



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012136648/15, 27.01.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 27.01.2011

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 28.01.2010 US 61/299,127

(43) Дата публикации заявки: 10.03.2014 Бюл. № 7

(45) Опубликовано: 20.07.2015 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: US4427650 A, 24.01.1984. US7196054 B1,
 27.03.2007. UZ 3298 C, 31.03.2007 .

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: 28.08.2012

(86) Заявка РСТ:
 IL 2011/000092 (27.01.2011)

(87) Публикация заявки РСТ:
 WO 2011/092694 (04.08.2011)

Адрес для переписки:
 129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
 ООО "Юридическая фирма Городисский и
 Партнеры"

(72) Автор(ы):

ИЛАН Эрез (IL),
 НУР Израэль (IL),
 РЕГЕВ Кфир (IL)

(73) Патентообладатель(и):

ОМРИКС БИОФАРМАСЬЮТИКАЛС
 ЛТД. (IL)

R U
C 2
C 0
C 9
C 9
C 9
C 2
R U

(54) СПОСОБ ОБЕСПЕЧЕНИЯ УЛУЧШЕННОГО УПЛОТНЕНИЯ С ПОМОЩЬЮ ФИБРИНА

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине. Описана
 фибриновая матрица, описан способ ее получения
 и способ обработки или предотвращения дефекта
 на влажной ткани нуждающегося в обработке
 объекта. Описано использование для

герметичного уплотнения дефекта в слизистой
 оболочке или другой влажной ткани. Фибриновая
 матрица является эффективной для уплотнения
 подтеканий ткани. 6 н. и 29 з.п. ф-лы, 3 ил., 1 табл.,
 3 пр.

R U
2 5 5 6 9 6 0 C 2



(51) Int. Cl.
 A61L 24/00 (2006.01)
 A61L 24/10 (2006.01)
 A61K 38/36 (2006.01)

FEDERAL SERVICE
 FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2012136648/15, 27.01.2011

(24) Effective date for property rights:
 27.01.2011

Priority:

(30) Convention priority:
 28.01.2010 US 61/299,127

(43) Application published: 10.03.2014 Bull. № 7

(45) Date of publication: 20.07.2015 Bull. № 20

(85) Commencement of national phase: 28.08.2012

(86) PCT application:
 IL 2011/000092 (27.01.2011)

(87) PCT publication:
 WO 2011/092694 (04.08.2011)

Mail address:

129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
 OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

ILAN Ehrez (IL),
 NUR Izraehl' (IL),
 REGEV Kfir (IL)

(73) Proprietor(s):

OMRIKS BIOFARMAS'JUTIKALS LTD. (IL)

R U 2 5 5 6 9 6 0 C 2

(54) METHOD OF PROVIDING IMPROVED SEALING BY MEANS OF FIBRIN

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine.

Described are: fibrin matrix, method of its obtaining and method of processing or prevention of defect on wet tissue of object requiring processing. Described is

application for hermetic sealing of defect in mucous membrane or other wet tissue.

EFFECT: fibrin matrix is efficient for sealing tissue leakages.

35 cl, 3 dwg, 1 tbl, 3 ex

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к фибриновой матрице с улучшенными уплотняющими свойствами, ее получению и использованию.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 Фибриновый уплотнитель, как правило, представляет собой продукт крови, получаемый как из промышленных источников, так и из некоторых региональных центров переливания крови. К числу компонентов, обычно используемых для получения фибриновых уплотнителей, относятся, главным образом, фибриноген, дополненный различным количеством фактора VIII, фактора XIII, фибронектина, витронектина и 10 фактора фон Виллебранда (vWF). Фибриногенный компонент, как правило, активируется последней протеазой коагулирующего каскада - тромбином.

Фибриновый уплотнитель образуется в результате ферментативной реакции, включающей среди прочего фибриноген, тромбин и фактор XIII. Тромбин преобразует 15 фибриноген в фибрин путем ферментативного действия при скорости, обусловленной концентрацией тромбина. Фактор XIII, как правило, присутствует в фибриногенном компоненте уплотнителя и представляет собой фермент системы коагуляции крови, поперечно связывающий и стабилизирующий фибриновый сгусток. Этот процесс минует большинство этапов нормальной коагуляции и имитирует ее последнюю фазу. 20 Некоторые производители добавляют антипротеолитические вещества в состав фибринового уплотнителя (см. патент WO 93/05822) или специально удаляют плазминоген с целью остановить или отсрочить фибринолиз (см. патенты США №№ 5792835 и 7125569).

В патенте США № 4427650 раскрывается тканевый адгезив, который можно наносить 25 в виде сухой порошкообразной смеси сразу и непосредственно на рану или на операционное поле. Адгезив состоит из твердых порошкообразных биологически активных компонентов и содержит от 60 до 96% вес. фибриногена, выделенного преимущественно из крионерастворимого глобулина, от 0,05 до 5% вес. ингибитора фибринолиза и от 0,1 до 15% вес. тромбина и (или) протромбина.

30 В патенте США № 5962405 раскрывается лиофилизированный фибриногенный препарат для получения фибриногенного раствора, используемого в качестве тканевого адгезива. Фибриногенный препарат содержит вещество, улучшающее растворимость.

Некоторое время назад стало известно, что фибриновый уплотнитель можно 35 накладывать на раны, такие как открытые раны человека, с целью их закрытия, остановки кровотечения и предотвращения попадания в рану других веществ, таких как инфекционные вещества.

Сообщалось о результатах применения фибринового уплотнителя для уплотнения дефектов в тканях, находящихся в постоянном движении, например тканях желудочно-кишечного тракта и легких. Однако в этих сообщениях присутствуют расхождения.

40 Один описанный подход к сокращению послеоперационных дефектов, таких как подтекания по линии скобочного или ниточного (скобочного/ниточного) шва после желудочно-кишечной резекции, подразумевает усиление скобочного/ниточного шва. В продаже имеются различные продукты для усиления скобочного/ниточного шва. Например, врачи применяют неабсорбируемые или полуабсорбируемые продукты для 45 усиления скобочного шва, такие как Seamguard®, Peristrips Dry® и Surgisis®. Однако в ранних экспериментальных и клинических исследованиях абсорбируемый материал для усиления скобочного шва продемонстрировал существенные преимущества по сравнению с неабсорбируемым или полуабсорбируемым материалом для усиления

скобочного шва (Yo et al. «Buttressing of the staple line in gastrointestinal anastomoses: overview of new technology designed to reduce perioperative complications». *Dig Surg.* 2006; 23:283-291). Недавние сообщения об использовании фибрина в качестве абсорбируемого

5 усилителя скобочного шва для предотвращения послеоперационных подтеканий в области желудочно-кишечного тракта (Fullum et al. «Decreasing anastomotic and staple line leaks after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass». *Surg Endosc.* 2009; 23:1403-1408; Efthimiou et al. «Fibrin sealant associated with increased body temperature and leukocytosis after laparoscopic gastric bypass». *Surg Obes Relat Dis.* 17 марта 2009 г.) позволяют предположить,

10 что существующие композиции фибриновых уплотнителей непригодны для усиления скобочных/ниточных швов.

В патенте США № 5690675 раскрывается способ закрытия ран в легочной ткани посредством двухэтапного способа, по существу состоящего из наложения скрепляющих элементов (например, скоб, клипс, штифтов, крючков) на окораневую область, где скрепляющие элементы могут образовывать проникающие отверстия. Скрепляющие 15 элементы покрыты предварительно сформированным слоем коллагена, фибрина, фибриногена, эластина, альбумина или их комбинацией, и под воздействием на данную область энергии материал вплавляется в ткань и герметично уплотняет проникающие отверстия в ткани.

В патенте США № 5883078 раскрывается стабильный тканевый адгезив, содержащий 20 фибриноген и активатор или проактиватор протромбина. Адгезив может быть представлен в жидкой или сухой форме. В одном варианте осуществления твердый 2-сторонний тканевый адгезив получают путем наложения сухого адгезива в твердой форме на раневую поверхность и последующей обработки второй раневой поверхности (второй части ткани) и кратковременного сжимания двух частей вместе. Препарат 25 быстро растворяется при помощи присутствующей крови и (или) раневого секрета и затем отвердевает с началом коагуляции, при этом достигается плотное соединение и гемостатический эффект. Твердый 2-сторонний тканевый адгезив особенно подходит для соединения частей мягких тканей, таких как печень или селезенка.

Lillemoe et al. [(2004) *J Gastrointest Surg.*, том 8, № 7, стр. 766-774 в статье под названием 30 «Does Fibrin Glue Sealant Decrease the Rate of Pancreatic Fistula After Pancreaticoduodenectomy? Results of a Prospective Randomized Trial»] показали, что местное нанесение фибринового клея-уплотнителя на поверхность панкреатического анастомоза не способствовало снижению частоты возникновения свища поджелудочной железы или общих осложнений у пациентов после панкреатикодуоденэктомии, и пришли к заключению, что применение 35 этого вещества в данном случае не приносит пользы.

Другое исследование («The sealing effect of fibrin glue against alveolar air leakage evaluated up to 48h; comparison between different methods of application» Kawamura et al. (2005 г.) *Eur J of Cardiothorac Surg.* 28(1):39-42) раскрывает уплотняющее действие фибринового клея против утечки альвеолярного воздуха на примере животной модели и оценивает 40 различные способы применения. Использовали раствор А, состоящий из протеинового концентрата, содержащего фибриноген, и раствор В, содержащий тромбин. В рамках способа нанесения растиранием и распылением раствора А наносили по каплям и осторожно растирали на поверхности области утечки воздуха. Затем оба раствора одновременно распыляли в виде смешанного аэрозоля. В рамках другого способа 45 получали двойной слой путем нанесения по каплям раствора А на поверхность области утечки воздуха, после чего по каплям наносили раствор В. В рамках другого способа на животных моделях (собаки) использовали коллагеновую матрицу, с одной стороны покрытую сухим фибриногеном и тромбином (TachoComb), и проверяли результаты

по истечении 24 часов. По словам авторов, уплотняющий эффект фибринового клея остается относительно нестабильным в течение периода до 12 часов после нанесения. Кроме того, авторы пришли к выводу, что способ нанесения растиранием и распылением может способствовать повышению скорости достижения фибриновым уплотнителем 5 своей полной силы по сравнению с другими двумя способами.

Другое исследование, проведенное Yo et al. (2006 г.) (Dig Surg 23: 283-291), раскрывает попытки уменьшить осложнения анастомоза, такие как кровотечение или подтекание по линии скобочного шва, при выполнении желудочно-кишечных резекций. Yo отмечает, что у животной модели крысы при толстокишечном анастомозе применение

10 фибринового клея для уплотнения и предотвращения подтекания не представляется целесообразным. В работе раскрывается, что при резекции желудка применение фибринового клея для поддержки и уплотнения скобочного шва представляется более успешным.

В патенте США № 7196054 раскрывается способ обработки поврежденной ткани у 15 пациента, включающий нанесение на поврежденную ткань композиции в форме сухого порошка, содержащего фибриноген в количестве, достаточном для формирования фибриновой матрицы в присутствии тромбина, фактора XIII, Ca^{2+} и водного раствора; введение в композицию тромбина, фактора XIII, Ca^{2+} и водного раствора в количествах, 20 достаточных для формирования фибриновой матрицы в присутствии фибриногена.

Fullum et al. (2009 г.) раскрывает, что несостоятельность анастомоза и подтекания по линии скобочного шва (ASL) появляются после лапароскопического шунтирования желудка с гастроэзоноанастомозом по Ру (LRYGB) у пациентов, страдающих ожирением. Фибриновый уплотнитель наносили вдоль линии скобочного шва на желудке. Авторы 25 пришли к выводу, что оперативная техника, включая подходящий размер скоб, усиление скобочного шва, сшивание разреза вручную, фиксирующий шов, испытание на протекание, проводимое во время операции, и фибриновые уплотнители, стала инструментом для снижения частоты возникновения ASL после LRYGB. Авторам не удалось установить, какой из компонентов сыграл основную роль в предотвращении 30 ASL.

