

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 970201 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 970201

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification (IPC⁶)
A61K 31/725
A61K 31/73

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 13.07.1995

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 17.01.1997

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 17.01.1997

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 13.06.2019

(86) Kansainvälinen hakemus - 13.07.1995 PCT/SE1995/000856
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority
19.07.1994 SE 9402529

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Astra Aktiebolag, 151 85 Södertälje, SVERIGE, (SE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Hansson, Hans-Arne, Sverige, SVERIGE, (SE)
2 • Johansson-Ruden, Gunilla, Sverige, SVERIGE, (SE)
3 • Larm, Olle, Sverige, SVERIGE, (SE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Yhteentarttumista estävä aine
Antiadhesionsmedel

Yhteentarttumista estävä aine - Antiadhesionsmedel

Tekniikan taso

- 5 Keksintö liittyy uusiin yhteentarttumista estäviin aineisiin, toisin sanoen tuotteisiin, joilla kyetään estämään kudosten ei-toivottua yhteentarttumista haavan paranemisen yhteydessä. Tuotteella kyetään myös edistämään paranemisen laadullista tulosta sen perusteella, että tämä stimuloi kudoksen regeneraatiota.
- 10 Keksintö sisältää myös menetelmän tällaisen kudosten haitallisen yhteentarttumisen estämiseksi.

Keksinnön tausta

- 15 Elämämme laadulle on mitä merkityksekkäintä, että kykenemme liikkumaan vapaasti haluamallamme ja kulloisessakin tilanteessa tarvitsemallamme tavalla. Liikuntakykymme edellyttää tuki- ja liikuntaelimestön toimivan sopivasti tiiviissä yhteistyössä pääasiassa ihon, limakalvojen ja hermokudoksen kanssa ja se vaatii itsessään sen, että eri rakenteet, kuten luut, lihakset ja jänteet, kykenevät liikkumaan esteettä toistensa suhteen. Näihin toimintoihin vaaditaan
- 20 liukuvyöhykkeitä, mahdollisimman pientä kitkaa ja mahdollisimman suurta liikkumisvapautta. Optimaalisen toimintakyvyn saavuttamiseksi tarvitaan siten esimerkiksi liukujärjestelmiä, jotka sijaitsevat vierekkäisten lihasten ja jänteiden välissä sekä ihon ja sen vieressä olevien kudoksen välissä. Sama pätee myös sisäelinten, kuten ruoansulatuskanavan, sydämen, keuhkojen, aivojen ja selkäytimen, rakenteisiin. Liukujärjestelmiä muodostavat irtonaisesta sidekudoksesta muodostuneet ohuet kerrokset, joita vatsassa, rintaontelossa, sydänpuussin ontelossa, aivoissa ja selkäytimessä verhoavat mesoteelisolut. Samanlainen rakenne esiintyy jänteiden vieruskudoksessa.
- 30 Nämä liukujärjestelmät tulehtuvat ja vaurioituvat erittäin herkkästi. Niihin muodostuu helposti arpikudosta, mikä heikentää toimintakykyä ja johtaa jopa sen menetykseen. Yhteentarttumia, toisin sanoen syiden muodostumista, voi tapahtua vatsaontelossa, ja vierekkäisten tai ympäröivien kudosten membraanityyppiset yhteentarttumat voivat lopulta aiheuttaa hengenvaarallisen tautitilana pidetyn suolentukkeuman. Vammojen hoitoon, kasvainten poistoon tai muiden sairauksien hoitoon tai korjaaviin leikkauksiin käytettyjen kirurgisten toimenpiteiden johdosta
- 35 muodostuu aina arpikudosta, minkä perusteella "luonnollisia ja alkuperäisiä"

liukujärjestelmiä häviää elimistöstä enemmän tai vähemmän laajassa mittakaavassa.

Ihon ja limakalvojen peitteiden vauriot parantuvat monimutkaisesti toisaalta sen perusteella, että sidekudos kykenee regeneroitumaan vain rajoitetusti, ja toisaalta sen perusteella, että peitteisiin muodostuu kypsymätöntä jyväiskudosta, ja viimeksi mainittu kykenee vain rajoitetusti saavuttamaan normaalin kudoksen kypsyystilaa muistuttavan tilan. Muutamia poikkeuksia lukuun ottamatta verinahka ei nuorilla eikä aikuisilla muodostu uudelleen vaurioitumisen jälkeen. Verinahan pienet ja/tai pinnalliset vauriot paranevat siten, että menetetyn kudoksen tilalle syntyy viereistä kudostyyppiä muistuttavia rakenteita sekä reagoivaa jyväiskudosta. Jos kudosta on menetetty laajemmalti, kuten syvien palohaavojen syntymisen jälkeen, kolmannen asteen palovammojen syntymisen jälkeen ja kun osa verinahasta on tuhoutunut, niin paranemisen yhteydessä muodostuu väistämättä arpikudosta, kudosta häviää vaihtelevassa määrin mutta pysyvästi ja syntyy pysyviä epämuodostumia. Arpikudoksen sisältämä mekaanisesti kestävä komponentti on pääasiassa tyyppin III kollageenia, joka on lyhytsäikeistä ja heikosti järjestäytyneitä ja se on mekaanisilta ominaisuuksiltaan siten heikompi kuin normaali optimaalinen kollageenityyppi I. Amorfisen taipuisan perusaineen osuus samoin kuin solumäärä on pienentynyt. Verisuonten määrä pienenee ajan myötä siitä, mitä se on normaalissa kudoksessa, ja verisuonten jakaantuminen ja niiden tyypit ovat muuttuneet. Kyseisessä kudoksessa tavataan usein suuria, ohutseinäisiä verisuonia, joiden toiminta on vastaavia normaaleja verisuonia heikompa ja imusuonitus on myös epänormaalialia. Liukujärjestelmien tilalle muodostuu siten lopulta jäykkää, säikeistä kollageenista muodostuvaa sidekudosta.

