



(12) PATENT

(19) NO

(11) 330580

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

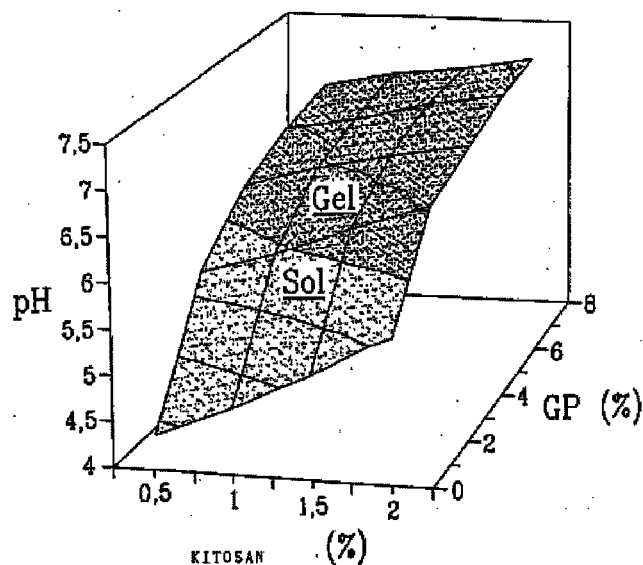
A61L 24/08 (2006.01)

A61L 27/20 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20000593	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1998.04.06 PCT/CA1998/00326
(22)	Inng.dag	2000.02.04	(85)	Videreføringsdag	2000.02.04
(24)	Løpedag	1998.04.06	(30)	Prioritet	1997.08.04, CA, 2212300
(41)	Alm.tilgj	2000.03.29			
(45)	Meddelt	2011.05.16			
(73)	Innehaver	Bio Syntech Canada Inc, 475, boulevard Armand Frappier, Parc Scientifique et de Haute Technologi, Laval, QC H7V 4A7, Canada			
(72)	Oppfinner	Abdellatif Chente, Kirkland, QC, Canada Cyril Chaput, Montreal, QC, Canada Christèle Combes, Ramonville Saint-Agne, Frankrike Fayrouz Jalal, Montreal, QC, Canada Amine Selmani, Laval, QC, Canada			
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 6963 St Olavs Plass, 0130 OSLO, Norge			
(54)	Benevnelse	Polysakkaridbasert gel, fremgangsmåte for fremstilling av denne og anvendelse av gelen fir fremstilling av biokompatible, nedbrytbare materialer			
(56)	Anførte publikasjoner	US 5587175 A , US 4659700 A			
(57)	Sammendrag				

Den foreliggende oppfinnelse angår en temperaturkontrollert pH-avhengig dannelse av ioniske polysakkaridgeler, såsom kitosan/organofosfat vandige systemer, og fremgangsmåte til fremstilling derav. Mens kitosan vandige oppløsninger er pH-avhengige gelatinerende systemer, forer tilsetning av et monofosfat dibasisk salt av polyol eller sukker til kitosan vandige oppløsninger til ytterligere temperaturkontrollert pH-avhengig gelatinerings. Faste organofosfatsalter (1-20 % vekt/vol) blir tilsatt og oppløst ved lav temperatur (10°C) i 0,5-4,0 % vekt/vol kitosan i vandige sure oppløsninger. Vandige kitosan/organofosfatoppløsninger blir initielt lagret ved lave temperaturer (4°C), deretter endotermisk gelatinert innenfor temperaturområdet fra 30-60°C. Kitosan/organofosfatoppløsninger transformeres hurtig til geler ved den ønskede gelatineringsstemperatur. Gelatineringsstemperatur kan være ex vivo i alle mottakere eller former, eller in situ i dyr eller mennesker (in vivo) slik at den fyller opp en vevsdefekt eller hulrom.



Den foreliggende oppfinnelse angår en temperaturkontrollert, pH-avhengig dannelse av ioniske polysakkaridgeler, såsom kitosan/organofosfat vandige systemer, og fremgangsmåter til fremstilling derav.

- 5 Kitosan er en kommersielt tilgjengelig billig polymer, et derivat av eller poly(N-acetyl-glukosamin) materialer. Kitosan er hovedsakelig sammensatt av D-glukosaminenheter som er dannet gjennom katalysert N-deacetylering av kitin, en uoppløselig biopolymer ekstrahert fra harde skall hos marine levende dyr (fisker, krepsdyr, reker, krabber, o.s.v.) eller syntetisert av naturlige organismer
- 10 (zygomyseter, sopper, o.s.v.). Kitosan er forventet å ha gode viskoelastiske egenskaper og har adekvat vevskompatibilitet og biodegraderbarhet som gjør den ideel for bioaktive og resorberbare implantater. Poly-D-glukosaminkjeder er også kjent for potensielt å tilhefte et stort antall proteoglykanmolekyler og sameksistere med fibrøse kollagener for å danne vandige geler. Det er ment at rollen til
- 15 proteoglykaner i gelen er å tilbakeholde vann og tilføre egnet viskoelastisitet. Resulterende ekstracellulære matriser er forventet å gi kompatible omgivelser for cellulær proliferering og vevsdannelse, spesielt for hud, ligament, ben og bruskceller. Som en konsekvens tiltrekker kitosan stor interesse for bærende eller understøttende materialer av biokonstruerte kunstige vev.
- 20 Videre har kitin og delvis-acetylt kitosanderivater i stor grad blitt undersøkt for terapeutiske stoffer eller implanterbare materialer. Biokompatibilitet av kitosanbaserte materialer er blitt evaluert spesifikt for blod, sår og ben. Immunologiske og genotoksiske aktiviteter såvel som stimulerende virkninger på makrofagvirkning er også blitt studert for forskjellige kitosanmaterialer.
- 25 Kitosan og dets derivater er blitt i stor grad undersøkt for legemiddelleveringssystemer gjennom geler (Ohya Y. et al. (1993) J. Microencapsulation, 10(1):1-9). Peptidlevering med kitosan ble foreslått å bli utført nasalt. Kationiske kolloidale legemiddelbærere ble foreslått fra kitosan-polykaprolaktonsystemer. Sårheling og rekonstruktive anordninger laget av
- 30 kitosanmateriale er blitt foreslått for åpne eller kornea-sår, periodontalt vev og hud. Kitosan ble spesielt evaluert i ben og dura mater og som et hemostatisk middel.
- 35 Innfanging av levende biologiske midler (celler, enzymer, etc.) er blitt undersøkt med forskjellige kitosanprodukter, i nesten alle tilfeller har midlertid levende celler blitt innkapslet i alginat/kitosan mikrokuler. Innkapsling av kondrocytter (bruksceller) ble foreslått i kalsium-alginat/kitosankuler.
- Gelatering av kitosan gjennom polyfosfater er blitt utviklet for innkapslende celler såsom neurale eller muskuluskjellelt vev. Generelt ble kitosan i et syre/vann-medium oppløst med cellesuspensjoner, og den resulterende blanding ble helt i en

- bufret penta-natrium tri-polyfosfat slik at det ble dannet celleoppladede kitosankuler og kapsler. Innfanging av neurale celler i fosfat-gelerte kitosankuler har ført til god cellulær viabilitet men lav prolifereringshastighet (Zielinski, B.A. et al. (1994) Biomaterials, 15(13):1049-1056). Ingen store eller spesifikt
- 5 tredimensjonalt formede materialer ble foreslått (Zielinski, B.A. et al. (1994) Biomaterials, 15(13):1049-1056). Polysakkaridkapsler er blitt foreslått for innfanging av fysiologisk aktive celler såsom Langerhanske øyer (US patent nr. 4 391 909). Kitosan/hydroklorid cisplatinblanding ble tverrbundet og foreslått som legemiddelleveringssystemer.
- 10 Kitosanderivater er blitt inkorporert i tallrike bærersammensetninger og legemiddelformuleringer. Kitosanmaterialer såsom sårfylende materialer eller kontraseptive produkter ble også foreslått (US patent nr. 4 956 350 og 4 474 769). Kitosangeler ble igjen rapportert som bærere for immobiliserende og innkapslende levende biomaterialer såsom celler, bakterier og sopp (US patent nr. 4 647 536).
- 15 Frie legemiddelsystemer laget av kitosan ble også foreslått for in situ gelatering og forming (US patent nr. 5 422 116).
- I US patent nr. 4 659 700 ble kitosangeler fremstilt fra glycerol/syre/vann-systemer som biodegraderbare bærere for legemiddellevering. De resulterende kitosangeler ble rapportert å forbli meget stabile, og opprettholdt i tredimensjonal form i lange
- 20 perioder og over et stort område av temperaturer, spesielt mellom 4 °C og 40 °C. Geler og gellignende materialer ble prosessert ved å oppløse 1,0-4,0 % (vekt/vol) kitosan i syre-vann-glycerol-oppløsninger hvori eddiksyre, maursyre eller propionsyre og 10-90 % glycerolandeler ble det fortrinnsvis brukt, og ved nøytralisering med flytende baser såsom natrium-, ammonium- og
- 25 kaliumhydroksider eller ammoniakkdamper. pH-verdien til de resulterende kitosan/glycerol-gelmaterialer er ca. pH 7,0. Etter nøytralisering forandres de resulterende blandinger til geler ved henstand, idet slike geler tilsynelatende resulterer fra interaksjon av kitosan, glycerol og vann. Intet fri glycerol eller vann ble rapportert å være tilstede. Det skal merkes imidlertid at slike tredimensjonalt
- 30 formede kitosan-glycerol-geler vil skje bare når oppløsningen er tidligere nøytralisert med en base. Et stykke tredimensjonale geler kan støpes lett såvel som gellignende membraner. Rollen til glycerolkomponenten og kitosan-glycerol-interaksjonen er ikke utredet.
- In situ dannede geler ble også foreslått med ioniske sakkarider i US patent nr.
- 35 5 587 175. En sammensetning kan anvendes som en medisinsk anordning for legemiddellevering, applisering av et diagnostisk middel, eller forhindring av postoperative adhesjoner, og er sammensatt av en vandig flytende vehikkel som er i stand til å bli gelert in situ. Det inkluderer minst ett ionisk polysakkarid, minst én filmdannende polymer og et legemiddel eller farmasøytisk middel, vann og

eventuelt et motion i stand til å gelatere det ioniske polysakkarid (US patent nr. 5 687 175). Gelateringen nås imidlertid ved interaksjon mellom det ioniske polysakkarid og den filmdannende polymer, eller ved motionindusert tverrbinding av det ioniske polysakkarid. Andre in situ dannende geler er basert på

5 polyoksyalkylensammensetning (US patent nr. 4 184 618) eller polyoksyalkylen/polysakkaridblanding (US patent nr. 5 126 141) eller alginat/kationblending in situ (US patent nr. 4 185 618 og 5 266 326).

Det er meget ønskelig å bli tilveiebrakt med en temperaturkontrollert, pH-avhengig dannet polysakkaridgel som kan anvendes til å innkapsle celler og cellulært

10 materiale mens deres biologiske aktivitet opprettholdes.

Det vil være meget ønskelig å bli tilveiebrakt med en slik polysakkaridgel som ville opprettholde sin faste eller geltilstand ved den fysiologiske temperatur eller 37 °C.