В отличие от этого Efthimiou et al. (2009 г.) раскрывает, что использование фибринового уплотнителя не повлияло на степень несостоятельности анастомоза и подтеканий по линии скобочного шва при LRYGB.

Существует неудовлетворенная потребность в усовершенствованном составе 35 фибринового уплотнителя для уплотнения дефектов в тканях, находящихся в постоянном движении, например тканях желудочно-кишечного тракта и легких.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящее время фибриновые уплотнители применяют в основном для гемостаза; это действие может быть усилено аутогенными факторами свертывания крови, например 40 фибриногеном, присутствующим в крови, покрывающей раневую область.

Фибриновый уплотнитель применяется также для уплотнения ткани при подтекании, например при утечке воздуха и (или) текучей среды, например мочи, пищеварительной 45 жидкости, серозной жидкости. Обычно при наличии в тканях таких подтеканий аутогенные факторы свертывания крови отсутствуют. Большинство уплотнителей, включая синтетические уплотнители, не эффективны для уплотнения подтеканий в тканях. Без привязки к механизму воздух/жидкость может выступать в качестве барьера между уплотнителем и тканью и, таким образом, препятствует непосредственному контакту между уплотнителем и тканью.

Как правило, хирурги часто максимально высушивают раневую подтекающую

поврежденную ткань перед нанесением уплотнителя. Обычно высушивание выполняется вручную при помощи губки/марли и газового спрея (Hidas et al. «Sutureless nephron-sparing surgery: use of albumin glutaraldehyde tissue adhesive (BioGlue)». *Urology*, 2006; 67: 697-700). Эти процедуры по высушиванию повышают риск слипания ткани (Kamel RM.

5 «Prevention of postoperative peritoneal adhesions». *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2010; 150(2):111-118).

Кроме того, эти процедуры по высушиванию также проблематично выполнить на недоступных для хирурга участках, например при выполнении лапароскопических операций.

10 Настоящее изобретение предлагает фибриновую матрицу, эффективную для уплотнения подтеканий ткани.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу нанесения фибриновой матрицы на влажную ткань, включающему: нанесение эффективного количества твердой фибриновой уплотнительной смеси на влажную ткань; и нанесение эффективного

15 количества жидкой фибриновой уплотнительной композиции поверх по меньшей мере части нанесенной твердой фибриновой уплотнительной смеси, причем эффективные количества твердой фибриновой уплотнительной смеси и жидкой фибриновой уплотнительной композиции достаточны для формирования фибриновой матрицы на влажной ткани, обладающей более высокой уплотняющей способностью, связанной с

20 нанесением эффективного количества либо жидкой фибриновой уплотнительной композиции, либо твердой фибриновой уплотнительной смеси.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения уплотняющая способность возрастает по меньшей мере в 1,2 раза по отношению к нанесению жидкой фибриновой уплотнительной композиции.

25 В другом варианте осуществления настоящего изобретения уплотняющая способность возрастает приблизительно в 1,7 раза по отношению к нанесению жидкой фибриновой уплотнительной композиции.

В другом дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения нанесение осуществляется на ткань, которая является необогащенной, имеет небольшое

30 количество, недостаточное количество или не имеет кровеносных сосудов, и (или) на ткани, медленно выделяющие текучую среду или некровоточащие.

35 В одном варианте осуществления настоящего изобретения твердая фибриновая уплотнительная смесь содержит твердый компонент, содержащий фибриноген, и твердый компонент, содержащий протеолитический ферментный компонент, способный образовывать фибрин при взаимодействии с фибриногеном.

В другом дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения компонент твердой фибриновой уплотнительной смеси, содержащий фибриноген, готовят на стадии высушивания фибриноген-содержащего раствора с концентрацией фибриногена менее 25 мг/мл.

40 В одном варианте осуществления настоящего изобретения концентрация фибриногена составляет приблизительно 20 мг/мл.

Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения протеолитический фермент представляет собой тромбин.

45 В другом дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения нанесение осуществляется на тканевый дефект.

Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения нанесение осуществляется по меньшей мере на часть скобочного или ниточного шва на ткани.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения фибриновой

матрицы на влажной поверхности, включающему следующие стадии: предоставление твердого компонента, содержащего фибриноген; предоставление твердого компонента, содержащего протеолитический фермент, способный к образованию фибрина при взаимодействии с фибриногеном; предоставление жидкой фибриновой уплотнительной композиции; нанесение эффективного количества твердых компонентов по меньшей мере на часть влажной поверхности; и нанесение эффективного количества жидкой фибриновой уплотнительной композиции поверх по меньшей мере части нанесенных твердых компонентов.

5 В одном варианте осуществления настоящего изобретения влажная поверхность не 10 содержит фибриногена.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения жидкую фибриновую уплотнительную композицию предоставляют в твердой форме и восстанавливают перед нанесением.

15 В другом дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения жидкую фибриновую уплотнительную композицию предоставляют в замороженном виде и размораживают перед нанесением.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения твердый компонент 20 предоставляют в жидкой форме и высушивают перед нанесением.

Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения твердый компонент 25 предоставляют в замороженном виде и высушивают перед нанесением.

В другом дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения твердые компоненты наносят одновременно или один за другим.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения жидкие компоненты 30 наносят одновременно или один за другим.

25 В другом дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения твердые компоненты представлены в виде смеси.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения поверхность представляет собой ткань.

30 В одном варианте осуществления настоящего изобретения ткань является необогащенной, имеет небольшое количество, недостаточное количество или не имеет кровеносных сосудов и (или) медленно выделяет текучую среду или не кровоточит.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фибриновой матрице, получаемой в соответствии с настоящим изобретением.

35 Еще в одном аспекте настоящее изобретение предлагает способ обработки или предотвращения дефекта на влажной ткани нуждающегося в обработке объекта, включающий следующие стадии:

40 а) предоставление компонента, содержащего твердый фибриноген, предоставление компонента, содержащего твердый протеолитический фермент, способный к образованию фибрина при взаимодействии с фибриногеном; и предоставление жидкой фибриновой уплотнительной композиции;

б) нанесение эффективного количества твердых компонентов из п. а) по меньшей мере на часть влажной поверхности; и

с) нанесение эффективного количества жидкой фибриновой уплотнительной композиции из п. а) поверх по меньшей мере части нанесенных твердых компонентов.

45 В одном варианте осуществления настоящего изобретения влажная ткань является необогащенной, имеет небольшое количество, недостаточное количество или не имеет кровеносных сосудов и (или) медленно выделяет текучую среду или не кровоточит.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения дефект представляет

собой подтекание в ткани.

В другом дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения просачивающееся вещество является необогащенным, имеет небольшое количество, недостаточное количество или не имеет плазмы или компонентов крови.

5 В одном варианте осуществления настоящего изобретения жидкую фибриновую уплотнительную композицию предоставляют в твердой форме и восстанавливают перед нанесением.

10 В другом дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения жидкую фибриновую уплотнительную композицию предоставляют в замороженном виде и размораживают перед нанесением.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения твердый компонент предоставляют в жидкой форме и высушивают перед нанесением.

Еще в одном варианте осуществления настоящего изобретения твердый компонент предоставляют в замороженном виде и высушивают перед нанесением.

15 В другом дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения твердые компоненты наносят одновременно или один за другим.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения жидкие компоненты наносят одновременно или один за другим.

20 В другом варианте осуществления настоящего изобретения твердые компоненты из п. а) представлены в виде смеси.

В другом дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения дефект представляет собой скобу или нить.

25 В одном аспекте настояще изобретение предлагает набор, содержащий: (i) контейнер (ы), содержащий(ие) твердые компоненты, содержащие (a) фибриногенный компонент и (b) протеолитический ферментный компонент, способный к образованию фибринов

30 и при взаимодействии с фибриногеном, причем компоненты (a) и (b) находятся в отдельных контейнерах или в одном и том же контейнере в виде смеси; и (ii) по меньшей мере два отдельных контейнера, причем по меньшей мере один отдельный контейнер содержит жидкий, замороженный или твердый фибриногенный компонент, и по меньшей мере

35 второй отдельный контейнер содержит жидкий, замороженный или твердый протеолитический ферментный компонент, способный к образованию фибринов при взаимодействии с фибриногеном, при этом если по меньшей мере два отдельных контейнера (ii) содержат твердые компоненты, то компоненты (a) и (b) находятся в одном и том же контейнере в виде смеси.

40 В одном варианте осуществления настоящего изобретения протеолитический фермент представляет собой тромбин.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения набор используют применительно к влажной поверхности.

45 В другом дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения набор применяют для уплотнения подтеканий в тканях, которые являются необогащенными, имеют небольшое количество, недостаточное количество или не имеют кровеносных сосудов, и (или) тканях, медленно выделяющих текущую среду или некровоточащих.

Фибриновую матрицу или набор в соответствии с настоящим изобретением можно использовать для обработки или предотвращения дефекта на влажной ткани.

45 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фигуре 1 представлено усилие, необходимое для отделения двух слоев ткани подвздошной кишки (усилие отслаивания), связанных вместе при помощи двух различных фибриновых уплотнительных композиций: смеси лиофилизированного

фибриногена и тромбина в сравнении с двухкомпонентной жидкой фибриновой уплотнительной композицией.

На фигуре 2 представлена уплотняющая способность (измеренная путем разрушающего испытания) смеси лиофилизированного фибриногена и тромбина, двухкомпонентной жидкой фибриновой уплотнительной композиции и фибриновой матрицы, полученной путем последовательного нанесения лиофилизированного фибриногена и тромбина и двухкомпонентного жидкого фибринового уплотнителя.

На фигуре 3 представлена уплотняющая способность (измеренная путем разрушающего испытания) фибрина, полученного путем нанесения лиофилизированного тромбина с последующим распылением жидкого фибринового уплотнителя; фибрина, полученного путем нанесения лиофилизированного фибриногена с последующим распылением жидкого фибринового уплотнителя; фибрина, полученного путем нанесения смеси лиофилизированного фибриногена и тромбина с последующим распылением жидкого фибринового уплотнителя; и фибриновой композиции, полученной путем нанесения сухого альбумина с последующим распылением жидкого фибринового уплотнителя.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способу нанесения фибриновой матрицы на слизистую оболочку или другую влажную ткань, причем способ включает в себя последовательное нанесение твердой фибриновой уплотнительной смеси на поверхность ткани с последующим нанесением жидкой фибриновой уплотнительной композиции поверх по меньшей мере части поверхности. Настоящее изобретение также относится к эффективному уплотнению дефекта на слизистой оболочке или другой влажной ткани путем последовательного нанесения сначала твердой фибриновой уплотнительной смеси, а затем жидкой фибриновой уплотнительной композиции.

В основе настоящего изобретения лежат следующие данные исследования.

Силу адгезии (или усилие отслаивания) различных испытываемых фибриновых композиций изучали путем проведения исследования на отслаивание. Испытание позволяет измерить прочность соединения фибринового клея между слоями подслизистой оболочки тонкой кишки свиньи. В одном варианте осуществления испытываемую адгезивную композицию наносили на серозное поле подвздошной кишки свиньи. После нанесения испытываемой фибриновой уплотнительной композиции ткань подвздошной кишки сворачивали (сероза к серозе) и оставляли фибриновую уплотнительную композицию для полимеризации. Усилие, необходимое для отделения двух слипшихся слоев ткани подвздошной кишки друг от друга (усилие отслаивания), измеряли при помощи универсальных разрывных испытательных машин LFPLUS производства Lloyd Instruments. Обычно чем выше измеренное усилие отслаивания, тем больше сила адгезии испытываемой композиции. В соответствии с настоящим изобретением было установлено, что сила адгезии существенно повысилась благодаря использованию лиофилизированной фибриновой уплотнительной композиции вместо жидкой фибриновой уплотнительной композиции. Было установлено, что сила адгезии лиофилизированной фибриновой уплотнительной композиции была приблизительно в 2,7 раза выше по сравнению с силой адгезии жидкой фибриновой уплотнительной композиции.

