



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1291020** **A3**

(51) 4 A 61 K 31/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР  
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21) 3266255/30-15

(22) 30.03.81

(31) 2529/80

(32) 31.03.80

(33) CH

(46) 15.02.87. Бюл. № 6

(71) Золько Базель АГ (CH)

(72) Вольфганг Фрэфель, Хайнц Феликс Лихти и Массимо Брунетти (CH)

(53) 59.089.844(088.8)

(56) Lorgiader F. Organ Transplantation, Gorg Thieme, 1970.

Walter P., Schmitz H. Der heterologe Gefassersatz, Editio Cantor, Aulendorf, 1976.

Sawyer P.H. et al. Vascular Grafts Appleton Century Crofts, 1977, p. 282.

(54) СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ТРАНСПЛАНТАТОВ ОРГАНОВ

(57) Изобретение относится к области медицины и касается способа приготовления трансплантатов органов. Цель изобретения - повышение степени сохранения биофизических свойств исходных органов. Для этого изъятые у рыб, птиц и млекопитающих органы обрабатывают растворами ди-, три- или поликарбоновых кислот или их хлорангидридов, взятыми в концентрации 0,02-3,2% при комнатной температуре в течение 3-48 ч.

(19) **SU** (11) **1291020** **A3**

Изобретение относится к медицине и касается способа приготовления трансплантатов органов.

Целью изобретения является повышение степени сохранения биофизических свойств исходных органов.

Установлено, что путем внутри- и/или межмолекулярной сшивки макромолекул межклеточной матрицы органов или частей органов можно в значительной мере сохранить первоначально имеющиеся биофизические свойства (в случае протезов сосудов аксиальную и радиальную эластичность, а также гладкое состояние внутренней поверхности сосудов). Эта сшивка отличается от известных способов тем, что она осуществляется не за счет образования шиффовых оснований, а за счет химически более стабильных амидокислотных связей между аминокруппами, соответственно за счет сложноэфирных связей спиртовых гидроксильных групп пептидных цепей межклеточной матрицы и карбоксильных групп ди-, три- или поликарбоновой кислоты, которая применяется как средство сшивки.

Предлагаемый способ заключается в том, что органы или части органов рыб, птиц или млекопитающих, предпочтительно высших млекопитающих, обрабатывают для сшивки макромолекул межклеточной матрицы за счет образования амидных связей и сложноэфирных связей между аминокруппами, соответственно между спиртовыми гидроксильными группами пептидных цепей и карбоксильными группами ди-, три- или поликарбоновых кислот алифатического, циклоалифатического, ароматического или гетероциклического ряда.

Матрицу можно обрабатывать на дополнительной стадии способа диальдегидом. Обработка диальдегидом служит в основном для связывания не окисленных при сшивке аминокрупп. Благодаря этому повышается избыток отрицательного заряда, который, согласно изобретению, снижает опасность появления тромбоза, например, при трансплантации сосудов.

В качестве исходного материала применяются, в частности, артерии, вены, сердечные клапаны, а также перикард и т.д., полученные у птиц и высших млекопитающих. Трансплантаты

могут быть получены как у людей (аутологичные трансплантаты), так и у телят, крупного рогатого скота, лошадей, овец, свиней, гусей, индеек, фазанов и других животных (инадекватные трансплантаты). При этом предпочтительны органы и части органов животных из-за их большей доступности, в особенности молодых животных, органы которых обладают превосходной эластичностью.

Органы и части органов тотчас после изъятия освобождают от окружающих тканей, коллатерали перевязывают лигатурой. Затем их подвергают обработке или до обработки хранят в воде, физиологическом растворе поваренной соли или в другом физиологическом водном растворе, например твине 80 (полиоксиэтиленовые производные сорбитанолеата), или в неводной жидкости, например диметилсульфоксиде, при 0-15°C с добавлением небольшого количества азида натрия.

