, jól definiált csúszási felülettel vagy anélkül, így csak a minimális gyulladás eseteiben állnak helyre. A sarjadzó szövet képződése azonban csak valamilyen gyulladásos folyamattal kapcsolatosan fordul elő, amely önmagától eredményezi éretlen sejtek és szöveti komponensek képződését. A helyreállítási folyamat során képzett új szövetnek az arra való képtelensége, hogy megközelítse a normális differenciálódási szinteket, az oka annak, hogy a hegszövet mennyiségileg és minőségileg alacsonyabbrendű az eredeti érett, de elvesztett szövetnél. A regenerált szövet érése azt igényli, hogy hozzájusson azokhoz a növekedési faktorokhoz, amelyek szabályozzák és elősegítik a sejtek, rostok és az alapanyagok differenciálódását.

Széleskörű kutatást fordítottak már annak a problémának a megoldására, hogy hogyan lehet elkerülni a sebek, így a sebészeti vágások, balesetek, gyulladások és daganatok által okozott sebek gyógyulása kapcsán a szövetek nem kívánatos összenövését. A PCT/US/02406 számú szabadalmi iratban leírják az

ezzel a speciális problémával kapcsolatos technológiát, és mellékelik a háttértudomány viszonylag terjedelmes ismertetését is. Az ebben a szabadalmi iratban szereplő technika szendvics-szerkezetek használatán alapszik, amelyek egy biológiaiilag lebontható, biológiaiilag aktív membránt és olyan szemben lévő felületeket tartalmaznak, amelyek eltérő összetételűek, és így eltérő biológiai funkciójúak. Az ennek megfelelő termékek azonban még nem látszanak kereskedelmileg elérhetőnek.

Ennek megfelelően, a találmány egyik tárgya olyan összenövést gátló szer rendelkezésre bocsátása, amelynek használatával csak rövid ideig tartó, minimális gyulladást váltunk ki, amely szer ezenfelül biológiaiilag elfogadható és biológiaiilag lebontható, anélkül, hogy zavaró lebontási termékek keletkeznének.

A találmány egy másik tárgya olyan összenövést gátló szer szolgáltatása, amelynek megvan az a képessége, hogy határfelületeket képezzen, és például sebészi vágások egyszerűbb mechanikai és technikai kezelését eredményezze.

Ismét másik tárgya a találmánynak olyan eljárás rendelkezésre bocsátása, amely megakadályozza vagy lényegesen csökkenti a sebgyógyulással kapcsolatban a szomszédos vagy környezeti szövetek és szervek nem kívánatos összenövését.

Úgyszintén tárgyát képezi a találmánynak a sebgyógyulással kapcsolatban a szövetek regenerálódásának stimulálása.

Ezen és az alábbi közlésekben megvilágított okokból kifolyólag, a találmány által rendelkezésre bocsátjuk a kitozán-

nak és egy rá immobilizált, a heparin, heparán-szulfát és dextrán-szulfát közül választott poliszacharidnak új felhasználását. Ennek az anyagnak a használatával előállíthatunk egy olyan szert, amelynek megvan az a képessége, hogy kiküszöbölje vagy lényegesen csökkentse a sebgyógyulással kapcsolatban a károsult szövetnek a szomszédos vagy környező szövetekkel való nem kívánatos összenövését.

Az alkalmazott poliszacharidot a kitozánra lényegileg három különböző módon immobilizálhatjuk. Így, az immobilizáció megvalósulhat ionos kötéssel, kovalens kötéssel vagy oldatból való kicsapással a kitozánba való mechanikai bezárással. Az illető poliszacharidnak aminocsoportokat tartalmazó szubsztátumhoz való kovalens kötésére szolgáló eljárást ismertetnek az US 4,613,665 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban. Poliszacharidként különösen előnyös heparint vagy heparán-szulfátot alkalmazni, minthogy ezek az anyagok a piacon különböző gyártóktól hozzáférhetők. Természetesen, a poliszacharid részlegesen hidrolizált formái is használhatók, feltéve, hogy megmaradt a biológiai aktivitásuk.