Уплотняющие свойства различных фибриновых композиций измеряли путем проведения разрушающего испытания. Разрушающее испытание позволяет определить и оценить способность уплотнителя предотвращать подтекание. Коротко говоря, алюминиевую трубку, соединенную с источником воды и имеющую отверстия, вводят

в трубчатый сегмент подвздошной кишки свиньи, который уплотняют и зажимают на обоих концах трубы. После этого в алюминиевую трубку подают воду, вода поступает через отверстия в пространство между подвздошной кишкой и алюминиевой трубкой, при этом обратный ток воды в алюминиевую трубку исключается. Перед подачей воды 5 выполняют 10-миллиметровый разрез перпендикулярно длине кишки, разрез сначала сшивают нитью по средней линии, а затем на область разреза наносят испытываемую фибриновую уплотнительную композицию через трафарет из парафильма площадью 6 см², который размещают вокруг области разреза. После нанесения испытываемой 10 композиции фибрин оставляют для отверждения (или полимеризации) в течение 10 минут и заполняют кишечник водой для изучения его способности выдерживать давление. При поступлении воды в пространство между подвздошной кишкой и трубкой давление воды возрастает до тех пор, пока уплотнение разреза не откроется и не 15 произойдет резкое понижение давления. Уровень давления измеряют при помощи манометра (D-logmate 590 MRC (Израиль)), соединенного с линией подачи жидкости. 15 Давление, измеренное до понижения, регистрируют и принимают за давление разрушения. Обычно более высокое зарегистрированное давление разрушения указывает на более высокие уплотняющие свойства испытываемой композиции.

В соответствии с настоящим изобретением также было установлено, что 20 лиофилизованный фибриновый уплотнитель, показавший более высокую силу адгезии по сравнению с жидким фибриновым уплотнителем, оказался неэффективным для уплотнения. В отличие от этого жидкая фибриновая уплотнительная композиция обладает лучшим уплотняющим действием, чем лиофилизованный фибриновый 25 уплотнитель.

Кроме того, неожиданно установлено, что последовательное нанесение 25 лиофилизированного фибринового уплотнителя и жидкой фибриновой уплотнительной композиции обеспечивает взаимоусиливающее повышение уплотняющего свойства. Отмечено повышение уплотняющей способности приблизительно в 1,7 раза по 30 сравнению с уплотняющей способностью жидкой фибриновой уплотнительной композиции. Однако взаимоусиливающее повышение уплотняющих свойств не было выявлено при последовательном нанесении лиофилизированного фибриногена или 35 лиофилизированного тромбина с последующим введением жидкой фибриновой уплотнительной композиции.

Также было установлено, что высушивание слизистой оболочки перед нанесением 35 жидкой фибриновой уплотнительной композиции (например, путем нанесения сухого белка, такого как сухой альбумин, на слизистый слой) не приводит к повышению уплотняющих характеристик жидкой фибриновой уплотнительной композиции.

Эти данные способствовали разработке усовершенствованного способа создания 40 фибриновой матрицы с более высокой уплотняющей способностью на слизистой оболочке или другой влажной ткани. Фибриновую матрицу, полученную в соответствии с принципами настоящего изобретения, можно использовать для уплотнения дефектов в слизистой оболочке или другой влажной ткани, например на тканях, находящихся в постоянном движении, таких как ткани желудочно-кишечного тракта и легких.

Термин «ткань» относится к ассоциации клеток и (или) клеточных компонентов, 45 объединенных для выполнения конкретной функции. Клетки в ткани могут принадлежать к одному типу или более чем к одному типу. Ткань может быть искусственной, где клетки выращены для обеспечения функционирования подобно ткани в живом организме. Ткань может быть тканью организма человека или животного.

Термин «фибриновая матрица» относится к фибрину, полученному путем

последовательного нанесения твердой фибриновой уплотнительной смеси и жидкой фибриновой уплотнительной композиции.

Термин «эффективное количество твердой фибриновой уплотнительной смеси» относится к количеству твердого компонента, содержащего фибриноген, и количеству 5 твердого компонента, содержащего протеолитический фермент, способный к образованию фибрина при взаимодействии с фибриногеном, которые после гидратации на влажной ткани образуют фибриновый сгусток.

Термин «эффективное количество жидкой фибриновой уплотнительной композиции» относится к количеству жидкого компонента, содержащего фибриноген, и количеству 10 жидкого компонента, содержащего протеолитический фермент (способный к образованию фибрина при взаимодействии с фибриногеном), которые обеспечивают образование фибринового сгустка после смешивания жидких компонентов.

Без привязки к механизму получается, что после нанесения твердой уплотнительной смеси на влажную ткань происходит ее гидратация. Гидратированная твердая 15 уплотнительная смесь заполняет ткань, отверждая жидкость, присутствующую во влажной ткани и образуя фибриновый слой в непосредственной близости к ткани. Затем наносят жидкую фибриновую уплотнительную композицию на эту заполненную ткань, что приводит к повышению уплотняющей способности и прочности.

Преимущество состоит в том, что отверждение влаги на поверхности без 20 необходимости использовать губку или марлю способно снизить риск образования спаек в послеоперационном периоде.

Термин «спайка» относится к неправильному соединению между тканями и (или) 25 органами. Обычно спайки образуются после хирургических операций, например вследствие неравномерной обработки тканей; вследствие высушивания поверхности ткани и (или) из-за присутствия реакционно-способных инородных тел (например, шовных материалов, тальковой пудры или остатков волокна) на операционном поле.

Термин «слизистая оболочка» или «слизистая ткань» относится к влажной ткани, покрывающей некоторые органы и полости организма. Обычно слизистая ткань 30 секretирует слизистый материал. Примеры слизистой ткани включают, помимо прочего, слизистую оболочку полости рта, например буккальную и сублингвальную; слизистую оболочку носа; слизистую оболочку глаза; слизистую оболочку половых органов; ректальную слизистую оболочку; слизистую оболочку уха; слизистую оболочку легких; слизистую оболочку бронхов; слизистую оболочку желудка; слизистую оболочку кишечника; слизистую оболочку органов обоняния; слизистую оболочку матки; и 35 слизистую оболочку пищевода. Термин «слизистый» используется для определения сырого (влажного) и вязкого материала, такого как вещество, богатое муцином, альбумином гликопротеина и (или) другим компонентом, обуславливающим вязкость.

Термин «другая влажная ткань» относится к смачиваемой ткани. Ткань может 40 смачиваться физиологическими жидкостями организма, такими как сыворотка, инфильтрат сыворотки, кровь и воспалительные жидкости, и (или) другими жидкостями (текущими средами), такими как фосфатный буферный раствор (ФБР). В одном варианте осуществления настоящего изобретения текучая среда не содержит факторов свертывания крови (т.е. не содержит фибриногена).

В рамках настоящего документа термин «дефект» относится к надрыву, расхождению, 45 каналу, фиссуре, проколу, ране, свищу, отверстию, порезу, щели, перфорации, трещине, проколу или разрыву, подтеканию, например в ткани. Например, дефект может возникнуть в результате наложения анастомоза. Дефект может быть врожденным, например грыжа; вызван патологией в организме, например серома, грыжа, инфекция,

воспаление; возникнуть после хирургического вмешательства, наложения ниточного и (или) скобочного шва; или обусловлен внешними факторами, например такими как несчастный случай, травмы.

Термин «подтекание» относится к просачиванию или вытеканию вещества, например

5 текучей среды, вязкого материала и (или) воздуха, например через надрыв, расхождение, канал, фиссуру, прокол, рану, свищ, отверстие, порез, щель, перфорацию, трещину, прокол или разрыв в ткани.

Термин «анастомоз» обычно используется для обозначения хирургической процедуры, применяемой для повторного соединения двух или более участков органа или ткани.

10 Процедуру можно выполнять после рассечения мочевыводящих путей (уретры), горла (пищевода) или при проведении хирургических операций на кишечнике. Процедуру также можно выполнять после удаления пораженной ткани (такой как воспаленная, раковая ткань или ткань с иной патологией, например при язвенной болезни).

Настоящее изобретение также относится к набору, содержащему: (i) контейнер(ы),

15 содержащий(ие) твердые компоненты, содержащие (a) фибриногенный компонент и (b) протеолитический ферментный компонент, способный к образованию фибрина при взаимодействии с фибриногеном; и (ii) по меньшей мере два отдельных контейнера, причем по меньшей мере один отдельный контейнер содержит жидкий, замороженный или твердый фибриногенный компонент, и по меньшей мере второй отдельный

20 контейнер содержит жидкий, замороженный или твердый протеолитический ферментный компонент, способный к образованию фибрина при взаимодействии с фибриногеном.

Компоненты (a) и (b) элемента (i) могут находиться в отдельных контейнерах или в одном и том же контейнере в виде смеси. В одном варианте осуществления, если по меньшей мере два отдельных контейнера (ii) содержат твердые компоненты, то

25 компоненты (a) и (b) находятся в одном и том же контейнере в виде смеси. В другом варианте осуществления, если по меньшей мере два отдельных контейнера (ii) содержат твердые компоненты, то по меньшей мере один контейнер содержит водный раствор для их гидратации.

В отличие от имеющихся в продаже фибриновых наборов, предназначенных

30 специально для гемостаза, набор, составляющий предмет настоящего изобретения, также допустим для уплотнения подтеканий в тканях, которые не являются обогащенными, имеют небольшое количество, недостаточное количество или не имеют кровеносных сосудов.

Неограничивающими примерами тканей, не являющихся обогащенными, имеющими

35 небольшое количество, недостаточное количество или не имеющими кровеносных сосудов, являются: твердая мозговая оболочка, мочевой пузырь, глаза, легкие и желчный пузырь.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения набор предназначен для уплотнения подтеканий в тканях, не являющихся обогащенными, имеющими небольшое

40 количество, недостаточное количество или не имеющими кровеносных сосудов.

Термин «гемостаз» относится к способности агента останавливать кровотечение из поврежденного кровеносного сосуда и (или) способствовать удержанию крови внутри кровеносного сосуда.

Кроме того, в отличие от имеющихся в продаже фибриновых наборов,

45 предназначенные специально для остановки кровотечения из поврежденного кровеносного сосуда и (или) для удержания крови внутри кровеносного сосуда, набор, составляющий предмет настоящего изобретения, также допустим для уплотнения подтеканий веществ, не содержащих крови и плазмы, например таких как

цереброспинальная жидкость (ЦСЖ), воздух, содержимое кишечника, желчь, лимфатическая жидкость и жидкая часть стекловидного тела.

В одном варианте осуществления фибриновая матрица или набор, составляющий предмет настоящего изобретения, предназначен для уплотнения подтеканий в тканях, медленно выделяющих текущую среду или некровоточащих. Термин «медленное выделение текущей среды» обозначает, например, незначительное кровотечение. Термин «медленное выделение текущей среды» охватывает случаи кровотечения, где имеет место относительно низкая кровопотеря при относительно низкой скорости.

Набор также может содержать инструкцию по применению. Набор также может содержать средства для рассечения и (или) сшивания ткани или органа скобами или нитью, такие как механические или ручные режущие и сшивающие устройства. В качестве контейнера можно использовать ампулу, предварительно наполненный шприц, бутылек, трубку или любой другой допустимый контейнер, содержащий твердые или жидкие компоненты. Контейнеры могут быть разного размера и содержать различный объем (массу) композиций, например каждый жидкий компонент может иметь объем не более приблизительно 10 мл, а каждый твердый компонент может иметь массу сухого вещества не более приблизительно 3 г. В набор также может быть необязательно включен аппликатор для введения твердых и жидких компонентов.

