



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **310334**

(13) B1

(51) Int Cl<sup>7</sup> A 61 K 47/36

### Patentstyret

|                   |            |                                      |                            |
|-------------------|------------|--------------------------------------|----------------------------|
| (21) Søknadsnr    | 19934592   | (86) Int. inng. dag og søknadsnummer | 1992.06.17, PCT/SE92/00441 |
| (22) Inng. dag    | 1993.12.14 | (85) Videreføringsdag                | 1993.12.14                 |
| (24) Løpedag      | 1992.06.17 | (30) Prioritet                       | 1991.06.17, SE, 9101853    |
| (41) Alm. tilgj.  | 1994.02.14 |                                      |                            |
| (45) Meddelt dato | 2001.06.25 |                                      |                            |

|                  |                                               |
|------------------|-----------------------------------------------|
| (71) Patenthaver | Pharmacia & Upjohn AB, S-112 87 Stockholm, SE |
| (72) Oppfinner   | Jonas Wadström, Uppsala, SE                   |
| (74) Fullmektig  | Bergen Patentkontor AS, 5817 Bergen           |

(54) **Benevnelse**                      **Vevsbehandlingsmateriale og preparat bestående av to komponenter som ved blanding danner materialet, samt anvendelser av vevsbehandlingsmaterialet**

(56) **Anførte publikasjoner**    Ingen

(57) **Sammendrag**

Det omtales et vevsbehandlingsmateriale, særlig et adhesivt materiale omfattende (i) fibrin eller fibrinogen og (ii) en bionedbrytbar og biokompatibel polymer som kan danne en viskøs vandig blanding. I tillegg til liming kan vevsadhesivmaterialet anvendes for langsom avgivelse av et medikament som er inkorporert i dette eller for anti-adherensformål, for sårhelning osv.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører et vevsbehandlingsmateriale, særlig et vevsadhesiv som har forbedrede egenskaper.

Oppfinnelsen vedrører også et preparat bestående av  
5 to komponenter som ved blanding danner materialet.

Dessuten vedrører oppfinnelsen anvedelser av vevsbehandlingsmaterialet.

Anvendelse av blodkoagulerende substanser for å stanse blødninger og for å tildekke sår har vært kjent i  
10 lang tid. Således ble den hemostatiske virkning til fibrinpulver rapportert for ca. 80 år siden, og det ble gjort forsøk på å anvende fibrin eller fibrinplaster for å stanse blødninger i hjernen og under generell kirurgi.

I dag har en slik anvendelse av fibrin som et bio-  
15 logisk adhesiv oppnådd bred aksept og funnet anvendelse innen mange kirurgiske felter. Generelt er fibrin-tildekningsmidler basert på de to komponentene fibrinogen og trombin. Når disse komponenter blandes dannes det en fibrinkoagel ved at fibrinogenmolekylet spaltes under inn-  
20 virkning av trombin til dannelsen av fibrinmonomerer som spontant polymeriserer til dannelsen av et tredimensjonalt nettverk av fibrin som stort sett holdes sammen ved hjelp av hydrogenbindinger. Dette tilsvarer den siste fase i den

naturlige blodlevringskaskade, idet koaguleringsshastigheten er avhengig av konsentrasjonen av det anvendte trombin.

For å forbedre strekkfastheten, frembringes det kovalent fornetning mellom fibrinkjeden ved at faktor XIII inkluderes i tildekningsmaterialet. Fibrinlevringens styrke forbedres ytterligere ved tilsats av fibronektin til materialet idet fibronektinet fornettes og bindes til det dannede fibrinnettverk.

For å forhindre en for tidlig nedbrytning av fibrinlevringen som følge av fibrinolyse, kan fibrintildekningsmaterialet omfatte en plasminogenaktivator-inhibitor eller en plasmin-inhibitor, såsom aprotinin. En slik inhibitor vil også nedsette den fibrinolytiske aktivitet som skyldes eventuelle rester av plasminogen i fibrinogenmaterialet.

Tilsvarende kan materialene ifølge oppfinnelsen som omfatter hyaluronsyre (eller andre polysakkarider), også omfatte en hyaluronidaseinhibitor såsom én eller flere flavonoider (eller korresponderende inhibitorer for andre polysakkarider) for å hindre en tidlig nedbrytning (d.v.s. å forlenge varigheten) til hyaluronsyrekomponenten som følge av hyaluronidase som alltid vil være tilstede i det omgivende vev. Hyaluronsyren kan, slik det angis ovenfor være fornett, idet et handelsvanlig tilgjengelig eksempel er Hylan® (varemerke, tilgjengelig fra Biomatix, Ritchfield, N.Y., USA). Hyaluronsyrematerialene kan f.eks. har form av geler, løsninger, osv.

De resultater som kan oppnås ved hjelp av fibrintildekningsmaterialer er hovedsakelig:

(i) Hemostase. Fibrinlevringen fungerer som en hemostatisk barriere og nedsetter faren for serum-, lymfe- og væskelekkasje. Den hemostatiske virkning kan forsterkes dersom fibrintildekningsmaterialet kombineres med et biokompatibelt, fast plant materiale, såsom collagen.

(ii) Klebing. Som følge av dets adhesive egenskaper vil fibrintildekningsmaterialet atraumatisk binde vevene ved at det dannes en sterk forbindelse mellom disse, og

vil tilpasse ujevne såroverflater. Denne heftende virkning økes ved at fibronektin bindes til eksponert collagen.

(iii) Sårhelning. Fibrintildekningsmaterialet fremmer innveksten av fibroblaster som i kombinasjon med effektiv hemostase og adhesjon mellom sårflater gir en forbedret helningsprosess. Sårhelning frembrakt ved hjelp av fibrintildekningsmaterialet resulterer i sterk arrdannelse og forhindrer ikke dannelse av adhesjoner. Anvendelse av materialene ifølge oppfinnelsen som et adheransedempende/sårhelende-materiale fører imidlertid til et normalt vev (regenerativ) heller enn arrvev dvs. en optimal sårhelning. Dessuten vil slike materialer også nedsette betennelsesresponsen slik det fremgår av testresultatene som er angitt i tabell 4 nedenfor.

Anvendelsesområdene innbefatter blant annet, øre- nese- og halskirurgi, generell kirurgi, tannkirurgi, nevrokirurgi, plastisk kirurgi, toraks- og vaskulær kirurgi, abdominal kirurgi, ortopedi, skadekirurgi, gynekologi, urologi, og optalmologi. Fibrintildekningsmidler har også vært anvendt for lokal påføring av medikamenter, såsom antibiotika, vekstfaktorer og cytostatika.