Обязательной стадией способа является сшивка пептидных цепей компонентов межклеточной матрицы. Она основана на связывании двух, трех или более аминокрупп (преобладающей частью  $\epsilon$ -аминогрупп лизиновых радикалов) соответственно спиртовых гидроксильных групп пептидных цепей алифатическими, циклоалифатическими, ароматическими или гетероциклическими ди-, три- или поликарбоновыми кислотами благодаря амидокислотным или сложноэфирным связям.

Из указанных карбоновых кислот прежде всего пригодны такие, которые не содержат ни оксогрупп (альдегидных и кетонных групп), ни аминокрупп. В особенности принимают во внимание такие ди-, три- или поликарбоновые кислоты, которые не содержат никаких функциональных групп кроме карбоксильных и гидроксильных групп.

В качестве алифатических дикарбоновых и трикарбоновых кислот предпочтительны соединения с количеством атомов углерода вплоть до 12, т.е. щавелевая, малоновая, янтарная, яблочная, глутаровая, адипиновая, пимелиновая, пробковая, себациновая и додекандикарбоновая, винная и слизевая кислоты, в качестве трикарбоновых кислот - трикарбаллиловая и лимонная кислоты.

Из циклоалифатических ди-, три- или поликарбоновых кислот пригодны циклопентадикарбоновые и циклогександикарбоновые кислоты, например циклогексан-1,4-дикарбоновая кислота.

В качестве ароматических дикарбоновых кислот в особенности нужно отметить фталевую, изофталевую и терефталевую кислоты, в качестве ароматических трикарбоновых кислот - тримезиновую и тримеллитовую кислоты.

Из гетероциклических ди-, три- и поликарбоновых кислот принимают во внимание фуран-2,5-дикарбоновую, тетрагидрофуран-2,5-дикарбоновую кислоты, окисленные крахмалы и карбоксиметилцеллюлозу.

Расстояние между двумя доступными для сшивки  $\varepsilon$ -аминогруппами и целесообразная для осуществления способа растворимость в растворителях в случае упомянутых предпочтительных групп требует более узкого нижнего и верхнего предела. Особенно предпочтительны, следовательно, с одной стороны, алифатические дикарбоновые кислоты с 3-12 атомами углерода, т.е. от малоновой до декандикарбоновой кислоты. С другой стороны, также оправдывают себя более высокомолекулярные поликарбоновые кислоты, например окисленные крахмалы.

Сшивку может достигаться на основании всех применяющихся в химии способов для образования амидной связи между амино- и карбоксильной группой. В частности, со свободными аминогруппами межклеточной матрицы могут вступать во взаимодействие хлорангидриды, азиды или ангидриды указанных карбоновых кислот. Точно так же свободные ди-, три-, поликарбоновые кислоты могут связываться со свободными аминогруппами межклеточной матрицы с помощью пригодного реагента сочетания (карбодимиды, например дициклогексилкарбодимид).

Реакция, как правило, осуществляется в безводном органическом растворителе, таком как тетрагидрофуран, диоксан, пиридин, диметилформамид, диметилацетамид, диметилсульфоксид и гексаметилфосфортриамид, или в смеси двух или более растворителей,

Если используется водорастворимый реагент сочетания, например N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодимид-гидрохлорид, то в качестве растворителя пригодна также вода.

Такого рода стабилизированные органы и части органов могут подвергаться дублированию или сшивке (факкультативной) на второй стадии способа с помощью диальдегида, в результате чего оказывается воздействие на возможно еще свободные аминокрупы коллаген-пептидной цепи с образованием шиффовых оснований. Эта обработка предпочтительна также потому, что получающиеся с помощью глутарового диальдегида протезы уже практически стерильны.

В качестве диальдегида пригоден любой диальдегид, предпочтительны формальдегиды, диальдегидкрахмалы и прежде всего глутаровый диальдегид. Реакция с диальдегидом осуществляется предпочтительно в водном растворе (например, по способу согласно патенту Швейцарии № 595105 или патенту США № 3093439).