En hensikt med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe en

15 temperaturkontrollert, pH-avhengig dannet polysakkaridgel som kan anvendes til å innkapsle celler eller cellulært materiale som opprettholder sin biologiske aktivitet. En annen hensikt med den foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe en polysakkaridgel som ville opprettholde sin faste eller geltilstand ved den fysiologiske temperatur eller 37 °C.

20 En annen hensikt med den foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe fremgangsmåte til fremstilling av en slik polysakkaridgel.

I overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse er det tilveiebrakt en polysakkaridgel som omfatter:

- a) 0,1-5,0 vekt% vann eller et kitosan eller kitosanderivat; og
 - 25 b) 1,0-20 vekt% av et salt av polyol eller sukker valgt fra gruppen som består av monofosfat dibasisk salt, monosulfatsalt og et monokarboksylysyesalt av polyol eller sukker;
- hvor nevnte gel er indusert og stabil innenfor et temperaturområde fra 20-70°, og er tilpasset å være formet, og/eller gelatinert in situ i et vev, organ eller hulrom i et
- 30 dyr eller menneske.

Saltet kan være ethvert av de følgende, eller i enhver av de følgende kombinasjoner:

- a) et monofosfat dibasisk salt valgt fra gruppen som består av glycerol, som omfatter glycerol-2-fosfat, sn-glycerol 3-fosfat og L-glycerol-3-fosfatsalter;
- 35 b) et monofosfat dibasisk salt og nevnte polyol er valgt fra gruppen som består av histidinol, acetol, dietylstillbesterol, indol-glycerol, sorbitol, ribitol, xylitol, arabinitol, eryteritol, inositol, mannitol, glycitol og en blanding derav;

- c) et monofosfat dibasisk salt og nevnte sukker som er valgt fra gruppen som består av fruktose, galaktose, ribose, glukose, xylose, ramnulose, sorbose, erytrulose, deoksy-ribose, ketose, mannose, arabinose, fukulose, fruktopyranose, ketoglukose, sedoheptulose, trehalose, tagatose, sukrose, allose, treose, xylulose, heksose, metyltio-ribose, metyltio-deoksy-ribulose, og en blanding derav;
- d) et monofosfat dibasisk salt og nevnte polyol som er valgt fra gruppen som består av palmitoyl-glycerol, linoleoyl-glycerol, oleoyl-glycerol, arakidonoyl-glycerol og en blanding derav; og
- e) glycerofosfatsalt er valgt fra gruppen som består av glycerofosfatdinatrium, glycerofosfatdikalium, glycerofosfatkalsium, glycerofosfatbarium og glycerofosfatstrontium.

En foretrukket gel i henhold til én utforming av foreliggende oppfinnelse er valgt fra gruppen som består av kitosan- β -glycerofosfat, kitosan- α -glycerofosfat, kitosan-glukose-1-glycerofosfat, og kitosan-fruktose-6-glycerofosfat.

- De faste partikkel eller vannoppløselige tilsetninger kan inkorporeres i nevnte polysakkaridgel før gelateringen.

Legemidlene, polypeptidene eller de ikke-levende farmasøytiske midler kan inkorporeres i nevnte polysakkaridgel før gelateringen.

- De levende mikroorganismer, planteceller, dyreceller eller humane celler kan innkapslet i nevnte polysakkaridgel før gelateringen.

Gelen kan dannes in situ subkutant, intraperitonealt, intramuskulært og i biologisk bindevev, bedefekter, frakturer, leddhuler, kroppsrør eller hulrom, øyehulen eller faste tumorer.

- Gelen i henhold til foreliggende oppfinnelse kan anvendes som en bærer til å levere farmasøytiske midler in situ.

I henhold til foreliggende oppfinnelse er det også tilveiebrakt en fremgangsmåte til å produsere en polysakkaridgeloppløsning i henhold til foreliggende oppfinnelse, som omfatter trinnene:

- a) å oppløse et kitosan eller et kitosanderivat i en vandig sur oppløsning med en pH-verdi fra ca. 2,0 til ca. 5,0 for å oppnå en vandig polysakkaridsammensetning som har en konsentrasjon på 0,1-5,0 vekt% av kitosan eller et kitosanderivat;
- b) å oppløse 1,0-20 vekt% av et salt av polyol eller sukker, hvori nevnte salt fra gruppen som består av monofosfat dibasisk salt, monosulfatsalt og et monokarboksytsalt, i nevnte vandige polysakkaridsammensetning fra trinn a) for å oppnå en polysakkaridoppløsning, hvori nevnte polysakkaridgel har en

konsentrasjon på 0,1-5 vekt% av kitosan eller et kitosanderivat, og en konsentrasjon på 1,0-20 vekt% av et salt av en polyol eller sukker, og har en pH-verdi fra. ca. 6,4 til ca. 7,4.

Denne fremgangsmåten kan videre omfatte trinn c) etter trinn b),

- 5 c) å oppvarme nevnte polysakkaridgeloppløsning ved en fasthetsdannende temperatur som strekker seg fra ca. 20 °C til ca. 80 °C til dannelse av en polysakkaridgel.

Et farmasøytisk middel kan tilsettes polysakkaridgeloppløsningen fra trinn b).

- 10 Den vandige syreoppløsning kan fremstilles fra organiske eller uorganiske syrer valgt fra gruppen som består av eddiksyre, askorbinsyre, salisylsyre, fosforsyre, saltsyre, propionsyre, maursyre, og en blanding derav.

Polysakkaridgeloppløsningen kan holdes i en stabil ikke-gelert flytende form ved en temperatur som strekker seg fra ca. 0 °C til ca. 20 °C.

- 15 En solidifiserende temperatur strekker seg fra ca. 37 °C til ca. 60 °C, fortrinnsvis ca. 37 °C.

Molekylvekten til kitosan strekker seg fra ca. 10000 til 200000.

- 20 Polysakkaridgelen er termoirreversibel eller termoreversibel ved å justere pH-verdien til polysakkaridgelen, slik at når pH-verdien til nevnte polysakkaridgeloppløsning er > 6,9, eller når pH-verdien til nevnte polysakkaridgeloppløsning er < 6,9.

De faste partikkeltilsetningene kan settes til polysakkaridgeloppløsningen i trinn b).

- 25 Polysakkaridgeloppløsningen kan innføres i en dyre- eller menneskelig kropp ved injeksjon eller endoskopisk administrering, og gelateres in situ ved en temperatur på ca. 37 °C.

I hēnhold til foreliggende oppfinnelse er det også tilveiebrakt anvendelse av polysakkaridgelen for å fremstille biokompatible degraderbare materialer brukt i kosmetikk, farmakologi, medisin, og/eller kirurgi.

- 30 Gelen kan inkorporeres som et hele, eller som en komponent, i implanterbare anordninger eller implantater for å reparere, rekonstruere og/eller erstatte vev og/eller organer, enten hos dyr eller mennesker.

Gelen kan brukes som et hele, eller som en komponent av, implanterbare, transdermale eller dermatologiske legemiddelleveringssystemer.

Gelen kan brukes som et hele, eller som en komponent av oftalmologiske implantater eller legemiddelleveringssystemer.

- 5 Gelen kan brukes til å produsere celleopplastede kunstige matriser som blir applisert til de konstruerte og kultur av biokonstruerte hybridmaterialer og vevsekvivalenter.

De opplastede celler kan velges fra gruppen som består av kondrocytter (leddbrusk), fibrokondrocytter (menisk), ligamentfibroblaster (ligament), hudfibroblaster (hud), endocytter (sener), myofibroblaster (muskel), mesenchymale stamceller og keratinocytter (hud).

- 10 Den celleopplastede gel og avledede produkter er beregnet for kultur og konstruksjon av kunstig leddbrusk og bruskvev og organer, enten for kirurgisk eller laboratorietestingsanvendelser.

- 15 Den celleopplastede gel og avledede produkter er bestemt for utvikling og konstruksjon av levende kunstige substitutter for ligamenter, sener, hud, benmuskler og ethvert metabolsk organ, enten for kirurgisk eller laboratorietesteanvendelser.

Den celleopplastede gel og avledede produkter blir anvendt som levende substitutter til erstatning av leddbrusk, fibrobrusker, bruskorganer, ligamenter, sener, benvev eller hud.

- 20 Celleoppladede hydrogel blir gelatert in situ for å indusere en ektopisk dannelse av fibrobruskliggende eller brusklignende vev.

- 25 Polysakkaridgeloppløsning kan anvendes til å produsere en avledet gel eller hydrogel ved 1) å inkorporere og oppløse minst én komplementær polymer i nevnte polysakkaridgeloppløsning, og 2) ved å tillate nevnte polysakkarid og komplementære polymer å virke sammen i en tilstrekkelig tidsperiode til å resultere i en klar tredimensjonal gel i et temperaturområde mellom 20-60°C.

Den komplementære polymer er en ikke-ionisk vannoppløselig polysakkarid eller en hydroksyalkylcellulose.

- 30 For hensikten til den foreliggende oppfinnelse er de følgende betegnelser og uttrykk definert nedenfor.

Betegnelsen "polysakkaridgeloppløsning" er ment å bety en polysakkaridoppløsning i en stabil ugelatert flytende form ved en temperatur som strekker seg fra ca. 0 °C til ca. 15 °C, som kan gelateres eller forandres til en geltilstand når den oppvarmes til den gelaterende temperatur.

Betegnelsen "gelaterende temperatur" er ment å bety enhver temperatur som strekker seg fra ca. 20 °C til ca. 80 °C, fortrinnsvis mellom 37 °C til ca. 60 °C, mer fortrinnsvis ved ca. den fysiologiske temperatur eller 37 °C.

- 5 Uttrykket "salter av polyoler eller sukre" er ment å bety monofosfat dibasiske salter, monosulfatsalter og monokarboksylysyrer salter av polyoler eller sukre.

Den foreliggende oppfinnelse inkluderer fremgangsmåte til å danne forskjellige gelaterte materialer, hvis materialer enten blir støpt (spesiellagede former, rør, membraner, filmer...) eller dannet in situ i biologiske omgivelser (fylling av vevsdefekter).

- 10 I en foretrukket utforming har den kitosan/organofosfat vandige oppløsningen en pH-verdi over pKa til kitosan og forandres til en fast gel ved termisk stimulering. Denne polysakkaridgel kan brukes som en bærer for legemidler eller som et ikke-levende terapeutisk leveringsystem, som substituerende materialer for vev og organer og som innkapslende midler for levende celler eller mikroorganismer.
- 15 Kitosan/organofosfatgelmatriser blir hurtig dannet ved temperaturer mellom 30 °C og 60 °C. Kitosan/organofosfat vandig system blir brukt som injiserbare fyllmaterialer, injisert og gelatert in situ for oppfylling og reparering av vevsdefekter.

- 20 Glycerol-2-fosfat, glycerol-3-fosfat og glukose-1-fosfat baserte salter er de foretrukne beskrevne salter i henhold til foreliggende oppfinnelse.

- Kitosan/polyol- eller sukker-fosfat og kitosan/polyol- eller sukker-sulfatgeler kan anvendes ved kirurgiske rekonstruktive og regenerative anvendelser og med legemiddelleveringshensikt. De tilveiebringer termisk reversible eller irreversible bioeroderbare polymere geler med biologiske velkjente og kompatible
- 25 komponenter over et bredt område av medisinske/bioteknologiske applikasjoner.

