



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **310222**

(13) B1

(51) Int Cl⁷ A 61 K 31/727, 31/722, 31/737,
A 61 P 17/02

Patentstyret

(21) Søknadsnr	19970214	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	1997.01.17	søknadsnummer	1995.07.13, PCT/SE95/00856
(24) Løpedag	1995.07.13	(85) Videreføringsdag	1997.01.17
(41) Alm. tilgj.	1997.01.17	(30) Prioritet	1994.07.19, SE, 9402529
(45) Meddelt dato	2001.06.11		
(71) Patenthaver	Astra AB, S-151 85 Södertälje, SE		
(72) Oppfinner	Hans-Arne Hansson, Hovås, SE		
	Gunilla Johansson-Rudén, Askim, SE		
	Olle Larm, Bromma, SE		
(74) Fullmektig	Bryns Zacco AS, 0106 Oslo		

(54) Benevnelse **Anvendelse av kitosan og et polysakkarid i forbindelse med sårheling**

(56) Anførte publikasjoner Ingen

(57) Sammendrag

Anvendelse av kitosan og et polysakkarid immobilisert dertil valgt fra heparin, heparansulfat og dekstransulfat for fremstilling av et middel som kan hindre eller vesentlig redusere uønsket adhesjon av skadet vev med tilstøtende eller omgivende vev i forbindelse med sårheling; og en fremgangsmåte for anvendelse av et slikt middel.

Foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av anti-adhesjonsmidler, det vil si produkter som har evnen til å hindre uønsket adhesjon av vev i forbindelse med sårheling. Oppfinnelsen angår mer spesielt anvendelse av kitosan og et polysakkarid immobilisert dertil for fremstilling av et middel som reduserer eller hindrer slik uønsket adhesjon. Dette midlet har også evnen til å forbedre helingskvaliteten ved stimulering av vevregenerering.

Vår evne til å bevege oss fritt etter ønske og i overensstemmelse med behovene i tiden er av ytterste viktighet for vår livskvalitet. Egnert funksjon av muskelskjelettssystemet i nært samvirke med hovedsakelig huden, slimhinner og nervevev er en nødvendig forutsetning for vår evne til bevegelse og krever per se at forskjellige strukturer slik som ben, muskler og sener beveger seg fritt i forhold til hverandre. Slike aktiviteter krever glidesoner, minimal funksjon og maksimal frihet for bevegelse. Glidesystemer mellom for eksempel tilstøtende muskler og sener samt mellom hud og tilstøtende vev er således nødvendig for optimal funksjon. Det samme er tilfelle for viscerale strukturer slik som den gastrointestinale kanal, hjerte, lunge, hjerne og ryggmargen. Glidesystemene består av tynne ark av løst bindevev som i abdomen, torakalhulrommet, perikardialrommet og for hjernen og ryggmargen er avgrenset av mesotelceller. Paratenonene viser en lignende konstruksjon.

Disse glidesystemene er meget følsomme overfor inflammasjon og skade. Arrvev blir lett dannet og resulterer i en svekket funksjon og endog funksjonstap. Adhesjoner kan dannes i abdominalhulrommet, dvs. dannelse av strenger, og membranlignende sammen-smeltninger av tilstøtende eller omgivende strukturer kan til slutt resultere i ileus, en livstruende tilstand. Kirurgiske prosedyrer utført for å behandle skader, fjerne tumorer eller behandle andre forstyrrelser eller for utførelse av rekonstruksjoner resulterer alltid i arrdannelse og derved mer eller mindre omfattende tap av "naturlige og opprinnelige" glidesystemer.