Kommersielle fibrinheftemidler (fremstilt fra humanplasma) er tilgjengelige under handelsnavnene Tissucol, Tisseel og Fibrin-Kleber Humano Immuno (Immuno AG, Wien, Østerrike) såvel som Beriplast (Behringswerke AG, Marburg, Tyskland) (disse handelsnavn er registrerte varemerker i en rekke land). Tisseel<sup>TM</sup> er et to-komponent hjelpemiddel som inneholder en fluid trombinkomponent innbefattende kalsiumklorid og en noe mere viskøs fibrinogenkomponent innbefattende faktor VIII, fibronektin, aprotinin og plasminogen. De to materialer leveres dypfrosset i to separate sprøyter, eller som to lyfiliserte pulvere med korresponderende aprotinin- og kalsiumløsninger som løsningsmidler. Som forklart ovenfor konsolideres fibrintildekningsmaterialet når de to komponenter kombineres som følge av fibrin monomeraggregering. Herdehastigheten av

henger av trombinkonsentrasjonen og varierer fra noen få sekunder (høy trombinkonsentrasjon) til noen få minutter (lav trombinkonsentrasjon).

Imidlertid beror en vesentlig og velkjent ulempe med de kjente preparater på komponentenes vannlignende fluiditet når de anvendes, og dette fører til betydelige håndteringsproblemer med heftemiddelet. Det har vært gjort forsøk på å overvinne dette problem og frembringe blandingen av komponentene ved utvikling av spesielle påføringssystemer såsom en dobbelt-sprøyte applikator (f.eks. den som leveres under handelsnavnet Duploject®, Immuno AG, Wien, Østerrike, og som er omtalt f.eks. i US-patentskrift 4.359.049, eller et spesielt spraysystem som er omtalt i f.eks. EP-patentskrift 156.098). Det grunnleggende problem med et lavviskøst heftemiddel er imidlertid fortsatt tilstede. For det første er en ikke-viskøs eller lav-viskøs lim uegnet for anvendelse på ikke-horisontale overflater siden den vil renne av før herdingen. For det andre er det en avgjort risiko for at et ikke-viskøst eller lav-viskøst heftemiddel kan renne av til områder hvor det uønsket og hvor det kan medføre komplikasjoner. Dette er særlig tilfelle under vaskulærkirurgi siden fluidlimet kan komme i kontakt med innsiden av årene før det herder og følgelig medføre tromboemboliske komplikasjoner. På den andre side kan en øyeblikkelig herdende fibrinlim (omfattende en høy konsentrasjon av trombin), ikke anvendes hvor delene som skal tildekkes krever en etterfølgende tilpasning.

En annen tilnærming er omtalt av blant annet Bass et al i J. Vasc. Surg. 1990, May 11(5):718-25, som det herved skal refereres til. Denne publikasjon omtaler en teknikk som benevnes laser-vevsforening (eller sveising), hvor et laserenergiabsorberende fargestoff (kromofor) og fibrinogen forenes ved hjelp av en laser for å frembringe en sterk anastomose som sies å være blant annet hurtigere

helende enn en konvensjonell suturanastomose. Tilsvarende koagulering- og/eller bindingseffekter kan frembringes med andre proteiner og energikilder.

Det er et formål med den foreliggende oppfinnelse å frembringe en forbedret fibrinlim som ikke gir de ovennevnte lav-viskositetsproblemer, og som kan frembringe sårhelning uten arrdannelse eller utvikling av adhesjoner. Dette formål oppnås ved at det i et fibrinlim-materiale av den ovennevnte type innblandes en viskositetsøkende mengde av en bionedbrytbar og biokompatibel polymer som kan danne en viskøs vandig løsning. Ifølge den foreliggende oppfinnelse har det vist seg at ved å tilsette en slik viskositetsøkende polymer, vil lim-materialet oppnå en viskositet som er adekvat til å frembringe og forbedre håndteringen og påføringen av denne, samtidig som at den ikke på negativ måte vil påvirke fibrinlimets gode egenskaper. For formålene å frembringe sårhelning og adheransedempning kan de adhesive egenskaper imidlertid være mindre uttalt, eller til og med mangle.

Følgelig vedrører den foreliggende oppfinnelse et vevsbehandlingsmateriale som er kjennetegnet ved at det omfatter

- i) fibrin, fibrinogen eller en kombinasjon derav,
- ii) faktor XIII,
- iii) trombin, samt
- iv) et viskositetsøkende polysakkarid eller proteoglykan, som ikke innvirker negativt på levringsprosessen og som foreligger i tilstrekkelig mengde til at det kan dannes en viskøs, vandig løsning.

Preparatet er kjennetegnet ved at den ene komponent omfatter fibrinogen og faktor XII og den andre trombin.

En anvendelse av det foreliggende vevs-adhesiv-materiale innbefatter således et forbedret fibrinlim som ved anvendelsen oppviser viskositetsegenskaper som muliggjør en lettvin og sikker påføring derav på en ønsket lokalisering eller område.

I en annen anvendelsesform omfatter det foreliggende vevsbehandlingsmateriale en terapeutisk substans og omfatter et farmasøytisk materiale for lokal administrering av den terapeutiske substans. Ifølge en spesiell utførelse er den terapeutiske substans selve den viskøse polymer eller et stoff som er bundet til dette slik det skal beskrives mere detaljert nedenfor.

Ifølge enda en annen utførelsesform omfatter det foreliggende vevsbehandlingsmateriale et sårhelnings- og adheransedempende materiale, idet det høymolekylære materiale gir materialet slike adheransehemmende egenskaper at det kan anvendes til å forhindre adheranse til tilstøtende vev under kirurgiske prosedyrer. I forbindelse med slik adheransehemmende anvendelse, benyttes det foreliggende vevsbehandlingsmateriale til sårhelning. Ved f.eks. å lime sårkanter med vevsbehandlingsmaterialet, oppnås det pene arr. Dessuten vil cellulære transplantater, og særlig hudtransplantater heles hurtigere. Dette vil selvsagt være av særlig interesse innenfor plastisk kirurgi.

Det ovennevnte bionedbrytbare og biokompatible polymermateriale som kan danne en vandig løsning kan velges fra et stort antall substanser (innbefattende substanser som vil bli tilgjengelige i fremtiden), og valg av slike kan lettvinnt gjennomføres av en fagkyndig.