Fig. 1 illustrerer forekomsten av termisk kontrollert Sol til Gel overgang (geldannelse) avhengig av pH-verdien til kitosan/glycerofosfat vandig oppløsning karakterisert ved kitosan konsentrasjonen (vekt%), glycerofosfatkonsentrasjonen (vekt%) og pH-verdi til kitosan/glycerofosfat vandig oppløsning;

- 30 Fig. 2 illustrerer Sol/Gel diagrammet for kitosan/glycerofosfatssystemene presentert som et forhold mellom det molare innhold i glycerofosfat og forholdet av det molare innhold av glycerofosfat ved det molare innhold av glukosaminenheter;

Fig. 3 illustrerer Sol-Gel overgangen (geldannelse) indusert av varme og fulgt mot temperaturen ved reologisk måling av modulusparametre og viskositetsparametre;

Fig. 4 illustrerer mikrostrukturene til kitosan/glycerofosfatgelene dannet in vitro sett som observert ved scanning elektronmikroskopi på gelprøver som var blitt frysetørket ved -30°C og under 8 timer; og

Fig. 5 illustrerer kitosan/glycerofosfatoppløsninger som blir injisert i kaniner, subkutant og i leddet i ben eller subkutant på torso, og tillatt å gelateres in situ ved kroppstemperatur.

Kitosan blir oppløst i vandige sure oppløsninger slik at det oppnås klare vandige kitosanoppløsninger som har pH-nivåer innenfor området 4,3-5,6.

Kitosanoppløsningene kan steriliseres gjennom filtrering eller damp-autoklaving, og lagres ved lave pluss-temperaturer (4°C). Organofosfatkomponenten ble tilsatt kitosanoppløsningen, fortrinnsvis ved lave pluss-temperaturer (4°C), deretter blir den vandige kitosan/organo-fosfatblandingen gelatert termisk, gjennom en endotermisk mekanisme, innenfor temperaturområdet fra $30-60^{\circ}\text{C}$. Når den er dannet er den resulterende kitosan/organofosfatgelen termisk stabil ved oppvarming, selv opp til 180°C (i autoklav), særlig i vevskulturmedium. Bioinnkapsling med kitosan/organofosfatgeler blir oppnådd ved å inkorporere de levende cellene i den ugelaterte vandige kitosan/organofosfatoppløsningen ved lav temperatur (4°C). Deretter blir temperaturen til den resulterende blanding av kitosan/organofosfat-celler hevet til og opprettholdt ved 37°C hvor gelatering skjer innenfor ~ 1 time. Organosulfater eller monokarboksylysesalter av polyoler eller sukre spiller en lignende rolle som organofosfater.

Kitosan og dets derivater er relativt billige og kommersielt tilgjengelige materialer og representerer en attraktiv gruppe av biokompatible og degraderbare polymerer. De har faste eller oppløsningsegenskaper som kan modifiseres ved å forandre deres kjemiske sammensetning og/eller fysikokjemiske egenskaper. Acetyleringsgraden og molekylvekt er blitt vist å bli i stor grad influert av oppløsningens egenskaper, enzymatisk degraderbarhet og biologisk aktivitet. Kjemiske modifikasjoner, f.eks. er blitt foreslått å nøytralisere eller modifisere kitosankjeder ved å inkorporere karboksylysyre, acetat, glutaminsyre, karboksymetyl- eller sulfatgrupper. Kjemisk tverrbinding (anhydrid, glutaraldehyd, glutamat ravsyre vekstor-PEG...) av kitosan makromolekyler induserer kovalente bindinger for å danne forgrenede eller podede nettverk.

Fysikalsk gelatering av kitosan og dets derivater kan oppnås gjennom forskjellige teknikker:

- a) nøytralisering (NaOH , KOH , NH_4OH ...) som induserer hydrogenbinding mellom kitosankjedene;
- b) ionisk kompleksing med divalente anioner (borat, molybdat, polyfosfat, sulfatsalter og sulfaterte makromolekyler...) som induserer rene elektrostatiske

interaksjoner;

c) kompleksering med anioniske surfaktanter (natriumalkylsulfat...) som induserer elektrostatiske interaksjoner og surfaktant-surfaktant hydrofobe interaksjoner.

- 5 I henhold til foreliggende oppfinnelse er det foreslått en ny gelateringsmekanisme som kombinerer hydrogenbinding, elektrostatiske interaksjoner og kitosan-kitosanhydrofobe interaksjoner. Den kan bare oppnås gjennom komplekse interaksjoner mellom kitosan makromolekyler, vannmolekyler og monofosfat dibasiske salter av polyoler eller sukre.
- 10 Polyoler blir ofte tilsatt sammensetninger for å forbedre egenskapene. Sorbitol og mannitol er for tiden brukt som tonisitetsforøkende midler. Glycerol og polyetylglycerol er foreslått som plastiserende midler. Polyoler (-ol: glycerol, sorbitol...) og sukre (-ose: fruktose, glukose, galaktose...) ble brukt som termisk stabiliserende midler for proteiner i oppløsninger (Back, J.F: et al. (1979)
- 15 Biochemistry, 18(23):5191-5196). Avhengig av de valgte molekyler ble de funnet å lage eller bryte strukturering av vann, danne hydrogenbinding, elektrostatisk eller hydrofob interaksjon, og presentere endotermiske overganger (Back, J.F. et al. (1979) Biochemistry, 18(23):5191-5196). Polyoler og sukre stabiliserer proteiner til varmedenaturering skjønt deres struktur påvirker vannet og styrken av hydrofobe
- 20 interaksjoner.
- Beta-glycerofosfat dinatrium eller kalsiumsalt, eller glycerol-2-fosfat dinatrium eller kalsiumsalt er et godt undersøkt molekyl i biologiske vitenskaper. Det er vurdert slik at et substrat for alkalisk fosfatase (AL). Glycerofosfat er i stor grad brukt som et cellekulturmediumsupplement for å dyrke celler isolert fra muskulo-
- 25 skjelettvev, og er blitt vist å indusere eller opprettholde syntesen av spesifikke matrikskomponenter når det leveres til ben/bruskceller i kultur (Chung, C.-C. et al. (1992) Calcif. Tissue Int., 51:305-311; Bellows, C.G. et al. (1992) Bone and Mineral, 17:15-29). Gelatering av kitosan vil skje med enhver kvalitet angitt eller renhetsangitt glycerolfosfat mens innkapsling av levende biologiske organismer vil
- 30 kreve cellekulturtestet glycerofosfat. Alfa-glycerofosfat dinatrium eller kalsiumsalt, eller glycerol-3-fosfat dinatrium eller kalsiumsalt, eller glycerol-3-fosfat dinatrium eller kalsiumsalt, er også et organisk salt av biologisk viktighet (Chung, C.-H. et al. (1992) Calcif, Tissue Int., 51:305-311). Glycerofosfatsalter blir utfelt fra glycerofosforsyrer som blir oppnådd ved hydrolyse av lektin, et
- 35 velkjent biologiske molekyl og fosfatider fra egg, soyabønner og fisk. Glycerofosforsyrer er til stede i to isomeriske strukturer, alfa og beta, hvori beta-glycerolfosforsyren er optisk inaktiv og alfa-glycerofosforsyren er optisk aktiv. Glycerofosforsyren er fysiologisk aktiv forbindelse, som er involvert i katabolismen av karbohydrater. Glycerofosfathydrogenase ble også funnet aktiv i

nervevev mens glycerofosfat ble rapportert å akselerere hastigheten av avfarging av metylenblått ved marsvinnener. Alfa-glycerofosfat interagerer med pyrodruesyre gjennom oksidasjon-reduksjonsreaksjoner for å produsere melkesyre i friske muskelestrakter. Glycerofosforsyre er for tiden tilgjengelig som dinatrium, kalsium, magnesium, dikalium, strontium og bariumsalter, som har en relativt sterk basisk karakter. Både alfa- og beta-glycerofosfatsalter er billige og lett tilgjengelige kilder for organiske monofosfat dibasiske salter blant polyol eller sukkerfosfatsaltene.

Oppløsning av kitosan i vandige oppløsninger krever protonering av amingruppene til kitosankjedene som blir nådd med vandig sure oppløsninger som har en pH som varierer fra 3,0-5,0. Når det er oppløst forblir kitosan oppløselig inntil en pH på ca. 6,2. Nøytralisering av sure kitosanoppløsninger ved alkali resulterer i en pH-økning såvel som en deprotonering av amingruppene. Nøytralisering av sure kitosanoppløsninger til en pH-verdi over pKa til kitosan ved ca. 6,3-6,4 resulterer i OH-HN og O-HN interkjeder og vann-kitosan hydrogenbindinger som induserer et hydrert tredimensjonalt nettverk, en kitosangel. Ved pH-verdier over 6,3-6,4 resulterer kitosanoppløsninger systematisk i kitosangeler ved et normalt temperaturområde (0-60 °C). Imidlertid tilblending av et organofosfat til en kitosan vandig oppløsning øker pH-verdien til kitosan/organofosfatoppløsninger som forblir ugeatlet og flytende i lange tidsperioder selv ved pH over 6,5 og opp til 7,2. Disse neo-nøytrale kitosan/organofosfat vandige oppløsninger (pH 6,5-7,2) vil gelatere når de stimuleres av en adekvat temperatur. Gelateringstiden blir kontrollert ved temperaturen. F.eks. trenger en kitosan/organofosfatoppløsning som gelateres på ca. 30 min. ved 37 °C, bare ca. 2 min. ved 60 °C for å danne en gel.

Gelateringsmekanismen såvel som gelegenskapene er blitt forventet å være like for alle kitosan/organofosfatsystemer. Således kan gelatering av kitosan/ β -glycerofosfatoppløsninger som er blitt undersøkt i større detalj praktisk å være typisk eksempel. Resultatene som angir pH-avhengighet og temperaturavhengighet av gelatering for kitosan/ β -glycerofosfatoppløsninger er oppsummert i Sol/Gel diagrammet vist i fig. 1 og 2. I tillegg til gelstyrke viser de reologiske eksperimenter representert i fig. 3 utvetydig at gelateringen av kitosan/ β -glycerofosfatoppløsning skjer ved oppvarming. Forandringen i modulus som opptrer ved ca. 60 °C er symptomatiske for Sol til Gel transisjon og Geldannelse. Denne temperatur for geldannelse vil være avhengig av oppløsningens egenskaper og oppvarmingshastighet (nødvendig aktiveringsenergi).

Den porøse struktur til kitosan/ β -glycerofosfatgeler er blitt vist ved skanning elektronmikroskopi som vist i fig. 4. Gelene har en typisk mikrostruktur med kammere på ca. 100 mikron og porer på ca. 10 mikron. Deres mikrostruktur

avviker fra de observerte på kitosangeler fremstilt ved enkel nøytralisering hvori en lamellær arkitektur var til stede.

En annen viktig egenskap er relatert til injiserbarheten og in vivo gelatering av kitosan/ β -glycerofosfatoppløsninger. Injeksjoner og geler er typisk vist i fig. 5A og 5B. Den sorte pil i fig. 5A viser gelen dannet in situ i kneleddintraledsone mellom det kolaterale ligament og den patellare sene. Den andre gel blir dannet subkutant mellom huden og benmuskulene. Sort pil i fig. 5B viser gelen dannet subkutant in situ i torsoregionen.