Полученные трансплантаты затем тщательно промывают водной, стерилизуют и хранят вплоть до применения в запаянных пластмассовых мешках. Стерилизацию продуктов осуществляют исключительно химическим путем с помощью пропен-1,2-оксида (см. далее под названием К-1-раствор), пропиолактона (лактон  $\beta$ -окси-пропионовой кислоты) или этиленоксида.

Имплантацию протезов осуществляли гибридным собакам весом по 20-25 кг: а) на обеих Arterias femorales каждой собаки дистально паховой связки по методу P.Walter и сотр. (Helv. chir. Acta 46 (1979), 81 и последующие); б) на обеих каротидах; в) на Aorta abdominalis каудально отхождению Arteria renales (P.Walter and H.Schmitz, Der heterologe Gefassersatz, с.30, Editio Condor. Aulendorf, 1976); г) на инфрааренальной Vena cava interior по методу S.Horseh и сотр. (Longenbecks Arch. Chir 344 (1978), 225 и последующие). Для сравнения осуществлялись параллельные опыты с протезами из тефлона (Р) и дакрона (Р), а также с пупочными венами, которые дублили только с помощью глутарового диальдегида. Измеряли про-

цент закрытия имплантата спустя шесть недель.

Место имплантации на тазобедренном суставе собаки подвергается высокой механической нагрузке.

Показательны сравнительные результаты. Имплантаты из тефлона (Р) и Umbilicolvene имеют закрытие 100%, имплантаты из дакрона (Р) имеют закрытие 77%, в то время как предлагаемые имплантаты согласно примеру 9 имеют закрытие 50%. Полученные при сравнительных опытах значения статистически достоверны.

В опытах, продолжавшихся в течение 6 мес при физиологически благоприятных условиях, а именно на *Artiria Sacitis* процент закрытия имплантатов согласно примеру 9 упал до 20% (полученное значение статистически достоверно). Во время опытов, продолжавшихся 6 мес в инфраренальной области, тромбозов не наблюдали.

**Пример 1.** Каротиды телянка освобождают от окружающей связующей ткани и перевязывают коллатерали. После механической препарации их промывают деионизированной водой, высушивают фильтровальной бумагой, насаживают на стеклянную палочку диаметром, например, 3 мм и для обезвоживания помещают в заполненный тетрагидрофураном мерный цилиндр. Каждые 1-2 ч содержимое мерного цилиндра встряхивают. Спустя 5 ч жидкость заменяют новым тетрагидрофураном. Спустя следующие 2-3 ч стеклянную палочку удаляют.

На следующий день артерии вносят в 2%-ный (вес/объем) раствор хлорангидрида адипиновой кислоты в тетрагидрофуране и оставляют в этом растворе 24 ч. Раствор встряхивают или заставляют циркулировать с помощью насоса. После этого артерии помещают в чистый тетрагидрофуран, затем в смесь тетрагидрофурана с водой (1:1 по объему) и наконец в забуференный фосфатом раствор поваренной соли и оставляют в нем на 30-60 мин. В результате артерии готовы к стерилизации или к гидролизу с помощью фицина, папаина или тому подобного.

а). Стерилизация с помощью пропен-1,2-оксида.

Артерии на 16-24 ч (возможно также и на более длительное время) по-

мещают в 1%-ный (вес/объем) раствор пропен-1,2-оксида в смеси этанола с водой (1:1 по объему). Затем их в стерильных условиях помещают в PBS-раствор и вместе с ним запаивают в стерильный пластмассовый мешок.

PBS-раствор готовят следующим образом.

В 40 л воды растворяют 320 г хлористого натрия, 8 г хлористого калия, 51,2 г дигидрата вторичного фосфата натрия, 8,0 г первичного фосфата калия, 5,2 г дигидрата хлористого кальция и 4,0 г гексагидрата хлористого магния.