En foretrukket gruppe av nevnte bionedbrytbare og biokompatible polymerer, i det etterfølgende ofte referert til som viskositetsøkende polymerer, omfatter høymolekylære polyglykaner eller polysakkarider. Eksempler på slike polysakkarider for oppfinnelsens formål innbefatter eksantan, dekstran, cellulose og proteoglykaner, særlig hyaluronsyre og salter og derivater derav. Som eksempler på cellulosederivater kan nevnes metylcellulose, karboksymetylcellulose (CMC) og hydroksypropylmetylcellulose (HPMC), bare for å nevne noen få av disse. Eksempler på andre viskositetsøkende polymerer enn høymolekylære polysakkarider er gelatin og polyvinylpyrrolidon.

Et foretrukket polysakkharid/polyglykan er hyaluronsyre og salter og derivater derav. Natriumhyaluronat er et lineært polysakkharid med høy molekylvekt bygd opp av repeterende disakkaridenheter. Det forekommer i det ekstra  
5 cellulære rom i alt vev og har den samme enkle kjemiske struktur i alle specis. Følgelig vil påføring av et rensset preparat av hyaluronat kun føre til en midlertidig økning i den lokale konsentrasjon av endogent materiale, og anvendelse av materialet vil ikke gi noen skadelige fysiologiske virkninger. I løsning vil hyaluronatet danne svært  
10 utstrakte tilfeldige spiraler som allerede ved lave konsentrasjoner vikles sammen til et fleksibelt molekylært nettverk som gir hyaluronatløsninger interessante reologiske egenskaper som er anvendelige for det foreliggende  
15 formål.

De viskoelastiske egenskapene til natriumhyaluronat har ført til dets kliniske anvendelse som avstandselement og som et hjelpemiddel under operative prosedyrer innenfor feltet øyekirurgi. Det har også vist seg å være biologisk  
20 aktivt under epitelregenerering av ørets trommehinne og å kunne inhibere innveksten av vaskulære endotelceller. Dessuten spiller det en rolle under sårhelning idet det influerer på migreringen av granulasjonsvevceller og nedsetter omfanget av adhesjoner som dannes etter kirurgien.  
25 Natriumhyaluronat sin biotilgjengelighet er imidlertid i og for seg begrenset som følge av dets hurtige omsetning og korte halveringstid.

Når vevsbehandlingsmaterialet anvendes som et forbedret vevsadhesiv bør andelen av den viskositetsøkende  
30 polymer i den fluide fibrinlim som anvendes, velges slik at det gir en passende viskositet for den tiltenkte anvendelse samtidig som det ikke på skadelig måte får innvirkning på fibrinklumpingen, og vil avhenge av polymeren og det spesielle vevsadhesivmateriale som fremstilles.  
35 Egnede startviskositeter til den ferdige løsningblanding av det totale materiale for hver bestemt anvendelse kan på enkel måte frembringes av en fagkyndig person, men er

generelt innenfor området 500-1.000.000 centipoise (cP),  
fortrinnsvis 1.000-500.000 centipoise. Med betegnelsen  
ferdig løsningblanding slik det anvendes her betyr ikke  
nødvendigvis en homogen tilstand. Derimot kan blandingen,  
5 avhengig av blandedprosedyren, i mange tilfeller ikke oppnå  
en homogen eller uniform tilstand før levringen. Slik det  
er velkjent for en fagkyndig innen dette området, har  
viskositeten sammenheng med konsentrasjonen og begrensende  
til viskositetstallet,  $\eta_0 = (\text{Conc.} \times [\eta])^{3,6}/10$ . Modifisert  
10 etter Morris et al, Carbohydrate polymers, Vol. 1, 1981,  
side 5-21. Fra  $[\eta]$  oppnår en molekylvekten ved å anvende  
Cleland's formel for  $[\eta] = k \times \text{midlere molekylvekt}^{k_1}$ ,  
Cleland et al, Biopolymers, Vol. 9, 1970, sider 799-80.

Som for de tidligere kjente fibrine tildeknings-  
15 materialer kan vevsadhesivmaterialet ifølge den foreligg-  
ende oppfinnelse omfatte ytterligere bestanddeler. Så-  
ledes, i tillegg til tildekningsprotein og viskositetsøk-  
ende polymer, såsom f.eks. høymolekylær polysakkarid, om-  
fatter materialet fortrinnsvis faktor XIII og/eller fibro-  
20 nektin og/eller plasminogen. Fortrinnsvis kan materialet  
også omfatte levringsenzymer, dvs. trombin, særlig i  
kombinasjon med toverdige kalsium såsom kalsiumklorid. Kon-  
sentrasjonen av kalsiumklorid vil da variere, f.eks. mell-  
om 40 mM og 0,2 M avhengig av det spesifikke formål med  
25 vevs-adhesivmaterialet, idet høye konsentrasjoner av  
kalsiumklorid inhiberer fibroblastvekst og følgelig er  
foretrukket for anti-adheranse påføringer (samtidig med  
fravær av fibronektin som stimulerer innveksten av fibro-  
blaster). Det kan videre være verdifullt å inkludere en  
30 fibrinolyseinhibitor, såsom en plasmininhibitor, f.eks.  
aprotinin, aprilotinin, alfa-2-antiplasmin, alfa-2-makro-  
globulin, alfa-1-antitrypsin, epsilon-aminokapronsyre  
eller traneksaminsyre, eller en plasminaktivator inhi-  
bitor, f.eks. PAI-1 eller PAI-2.

35 Mens andelen av de tidligere kjente ingredienser i  
vevsadhesivmaterialet ifølge oppfinnelsen kan velges under  
rettledning fra materialene ifølge den kjente teknikk, kan

den nødvendige mengde av den viskositetsøkende polymer lettvt bestemmes av en fagkyndig innen området avhengig av den bestemte polymer og den tiltenkte bruksform. Dersom således konsentrasjonen og/eller molekylvekten til den viksositetsøkende polymer er for lav, vil viskositets-  
5 økningen være utilstrekkelig, og en for høy konsentrasjon og/eller molekylvekt vil inhibere fibrinpolymeriseringen og adhesjonen til vevet.

Ved å øke trombinkonsentrasjonen kan polymeriser-  
10 ingen av fibronogen speedes opp og som en konsekvens influeres tidsrommet inntil limet herdes. Ved lave trombinkonsentrajoner vil fibrinlim-materialet forbli mer eller mindre fluid i flere minutter etter påføringen. En ytterligere nyttig virkning av å øke viskositeten med en  
15 viskositetsøkende polymer i overensstemmelse med oppfinn-elsen gjelder derfor muligheten til å anvende lavere konsentrasjoner av trombin, noe som er nødvendig i situa-sjoner hvor områder som skal forsegles krever etterfølg-ende tilpasning selv på ikke-horisontale overflater.