Helingen av skader i huden og slimhinnene er komplisert, på den ene siden ved bindevevs begrensede evne til å regenereres og på den annen side ved dannelsen av ikke fullt utviklet granulasjonsvev, hvor sistnevnte har en begrenset evne til å oppnå en moden tilstand lik den til normalt vev. Dermis blir således verken gjendannet hos unge mennesker eller hos voksne etter skade med få unntagelser. Små og/eller overflatiske skader på dermis heles ved erstatning av det tapte vevet ved utvikling av strukturer av tilstøtende type og ved utvikling av reaktivt granulasjonsvev. Mer omfattende vevstap, slik som etter dype forbrenninger, tredje grads termiske skader, og etter tap av en del av

dermis, heles uunngåelig med arrdannelse, varierende, men vedvarende vevstap og med permanente deformasjoner. Den mekaniske resistente komponenten i arrvevet utgjøres stort sett av type III kollagen med korte fibre og dårlig organisering og har derfor dårlige mekaniske egenskaper sammenlignet med kollagen av den normale optimale type I.

- 5 Fraksjonen av amorf, plastisk basissubstans har blitt redusert samt også vevscellulareteten. Antall blodkar blir over tid redusert i forhold til det i normalt vev og fordelingen og typen av kar har blitt endret. Brede, tynnveggede kar med dårlig funksjon sammenlignet med de tilsvarende normale blodkar forekommer ofte, hvilket også er tilfelle for abnormale lymfekarsystemer. Glidesystemene blir således til slutt erstattet av stivt, fibrøst
- 10 kollagenbindevev.

En ytterligere kompliserende og meget viktig faktor utgjøres av oppkomsten av *myofibroblaster*, dvs. "vanlige" bindevevceller (fibroblaster) som, samt også en del av makrofagene, har et forøket antall cytoplasmiske bunter av muskelproteiner som

- 15 muliggjør en langsom og kraftig kontraksjon av cellene og opprettholdelse av kontraksjonen i et lengre tidsrom. Dette kan resultere i kontrakturer som ytterligere deformerer og begrenser funksjonen til det påvirkede vevet. En forøket tilstedeværelse av myofibroblaster sees for eksempel omkring brystimplantater (silikonproteser implantert for brystforstørrelse eller brystrekonstruksjon; en mer detaljert beskrivelse av
- 20 C. Lossing & H-A Hansson finnes i en artikkel i Plastic Reconstr. Surgery 1993, Vol. 91, side 1277-1286) og omkring suturer og andre implantater av fremmede materialer. Myofibroblaster utbreder seg med forøket hyppighet omkring ledd i visse reumatoide sykdommer og kan resultere i skjevstilling av fingre og noen ganger også i luksasjoner. Denne cellen er den patogene faktoren som forårsaker deformasjoner i hånden hvilket
- 25 rammer pasienter med Dupuytren's kontraktur. Myofibroblastene samt vanlige fibroblaster er festet til kollagentråder ved hjelp av spesifikke heterodimere reseptorer, hvorav en enhet alltid utgjøres av $\beta 1$ -*integrin*. Blokkering av integriner resulterer i eliminering av kontrakturer. Inflammasjonsreduserende legemidler kan innvirke på ekspresjonen av integriner.

30

Glidesystemer i løst bindevev med eller uten en veldefinert glideoverflate blir således kun gjenopprettet i tilfeller med minimal inflammasjon. Dannelsen av granulasjonsvev forekommer imidlertid kun i forbindelse med en inflammatorisk prosess som per se resulterer i dannelse av umodne celler og vevskomponenter. Denne manglende evne hos det nye

35 vevet dannet under reparasjonsprosessen til å nærme seg de normale differensieringsnivåene er grunnen til at arrvev har dårlig kvalitet kvantitativt og kvalitativt sammenlignet med det opprinnelige, modne, men tapte vevet. Modning av regenerert vev krever

adgang til vekstfaktorer som regulerer og fremmer differensiering av celler, fibre og grunnsustans.

