



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 30 779 T2 2004.09.23**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 815 144 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 30 779.0**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/AU96/00138**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 904 672.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/028476**

(86) PCT-Anmeldetag: **13.03.1996**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **19.09.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **07.01.1998**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **19.11.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **23.09.2004**

(51) Int Cl.7: **C08B 37/00**

**A61K 7/48, A61K 31/715, A61K 31/716,
A61L 27/00**

(30) Unionspriorität:

PN166195 13.03.1995 AU

(73) Patentinhaber:

**Novogen Research Pty. Ltd., North Ryde,
Neusüdwaales, AU**

(74) Vertreter:

**Patent- und Rechtsanwälte Kraus & Weisert,
80539 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

KELLY, Edmund, Graham, Northbridge, AU

(54) Bezeichnung: **THERAPEUTISCHE VERWENDUNGEN VON GLUCAN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft therapeutische Verwendungen von Glucan.

Hintergrund und der Erfindung

[0002] Glucan ist ein Sammelbegriff, der ein Oligo- oder Polysaccharid bezeichnet, das vorwiegend oder gänzlich aus dem Monosaccharid D-Glukose aufgebaut ist. Glucane sind in der Natur in vielen tausend Formen, die als ein Ergebnis der hochgradig unterschiedlichen Art und Weise, auf die die einzelnen Glukoseeinheiten verbunden sein können (glykosidische Verknüpfungen), und auch der sterischen Gesamtstruktur des Stammoleküls möglich sind, weit verbreitet.

[0003] Das in dieser Erfindung genannte Glucan ist typischerweise eine lineare Kette mittlerer Glukopyranoseeinheiten mit einer variablen Anzahl an Seitenzweigen relativ kurzer Länge. Die glykosidischen Verknüpfungen sind vorwiegend (nicht weniger als 90%) vom β -1,3-Typ mit einer geringeren Anzahl (nicht mehr als 10%) an Verknüpfungen vom β -1,6-Typ; die β -1,3-Verknüpfungen bilden den Hauptanteil der Kette des Moleküls, während die β -1,6-Verknüpfungen vorwiegend in den Seitenzweigen auftreten. Der chemische Name dieser Form von Glucan ist Poly-(1,3)- β -D-Glukopyranosyl-(1,6)- β -D-Glukopyranose. Glucan ist ein gut beschriebenes Molekül.

[0004] Diese Form von Glucan wird hauptsächlich in der Zellwand der meisten Pilze (einschließlich Hefen und Schimmelpilzen) und in einigen Bakterien gefunden. Glucan ist, in Kombination mit anderen Polysacchariden wie Mannan und Chitin, für die Form und die mechanische Festigkeit der Zellwand verantwortlich. Das Glucan macht typischerweise annähernd 40 Gew.-% bis 50 Gew.-% der Zellwände in diesen Zellen aus.

[0005] Die chemische Struktur des Glucans der Pilzzellwände ist detailliert untersucht worden, wobei die folgenden Veröffentlichungen („sentinel articles“) erschienen sind: Bacon et al (1969); Manners et al (1973).

[0006] Glucane der Pilzzellwände sind lange Zeit in der Industrie, insbesondere in der Nahrungsmittelindustrie, gewöhnlicherweise in einer halb gereinigten Form, verwendet worden: Ihre Verwendungen haben die Verwendung als Stabilisatoren, Bindemittel, Verdickungsmittel und oberflächenaktive Materialien eingeschlossen.

[0007] Es ist auch seit mehr als 40 Jahren bekannt gewesen, dass Glucane der Pilzzellwände biologisch aktiv sind, wobei sie eine Vielzahl an Wirkungen auf die reticuloendothelialen Systeme und Immunsysteme von Tieren ausüben. Die herausragende biologische Wirkung ist in dieser Hinsicht ihre Fähigkeit, die Aktivität der körpereigenen primären Abwehrzellen – der Makrophage und der neutrophile Leukozyt – nicht spezifisch zu stimulieren. Man glaubt, dass dies an den Rezeptoren für β -1,3-Glucan liegt, die auf der Oberfläche dieser Zellen auftreten (Czop und Austen, 1985). Die Wechselwirkung zwischen Glucan und dessen Rezeptor erzeugt derartige stimulierende Wirkungen, wie verstärkte Phagozytose (Riggi und Di Luzio, 1961), erhöhte Zellgröße (Patchen und Lotzova, 1980), verstärkte Zellproliferation (Deimann und Fahimi, 1979), verstärktes Anhaften und verstärkte chemotaktische Aktivität (Niskanen et al., 1978) und Herstellung einer großen Auswahl an Cytokinen und Leukotrienen (Sherwood et al., 1986, 1987).

[0008] Es ist berichtet worden, dass die zuvor erwähnten biologischen Reaktionen des Glucans der Pilzzellwände zu einer Vielzahl klinischer Wirkungen führen, die verstärkte Widerstandsfähigkeit gegen Infektionen mit Pilzen (Williams et al., 1978), Bakterien (William et al., 1983), Viren (Williams und Di Luzio, 1985), Protozoen (Cook et al., 1979) in Folge systemischer Applikation; verstärkte Antitumoraktivität in Folge systemischer Applikation (William et al., 1985) oder intralesionaler Applikation (Mansell et al., 1975); und verstärkte Immunempfindlichkeit („Immune Responsiveness“) in Folge systemischer Applikation (Maeda und Chihara, 1973) beinhalten. Es ist leicht zu erkennen, dass diese klinischen Wirkungen hochgradig heilsam und bedeutsam sind sowie eine Möglichkeit darstellen, Pharmazeutika auf Basis von Glucanen der Pilzzellwände, wie zum Beispiel Pharmazeutika mit möglicherweise weitreichender Anwendung sowohl in der Veterinärmedizin als auch in der Humanmedizin, zu entwickeln.

[0009] Von den verschiedenen getesteten Glucanen der Pilzzellwände hat sich das der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* hinsichtlich der Wirksamkeit und Sicherheit als ein Immunstimulans bei Tieren und Menschen als annehmbar erwiesen. Nachfolgend wird dieses als *Saccharomyces cerevisiae*-(„Sc“)-Glucan bezeichnet. Vorwiegend oder vollständig β -1,3-Glucane anderer Pilze, Bakterien oder Pflanzen aus der Familie Gaminaceae haben sich als immunstimulierend bei Tieren erwiesen. Aber verglichen zu Sc-Glucan sind sie entweder nicht so wirksam oder, wenn sie vergleichbare oder größere Wirksamkeit aufweisen, dann ist diese gewöhnlicherweise mit einem höheren Grad an unerwünschten Nebenwirkungen verbunden.

[0010] Sc-Glucan hat sich als ein Immunstimulans bei Tieren in unterschiedlichen Formen biologisch aktiv erwiesen. Diese beinhalten (a) eine hochmolekulargewichtige (typischerweise größer als 3×10^6 d), wasserunlösliche, in Mikropartikeln vorliegende Form oder (b) Formen mit kleinerem Molekulargewicht (typischerweise niedriger als 500.000 d), die in Wasser dispergierbar oder löslich sind. Es ist beschrieben, dass Wasserlöslich-

keit entweder durch Spaltung der in großen Mikropartikeln vorliegenden Glucanform in kleinere Moleküle unter Verwendung von Verfahren wie enzymatische Digestion oder Einstellen drastischer pH-Werte oder durch Komplexieren an Salze wie Amine, Sulfate und Phosphate erzielt wird. Der Hauptvorteil der kleineren, wasserlöslichen Form gegenüber der größeren, als Mikropartikel vorliegenden Form ist, dass sie sicherer ist, wenn sie durch parenterale Wege der Verabreichung, wie z. B. intravenös, gegeben wird. Es ist ebenso wahrscheinlich, dass die kleiner dimensionierten Moleküle auf einer molekularen Basis besser bioverfügbar sind.