20 Vevsbehandlingsmaterialet ifølge den foreliggende oppfinnelse kan være tilstede i de samme typer av prepara-rater som de tidligere kjente fibrin-tildekningsmidler. Ifølge en foretrukket utførelse er vevsadhesivet følgelig et tokomponentspreparat, hvor den ene komponent omfatter  
25 blodlevringsprotein(er) og den andre omfatter trombin og toverdig kalsium såvel som eventuelle tilsatser innbefat-tende fibronolyseinhibitorer. Den viskositetsøkende poly-mer kan innbefattes i den ene eller begge av de to kompo-nenter avhengig av vevsadhesivets tiltenkte anvendelse.

30 Mens den viskositetsøkende polymer, i tilfellet av en fibrinlim, kan innbefattes i det ene eller begge av de to komponenter, er det for andre anvendelser fortrinnsvis assosiert med fibrin- eller fibrinogenmaterialet. Det er selvsagt i det minste teoretisk også mulig å frembringe  
35 den viskositetsøkende polymer som et separat materiale. Materialene kan være frembrakt i dypfrosset løsningsform

eller som lyofiliserte pulvere, for så å fortynnes før anvendelse med egnede vandige løsninger, f.eks. inneholdende aprotinin og kalsiumioner, respektive.

5       Vevsbehandlingsmaterialet ifølge oppfinnelsen kan også anvendes i ulike kombinasjoner som det i og for seg er kjent innenfor dette område. Under henvisning til den ovennevnte tokomponent utførelse kan f.eks. en komponent være frembrakt i et biokompatibelt fast matrisemateriale som en prefabrikkert enhet og det andre (aktiverende)  
10       materiale kan så tilsettes ved brukstidspunktet. Den viskositetsøkende polymer kan frembringes sammen med en av eller begge materialer.

      I en slik utførelse kan vevsadhesivet ifølge oppfinnelsen omfatte et vevskompatibelt flatt matrisemateriale, såsom et ikkevevet stoff, hvori den blodkoagulerende substans, den viskositetsøkende polymer, f.eks.  
15       høy molekylær polysakkarid, og eventuelle tilsatsmaterialer impregneres. Ifølge en variasjon tilsettes den viskositetsøkende polymer sammen med trombinet. Ifølge en annen variasjon impregneres matriksmaterialet med trombinet, og den blodkoagulerende substans tilsettes sammen med den viskositetsøkende polymer ved brukstidspunktet. Et  
20       slikt ikkevevet stoff kan f.eks. omfatte et glykoprotein, såsom collagen (fortrinnsvis porøs), globulin, myoglobulin, kasein eller albumin, gelatin, silkefibroin eller et polysakkarid, såsom cellulose, eller blandinger derav. En slik utførelse er f.eks. særlig egnet for å stanse blødninger og for å tildekke sår. Det skal imidlertid bemerkes at for adheransedempningsformål vil, slik det lettvint vil  
25       forstås, et materiale som collagen som har adhesjonsøkende egenskaper, ikke være egnet, idet f.eks. cellulose er et mere velegnet materiale i denne sammenheng. Et slikt impregnert flatt materiale frembringes fortrinnsvis i lyofilisert form.

35       Ifølge en annen utførelse er vevsbehandlingsmaterialet utformet som en film eller ark for kirurgisk anvend-

else omfattende en ikkefornettet kombinasjon av fibrin og viskositetsøkende polymer.

Vevsbehandlingsmaterialet i følge den foreliggende oppfinnelse kan selvsagt anvendes i alle andre preparater  
5 hvori de tidligere kjente fibrinlimer har vært anvendt, f.eks. som et implanteringsmateriale for bindende brusk og reparasjonsmaterialer for ben-defekter i kombinasjon med embryoniske kondrocytter eller mesenkymale celler såsom beskrevet for et konvensjonelt fibrinlim i f.eks. US-  
10 patenskrift 4.642.120.

Som allerede nevnt ovenfor kan det foreliggende vevsbehandlingsmateriale, f.eks. et av de ovenfor beskrevne utførelser, benyttes for tilførsel av en farmasøytisk aktiv substans. Ved å innblande et medikament, såsom et  
15 antibiotika, en vekstfaktor osv. i vevsadhesivet vil det bli innleiret i fibrinnettverket som dannes under før påføringen av vevsadhesivet. En vil derved sikres at medikamentet holdes på påføringsstedet samtidig som at det på kontrollert måte frigis fra materialet, f.eks. når det  
20 anvendes som okulære dråper, et sårhelningspreparat osv.

Som også nevnt ovenfor kan den farmasøytisk aktive substans som skal frigis fra det foreliggende vevsadhesivet omfatte den viskositetsøkende polymer i seg selv eller en substans bundet dertil.

25 Et spesifikt eksempel på en slik viskositetsøkende polymer som tilfredsstiller viskositetsøkingskravet samtidig som at det har terapeutisk og farmasøytisk anvendelse, og for hvilken det kan være ønskelig å opprettholde biotilgjengeligheten, omfatter hyaluronsyre og salter og  
30 derivater derav som er lettløselige i vann og som tidligere nevnt, har en ekstremt kort biologisk halveringstid. Vevsbehandlingsmaterialet ifølge den foreliggende oppfinnelse omfatter således et foretrukket langsomt avgivbart preparat for proteoglykaner såsom hyaluronsyre og dets  
35 salter og derivater, og øker i betydelig grad dets biotilgjengelighet.

Vevsbehandlingsmaterialet ifølge den foreliggende oppfinnelse kan f.eks. fremstilles og tilpasses for administreringsformer på tilsvarende måte som de tidligere kjente vevsadhesiver.

5 Det skal påpekes at materialene ikke er begrenset til de adhesive egenskaper, idet ikke-adhesive materialer også kan innbefattes, og særlig når materialet primært er tiltenkt for sårhelning. De sistnevnte materialer kan særlig innbefatte ikke-adhesive proteiner såsom albumin og/

10 eller vekstfaktorer. Stort sett ikke-adhesive materialer kan også frembringes når materialets polymerdel inhiberer proteindelens adhesive egenskaper. Det skal i denne forbindelse påpekes at oppfinnelsen innbefatter både adhesive og stort sett ikke-adhesive materialer, selv om det for

15 enkelthet skyld ofte blir henvist til som et adhesiv i denne beskrivelse innbefattende eksemplene.