Det har vært rettet omfattende forskning mot å løse problemet med unngåelse av uønsket
5 adhesjon av vev i forbindelse med heling av sår, for eksempel sår forårsaket av kirurgiske
innsnitt, av ulykker, inflammasjoner og tumorer. PCT-søknad nr. US90/02406 beskriver
teknologi forbundet med dette spesielle problemet og innbefatter også en relativt
omfattende utredning hva angår bakgrunnsteknikken. De teknikker som er beskrevet i
ovennevnte patentsøknad er basert på bruken av "sandwich"-konstruksjoner omfattende
10 en bionedbrytbar bioaktiv membran hvis motstilte overflater har forskjellig sammen-
setning og derved forskjellige biologiske funksjoner. De tilsvarende produkter synes
imidlertid ikke å være tilgjengelige på markedet.

Ifølge foreliggende oppfinnelse er det tilveiebragt anvendelse av kitosan og et
15 polysakkarid immobilisert dertil valgt fra heparin, heparansulfat og dekstransulfat for
fremstilling av et middel som kan hindre eller vesentlig redusere uønsket adhesjon av
skadet vev med tilstøtende eller omgivende vev i forbindelse med sårheling.

Fordelaktige og foretrukne trekk ved foreliggende anvendelse fremgår fra medfølgende
20 krav 2-9.

Ved foreliggende anvendelse induseres kun en minimal inflammasjon av kort varighet, i
det nevnte middel dessuten er bioakseptabelt og bionedbrytbart uten å resultere i
forstyrrende nedbrytningsprodukter. Videre har det evnen til å indusere grenseflate-
25 overflater og resulterer i forenklet mekanisk og teknisk håndtering i forbindelse med for
eksempel kirurgiske innsnitt. Det oppnås også at regenerering av vev i forbindelse med
sårheling stimuleres.

Polysakkaridet som anvendes kan immobiliseres til kitosan på hovedsakelig tre
30 forskjellige måter. Således kan immobilisering finne sted ved ionisk binding, ved kovalent
binding eller ved mekanisk inklusjon i nevnte kitosan i forbindelse med utfelling fra
oppløsning. En fremgangsmåte for kovalent binding av det relevante polysakkaridet til et
substrat som bærer aminogrupper er beskrevet i US-patent nr. 4.613.655.

35 Som polysakkarid er det spesielt foretrukket å anvende heparin eller heparansulfat hvilke
stoffer er kommersielt tilgjengelige på markedet fra flere produsenter. Delvis

hydrolyserte former av polysakkaridet kan naturligvis også anvendes forutsatt at den biologiske aktiviteten er opprettholdt.

Anti-adherensmidlet som anvendes ifølge oppfinnelsen kan være til stede i forskjellige
5 fysikalske former, for eksempel som filmer eller membraner, geler, rør eller slanger, pulvere, aerosoler eller oppløsninger. Den relevante formen er naturligvis tilpasset til den aktuelle skaden. I de fleste tilfellene er filmer nyttige mens rør eller geler kan anvendes i spesielle tilfeller, for eksempel i forbindelse med langstrakte snevre vev, slik som muskler og sener.

10 Kitosan er et lineært 1,4-bundet polysakkarid oppbygget fra β -D-glukoseaminyheter. Kitosanen fremstilles ved N-deacetylering av kitin, en polymer som danner skallet til blant annet insekter og skaldyr. Kommersielt blir kitin utvunnet fra krabbe- og rekeskall som utgjør avfallsprodukter fra fiskeindustrien. Ved å regulere den alkaliske
15 behandlingen av kitiner kan det fremstilles kitosaner med varierende grad av N-acetylering. Ved behandling av kitin med konsentrert alkali, vanligvis natriumhydroksid, finner således N-deacetylering sted, dvs. acetamidogrupper omdannes til aminogrupper til dannelsen av kitosan.

20 De fysikalske egenskapene til kitosan som påvirker dens nytteighet avhenger av graden av N-acetylering, molekylvekten og homogeniteten. Kitosan er bionedbrytbar, både av kitinase i i fordøyelsessystemet og av lysozym og andre enzymer i kroppsvæskene.