A találmány szerinti, összenövést gátló szer különböző fizikai formákban lehet jelen, így például filmek vagy membránok, gélek, tubusok vagy tömlők, porok, aeroszók vagy oldatok formájában. A megfelelő formát természetesen az illető károsodáshoz igazítjuk. A legtöbb esetben a filmek használhatók, míg a tubusok vagy gélek speciális esetekben használhatók, például megnyúlt, bezárt szöveteknél, így izmoknál is inaknál.

A kitonáz β -D-glükóz-amin egységekből felépülő lineáris, 1,4-kötésű poliszacharid. A kitozánt a kitinnek, az egyebek között a rovarok és kagylók héját alkotó polimerek az N-dezacetilezésével állítják elő. A kereskedelemben kapható kitint a halászati ipar melléktermékét képező rákok és garnélarákok héjából nyerik. A kitinek lúgos kezelésének szabályozásával változó N-acetilezettségi fokú kitozánokat állíthatunk elő. A kitint tömény lúggal, általában nátrium-hidroxiddal kezelve, az N-dezacetilezés végbemegy, vagyis az acetyl-amino-csoportok átalakulnak aminocsoportokká, és kitonáz képződik.

A kitozán felhasználhatóságát befolyásoló fizikai tulajdonságai az N-acetilezettség fokától, a molekulatömegtől és a homogenitástól függenek. A kitozán biológiailag lebontható, mind az emésztőrendszer kitináza, mind a lizozin és a szervezet nedveiben lévő egyéb enzimek által.

A találmányban való felhasználás szempontjából előnyös, ha a kitozán N-acetilezettségi foka legfeljebb körülbelül 90%, előnyösebben legfeljebb körülbelül 50%. Különösen előnyös, ha az N-acetilezettségi fok kisebb körülbelül 25 %-nál.

A találmány eljárást is bocsát rendelkezésre a sebgyógyulással kapcsolatban a szövetek nem kívánatos összenövésének megakadályozására vagy lényeges mértékű csökkentésére. Ez az eljárás abból áll, hogy a sebgyógyulás helyére egy kitozánt és a heparin, heparán-szulfát és dextrin-szulfát közül választott, rá immobilizált poliszacharidot tartalmazó ágenst alkalmazunk.

Az érintett seb jellegétől függően, ezt az ágenst alkal-

mazhatjuk film vagy gél formájában vagy tubus vagy tömlő formájában. Hogy az alkalmazáshoz melyik terméket válasszuk, az könnyen eldönthető például az illető sebészi eljárás alapján.

Az előnyös megvalósítások példái

A találmányt a továbbiakban az oltalmi kört semmiképp sem korlátozó példákkal szemléltetjük. A példákban szereplő valamennyi filmet 54 cm^2 felületi területű Petri-csészékben készítjük.

1. példa:

Kitozánfilm készítése

5 g kitozán-hidroklorid sót (50% acetilezettségi fokú; Pronova) oldunk 0,5 liter desztillált vízben; így 1 tömeg/térfogat %-os oldatot kapunk. A kapott oldat 10 ml-ét Petri-csészébe vesszük, és $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os szárítószekrényben 24 órás bepárlással és szárítással kitozánfilmet képezünk. Az így kapott filmet azután 0,2 M (9,0 pH-jú) nátrium-foszfát-puffer hozzáadásával semlegesítjük. A filmet szobahőmérsékleten 2-4 órán át a Petri-csészében, ebben a pufferben állni hagyjuk, majd vízzel 3-4-szer mossuk, és hagyjuk megszáradni.

2. példa:

Kitozánfilm készítése

5 g kitozán-hidroklorid sót (20% acetilezettségi fokú; Pronova) oldunk 0,5 liter 2 %-os ecetsavoldatban; így 1 tömeg/térfogat %-os oldatot kapunk. Az oldatot autoklávban 125

°C-on, 1 órán át sterilezzük. Lehűlés után Petri-csészében filmet készítünk, ez alkalommal 20 ml oldatot használva. A filmet azután szobahőmérsékleten hagyjuk megszáradni, és 0,2 M (9,0 pH-jú) nátrium-foszfát-puffer hozzáadásával semlegesítjük. A filmet ebben a pufferben, szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd 3-4-szer mossuk desztillált vízzel, és ismét hagyjuk megszáradni.