Oppfinnelsen skal i det etterfølgende beskrives mere detaljert ved hjelp av eksempler. Ved et eksempel utprøves lim-egenskapene til en utførelse av vevsadhesivtmaterialet

20 ved dyreforsøk, idet det henvises til den medfølgende tegning hvor den eneste figur er et skjematisk sideriss av en oppspent åre med tre suturer. Et andre eksempel beskriver fremstillingen av en annen utførelse av vevsadhesivmaterialet. Et tredje eksempel illustrerer anvendelse av

25 vevsadhesivmaterialet som et preparat for kontrollert avgivelse, og et fjerde eksempel viser egenskapene til vevsadhesivmaterialet som et ikke-adhesivt og sårhelningsfremmende middel.

#### Eksempel 1.

30 Dyr.

Det ble anvendt 21 hannrotter av stammen Sprague-Dawley med en kroppsvekt på 230-345 g. Disse ble holdt under vanlige miljøbetingelser med fri tilgang til vann og mat i en uke før forsøkene.

Fremgangsmåte.

Dyrene ble bedøvet med 0,75 mg/100 g kroppsvekt fluanison og 0,024 mg/100 g kroppsvekt fenatyl (Hypnorm®, Janssen, Belgia), i kombinasjon med 0,38 mg/100 g kroppsvekt midazolan, (Dormicum®, Roche AG, Sveits) gitt subkutan-  
5 tant. En ytterligere dose ble gitt etter 30-45 minutter.

Dyrene ble plassert på en oppvarmet vannmadrass (Aquamatic K-20-D, Hamilton, Cincinnati, USA) som var inn-  
10 stilt på 37°C.

Blodårene i låret ble eksponert ved hjelp av et L-formet lyskeinnsnitt, og arterien ble mobilisert fra det inguinale ligament til de epigastriske blodårer. Den dype arterie ble kauterisert med bipolar diatermi. Noen få µl  
15 40 mg/ml (ACO, Sverige) papaverin ble administrert topisk for å løse opp vasospasmer induisert ved det operative traume. To til tre minutter senere ble to separate mikrovaskulære klemmer festet og arterien ble delt med to  
20 snitt. De avskårne blodåre-ender ble forsiktig spilet ut (dilatert) med en mikrodilator og hulrommet ble vasket ut med noen få ml saltløsning. Arterien ble deretter sydd med tre 10.0 nylon suturer (STT) anordnet 120° fra hverandre. Spenningen i blodåren medførte en spalte på 0,2-0,4 mm mellom hver sutur slik det er skjematisk vist på fig. 1,  
25 hvor henvisningstallet 1 betegner blodåren, 2 viser klemmene, 3 viser suturene, og 4 antyder spaltene.

I stedet for å fullføre anastomosen som generelt krever totalt 8-12 suturer, ble spalten mellom stingene forseglet med 0,2 ml fibrin lim påført med et Duploject®  
30 dobbelt sprøytesystem (Immuno AG, Østerrike). Limeprosedyren for anastomosen ble gjennomført tilfeldig (randomized) med en av de tre følgende limpreparater:

I. Original Tisseel® (Immuno AG, Østerrike) hvor den ene sprøyte ("Fibrinogen komponenten") omfattet 75-115  
35 mg/ml fibrinogen, 2-9 mg/ml plasma fibronektin, 10-50 U faktor XIII, 40-120 µl plasminogen og 3000 KIU/ml aprotinin, og hadde en viskositet på ca. 100 cP. Den andre

sprøyte ("Trombin komponenten") inneholdt 500 IU/ml trombin og 40 mM  $\text{CaCl}_2$  og hadde en viskositet på 1,2 cP. Den initielle viskositet til de blandede komponenter (1+1) i de to sprøyter var godt under 100 cP.

5           II. Tisseel®-fibrinogen komponenten ble blandet 1+1 med natriumhyaluronatløsning, 10 mg/ml, med en midlere molekyllvekt på 4.000.000, null skjærviskositet 300.000 cP, oppløst i 0,002 M natriumfosfat, 0,145 M NaCl, pH 7,3 (Healon®, Kabi Pharmacia AB, Sverige), i det tilsatsen av  
10   hyaluronatet således nedsatte sluttkonsentrasjonene av aprotinin og fibrinogen med en halvdel og frembrakte en viskositet på ca. 24.000 cP. Den initielle viskositet av løsningen som frembringes ved blandingen (1+1) av hyaluronat-supplementert fibrinogenkomponent med trombinkomponenten, var ca. 2.000 cP.

15           III. Fibrinogenkomponenten ble fortynnet 1+1 med 0,145 M NaCl, noe som førte til samme sluttkonsentrasjoner av aprotinin og fibrinogen som i preparasjon II.

20           Fem minutter etter limpåføringen ble vaskularklemmene fjernet, i det en begynte med den som var plassert lengst borte. Tilfeldig blødning ble kontrollert ved forsiktig manuelt trykk.

#### Testfremgangsmåte og resultater.

25           Åpenheten ble testet 20 minutter etter fullføringen av anastomosen med Aucland's åpenhetstest (Aucland R.D, Microsurgery Practice Manual, 2. utgave, 1980, Mosby, St. Louis). Huden ble deretter lukket med avbrutte suturer og dyrene fikk våkne fra bedøvelsen.

30           Dyrene ble re-evaluert 24 timer senere i en blindprøvetesting (blind fashion). Dyrene ble bedøvet og anastomosenes åpenhet ble testet som beskrevet ovenfor. Rottene ble deretter avlivet med en overdose av barbiturat og de åpne arteriene ble skåret ut. Overskudd av fibrinlim  
35   ble fjernet og årene og anastomosene ble deretter snittet opp på langs og inspisert fra innsiden. Intravaskulært trombenmateriale ble forsiktig fjernet ved skylling med

saltløsning og gjenværende vegg-adherente fibrinlimavsetninger ble semikvantitativt fastslått i prosent av den innvendige åre-diameter.

5 Virkningene av de tre typene av limpreparater på åpenheten til anastomosene og fibrinlimavsetningene ble evaluert ved å sammenligne gruppe I, II og III med anvendelse av enveis Anova med flertrinnstesting ifølge fremgangsmåten med minst signifikante forskjeller, 20 minutter og 24 timer respektive, etter fullføringen av anastomosene. Alle data er gitt som midlere + SEM. En forskjell på 10 5% nivået ble betraktet som signifikant. Resultatene er oppsummert i tabell 1 nedenfor.