Фибриновую матрицу или набор в соответствии с настоящим изобретением можно использовать для любых терапевтических целей. Термин «любые терапевтические цели» относится к любым видам лечения и профилактики у объекта. Примеры терапевтических целей включают, помимо прочего, уплотнение высверленного отверстия, выполненного в ткани или органе, например в кости; анастомоз на кровеносных сосудах; соединение частей ткани, например частей мягких тканей; обработку или предотвращение дефектов твердой мозговой оболочки, например разрывов и подтеканий после инфекций твердой мозговой оболочки, фиссур или трещин; остановку или предотвращение кровотечений; устранение или предотвращение утечек воздуха, например после резекции легкого; обработку или предотвращение дефектов после перфорации кишечника; обработку или предотвращение дефектов после процедуры анастомоза, выполненной на любой ткани, например такой как матка, пищевод, желудок, поджелудочная железа, проток поджелудочной железы, желчный пузырь, желчный проток, кишечник (включая тонкий кишечник и толстую кишку) и прямая кишка; устранение или предотвращение послеоперационных подтеканий в любой ткани, например такой как матка, пищевод, желудок, поджелудочная железа, проток поджелудочной железы, желчный пузырь, желчный проток, кишечник (включая тонкий кишечник и толстую кишку) и прямая кишка; предотвращение или снижение частоты возникновения послеоперационных подтеканий по линии скобочного или ниточного шва, например путем наложения фибриновой матрицы в соответствии с настоящим изобретением по меньшей мере на часть дефекта, такого как скобочный/ниточный шов; для прочной фиксации протеза, например во время операции по поводу грыжи; для усиления скобочного/ниточного шва; предотвращение или уменьшение утечки альвеолярного воздуха; обработку или предотвращение почечных дефектов; обработку или предотвращение свищей; обработку или предотвращение сердечных дефектов, например проникающих ран в сердце; укрепление сосудистого трансплантата; и устранение или предотвращение подтеканий цереброспинальной жидкости.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое использование подразумевает уплотнение подтеканий в тканях, не обогащенных кровеносными сосудами или имеющих недостаточное количество кровеносных сосудов.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения терапевтическое использование подразумевает усиление скобочного/ниточного шва.

Фибриновую матрицу, составляющую предмет настоящего изобретения, можно использовать для уплотнения дефектов без скоб и нитей.

5 Термин «скоба или нить» включает любой скрепляющий элемент, используемый для закрытия раны, такой как, помимо прочего, скоба, клипса, штифт, крючок, нить и т.п.

Термин «по меньшей мере часть дефекта» в рамках настоящего документа относится к области, которая меньше, равна или больше области дефекта. Например, область может составлять 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%, включая любой диапазон

10 между указанными процентными величинами, или больше от области дефекта. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фибриновую матрицу или набор, составляющий предмет настоящего изобретения, применяют для усиления скобочного/ниточного шва. Например, 10-миллиметровый разрез, выполненный у объекта во время хирургической операции, сначала сшивают при помощи нити или скоб. Для усиления 15 на скобочный/ниточный шов наносят 100 мг твердой фибриновой уплотнительной смеси (1 000 МЕ тромбина на 70 мг фибриногена), после чего распыляют жидкую фибриновую уплотнительную композицию. Жидкий фибрин наносят путем распыления композиции общим объемом 2 мл (в соотношении двух компонентов 1:1), содержащей 1 000 МЕ/мл тромбина и 70 мг/мл фибриногена.

20 Термин «объект» в рамках настоящего документа включает животных, относящихся к классу млекопитающих, включая человека. В одном варианте осуществления объектом является пациент.

В одном аспекте настоящее изобретение предлагает способ нанесения фибриновой матрицы на влажную ткань. Способ включает следующие стадии: нанесение

25 эффективного количества твердой фибриновой уплотнительной смеси на влажную ткань; и нанесение эффективного количества жидкой фибриновой уплотнительной композиции поверх по меньшей мере части твердой фибриновой уплотнительной смеси, причем эффективные количества твердой фибриновой уплотнительной смеси и жидкой фибриновой уплотнительной композиции достаточны для формирования фибриновой 30 матрицы на влажной ткани, обладающей улучшенной уплотняющей способностью, связанной с нанесением эффективного количества либо жидкой фибриновой уплотнительной композиции, либо твердой фибриновой уплотнительной смеси. Преимущественным является нанесение твердого фибринового уплотнителя перед 35 жидким фибриновым уплотнителем, что повышает уплотняющую способность жидкого фибринового уплотнителя.

Термин «влажная ткань» относится к смачиваемой ткани и включает, например, слизистую оболочку, слизистую ткань и другую влажную ткань. В другом варианте осуществления настоящего изобретения ткань смачивается текучей средой, не содержащей фибриногена. Термин «не содержащий фибриногена» относится, например, 40 к концентрации фибриногена менее чем 1,5 г/л.

Термин «поверх по меньшей мере части твердой фибриновой уплотнительной смеси» в рамках настоящего документа относится к области, варьирующейся от области с меньшей площадью поверхности до области с большей площадью поверхности по сравнению с областью, на которую нанесен(ы) твердый(ые) фибриновый(ые) 45 уплотнительный(ые) компонент(ы). Например, жидкую фибриновую уплотнительную композицию может быть нанесена на 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%, включая любой диапазон между указанными процентными величинами, от площади поверхности, на которую нанесен(ы) твердый(ые) компонент(ы). В альтернативном варианте

осуществления жидкую фибриновую уплотнительную композицию можно наносить на большую площадь поверхности, чем площадь, на которую нанесен(ы) твердый(ые) компонент(ы), например на всю поверхность влажной ткани или органа.

Термин «жидкая фибриновая уплотнительная композиция» относится в рамках

- 5 настоящей заявки по меньшей мере к двум отдельным жидким компонентам, необходимым для образования фибринового уплотнителя. По меньшей мере один отдельный компонент содержит фибриноген, и по меньшей мере второй отдельный компонент содержит протеолитический фермент, способный к образованию фибрина при взаимодействии с фибриногеном (или с фибриноген-содержащей композицией).
- 10 При введении по меньшей мере двух отдельных компонентов, например при инъекции в целевую область, жидкие компоненты вступают во взаимодействие, имитируя заключительные стадии коагуляционного каскада крови и образуя известный специалистам сгусток, фибрин.

Термин «мягкая ткань» обычно относится к структурам организма, соединяющим,

- 15 поддерживающим, охватывающим и (или) окружающим другие структуры и органы. Мягкая ткань может быть соединительной тканью или несоединительной тканью. Примеры мягкой ткани включают, помимо прочего, сухожилия, связки, волокнистые соединительные ткани, синовиальную перепонку, соединительнотканную оболочку, мышцы, мышечную стенку, нервы, кишечник, жировую ткань, печень, кожу, селезенку
- 20 и кровеносные сосуды.

- Термин «твёрдая фибриновая уплотнительная смесь» в рамках настоящей заявки относится к твердой композиции, содержащей исходные вещества для образования фибринового уплотнителя. Композиция содержит твердый протеолитический фермент, способный к образованию фибрина при взаимодействии с фибриногеном (или
- 25 фибриноген-содержащей композицией), и твердый фибриноген. Твёрдая смесь также может содержать другие компоненты, такие как альбумин. В качестве протеолитического фермента можно использовать тромбин и (или) вещество, получаемое из змеиного яда. В одном варианте осуществления настоящего изобретения твёрдая композиция содержит фибриногенный и тромбиновый компоненты в
- 30 лиофилизированной форме. В другом варианте осуществления растворы, содержащие тромбин и фибриноген, высушивают отдельно, например путем лиофилизации, для получения соответствующих твердых компонентов в составе общей твердой фибриновой уплотнительной смеси. В другом варианте осуществления настоящего изобретения полученные твердые материалы измельчают в порошок при помощи мельницы
- 35 сверхтонкого помола или мельницы с охлаждаемой лопаткой или вручную путем протирания твердого материала через сито, например при помощи шпателя. В одном варианте осуществления настоящего изобретения материал измельчали протиранием через сито с ячейками 200 мкм при помощи шпателя. В другом варианте осуществления настоящего изобретения твердые материалы измельчали в порошок, используя способ,
- 40 описанный в международной патентной заявке WO 2008/053475, включенной в настоящий документ путем ссылки.

- Размер частиц твердого материала после помола может составлять менее 1 000 мкм. В одном варианте осуществления настоящего изобретения размер частиц твердого материала после помола составляет не более 200 мкм. Размер частиц может находиться
- 45 в диапазоне от 10 до 100 мкм или от 10 до 60 мкм. Твердый протеолитический фермент и твердый фибриноген могут быть предоставлены вместе. Также возможен вариант, когда твердые исходные вещества предоставляют по отдельности и наносят на целевую поверхность одновременно или один за другим. В одном варианте осуществления

настоящего изобретения твердый протеолитический фермент и твердый фибриноген предоставляют в виде смеси.

Настоящее изобретение также предлагает способ получения фибриновой матрицы на смачиваемой поверхности. Способ включает следующие стадии: предоставление

- 5 твердого компонента, содержащего фибриноген; предоставление твердого компонента, содержащего протеолитический фермент, способный к образованию фибрина при взаимодействии с фибриногеном; предоставление жидкой фибриновой уплотнительной композиции; нанесение эффективного количества твердых компонентов по меньшей мере на часть смачиваемой поверхности; нанесение эффективного количества жидкой
- 10 фибриновой уплотнительной композиции поверх по меньшей мере части твердых компонентов.

Термин «смачиваемая поверхность» относится к влажной поверхности. Поверхностью могут быть слизистая оболочка, слизистая ткань и (или) другая влажная ткань.

- Поверхность может смачиваться биологическими жидкостями, такими как инфильтрат
- 15 сыворотки, кровь и воспалительные жидкости, и (или) небиологическими жидкостями, такими как ФБР.

- Смачиваемая поверхность может представлять собой поверхность части организма пациента, например любую ткань, содержащую жидкости или воздух. Термин «поверхность» включает, помимо прочего, область половых органов, включая матку,
- 20 влагалище и яичники; легкие; анус; селезенку; печень; твердую мозговую оболочку; почки; пищевод; желудок; поджелудочную железу; проток поджелудочной железы; желчный пузырь; желчный проток; кишечник (включая тонкий кишечник и толстую кишку); и сердечную мышцу. Поверхность может кровоточить или не кровоточить. В одном варианте осуществления настоящего изобретения поверхность не кровоточит.
- 25 В другом варианте осуществления настоящего изобретения поверхность смачивается текучей средой, не содержащей фактора свертывания крови (т.е. не содержит фибриногена). Поверхность может представлять собой любую поверхность, например рабочую поверхность, поверхность протеза.

- Термин «по меньшей мере часть смачиваемой поверхности» в рамках настоящего
- 30 документа относится к области, которая меньше, равна или больше смачиваемой поверхности. Например, область может составлять 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%, включая любой диапазон между указанными процентными величинами, или больше от площади поверхности.

- Твердые компоненты в твердой фибриновой смеси взаимодействуют после
- 35 гидратации, например после контакта с влажной тканью, образуя фибриновый уплотнитель. Обычно фибриногенные препараты обладают относительно низкой растворимостью, и слизистая ткань демонстрирует относительно низкое содержание жидкости. Преимущество состоит в том, что фибриногенный компонент используемой твердой фибриновой уплотнительной смеси способен к быстрому растворению и (или)
- 40 гидратации после нанесения на ткань.

- Термин «попасть по меньшей мере части твердого(ых) компонента(ов)» относится к области, варьирующейся от области с меньшей площадью поверхности до области с большей площадью поверхности по сравнению с областью, на которую нанесен(ы) твердый(ые) фибриновый(ые) уплотнительный(ые) компонент(ы). Например, жидкая
- 45 фибриновая уплотнительная композиция может быть нанесена на 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%, включая любой диапазон между указанными процентными величинами, от площади поверхности, на которую нанесен(ы) твердый(ые) компонент(ы). В альтернативном варианте осуществления жидкую фибриновую уплотнительную

композицию можно наносить на большую площадь поверхности, чем площадь, на которую нанесен(ы) твердый(ые) компонент(ы), например на всю поверхность.