Для хранения артерий в смеси этанола с водой достаточно их поместить в указанный водно-спиртовой раствор пропиленоксида и вместе с жидкостью запаковать в пластмассовый мешок.

б). Стерилизация с помощью пропиолактона (лактон  $\beta$ -окси-пропионовой кислоты).

Примерно в 900 мл деионизированной воды растворяют следующие соли: 0,236 г хлористого натрия, 0,248 г хлористого калия, 0,363 г дигидрата хлористого кальция, 0,190 г гексагидрата хлористого магния и 0,172 г первичного фосфата калия. С помощью примерно 0,1 н водного раствора едкого натра доводят pH раствора до 7,4. Затем в растворе растворяют 11,782 г бикарбоната натрия и объем доводят до 1000 мл путем добавления воды.

Непосредственно перед стерилизацией артерий к 1 л этого раствора добавляют 8,6 мл (10,83 г) пропиолактона, в смесь помещают артерии и запаивают их вместе с жидкостью в пластмассовый мешок.

в). Стерилизация с помощью этиленоксида.

Помещенные в раствор PBS или физиологический раствор поваренной соли артерии вместе с жидкостью запаивают в пластмассовом мешке. Стерилизуют тем, что закрытый пластмассовый мешок в аппарате для стерилизации обрабатывают газообразной окисью этилена 4 ч при 25-30°C.

**Пример 2.** Четыре механически отпрепарированные артерии телянка по отдельности насаживают на стеклянные палочки толщиной 4 мм и помещают в заполненный пиридином мерный цилиндр емкостью 500 мл. Спустя час они становятся настолько жесткими,

что стеклянные палочки можно вынуть. Жидкость сливают и заменяют новым пиридином. Спустя час пиридин еще раз обновляют. Спустя еще час артерии вносят в смесь, которая готовится следующим образом: в смесь из 98 мл пиридина и 2 мл диметилформамида при перемешивании вносят шприцем 2 мл (2,5 г) хлорангидрида адипиновой кислоты, при этом образуется мелкий осадок адипилпиридинийхлорида. Когда он отстаивается, его накрывают ситом из фарфора. Затем артерии помещают на сито так, чтобы они были полностью покрыты жидкостью, однако не соприкасались с осадком. Спустя 18 ч артерии вынимают из жидкости и погружают на 30 мин в К-1-раствор (см. пример 6). Затем их промывают четырехкратно 0,05 н стерильным водным раствором уксусной кислоты и дважды стерильным фосфатным буфером (1/15 молярным) с pH 8. Их помещают в стерильный PBS-раствор и вместе с этой жидкостью запаивают в пластмассовый мешок.

**Пример 3.** 10 артерий телят механически препарируют и на 3 ч помещают вертикально в заполненный тетрагидрофураном мерный цилиндр емкостью 500 мл. Затем их по отдельности помещают в стеклянные трубки шириной примерно 2 см и встряхивают их (каждая с 40 мл 0,06%-ного (вес/объем) раствора адипиновой кислоты в смеси тетрагидрофурана с водой (4:1 по объему). Спустя 1 ч добавляют по 40 мл 2%-ного (вес/объем) раствора дициклогексилкарбодиимида в тетрагидрофуране и путем встряхивания и колебания смешивают с уже имеющимся раствором. Спустя 3 ч артерии помещают в К-1-раствор (см. пример 6). На следующий день их промывают по 40 мл стерильной смеси этанола с водой (1:1 по объему), стерильного фосфатного буфера (1/15 молярного) с pH 8 и помещают их в стерильный PBS-раствор. Наконец их вместе с PBS-раствором запаивают в пластмассовый мешок.