Yhden lisävaikeuksia aiheuttavan erittäin tärkeän tekijän muodostaa se, että arpikudokseen ilmaantuu myofibroblasteja, toisin sanoen "tavallisia" sidekudossoluja (fibroblasteja) jotka, kuten myös osa makrofageista, sisältävät solulimassaan normaalia runsaammin lihasproteiinikumppuja, joiden avulla solut kykenevät supistumaan hitaasti ja voimakkaasti ja pysymään supistuneina pitkän aikaa. Tämä voi johtaa kutistumiin, jotka saavat vaurioituneen kudoksen poikkeamaan yhä enemmän alkuperäisestä muodostaan ja rajoittavat sen toimintakykyä. Myofibroblastien määrän havaitaan lisääntyvän esimerkiksi rintarauhasimplantaattien [rintojen suurentamiseksi tai rinnan ennalleen muotoilemiseksi siirrettävä silikoniproteesi; tätä kysymystä ovat yksityiskohtaisemmin käsitelleet Lossing, C. & Hansson, H.-A. julkaisussa *Plastic Reconstr. Surgery* 91 (1993) 1277 - 1286 ilmestyneessä artikkelissaan] ympärillä ja ompeleiden ympärillä sekä vieraista

materiaaleista valmistettujen muiden implantaattien ympärillä. Tietyissä reumataudeissa myofibroblasteja esiintyy normaalia useammin nivelten ympärillä, mikä voi johtaa sormien vääristymiseen ja joskus myös sijoiltaan menoon. Tämä solu on juuri se sellaisia epämuodostumia aiheuttava patogeeninen tekijä, joita
 5 Dupuytrenin kutistuskoukistumaa sairastavat potilaat saavat käsiinsä. Myofibroblastit sekä tavalliset fibroblastit kiinnittyvät kollageenisäikeisiin spesifisten heterodimeeristen reseptorien avulla, joiden yhden yksikön muodostaa aina 1-integriini. Jos integriinien toiminta estetään, niin lopputuloksena on kontraktuurien eliminoituminen. Tulehdusta lievittävät lääkkeet voivat vaikuttaa
 10 integriinin ilmentymiseen.

Irtonaisen sidekudoksen sisältämät liukujärjestelmät, joissa joko on tai ei ole selvästi rajoittuvaa liukupintaa, palautuvat ainoastaan entiselleen niissä tapauksissa, joissa tulehtuminen on jäänyt hyvin vähäiseksi. Jyväiskudoksen muodostumista tapahtuu kuitenkin vain tulehdusilmiön yhteydessä, joka itsessään johtaa epäkypsien solujen ja kudostekomponenttien muodostumiseen. Syynä siihen, että
 15 arpikudos on tasoltaan määrällisesti ja laadullisesti alkuperäistä kypsää mutta menetettyä kudosta heikompaa, on juuri se, ettei tässä korjaustapahtumasarjassa muodostunut uusi kudos kykene saavuttamaan normaalin erilaistumisen tasoja.
 20 Regeneroituneen kudoksen kypsyminen vaatii sitä, että tarjolla on solujen, säikeiden ja perusaineen erilaistumista sääteleviä ja edistäviä kasvutekijöitä.

Tekniikan taso

Laajamittaista tutkimusta on kohdistettu sen ongelman ratkaisemiseksi, kuinka
 25 voitaisiin välttyä siltä kudosten haitalliselta yhteentarttumiselta, joka liittyy haavojen, esimerkiksi kirurgisissa toimenpiteissä tehtyjen leikkaushaavojen, onnettomuuksien, tulehdusten ja tuumorien aiheuttamien haavojen, paranemiseen. PCT-patenttihakemusjulkaisussa nro US90/02 406 kuvataan tähän nimenomaiseen ongelmaan liittyviä keinoja ja siihen on myös liitetty suhteellisen laaja selvitys
 30 tekniikan tasosta. Mainitussa patenttihakemusjulkaisussa kuvatut menetelmät perustuvat sellaisten kerroskonstruktioiden käyttöön, jotka koostuvat biologisesti hajoaavasta, biologisesti aktiivisesta membraanista, jonka vastakkaisten pintojen koostumukset poikkeavat toisistaan ja joiden biologiset toiminnot ovat siten erilaiset. Vastaavia tuotteita ei kuitenkaan näytä olevan saatavilla kaupallisesti.