[0011] Bis heute ist es weder technisch möglich noch wirtschaftlich durchführbar gewesen, Glucan auf kommerzieller Basis zu synthetisieren. Somit macht es die Herstellung kommerzieller Mengen von β -1,3-Glucan für therapeutische Verwendungen erforderlich, dass es aus Pilzen, Bakterien, Algen oder Samenkörnern von Getreidepflanzen extrahiert wird.

[0012] Wie nachfolgend beschreiben, befasst sich diese Erfindung mit therapeutischen Verwendungen von Glucan.

[0013] Das Dokument WO 87/01037 beschreibt Glucane, die aus *Saccharomyces cerevisiae* erhalten worden sind, für die Verwendung in einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Prävention oder Behandlung von Infektionen bei Tieren und Menschen, insbesondere zur Verwendung in der Behandlung von malignen, neoplastischen Erkrankungen und zur Stimulierung von Makrophagen-Zellen in vivo zur Erzeugung und Sekretion eines löslichen cytotoxischen/cytostatischen Faktors.

[0014] Das Dokument US-5,397,773 beschreibt eine Zusammensetzung und ein Verfahren zum Schützen der Haut vor der Schädigung durch UV-Strahlung oder Sonnenstrahlung, die topische Applikation einer Zusammensetzung, die einen Extrakt aus Hefezellwänden, der Glucane beinhaltet hat, enthält, auf die Haut umfasst.

Zusammenfassung der Erfindung

[0015] Diese Erfindung ist auf die Verwendung von Glucan zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Hautulzeration oder Knochenbruch oder zur Verstärkung der Fixierung implantierter, orthopädischer Hilfsmittel gerichtet.

[0016] Unter einem weiteren Gesichtspunkt beschäftigt sich diese Erfindung mit einem Verfahren zur Behandlung von Hautulzeration oder Knochenbruch oder zur Verstärkung der Fixierung implantierter, orthopädischer Hilfsmittel, das das Verabreichen von Glucan in Verbindung mit einem oder mehreren pharmazeutisch oder veterinär annehmbaren Trägern oder Exzipientien an ein Subjekt umfasst.

[0017] Unter einem anderen Gesichtspunkt beschäftigt sich diese Erfindung mit einem Mittel zur Behandlung von Hautulzeration oder Knochenbruch oder zur Verstärkung der Fixierung implantierter, orthopädischer Hilfsmittel, das Glucan gegebenenfalls in Verbindung mit einem oder mehreren pharmazeutisch annehmbaren Trägern oder Exzipientien umfasst.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0018] Unter einem weiteren Gesichtspunkt ist diese Erfindung auf die Verwendung von Glucan zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Hautulzeration oder Knochenbruch oder der Implantation/Fixierung von orthopädischen Hilfsmitteln gerichtet.

[0019] Unter einem weiteren Gesichtspunkt beschäftigt sich diese Erfindung mit dem Verfahren zur Behandlung von Hautulzeration oder Knochenbruch oder der Implantation/Fixierung orthopädischer Hilfsmittel, das das Verabreichen von Glucan in Verbindung mit einem oder mehreren pharmazeutisch oder veterinär annehmbaren Trägern oder Exzipientien umfasst.

[0020] Unter einem immer noch weiteren Gesichtspunkt dieser Erfindung wird ein Mittel zur Behandlung dermalen Hautulzeration, zur Verstärkung der Wiederherstellung von Knochen- und Bindegewebe, oder zur Implantation/Fixierung orthopädischer Hilfsmittel, wobei das Mittel Glucan in Verbindung mit einem oder mehreren pharmazeutisch oder veterinär annehmbaren Trägern oder Exzipientien umfasst, bereitgestellt.

[0021] Bei diesen therapeutischen Verwendungen von Glucan kommt eine wirksame Menge Glucan zum Einsatz. Was eine wirksame Menge ausmacht, wird von den besonderen, zu behandelnden Beschwerden sowie von An und Form der Verabreichung abhängen. Im Allgemeinen wird eine Zusammensetzung oder ein Medikament Glucan in einer Menge von 0,05% (g/g) bis 30% (g/g), wie bspw. 0,1 bis 5% (g/g), spezieller von 0,3% bis 1% (g/g) und sogar noch spezieller von 0,25 bis 0,5% (g/g) enthalten.

[0022] Eine besonders vorteilhafte therapeutische Applikation für Glucan (wie als Mikropartikel vorliegende, lösliche oder gelartige Formen, die auf eine der zuvor erwähnten Methoden hergestellt worden sind oder durch Methoden aus dem Stand der Technik hergestellt worden sind) gemäß der vorliegenden Erfindung liegt in der Behandlung dermalen Ulzeration. Es ist bekannt, dass β -1,3-Glucan die Heilung bei durchgehenden, durch Operation erzeugten Hautwunden bei Tieren und Menschen ohne dysfunktionale Heilung fördert. Topisch oder parenteral appliziertes Glucan ist nämlich in der Lage, die Heilungsreaktion bei Hautwunden mit normalen Hei-

lungsmechanismen zu beschleunigen. Im Allgemeinen nimmt man an, dass Glucan dies durch Aktivierung von Wundmakrophagen erzielt. Makrophagen sind kritische Zellen im Heilungsprozess, die eine Reihe von Cytokinen und Wachstumsfaktoren erzeugen, die verschiedene Komponenten der Heilungskaskade initiieren – nämlich Fibroplasie, Collagenerzeugung, Angiogenese, Epithelialisierung und Collagenvernetzung. In diesem Prozess spielt der Makrophage eine Schlüsselrolle beim Regulieren, wobei er das Verfahren sowohl initiiert als auch hilft, sicherzustellen, dass das Verfahren in einer koordinierten und integrierten Art und Weise voranschreitet. Es wird angenommen, dass es eine primäre Wirkung des Glucans ist, eine temporale Beschleunigung der Heilungskaskade zu erzeugen.

[0023] Dermale Geschwüre sind typischerweise chronische Wunden, die einen ziemlich unterschiedlichen Satz an physiologischen Eigenschaften, innerhalb der Wunde zu wirken, im Vergleich zu akuten Operationswunden, aufweisen. Wohingegen die Physiologie des Heilungsprozesses für akute Operationswunden gut beschrieben ist, ist sie für chronische Geschwüre schlecht bestimmt. Geschwüre zeigen typischerweise entweder wegen konstanter Reizung oder konstantem Druck (wie Dekubitus oder Wundliegen) oder wegen eingeschränkter Blutversorgung (wie in Individuen mit arterieller Ischämie oder venöser Thrombose) oder Infektion (wie „Tropen“-Geschwüre) oder Nervenschaden („neurotrophe“ Ulzerationen) oder Diabetes schlechte bis vernachlässigbare Heilung. Geschwüre besitzen verschiedene pathologische Befunde, und die zugrundeliegenden Ursachen können, wo sie bekannt sind, ziemlich verschieden sein. Verschiedene Arten von Geschwüren, die gemäß dieser Erfindung behandelt werden können, enthalten diejenigen, die mit physischer Verletzung (Strahlung, thermische Verbrennungen, Dekubitus, Insektenbisse), beeinträchtigter Durchblutung (arteriell, venös), Infektion (Knochen, pyrogenes, synergistisches Gangrän, Syphilis, Tuberkulose, Tropenerkrankungen, Pilzkrankungen), Neoplasie (primärer Hauttumor, Metastasen, Leukämie) und neurotrophen Läsionen (Rückenmarkläsionen, periphere Neuropathien) verbunden sind.