**Пример 4.** 10 артерий телят после механического препарирования помещают в заполненный диметилформамидом мерный цилиндр емкостью 500 мл. Спустя 3 ч их по отдельности помещают в стеклянные трубки с внутренним диаметром примерно 2 см и

заливают их по 40 мл 0,06%-ного (вес/объем) раствора адипиновой кислоты в смеси диметилформамида с водой (4:1). Спустя час добавляют по 40 мл 2%-ного (по объему) раствора дициклогексилкарбодиимида в диметилформамиде и смешивают путем встряхивания и колебания с уже введенным раствором адипиновой кислоты. Спустя 3 ч жидкость из каждой трубки выливают и заменяют по 80 мл К-1-раствора. На следующий день артерии промывают по 40 мл стерильной смеси этанола с водой (1:1 по объему) и стерильного фосфатного буфера (1/15-молярного) с pH 9. Наконец их вносят в стерильный PBS-раствор и вместе с ним запаивают в пластмассовый мешок.

**Пример 5.** 4 артерии телят освобождают от связующей ткани и перевязывают коллатерали. Затем артерии вносят на 2 ч в 60 мл 0,02%-ного (вес/объем) водного раствора адипиновой кислоты. Затем их помещают в 60 мл водного раствора, который содержит адипиновую кислоту в концентрации 0,2 г на литр и N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид-гидрохлорид в концентрации 25 г на литр. Спустя 20 ч артерии вносят в К-1-раствор, спустя 24 ч - в стерильный PBS-раствор. Вместе с ним их запаивают в стерильный пластмассовый мешок.

**Пример 6.** Механические препарированные артерии помещают на 2 ч в 60 мл раствора 0,1%-ного (вес/объем) пробковой кислоты в воде, затем в 60 мл водного раствора, который на литр содержит 0,24 г пробковой кислоты и 25 г N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид-гидрохлорида. Спустя 20 ч артерии вносят в К-1-раствор, спустя следующие 24 ч - в стерильный PBS-раствор и вместе с ним запаивают в стерильный пластмассовый мешок.

К-1-раствор готовят следующим образом.

Смешивают 720 мл воды и 720 мл этанола. К этому раствору добавляют 16,9 мл (14,1 г) пропен-1,2-оксида. Этот раствор всегда готовится свежим и используется непосредственно после приготовления для стерилизации.

**Пример 7.** Каротиды телят, как описано в примере 1, механически

препарируют и промывают водой, затем помещают в 200 мл тетрагидрофурана. Спустя 7 дней артерии помещают в 3,2%-ный (вес/объем) раствор дихлорангидрида додекарбоновой кислоты в тетрагидрофуране и оставляют их лежать в нем 48 ч. Затем их помещают на 16 ч в тетрагидрофуран, на 8 ч в буферный раствор тетрагидрофурана (1:1 по объему) с pH 4,5 и на 1 день в водный буферный раствор с pH 4,5. Теперь они готовы к стерилизации или к гидролизу.

Пример 8. 10 артерий телят после механической обработки помещают в плоскую чашку и заливают 500 мл 1%-ного раствора лимонной кислоты в воде (вес/объем). Через 2 ч артерии помещают в мерный цилиндр на 500 мл в вертикальном положении и заливают их раствором 0,2 г лимонной кислоты и 10 г N-этилен-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид-гидрохлорида в 500 мл воды. Через день артерии промывают в течение 20 мин в проточной воде и затем помещают в стерильный физиологический раствор поваренной соли. Вместе с физиологическим раствором артерии помещают в пакетики из полимерного материала, пакетики запаивают и стерилизуют окисью этилена, как это описано в примере 1.

Пример 9. 10 артерий телят после механической обработки натягивают на стеклянные стержни и устанавливают в мерный цилиндр на 500 мл, заполненный насыщенным водным раствором DL-камфарной кислоты (DL-1,2,2-триметилциклопентан-1,3-цис-дикарбоновая кислота). Через 4 ч артерии, не снимая их со стержней, помещают в мерный цилиндр на 500 мл и заливают раствором 0,25 г DL-камфарной кислоты и 10 г N-этил-N'-(3-диметиламино-пропил)-карбодиимид-гидрохлорида в 500 мл воды. Через 4 ч стержни осторожно вытаскивают из артерий, а через день артерии в течение получаса промывают проточной водой, помещают в стерильный физиологический раствор поваренной соли и вместе с ним запаивают в пакеты из полимерного материала, после чего сразу же стерилизуют окисью этилена, как это описано в примере 1.