35

Keksinnön yhteenveto

Tämän mukaisesti tämän keksinnön kohteena on saattaa käyttöön yhteentarttumista estävä aine, jonka käyttö synnyttää vain lyhyen aikaa kestävän vähäisen

tulehduksen, ja mainittu aine on lisäksi biologisesti hyväksyttävä ja kykenee hajoamaan biologisesti haitallisia hajoamistuotteita muodostamatta.

5 Tämän keksinnön toisena kohteena on saattaa käyttöön yhteentarttumista estävä aine, jolla kyetään saamaan aikaan vastinpintoja ja jonka käyttö tuottaa sen lopputuloksen, että mekaaniset ja tekniset toimenpiteet esimerkiksi kirurgisten leikkaushaavojen yhteydessä yksinkertaistuvat.

10 Vielä yhtenä tämän keksinnön kohteena on saattaa käyttöön menetelmä, jolla viereisten tai ympäröivien kudoksien ja elinten haitallinen tarttuminen haavan paranemisen yhteydessä saadaan estettyä tai tätä saadaan vähennettyä huomattavasti.

15 Vielä yhtenä tämän keksinnön kohteena on stimuloida kudoksen regeneraatiota haavan paranemisen yhteydessä.

20 Tästä keksinnöstä saadaan käyttöön näihin sekä muihin seuraavassa patenttiselityksessä tarkasteltaviin kohteisiin uusi kitosaanin ja siihen immobilisoidun polysakkaridin käyttötapa, ja mainittu polysakkaridi on hepariini, heparaanisulfaatti tai dekstraanisulfaatti. Kyseistä ainekoostumusta käyttämällä voidaan tuottaa aine, joka kykenee eliminoimaan tai vähentämään merkittävästi vaurioituneen kudoksen haitallista tarttumista viereisiin tai ympäröiviin kudoksiin haavan paranemisen yhteydessä.

25 Käytetty polysakkaridi voidaan immobilisoida kitosaaniin pääasiallisesti kolmella eri tavalla. Immobilisointi voi siten tapahtua ionisidoksin, kovalenttisin sidoksin tai sen perusteella, että polysakkaridi sulkeutuu kitosaanin sisään mekaanisesti materiaalia liuoksesta saostettaessa. Menetelmä asianmukaisen polysakkaridin kovalenttiseksi sitomiseksi aminoryhmiä sisältävään alustaan on kuvattu US-patenttijulkaisussa nro 4 613 665.

30 Polysakkaridina on erityisen edullista käyttää hepariinia tai heparaanisulfaattia, joita mainittuja aineita on saatavilla kaupallisesti useilta valmistajilta. Voidaan myös luonnollisesti käyttää polysakkaridin osittain hydrolysoituja muotoja edellyttäen, että niissä on jäljellä biologista aktiivisuutta.

35 Tämän keksinnön mukaisesti käytettävä yhteentarttumista estävä aine voidaan tehdä erilaisiin fysikaalisiin muotoihin esimerkiksi kalvoiksi tai membraaneiksi, geeleiksi, putkiksi tai letkuiksi, jauheiksi, aerosoleiksi tai liuoksiksi. Asian-

omainen muoto on luonnollisesti hoidettavan vaurion mukainen. Kalvot ovat käyttökelpoisia useimmissa tapauksissa, kun taas putkia tai geelejä voidaan käyttää erityistapauksissa, esimerkiksi pitkänomaisten omaan osastoonsa rajoittuvien kudosten, esimerkiksi lihasten tai jänteiden, yhteydessä.

5

Kitosaani on 1,4-sidosten avulla muodostunut lineaarinen polysakkaridi, joka on rakentunut β -D-glukosamiiniyksiköistä. Kitosaania valmistetaan N-deasetyloimalla kitiiniä, joka on muun muassa hyönteisten ja äyriäisten ulkokuorta muodostava polymeeri. Kitiiniä saadaan kaupalliseen käyttöön rapujen ja katkarapujen kuorista, jotka ovat kalastusteollisuuden tuottamaa jätettä. Kitiinien alkalikäsittelyä 10 kontrolloimalla voidaan tehdä eriasteisesti N-asetyloituneita kitosaaneja. Kun kitiiniä käsitellään väkevällä emäksellä, tavallisesti natriumhydroksidilla, tapahtuu N-deasetyloituminen, toisin sanoen asetamidoryhmien muuttuminen aminoryhmiksi, mistä saadaan kitosaania.

15

Kitosaanin käyttökelpoisuuteen vaikuttavat fysikaaliset ominaisuudet ovat riippuvaisia N-asetyloitumisasteesta, molekyylipainosta ja homogeenisuudesta. Kitosaani hajoaa biologisesti sekä ruoansulatusjärjestelmässä esiintyvän kitinaasin että lysotsyymiin ja muiden ruumiinnesteissä esiintyvien entsyymien vaikutuksesta.

20

Tämän keksinnön mukaisen käytön yhteydessä on edullista, että kitosaanin N-asetyloitumisaste on korkeintaan noin 90 % ja edullisemmin korkeintaan noin 50 %. On erityisen edullista, että N-asetyloitumisaste on alle noin 25 %.