[0024] Geschwüre, die mit dysfunktioneller Heilung verbunden sind, variieren stark hinsichtlich der Schwere: von Hautwunden, die sich in die Dermis erstrecken und eine Oberfläche von 1–2 cm² besitzen, bis zu Wunden, die sich durch die Dermis, das subkutane Gewebe und Muskeln erstrecken und Vertiefungen und Hohlräume mit Volumina von annähernd 500 cm³ bilden. Insbesondere die größeren Geschwüre können entkräftend und einschränkend sein und eine intensive und teure Therapie zur Behandlung erfordern. Kontrolle von Wundsepsis, regelmäßige Wundreinigung, regelmäßige Verbände, hypostatische Ableitung und Korrekturoperation sind nur einige der gegenwärtigen Standardtherapien. Jedoch sind gegenwärtig zugängliche, am besten gebräuchliche Wundbehandlungstherapien nicht gleichmäßig erfolgreich, benötigen beträchtliche Zeitspannen, um günstige Ergebnisse zu erzielen, sind mit schlechten Anteilen der Einhaltung durch den Patienten verbunden, sind im Allgemeinen teurer und sind mit einer hohen Häufigkeit des Wiederauftretens von Geschwüren verbunden. Es ist von Margolis (J. Dermatological Surgery (1995) 21(2) 145–148) angemerkt worden, dass „ein Mangel an Daten besteht, der die Wirksamkeit eines topischen Mittels zur Behandlung von Druckgeschwüren adäquat behandelt“.

[0025] Es kann daher erkannt werden, dass in Anbetracht der hohen Häufigkeit von Geschwüren in der Gesellschaft und die Behandlungskosten für die Gesellschaft ein dringender Bedarf besteht, verbesserte Therapien zu entwickeln. Idealerweise sollte eine derartige Therapie eine hohe Erfolgsrate aufweisen, komfortabel zu verwenden sein und schnell eine klinische Reaktion erzeugen, um die Einhaltung durch den Patienten zu ermöglichen sowie vorzugsweise preiswert sein.

[0026] Eine besondere Schwierigkeit bei der Entwicklung einer einheitlich erfolgreichen Behandlung, die eine Verbesserung gegenüber gegenwärtigen Behandlungsmodalitäten sein kann, ist die Uneinheitlichkeit der verschiedenen Arten von Geschwüren, bei denen sowohl die zugrundeliegenden, ursächlichen Krankheitsverläufe als auch die Pathophysiologie innerhalb der Wunden eine beträchtliche Abweichung zeigen. Diese verwirrende Variabilität ist das allgemein schlechte Verständnis davon, welche der verschiedenen Komponenten der Heilungsreaktion dysfunktionell ist und daher zur primären Pathologie der dysfunktionellen Heilungsreaktion beiträgt. Damit kann ein erfolgreicher Antagonismus der Dysfunktion eines besonderen Teils der Heilungskaskade bei einer Art von Geschwür nicht notwendigerweise bei einer anderen Art von Geschwür erfolgreich sein. Insbesondere gibt es keinen Beweis dafür, dass Immunsuppression lokaler Wunden oder Makrophagendysfunktion pathologische Schlüsselmerkmale sind, oder dass die Verstärkung lokaler Immunmechanismen innerhalb derartiger Geschwüre zu verstärkten Heilungsreaktionen führen würde, wie es bei unkomplizierten, operativen Hautwunden ohne dysfunktionelle Heilungsreaktionen beobachtet wird.

[0027] Daher war es völlig unerwartet zu finden, dass topische Applikation von Glucan bei Dekubitus, venöser Stasis und arteriellen, ischämischen Geschwüren schnelle und wirksame Heilungsreaktionen an diesen Wunden induziert. Dies war unerwartet, (a) weil der primäre, ursächliche Faktor diese Arten von Geschwüren beeinträchtigte Blutversorgung ist und es kein Anzeichen dafür gibt, vorzuschlagen, dass dies eine Reaktion auf den Antagonismus durch ein Immunstimulans wäre, und (b) weil es erwartet werden könnte, dass, sogar wo es möglich sein könnte, die Heilungsreaktion zu fördern, das beeinträchtigte Gefäßsystem an der Wunde die Heilungsreaktion behindert, wie es bei gegenwärtigen Behandlungsmodalitäten beobachtet wird. Die heilende Wirkung von Glucan bei diesen Arten von Geschwüren ist es sogar noch bemerkenswerter, wenn man be-

denkt, dass eine vollständige Heilungsreaktion in der Abwesenheit anderer unterstützender Therapien wie Sepsiskontrolle, hypostatische Ableitung und Korrektur der primären Ursache erzielt werden kann.

[0028] Die Behandlung von Dekubitusgeschwüren und Venostasegeschwüren sind gemäß dieser Erfindung besonders bevorzugt, obwohl die Erfindung nicht auf die Behandlung dieser Geschwürformen beschränkt ist.

[0029] Dekubitusgeschwüre entstehen durch mehrere Mechanismen. Sie sind eine unheilvolle Komplikation der Immobilisierung. Sie können von Scherkräften auf der Haut, einer Schlagverletzung auf der Haut, Drogen und verlängertem Druck, der dem Gewebe die Blutversorgung entzieht, stammen. Reizende oder verunreinigte Injektionen und verlängerter Kontakt mit Feuchtigkeit, Urin und Fäkalien spielt ebenso eine bedeutende Rolle. Verringerte Durchblutung der Haut ist ebenfalls ein erheblicher Risikofaktor. Die Geschwüre variieren hinsichtlich der Tiefe und erstrecken sich oft von der Haut bis an einen Knochendruckpunkt. Die Behandlung ist schwierig und gewöhnlich langwierig. Chirurgische Techniken sind gegenwärtig die bedeutsamsten Mittel, um eine optimale Heilung zu erzielen.

[0030] Annähernd die Hälfte der venösen Geschwüre sind mit unsachgemäßem Perforieren von Venen im Bereich des Knöchels verbunden und stellen ein langfristiges Problem bei vielen immobilen Patienten dar. Ulzeration ist selten ein Symptom primärer Krampfadern, steht aber praktisch immer in Verbindung mit Insuffizienz der poplitealen Venenklappe. Venostasegeschwüre sind äußerst häufig nur proximal oder distal zum Schienbeinknöchel (ossales Sprunggelenk, bony ankle joint) und entwickeln sich häufig an Stellen geringfügiger Verletzung oder von Hautinfektionen. Narbenbildung und sekundäre Infektion beeinträchtigen jeweils die Heilung und machen erneutes Auftreten üblich, wenn Heilung auftritt. Die natürliche Geschichte venöser Ulzeration ist zyklisches Heilen und erneutes Auftreten.

[0031] Im Fall von Dekubitusgeschwüren wird das Glucan vorzugsweise in der Form eines Puders (als Mikropartikel vorliegendes Glucan) oder in einer Creme- oder Salbenbasis (als Mikropartikel vorliegende, lösliche oder gelartige Formen von Glucan) appliziert. Die Applikation ist im Allgemeinen täglich und kann eine Zeitspanne andauern, die dafür ausreichend ist, die Geschwüre zu heilen, wie z. B. 7 bis 28 Tage. Man beobachtet, dass die Reaktion auf die Glucantherapie innerhalb von 2 bis 3 Tagen mit Anzeichen frischer Granulation und Epithelwachstum sichtbar wird. Die erforderliche Zeitdauer, um Geschwüre zu heilen, wird gemäß einer Anzahl an Faktoren wie Geschwürgröße, Grad der Wundsepsis und Ernährungszustand des Wirts schwanken. Typischerweise wird das Wundvolumen innerhalb von 2 bis 3 Wochen um 50% reduziert, wobei vollständiges oder beinahe vollständiges Verschließen der Wunde in 4–6 Wochen nach Beginn der Glucantherapie bewirkt wird. Es ist bemerkenswert, dass die meisten der Dekubitusgeschwüre, in denen Glucan eine Heilungsreaktion bewirkt, gegen die Standardtherapie, einschließlich einer breiten Spanne topischer Präparate und Wundverbänden, für Zeiträume von bis zu 7 Jahren refraktär gewesen sind.