В соответствии с настоящим изобретением твердый фибриноген, полученный путем лиофилизации фибриноген-содержащего раствора с концентрацией фибриногена 20

5 мг/мл, восстановили в водном растворе при комнатной температуре в течение периода времени менее 10 минут. В одном варианте осуществления настоящего изобретения фибриногенный компонент твердой фибриновой уплотнительной смеси получен из фибриноген-содержащего раствора с концентрацией фибриногена не более 150, например не более 85, 25 мг/мл или меньше 20 мг/мл.

10 Твердая фибриновая уплотнительная смесь может быть получена путем высушивания жидкой фибриновой уплотнительной композиции. Допускается использование любой известной в данной области процедуры высушивания, включая, помимо прочего, лиофилизацию (сублимационное высушивание) или высушивание распылением.

15 Высушивание можно выполнять при различных температурах с использованием различного оборудования для высушивания, такого как камера с регулируемой влажностью, сушильная печь, сушильный канал, вакуумная сушилка, или любым другим допустимым способом, не влияющим на образование сгустка.

20 Термин «твёрдый» в рамках настоящего описания относится к композиции, содержащей жидкость в количестве менее 5%, например менее 4, 3, 2, 1% по весу или меньше от общего веса сухой композиции. Термин «твёрдый» и термины «сухой» или «порошок» являются взаимозаменяемыми.

Твердый фибриновый уплотнитель можно наносить на ткань при помощи дозатора. Примеры дозаторов представлены в патенте США № 1776489 и в патенте США № 7455248, включенных в настоящий документ путем ссылки.

25 Термин «улучшенная уплотняющая способность» относится, например, к уплотняющей способности, которая по меньшей мере приблизительно в 1,2 раза выше по сравнению с уплотняющей способностью одного жидкого уплотнителя. В одном варианте осуществления настоящего изобретения уплотняющая способность возрастает приблизительно в 1,7 раза по отношению к нанесению жидкой фибриновой

30 уплотнительной композиции. Уплотняющую способность можно измерить, например, при помощи разрушающего испытания, описанного выше.

Фраза «уплотняющая способность, увеличенная в 1,2 раза» относится к уплотняющей способности, которая на 20% превышает уплотняющую способность, достижимую при нанесении жидкой фибриновой уплотнительной композиции. Фраза «уплотняющая 35 способность, увеличенная в 1,7 раза» относится к уплотняющей способности, которая на 70% превышает уплотняющую способность, достижимую при нанесении жидкой фибриновой уплотнительной композиции.

В качестве протеолитического фермента можно использовать тромбин и (или) 40 вещество, получаемое из змеиного яда. Жидкие компоненты могут быть заморожены до момента использования (например, при температуре -18°C или ниже) или высушены, например, путем лиофилизации, для длительного хранения. Высушенные компоненты могут быть восстановлены перед использованием путем добавления различного объема фармацевтически приемлемого носителя. Термин «фармацевтически приемлемый 45 носитель» относится к любому разбавителю или среде, которые допустимы для использования применительно к человеку или другим животным. Носитель может быть выбран из числа известных в данной области носителей, таких как, помимо прочего, фосфатный буферный раствор (ФБР), физиологический раствор, раствор хлорида натрия, раствор хлорида кальция, лактат Рингера (ЛР), 5% декстроза в нормальном

5 физиологическом растворе и вода для инъекций. Для восстановления лиофилизированного фибриногена перед использованием можно применять стерилизованную воду. Для восстановления лиофилизированного тромбина перед использованием можно применять стерильный раствор хлорида кальция или воду, например дистиллированную воду. Восстановленные лиофилизированные фибриноген и тромбин можно использовать в составе жидкой фибриновой уплотнительной композиции с последующим образованием фибрина. Два компонента можно наносить на требуемую область одновременно или один за другим.

10 В одном варианте осуществления настоящего изобретения фибриноген-содержащий

15 компонент состоит из биологически активного компонента (БАК), представляющего собой раствор белков, полученных из плазмы крови. Этот компонент может дополнительно содержать транексамовую кислоту и аргинин, или лизин, или смеси аргинина и лизина, или их фармацевтически приемлемые соли.

20 БАК может быть получен из криопреципитата, такого как концентрированный

25 криопреципитат. Термин «криопреципитат» относится к компоненту крови, получаемому из замороженной плазмы, полученной из цельной крови. Криопреципитат может быть получен при размораживании замороженной плазмы на холоде, обычно при температуре 0-4°C, в результате чего образуется осажденный супернатант, содержащий фибриноген и фактор XIII. Осадок можно собрать, например, путем центрифugирования. Обычно БАК содержит фактор VIII, фибронектин, фактор фон Виллебранда (vWF), витронектин и т.д., например, как описано в патенте США № 6121232 и соответствующей опубликованной заявке PCT WO 98/33533, включенных в настоящий документ путем ссылки.

25 БАК может содержать стабилизаторы, такие как гидрохлорид аргинина. Обычно

30 количество фибриногена в БАК находится в диапазоне от приблизительно 40 до приблизительно 60 мг/мл. Количество транексамовой кислоты в растворе БАК может находиться в диапазоне от приблизительно 80 до приблизительно 110 мг/мл. Количество гидрохлорида аргинина может находиться в диапазоне от приблизительно 15 до приблизительно 25 мг/мл.

35 Раствор необязательно буферизуют до физиологически совместимого уровня кислотности. Буферный раствор может состоять из глицина, цитрата натрия, хлорида натрия, хлорида кальция и воды для инъекций, используемой в качестве среды. Глицин может присутствовать в композиции в количестве от приблизительно 6 до приблизительно 10 мг/мл, цитрат натрия может присутствовать в диапазоне от приблизительно 1 до приблизительно 5 мг/мл, хлорид натрия может присутствовать в диапазоне от приблизительно 5 до приблизительно 9 мг/мл, и концентрация хлорида кальция может составлять приблизительно 0,1-0,2 мг/мл.

40 В другом варианте осуществления концентрацию плазминогена и плазмина в композиции БАК снижают до значения, составляющего не более 15 мкг/мл, например до 5 мкг/мл или меньше плазминогена, например, способом, описанным в патенте США № 7125569 и соответствующей опубликованной заявке PCT WO 02/095019, включенных в настоящий документ путем ссылки.

45 Допускается также, чтобы фибриновая уплотнительная композиция содержала компоненты, способствующие образованию сгустка, такие как Ca^{2+} , фактор VIII, фибронектин, витронектин, фактор фон Виллебранда (vWF), которые могут быть подготовлены в виде отдельных компонентов или в смеси с жидкими компонентами.

Жидкую фибриновую уплотнительную композицию можно наносить на ткань при помощи дозатора, который позволяет наносить уплотнитель непосредственно на ткань

или другой носитель, или рабочую поверхность при помощи струи воздуха или без нее, например путем добавления по каплям. В одном варианте осуществления настоящего изобретения уплотнитель распыляют под давлением воздуха 103,4 кПа (15 фунтов на кв. дюйм). Примеры дозаторов для уплотнителей ткани см. в патентах США №№

5 4631055, 4846405, 5116315, 5582596, 5665067, 5989215, 6461361 и 6585696, 6620125 и 6802822, и в публикациях РСТ №№ WO 96/39212, WO 2007/059801 и WO 2010/095128, включенных в настоящий документ путем ссылки.

Перед использованием в хирургических операциях жидкая фибриновая уплотнительная композиция содержит по меньшей мере два компонента. В одном 10 варианте осуществления жидкая фибриновая уплотнительная композиция содержит два жидких компонента, причем один компонент содержит фибриноген и при взаимодействии со вторым компонентом, содержащим протеолитический фермент, такой как человеческий тромбин, образует фибриновый сгусток. Во время хирургических операций отдельные жидкие компоненты, например два жидких компонента, наносят 15 одновременно или один за другим, например, при помощи двух шприцов, в результате чего два компонента смешиваются с образованием фибрина.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения в качестве 20 протеолитического фермента используется человеческий тромбин, обладающий активностью в диапазоне от приблизительно 2 до приблизительно 4 000 МЕ/мл. Коагулирующую активность тромбина можно измерить напрямую, например, в соответствии с процедурой испытания согласно Европейской фармакопее (0903/1997), и (или) опосредованно, например путем измерения длины пути миграции на наклонной поверхности («капельная проба» согласно описанию в опубликованной заявке на патент США 2010/0203033) или любым другим способом, известным в данной области. 25 Специалисту будет понятно, что в составе фибринового клея может быть указан коагулирующий белок вместо коагулирующего фибриногена.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения фибриногенный и 30 протеолитический ферментные компоненты наносят таким образом, что одинаковые объемы двух компонентов смешивают и наносят на соответствующую раневую поверхность пациента. Разумеется, следует понимать, что фибриновую матрицу, составляющую предмет настоящего изобретения, можно использовать во время хирургических операций, а также в других ситуациях, когда необходимо остановить кровотечение.

Твердую фибриновую уплотнительную смесь можно получить путем смешивания 35 твердого фибриногена и твердого тромбина в любом необходимом диапазоне соотношений. Например, если твердый фибриногенный компонент получили из фибриноген-содержащего раствора с концентрацией фибриногена 40-85 мг/мл, а твердый тромбиновый компонент получили из тромбин-содержащего раствора с концентрацией тромбина приблизительно 800-1 200 МЕ/мл, два твердых компонента могут быть 40 смешаны в соотношении 1:1, 3,2:1, 6,4:1 соответственно и т.д. Смешивание может проводиться в условиях регулируемой влажности (относительная влажность 25% при температуре 37°C). Порошковую смесь можно хранить до использования в закрытой емкости.

Перед высушиванием фибриноген-содержащий раствор можно развести, например, 45 до получения концентрации фибриногена 25 мг/мл или 20 мг/мл. Смешивание двух компонентов можно выполнять перед нанесением твердой фибриновой уплотнительной смеси на ткань или можно наносить эти компоненты непосредственно на ткань в требуемой пропорции.

Во время нанесения жидкой фибриновой уплотнительной композиции на ткань можно наносить фибриноген-содержащий компонент и тромбин-содержащий компонент в любом необходимом диапазоне соотношений. Например, если концентрация фибриногенного компонента составляет 40-85 мг/мл и концентрация тромбина 5 составляет приблизительно 800-1 200 МЕ/мл, два компонента могут быть смешаны в соотношении 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 соответственно и т.д. В одном варианте осуществления настоящего изобретения компоненты жидкого фибринового уплотнителя используют в соотношении 1:1.

Фибриновую матрицу, составляющую предмет настоящего изобретения, можно

10 использовать в терапевтически эффективном количестве. Термин «терапевтически эффективное количество» относится к дозе, необходимой для профилактики или лечения заболевания, расстройства или патологического состояния. Эффективную дозу можно изменять в зависимости от возраста и веса объекта, заболевания и его тяжести (например, размер разреза) и других факторов, которые могут быть выявлены специалистами в 15 данной области. Например, твердую фибриновую уплотнительную смесь можно наносить в объеме от 0,1 до 100 мг на см², например в объеме 0,5, 1, 4, 8, 16, 30, 60 или 100 мг на см². Жидкую фибриновую уплотнительную композицию можно наносить в объеме от приблизительно 0,01 до приблизительно 1 мл на см², например в объеме 0,01, 20 0,05, 0,5 или 1 мл на см².

В одном варианте осуществления при разрезе 10 мм на область площадью 6 см² последовательно путем рассеивания наносят 100 мг твердой фибриновой уплотнительной смеси (1 000 МЕ тромбина на 70 мг фибриногена), после чего распыляют жидкую 25 фибриновую уплотнительную композицию. Жидкую композицию наносят путем распыления общим объемом 2 мл (в соотношении двух компонентов 1:1), где тромбин составляет 1 000 МЕ/мл и фибриноген составляет 70 мг/мл.

В соответствии со способами настоящего изобретения жидкую фибриновую 30 уплотнительную композицию может быть предоставлена в твердой форме и восстановлена перед нанесением. Восстановление можно осуществлять путем добавления фармацевтически приемлемого носителя в различных объемах. Термин «восстановление» относится к способу преобразования твердой формы в жидкую. Восстановленный 35 продукт может представлять собой жидкий продукт, полученным путем добавления жидкости на водной основе к сухим веществам, из которых предварительно удалили жидкость.