I forbindelse med anvendelsen av foreliggende oppfinnelse er det foretrukket at kitosanen
25 har en N-acetyleringsgrad på høyst ca. 90% og fortrinnsvis høyst ca. 50%. Det er særlig foretrukket at graden av N-acetylering er mindre enn ca. 25%.

Avhengig av det involverte sårets karakter kan midlet påføres i form av en film, i form av en gel eller i form av et rør eller en slange. Produktet som velges for påføringen kan lett
30 bestemmes i forbindelse med for eksempel den relevante kirurgiske prosedyren.

Eksempler på foretrukne utførelser

Foreliggende oppfinnelse vil i det følgende bli illustrert i de nedenstående eksempler. I
35 eksemplene har alle filmer blitt fremstilt i Petri-skåler som har et overflateareal på 54 cm².

Eksempel 1Fremstilling av kitosanfilm

- 5 5 g hydrokloridsalt av kitosan (50% acetyleringsgrad, Pronova) oppløses i destillert vann (0,5 l, 1% vol/vekt). 10 ml av den oppnådde oppløsning overføres til en Petri-skål og en film av kitosan dannes ved fordampning og tørking i et oppvarmingskammer ved 70°C i 24 timer. Den oppnådde filmen blir deretter nøytralisert ved tilsetning av en natriumfosfatbuffer, 0,2 M, pH 9,0. Filmen får forbli i Petri-skålen i nevnte buffer ved
10 romtemperatur i 2-4 timer, blir deretter vasket 3-4 ganger med vann og får tørke.

Eksempel 2Fremstilling av kitosanfilm

- 15 5 g hydrokloridsalt av kitosan (20% acetyleringsgrad, Pronova) oppløses i en 2% eddiksyreoppløsning (0,5 l, 1% vol/vekt). Oppløsningen autoklaveres i 1 time ved 125°C for steriliseringsformål. Etter avkjøling fremstilles en film i en Petri-skål, i dette tilfelle ved bruk av 20 ml av oppløsningen. Filmen får deretter tørke ved romtemperatur og
20 nøytraliseres ved tilsetning av natriumfosfatbuffer, 0,2 M, pH 9,0, tilsatt til skålen.

Filmen får oppholde seg i denne bufferen i 2-4 timer ved romtemperatur, blir deretter vasket med destillert vann 3-4 ganger og får igjen tørke.

Eksempel 3Nedbrytning av heparin med salpetersyrling

- 1 g heparin oppløses i 300 ml vann. Oppløsningen avkjøles til 0°C i isvann og holdes i
30 kald tilstand. Først tilsettes 10 mg natriumnitritt (NaNO_2). Deretter tilsettes 2 ml eddiksyre til oppløsningen under omrøring. Reaksjonsblandingen holdes ved 0°C i 2 timer, dialyseres og frysetørkes. Utbyttet er 0,7 g nedbrutt heparin.

Eksempel 4Periodatoksidasjon av heparin

- 5 En oppløsning av natriumperiodat-oksidert natriumheparin fremstilles på følgende måte.
1 g natriumperiodat, NaIO_4 , oppløses i 200 ml destillert vann. 10 g natriumheparin
tilsettes til oppløsningen av natriumperiodat og omrøres natten over i mørket. Den
resulterende oppløsningen blir etter tilsetning av 10 ml glycerol og omrøring i 2 timer
dialysert mot vann. Vannet skiftes hver time. Dette resulterer i en oppløsning som
10 inneholder periodatoksidert heparin i en konsentrasjon på ca. 19 mg/ml.

Eksempel 5Fremstilling av kitosanfilm med kovalent bundet heparin (endepunkttilfesting)

- 15 Til en nøytralisert kitosanfilm fremstilt ifølge eksempel 1 tilsettes 20 ml av en oppløsning
inneholdende 125 mg nitrittnebrutt heparin, fremstilt som i eksempel 3, oppløst i 0,5 l
vann og inneholdende 4,4 g NaCl. Til oppløsningen tilsettes 15 mg
natriumcyanborhydrid. Oppløsningens pH-verdi justeres til 3,9 ved bruk av 0,5 M
20 saltsyre eller en annen syre. Oppløsningen inneholdende kitosanfilmen henses ved
romtemperatur i 14 timer og den behandlede filmen vaskes deretter 3-4 ganger med vann
og får tørke.