[0032] Auf eine ähnliche Weise fördert die Applikation als Mikropartikel vorliegender, löslicher oder gelartiger Formen von Glucan bei Venostasegeschwüren und materiellen ischämischen Geschwüren die Heilung der Geschwüre. Wie bei Dekubitusgeschwüren führt die Behandlung dieser Geschwüre mit Glucan innerhalb von 2–3 Tagen nach dem Beginn der Glucantherapie zu einer klinischen Reaktion in der Wunde mit derartigen Heilungsanzeichen wie dem Auftreten von frischem Granulationsgewebe und weniger Trümmern, die zu einem saubereren Erscheinungsbild in der Wunde führen. Glucan in der Form eines Puders, einer Creme, einer Lotion, einer Salbe oder eines Gels kann täglich auf die Stelle des Geschwürs topisch appliziert werden, bis Heilung eintritt. Die chronische Natur der zugrundeliegenden vaskulären Erkrankung bedeutet in diesen Fällen, dass die Veranlagung zur Bildung derartiger Geschwüre bei dem Patienten verbleibt. Es kann daher notwendig werden, die Glucantherapie auf langfristiger Basis fortzusetzen, um das erneute Auftreten zu verhindern.

[0033] Es ist daher ersichtlich, dass es eine völlig unerwartete Beobachtung ist, dass Glucan dazu in der Lage ist, die Heilungsprozesse bei Hautgeschwüren zu fördern, wenn die individuellen Komponenten des Heilungsprozesses im Wesentlichen normal sind, aber nicht dazu in der Lage sind, die dysfunktionelle Ursache, wie unzureichende Blutzufuhr, unzureichende venöse Ableitung, übermäßiges Gewebeödem, Infektion, konstanter Druck oder verschiedene andere Ursachen, zu bekämpfen.

[0034] Man beobachtet, dass die Applikation von Glucan auf Geschwüre, wie oben beschrieben, eine hohe Geschwindigkeit der therapeutischen Reaktion erzeugt. Hautgeschwüre, die entweder unempfindlich oder schwach empfindlich für herkömmliche Wundbehandlungspraxis sind, reagieren typischerweise innerhalb mehrerer Tage auf die Behandlung mit Glucan, die in einem großen Teil der Fälle zu einer vollständigen Heilung innerhalb mehrerer Wochen der Behandlung führt. Man findet, dass Glucan in der Behandlung von Geschwüren wirksam ist, wenn es lokal auf die Wunde in verschiedenen Formen, wie z. B. ein Puder, ein Gel, eine Creme oder ein Verband, wie eine Mullbinde, oder ein gallertartiges Material oder irgendeine andere Zusammensetzung, die Fachleuten auf dem Gebiet der pharmazeutischen Formulierung allgemein bekannt sind, appliziert wird.

[0035] Unter einem verwandten Gesichtspunkt kann die Behandlung von Geschwüren, die auf herkömmliche Therapien (wie normale Verbände oder Salben) ansprechen, durch Verabreichung von Glucan beschleunigt werden.

[0036] Eine andere unvorhergesehene therapeutische Anwendung für Glucan (wie z. B. als Mikropartikel vor-

liegende, lösliche oder gelartige Formen, die auf eine der zuvor erwähnten Methoden oder andere, im Stand der Technik bekannte Verfahren hergestellt worden sind) gemäß der vorliegenden Erfindung liegt in der Behandlung von Knochenbruch. Die Wiederherstellung eines gebrochenen Knochens kommt charakteristischerweise durch ein Wiederherstellungsverfahren zustande, das grundsätzlich analog bei Weichgewebe wie Haut zu beobachten ist, sich aber hinsichtlich einiger bedeutender Gesichtspunkte unterscheidet. Bei einem Knochen ist ein bedeutender, früher Schritt im Wiederherstellungsverfahren die Bildung einer faserigen, als Callus bekannte Struktur, die die gebrochene Stelle verbrückt, wobei sie ein Gerüst für den Wiederherstellungsprozess bildet und ein Maß an Immobilisierung der gebrochenen Stelle gewährleistet. Zu gegebener Zeit wird der Callus mineralisiert, was für Kontinuität mit dem verletzten Knochen sorgt, und erfährt ein Maß an Umbildung zu annähernd der ursprünglichen Form des Knochens. Unter diesem Gesichtspunkt der Erfindung verstärkt die Applikation von Glucan auf die Stelle der Verletzung die Geschwindigkeit der Wiederherstellung des verletzten Knochens, was somit die Behandlung des Bruches vereinfacht.

[0037] Man beobachtet, dass die Wirkung einer derartigen Behandlung eine frühere Einleitung der Callusbildung und eine frühere Organisation des Bindegewebes innerhalb dieses Callus ist, was für eine feste, faserige Matrix sorgt. Das Ergebnis davon ist der Aufbau eines immobilisierenden Callus zu einer früheren Zeit mit der wichtigen klinischen Wirkung der Verringerung der Gefahr der Trennung der gebrochenen Kanten des Knochens. Dies ist eine hochgradig wünschenswerte Wirkung sowohl bei Tieren als auch bei Menschen, weil jegliche Spaltung der Bruchstelle die Ursache für eine verzögerte Heilung sein kann. Spaltung an der Bruchstelle bleibt ein Problem, sogar wenn Methoden physikalischer Immobilisierung durch mechanische Mittel wie starre Schienen (wie z. B. Gipsverbände oder Bandagen) oder Implantate (wie Nägel oder Schrauben) verwendet werden. Während man findet, dass der Prozess der Mineralisierung durch die Glucanbehandlung nicht merklich verstärkt wird, findet man, dass die Wirkung von Glucan bei der Beschleunigung der Callus-Phase die Wirkung der Verringerung der Gesamtzeit bis zur Vervollständigung der Mineralisierung hat.

[0038] Das Glucan wird vorzugsweise direkt auf die Stelle der Knochenverletzung in einer Form aufgetragen, die die Retention des Glucans an der Stelle des Bruchs maximiert. Formulierungen zur langsamen Freisetzung sind im Stand der Technik wohlbekannt und werden in diesen Anwendungen vorzugsweise verwendet. Man findet, dass das viskose Gel, das durch die in dieser Erfindung beschriebene Ausführungsform gebildet worden ist, wobei eine hochgradig alkalische Lösung von löslichem Glucan in einer Konzentration von über 15 mg/ml (von 15 mg/ml bis 500 mg/ml, bevorzugter von 15 mg/ml bis 30 mg/ml) auf pH 7,5 eingestellt wird (Beispiel 4), eine bevorzugte Form ist. Diese Form ist ausreichend viskos und mit Blut und Gewebeflüssigkeiten nicht mischbar, um an der Stelle der Auftragung für Zeitspannen von bis zu 48 Stunden zu verbleiben. Ein zusätzlicher Vorteil dieser gelartigen Form ist es, dass sie ausreichend bearbeitbar ist, um durch feine Kanülen injiziert werden zu können. In dieser Form kann das Glucan durch Injektion in die Bruchstelle verabreicht werden, wo der Bruch ohne das Erfordernis operativer Freisetzung des Knochens repositioniert wird. Alternativ kann das Gel auf die Bruchstelle während der offenen, operativen Repositionierung von Brüchen verabreicht werden.