25

Tästä keksinnöstä saadaan myös käyttöön menetelmä haavojen paranemisen yhteydessä tapahtuvan kudosten haitallisen kiinnitarttumisen estämiseksi tai sen vähentämiseksi merkittävässä määrin. Tähän menetelmään sisältyy se, että haavan paranemiskohtaa käsitellään aineella, joka koostuu kitosaanista ja tähän immobilisoidusta polysakkaridista, joka on hepariini, heparaanisulfaatti tai dekstraanisulfaatti.

30

Kyseessä olevan haavan luonteen mukaan voidaan ainetta lisätä kalvon muodossa, geelin muodossa tai putken tai letkun muodossa. Käyttöön valittavaa tuotetta koskeva ratkaisu voidaan tehdä vaikeuksitta esimerkiksi kyseessä olevan kirurgisen toimenpiteen yhteydessä.

35

Edullisten sovellutusmuotojen yksityiskohtainen kuvaus

Tätä keksintöä kuvataan seuraavaksi tätä keksintöä rajoittamattomien esimerkkien yhteydessä. Esimerkeissä kaikki kalvot on valmistettu petrimaljoilla, joiden pinta-ala on 54 cm².

5

Esimerkki 1

Kitosaanikalvon valmistus

5 g kitosaanin hydrokloridisuolaa (asetyloitumisaste 50 %, Pronova) liuotetaan tislattuun veteen (0,5 l, 1 % v/w). 10 ml saatua liuosta pipetoidaan petrimaljalle ja kitosaanikalvo muodostetaan haihduttamalla ja kuivattamalla lämpökaapissa 70 °C:ssa 24 tunnin ajan. Tämän jälkeen saatu kalvo neutraloidaan lisäämällä siihen 0,2 M natriumfosfaattipuskuria, jonka pH on 9,0. Kalvon annetaan jäädä petrimaljaan mainittuun puskuriin huoneenlämpöön 2 - 4 tunnin ajaksi ja se pestään sitten 3 - 4 kertaa vedellä ja sen annetaan kuivua.

15

Esimerkki 2

Kitosaanikalvon valmistus

5 g kitosaanin hydrokloridisuolaa (asetyloitumisaste 20 %, Pronova) liuotetaan 2-%:iseen etikkahappoliuokseen (0,5 l, 1 % v/w). Liuosta autoklavoidaan 1 tunnin ajan 125 °C:ssa sen steriloimiseksi. Kun seos on jäähtynyt, niin kalvo tehdään petrimaljassa käyttäen tässä tapauksessa 20 ml liuosta. Kalvon annetaan tämän jälkeen kuivua huoneen lämpötilassa ja se neutraloidaan lisäämällä 0,2 M natriumfosfaattipuskuria, jonka pH on 9,0, jota puskuria lisätään maljaan. Kalvon annetaan jäädä tähän puskuriin 2 - 4 tunnin ajaksi huoneenlämpötilaan ja se pestään tämän jälkeen tislattulla vedellä 3 - 4 kertaa ja annetaan jälleen kuivua.

25

Esimerkki 3

Hepariinin pilkkominen typpihapokkeella

Yksi gramma hepariinia liuotetaan 300 ml:aan vettä. Liuos jäähdytetään 0 °C:een jäävedessä ja seos pidetään kylmänä. Seokseen lisätään ensin 10 mg natriumnitriittiä (NaNO₂). Tämän jälkeen liuokseen lisätään 2 ml etikkahappoa liuosta samalla sekoittaen. Reaktioseosta pidetään 0 °C:ssa kahden tunnin ajan, se dialysoidaan ja kylmäkuivataan. Saanto on 0,7 g pilkkoutunutta hepariinia.

35

Esimerkki 4

Hepariinin hapettaminen perjodaatilla

Natriunperjodaatilla hapetettu natriumhepariiniliuos valmistetaan seuraavalla tavalla: Yksi gramma natriumperjodaattia, NaIO₄, liuotetaan 200 ml:aan tislattua vettä.

Natriumperjodaattiliuokseen lisätään kymmenen grammaa natriumhepariinia ja sitä sekoitetaan pimeässä yön yli. Kun liuokseen on lisätty 10 ml glyserolia ja sitä on sekoitettu kahden tunnin ajan, niin saatu liuos dialysoidaan vettä vastaan. Vesi vaihdetaan kerran tunnissa. Tästä saadaan liuos, joka sisältää perjodaatilla hapetettua hepariinia, jonka konsentraatio on noin 19 mg/ml.

Esimerkki 5

Kovalenttisesti sitoutunutta hepariinia sisältävän kitosaanikalvon valmistus (päästä tapahtuva kiinnittäminen)

10 Esimerkin 1 mukaisesti valmistettuun neutraloituun kitosaanikalvoon lisätään 20 ml liuosta, joka sisältää 125 mg esimerkin 3 mukaisesti valmistettua nitriitillä pilkottua hepariinia, joka on liuotettu 0,5 l:aan vettä ja joka sisältää 4,4 g NaCl:ia. Liuokseen lisätään 15 mg natriumsyaaniboorihydridiä. Liuoksen pH säädetään arvoon 3,9 käyttäen 0,5 M suolahappoa tai jotain muuta happoa. Kitosaanikalvon sisältävän liuoksen annetaan olla paikoillaan huoneen lämpötilassa 14 tunnin ajan ja käsitelty kalvo pestään tämän jälkeen 3 - 4 kertaa vedellä ja sen annetaan kuivua.