В альтернативном варианте осуществления жидкую фибриновую уплотнительную композицию может быть предоставлена в замороженном виде, например при температуре 40 -18°C или ниже, и разморожена перед нанесением. Размораживание можно осуществлять путем инкубирования контейнеров, содержащих жидкие компоненты, при комнатной температуре (от 20°C до 25°C), при температуре от 2 до 8°C или при температуре 37°C. В другом варианте осуществления жидкие компоненты наносят одновременно. В другом дополнительном варианте осуществления жидкие компоненты наносят один за другим.

Твердый компонент может быть предоставлен в жидкой форме и высушен перед 45 нанесением, например путем лиофилизации (сублимационное высушивание) или высушивания распылением. В альтернативном варианте осуществления твердый компонент может быть предоставлен в замороженном виде и высушен перед нанесением. Замороженные компоненты могут быть разморожены и затем высушены или могут быть преобразованы непосредственно из замороженной в твердую форму, например

путем сублимации.

Твердый компонент может быть предоставлен во взвешенном состоянии, например в любом допустимом растворителе, включая неводную жидкость, такую как гидрофторуглерод (ГФУ), или любую другую жидкость-носитель, в которой не

5 растворяется твердый компонент, такую как спирты, эфиры или другие органические жидкости. Твердые компоненты и (или) жидкие компоненты можно наносить одновременно или один за другим в соответствии со способами, составляющими предмет настоящего изобретения. В одном варианте осуществления твердые компоненты предоставляют в виде смеси и наносят одновременно. В другом варианте осуществления 10 твердые компоненты предоставляют в отдельных контейнерах и наносят одновременно. В другом дополнительном варианте осуществления твердые компоненты предоставляют в отдельных контейнерах и наносят один за другим.

Фибриновую матрицу, составляющую предмет настоящего изобретения, можно наносить любым способом, используемым хирургами для устраниния или

15 предотвращения дефектов, включая, помимо прочего, открытое оперативное вмешательство и минимально инвазивную операцию (МИО), такую как лапароскопическая операция. В одном варианте осуществления настоящего изобретения на операционном поле выполняют разрез и на дефект наносят фибриновую матрицу. В другом варианте осуществления на операционном поле выполняют разрез, разрез 20 сшивают скобами или нитью и на скобочный или ниточный шов наносят фибриновую матрицу. Пациент получает местную, регионарную или общую анестезию. Термин «открытое оперативное вмешательство» относится к хирургическому вмешательству, при котором хирург получает прямой доступ к операционному полю посредством относительно большого разреза.

25 В рамках настоящего документа термин «минимально инвазивная операция» относится к хирургическому вмешательству, при котором хирург получает доступ к операционному полю посредством небольших разрезов или через полость организма, или через анатомическое отверстие, например путем лапароскопии. Для визуализации операционного поля можно использовать специальную технику, такую как миниатюрные 30 камеры с микроскопами, миниатюрные оптоволоконные фонари и мониторы с высоким разрешением. Применительно к операционному полю можно использовать инструменты, имеющие «концевые зажимы», такие как щипцы, кусачки, иглодержатели, прижигатели и т.п.

Фибриноген- и тромбин-содержащие компоненты поставляют такие производители, 35 как OMRIX (например, EVICEL®, QUIXIL®, ADHEXIL™; EVITHROM®); Baxter (например, TISEEL®); CSL (например, Beriplast®) и т.п. В одном варианте осуществления жидкие фибриновые уплотнительные компоненты получают из общей плазмы человека и поставляют в виде набора для однократного применения, включающего две ампулы: одна ампула содержит биологически активный компонент 2 (БАК2), а другая ампула 40 содержит тромбин. Набор может дополнительно включать стерильный аппликатор и инструкцию по применению.

В одном варианте осуществления компонент БАК2 представляет собой стерильный раствор с pH 6,7-7,2, по существу состоящий из концентрата человеческого фибриногена. Фибриноген - это белок крови человека, образующий сгусток при взаимодействии с 45 тромбином. Жидкая фибриновая уплотнительная композиция, такая как раствор БАК2, может содержать: концентрат человеческого фибриногена (55-85 мг/мл), гидрохлорид аргинина, глицин, хлорид натрия, цитрат натрия, хлорид кальция и воду для инъекций (WFI).

В одном варианте осуществления тромбиновый компонент представлен в виде стерильного раствора, pH 6,8-7,2, содержащего человеческий тромбин высокой очистки, активирующий коагуляцию конечного объединенного продукта. Тромбин - это высокоспецифичная протеаза, трансформирующая фибриноген, содержащийся в БАК2, в фибрин. Раствор тромбина может содержать: человеческий тромбин (800-1 200 МЕ/мл), хлорид кальция, человеческий альбумин, маннитол, ацетат натрия и воду для инъекций.

Криопреципитат, который может быть исходным материалом для БАК2, и криосупернатантная плазма, которая может быть исходным материалом для получения тромбина, могут быть получены из общей плазмы человека. Специалистам в данной области хорошо известны стадии получения криопреципитата и криосупернатантной плазмы. В одном варианте осуществления тромбин получают путем хроматографической очистки протромбина из криосупернатантной плазмы после ее активации хлоридом кальция, например, как описано в патенте США № 5143838, включенном в настоящий документ путем ссылки. В другом варианте осуществления фибриногенный компонент получают из криопреципитата, в частности из концентрированного криопреципитата.

Фибриногенный и тромбиновый компоненты, упомянутые выше как часть жидкого фибринового уплотнительного компонента или лиофилизированного компонента, могут быть получены из плазмы человека или животного. Однако допускается также получение компонентов рекомбинантными способами. Фибриногенные компоненты могут быть получены в соответствии со способами, описанными в патенте США № 6121232 и опубликованной заявке PCT WO 98/33533, где плазмин(оген) удаляют, как описано в опубликованной заявке ЕР 1390485, и не добавляют транексамовой кислоты.

Фибриновые уплотнительные компоненты в составе двухкомпонентного жидкого фибринового уплотнителя или твердой фибриновой уплотнительной смеси, полученные из крови или фракций крови, обычно подвергают по меньшей мере двум дискретным стадиям инактивации/удаления вирусов. Процессы инактивации и удаления вирусов можно выполнять, например, следующими способами: нанофильтрацией; растворением/очищением; обработкой при низком pH, УФ-облучением; обработкой тиоцианатом натрия и (или) любым другим способом, известным в этой области.

Термин «стадия инактивации вирусов» относится к ситуации, в которой вирусы остаются в растворе, но оказываются нежизнеспособными, например при растворении их жировой оболочки. Термин «стадия удаления вирусов» относится к ситуации, в которой вирусы физически удаляют из раствора, например путем исключения по размеру.

Термин «по меньшей мере две дискретные стадии инактивации/удаления вирусов» включает выполнение по меньшей мере двух различных и независимых видов обработки для инактивации или удаления вирусов. Допускается комбинирование двух или более из следующих неограничивающих примеров обработки: пастеризация, растворение/очищение (Р/О), нанофильтрация, обработка при низком pH, УФ-облучение и обработка тиоцианатом натрия.

Использование БАК, полученного из концентрированного криопреципитата, является преимущественным, поскольку такая фракция, помимо фибриногена, содержит также ценные компоненты крови, которые играют важную роль в процессе коагуляции крови при взаимодействии протеолитического фермента, такого как человеческий тромбин, с раствором БАК. К числу ценных компонентов относятся, например, фактор VIII, фактор XIII, фибронектин, витронектин, фактор фон Виллебранда (vWF), и т.д.

Нанесение твердой фибриновой уплотнительной смеси с последующим нанесением

жидкой фибриновой уплотнительной композиции способствует образованию фибриновой матрицы на ткани с более высокой уплотняющей способностью, достичь которую посредством нанесения каждой из упомянутых уплотнительных композиций по отдельности не представляется возможным. Фибриновая матрица, образованная в 5 соответствии с настоящим изобретением, особенно пригодна для уплотнения дефектов в слизистых тканях и другой кишечной или влажной ткани, находящихся в постоянном движении, например в ткани желудочно-кишечного тракта. Например, фибрин в соответствии с настоящим изобретением можно использовать для профилактики осложнений в виде подтеканий после резекции с наложением скобочных швов или 10 анастомоза в хирургии желудочно-кишечного тракта. Кроме этого, использование фибрина в соответствии с настоящим изобретением может быть предпочтительно для надежной фиксации протеза во время операции по поводу грыжи.

Содержания заявок, патентов и публикаций, упомянутых выше и далее по тексту, настоящим включены в настоящий документ путем ссылки.

15 Настоящее изобретение далее описано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

ПРИМЕРЫ

Материалы и способы

Лиофилизация

20 Лиофилизация выполнялась в соответствии со следующим циклом:

Стадия	Фаза	Время (ч:м)	Темп. (°C)	Вакуум (Па (мбар))
1	Начальные значения	--:--	4	НЕТ
2	Замораживание	1:00	-30	НЕТ
25	Замораживание	1:00	-50	НЕТ
4	Замораживание	5:40	-50	НЕТ
5	Получение	0:20	-45	НЕТ
6	Сублимация	0:15	-42	20(0,2)
7	Сублимация	0:15	-25	20(0,2)
8	Сублимация	25:00	-25	20(0,2)
20	Сублимация	1:00	-15	20(0,2)
9	Сублимация	12:00	-15	20(0,2)
10	Сублимация	2:00	20	20(0,2)
30	Сублимация	5:00	20	20(0,2)
11	Вторичное высушивание	0:30	25	12(0,12)
12	Вторичное высушивание	18:00	25	12(0,12)

35 **Жидкий фибриноген и тромбин**

В описанных ниже экспериментах в качестве двухкомпонентного жидкого фибринового уплотнителя использовали два жидкых компонента фибринового уплотнителя EVICEL® (БАК2 и тромбин; Omrix Biopharmaceuticals Ltd.). Фибриногенный компонент (содержащий 70 мг фибриногена/мл) использовали в имеющемся состоянии и, если не указано иное, тромбиновый компонент использовали в имеющемся состоянии (1 000 МЕ/мл) или разведенным в 10 раз разбавленным буферным раствором [0,04 М CaCl₂ в дистиллированной, деионизованной воде (DDW)]. Во всех экспериментах жидкий фибриновый уплотнитель распыляли под давлением воздуха 103,4 кПа (15 фунтов на кв. дюйм).

45 **Получение лиофилизированной смеси фибриногена и тромбина**

Композиции растворов, используемые для получения лиофилизированных порошков, представляли собой два жидких компонента EVICEL®. Каждый из компонентов лиофилизировали раздельно согласно циклу лиофилизации, описанному выше. Перед

процедурой лиофилизации фибриногенный компонент разбавляли DDW до получения концентрации фибриногена 20 мг/мл.

После лиофилизации порошки протирали при помощи шпателя через сито с ячейками 200 мкм. Протертые порошки фибриногена и тромбина смешивали в соотношении по весу 3,2:1 (равно соотношению 1 000 МЕ тромбина на 70 мг фибриногена, как в составе EVICEL) или 6,4:1 (равно соотношению 500 МЕ тромбина на 70 мг фибриногена) соответственно. Смешивание выполняли в условиях регулируемой влажности (относительная влажность 25% при температуре 37°C). Порошковую смесь хранили до использования в закрытой емкости. Для каждого эксперимента готовили свежую порошковую смесь.

Пример 1. Сила адгезии лиофилизированной фибриновой уплотнительной композиции и жидкой фибриновой уплотнительной композиции.

В следующем эксперименте измеряли силы адгезии лиофилизированной фибриновой уплотнительной композиции и жидкой фибриновой уплотнительной композиции.

Оценку выполняли путем исследования усилия отслаивания, по существу как описано в публикации Nicoson ZR, г. Бакли, штат Калифорния. «Bond strength of fibrin glue between layers of porcine small intestine submucosa (SIS)». Biomed Sci Instrum. 2002; 38:179-184. Коротко говоря, испытываемую адгезионную композицию наносили на серозное поле подвздошной кишки свиньи (сегмент 4×10 см) через трафарет из парафильма размером 4×4 см (16 см²) (способ нанесения см. ниже).