[0039] Die mögliche Nützlichkeit der Glucanbehandlung für Knochenbrüche bei Menschen ist von den Erfindern in einem Tierversuch gezeigt worden. Die Ratte ist ein Standardmodell, das in der experimentiellen Medizin für die Erforschung von Knochenbrüchen verwendet wird, und wird allgemein als direkt voraussagend für die Therapie bei Menschen betrachtet (Bak et al. 1992). Bei diesem Tierversuch haben die Erfinder festgestellt, dass die Injektion von 2 ml löslichen Glucans in einer Konzentration von 15 mg/ml in einer gelartigen Form an der Stelle eines gebrochenen Oberschenkelknochens zu einer beschleunigten Heilung im Vergleich zu nicht behandelten Brüchen führte, wie es durch erhöhte Zugfestigkeit der teilweise verheilten Knochen nach 12 Tagen bewiesen wurde (Beispiel 10).

[0040] Es kann daher leicht vorausgesehen werden, dass Glucan, das nicht toxisch und physiologisch annehmbar ist, weitreichende Anwendung in der Behandlung von Brüchen in der Human- und Tiermedizin finden kann. Beispielsweise wird eine einzelne Bolusinjektion oder -applikation von Glucan an der Stelle des Bruches die Heilung fördern und die Zugfestigkeit des verheilten Knochens erhöhen.

[0041] Ein weiterer, unerwarteter, therapeutischer Nutzen ist es, dass Glucan die Fixierung von Vorrichtungen wie Nadeln, Schrauben, künstlichen Gelenken und Prothesen, die in oder auf den Knochen fixiert oder implantiert worden sind, verstärkt. Man beobachtet, dass die Applikation von Glucan (wie durch lokale Auftragung eines Puders oder Gels oder durch Injektion) an die Stelle der Fixierung der Vorrichtung den lokalen Entzündungsprozess signifikant verstärkt, der als Reaktion auf den Kontakt der Vorrichtung mit dem Knochen auftritt und im Allgemeinen ein integraler Bestandteil der Festigkeit der Bindung zwischen dem Knochen und der Vorrichtung ist.

[0042] Eine besondere therapeutische Indikation für Glucan (entweder als Mikropartikel vorliegende oder lösliche Formen, die nach einer der zuvor erwähnten Methoden oder nach Methoden des Standes der Technik hergestellt worden sind) gemäß der vorliegenden Erfindung liegt in der Behandlung von verletztem Bindegewebe wie Sehnen und Bändern, was bislang nicht beschrieben oder vorgeschlagen worden ist. Derartige Gewebe sind typischerweise dicht faserig, weil sie relativ hohen Spannungsbelastungen unterworfen sind. Diese

Verletzungen beinhalten zum Beispiel (a) akute oder chronische Entzündung in Verbindung mit Überbeanspruchung, Dehnung oder Verletzung, derartige Zustände, die typischerweise mit Sportverletzungen oder dem als RSI-Syndrom (Repetitive Strain Injury) bekannten Syndrom oder übermäßiger oder ungewöhnlicher Belastung in Verbindung stehen, und (b) Operation, insbesondere wenn das Gewebe durchtrennt oder durchgeschnitten wird, sind aber nicht darauf beschränkt. Es ist bekannt, dass Verletzungen dieser Art in derartigen Geweben typischerweise langsamer heilen, teilweise aufgrund der relativen Schwierigkeit der vollständigen Ruhigstellung des verletzten Gewebes wegen ihrer Spannungen hervorrufenden Funktionen, aber größtenteils wegen des charakteristischerweise niedrigeren Grads an Aktivität sämtlicher Gesichtspunkte der Gewebeheilungskaskade im Vergleich zu der, die in Weichgeweben beobachtet wird. Eine bedeutsame Ursache dieses vergleichsweise niedrigen Grads an Gewebewiederherstellungsaktivität in Sehnen und Bändern ist eine eingeschränkte Blutversorgung im Vergleich zu den meisten Weichgeweben. Man findet, dass die Applikation von Glucan auf die verletzte Sehne oder das verletzte Band entweder zum Zeitpunkt der akuten Verletzung, wie z. B. die folgende Operation oder eine äußere Verletzung, oder bei chronischer Verletzung wie chronischer Entzündung sowohl die Geschwindigkeit des Ansatzes als auch den Grad der Heilungsreaktion in diesen Geweben fördern wird, was im Fall der Operation zur früheren Rückkehr der normalen Festigkeit und Funktion und im Fall der Entzündung zur früheren Auflösung des Entzündungsprozesses führt. Das Glucan kann direkt in die verletzte Sehne oder das verletzte Band injiziert werden. Obwohl es beschrieben worden ist, dass Glucan ein wirksamer Verstärker der Wundheilung im Hautgewebe bei gesunden Geweben ist, ist es aus dieser Kenntnis nicht offensichtlich, dass Glucan die Fähigkeit besitzt, eine verstärkte Auflösung chronischer Entzündungsprozesse zu bewirken oder Heilungsprozesse in Geweben mit beschränkter Blutzufuhr oder in Geweben, von denen es bekannt ist, dass normale Heilungsgeschwindigkeiten relativ niedrig sind, zu verstärken.

[0043] Es sollte selbstverständlich sein, dass die neuartigen, therapeutischen, hierin beschriebenen Verwendungen für Glucan nicht auf Glucan beschränkt sind, das durch die hierin beschriebenen Verfahren hergestellt worden ist, obwohl dieses Material bevorzugt ist. Sämtliche früheren Glucanmaterialien, wie die durch Hassid et al, Di Luzio et al, Manners et al und Jamas et al (US Patent No. 5028703, 5250436, 5082936 und 4992540), können verwendet werden. Vorzugsweise ist das Glucan Sc-Glucan.

[0044] Diese Erfindung wird nun in Bezug auf die folgenden, nicht einschränkenden Beispiele beschrieben, die verschiedene Ausführungsformen der Erfindung veranschaulichen.

Referenzbeispiel 1

[0045] Als Mikropartikel vorliegendes Glucan wird wie folgt hergestellt:

[0046] Eine 400 g-Probe von kommerziellen *Saccharomyces cerevisiae* in trockener Form wird zu vier Litern 4%iger (g/v) Natriumhydroxidlösung gegeben und eine Stunde lang unter starkem Rühren auf 100°C erhitzt. Man lässt die Suspension auf eine Temperatur zwischen 45°C und 50°C abkühlen, bevor die lysierten Hefezellen aus dem alkalischen Hydrolysat durch zehnmündige Zentrifugierung bei 800 g abgetrennt werden. Die lysierten Hefezellen werden in einer frischen Charge von drei Litern 3%iger (g/v) Natriumhydroxydlösung erneut suspendiert und 15 Minuten lang gekocht. Nach der Abtrennung durch Zentrifugierung werden die lysierten Zellen in einer frischen Charge von 2 Litern 3%iger (g/v) Natriumhydroxidlösung erneut suspendiert, 15 Minuten lang gekocht und nachfolgend 16 Stunden lang bei 70°C stehen gelassen. Nach der Abtrennung durch Zentrifugierung werden die lysierten Hefezellen in Wasser erneut suspendiert und 10 Minuten lang gekocht. Der letzte Schritt wird einmal wiederholt. Nach der Zentrifugierung werden die lysierten Zellen in einer frischen Probe von zwei Litern Wasser suspendiert, wobei der pH-Wert auf 4,5 durch Zugabe von Phosphorsäure eingestellt worden ist, und die Suspension wird daraufhin 30 Minuten lang gekocht. 500 ml Chloroform werden nachfolgend zugegeben, die Suspension wird 10 Minuten lang einem kräftigen Schütteln unterzogen und nachfolgend lässt man die Suspension 10 Minuten lang in einem Scheidetrichter absetzen. Die Suspension trennt sich in drei eindeutige Phasen auf, eine untere organische Phase, eine obere wässrige Phase und eine zwischen diesen beiden Phasen liegende Zwischenphase, die grau gefärbt ist. Die untere Chloroformphase und eine gräuliche Zwischenphase werden verworfen, was eine wässrige Phase zurücklässt, die gesammelt wird und wie zuvor mit einer frischen Charge von 500 ml Chloroform in Kontakt gebracht wird. Die letzte wässrige Phase wird gesammelt, 10 Minuten lang gekocht, um sämtliches verbliebenes Chloroform zu entfernen, und nachfolgend unter Verwendung eines Sprühtrockners getrocknet.