Esimerkki 6

Kovalenttisesti sidottua hepariinia sisältävän kitosaanikalvon valmistus (useasta pisteestä tapahtuva kiinnittäminen)

20 Esimerkin 2 mukaisesti valmistetun neutraloidun kitosaanikalvon annetaan jäädä paikoilleen 24 tunniksi 20 ml:aan liuosta, jonka koostumus on esitetty seuraavaksi. 4,4 natriumkloridia ja 125 mg perjodaatilla hapetettua hepariinia, joka on valmistettu esimerkissä 4 kuvatulla tavalla, liuotetaan 0,5 l:aan vettä, pH säädetään arvoon 3,9 käyttäen 0,5 M suolahappoa. Tähän liuokseen lisätään 15 mg natriumsyaaniboorihydridiä ja liuosta pidetään 10 tuntia huoneen lämpötilassa. Käsitelty kalvo pestään tämän jälkeen 3 - 4 kertaa vedellä ja sen annetaan kuivua. Tietoa tämän hepariinin kovalenttisen kiinnittämismenetelmän yksityiskohdista on saatavissa tutustumalla edellä mainittuun US-patenttijulkaisuun nro 4 613 665.

Esimerkki 7

Ionisidoksin kiinnittynyttä hepariinia sisältävän kitosaanikalvon valmistus

35 Neutraloitu kitosaanikalvo valmistetaan esimerkissä 2 käytetyllä tavalla. Tähän lisätään hepariiniliuosta (125 g 0,5 l:ssa vettä, joka sisältää 4,4 g NaCl:ia). Kun kalvoa on pidetty 3 tuntia huoneen lämpötilassa, se huuhdellaan 2 X 0,5 l:lla vettä ja kuivataan.

Esimerkki 8Biologinen tutkimus, kontrolli

Esimerkin 2 mukaisesti valmistettua kalvoa käytetään tarttumista estävänä membraanina seuraavassa eläinmallissa.

5

Rotan vatsan seinämä avataan ja pituussuuntaisen leikkauslinjan kummallekin puolelle tehdään kirurgisin keinoin haava, joka on kooltaan noin 12 x 10 mm. Toinen haava peitetään esimerkistä 2 peräisin olevalla membraaninkappaleella, jonka koko on 18 x 15 mm, kun taas toinen haava jätetään avoimeksi. Membraani ommellaan käyttäen Dexon[®]7-0:aa siten, ettei ommelta tule lainkaan vatsaontelon puolelle.

10

Tulos arvioidaan 2 ja 4 viikon kuluttua. Tässä yhteydessä havaitaan pieniä vatsaontelon ja membraanin kiinnittymiä, kun taas siinä tapauksessa, jossa kudonvaurio ei ollut kalvon peittämä, voitiin osoittaa laaja-alaista kiinnittymistä.

15

Kalvon alla oleva vatsassa sijaitseva haava paranee pääosin arpikudoksen muodostuksen avulla, ja merkkejä tulehdusreaktiosta ja kapselin muodostumisesta kalvon ympärille on havaittavissa.

20

Esimerkki 9Biologinen tutkimus, tämän keksinnön mukainen materiaali

Esimerkin 3 mukaisesti valmistettua kalvoa käytetään tarttumista estävänä membraanina seuraavassa eläinmallissa.

25

Rotan vatsan seinämä avataan ja pituussuuntaisen leikkauslinjan kummallekin puolelle tehdään kirurgisin keinoin haava, joka on kooltaan noin 12 x 10 mm.

30

Toinen vaurio peitetään kalvolla, jonka koko on noin 18 x 15 mm, kun taas toinen vaurio jätetään avoimeksi. Membraani ommellaan samalla tavoin kuin esimerkissä 8.

35

Avoimeksi jätetyllä haava-alueella esiintyi useita yhteentarttumiskohtia, päinvastoin kuin kalvolla peitetyllä haavalla, jossa esiintyi hyvin harvoja yhteentarttumiskohtia tai näitä ei ollut ollenkaan.

Esimerkki 10Ionisidoksin kiinnittynyttä hepariinia sisältävän kitosaanikalvon valmistus

5 g kitosaanin hydrokloridisuolaa (asetyloitumisaste 45 %, Pronova) liuotetaan veteen (0,5 l, 1 % v/w). Liuosta autoklavoidaan 1 tunnin ajan 125 °C:ssa sen steriloimiseksi. Kun liuos on jäähtynyt, niin kalvo tehdään petrimaljalle, mihin tässä tapauksessa käytetään 20 ml liuosta. Kalvon annetaan sitten kuivua huoneen lämpötilassa ja siihen lisätään hepariiniliuosta (125 g 0,5 l:ssa vettä). Kun kalvoa on pidetty huoneen lämpötilassa 3 tuntia, se huuhdellaan 2 x 0,5 l:lla vettä ja se kuivataan.