После нанесения различных фибриновых уплотнительных композиций трафарет из парафильма удалили, ткань подвздошной кишки завернули (сероза к серозе) и оставили для полимеризации на 10 минут при комнатной температуре (приблизительно 20-25°C). Для получения четырех реплик сегмент нарезали на полоски размером 1×10 см и измеряли силу, необходимую для отделения двух слипшихся слоев ткани подвздошной кишки друг от друга (известную как усилие отслаивания), при помощи универсальных разрывных испытательных машин LFPLUS производства Lloyd Instruments.

Испытываемые композиции наносили следующим образом:

- жидкие фибриногенный и тромбиновый компоненты наносили путем распыления одинакового количества фибриногена и тромбина общим объемом 2 мл. Тромбин наносили в двух различных концентрациях, 100 или 1 000 МЕ/мл, а фибриноген - в концентрации 70 мг/мл; и

- 400 мг каждой лиофилизированной смеси (смесь, содержащую 500 или 1 000 МЕ тромбина на 70 мг фибриногена, готовили, как указано в разделе «Материалы и способы») наносили на трафарет из парафильма размером 16 см² (на каждую реплику наносили 100 мг). Затем для предотвращения высыхания ткани на порошок распыляли ФБР до тех пор, пока порошок не становился влажным.

Значения силы адгезии для различных испытываемых композиций представлены на фиг. 1.

Было отмечено, что при формировании фибрина при помощи лиофилизированной композиции для разделения двух слоев ткани кишечника потребовалось большее усилие по сравнению с усилием, необходимым в случае применения жидкой фибриновой уплотнительной композиции (сравните усилия отслаивания при использовании лиофилизированной композиции и при использовании жидкой композиции с одинаковой концентрацией 1 000 МЕ тромбина на 70 мг фибриногена).

Таким образом, было установлено, что сила адгезии между двумя образцами существенно выше при использовании лиофилизированной композиции.

Кроме того, было отмечено, что твердый фибриноген, полученный путем

лиофилизации фибриноген-содержащего раствора с концентрацией фибриногена 20 мг/мл, восстанавливали в водном растворе при комнатной температуре в течение периода времени менее 10 минут. Более низкая концентрация фибриногена приводит к образованию более пористого лиофилизированного остатка и более пористых частиц 5 после помола этого остатка. Считается, что высокая пористость позволяет жидкости легче проникать в частицы, в результате чего сокращается время регидратации.

Пример 2. Уплотняющее свойство различных фибриновых уплотнительных композиций.

Предыдущий пример продемонстрировал, что благодаря применению лиофилизированной композиции повышается сила адгезии. В ходе данного эксперимента 10 исследовали уплотняющие свойства трех различных уплотнительных композиций: смеси лиофилизированных фибриногена и тромбина, жидкой фибриновой уплотнительной композиции и фибринового уплотнителя, полученного путем последовательного нанесения смеси лиофилизированных фибриногена и тромбина и последующего нанесения жидкой фибриновой уплотнительной композиции.

15 Разрушающее испытание [по существу как описано у Vilela et al. «What Is Important For Continent Catheterizable Stomas: Angulations or Extension?» Int Braz J Urol. 2007; том 33(2): 254-263] проводили с целью определить и оценить способность уплотнителя обеспечивать герметичное уплотнение и выдерживать давление.

Давление разрушения в этой модели указывает на способность испытываемой 20 композиции прилипать к ткани и сохранять свою механическую целостность до достижения значения давления, при котором происходит разрыв уплотнения, в результате чего давление резко падает и происходит явное подтекание жидкости.

Как упоминалось ранее, специально разработанную алюминиевую трубку (длиной 27 см) с отверстиями вводили в трубчатый сегмент подвздошной кишки свиньи на 25 глубину 25-30 см. Трубчатый сегмент уплотнили, прижав его с обоих концов к трубке при помощи пластиковых дисков, и затянули при помощи металлических винтов. Алюминиевую трубку подсоединили к источнику воды. После того как в алюминиевую трубку подали воду, вода поступила в пространство между подвздошной кишкой и алюминиевой трубкой через отверстия, предусмотренные по периметру окружности 30 трубы, при этом обратный ток воды в алюминиевую трубку был исключен.

Перед подачей воды при помощи острого лезвия выполнили 10-миллиметровый разрез перпендикулярно длине кишки. Для более точной имитации клинических условий сначала зашили разрез нитью по средней линии (при помощи одной нити 3×0; ETHICON; номер по каталогу ss684), а затем на область разреза через трафарет из парафильма 35 (20×30 мм; 6 см²), помещенный вокруг области разреза, нанесли испытываемую фибриновую уплотнительную композицию. После нанесения испытываемой композиции (см. нанесение ниже по тексту) фибрин оставили на 10 минут для отверждения, а кишечник заполнили водой для исследования его способности выдерживать давление. При поступлении воды в пространство между подвздошной кишкой и трубкой давление 40 воды возрастает до тех пор, пока не откроется уплотнение разреза и не произойдет резкое понижение давления. Установленный уровень давления измеряли при помощи манометра D-logmate 590 MRC (Израиль), соединенного с линией подачи жидкости, до выявления резкого понижения кривой давления. Давление, измеренное до резкого понижения, зарегистрировали и приняли за давление разрушения.

45 Испытываемые композиции наносили следующим образом:
 - Жидкий фибрин наносили путем распыления общим объемом 2 мл (соотношение между двумя компонентами 1:1). В ходе данного эксперимента исследовали только одну концентрацию тромбина: 1 000 МЕ на 70 мг фибриногена.

- 100 мг лиофилизированной смеси рассеивали через трафарет размером 6 см².

Испытывали только одну смесь - смесь, содержащую 1 000 МЕ тромбина на 70 мг (лиофилизированные фибриногенный и тромбиновый компоненты смешивали в соотношении 3,2:1, как описано в разделе «Материалы и способы»). Для предотвращения высыхания ткани после рассеивания лиофилизированной композиции распыляли ФБР.

- Последовательное нанесение выполняли путем рассеивания 100 мг лиофилизированного фибриногена и тромбина (1 000 МЕ тромбина на 70 мг) с последующим распылением жидких фибриногенного и тромбинового компонентов (общим объемом 2 мл). Если слизистая оболочка, окружающая кишечник, не полностью смачивала лиофилизированный порошок, после рассеивания лиофилизированной композиции распыляли ФБР.

Было установлено, что лиофилизированный фибриновый уплотнитель, обладающий большей силой адгезии, чем жидкий фибриновый уплотнитель (см. фиг. 1), оказался неэффективным для обеспечения уплотнения (показал низкое значение давления разрушения; фиг. 2).

Жидкий фибриновый уплотнитель продемонстрировал более высокое уплотняющее действие, чем лиофилизированный фибриновый уплотнитель. Неожиданным образом последовательное нанесение лиофилизированного фибринового уплотнителя перед распылением жидкого фибринового уплотнителя дало более высокий уплотняющий эффект, чем при комбинировании компонентов. Таким образом, было установлено, что уплотняющее свойство при последовательном нанесении порошкового и жидкого уплотнителей выше, чем уплотняющие свойства каждой композиции, используемой по отдельности.

Без привязки к механизму очевидно, что лиофилизированные фибриногенный и тромбиновый порошки растворяются в слизистой оболочке, покрывающей ткань кишечника, формируя таким образом слой фибрина в непосредственной близости к серозной ткани. При распылении жидкого фибринового уплотнителя после нанесения лиофилизированных порошков отмечено взаимоусиливающее уплотнение ткани, как сказано выше (фиг. 2).

Пример 3. Наиболее высокое уплотняющее действие фибриновой композиции, полученной путем нанесения твердой фибриновой уплотнительной смеси с последующим нанесением жидкой фибриновой уплотнительной композиции

В предыдущих примерах показано, что фибриновый уплотнитель, полученный путем последовательного нанесения лиофилизированной смеси фибриногена и тромбина с последующим распылением жидкого фибринового уплотнителя, имеет наиболее высокую уплотняющую способность.

В следующем примере при помощи разрушающего испытания исследуют уплотняющие характеристики при нанесении только одного из лиофилизированных компонентов по отдельности (либо фибриногена, либо тромбина) с последующим нанесением жидкого фибринового уплотнителя. В следующем примере также исследуют вопрос, может ли нанесение на разрез альбумина, высушивающего слизистую оболочку, покрывающую кишечник, способствовать лучшей адгезии фибринового уплотнителя к ткани и тем самым улучшению уплотняющих характеристик уплотнителя.

Для этих целей проводили описанное выше (пример 2) разрушающее испытание и оценивали уплотняющее свойство следующих фибриновых уплотнителей: фибрина, полученного путем нанесения 25 мг лиофилизированного тромбина (получен из раствора, содержащего 1 000 МЕ/мл тромбина, где тромбин является жидким компонентом EVICEL; лиофилизировано 625 мкл раствора) с последующим распылением

2 мл жидкого фибринового уплотнителя; фибрина, полученного путем нанесения 75 мг лиофилизированного фибриногена (получен из раствора, содержащего 20 мг/мл фибриногена, как указано выше) с последующим распылением 2 мл жидкого фибринового уплотнителя; фибрина, полученного путем нанесения 100 мг смеси 5 лиофилизированных фибриногена и тромбина (в соотношении 3,2:1 по весу, как указано выше) с последующим распылением 2 мл жидкого фибринового уплотнителя; и фибриновой композиции, полученной путем нанесения 100 мг сухого альбумина (Sigma; номер по каталогу 078k1503) с последующим распылением 2 мл жидкого фибринового уплотнителя. Все порошки (в том числе сухой альбумин) перед использованием 10 протирали при помощи шпателя через сито с ячейками размером 200 мкм.

Результаты представлены на фиг. 3. Статистические данные были получены путем однофакторного дисперсионного анализа с определением критерия Тьюки-Крамера. Однаковыми буквами обозначены средние величины, существенно не отличающиеся друг от друга ($p>0,05$), а разные буквы используются для обозначения существенно 15 различных средних величин ($p\leq0,05$). Отмечено, что последовательное нанесение твердого фибринового уплотнителя и жидкой фибриновой уплотнительной композиции способствует формированию фибриновой матрицы с превосходящей уплотняющей способностью по сравнению с фибриновой матрицей, полученной путем нанесения только одного из лиофилизированных компонентов по отдельности (либо фибриногена, 20 либо тромбина) с последующим нанесением жидкой композиции. Также было установлено, что нанесение сухого белка (например, альбумина), высушивающего слизистую оболочку, не способствует повышению уплотняющей способности жидкой фибриновой уплотнительной композиции.

25 **Формула изобретения**

1. Способ нанесения фибриновой матрицы на влажную ткань, содержащий:

а) нанесение эффективного количества твердой фибриновой уплотнительной смеси на влажную ткань, где твердая фибриновая уплотнительная смесь содержит твердый компонент, содержащий фибриноген, и твердый компонент, содержащий тромбин; и

30 б) нанесение эффективного количества жидкой фибриновой уплотнительной композиции поверх по меньшей мере части нанесенной твердой фибриновой уплотнительной смеси, где жидкая фибриновая уплотнительная композиция содержит по меньшей мере два отдельных жидких компонента, при этом по меньшей мере один отдельный компонент содержит фибриноген и по меньшей мере второй отдельный компонент содержит тромбин;

35 причем эффективные количества твердой фибриновой уплотнительной смеси и жидкой фибриновой уплотнительной композиции достаточны для получения фибриновой матрицы на влажной ткани, обладающей улучшенной уплотняющей способностью по отношению к нанесению эффективного количества либо жидкой фибриновой уплотнительной композиции, либо твердой фибриновой уплотнительной смеси.

40 2. Способ по п. 1, в котором уплотняющая способность возрастает по меньшей мере в 1,2 раза по отношению к нанесению жидкой фибриновой уплотнительной композиции.