[0047] Eine Analyse der wässrigen Phase zeigte, dass sie nur verzweigtes β -(1,3)(1,6)-Glucan im Verhältnis von 95 bis 98% β -1,3 : 2 bis 5% β -1,6-Verknüpfungen enthielt. Die organische Phase ist leicht opak und enthält Lipide, aber kein Glucan. Die dazwischen liegende Phase (Zwischenphase) enthält unverzweigtes β -(1,3)-Glucan (98 bis 100% β -1,3 : 0 bis 2% β -1,6) in Verbindung mit Chitin-, Protein- und anderen nicht-Glucan-Verunreinigungen. Biologische Tests zeigten, dass das verzweigte Glucan biologisch signifikant aktiver als unverzweigtes β -(1,3)-Glucan in einem Wundheilungstest war.

[0048] Die chemische Zusammensetzung des hergestellten Glucans ist in Tabelle 7 dargelegt.

Tabelle 7

Chemische Zusammensetzung des durch das Verfahren hergestellten Sc-Glucans

	Gew.-%
Glukose ¹	>98
Mannan ¹	<0,2
Protein ²	<0,5
Glykogen ³	<0,5
Chitin ¹	<0,3
Lipid ⁴	nicht bestimmbar
glykosidische Verknüpfung	
β -1,3	96-97
β -1,6	3-4

Analysemethoden:

HPLC
 Lowry-Methode
 GC-MS
 NMR

[0049] Aus dieser Analyse wird ersichtlich, dass das Endprodukt ein verzweigtes β -(1,3)(1,6)-Glucan ist, das im Wesentlichen rein ist, nur Spuren von Verunreinigungen enthält und 2 bis 3% β -1,6-Verknüpfungen enthält.

Referenzbeispiel 2

[0050] Als Mikropartikel vorliegendes Sc-Glucan wird wie folgt hergestellt:

[0051] Eine 400 g-Probe von kommerziellen *Saccharomyces cerevisiae* in trockener Form wird zu vier Litern 4%iger (g/g) Natriumhydroxidlösung gegeben und eine Stunde lang unter starkem Rühren auf 100°C erhitzt. Man lässt die Suspension auf eine Temperatur zwischen 45°C und 50°C abkühlen, bevor die lysierten Hefezellen aus dem alkalischen Hydrolysat durch zehnmündige Zentrifugierung bei 800 g abgetrennt werden. Die lysierten Hefezellen werden in einer frischen Charge von 3 Litern 3%iger (g/v) Natriumhydroxidlösung erneut suspendiert und 15 Minuten lang gekocht. Nach der Abtrennung durch Zentrifugierung werden die lysierten Hefezellen in einer frischen Charge von zwei Litern 3%iger (g/v) Natriumhydroxidlösung erneut suspendiert, 15 Minuten lang gekocht und nachfolgend lässt man sie 16 Stunden lang bei 70°C stehen. Nach der Abtrennung zur Zentrifugierung werden die lysierten Hefezellen in Wasser erneut suspendiert und 10 Minuten lang gekocht. Der letzte Schritt wird einmal wiederholt. Nach der Zentrifugierung werden die lysierten Hefezellen in einer frischen Probe von 2 Litern Wasser, wobei der pH-Wert durch Zugabe von Salzsäure auf 4,5 eingestellt worden ist, erneut suspendiert und die Suspension wird nachfolgend 10 Minuten lang gekocht. 500 ml Chloroform werden daraufhin zugegeben, die Suspension wird 10 Minuten lang einem kräftigen Schütteln unterzogen und nachfolgend lässt man die Suspension 10 Minuten lang in einen Scheidetrichter absetzen. Die untere Chloroformphase und eine gräuliche Zwischenphase werden verworfen, was eine wässrige Phase zurücklässt, die gesammelt wird und wie zuvor mit einer frischen Charge von 500 ml Chloroform in Kontakt gebracht wird. Die letztendliche wässrige Phase wird gesammelt und 10 Minuten lang gekocht, um sämtliches zurückbleibendes Chloroform zu entfernen, und nachfolgend unter Verwendung eines Sprühtrockners getrocknet.

[0052] Die chemische Zusammensetzung des hergestellten Glucans ist in Tabelle 8 dargelegt.

Tabelle 8

Chemische Zusammensetzung des durch dieses Verfahren hergestellten Sc-Glucans

	Gew.-%
Glukose ¹	>98
Mannan ¹	<0,2
Protein ²	<0,5
Glykogen ³	<0,5
Chitin ¹	<0,3
Lipid ⁴	nicht bestimmbar
glykosidische Verknüpfung	
β -1,3	98-99
β -1,6	1-2

[0053] Es ist ersichtlich, dass im Vergleich zu dem in Referenzbeispiel 1 erhaltenen Endproduktmaterial dieses Material einen ähnlichen Reinheitsgrad aufweist, aber geringfügig weniger β -1,6-Glucan-Verknüpfungen besitzt, was einen geringeren Grad an Seitenverzweigungen anzeigt.

Referenzbeispiel 3

[0054] Ein Protokoll zur Herstellung von minimal polymerisiertem, löslichen Sc-Glucan ist wie folgt:

[0055] Als Mikropartikel vorliegendes Sc-Glucan wird, wie in Referenzbeispiel 2 genau beschrieben, hergestellt. 10 g dieses Materials werden in 100 ml steriler, 5%iger NaOH-Lösung suspendiert und zwei Stunden lang bei 5°C schwach gerührt (was einen pH-Wert um pH 13 ergibt). Die Suspension wird dann in einem Verhältnis von 1 : 1 mit sterilem, destilliertem Wasser verdünnt und dann durch eine 1 μ -Membran filtriert, um die ungelösten Feststoffe zu entfernen. Der pH-Wert der filtrierten Lösung wird daraufhin durch Zugabe der 5 M HCl auf 10 eingestellt und dann gegen zwei Liter destilliertes Wasser (pH 10) in einem Pelicon-System unter Verwendung einer auf 10.000 D beschränkenden Membran dialysiert. Die Lösung kann via Durchlauf durch eine 0,45 μ -Membran steril gemacht werden und der pH-Wert der Lösung kann wie gewünscht eingestellt werden. Das so hergestellte lösliche Glucan ist als ein pharmazeutisches Produkt nützlich.

[0056] Gelpermeationschromatographie (Waters Styragel HR 5E[®]-Säule; effektive Molekulargewichtsspanne von 10×10^4 bis $4,0 \times 10^6$ Dalton) des löslichen Glucans zeigte, dass das Material im Wesentlichen homogen mit einer sehr engen Streubreite des Molekulargewichts war, wobei es ein durchschnittliches Molekulargewicht von 140.000 Dalton und einen Polydispersitätsindex von 2,564 besaß. Bei dieser Bestimmung ist das Lösungsmittel DMSO und die Säulenflussrate 1 ml/min.

Referenzbeispiel 4

[0057] Ein Protokoll zur Herstellung von polymerisiertem, löslichen Glucan gemäß der vorliegenden Erfindung ist wie folgt.

[0058] Als Mikropartikel vorliegendes Sc-Glucan wird, wie in Referenzbeispiel 2 genau beschrieben, hergestellt. 15 g dieses Materials werden in 100 ml steriler, 5%iger NaOH-Lösung suspendiert und zwei Stunden lang bei 5°C schwach gerührt. Die Suspension wird daraufhin bei 1000 g zentrifugiert, um die ungelösten Feststoffe zu entfernen. Der pH-Wert der Lösung wird dann durch Zugabe von 5 M HCl auf 10 eingestellt und dann gegen 2 L destilliertes Wasser (pH 10) in einem Pelicon-System unter Verwendung einer auf 10.000 D beschränkenden Membran dialysiert. Daraufhin wird der pH-Wert durch die weitere Zugabe von Salzsäure auf 7,5 eingestellt, was ein viskoses Gel erzeugt, das als ein pharmazeutisches Produkt nützlich ist.