I kitosan/organo-fosfatgeler, bidrar organo-fosfatanioner til tverrbindingen av kitosan makromolekylkjedene, men ikke på samme måte som den rene ioniske tverrbinding som finner sted under gelatering av kitosan med uorganiske divalentanioner, såsom sulfat, oksalat, fosfat eller polyfosfat (pyrofosfater, metafosfater eller tripolyfosfater). En vandig kitosanoppløsning blir øyeblikkelig til gel i nærvær av uorganiske divalente anioner og uavhengig av oppløsnings pH-verdi. Videre utgjør heving av temperaturen en uheldig faktor for gelatering av denne type systemer. I kontrast avhenger gelatering av kitosan/organofosfatoppløsninger på både den avsluttende pH-verdi til kitosan/organofosfatoppløsning og temperaturen. Hver oppløsning av kitosan/organofosfat kan ikke gelateres, ved noen temperatur, så lenge dens pH-verdi er under 6,45, og hver oppløsning av kitosan/organofosfat med pH-verdi over 6,45 kan fremstilles ved 20 °C, uten øyeblikkelig gelatering og kan lagres i lang tid ved 4 °C uten å omdannes til gel. Ved 37 °C kan bare kitosan/organofosfatoppløsning med pH-verdi over 6,9 gelateres mer eller mindre hurtig. Det er forventet at nærvær av organofosfatmolekyler i kitosanoppløsninger påvirker direkte elektrostatiske interaksjoner, hydrofobe interaksjoner og hydrogenbindinger til kitosankjeder. Således blir de viktigste interaksjoner involvert i dannelsen av kitosan/organofosfatgeler essensielt: 1) kitosan/kitosan interkjede hydrogenbinding (KITOSAN-KITOSAN); 2) kitosan/organo-fosfat elektrostatiske tiltrekninger mellom ammoniumgruppene til makromolekylkjedene og fosfatgruppen til organofosfatmolekylene (KITOSAN-FOSFAT); 3) kitosan-kitosan hydrofobe interaksjoner induisert gjennom den strukturerende virkning av polyolen eller sukkerdelene på vannmolekylene. Den strukturerende virkning av polyoldelene på vann reduserer kitosan-vann interaksjoner og forhøyer derfor kitosan-htosan interaksjoner. Det ikke-trivielle aspekt av slik gelatering har essensielt opprinnelse fra de siste polyol-vanninduserte kitosan hydrofobe tiltrekninger som blir forhøyet ved å øke temperaturen (temperaturkontrollert gelatering). Ved lave temperaturer beskytter kitosan-vann sterke interaksjoner de hydrerte kitosan makromolekyler mot aggregeringer. Fjerning av laget av vannmolekyler etter oppvarming favoriserer og styrker kitosan-kitosan

interaksjoner og følgelig induserer makromolekyllassosiering. Gelateringen ville imidlertid aldri skje hvis de to første tiltrekninger (KITOSAN-KITOSAN & KITOSAN-FOSFAT) er totalt innoperabelt i kitosan/organofosfatoppløsningen.

Dette forklarer at pH-avhengigheten som fremdeles styrer den

- 5 temperaturkontrollerte gelatering av kitosan/organofosfatsystemer. Skjønt slik KITOSAN-FOSFAT elektrostatisk tiltrekning er til stede kan ikke fosfatgruppene være det eneste tverrbindende middel for kitosankjedene på grunn av ikke-kompatible sterisk forhindring. Dette adskiller signifikant denne gelateringsmekanisme fra den rene ioniske gelatering til kitosan av fosfater eller
- 10 polyfosfat divalente anioner. En ren ionisk tverrbinding ville ikke være temperaturkontrollert eller stimulert.

Denne type av temperaturkontrollert pH-avhengig gelatering blir spesifikt induert av organiske monofosfat dibasiske salt i kitosanoppløsning, men kan imidlertid indueres like godt av andre organiske salter, såsom monosulfatsalter av polyoler

15 eller sukre, såsom polyol-sulfat eller sukker-sulfat, eller monokarboksylysyesalter av polyoler eller sukre. F.eks. i overensstemmelse med foreliggende oppfinnelse er en kitosan/glukose-1-sulfatoppløsning forventet å gelatere slik at en kitosan/glukose-1-fosfatoppløsning gjør.

- Det er også et mål med den foreliggende oppfinnelse å tilveiebringe en vandig
- 20 kitosan/organofosfatoppløsning som kan dannes og lagres ved lav temperatur (4 °C) og transformeres ved fysiologisk temperatur til tredimensjonal stabil kitosan/organofosfatgel. Det inkluderer ikke-toksiske biokompatible komponenter for pattedyr eller menneskelige omgivelser med begge komponenter og prosesser med lave toksisitetvirkninger mot levende biologiske organismer og preserverer
- 25 den cellulære reabilitet. Gelen tilveiebringer også gode mekaniske/behandlingsytteevne for lange tidsperioder ved fysiologisk temperatur og i fysiologisk vandig media som inneholder aminosyrer, ioner og proteiner. Kitosanderivatene kan selekteres såvel som til å prosessere kitosan/organofosfatgeler og omfatter N,O-substituenten av kitosan.

- 30 Uttrykket "organofosfat (salt)" betegner heri, uten begrensning, monofosfat dibasiske salter av polyoler eller sukre, såsom polyol-fosfat dibasisk salter eller sukkerfosfat dibasiske salter. Organosulfater (salt) betegner også heri monosulfatsalter av polyoler eller sukre, såsom polyol-sulfatsalter eller sukker-sulfatsalter. De foretrukne organofosfatsalter kan selekteres fra monofosfat
- 35 dibasiske salter av glycerol, inkludert glycerol-2-fosfat, sn-glycerol 3-fosfat og 1-glycerol-3-fosfatsalter (alfa-glycerofosfat eller beta-glycerofosfat), monofosfat dibasiske salter av histidinol, acetol, dietylstilbesterol, indolglycerol, sorbitol, ribitol, xylitol, arabinitol, erytritol, inositol, mannitol, glycitol, palmitoyl-glycerol, lineoleoyl-glycerol, oleoyl-glycerol eller arakidonoyl-glycerol, og monofosfat

dibasiske salter av fruktose, galaktose, ribose, glukose, xylose, ramnulose, sorbose, erytrulose, deoksy-ribose, ketose, mannose, arabinose, fukulose, fruktopyranose, ketoglukose, sedoheptulose, trehalose, tagatose, sukrose, allose, treose, xylulose, heksose, metyltioribose eller metyltio-deoksy-ribulose. Andre monosalter av
 5 interesse (sulfat, karboksylat) kan være avledet fra de samme polyoler eller sukre.

Uttrykket “glycerofosfat eller glycerofosfat” betegner heri både alfa-glycerofosfat eller beta-glycerofosfat isomerer. Alfa-glycerofosfat er uten adskillelse referert for glycerol-3-fosfat (alle optiske enantiomerer) mens beta-glycerofosfat er på samme måte referert for glycerol-2-fosfat. Uttrykket “tredimensjonal” betegner heri det
 10 faktum at den polymere oppløsning blir øyeblikkelig gelatert og skapt av formen hvori oppløsningen initielt ble helt. Geler kan fremstilles i glass eller plastbegre, asjetter eller rør eller mellom to plater slik at enhver forventet form oppnås.

Uttrykket “in situ gelatering” betegner heri dannelsen av kitosan/organofosfatgeler ved å injisere den flytende kitosan/glycerofosfatoppløsningen i spesifikke steder i
 15 pattedyr eller menneskelige omgivelser, f.eks. ethvert vev (muskler, ben, ligamenter, brusk) og organer. Gelatering in situ tillater fullstendig å presis fylling av vevsdefekter eller kroppshulrom. Gelatering av kitosan/organofosfatblandingen blir indusert av den fysiologiske temperatur.

Uttrykket “endothermal gelatering” betegner heri den termiske mekanismen til
 20 kitosan/organofosfatoppløsningen som tillater oppløsningen å gelateres ved å stå ved den ønskede temperatur. Induksjon av Sol til Gel overføringer av kitosan-organofosfatssystemet krever energi via f.eks. temperaturen.

Uttrykket “celler eller cellulært stoff” betegner heri levende biologiske midler, såsom isolerte celler, cellulære dispersjoner, celleaggregater, cellesferoider eller
 25 celler festet til faste mikrosfærepartikler, som er innkapslet i kitosan/organofosfatgelene.

Uttrykket “in situ dannelse” betegner heri fremgangsmåten til å administrere den ugelaterte kitosan/organofosfat flytende oppløsning til et kroppssted (f.eks. bindevev, kroppskanaler, leddhulrom, frakturer, bendefekter...), og å indusere og
 30 sikre på kroppstedet ved fysiologisk temperatur en fullstendig gelatering av polysakkaridoppløsningen til en gel.

Dannelse av kitosan/organofosfatgeler

Det utvalgte organofosfatsaltet var heri glycerofosfat, men lignende resultater ble oppnådd med andre monofosfat dibasiske salter av polyoler eller sukre. Kitosan i
 35 pulverform blir oppløst i en vandig sur oppløsning inntil det oppnås en klar oppløsning. Andelen av kitosan varierer fra 0,5 til 5,0 % (vekt/vol) fortrinnsvis fra 1,0-3,0 vekt%. pH-verdien til den vandige kitosanoppløsningen varierer fra 4,5-5,5.

Vandige kitosanoppløsninger kan steriliseres enten ved filtrasjon med sterile filtre i linjen (0,22 mikrometer) eller ved dampautoklaving (120 °C). Sterilisering av kitosan/glycerofosfatgelene kan ikke filtreres på grunn av viskositeten eller dampautoklaveres på grunn av den termiske sensitivitet, men kan utføres ved gammabestråling eller oppnås gjennom strengt sterile fremgangsmåter. Ferskt fremstilte vandige kitosanoppløsninger blir fortrinnsvis lagret ved lave plusstemperaturer (4 °C). Glycerofosfaltfelt fin pulverform blir tilsatt, og oppløst i, den vandige kitosanoppløsningen ved temperaturer som varierer fra 4-15 °C, fortrinnsvis 10 °C. Når det blir oppnådd en klar homogen kitosan/glycerofosfat vandig oppløsning med en pH-verdi som varierer fra 6,5 til 7,2 blir den nevnte oppløsning helt opp i den ønskede mottaker, og holdt der ved egnet temperatur til gel. Glycerofosfatfilt i form av vandig oppløsning kan også anvendes.

Avhengig av den avsluttende pH-verdi er kitosan/glycerofosfatoppløsningene forventet å føre enten til termisk reversibel eller irreversibel gel. Reversible geler har sin opprinnelse i kitosan/glycerofosfatoppløsninger som har en pH-verdi mellom 6,5 og 6,9, mens de irreversible geler har sin opprinnelse i kitosan/glycerofosfatoppløsninger som har en pH over 6,9. Typen av syre som ble brukt for de sure kitosanoppløsninger influerer ikke fundamentalt på sol til gel overgangen av kitosan/glycerofosfatssystemet. En avsluttende pH-verdi i en kitosan/glycerofosfatoppløsning er avhengig av pH-verdien til vann/syre-oppløsningen såvel som kitosan og glycerofosfatkonsentrasjonene. Idet kitosan og glycerofosfat er to alkaliske komponenter har det en tendens til å øke pH-verdien til den sure oppløsning hvori de blir oppløst. Konsentrasjonene av kitosan og glycerofosfat kan balanseres for å oppnå den egnede pH-verdi til kitosan/glycerofosfatoppløsningen, mens oppløselighetsgrensen til begge komponenter og spesielt den til kitosan tas inn i vurderingen.