3. Способ по п. 1, в котором уплотняющая способность

45 возрастает приблизительно в 1,7 раза по отношению к нанесению жидкой фибриновой уплотнительной композиции.

4. Способ по п. 1, в котором нанесение осуществляется на ткань, которая является необогащенной, имеет небольшое количество, недостаточное количество или не имеет кровеносных сосудов, и (или) на ткань, медленно выделяющую текучую среду или

некровоточащую.

5. Способ по п. 1, в котором фибриноген-содержащий компонент твердой фибриновой уплотнительной смеси готовят на стадии высушивания фибриноген-содержащего раствора с концентрацией фибриногена менее 25 мг/мл.

5 6. Способ по п. 5, в котором концентрация фибриногена составляет приблизительно 20 мг/мл.

7. Способ по п. 1, в котором нанесение осуществляется на тканевый дефект.

8. Способ по п. 1, в котором нанесение осуществляется по меньшей мере на часть скобочного или ниточного шва, имеющегося на ткани.

10 9. Способ получения фибриновой матрицы на влажной ткани, включающий следующие стадии: предоставление твердого компонента, содержащего фибриноген; предоставление твердого компонента, содержащего тромбин; предоставление жидкой фибриновой уплотнительной композиции, где жидкая фибриновая уплотнительная композиция содержит по меньшей мере два отдельных жидких компонента, при этом

15 по меньшей мере один отдельный компонент содержит фибриноген и по меньшей мере второй отдельный компонент содержит тромбин; нанесение эффективного количества твердых компонентов по меньшей мере на часть влажной поверхности; и нанесение эффективного количества жидкой фибриновой уплотнительной композиции поверх по меньшей мере части нанесенных твердых компонентов.

20 10. Способ по п. 9, в котором влажная ткань не содержит фибриногена.

11. Способ по п. 9, в котором жидкую фибриновую уплотнительную композицию предоставляют в твердой форме и восстанавливают перед ее нанесением.

12. Способ по п. 9, в котором жидкую фибриновую уплотнительную композицию предоставляют в замороженном виде и размораживают перед ее нанесением.

25 13. Способ по п. 9, в котором твердый компонент предоставляют в жидкой форме и высушивают перед его нанесением.

14. Способ по п. 9, в котором твердый компонент предоставляют в замороженном виде и высушивают перед его нанесением.

30 15. Способ по п. 9, в котором твердые компоненты наносят одновременно или один за другим.

16. Способ по п. 9, в котором жидкие компоненты наносят одновременно или один за другим.

17. Способ по п. 9, в котором твердые компоненты представлены в виде смеси.

35 18. Способ по п. 9, в котором ткань является необогащенной, имеет небольшое количество, недостаточное количество или не имеет кровеносных сосудов и (или) медленно выделяет текучую среду или не кровоточит.

19. Фибриновая матрица, получаемая способом по п. 9.

20. Способ обработки или предотвращения дефекта на влажной ткани нуждающегося в обработке объекта, включающий следующие стадии:

40 а) предоставление компонента, содержащего твердый фибриноген, предоставление компонента, содержащего твердый тромбин; и предоставление жидкой фибриновой уплотнительной композиции, где жидкая фибриновая уплотнительная композиция содержит по меньшей мере два отдельных жидких компонента, при этом по меньшей мере один отдельный компонент содержит фибриноген и по меньшей мере второй

45 отдельный компонент содержит тромбин;

б) нанесение эффективного количества твердых компонентов из п. а) по меньшей мере на часть влажной ткани; и

с) нанесение эффективного количества жидкой фибриновой уплотнительной

композиции из п. а) поверх по меньшей мере части нанесенных твердых компонентов.

21. Способ по п. 20, в котором влажная ткань является необогащенной, имеет небольшое количество, недостаточное количество или не имеет кровеносных сосудов и (или) медленно выделяет текучую среду или не кровоточит.

5 22. Способ по п. 20, в котором дефект представляет собой подтекание в ткани.

23. Способ по п. 22, в котором просачивающееся вещество является необогащенным, имеет небольшое количество, недостаточное количество или не имеет плазмы или компонентов крови.

24. Способ по п. 20, в котором жидкую фибриновую уплотнительную композицию

10 предоставляет в твердой форме и восстанавливают перед ее нанесением.

25. Способ по п. 20, в котором жидкую фибриновую уплотнительную композицию предоставляют в замороженном виде и размораживают перед ее нанесением.

26. Способ по п. 20, в котором твердый компонент предоставляют в жидкой форме и высушивают перед его нанесением.

15 27. Способ по п. 20, в котором твердый компонент предоставляют в замороженном виде и высушивают перед его нанесением.

28. Способ по п. 20, в котором твердые компоненты наносят одновременно или один за другим.

29. Способ по п. 20, в котором жидкие компоненты наносят одновременно или один 20 за другим.

30. Способ по п. 20, в котором твердые компоненты из п. а) представлены в виде смеси.

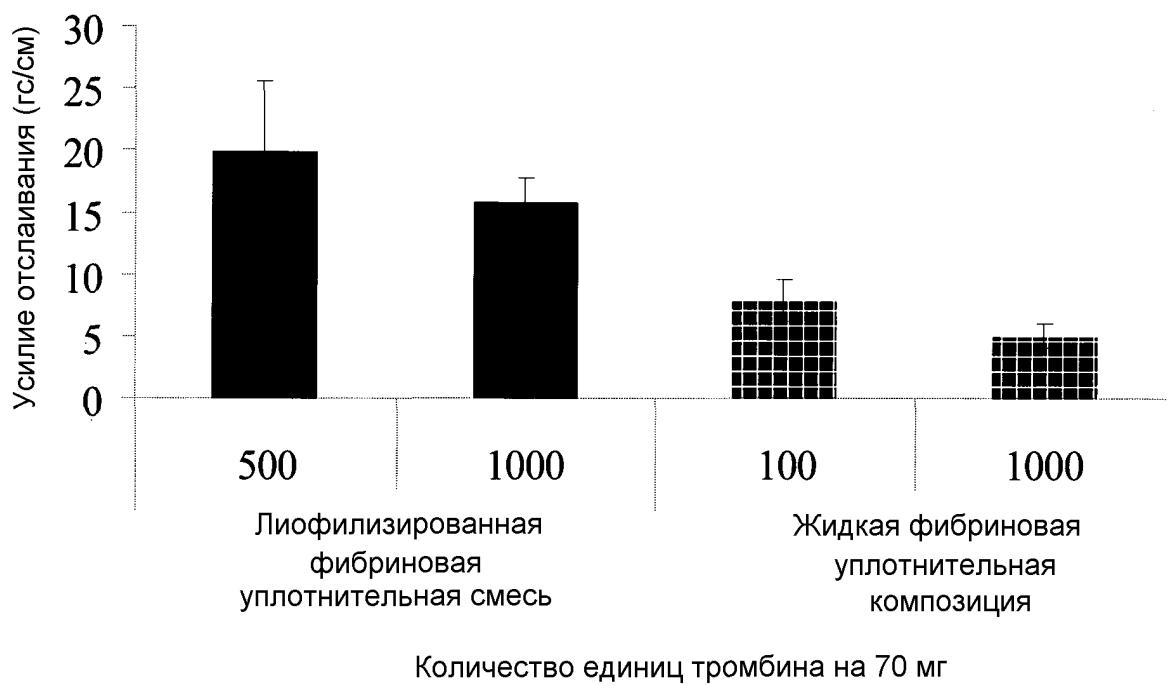
31. Способ по п. 20, в котором дефект представляет собой скобу или нить.

32. Набор для нанесения на влажную ткань нуждающегося в обработке объекта, 25 содержащий: (i) контейнер(ы), содержащий(ие) твердые компоненты, содержащие (a) фибриногенный компонент и (b) тромбин, причем компоненты (a) и (b) находятся в отдельных контейнерах или в одном и том же контейнере в виде смеси; и (ii) по меньшей мере два отдельных контейнера, причем по меньшей мере один отдельный контейнер содержит жидкий, замороженный или твердый фибриногенный компонент и по меньшей 30 мере второй отдельный контейнер содержит жидкий, замороженный или твердый тромбин, причем если по меньшей мере два отдельных контейнера из п. (ii) содержат твердые компоненты, то компоненты (a) и (b) находятся в одном и том же контейнере в виде смеси.

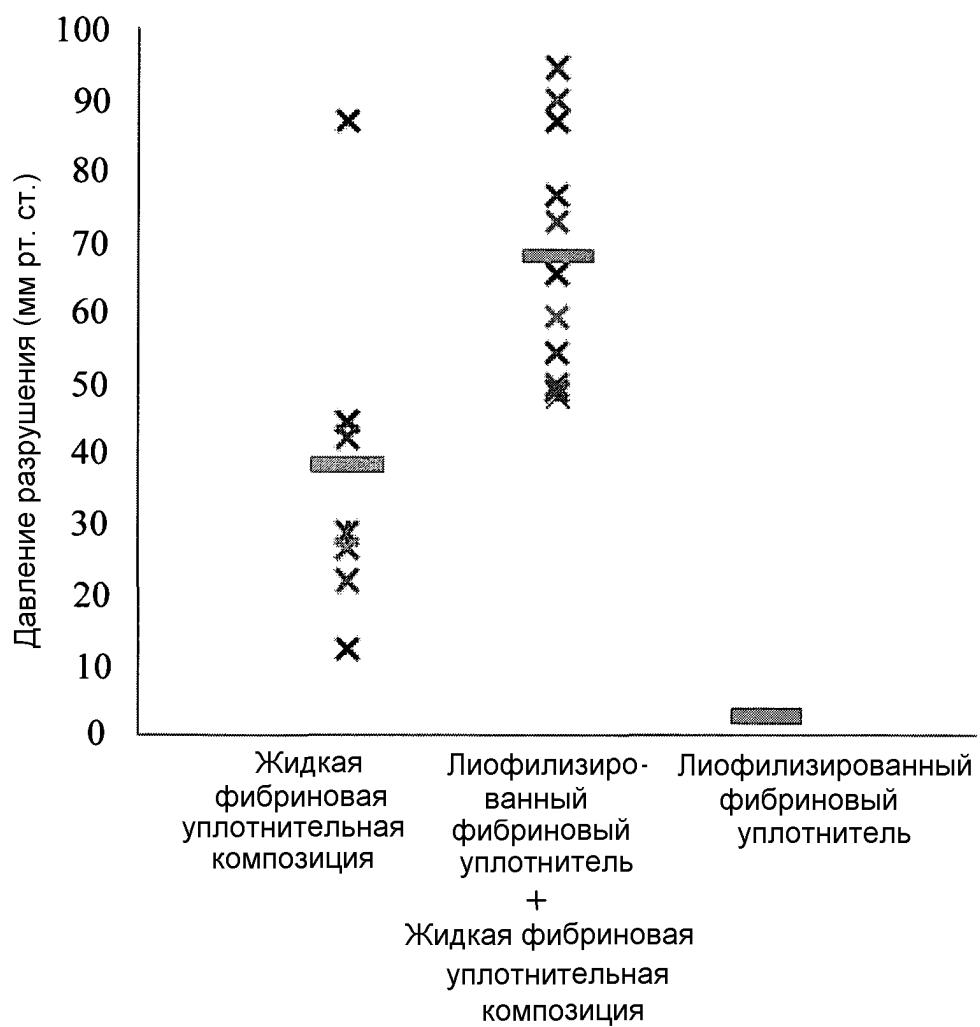
33. Набор по п. 32 для нанесения на влажную поверхность.

35 34. Набор по п. 32 для уплотнения подтеканий в тканях, которые являются необогащенными, имеют небольшое количество, недостаточное количество или не имеют кровеносных сосудов, и (или) тканях, медленно выделяющих текучую среду или некровоточащих.

35 35. Способ обработки или предотвращения дефекта на влажной ткани нуждающегося 40 в обработке объекта, содержащий введение терапевтически эффективного количества фибриновой матрицы по п. 19.



ФИГ. 1



ФИГ. 2