Eksempel 6Fremstilling av kitosanfilm med kovalent bundet heparin (flerpunkttilfesting)

- 25 En nøytralisert kitosanfilm fremstilt ifølge eksempel 2 henses i 24 timer i 20 ml av
følgende oppløsning.
30 4,4 natriumklorid og 125 mg periodatoksidert heparin, fremstilt som beskrevet i
eksempel 4, oppløses i 0,5 l vann, og pH-verdien justeres til 3,9 ved bruk av 0,5 M
saltsyre. Til oppløsningen tilsettes 15 mg natriumcyanborhydrid, og oppløsningen holdes
i 10 timer ved romtemperatur. Den behandlede filmen vaskes deretter med vann 3-4
ganger og får tørke. Med hensyn til detaljer angående denne teknikken med kovalent
35 binding av heparin vises det til ovennevnte US-patent nr. 4.613.665.

Eksempel 7Fremstilling av kitosanfilm med ionisk bundet heparin

- 5 En nøytralisert kitosanfilm fremstilt som i eksempel 2. En oppløsning av heparin (125 g i 0,5 l vann inneholdende 4,4 g NaCl) tilsettes. Etter 3 timer ved romtemperatur skylles filmen med 2 x 0,5 l vann og tørkes.

Eksempel 8

10

Biologisk test, kontroll

Filmen fremstilt ifølge eksempel 2 anvendes om en anti-adherensmembran i følgende dyremodell.

- 15 Abdominalveggen til en rotte åpnes og på hver side av sagittallinjen frembringes det på kirurgisk måte et sår på ca. 12 x 10 mm. En defekt dekkes med en film fra eksempel 2, et stykke på ca. 18 x 15 mm, mens den andre defekten får være åpen. Membranen festes med sutur ved bruk av Dexon® 7-0 på en slik måte at ingen sutur eksponeres i abdominalhulrommet.

20

Resultatet evalueres etter 2 og 4 uker. I denne forbindelsen observeres beskjedent adherens i abdominalhulrommet mot membranen, mens massiv adherens kan vises dersom vevdefekten ikke er dekket av en film.

- 25 Abdominaldefekten under filmen heler vesentlig med arrvevdannelse, og det er tegn på inflammatorisk reaksjon og kapseldannelse omkring filmen.

Eksempel 9

- 30 Biologisk test, ifølge oppfinnelsen

Filmen fremstilt ifølge eksempel 3 anvendes som en anti-adherensmembran i følgende dyremodell.

- 35 Abdominalveggen til en rotte åpnes og på hver side av sagittallinjen skapes det på kirurgisk måte et sår på ca. 12 x 10 mm.

8

En defekt dekkes med filmen, ca. 18 x 15 mm, mens den andre defekten får være åpen. Membranen festes med sutur på samme måte som i eksempel 8.

Sårområdet som fikk være åpent viste flere adherenser i motsetning til såret som var
5 dekket av filmen, som hadde meget få hvis noen adherenser.

Eksempel 10Fremstilling av kitosanfilm med ionisk bundet heparin

10

5 g hydrokloridsalt av kitosan (45% acetyleringsgrad, Pronova) oppløses i vann (0,5 l, 1% vol/vekt). Oppløsningen autoklaveres i 1 time ved 125°C for steriliseringsformål. Etter avkjøling fremstilles en film i en Petri-skål, i dette tilfelle ved bruk av 20 ml av oppløsningen. Filmen får deretter tørke ved romtemperatur og en oppløsning av heparin
15 (125 g i 0,5 l vann) tilsettes. Etter 3 timer ved romtemperatur skylles filmen med 2 x 0,5 l vann og tørkes.