Tredimensjonale monolittiske geler

Det utvalgte organofosfatsalt var heri glycerofosfat, men lignende resultater kan oppnås med andre monofosfat dibasiske salter, monosulfatsalter eller monokarboksylatsalter av polyoler eller sukre. Mottakeren eller formen fylt med kitosan/glycerofosfatoppløsning blir oppvarmet ved en temperatur som varierer fra 30-60 °C, fortrinnsvis 37 °C. Gelateringen av kitosan/glycerofosfatoppløsningen ved 37 °C kan utføres med en vanlig cellekulturinkubator. Oppløsningen blir holdt ved den ønskede temperatur inntil den går over i en gel etter en periode som strekker seg fra noen dager til en uke (ved 30 °C) til noen minutter (ved 60 °C). Ved 37 °C blir gelateringen av kitosan/glycerofosfatoppløsningen på ca. 1 time. Når en tredimensjonal kitosan/glycerofosfatgel er dannet blir gelen tatt ut av formen og vasket i destillert vann. Kitosan/glycerofosfatgeler forblir stabile og

oppretholder sin tredimensjonale form selv ved høye temperaturer, 120°C (autoklav).

In situ dannelse av geler

Det utvalgte organofosfatsaltet var heri glycerofosfat, men lignende resultater ble oppnådd med andre monofosfat dibasiske salter, monosulfatsalter eller monokarboksylatsalter av polyoler eller sukre. In situ gelatering av kitosan/glycerofosfatoppløsningen kan utføres ved å utlevere oppløsningen fra en sprøyte. Dersom nødvendig kan oppløsningen bli pregelatert (initiering av den termiske gelatering) ved å holde sprøyten og kitosan/glyseofosfatoppløsningen ved ønsket temperatur, ideelt 37°C, inntil første tegn kommer til syne. En klar-til-gel kitosan/glycerofosfatblanding ble deretter administrert slik at den fyller vevsdefekter eller hulrom og gelateringsprosessen fullføres in situ (ved 37°C). Injeksjon av kitosan/glycerofosfatoppløsninger blir imidlertid begrenset av viskositeten til oppløsningene som kontrollerer injiserbarheten eller ekstruderbarheten til oppløsningene. En nål som har en åpning på 20 og under er ideelle materialer for injeksjon av slike geloppløsninger. Kroppshulrom og vevsdefekter virker som mottakere for oppløsningen, men de flytende materialer forblir i en åpen vandig omgivelse. Konformiteten og diffuserbarheten av kitosan/glyseofosfatoppløsninger er avhengig av egenskapene til oppløsningen og materialene. Øket viskositet resulterer i in situ dannelse av mer kompakte og mindre konformerbare geler.

Innkapsling av levende biologiske midler i kitosan/glycerofosfatgeler

Det valgte organo-fosfatsaltet var heri glycerofosfat, men lignende resultater ble oppnådd med andre monofosfat dibasiske salter, monosulfatsalter eller monokarboksylatsalter av polyoler eller sukre. Levende celler eller cellulært stoff ble fremstilt ved å bruke nåværende cellekulturteknikker. Celler eller cellulært stoff ble inkorporert og homogenisert ved lave plusstemperaturer, som strekker seg fra 4-20 °C, ideelt 20 °C, inn i den vandige kitosan/glycerofosfatoppløsningen. Cellene eller det cellulære stoffet oppløst i kitosan/glycerofosfatblandingen ble helt i ønskede skåler eller brønner og inkubert ved 37 °C. Minimums eller supplementert cellekulturmedium ble tilsatt til skålene eller brønnene som inneholder cellene eller det cellulære stoffet oppløst med kitosan/glycerofosfatmaterialer for å opprettholde levende og metabolsk aktiv de levende innkapslede biologiske midler. Cellekulturmedium ble fornyet hver annen dag etter dannelse av kitosan/glycerofosfatgeler.

Viabiliteten til celler i oppløsningen og gelen er potensielt redusert ved unormal osmolaritet. Kitosan/gøyserofosfatsystemer har forandrende osmolariteter avhengig av den ioniske glycerofosfatkomponenten. Da glycerofosfatsaltinnholdet er høyest er oppløsningens osmolaritet høyest, og svekkelsen på cellens reabilitet er størst.

Ideell osmolaritet for bioinnkapsling ville være rundt 270-340 mOsmol/kg.

Injeksjon og in situ gelatering av kitosan/glycerofosfatmaterialer oppløst med levende celler eller cellulære stoff kan vurderes på en lignende måte. Celler eller cellulært stoff blir innført ved en lav plusstemperatur i de vandige

- 5 kitosan/glycerofosfatoppløsninger før injeksjon og gelatering. Det eksisterer et direkte forhold mellom innholdet av glycerol-2-fosfat dinatriumsalt og osmolariteten. For å redusere slike osmolaritetsproblemer kan den avsluttende pH-verdi til kitosan/glycerofosfat justeres til den ønskede verdi mens glycerofosfatinnholdet holdes så lavt som mulig. Imidlertid må en lav
- 10 glycerofosfatinnholdgrense nås for prosessering av den temperaturkontrollerte pH-avhengige gelatering.

Terapeutisk anvendelse og andre anvendelser til kitosan-baserte geler

- En kitosan/organofosfat- eller organosulfat gel som tidligere beskrevet er et ideelt materiale for legemiddelleveringssystemer. Slik dannende in situ gellignende
- 15 bærer, hvori en fast partikkel- eller vannoppløselig tilsetning blir inkorporert før gelateringen kan administreres topisk, direkte til kroppsstedet som skal behandles eller diagnostiseres. Antibakterielle, antifungale, stereoidale eller ikke-stereoidale antiinflammatoriske, anti-kreft, antifibrose, antivirale, antiglukome, myotiske og anticholinerge, antipsykotiske, antihistamine, og dekongestive, anestetiske og
- 20 antiparasittiske midler kan inkorporeres i sammensetningen og gelen. På en lignende måte kan polypeptider eller ikke-levende farmasøytiske midler inkorporeres i sammensetningen eller gelen for styrkende, rekonstruktiv eller regenerative hensikter.

- Levende mikroorganismer, planteceller, dyreceller eller humane celler kan
- 25 innfanges identisk i polysakkaridgelen ved introduksjon før gelatering. Gelene oppløst med celler eller mikroorganismer kan anvendes for bioteknologiske hensikter i medisinen eller på andre industrielle områder. Kitosanbaserte in situ dannende geler kan dannes subkutan, intramuskulært, intraperitonealt eller i biologiske bindevev, bedefekter, frakturer, leddhuler, kroppskanaler eller hulrom,
- 30 øyehulen, faste tumorvaskulatorer, etc.

Den foreliggende oppfinnelse vil lettere forstås ved referanse til de følgende eksempler, som er gitt for å illustrere oppfinnelsen uten at området skal begrenses.

EKSEMPEL 1

Typisk gelatering av kitosan/organofosfatsystem

35 Eksperiment 1:

Et typisk eksperiment ble utført ved å oppløse 0,2 g kitosan i 10 ml vandig eddiksyreoppløsning (0,1 M). pH-verdien til eddiksyreoppløsningen var på forhånd justert til 4,0 ved å tilsette dråper av kaliumhydroksidoppløsning (1 M). Den 2 %

(vekt/vol) kitosanoppløsning oppnådd på denne måten hadde en pH-verdi på ca. 5,6. Deretter ble det tilsatt 0,800 g glycerofosfat dinatriumsalt pentahydrat og oppløst i kitosanoppløsning ved 10°C. pH-verdien til den resulterende homogene flytende blanding ble 7. Denne blanding ble satt i en glasscintillasjonsampulle i inkubatoren ved 37°C i 2 timer, nok tid til å oppnå volumgelateringsprosess. Den resulterende volumgel ble nedsenket i fornyede bad av destillert vann for å fjerne overskudd av glycerofosfatsalter.

Et lignende resultat ble oppnådd da glycerofosfat dinatriumsaltet (eller glycerol-2-fosfat dinatriumsalt) ble erstattet med alfa-glycerofosfat dinatriumsaltet (eller glycerol-3-fosfat dinatriumsalt).

Eksperiment 2:

En homogenisert kitosan/glycerofosfatoppløsning ble fremstilt som i eksperiment 1 og anbragt i en dobbel gel støper som har en glassplategelsandwich med et 1,6 mm mellomrom, og systemet ble holdt i en ovn ved 37°C. Dannelsen av en gelmembran ble oppnådd innenfor 2 timer og membranen ble tatt ut fra gelstøperen.

Eksperiment 3:

0,110 g røket silika i fast partikkelform (AEROSIL) ble dispergert i en oppløsning fremstilt ved å oppløse 0,200 g kitosan i 10 ml vandig eddiksyreoppløsning. 0,800 g glycerofosfat dinatriumsalt pentahydrat ble tilsatt kitosan-silikadispersjonen. Den resulterende sammensetning ble anbragt i en glasscintillasjonsampulle i vannbad holdt ved 37°C. Gelateringen av kitosan/glycerofosfatkomponenten ble observert innenfor 2 timer, og kitosan/glycerofosfatgelen inkluderer dispergerte faste silikapartikler.

Eksperiment 4:

0,200 g kitosan ble oppløst i eddiksyreoppløsning som i eksperiment 1. 1,239 g glukose-1-fosfat dinatriumsalt tetrahydrat ble tilsatt og oppløst slik at det ble oppnådd en klar kitosan/glukose-1-fosfatoppløsning. Denne kitosan/glukose-1-fosfatoppløsning plassert i en glasscintillasjonsampulle ble opprettholdt ved 37°C. Sol til Gel overføringen skjedde ved 37°C innenfor tre timer. Den resulterende volumgel ble senket ned i fornyede bad av destillert vann for å fjerne overskudd av glukose-fosfatsalt.

Eksperimentet ble utført som beskrevet i eksperiment 4 med unntagelse av at 1,239 g glukose-1-fosfatsalt ble erstattet med 0,100 g fruktose-6-fosfat dinatriumsaltdihydrat.

EKSEMPEL 2

Virkning av sammensetning på pH-verdien til oppløsningen og forekomst av gelatering

- En stamsyreoppløsning laget av vann/eddiksyre ble fremstilt for alle eksperimenter. pH-verdien til denne stamsyreoppløsningen ble justert til 4,0. Kitosanpulver med
- 5 høy molekylvekt (M.w. 2000000) ble tilsatt og oppløst i et volum av stamsyreoppløsningen slik at det ble fremstilt kitosanoppløsninger som har kitosanandeler varierende fra 0,5-2,0 % vekt/vol (tabell 1). Tabell 1 rapporterer de målte pH-verdiene for de forskjellige prøvene.

Tabell 1**Kitosan vandige oppløsninger og pH-nivåer**

Kitosan kons. (vekt/vol)	0,5	1,0	1,5	2,0
pH-verdi av kitosan Sol.	4,68	4,73	5,14	5,61

5 Glycerofosfat ble satt til kitosanoppløsningene og induserte en pH-økning. Tabell 2 viser virkningen av glycerofosfatkonsentrasjon på forskjellige kitosanoppløsninger. Konsentrasjonen av glycerofosfat varierer fra 0,065-0,300 mol/l.