10

Esimerkki 11Kitosaanikalvon valmistus

5 g kitosaanin hydrokloridisuolaa (asetyloitumisaste 45 %, Pronova) liuotetaan veteen (0,5 l, 1 % v/w). Liuosta autoklavoidaan 1 tunnin ajan 125 °C:ssa sen steriloimiseksi. Kun liuos on jäähtynyt, niin kalvo tehdään petrimaljalle, mihin tässä tapauksessa käytetään 20 ml liuosta. Kalvon annetaan sitten kuivua huoneenlämpötilassa ja se neutraloidaan lisäämällä 0,2 M natriumfosfaattipuskuria, jonka pH on 9,0 ja joka lisätään maljaan. Kalvon annetaan olla paikoillaan tässä puskurissa 2 - 4 tuntia huoneenlämpötilassa ja se pestään sitten tislattulla vedellä 3 - 4 kertaa ja annetaan kuivua uudelleen.

20

Esimerkki 12Biologinen tutkimus, tämän keksinnön mukainen materiaali

Edellä olevassa esimerkissä 10 kuvatussa kitosaani-hepariinista valmistettu kalvo asetetaan peittämään haavoja (10 x 12 mm, syvyys 1 mm), jotka on tehty edellä kuvatulla tavalla vatsan parietaaliseen seinämään. Vatsan seinämään tehdään vastakkaisen kyljen puolelle identtinen haava ja tämä peitetään esimerkin 11 mukaisella kitosaanikalvolla. Yhteentarttumien muodostumisen esiintymistä arvioidaan 2 viikon jälkeen. Hepariini-kitosaanikalvolla peitettyssä haavassa ei esiinny yhteentarttumuksia kun taas haavassa, joka on peitetty pelkällä kitosaanikalvolla, esiintyy muutamia pieniä yhteentarttumuksia. Tarkasteltaessa hepariini-kitosaanimembraania valomikroskoopilla haavan havaitaan parantuneen paremmin ja olevan mesoteelityyppisten solujen peittämä, ja hepariini-kitosaanikalvon ja haavan sisältävän vatsan seinämäkudoksen väliseen rajapintaan tunkeutuneiden tulehdussolujen määrä jää pienemmäksi kuin vastaavalla pelkällä kitosaanikalvolla peitettyllä alueella.

25

30

35

Esimerkki 13Kitosaani-hepariinikalvojen valmistus

5 g kitosaanin hydrokloridisuolaa (asetyloitumisaste 16 %, Pronova) liuotetaan 2-%:iseen etikkahappoliuokseen (0,5 l, 1 % v/w). Liuosta autoklavoidaan 1 tunnin ajan 125 °C:ssa sen sterilisoimiseksi. Kun liuos on jäähtynyt, niin kalvo valmistetaan petrimaljassa, mihin tässä tapauksessa käytetään 20 ml liuosta. Kalvon annetaan tämän jälkeen haihtua lämpökaapissa 70 °C:ssa 16 tunnin ajan. Kalvoa käsitellään 0,1 M NaOH-liuoksella 3 tunnin ajan huoneen lämpötilassa ja se pestään tämän jälkeen 3 - 4 kertaa tislattulla vedellä ja sen annetaan kuivua uudelleen 70 °C:ssa 2 tunnin ajan. Tulokseksi saatu kalvo siirretään tämän jälkeen petrimaljalle ja siihen lisätään 30 ml steriiliä natiivin hepariinin liuosta (1 % w/v, sian limakalvoa, Kabivitrum) 0,2 M fosfaattipuskurissa (pH 6,4). Kalvoa pidetään huoneen lämpötilassa yön yli ja se huuhdellaan sitten steriilillä vedellä ja kuivataan LAF-pöydällä. Neljä muuta kalvoa valmistetaan samoin kuin edellä käyttäen sellaisia muutoksia, joissa kalvoja käsitellään 0,5-%:isessä, 0,1-%:isessä, 0,01-%:isessä ja 0,00-%:isessä hepariiniliuoksessa, tässä järjestyksessä mainittuna. Heparinisoiduille kalvoille tehdään alkuaineanalyysi, josta käy ilmi, että kalvot sisältävät 1,2 %, 0,9 %, 1,3 %, 0,23 % ja 0,007 % rikkiä, tässä järjestyksessä ilmoitettuna. Nämä arvot vastaavat kymmenestä biopsiasta, jotka oli jaettu kuuteen ryhmään, saatuja hepariinipitoisuuksia, joiden havaittiin olevan 9,2 %, 7,7 %, 10,8 %, 1,9 % ja 0 %.

Esimerkki 14Haavojen valmistus in vitro -olosuhteissa

25 Steriiliä ihmisen ihoa saadaan masektomianäytteistä. Jokaisessa kokeessa käytetään vain yhdeltä luovuttajalta peräisin olevaa ihoa. Steriileissä olosuhteissa leikataan halkaisijaltaan 6 mm:n kiekkoja biopsianaskalilla (Stiefel Laboratories, UK). Jokaisen kappaleen keskelle näiden epidermaalille puolelle tehdään pienempi haava 3 mm:n biopsianaskalilla ja tästä saadut kappaleet siirretään 12-kuoppaisiin levyihin (Costar) epidermaalinen puoli ylöspäin. Jokaiseen kuoppaan lisätään 30 Dulbeccon modifioimaa Eaglen mediumia (DMEM) epidermin yläpinnan tasolle siten, että haava pysyy kaasun ja nesteen välisellä rajapinnalla. Kaikkiin näytteisiin lisätään fetaalista vasikanseerumia, 2 % (FCS), ja antibiootteja (penisilliiniä 50 µg/ml ja streptomysiiniä 50 µg/ml).