Eksempel 1120 Fremstilling av kitosanfilm

5 g hydrokloridsalt av kitosan (45% acetyleringsgrad, Pronova) oppløses i vann (0,5 l, 1% vol/vekt). Oppløsningen autoklaveres i 1 time ved 125°C for steriliseringsformål. Etter avkjøling fremstilles det en film i en Petri-skål, i dette tilfelle ved bruk av 20 ml av
25 oppløsningen. Filmen får deretter tørke ved romtemperatur og nøytraliseres ved tilsetning av natriumfosfatbuffer, 0,2 M, pH 9,0, tilsatt til skålen. Filmen får oppholde seg i denne bufferen i 2-4 timer ved romtemperatur, vaskes deretter med destillert vann 3-4 ganger og får på nytt tørke.

30 **Eksempel 12**Biologisk test, ifølge oppfinnelsen

Filmer fremstilt fra kitosan-heparin som beskrevet ovenfor i eksempel 10 anbringes for å
35 dekke sår (10 x 12 mm, dybde 1 mm) preparert på den parietale abdominalveggen som beskrevet ovenfor. Et identisk sår prepareres på den kontralaterale siden av abdominalveggen og dekkes med en kitosanfilm som beskrevet i eksempel 11.

Forekomsten av adherensdannelse evalueres etter 2 uker. Såret som er dekket med heparin-kitosanfilmen mangler adherenser mens den som er dekket med den rene kitosanfilmen viser noen få, mindre adherenser. Lysmikroskopisk undersøkelse av heparin-kitosanfilmen viser forbedret heling av såret inkludert graden av tildekning med mesotel-lignende celler, og at det er en mindre omfattende infiltrasjon av inflammatoriske celler ved grenseflaten mellom heparin-kitosanfilmen og det sårpåførte abdominalveggvevet enn i det tilsvarende området dekket med den rene kitosanfilmen.

Eksempel 13

10

Fremstilling av kitosan-heparinfilmer

5 g hydrokloridsalt av kitosan (16% acetyleringsgrad, Pronova) oppløses i en 2% eddiksyreoppløsning (0,5 l, 1% vol/vekt). Oppløsningen autoklaveres i 1 time ved 125°C for steriliseringsformål. Etter avkjøling fremstilles en film i en Petri-skål, i dette tilfelle ved bruk av 20 ml av oppløsningen. Filmen utsettes deretter for fordampning i en ovn ved 70°C i 16 timer. Filmen behandles med en 0,1 M NaOH-oppløsning i 3 timere ved romtemperatur og vaskes deretter med destillert vann 3-4 ganger og får igjen tørke i 70°C i 2 timer. Den resulterende filmen overføres deretter til en Petri-skål og 30 ml av en steril oppløsning av nativ heparin (1% vekt/vol, svineslimhinne, Kabivitrum) i 0,2 M fosfatbuffer (pH 6,4) tilsettes. Filmen holdes ved romtemperatur natten over og skylles deretter med sterilt vann og tørkes i en LAF-benk. Fire filmer til fremstilles som angitt ovenfor med den modifikasjon at de behandles med henholdsvis 0,5%, 0,1%, 0,01% og 0,00% oppløsninger av heparin. De hepariniserte filmene underkastes elementanalyse som viser at filmene inneholder henholdsvis 1,2%, 0,9%, 1,3%, 0,23% og 0,007% svovel. Disse verdiene tilsvarer et heparinnhold på 9,2%, 7,7%, 10,8%, delt i seks grupper med ti biopsier 1,9% og 0% respektivt.

Eksempel 14

30

Preparering av in vitro-sår

Steril menneskehud oppnås fra masektomiprøver. I hvert forsøk anvendes kun hud fra en enkelt donor. Under sterile betingelser utskjæres sirkelformede elementer med en diameter på 6 mm ved hjelp av en biopsistanseanordning (Stiefel Laboratories, UK). I midten av hvert stykke lages det på epidermissiden et partielt sår med en 3 mm biopsistanseanordning og deretter overføres stykkene til 12-brønners plater (Costar) med

epidermissiden opp. Hver brønn fylles med Dulbeccos modifiserte Eagles Medium (DMEM) til epidermisnivået idet såret holdes i gass/væske-grenseflaten.