Kitosan/glycerofosfatoppløsninger i glassampuller ble holdt ved 60°C og 37°C, og bulk og uniform gelatering ble notert innenfor 30 min. ved 60°C og 6 timer ved 37°C (tabell 2 og fig. 1). Kitosan og beta-glycerofosfatkomponenter influerer
10 individuelt på pH-økningen i de vandige oppløsninger, og følgelig influerer på Sol-Gel overgangen. Såvel som de oppløste materialene, vil den initielle pH i stam-vann-eddiksyreoppløsning også influere på Sol-Gel overgangen, men denne potensielle virkning synes å være begrenset av motaksjonen til kitosanoppløseligheten som avhenger av oppløsningens pH-verdi.

15 Tabell 2**Gelatering ac kitosan/glycerofosfatsammensetninger**

Kitosan kons. (vekt/vol)	1,5			2,0		
pH i Kitosan Sol.	5,14			5,61		
GP kons. (mol/l)	0,130	0,196	0,260	0,130	0,196	0,260
pH i Kitosan-GP Sol.	6,64	6,83	6,89	6,78	6,97	7,05
Gelatering 60°C	< 30 min.	< 30 min.	< 30 min.	< 30 min.	< 30 min.	< 30 min.

37°C	Nei	Nei	Nei	Nei	< 6 timer	< 6 timer
------	-----	-----	-----	-----	-----------	-----------

EKSEMPEL III

Termisk reversibilitet av gelatering av kitosan/glycerofosfatsystemer

En første kitosan/glycerofosfatoppløsning ble fremstilt fra 10 ml stam
 5 vann/eddiksyreoppløsning med pH-verdi 4,5 ved å tilsette og oppløse 0,200 g
 kitosan og 0,800 g glycerofosfat dinatriumsaltpentahydrat. Den resulterende
 kitosan/glycerofosfatoppløsning har en pH-verdi på ca. 7,05 og ble oppvarmet ved
 60°C hvor den gelaterte hurtig. Kitosan/glycerofosfatgelen ble avkjølt ved en
 temperatur på ca. 0-4°C, men ingen overgang blir observert med tiden og gelen
 10 forblir stabil ved 4°C. Denne kitosan/glycerofosfatgel er termoirreversibel.

En andre kitosan/glycerofosfatoppløsning ble fremstilt fra 10 ml stam
 vann/eddiksyreoppløsning med pH-verdi 4,0 ved å tilsette og oppløse 0,100 g
 kitosan og 0,800 g glycerofosfat dinatriumsalt pentahydrat.
 Kitosan/glycerofosfatoppløsningen har en pH-verdi på ca. 6,78 og ble oppvarmet
 15 ved 60°C for gelatering. Den resulterende kitosan/glycerofosfatgel blir deretter
 avkjølt ved en temperatur på ca. 0-4°C, og en Gel til Sol overgang blir observert
 etter en tidsperiode. Gelen går tilbake til en flytende oppløsning ved lave
 plusstemperaturer, f.eks. ved 4°C. Når denne oppløsningen blir gjenoppvarmet ved
 60°C inntre den reverse mekanismen (Sol til Gel overgang) igjen og en gel
 20 gjendannes. Sol til Gel til Sol overganger er reproducerbare mellom temperaturer
 ved 4°C og 60°C. Denne kitosan/glycerofosfatgel er termoreversibel.

Termoreversibiliteten til Sol til Gel overgangen av kitosan/glycerofosfatsystemene
 er funnet hovedsakelig å være avhengig av pH-verdien til
 kitosan/glycerofosfatoppløsningen. Et eksempel på pH-verdi og observert
 25 reversibilitet er gitt i tabell 3. Eksperimentelle observasjoner på
 kitosan/glycerofosfatsystemet har vist at termisk reversibilitet av Sol til Gel
 mekanismen forandres ved en pH-verdi i kitosan/glycerofosfatoppløsningen i
 nærheten av 6,9. En reversibel gelatering av kitosan/glycerofosfatoppløsningen
 skjer når pH-verdien blir holdt mellom 6,5 og 6,9. Et meget likt resultat ble
 30 observert med andre monofosfat dibasiske salter av polyoler eller sukre såsom
 glukose-1-fosfatsalter.

Tabell 3

Virkning av pH på Sol til Gel reversibilitet for en 2,0 % vekt/vol kitosankonsentrasjon

GP kons (mol/l)	0,130	0,163	0,196	0,260
pH av kitosan-GP Sol.	6,78	6,87	6,97	7,05
Reversibilitet av Sol til Gel 4-60°C	Reversibel, syklus	Reversibel, syklus	Irreversibel	Irreversibel

5

EKSEMPEL IV**In situ gelatering av kitosan/glycerofosfatmaterialer**

Voksne New-Zealand hvite kaniner ble anestesert ved intravenøs administrering av natriumpentosorbital (1 ml/kg) og holdt under anestesi i 3 timer. Etter 3 timer ble dyrene ofret ved en anestesioverdose og eksperimentene ble fortsatt post mortem. Dyret ble holdt på ryggen, og de lokaliserte soner på de øvre lemmer og torsoregion ble barbert. Huden ble gjennomskåret for å frigjøre subkutane fibrøse membraner og muskel på lemmet.

To kitosan/glycerofosfatoppløsninger var fremstilt tidligere, plassert i sprøyter og opprettholdt ved en lav temperatur (4-10°C): oppløsning I var en 2,7 % vekt/vol lav molekylvekt kitosan og 9,0 % vekt/vol glycerofosfat, mens oppløsning II var en 2,5 % medium molekylvekt kitosan og 9,0 % vekt/vol glycerofosfat. Sprøyter ble utstyrt med nr. 21 gauge nåler. Kitosan/glycerofosfatoppløsningen ble ikke fremstilt eller holdt under strengt sterile betingelser siden dyreeksperimentene ble utført innenfor en tidsperiode på 4-5 timer. Et volum (a) på 1,0-1,5 ml av oppløsning I ble injisert subkutan i de fibrøse membraner mens et andre volum (b) på 2,0 ml av oppløsning I ble injisert gjennom kneleddskapselen inn i leddhulen. Et volum (c) på 1,0 ml av oppløsning II ble injisert subkutan i torsoregionen. Alle injeksjonssteder ble gjendekket med det avskårne vev der hvor det var nødvendig. Gelatering in situ ble tillatt for en periode på 3 timer, deretter ble stedene gjenåpnet eller skåret ut og de in situ dannede geler ble oppsamlet.

Tabell 4

Injeksjoner og dannelse in situ av geler

	[kitosan] % vekt/vol	Volum	Anmerkninger
Subkutan, ben	2,7	1,5	Gel ekspanderer og blir konform med vevsover-flate
Intraled., kneledd	2,7	2,0	Gel ekspanderer og blir konform med leggvolum-konturene
Subkutan, torso	2,5	1,0	Gel ekspanderer ikke og beholder sin dråpefasong

Eksempel V

Innkapsling av pattedyrceller

En 2,5 % vekt/vol kitosan vandig oppløsning ble fremstilt som tidligere beskrevet. 5 1,98 g av kitosanoppløsningen ble blandet med 0,18 g beta-glycerofosfat dinatriumsalt, 0,4 ml Dubelcco Modified Eagle Medium F12 hvori dyrekondrocytter er dispergert, og 0,2 ml Dubelcco Modified Eagle Medium F12. Kondrocytter ble isolert fra kalv skulderbruskoverflater og oppsamlet fra primære monolagskulturer. Dubelcco Modified Eagle Medium F12 omfatter deksametason, 10 askorbinsyre og 10 % føtalt bovint serum. Alle kitosanoppløsninger, kitosan/glycerol-2-fosfatoppløsninger og fremgangsmåter var sterile. Med en gang kondrocyttene i kitosan/glycerol-2-fosfatdispersjonen var støpt ble den plassert i en inkubator ved 37°C inntil gelatering. Gelatering av kitosan/glycerom-2-fosfatsystemet ble observert innenfor 2 timer. Viabilitetstester på slike 15 kondrocyttopplastede kitosan/glycerol-2-fosfatgeler angir et område fra 10 % til 70 % levende kondrocytter. Innkapsling av mikroorganismer, planteceller, dyreceller eller humane celler i kitosan/glycerol-2-fosfatgeler kan utføres med forandrende egenskaper avhengig av den forventede viabilitet.

Mens oppfinnelsen er blitt beskrevet i sammenheng med spesifikke utforminger 20 derav skal det forstås at den er istand til ytterligere modifikasjoner og denne anvendelse er ment å dekke enhver variasjon, anvendelse eller tilpasning av oppfinnelsen i henhold til generelt oppfinnelsens prinsipp og inkludert slike avvik fra den foreliggende beskrivelse som kommer med kjent eller vanlig praksis innenfor området som oppfinnelsen tilhører og som kan anvendes til de viktigste 25 trekk som er fremsatt heri, og som følger i området til de vedheftede krav.

PATENTKRAV

1. Polysakkaridbasert gel,
karakterisert ved at den omfatter:
 - a) 0,1-5,0 vekt% kitosan eller et kitosanderivat; og
 - 5 b) 1,0-20 vekt% salt av polyol eller sukker valgt fra gruppen som består av monofosfat dibasisk salt, monosulfatsalt og en monokarboksylysyresalt av polyol eller sukker,
 hvori nevnte gel er indusert og stabil innenfor et temperaturområde fra 20-70°C og er tilpasset til å bli dannet og/eller gelatert in situ i et vev, organ eller hulrom i et

10 dyr eller menneske.
2. Gel som angitt i krav 1,
karakterisert ved at nevnte salt er et monofosfat dibasisk salt av glyserol, som omfatter glycerol-2-fosfat, sn-glyserol 3-fosfat og L-glycerol-3-fosfatsalter.
- 15 3. Gel som angitt i krav 1,
karakterisert ved at nevnte salt er et monofosfat dibasisk salt og nevnte polyol er valgt fra gruppen som består av histidinol, acetol, dietylstilbestrol, indol-glyserol, sorbitol, ribitol, xylitol, arabinitol, erytritol, inositol, mannitol, glucitol og en blanding derav.
- 20 4. Gel som angitt i krav 1,
karakterisert ved at nevnte salt er et monofosfat dibasisk salt og nevnte sukker er valgt fra gruppen som består av fruktose, galaktose, ribose, glukose, xylose, ramnulose, sorbose, erytrulose, deoksy-ribose, ketose, mannose, arabinose, fukulose, fruktopyranose, ketoglukose, sedoheptulose, trehalose, tagatose, sukrose,

25 allose, treose, xylulose, heksose, metyltio-ribose, metyltio-deoksy-ribulose, og en blanding derav.
5. Gel som angitt i krav 1,
karakterisert ved at nevnte salt er et monofosfat dibasisk salt og nevnte polyol er valgt fra gruppen som består av palmitoyl-glyserol, linoleoyl-glyserol,

30 oleoyl-glyserol, arachidonoyl-glyserol, og blandinger derav.
6. Gel som angitt i krav 1,
karakterisert ved at nevnte gelsammensetning er valgt fra gruppen som består av kitosan- β -glycerofosfat, kitosan- α -glycerofosfat, kitosan-glukose-1-glycerofosfat, og kitosan-fruktose-6-glycerofosfat.