[0059] Gelpermeationschromatographie zeigte, dass das Material im Wesentlichen homogen mit einer sehr engen Streubreite des Molekulargewichts war, wobei es ein durchschnittliches Molekulargewicht von 320.000

Dalton und einen Polydispersitätsindex von 2,2 hatte.

Beispiel 5

[0060] Ein Modell der verzögerten Wundheilung wurde an Ratten entwickelt, um die Fähigkeit des als Mikropartikel vorliegenden Sc-Glucans zu testen, die Wundheilung in dysfunktionellen Wunden zu fördern. Die Bruchfestigkeit von sieben Tage alten Hautwunden bei jungen, ausgewachsenen Laborinzuchtratten wird, wie vorher kurz dargestellt, bestimmt. Die Ratten werden in diesem Fall jedoch mit Wirkstoffen behandelt, die die Heilungsreaktion unterdrücken sollen. Dies wird durch tägliche Behandlung ab dem Zeitpunkt der Verwundung mit einer Kombination von Prednison (1 mg/kg), Cyclosporin A (5 mg/kg) und Azothioprin (2 mg/kg) erzielt. Diese dreifache Wirkstofftherapie sorgt für eine Auswahl unterdrückender Wirkungen auf Makrophagen, Lymphozyten und vasculäres Endothelium.

[0061] Tabelle 9 fasst die Ergebnisse der Verwendung von Sc-Glucan in diesem Modell zusammen. Die Wirkung der dreifachen Wirkstofftherapie war die erhebliche Verringerung ($p < 0,01$) der Bruchfestigkeit der Wunde nach sieben Tagen. Eine einzelne Applikation von 1 mg als Mikropartikel vorliegendem Sc-Glucan (pro 5 cm linearer Länge der Hautwunde), das durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellt worden war, bekämpfte die unterdrückende Wirkung der dreifachen Wirkstofftherapie erfolgreich, wobei die Bruchfestigkeit der Wunde auf die der bei normalen immunkompetenten Ratten beobachteten zurückkehrte.

Tabelle 9

[0062] Wirkung der topischen Sc-Glucan-Therapie auf die Bruchfestigkeit von Hautwunden bei Ratten mit und ohne durch Wirkstoffinduktion unterdrückter Wundheilung.

Gruppe	Wirkstoffbehandlung	Glucanbehandlung	Bruchfestigkeit der Wunde (g) (Mittelwert)
1	keine	keine	422
2	ja	keine	275
3	ja	ja	442

Beispiel 6

Glucanformulierung

[0063] Topische Präparate für humane und veterinäre Applikationen wurden aus den folgenden Komponenten hergestellt:

Topische Creme		
β -1,3-Glucan (als Mikropartikel vorliegend)	BP	1 mg/g
Zinkstearat	BP	3 mg/g
Cetomacrogol® 1000	BP	20 mg/g
Cetostearylalkohol	BP	80 mg/g
Phenoxyethanol	BPC 1973	5 μ L/g
Glycerin	BP	60 mg/g
Erdnussöl	BP	40 mg/g
gereinigtes Wasser	BP	bis 1 g

[0064] Diese Formulierung kann als Formulierung #1 bezeichnet werden.

[0065] Ein Puder zur topischen Applikation wurde aus den folgenden Komponenten hergestellt:

Topischer Puder		
β -1,3-Glucan (als Mikropartikel vorliegend)		100 mg/g
Maiskörnmehl	BP	900 mg/g

[0066] Diese Formulierung kann als Formulierung #2 bezeichnet werden.

[0067] Eine topische Creme wurde durch Vermischen der folgenden Komponenten hergestellt:

Topische Creme	
Paraffinöl	80 ml
Olivenöl	60 ml
wasserfreies Lanolincetomacrogel® 1000	60 g
Stearinsäure Cetostearylalkohol	58 g
Glycerylmonostearat Phenoxyethanol	60 g
Ölsäureglycerylester	25 ml
Wasser	1200 ml
Triethanolamin	27 ml
lösliches Glucan aus Referenzbeispiel 3	20 ml

[0068] Diese Formulierung kann als Formulierung #3 bezeichnet werden und sorgt für eine Creme, die 5 mg lösliches Glucan pro g enthält.

[0069] Formulierungen #1 bis #3 werden durch Einarbeiten von Glucan in der Form eines Gels variiert. Diese können als Formulierungen #1A bis #3A bezeichnet werden.

Beispiel 7

[0070] Ein Dekubitusgeschwür wurde erfolgreich an einem menschlichen Patienten unter Verwendung der Formulierung #1 behandelt.

[0071] Der Patient war ein 90 Jahre altes männliches Schlaganfallopfer, das 10 Jahre lang im Krankenhaus gewesen war und im Wesentlichen bettlägerig war. Ein Dekubitusgeschwür hatte sich 1986 an der rechten Gesäßbacke entwickelt und bestand trotz regulärer medizinischer und pflegender Beachtung fort. Bis 1988 war das Geschwür auf einen Durchmesser von 8 cm und eine Tiefe von 4 cm angewachsen. Herkömmliche Behandlungen, die aus regulärer Säuberung der Wunde, Anbringung von Schutzverbänden und Körperpositionierung zur Minimierung des Drucks auf das Geschwür bestanden, waren darin fehlgeschlagen, die fortschreitende Verschlimmerung des Geschwürs anzuhalten.

[0072] Die Behandlung des Sc-Glucan wurde begonnen und beruhte auf der topischen Applikation unter Verwendung der Formulierung #1. Tägliche topische Behandlungen wurden eine Woche lang durchgeführt und nachfolgend beendet. Zwei Wochen nach der Behandlung war das Geschwür vollständig geheilt; die Epithelialisierung war vollständig und es gab keine sichtbare Narbenbildung.

Beispiel 8

[0073] Ein Patient (Hr. G. W), der unter andauernden Beingeschwüren litt, wurde mit Glucan behandelt (Formulierung #1).

[0074] Der Patient war ein 53 Jahre alter Mann, der eine Sportverletzung erlitt, die einen gebrochenen Knö-

chel einschloss. In Folge dieser Verletzung wurde der Knöchel zweimal wiederhergestellt. Nach der zweiten Wiederherstellung heilte die Wunde nicht und vier Venostasegeschwüre entwickelten sich trotz der Verwendung systemischer und topischer Bakterizide und Antibiotika.

[0075] Nach fünf aufeinanderfolgenden täglichen Applikationen des Glucans, das die Wundheilungscreme aus Beispiel 5 der Formulierung 1 enthielt, auf drei der Geschwüre verheilte eines, das ursprünglich 3,8 cm × 1,9 cm maß, innerhalb von 10 Tagen vollständig, eines, das 10,2 × 3,8 cm maß, wurde auf 6,3 cm × 1,3 cm während der zehntägigen Behandlungsdauer reduziert und ein weiteres Geschwür, das 3,8 cm × 1,9 cm maß, wurde auf 2,5 cm × 1,2 cm reduziert. Die Behandlung wurde am zehnten Tag wieder begonnen und nach zwei weiteren Behandlungszyklen, die sieben Tage lang Applikation der Creme und sieben Tage lang keine Behandlung umfassen, heilten die letzteren beiden Geschwüre nach vier Wochen vollständig. Die Behandlung des vierten Geschwürs (10 cm × 9 cm), das zwei offene Bänder und übermäßige Gewebenekrose umfasste, wurde kurz danach begonnen. Nach zehn Tagen täglicher Behandlung gab es klare Anzeichen von erneutem epithelalem Wachstum und von Granulierungsgewebe, was zur Bedeckung der offenen Sehnen durch Granulierungsgewebe und einer Gesamtverringerung der Wundgröße auf 8 cm × 7 cm führte.