35

Esimerkki 15Paranemistutkimus in vitro -olosuhteissa

Esimerkissä 14 kuvatut in vitro -olosuhteissa tehdyt haavat jaetaan viiteen ryhmään, joissa jokaisessa ryhmässä on kymmenen biopsiaa. Jokainen haava peitetään esimerkin 13 mukaisella heparinisoidulla kalvolla. Mediumit vaihdetaan joka päivä. Seitsemän päivän kuluttua kappaleet kiinnitetään 4-%:isessä neutraalissa puskuroidussa formaldehydissä, niistä poistetaan vesi etanoli-ksyleenisarjoissa avulla ja niistä valmistetaan parafiinivalmisteet. 10 - 20 mm paksuiset poikkisuuntaan tehdyt kudosleikkeet värjätään hematoksyliinilla ja eosiinilla ja epiteelin uudismuodostuminen määritetään valomikroskopiolla. Vain sellaisten haavojen katsotaan parantuneen, jotka ovat täysin peittyneet keratinosyyteillä.

Kuten kuviosta 1 käy ilmi, niin kalvot, joiden hepariinipitoisuus on alle 2 %, eivät stimuloi solujen lisääntymistä.

Esimerkki 16Geelikoostumusten valmistus

Seuraavien neljän geelikoostumuksen valmistamiseen käytetään vettä, joka sisältää 0,9 % NaCl:ia.

A = 2 % metyyliiselluloosaa

B = 2 % metyyliiselluloosaa + 0,2 % natriumhepariinia

C = 0,5 % metyyliiselluloosaa + 1 % kitosaania (asetyloitumisaste 16 %)

D = 0,5 % metyyliiselluloosaa + 1 % kitosaania (asetyloitumisaste 16 %) + 0,2 % natriumhepariinia

Esimerkki 17Paranemistutkimus in vitro -olosuhteissa

Esimerkissä 14 kuvatut in vitro -olosuhteissa tehdyt haavat jaetaan kuuteen ryhmään, joissa jokaisessa ryhmässä on kymmenen biopsiaa. Jokainen haava viidessä ryhmässä peitetään esimerkin 16 mukaisella geelikoostumuksella. Viimeistä ryhmää käsitellään vain mediumilla (2-%:inen FCS). Mediumit vaihdetaan joka päivä. Seitsemän päivän kuluttua palat kiinnitetään 4-%:isessä neutraalissa puskuroidussa formaldehydissä, niistä poistetaan vesi etanoli-ksyleenisarjoissa ja niistä valmistetaan parafiinivalmisteet. 10 - 20 mm paksuiset poikkisuuntaan tehdyt kudosleikkeet värjätään hematoksyliinilla ja eosiinilla ja epiteelin uudismuodostuminen määritetään valomikroskopiolla. Vain sellaisten haavojen katsotaan parantuneen, jotka ovat täysin peittyneet keratinosyyteillä.

Kuten kuviosta 2 käy ilmi, niin geeli, joka koostuu kitosaanin ja hepariinin yhdistelmästä, parantaa haavat paremmin kuin geelit, joissa on vain kitosania tai vain hepariinia.

5 Esimerkki 18

Biologinen tutkimus, tämän keksinnön mukainen materiaali

Esimerkki 9 toistetaan käyttäen esimerkin 7 mukaisesti valmistettua kalvoa

10 Edellä kuvattujen biologisten tutkimusten perusteella on selvää, että käyttämällä tämän keksinnön mukaisia menetelmiä on mahdollista edistää merkittävästi paranemisominaisuuksia yhteentarttumisen ehkäisemisen ja kasvun stimuloitumisen kannalta katsoen. Tämä keksintö ei rajoitu yllä kuvattuihin esimerkkeihin ja keksinnön suojapiiriä rajoittavat vain oheisten patenttivaatimusten suojapiiri.

15 Tämän keksinnön sovellutusmuotojen kyseessä ollessa voidaan mainita, että edellä kuvatulla tavalla valmistettuja kalvoja tai membraaneja, geelejä tai jauheita tai liuoksia voidaan käyttää haavojen ja vammojen yhteydessä, jotka ovat elimissä tai rakenteissa tai näiden päällä ja jotka ovat: vatsaontelon seinämä; rintaontelon seinämä; keuhkot; sydän-sydänpuussi; keskeiset verisuonet; ruoansulatuskanava; urogenitaalikanava; kallo; serebraaliset aivokalvot; selkäydin; jänteet; hermot; lihakset; luu; limakalvo; sarveiskalvo; iho ja muut näitä vastaavat kohteet.

25 Putkien tai letkujen tai geelien muodossa olevia tuotteita voidaan käyttää ohjaamaan stimuloitua kasvua säilyttäen samanaikaisesti liukupinnat sen toiseikan perusteella, että tarttuminen ympäröiviin kohteisiin on vältettävissä. Tällaisia tuotteita voidaan käyttää hermojen, jänteiden ja ligamenttien, ruoansulatuskanavan, urogenitaalikanavien, verisuonten ja muiden vastaavien rakenteiden yhteydessä.