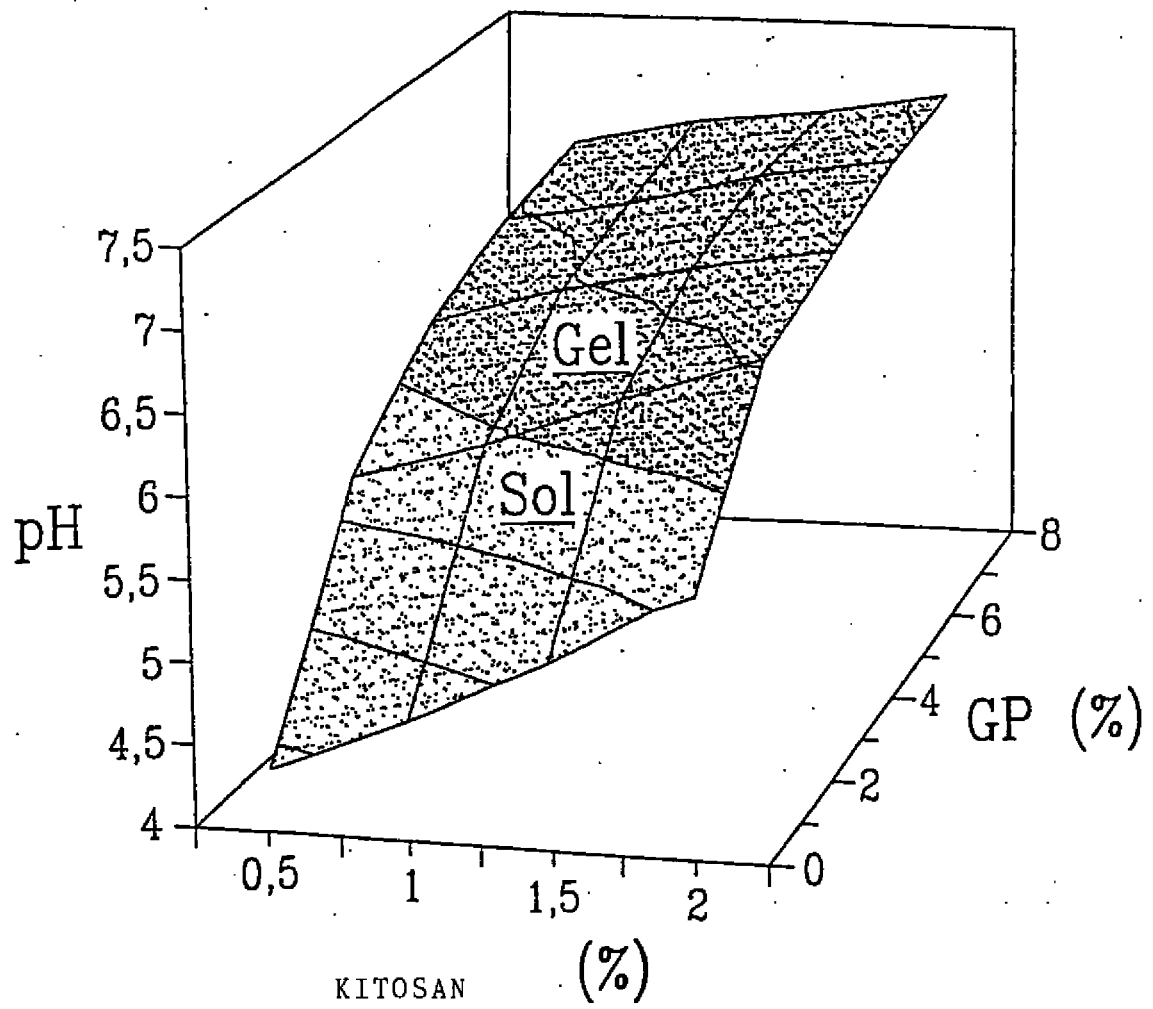
7. Gel som angitt i krav 1,
karakterisert ved at faste partikkel- eller vannoppløselige tilsetninger
blir inkorporert i nevnte polysakkaridgel før gelateringen.
8. Gel som angitt i krav 1,
5 karakterisert ved at legemidler, polypeptider eller ikke-levende
farmasøytiske midler blir inkorporert i nevnte polysakkaridgel før gelateringen.
9. Gel som angitt i krav 1,
karakterisert ved at levende mikroorganismer, planteceller, dyreceller
eller menneskeceller blir innkapslet i nevnte polysakkaridgel før gelatineringen.
- 10 10. Gel som angitt i krav 1,
karakterisert ved at nevnte gel blir dannet in situ subkutant,
intraperitonealt, intramuskulært eller i biologisk bindevev, bendifekter, frakturer,
leddhulrom, kroppskanaler eller hulrom, øyehulrom eller faste tumorer.
11. Gel som angitt i krav 10,
15 karakterisert ved at nevnte gel er en bærer som omfatter et farmasøytisk
middel for levering av nevnte farmasøytiske middel in situ.
12. Fremgangsmåte til å fremstille en polysakkaridgeloppløsning som angitt i
krav 1,
karakterisert ved at den omfatter trinnene:
- 20 a) å oppløse en kitosan eller et kitosanderivat i en vandig sur oppløsning
med en pH-verdi fra 2,0 til 5,0 for å oppnå en vandig polysakkaridsammensetning
som har en konsentrasjon på 0,1-5 vekt% av en kitosan eller et kitosanderivat;
- b) å oppløse 1,0-20 vekt% av et salt av polyol eller sukker, hvori nevnte salt
er valgt fra gruppen som består av monofosfat dibasisk salt, monosulfatsalt og et
25 monokarboksylsyresalt, i nevnte vandige polysakkaridsammensetning fra trinn a)
for å oppnå en polysakkaridgeloppløsning, hvori nevnte polysakkaridgel har en
konsentrasjon på 0,1-5,0 vekt% av en kitosan eller et kitosanderivat, og en
konsentrasjon på 1,0-20 vekt% av et salt av en polyol eller sukker, og har en
pH-verdi fra 6,4 til 7,4.
- 30 13. Fremgangsmåte som angitt i krav 12,
karakterisert ved at den ytterligere omfatter et trinn c) etter trinn b),
hvor
- c) består av å opphete nevnte polysakkaridgeloppløsning ved en
stivnetemperatur som varierer fra 20 °C til 80 °C inntil det dannes en
35 polysakkaridgel.

14. Fremgangsmåte som angitt i krav 12 eller 13,
karakterisert ved at et farmasøytisk middel blir tilsatt
polysakkaridgelopløsningen fra trinn b).
- 5 15. Fremgangsmåte som angitt i krav 12, 13 eller 14,
karakterisert ved at nevnte vandige sure oppløsning er fremstilt fra
organiske eller uorganiske syrer valgt fra gruppen som består av eddiksyre,
askorbinsyre, salisylsyre, fosforsyre, saltsyre, propionsyre, maursyre og en blanding
derav.
- 10 16. Fremgangsmåte som angitt i krav 12, 13 eller 14,
karakterisert ved at nevnte salt er et monofosfat dibasisk salt av glyserol,
hvor nevnte glyserol er valgt fra gruppen som består av glycerol-2-fosfat, sn-
glycerol 3-fosfat og L-glycerol-3-fosfatsalter.
- 15 17. Fremgangsmåte som angitt i krav 16,
karakterisert ved at nevnte glycerofosfatsalt er valgt fra en gruppe som
består av glycerofosfatdinatrium, glycerofosfatdikalium, glycerofosfatkalsium,
glycerolfosfatbarium og glycerofosfatstrontium.
- 20 18. Fremgangsmåte som angitt i krav 12, 13 eller 14,
karakterisert ved at nevnte salt er et monofosfat dibasisk salt av en
polyol, og nevnte polyol er valgt fra gruppen som består av histidinol, acetol,
dietylstilbestrol, indoglyserol, sorbitol, ribitol, xylitol, arabinitol, erytritol, inositol,
mannitol, glycitol og en blanding derav.
- 25 19. Fremgangsmåte som angitt i krav 12, 13 eller 14,
karakterisert ved at nevnte salt er et monofosfat dibasisk salt av en
sukker, hvor nevnte sukker er valgt fra en gruppe som omfatter fruktose, galaktose,
ribose, glukose, xylose, ramnulose, sorbose, erytrulose, deoksy-ribose, ketose,
mannose, arabinose, fukulose, fruktopyranose, ketoglukose, sedoheptulose,
trealose, tagatose, sukrose, allose, treose, xylulose, heksose, metyltio-ribose,
metyltio-deoksy-ribulose og en blanding derav.
- 30 20. Fremgangsmåte som angitt i krav 12, 13 eller 14,
karakterisert ved at nevnte salt er et monofosfat dibasisk salt av en
polyol og nevnte polyol er valgt fra gruppen som består av palmitoyl-glyserol,
linoleoyl-glyserol, oleoyl-glyserol, arakidonoyl-glyserol og en blanding derav.
- 35 21. Fremgangsmåte som angitt i krav 12, 13 eller 14,
karakterisert ved at nevnte salt er et monofosfat dibasisk salt og nevnte
fosfat er valgt fra gruppen som består av fosfatdinatrium, fosfatdikalium,
fosfatkalsium, fosfatbarium og fosfatstrontium.