Tabell 1.

|                                                                      | Eksperimentelle grupper          |                             |                              |
|----------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
|                                                                      | I                                | II                          | III                          |
|                                                                      | Original<br>Tisseel <sup>R</sup> | Fortynnet med<br>hyaluronat | Fortynnet med<br>saltløsning |
| 20 <u>Grad åpenhet (%)</u>                                           |                                  |                             |                              |
| 20 min etter<br>inngrep                                              | 35,7±13,3                        | 85,7±9,7                    | 35,7±13,3                    |
| 25 <u>Fibrinmasse inne<br/>i de åpne årer i %<br/>av årediameter</u> |                                  |                             |                              |
| 25 timer etter<br>inngrep                                            | 37,5±11,9                        | 8,0±4,2                     | 47,9±11,1                    |

30

Det fremgår av tabellen at åpenheten 20 minutter etter fullføringen av anastomosen var betydelig høyere ( $p < 0,01$ ) i gruppe II enn i gruppe I og III. Den semikvantitative bestemmelse av mengden av fibrinmasse som ble oppnådd inne i de åpne årer var betydelig lavere i 35 natriumhyaluronatbehandlet fibrinpreparater enn i gruppe I og III.

De åpenhetsgrader som ble oppnådd ved den foreliggende studie er sammenlignbare med de som tidligere er rapportert på mikrovaskulær anastomose utført med et minimalt antall suturer kombinert med ytterligere fibrinlim (50-75%), (se f.eks. Aucland R.D., ovenfor).

Omfanget av åpenhet 20 minutter etter fullføringen av anastomosen var således betydelig høyere i gruppen hvor Tisseel® ble kombinert med natriumhyaluronat. Denne forbedring skyldes en økning i viskositeten av preparatet og ikke en fortynning av fibrin, noe som demonstreres av det faktum at fortynning med saltløsning ikke influerte på åpenhetsomfanget. Denne mekanisme vises ytterligere av det faktum at mindre fibrin nådde innsiden av åren i den natriumhyaluronatbehandlede gruppe.

#### Eksempel 2.

Et fibrinlimmateriale motsvarende materialet II ifølge eksempel 1, men hvor xantan erstattet hyaluronsyre, ble fremstilt ved å blande 1 del (volum) av fibrinogenkomponenten av original Tisseel® (Immuno AG, Østerrike), som hadde samme sammensetning som gitt i eksempel 1, med 1 del (volum) av en 10 mg/ml vandig xantanløsning med en null skjærviskositet på 1.000.000 cP. Den resulterende løsning omfattende Tisseel® og xantan, og med en viskositet på 80.000 cP, ble deretter blandet (1+1) med Tisseel® trombinkomponenten (500 IU/ml, viskositet 1,2 cP). Den etterfølgende fibrinklumping i den resulterende blanding som hadde en initiell viskositet på ca. 6.400 cP, ble fulgt ved hjelp av et reometer ved 37°C. Etter 30 minutter var fasevinkelen ca. 4°C og den elastiske (lagrings) modulus var 1.300 Pa.

For sammenligning ble 1 del (volum) av fibrinogenkomponenten av original Tisseel® blandet med 1 del (volum) saltløsning (0,15 M NaCl). Den resulterende fibrinogenholdige løsning ble blandet med trombinkomponenten

(500 IU/ml) og fibrinklumpingen ble fulgt som ovenfor ved 37°C. Etter 30 minutter var fasevinkelen ca. 2° og den elastiske (lagrings) modulus var 1.800 Pa.

5 Således ble det i begge tilfeller dannet elastiske geler (fasevinkel nær opp til 0°) med tilnærmet samme stivhet (elastisitetensmodul) ved 37°C.

### Eksempel 3.

#### Testprosedyre.

10 1% (10 mg/ml) natriumhyaluronat (NaHA) (Healon®, Kabi Pharmacia, Uppsala, Sverige) ble blandet 1+1 med aprotinin og fibrinogenholdig sprøyte av Tisseel® fibrinlim (Immuno AG, Wien, Østerrike) som beskrevet for limpreparasjonen II ifølge eks. 1. Den andre trombinholdige komponent av fibrinlimet ble tilsatt med Duploject®  
15 applikator (Immuno AG, Wien, Østerrike) som førte til en sluttkonsentrasjon på 0,25% NaHA. 100 mg av det ferdige materiale ble plassert på bunnen av en petriskål. Etter en herdetid på 1 minutt (gruppe A) og 10 minutter (gruppe B)  
20 senere, ble 10 ml 0,145 M NaCl tilsatt. Petriskålene ble deretter plassert i et rystebad med en frekvens på 1 Hz ved 37°C eller i ro i et fuktiggjort vevsdyrkningskammer innstilt på 37°C (gruppene C og D, respektive).

De korresponderende kontroller var 1% NaHA (Healon®)  
25 fortynnet 1+3 med 0,145 M NaCl som førte til de samme sluttkonsentrasjoner av NaHA som i de eksperimentelle grupper (0,25%). Kontrollprøvene ble behandlet på samme måte som de eksperimentelle grupper med rysting (gruppene AC og BC) og uten rysting (gruppene CC og DC). Prøver av  
30 den tilsatte NaCl-løsning ble tatt etter 30 minutter, 60 minutter, 4 timer, 8 timer og 24 timer for analyse av NaHA. NaHA konsentrasjonene i NaCl-løsningen ble bestemt med HA-testen 50 (Kabi Pharmacia AB, Uppsala, Sverige).

Resultater.

I kontrollgruppene var NaCl-løsningene nesten umiddelbart mettet og det var praktisk talt ingen ytterligere økning i NaHA-konsentrasjonen opptil 24 timer, uavhengig om prøvene fikk stå i ro eller ble rystet. I de eksperimentelle grupper skjedde det imidlertid en jevn økning av konsentrasjon av NaHA i NaCl-løsningen. Oppløsningshastigheten var avhengig av om fibrinklumpen fikk herde i 10 minutter før tilsatt av NaCl-løsning, og av om de fikk stå i ro eller ble rystet. Resultatene er oppsummert i den etterfølgende tabell 2.

Tabell 2.

| Tid      | NaHA-konsentrasjon i tilsatt NaCl-løsning (µg/ml) |     |      |     |                  |    |      |    |
|----------|---------------------------------------------------|-----|------|-----|------------------|----|------|----|
|          | Eksperimentell grupper                            |     |      |     | Kontroll-grupper |    |      |    |
|          | Rystet                                            |     | I ro |     | Rystet           |    | I ro |    |
|          | A                                                 | B   | C    | D   | AC               | BC | CC   | DC |
| 30 min.  | 2,4                                               | 0,7 | 1,3  | 0,5 | 23               | 27 | 26   | 27 |
| 24 timer | 21                                                | 25  | 23   | 15  | 33               | 29 | 28   | 36 |

For å uttrykke hvor hurtig NaHA ble oppløst, ble tiden hvormed 30% av sluttmengden av A ble funnet i NaCl-løsningen, beregnet. Resultatene er oppsummert i tabell 3 nedenfor.