30 Paranemisen laatua voidaan mahdollisesti saada edistettyä vielä tästäkin yhdistämällä tähän keksintöön kasvutekijöitä.

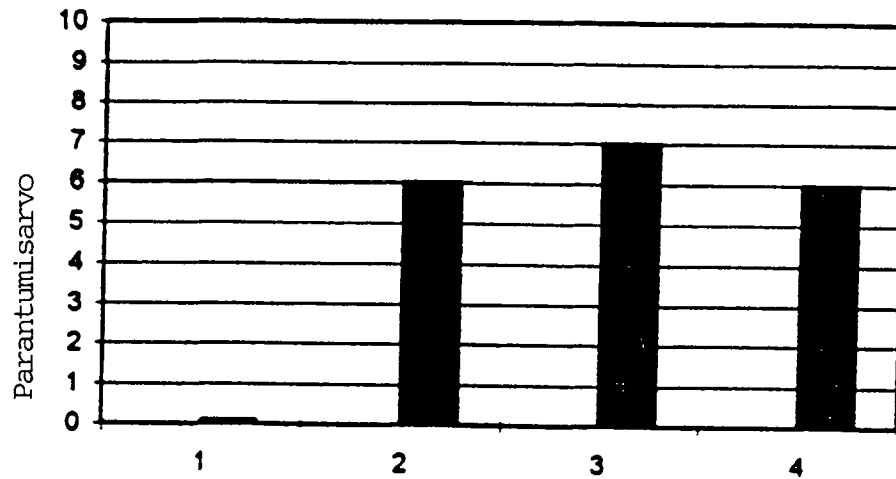
Patenttivaatimukset

1. Kitosaanin ja siihen immobilisoidun polysakkaridin käyttö, joka polysakkaridi on hepariini, heparaanisulfaatti tai dekstraanisulfaatti, sellaisen aineen valmistamiseksi, joka kykenee estämään tai merkittävästi vähentämään haavan paranemisen yhteydessä tapahtuvaa kudoksen haitallista kiinnitarttumista viereisiin tai ympäröiviin kudoksiin.
- 5
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että polysakkaridi immobilisoidaan kitosaaniin ionisidosten avulla.
- 10
3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että polysakkaridi immobilisoidaan kitosaaniin kovalenttisten sidosten avulla.
4. Minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että polysakkaridi on hepariini tai heparaanisulfaatti.
- 15
5. Minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että aine on kalvon tai membraanin muodossa.
- 20
6. Minkä tahansa patenttivaatimuksista 1 - 4 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että aine on putken tai letkun muodossa.
- 25
7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että aine on geelin muodossa.
8. Patenttivaatimuksen 6 mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että aine on jauheen, aerosolin tai liuoksen muodossa.
- 30
9. Minkä tahansa edellisistä patenttivaatimuksista mukainen käyttö, **tunnettu** siitä, että kitosaanin N-asetyloitumisaste on korkeintaan 90 % ja edullisesti korkeintaan 50 %.
- 35
10. Menetelmä haavan paranemisen yhteydessä tapahtuvan kudosten yhteentarttumisen estämiseksi tai tämän vähentämiseksi huomattavasti, **tunnettu** siitä, että haavan paranemiskohdassa käytetään aineetta, joka koostuu kitosaanista ja siihen immobilisoidusta polysakkaridista, joka on hepariini, heparaanisulfaatti tai dekstraanisulfaatti.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ainetta käytetään kalvon tai membraanin muodossa.
12. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ainetta
5 käytetään geelin muodossa.
13. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ainetta käytetään putken tai letkun muodossa.
- 10 14. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ainetta käytetään jauheen, aerosolin tai liuoksen muodossa.

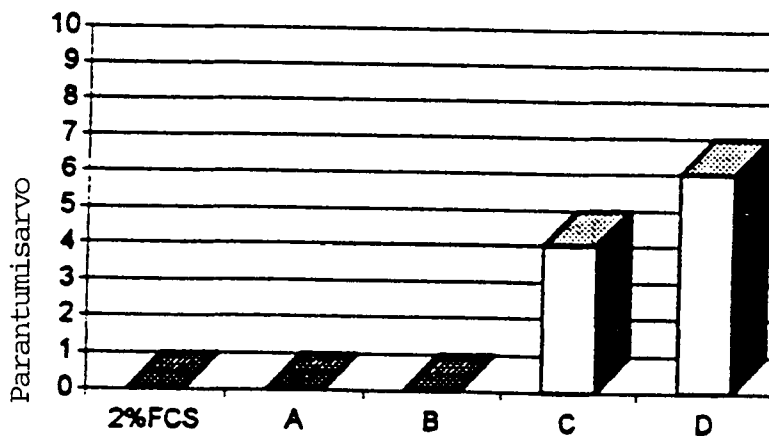


Fig 1



1=Kitosaani+1,9 % Heparini; 2=Kitosaani+10,8 % Heparini;
3=Kitosaani+7,7 % Heparini; 4=Kitosaani+9,2 % Heparini

Fig 2



A=2 % Metyyliselluloosa;
B=2 % Metyyliselluloosa+0,2 % Heparini;
C=0,5 % Metyyliselluloosa+1 % Kitosaani;
D=0,5 % Metyyliselluloosa+1 % Kitosaani+0,2 % Heparini