Føtalkalveserum, 2% (FCS) og antibiotika (penicillin 50 µg/ml og streptomycin 50 µg/ml) tilsettes til alle prøver.

5

Eksempel 15

In vitro-helingstest

- 10 In vitro-sårene, beskrevet i eksempel 14, deles i fem grupper med ti biopsier i hver gruppe. Hvert sår dekkes med en heparinisert film som beskrevet i eksempel 13. Mediene endres hver dag. Etter syv dager fikseres stykkene i 4% nøytral bufret formaldehyd, dehydratiseres gjennom en etanol-xylen-serie og innleires i parafin. Tverrsnitt, 10-20 mm i tykkelse, farges med hematoksilin og eosin og graden av re-
- 15 epitelisering bestemmes ved lysmikroskopi. Kun sår totalt dekket med keratinocytter anses som helet.

Som det fremgår fra Fig. 1, stimulerer filmer med heparininnhold under 2% ikke celleproliferasjon.

20

Eksempel 16

Fremstilling av gelpreparater

- 25 Vann inneholdende 0,9% NaCl anvendes for å fremstille følgende fire gelpreparater:

A = 2% metylcellulose

B = 2% metylcellulose + 0,2% natriumheparin

C = 0,5% metylcellulose + 1% kitosan (16% acetylering)

- 30 D = 0,5% metylcellulose + 1% kitosan (16% acetylering) + 0,2% natriumheparin

Eksempel 17

In vitro-helingstest

35

In vitro-sårene beskrevet i eksempel 14 deles i seks grupper med ti biopsier i hver gruppe. Hvert sår i fem av gruppene dekkes med et gelpreparat som beskrevet i

eksempel 16. Den siste gruppen behandles bare med mediene (2% FCS). Mediene skiftes hver dag. Etter syv dager fikseres stykkene i nøytral bufret formaldehyd, dehydratiseres gjennom en etanol-xylene-serie og innleires i parafin. Tverrsnitt, 10-20 mm i tykkelse, farges med hematoksilin og eosin og graden av reepitelisering bestemmes ved
 5 lysmikroskopi. Bare sår totalt dekket med keratinocytter anses som helet.

Som det fremgår fra Fig. 2, heler en gel bestående av en kombinasjon av kitosan og heparin sårene bedre enn det geler med bare kitosan eller bare heparin gjør.

10 Eksempel 18

Biologisk test, ifølge oppfinnelsen

Eksempel 9 gjentas ved bruk av filmen fremstilt ifølge eksempel 7.

15

Som det klart fremgår fra de biologiske forsøkene som er beskrevet ovenfor, gir anvendelsen av teknikker ifølge foreliggende oppfinnelse vesentlig forbedrede helingssegenskaper i betraktning av hindret adhesjon og stimulert vekst.

20 Når det gjelder anvendelsen av oppfinnelsen, kan det nevnes at filmer eller membraner, geler eller pulver fremstilt som angitt ovenfor eller oppløsninger kan anvendes i forbindelse med sår og defekter i eller på følgende organer og strukturer: abdominalvegg; toraksvegg; lunge; hjerte-perikard; sentrale blodkar; tarmkanal; urogenitalkanal; hjernehinne; ryggmarg; sener; nerver; muskler; ben; slimhinne; cornea; hud, osv.

25

Produkter i form av rør eller slanger eller geler kan anvendes som føringer i stimulert vekst og samtidig kan glideflater opprettholdes ut fra det faktum at adhesjon til omgivelsene unngås. Slike produkter kan anvendes i forbindelse med nerver, sener og ligamenter, tarmkanal, urogenitalkanaler, blodkar, osv.

30

Enda bedre stimulering av helingskvalitet kan sannsynligvis oppnås ved en kombinasjon av foreliggende oppfinnelse med vekstfaktorer.