Tabell 3.

|    |                                                 |    |      |     |                  |    |      |    |
|----|-------------------------------------------------|----|------|-----|------------------|----|------|----|
| 5  | Tid for oppløsning av 30% NaHA i løsning (min.) |    |      |     |                  |    |      |    |
| 10 | Eksperimentell grupper                          |    |      |     | Kontroll-grupper |    |      |    |
|    | Rystet                                          |    | I ro |     | Rystet           |    | I ro |    |
|    | A                                               | B  | C    | D   | AC               | BC | CC   | DC |
|    | 15                                              | 36 | 336  | 462 | 3                | 3  | 3    | 3  |

15 Resultatene ovenfor viser tydelig at natriumhyalu-  
 ronat oppløses opptil 150 ganger langsommere i en salt-  
 løsning når det inkorporeres i en fibrinlevring. Oppløs-  
 ningshastigheten er meget avhengig av hvor lenge fibrin-  
 limet fikk herde før løsningsmidlet ble tilsatt. Det kan  
 20 forventes at oppløsningshastigheten vil avta ytterligere  
 dersom levringen får anledning til å herde i enda lengre  
 tidsrom siden det vil ta flere timer å fullføre fornet-  
 ningen av fibrinbuntene. Det er videre demonstrert at  
 blandingen av NaHA og fibrin ikke bør være under bevegelse  
 25 dersom en forlengelse av oppløsningshastigheten er ønske-  
 lig.

Eksempel 4.Dyr og testprosedyre.

30 Det ble anvendt 10 hannrotter av stammens Sprague  
 Dawley med en kroppsvekt på 440-480 g. Miljøbetingelsene  
 og anestesian var den samme som beskrevet for eks. 1 oven-  
 for. Et laparotomi ble utført ved hjelp av et midtlinje  
 innsnitt. En titanskive med et sirkulært hull med diameter  
 35 11 mm i midten ble plassert på overflaten av høyre lever-  
 laps fremside. Den serosale overflate av leveren som ble  
 eksponert i hullet av skiven ble forsiktig børstet med en

nylon interdental tannbørste inntil det ble fremkalt en petekial blødning. Et noe større areal av det parietale peritoneum ble traumatisert på samme måte. Lokaliseringen av den traumatiserte parietale overflate ble valgt slik at de to børstede overflater kunne være i direkte kontakt med hverandre. Tidligere studier har vist at faste adhesjoner utvikler seg kun for den lokalisering hvor begge serosale overflater er i direkte kontakt. Fem dyr ble utsatt for enten ingen behandling eller for behandling med en blanding av hyaluronat og fibrinlim som beskrevet for limpreparasjonen II ifølge eks. 1. I det andre tilfellet ble den omskrevne lesjon på leveroverflaten dekket med 0,4 ml hyaluronat og fibrinlim blanding. Hyaluronatet ble tilsatt og blandet 1+1 med innholdene i den fibrinogenholdige sprøyte av Tisseel® (limpreparater II ifølge eks. 1 ovenfor).

Rottene ble holdt på ryggen i 20 minutter etter påføringen av blandingen for å sikre at parietale og viskerale overflater ikke kom i kontakt under herdingen av limet. Abdomenen og huden ble deretter lukket i sjikt med en løpende 4,0 Dexon sutur. Dyrene ble ofret etter 48 dager. Abdomenen ble re-eksponert ved et midtlinje innsnitt og adhesjonene ble evaluert. Forekomst og areal av utviklede adhesjoner ble uttrykt i prosent av opprinnelig serosal skade.

Virkningen av hyaluronat-fibrin limet på utviklingen av vedheft ble evaluert ved hjelp av en uparet "tow-tailed"-t-test. Data er gitt som midlere +SEM. En differanse på 5% nivået ble betraktet som signifikant.

### Resultater.

Alle adhesjoner som ble funnet ble lokalisert mellom leveren og inneroverflaten av den abdominale vegg, lokalisert til det område hvor leveroverflaten var traumatisert med børsten. For alle dyrene, unntatt ett, i kontroll

gruppen forekom det vedheft mens hos ingen av dyrene i den behandlede gruppe utviklet vedheft. Resultatene er presentert i tabell 4 nedenfor.

5 Tabell 4.

|                                           | Kontrollgruppe | Kontrollgruppe |
|-------------------------------------------|----------------|----------------|
| 10 Forekomst av adhesjoner (ant., dyr, %) | 80 ± 20*       | 0 ± 0          |
| Inflammasjonsreaksjoner (0-3)             | 1,2 ± 0,4      | 0,8 ± 0,2      |
| Adherensområde (%)                        | 65 ± 23,8*     | 0 ± 0          |

15 \* signifikant på 5% nivå

Den kombinerte behandling med hyaluronat og fibrin lim hindrer således fullstendig utvikling av adhesjoner, noe som så langt har blitt oppnådd med en av behandlingene  
 20 alene (Lindenberg, S., et al., Acta Chir, Scand. 151-525-527, 1985, og Amiel D., et al., J. Hand. Surg. (Am) 14:837-843, 1989). Mekanismene bak dette funn er uklare. Det faktum at hyaluronat holdes på traumalokaliseringen  
 25 over et lengre tidsrom såvel som den endrete sammensetning av fibrinklumpene synes å optimalisere betingelsene for sårhelning og forhindre dannelsen av arrvev med større omfang.

Dessuten reduserte materialet markert betennelsesreaksjon noe som indikerer at sårhelningen induseres ved  
 30 regenerering heller enn ved dannelse av arrvev og krymping. Det skal forstås at når det refereres til f.eks. polymerer, proteiner, polysakkarider, polyglukaner o.l., så skal oppfinnelsen også innbefatte salter, derivater og andre modifiseringer derav som er funksjonelt ekvivalente  
 35 når det gjelder de heri omtalte egenskaper.

P A T E N T K R A V .

1.      Vevsbehandlingsmateriale,    k a r a k t e r i -  
5    s e r t   v e d    at det omfatter
  - i)    fibrin, fibrinogen eller en kombinasjon derav,
  - ii)   faktor XIII,
  - iii) trombin, samt
  - iv)   et viskositetsøkende polysakkarid eller proteo-  
10   glykan, som ikke innvirker negativt på levringsprosessen  
og som foreligger i tilstrekkelig mengde til at det kan  
dannes en viskøs, vandig løsning.
  
2.      Vevsbehandlingsmateriale i samsvar med krav 1,  
15   k a r a k t e r i s e r t   v e d    at det dessuten  
omfatter toverdig kalsium.
  