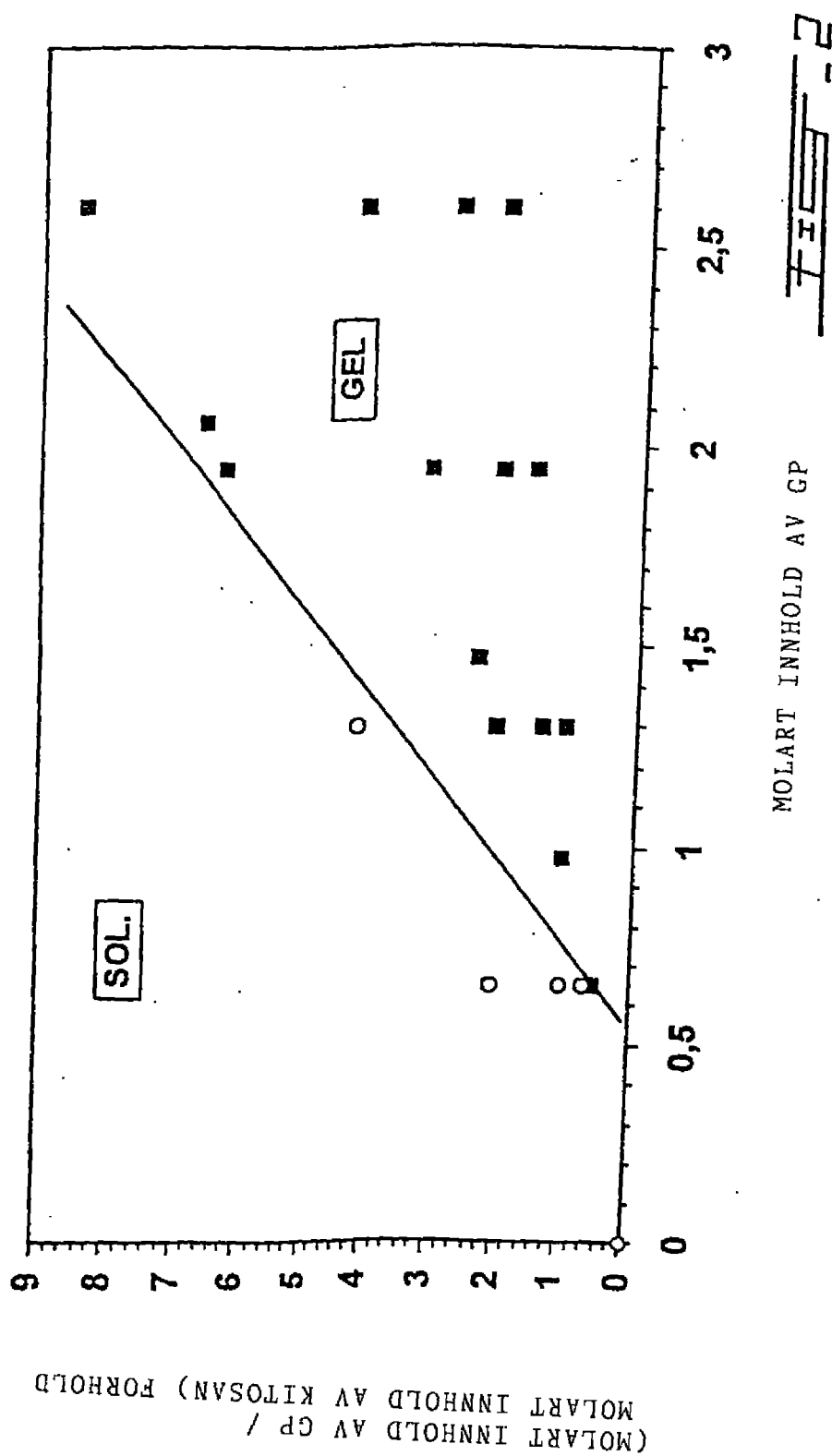
22. Fremgangsmåte som angitt i krav 12,
karakterisert ved at nevnte polysakkaridgeloppløsning er holdt ved en
stabil ugelatinert flytende form ved en temperatur som varierer fra 0-20 °C.
23. Fremgangsmåte som angitt i krav 13,
5 karakterisert ved at nevnte stivnetemperatur varierer fra 37-60°C.
24. Fremgangsmåte som angitt i krav 24,
karakterisert ved at nevnte stivnetemperatur er ca. 37 °C.
25. Fremgangsmåte som angitt i krav 12, 13 eller 14,
karakterisert ved at molekylvekten til kitosan varierer fra 10000 til
10 2000000.
26. Fremgangsmåte som angitt i krav 12, 13 eller 14,
karakterisert ved at polysakkaridgelen er termoirreversibel eller
termoirreversibel ved å justere pH-verdien til polysakkaridgelen.
27. Fremgangsmåte som angitt i krav 26,
15 karakterisert ved at polysakkaridgelen er termoirreversibel når pH-
verdien til nevnte polysakkaridgeloppløsning er større enn 6,9.
28. Fremgangsmåte som angitt i krav 26,
karakterisert ved at polysakkaridgelen er termoreversibel når pH-
verdien til nevnte polysakkaridgeloppløsning er mindre enn 6,9.
- 20 29. Fremgangsmåte som angitt i krav 12, 13 eller 14,
karakterisert ved at faste partikkeltilsetninger blir tilsatt
polysakkaridgeloppløsningen i trinn b).
- 25 30. Anvendelse av polysakkaridgelen som angitt i krav 1 for å produsere
biokompatible, degraderbare materialer brukt i kosmetikk, farmakologi, medisin
og/eller kirurgi.
31. Anvendelse som angitt i krav 30, hvori gelen blir inkorporert som hele, eller
som en komponent i implanterbare anordninger eller implantater for reparering,
rekonstruksjon og/eller erstatning av vev og/eller organer, enten i dyr eller
mennesker.
- 30 32. Anvendelse som angitt i krav 30, hvori gelen blir brukt som hele, eller som
en komponent i implanterbare, transdermale eller dermatologiske
legemiddelleveringssystemer.
33. Anvendelse som angitt i krav 30, hvori gelen blir brukt som hele, eller som
en komponent i oftalmologiske implantater eller legemiddelleveringssystemer.

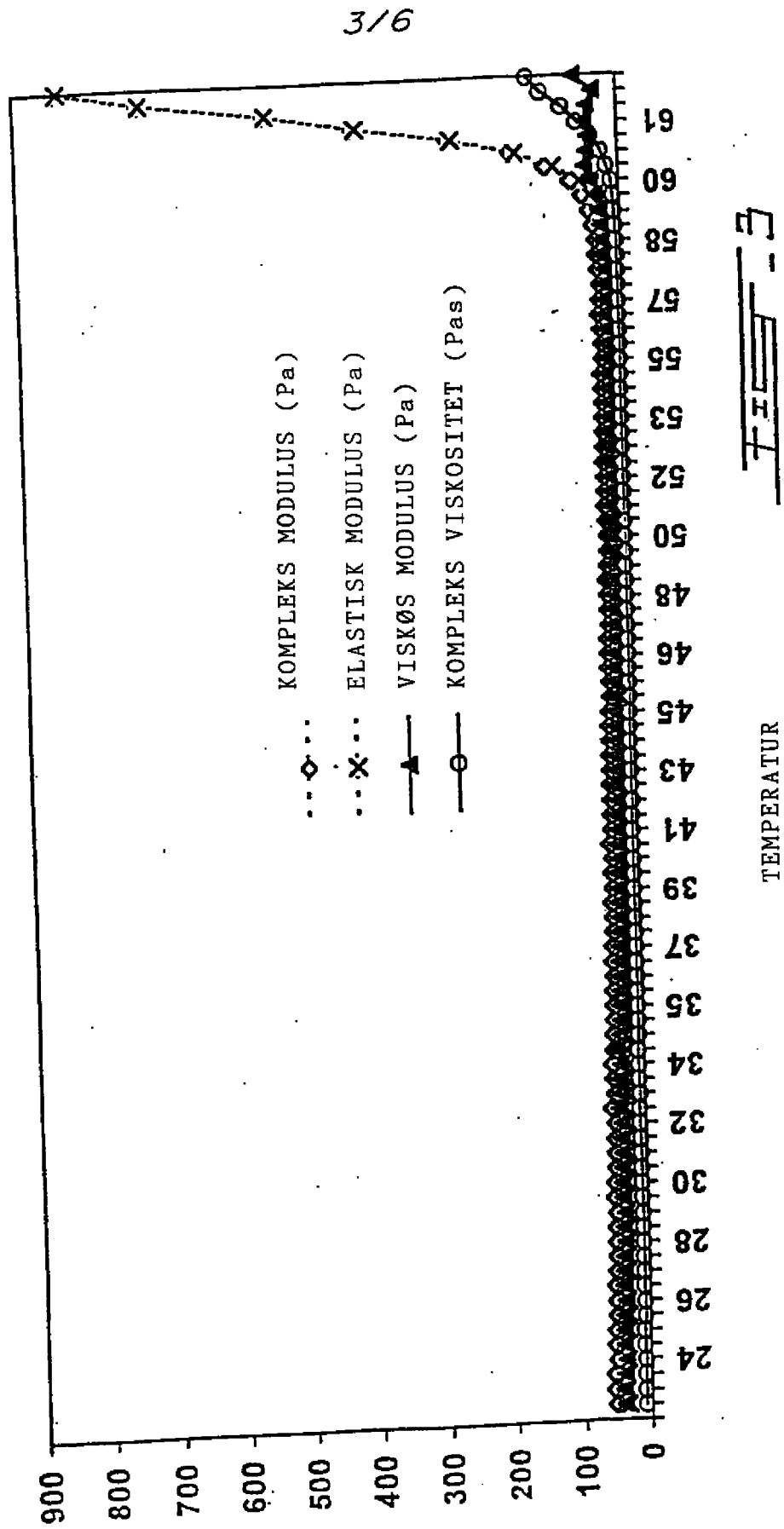
34. Anvendelse av gelen som angitt i krav 30 for produksjon av celleopplastede kunstige matriser som blir anvendt til konstruksjon og kultur av biokonstruerte hybridmaterialer og vevsekvivalenter.
- 5 35. Anvendelse som angitt i krav 34, hvori opplastingscellen er valgt fra gruppen som består av kondrocytter (leddbrusk), fibrokondrocytter (menisk), ligamentfibroblaster (ligament), hudfibroblaster (hud), tenocyter (sener), myofibroblaster (muskel), mesenchymale stamceller og keratinocyter (hud).
- 10 36. Anvendelse som angitt i krav 35, hvori den celleopplastde gel og avledede produkter er beregnet på kultur og konstruksjon av kunstig leddbrusk og leddvev og organer, enten for kirurgiske eller laboratorietesteanvendelser.
37. Anvendelse som angitt i krav 35, hvori den celleopplastede gelen og avledede produkter er beregnet for prosessering og konstruksjon av levende kunstige substitutter for ligamenter, sener, hud, ben, muskler og ethvert metabolsk organ, enten for kirurgisk eller laboratorietesteanvendelser.
- 15 38. Anvendelse som angitt i krav 35, hvori den celleopplastede gel og avledede produkter blir anvendt som levende substitutter for erstatning av leddbrusk, fibrobrusker, bruskorganer, ligamenter, sener, benvev eller hud.
- 20 39. Anvendelse som angitt i et av kravene 36-38, hvori den nevnte celleopplastede hydrogel blir gelatinert in situ for å indusere en ektopisk dannelselse av fibrobrusklignende eller brusklignende vev.
- 25 40. Anvendelse av polysakkaridgeloppløsningen som angitt i krav 12 for fremstilling av avledet gel eller hydrogel ved 1) inkorporere og oppløse minst ett komplementært polymer i nevnte polysakkaridgeloppløsning, og 2) ved å tillate nevnte polysakkarid å komplementære polymer å interagere over en tilstrekkelig tidsperiode for å transformeres til en klar tredimensjonal gel innenfor et temperaturområde mellom 20 °C og 60 °C.
41. Anvendelse som angitt i krav 40, hvori den komplementære polymer er et ikke-ionisk vannoppløselig polysakkarid eller en hydroksyalkylcellulose.

1/6

Fig. 1

216

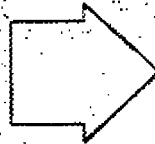
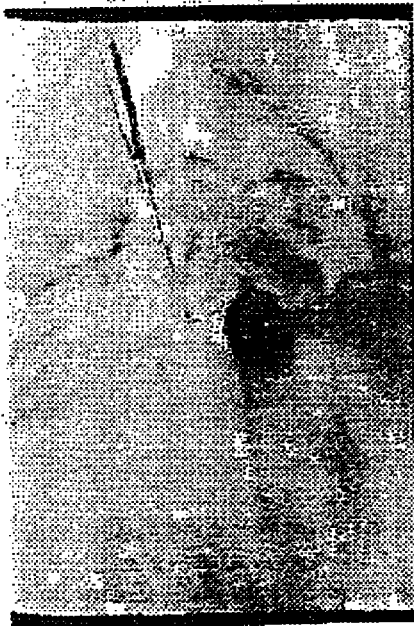




4/6



5/6

FIG - 5A

6/6