3. példa:

Heparin salétromsavas lebontása

1 g heparint oldunk 300 ml vízben. Az oldatot jeges vízben 0 °C-ra lehűtjük és hidegen tartjuk. Először 10 mg nátrium-nitritet (NaNO_2 -t) adunk hozzá; majd keverés közben 2 ml ecetsavat adunk az oldathoz. A reakcióelegyet 2 órán keresztül 0 °C-on tartjuk, dializáljuk és liofilizáljuk. Így 0,7 g lebontott heparint kapunk.

4. példa:

Heparin perjodátos oxidációja

Nátrium-perjodáttal oxidált heparin-nátrium oldatot a következő módon készítünk. 1 g nátrium-perjodátot (NaJO_4) oldunk 200 ml desztillált vízben. A nátrium-perjodát-oldathoz 10 g heparin-nátriumot adunk, és egy éjszakán át sötétben keverjük. A keletkező oldatot 10 ml glicerin hozzáadása és 2 órai keverés után vízzel szemben dializáljuk. A vizet óránként cseréljük. Ez perjodáttal oxidált heparint tartalmazó oldatot eredményez, körülbelül 19 mg/ml koncentrációban.

5. példa:**Kovalensen kötött (végpont-kapcsolódású) heparint tartalmazó kitozánfilm készítése**

Az 1. példa szerint készített, semlegesített kitozánfilmhez 20 ml olyan oldatot adunk, amely 4,4 g nátrium-kloridot tartalmazó 0,5 liter vízben oldott, a 3. példában leírtak szerint készített, nitrittel lebontott 125 mg heparint tartalmaz. Az oldathoz 15 mg nátrium-[ciano-trihidrido-borát]-(1-)-et adunk. Az oldat pH-ját 0,5 M sósavoldattal vagy más sav oldatával 3,9-re állítjuk. A kitozánfilmet tartalmazó oldatot szobahőmérsékleten 14 órán át állni hagyjuk, majd a kezelt filmet azután 3-4-szer mossuk vízzel, és hagyjuk megszáradni.

6. példa:**Kovalensen kötött (többpont-kapcsolódású) heparint tartalmazó kitozánfilm készítése**

A 2. példa szerint készített, semlegesített kitozánfilmet 24 órán keresztül állni hagyjuk az alábbi oldat 20 ml-ében:

4,4 g nátrium-kloridot és a 4. példában leírtak szerint készített, perjodáttal oxidált 125 mg heparint oldunk 0,5 liter vízben, és a pH-t 0,5 M sósavoldattal 3,9-re állítjuk. Az oldathoz 15 mg nátrium-[ciano-trihidrido-borát]-(1-)-et adunk, és 10 órán keresztül szobahőmérsékleten tartjuk. Az így kezelt filmet azután vízzel 3-4-szer mossuk, és hagyjuk megszáradni. A heparin kovalens kötési technikájának részleteit illetően hivatkozunk a fent említett US 4,613,665 számú ameri-

kai egyesült államokbeli szabadalmi leírásra.

7. példa:

Ionosan kötött heparint tartalmazó kitozánfilm készítése

Semlegesített kitozánfilmet készítünk a 2. példában leírtak szerint. Hozzáadjuk heparin 4,4 g nátrium-kloridot is tartalmazó 0,5 liter vízzel készült oldatát, majd azzal együtt 3 órán át szobahőmérsékleten tartjuk, és utána a filmet 2 x 0,5 liter vízzel öblítjük és megszárazítjuk.

8. példa:

Biológiai vizsgálat, kontroll

A 2. példa szerint készített filmet az alábbi állatkísérletben a kóros összenövést gátló membránként használjuk.

Egy patkány hasfalát megnyitjuk, és a szagittális vonal mindkét oldalán sebészi úton körülbelül 12 x 10 mm-es sebet ejtünk. Az egyik defektust fedjük egy körülbelül 18 x 15 mm-es, a 2. példa szerint készült filmmel, míg a másik defektust nyitva hagyjuk. A membránt Dexon®7-0-val összevarrjuk oly módon, hogy a varrat ne álljon ki a hasüregben.

Az eredményeket 2 és 4 hét elteltével értékeljük. Ezzel kapcsolatban csekély összenövés észlelhető a membránnal a hasüregben, viszont erős összenövések mutathatók ki, ha a szövetdefektus nincs fedve filmmel.