Пример 10. 100 коллатералей сонных артерий телят и быков длиной

2-4 см каждую укладывают в химический стакан объемом 200 мл и заливают 200 мл тетрагидрофурана. В течение суток жидкость дважды заменяют свежими порциями. Примерно через каждые 2 ч содержимое стакана тщательно перемешивают. На следующий день жидкость заменяют на раствор 20 мл/л хлорангидрида адипиновой кислоты и 38 мл/л триэтиламина в тетрагидрофуране. Время от времени стакан переворачивают для перемешивания его содержимого. На следующий день жидкость из стакана сливают и заливают коллатерали 200 мл тетрагидрофурана. Через 2 ч его заменяют на смесь тетрагидрофурана и цитратно-фосфатного буферного раствора с pH 4,5 в объемном соотношении 1:1, а еще через 2 ч на чистый цитратно-фосфатный буферный раствор с pH 4,5. Через день коллатерали промывают в течение четверти часа проточной водой, помещают в стерильный физиологический раствор поваренной соли в пакет из полимерного материала, пакет запаивают и стерилизуют окисью этилена, как это описано в примере 1.

Пример 11. Вырезают из перикарда телят 10 круглых кусков диаметром 3 см и выдерживают их в течение получаса в воде. Каждый из кусков укладывают на стержнеобразный шаблон диаметром около 8 мм, выступающий примерно на 2 см из пластины. После этого куски перикарда прижимают со всех сторон в направлении от центра с помощью гладкой моделирующей деревянной палочки к шаблону таким образом, что в результате они принимают форму мешочков диаметром около 8 и высотой примерно 12 см. Если шаблоны с надетыми на них кусками перикарда поместить на 20 мин под 100-ваттную нагревательную лампу, то они высыхают и могут быть сняты с шаблонов, сохраняя при этом свою форму. Затем их помещают в химический стакан с 150 мл тетрагидрофурана, следя при этом за тем, чтобы они полностью были покрыты жидкостью. Через 3 и 6 ч тетрагидрофуран в стакане заменяют свежими порциями. На следующий день тетрагидрофуран заменяют 3,5%-ным раствором (вес/объем) хлорангидрида додекановой кислоты в тетрагидрофуране и оставляют в нем мешочки из перикарда на 24 ч.

Затем жидкость в стакане заменяют на чистый тетрагидрофуран, через 4 ч - на смесь тетрагидрофурана и цитратно-фосфатного буферного раствора с рН 4,5 в объемном соотношении 1:1, а еще через 4 ч на чистый цитратно-фосфатный буферный раствор с рН 4,5. На следующий день мешочки из перикарда помещают в физиологический раствор поваренной соли, затем вместе с этим раствором в пакеты из полимерного материала, пакеты запаивают и стерилизуют с помощью окиси этилена. Обработанные таким образом кусочки перикарда можно использовать

для замены поврежденных барабанных перепонок.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

- Способ приготовления трансплантатов органов, включающий изъятие органов у животных и обработку их растворами химического реагента, отличающийся тем, что, с целью повышения степени сохранения биологических свойств исходных органов, в качестве химического реагента используют ди-, три- или поликарбоновые кислоты или их хлорангидриды концентрации 0,02-3,2%, а обработку ведут при комнатной температуре в течении 3-48 ч.
- 5
- 10
- 15

Составитель И.Тареева

Редактор М.Циткина Техред М.Ходанич Корректор Т.Колб.

Заказ 7920/60

Тираж 596

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д.4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г.Ужгород, ул.Проектная, 4