3.      Vevsbehandlingsmateriale i samsvar med krav 1 eller  
2,    k a r a k t e r i s e r t   v e d    at det viskøsi-  
20   tetsøkend polysakkarid eller proteoglykan foreligger i  
tilstrekkelig mengde til at en vandig løsning av materi-  
alet har en viskositet på 500-1.000.000 cP.
  
4.      Vevsbehandlingsmateriale i samsvar med krav 1 eller  
25   2,    k a r a k t e r i s e r t   v e d    at det  
viskositetsøkende polysakkarid er hyaluronsyre eller et  
salt eller derivat derav.
  
5.      Vevsbehandlingsmateriale i samsvar med et av kravene  
30   1-4,   k a r a k t e r i s e r t   v e d    at det dessuten  
omfatter minst ett ytterligere materiale valgt blant  
fibronnektin, en plasmininhibitor, en plasminogen-  
inhibitor, og plasminogen.
  
- 35   6.      Vevsbehandlingsmateriale i samsvar med et av kravene  
1-5,   k a r a k t e r i s e r t   v e d    at det dessuten  
omfatter minst én terapeutisk substans.

7.      Vevsbehandlingsmateriale i samsvar med krav 6,  
k a r a k t e r i s e r t   v e d   at den terapautiske  
substans er et sårhelingsfremmende protein.

5

8.      Vevsbehandlingsmateriale i samsvar med krav 7,  
k a r a k t e r i s e r t   v e d   at de sårhelings-  
fremmende proteiner er valgt blant serum proteiner,  
vevsvekstfaktorer, hormoner, kjemostatiskke proteiner og  
10      nutritionelle proteiner.

9.      Vevsbehandlingsmateriale i samsvar med krav 1 eller  
2,    k a r a k t e r i s e r t   v e d   at det er i form  
av en film eller et ark.

15

10.     Preparat bestående av to komponenter som ved  
blanding danner materialet ifølge et kravene 1-9,  
k a r a k t e r i s e r t   v e d   at den ene komponent  
omfatter fibrinogen og faktor XIII og den andre omfatter  
20     trombin.

11.     Preparat i samsvar med krav 10,    k a r a k -  
t e r i s e r t   v e d   at det viskositetsøkende poly-  
sakkarid eller proteoglykan befinner seg i komponenten som  
25     omfatter fibrinogen.

12.     Preparat i samsvar med krav 10 eller 11,  
k a r a k t e r i s e r t   v e d   at det toverdige  
kalsium befinner seg i komponenten som omfatter trombin.

30

13.     Preparat i samsvar med et av kravene 10-12,  
k a r a k t e r i s e r t   v e d   at minst én av  
komponentene blir understøttet av et bioforenelig, fast  
matriksmateriale.

14. Preparat i samsvar med et av kravene 10-13,  
k a r a k t e r i s e r t v e d at komponentene er i  
form av dypfrosset løsning eller lyofilisert pulver.

5

15. Anvendelse av vevsbehandlingsmaterialet ifølge et av  
kravene 1-9 i fremstilling av et medikament for langsom  
lokal administrering av en terapeutisk substans.

10 16. Anvendelse av vevsbehandlingsmaterialet ifølge et av  
kravene 1-9 i fremstilling av et medikament med langsom  
lokal administrering av hyaluronsyre eller et salt eller  
derivat derav.

15 17. Anvendelse av vevsbehandlingsmaterialet ifølge et av  
kravene 1-9 i fremstilling av et medikament som fremmer  
hemostase.

20 18. Anvendelse av vevsbehandlingsmaterialet ifølge et av  
kravene 1-9 i fremstilling av et medikament som fremmer  
vevsadhesjon.

25 19. Anvendelse av vevsbehandlingsmaterialet ifølge et av  
kravene 1-9 i fremstilling av et medikament som fremmer  
vevantiadhesjon.

30 20. Anvendelse av vevsbehandlingsmaterialet ifølge et av  
kravene 1-9 i fremstilling av et medikament som fremmer  
vevsårhelning.

21. Anvendelse av vevsbehandlingsmaterialet ifølge et av  
kravene 1-9 i fremstilling av et medikament for hindring  
av arrdannelse.

35 22. Anvendelse av vevsbehandlingsmaterialet ifølge et av  
kravene 1-9 for belegging av prostetiske materialer.

23. Anvendelse av vevsbehandlingsmaterialet ifølge et av kravene 1-9 som en bærer for celletransplantater.

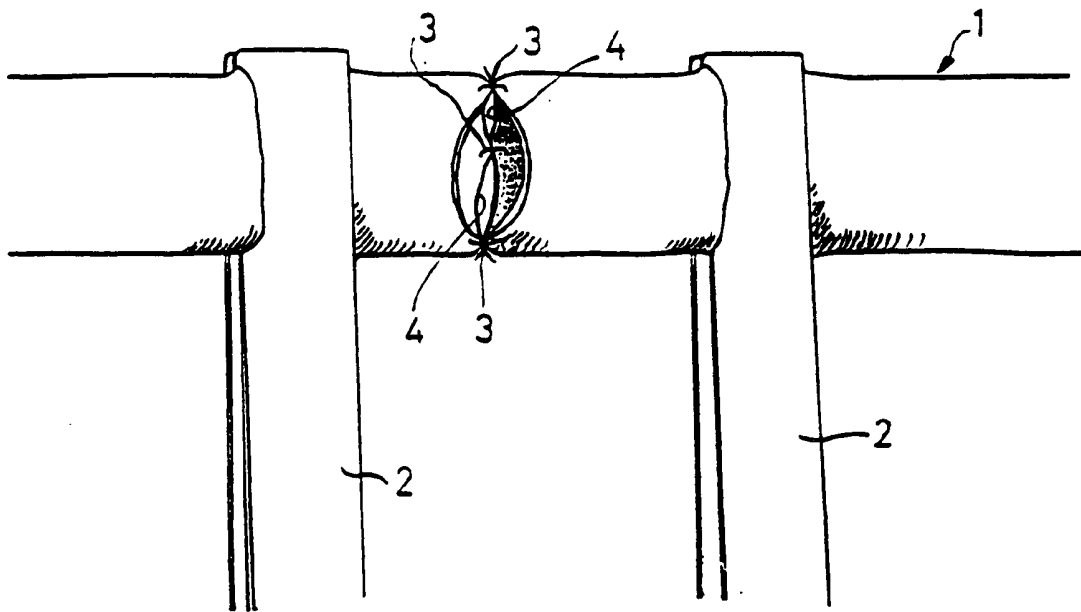


FIG. 1