A film alatti defektus lényegileg hegyszövet képződésével gyógyul, és a film körül gyulladásos reakció és tok képződésének jelei láthatók.

9. példa:**Biológiai vizsgálat, a találmány szerint**

Az alábbi állatkísérletben a 3. példában leírtak szerint készített filmet használjuk a kóros összenövést gátló membránként.

Egy patkány hasfalát megnyitjuk, és a szagittális vonal mindkét oldalán sebészi úton körülbelül 12 x 10 mm-es sebet ejtünk.

Az egyik defektust fedjük egy körülbelül 18 x 15 mm-es filmmel, míg a másik defektust nyitva hagyjuk. A membránt összevarrjuk a 8. példában leírtakkal azonos módon.

A nyitva hagyott sebfelület mutat néhány összenövést, elmentetben a filmmel fedett sebbel, amelynél nagyon kevés összenövés látható, vagy egyáltalán nem látható összenövés.

10. példa:**Ionosan kötött heparint tartalmazó kitozánfilm készítése**

Kitozán-hidroklorid só 5 g-ját (acetilezettségi fok 45%; Pronova) oldjuk 0,5 liter vízben; így 1 tömeg/térfogat %-os oldatot kapunk. Az oldatot sterilizálás céljából autoklávban 1 órán keresztül 125 °C-on tartjuk. Lehűtés után Petri-csészében filmet készítünk, ez esetben az oldat 20 ml-éből. A filmet azután szobahőmérsékleten hagyjuk megszáradni, és 125 mg heparin 0,5 liter vízzel készített oldatát adjuk hozzá, és azzal együtt 3 órán keresztül szobahőmérsékleten tartjuk, majd a filmet 2 x 0,5 liter vízzel öblítjük és megszáritjuk.

11. példa:**Kitozánfilm készítése**

Kitozán-hidroklorid só 5 g-ját (acetilezettségi fok 45%; Pronova) oldjuk 0,5 liter vízben; így 1 tömeg/térfogat %-os oldatot kapunk. Az oldatot sterilizálás céljából autoklávban 1 órán keresztül 125 °C-on tartjuk. Lehűtés után Petri-csészében filmet készítünk, ez esetben az oldat 20 ml-éből. A filmet azután szobahőmérsékleten hagyjuk megszáradni, és a Petri-csészéhez adott 0,2 M (9,0 pH-jú) nátrium-foszfát pufferoldattal semlegesítjük. A filmet szobahőmérsékleten 2-4 órán keresztül ebben a pufferben állni hagyjuk, majd desztillált vízzel 3-4-szer mossuk, és ismét hagyjuk megszáradni.

12. példa:**Biológiai vizsgálat, a találmány szerint**

A fenti 10. példában leírtak szerint készített kitozán-heparin-filmekkel fedjük a fentiek szerint, a parietális hasfalon ejtett 10 x 12 mm-es és 1 mm mélységű sebeket. Egy azonos sebet ejtünk a hasfal kontralaterális oldalán, és fedjük a 11. példában leírtak szerint készített kitozánfilmmel. A kóros összenövések képződésének előfordulását 2 hét elteltével értékeljük ki. A heparin-kitozán-filmmel fedett sebnél nincsenek kóros összenövések, míg a síma kitozánfilmmel fedett seb mutat néhány, csekény fokú összenövést. A heparin-kitozán-filmmel fedett seb fénymikroszkópos vizsgálata a seb jobb gyógyulását mutatja, beleértve a mezoteliális-szerű sejtekkel való borítás mértékét és azt, hogy kevésbé kiter-

jedt a gyulladásos sejteknek a beszűrődése a heparin-kitozán-film és a sebes hasfal szövetei közti érintkezési felületen, mint a síma kitozánfilmmel borított, megfelelő területen.