P a t e n t k r a v

1.

Anvendelse av kitosan og et polysakkarid immobilisert dertil valgt fra heparin,
5 heparansulfat og dekstransulfat for fremstilling av et middel som kan hindre eller
vesentlig redusere uønsket adhesjon av skadet vev med tilstøtende eller omgivende vev i
forbindelse med sårheling.

2.

10 Anvendelse ifølge krav 1, hvor polysakkaridet er immobilisert til kitosanen ved hjelp av
ioniske bindinger.

3.

Anvendelse ifølge krav 1, hvor polysakkaridet er immobilisert til kitosanen ved hjelp av
15 kovalente bindinger.

4.

Anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor polysakkaridet er
heparin eller heparansulfat.

20

5.

Anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor midlet er i form av en
film eller membran.

25 6.

Anvendelse ifølge hvilket som helst av kravene 1-4, hvor midlet er i form av et rør eller
en slange.

7.

30 Anvendelse ifølge krav 6, hvor midlet er i form av en gel.

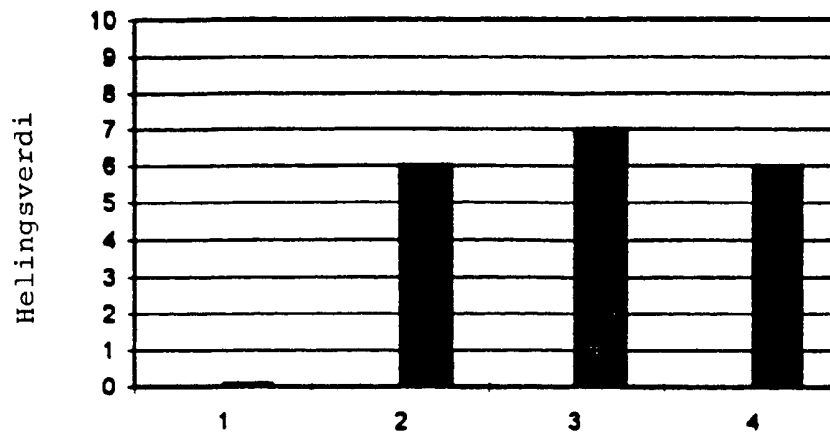
8.

Anvendelse ifølge krav 6, hvor midlet er i form av et pulver, en aerosol eller en
oppløsning.

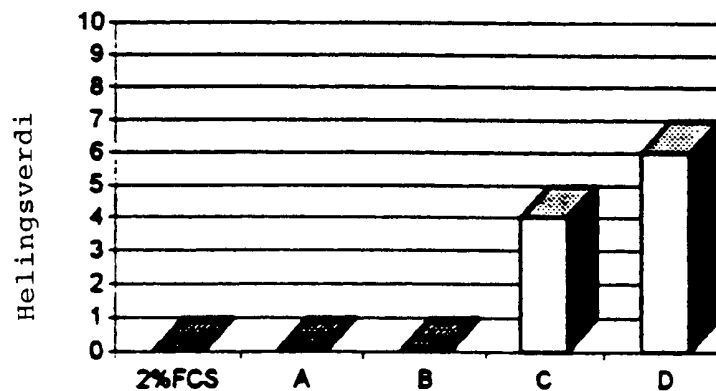
35

9.

Anvendelse ifølge hvilket som helst av de foregående krav, hvor kitosanen har en grad av N-acetylering på høyst ca. 90% og fortrinnsvis høyst ca. 50%.

1/1Fig 1

1=kitosan+1,9% heparin; 2=kitosan+10,8% heparin;
 3=kitosan+7,7% heparin; 4=kitosan+9,2% heparin;

Fig 2

A=2% metylcellulose;
 B=2% metylcellulose+0,2% heparin;
 C=0,5% metylcellulose+1% kitosan;
 D=0,5% metylcellulose+1% kitosan+0,2% heparin