13. példa:

Kitozán-heparin-filmek készítése

Kitozán-hidroklorid só 5 g-ját (az acetilezettség foka 16%; Pronova) oldjuk 500 ml 2 %-os ecetsavoldatban (így 1 tömeg/térfogat %-os oldatot kapunk). Az oldatot sterilizálás céljából autoklávban 1 órán át 125 °C-on tartjuk. Lehűtés után Petri-csészében filmet készítünk, ez alkalommal az oldat 20 ml-ével. A filmet azután 70 °C-os szárítószekrényben 16 óra alatt száraza pároljuk, majd 0,1 M nátrium-hidroxid oldattal 3 órán keresztül szobahőmérsékleten tartjuk, és utána desztillált vízzel 3-4-szer mossuk, és újból hagyjuk száradni 2 órán át 70 °C-on. Az így kapott filmet azután átvisszük egy Petri-csészébe, és sertés-nyálkahártyából nyert natív heparin (Kabivitrum) 0,2 M (6,4 pH-jú) foszfátpufferrel készített 1 tömeg/térfogat %-os steril oldatának 30 ml-ét adjuk hozzá. A filmet egy éjszakán át szobahőmérsékleten tartjuk, majd steril vízzel öblítjük, és LAF padon megszáritjuk. Négy további filmet is készítünk, azzal a módosítással, hogy azokat 0,5 %-os, 0,1 %-os, 0,01 %-os és 0,00 %-os heparinoldattal kezeljük. A heparinnal kezelt filmekből elemanalízist végzünk, ami azt mutatja, hogy a filmek 1,2%, 0,9%, 1,3%, 0,23% és 0,007% ként tartalmaznak. Ezek az értékek megfelelnek 9,2%, 7,7%, 10,8%, 1,9% és 0% heparintartalomnak, hat csoportba osztott,

tíz biopsziával.

14. példa:

Sebek in vitro készítése

Steril emberi bőrt a mell műtéti eltávolításának (mastectomia) mintáiból nyerünk. Minden egyes kísérletben csak egyetlen donortól származó bőrt használunk. Steril körülmények között biopszia-vágóval (Stiefel Laboratories, UK) 6 mm átmérőjű köröket vágunk ki. Minden egyes darab közepén, az epidermális oldalon, egy részleges sebet ejtünk 3 mm-es biopszia-vágóval, és azután a darabokat átvisszük 12 lyukas Costar-lemezekre, a felfelé fordított epidermális oldallal. Minden egyes lyukat megtöltünk Dulbecco-féle módosított Eagle táptalajjal (Dulbecco's Modified Eagles Medium = DMEM) az epidermális szintig, így a sebet a gáz/folyadék érintkező felületen tartva. 2% borjúmagzat szérumot (Fetal Calf Serum = FCS) és antibiotikumokat (50 µg/ml-es penicillin- és 50 µg/ml-es sztreptomycinoldatot) adunk minden egyes mintához.

15. példa:

A gyógyulás in vitro vizsgálata

A 14. példában leírt in vitro sebeket öt csoportba osztjuk, minden egyes csoportban tíz biopsziával. Minden egyes sebet fedünk a 13. példában leírtak szerint készített, heparinnal kezelt filmmel. A közegeket naponta cseréljük. Hét nap elteltével a darabokat neutrálisan puffertolt 4 %-os formaldehiddel fixáljuk, etanol-xilol sorozaton átvive dehidratáljuk,

és paraffinba ágyazzuk. 10-20 mm vastagságú keresztmetszete-
ket hematoxilinnal és eozinnal festünk meg, és az újbóli hám-
képződés (reepithelisation) fokát fénymikroszkópos vizsgálat-
tal becsüljük meg. Csak a keratinocitákkal teljesen fedett
sebeket tekintjük gyógyultnak.

Miként az 1. ábrából nyilvánvaló, a 2% alatti heparintar-
talmú filmek nem stimulálják a sejtburjánzást.

16. példa:

Gélkészítmények előállítása

Az alábbi négy gélkészítmény előállításánál 0,9% nátrium-
-klorid-tartalmú vizet használunk.

A = 2% metil-cellulóz;

B = 2% metil-cellulóz + 0,2% heparin-nátrium;

C = 0,5% metil-cellulóz + 1% kitozán (16% acetilezettség-
gel);

D = 0,5% metil-cellulóz + 1% kitozán (16% acetilezettség-
gel) + 0,2% heparin-nátrium.

17. példa:

A gyógyulás in vitro vizsgálata

A 14. példában leírtak szerint in vitro készített sebeket
hat csoportba osztjuk, minden egyes csoportban tíz biopsziá-
val. A csoportok közül ötben lévő minden sebet fedünk a 16.
példában leírt gélkészítménnyel. Az utolsó csoportot csupán a
2% FCS-t tartalmazó közeggel kezeljük. A közegeket naponta
cseréljük. Hét nap elteltével a darabokat neutrálisan puffe-

rolt 4 %-os formaldehiddel fixáljuk, etanol-xilol sorozaton átvíve dehidratáljuk, és paraffinba ágyazzuk. 10-20 mm vastagságú keresztmetszeteket hematoxilinnal és eozinnal megfestünk, és az újbóli hámképződés fokát fénymikroszkópos vizsgálattal megbecsüljük. Csak a keratinocitákkal teljesen fedett sebeket tekintjük gyógyultnak.

Miként a 2. ábrából nyilvánvaló, a kitozán és heparin kombinációját tartalmazó gél jobban gyógyítja a sebeket, mint a csak kitozánt vagy csak heparint tartalmazó gélek.

18. példa:

Biológiai vizsgálat, a találmány szerint

A 9. példát megismételjük a 7. példában leírtak szerint készült film használatával.

Miként a fent leírt biológiai kísérletekből világos, a találmány szerinti technikák használata lényegesen jobb gyógyulási körülményeket tesz lehetővé a meggátolt kóros összenövés és a stimulált növekedés tekintetében a találmány nem korlátozódik a fent megadott példákra, és a találmány oltalmi körét csupán a mellékelte igénypontok korlátozzák.

A találmány alkalmazásával kapcsolatban megemlíthetjük, hogy a fentiek szerint készített filmeket, membránokat, géleket vagy porokat, továbbá oldatokat használhatjuk a következő szervekben vagy szerveken és szerkezetekben lévő sebekre és defektusokra: hasfal, mellkasfal, tüdő, szívburok, központi véredények, bélcsatorna, húgy-ivarszervi csatorna, agyhártya, gerincagy, inak, idegek, izmok, csont, nyálkahártya, szaru-

hártya, bőr, stb.

Tubusok vagy tömlők vagy gélek formájában lévő termékek felhasználhatók vezetékként a stimulált növekedésnél és egyidejűleg egymáson csúszó felületeket tarthatunk fenn azáltal, hogy a környezettel való összenövés ki van küszöbölve. Az ilyen termékek felhasználhatók az idegekkel, inakkal, inszlagokkal, a bélcsatornával, a húgy-ivarszervi csatornával, a véredényekkel, stb. kapcsolatban.

A gyógyulás minőségének valószínűleg még jobb stimulálása érhető el a találmánynak növekedési faktorokkal való kombinálásával.

S Z A B A D A L M I I G É N Y P O N T O K

1. Kitozánnak és egy, a heparin, heparán-szulfát és dextrán-szulfát közül választott, rá immobilizált poliszacharidnak a felhasználása olyan ágens előállítására, amely képes megakadályozni vagy lényegesen csökkenteni a sebgyógyulás kapcsán a károsult szövetnek a szomszédos vagy környező szövetekkel való nem kívánatos összenövését.

2. Az 1. igénypont szerinti felhasználás, azzal jellemezve, hogy a poliszacharid a kitozáéhoz ionos kötéssel van immobilizálva.

3. Az 1. igénypont szerinti felhasználás, azzal jellemezve, hogy a poliszacharid a kitozáéhoz kovalens kötéssel van immobilizálva.

4. Az előző igénypontok bármelyike szerinti felhasználás, azzal jellemezve, hogy a poliszacharid heparin vagy heparán-szulfát.

5. Az előző igénypontok bármelyike szerinti felhasználás, azzal jellemezve, hogy az ágens film vagy membrán formájában van.

6. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti felhasználás, azzal jellemezve, hogy az ágens tubus vagy tömlő formájában van.

7. A 6. igénypont szerinti felhasználás, azzal jellemezve, hogy az ágens gél formában van.

8. A 6. igénypont szerinti felhasználás, azzal jellemezve, hogy az ágens por, aeroszol vagy oldat formájában van.

9. Az előző igénypontok bármelyike szerinti felhasználás, azzal jellemezve, hogy a kitozán N-acetilezettségi foka legfeljebb körülbelül 90%, előnyösen legfeljebb körülbelül 50%.

10. Eljárás a sebgyógyulással kapcsolatban a szövetek nem kívánatos összenövésének megakadályozására vagy lényeges csökkentésére, azzal jellemezve, hogy a sebgyógyulás helyére egy kitozánból és a heparin, heparán-szulfát és dextrán-szulfát közül választott, rá immobilizált poliszacharidból álló ágenst helyezünk.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ágenst film vagy membrán formában alkalmazzuk.

12. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ágenst gél formában alkalmazzuk.

13. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ágenst tubus vagy tömlő formájában alkalmazzuk.

14. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az ágenst por, aeroszol vagy oldat formában alkalmazzuk.

A meghatalmazott:



Ráthonyi Zoltán

szabadalmi ügyvivő

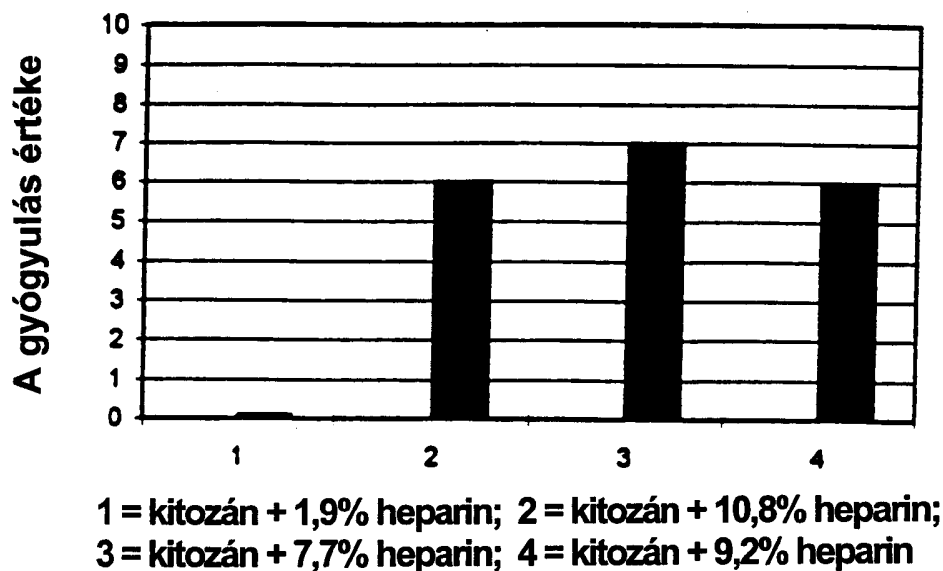
az S.B.G. & K. Nemzetközi

Szabadalmi Iroda tagja

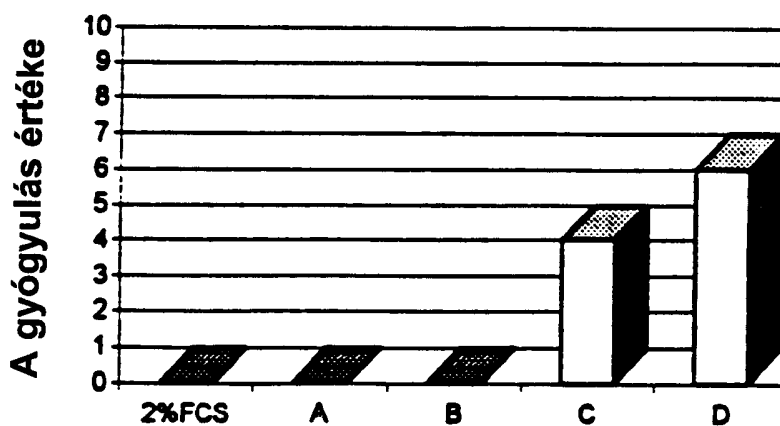
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.

Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

1. ábra



2. ábra



A = 2% metil-cellulóz;
B = 2% metil-cellulóz + 0,2% heparin;
C = 0,5% metil-cellulóz + 1% kitozán;
D = 0,5% metil-cellulóz + 1% kitozán + 0,2% heparin