[0076] Der Patient hatte nie derart positive Ergebnisse aus irgendeiner vorherigen Behandlung beobachtet.

Beispiel 9

[0077] Die hintere Seite des vorderen Unterschenkels eines sechs Jahre alten Vollbluthengstes wurde bei einem Kampf mit einem anderen Hengst schwer verletzt, was einen tiefen Hohlraum mit einem äußerlichen Loch mit einer Fläche von ungefähr 40 cm × 20 cm erzeugte. Anfängliche Behandlung war die Spülung mit Desinfektionsmittel und antibiotischen Lösungen, aber nach mehreren Tagen wurde die Schwere der Verletzung deutlicher und schien sich zu verschlechtern. Es bestand eine übermäßige und tiefe Verschorfung, die mit einer Nekrose des tief gelegenen Gewebes einschließlich Band und Sehnen und verbundenen Muskelmassen auftrat – einige Bänderreste waren als ungesund aussehende Stränge vorhanden und das Tier konnte kein Gewicht tragen. Der betroffene Bereich wurde zu dieser Zeit durch topische Applikation der Formulierung #1 aus Beispiel 5 behandelt.

[0078] Es gab eine sofortige und tiefgreifende Reaktion auf die Glucanbehandlung.

[0079] Die Folge der klinischen Reaktion auf die Behandlung war wie folgt:

24 Stunden nach der Behandlung: abgeschwächte Nekrose mit Verringerung der Vereiterung

36 Stunden nach der Behandlung: merkliche Verbesserung im Erscheinungsbild der Wunde mit Gewebe, das Vitalität zeigte

72 Stunden nach der Behandlung: die gesamte Fläche füllte sich schnell, wobei Band und Sehnenreste in neues Gewebe eingeschlossen wurden.

96 Stunden nach der Behandlung: Allgemeines Erscheinungsbild einer guten, schnellen und gesunden Heilung mit sichtbarer peripherer Epithelialisierung.

[0080] Schließlich schloss sich die Wunde nach 12 Tagen der Behandlung vollständig und mit minimaler Narbenbildung.

[0081] Zu dieser Zeit trug das Tier Gewicht auf allen Beinen.

Beispiel 10

[0082] Vier erwachsenen Ratten (männlich, Wistar, Inzucht-erzeugt) wurde der linke Unterschenkel unter Betäubung unter Verwendung von außen angelegter Kräfte gebrochen. Die Bruchstelle wurde durch äußeres Bestasten bestimmt. Eine 21-Gauge-Kanüle wurde dann durch die Haut über die Bruchstelle eingeführt und zwischen die gebrochenen Enden des Oberschenkelknochens positioniert. Der Bruch wurde daraufhin auf dem Standardweg durch Einsetzen eines intramedullären Nagels durch das Kniegelenk immobilisiert, um durch den Oberschenkelkopf herauszukommen. Bei zwei Ratten wurden 2 ml kolloidales Glucan, hergestellt nach Referenzbeispiel 4, an die Bruchstelle mittels der vorher positionierten Kanüle injiziert. Bei den anderen beiden Ratten wurden 2 ml Kochsalzlösung anstelle des Glucans injiziert.

[0083] Die Kanüle wurde daraufhin entfernt und man ließ sich die Ratten aus der Betäubung erholen. Zwölf Tage später wurden die Ratten getötet, die intramedullären Nägel wurden entfernt und die gebrochenen Oberschenkel wurden zur Visualisierung der Bruchstelle und zur Bestimmung der Stärke der Heilungsreaktion isoliert. Bei den beiden Kontrollratten (Kochsalzlösung) war die Bruchstelle innerhalb eines ansatzweisen Callus eingeschlossen und konnte leicht durch Verdrehung des oberen und unteren Femorschafes verschoben werden. Bei den beiden mit Glucan behandelten Ratten war der Callus weiter fortgeschritten, wobei eine beständigere und beträchtlich größere Kraft erforderlich war, um die gebrochenen Enden des Oberschenkelknochens zu verschieben. Es wurde geschlossen, dass die Wirkung des Glucans für die Beschleunigung der Callusbildung verantwortlich gewesen war, was zu einer verstärkten Bindung der Bruchstelle 12 Tage nach dem Bruch geführt hatte.

- [0084] Bacon J S D, Farmer, V C, Jones D, Taylor I F, "The glucan component of the cell wall of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) considered in relation to its ultrastructure", *Biochem. J.*, 114, 557–567 (1969)
- [0085] Bak B, Jensen KS, "Standardization of Tibial Fractures in the Rat" *Bone*, 13, 289–245 (1992)
- [0086] Canfield PJ, Greenoak GE, Reeve VE, Gallagher CH, "Characterisation of UV induced keratoacanthoma-like lesions in HRA/Skh-1 mice and their comparison with keratoacanthomas in man", *Pathology*, 17(4), 613–616 (1985)
- [0087] Cook J A, Holbrook T W, Parker B W, "Visceral leishmaniasis in mice: protective effect of glucan", *Journal of the Reticuloendothelial Society*, 27, 567–573 (1980)
- [0088] Czop J K, Austen K F, "Generation of leukotrienes by human monocytes upon stimulation of their β -glucan receptor during phagocytosis", *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 82, 2751–2755 (1985)
- [0089] Di Luzio N R, Williams D L, McNamee R B, Edwards B F, Kitahama A, "Comparative tumor-inhibitory and antibacterial activity of soluble and particulate glucan". *Int J Cancer*, 24, 773–779 (1979)
- [0090] Deimann, Fahimi, *Journal of Experimental Medicine*, 149, 883–897 (1979)
- [0091] Hassid WZ, Joslyn MA, McCready RM, "The molecular constitution of an insoluble polysaccharide from yeast, *Saccharomyces cerevisiae*". *Journal of the American Chemical Society*, 63, 295–298 (1941)
- [0092] Kelly G E, Lui. W. "Accelerated wound healing in normal and immunosuppressed animals", *Norvet Research Pty Ltd*, 1994, Report G94003.
- [0093] Maeda Y Y, Chihara G, "The effects of neonatal thymectomy on the antitumour activity of lentinan, carboxymethylpachyman and zymosan, and their effects on various immune responses", *International Journal of Cancer*, 11, 153–161 (1973)
- [0094] Manners D J, Masson A J, Patterson J C, "The structure of a β -(1,3)-D-glucan from yeast cell walls". *Biochem J*, 135, 19–30 (1973)
- [0095] Mansell P W A, Ichinose H, Reed R J, Kremetz E T, McNamee R, Di Luzio N R. "Macrophage-mediated destruction of human malignant cells in vivo". *Journal of the National Cancer Institute*, 54, 571–580 (1975)
- [0096] Niskanen, *Cancer Research*, 38, 1406–1409 (1978)
- [0097] Patchen, Lotzova, *Experimental Haematology* 8, 409–422 (1980)
- [0098] Riggi S, Di Luzio N R, "Identification of a RE stimulating agent in zymosan", *American Journal of Physiology* 200, 297–300 (1961)
- [0099] Sherwood E R, Williams D L, Di Luzio N R, "Glucan stimulates production of antitumor cytolytic/cytostatic factor(s) by macrophages", *Journal of Biological Response Modifiers*, 5, 504–526 (1986)
- [0100] Sherwood E R, Williams D L, McNamee R B, Jones E L, Browder I W, Di Luzio N R, "Enhancement of interleukin-1 and interleukin-2 production by soluble glucan", *International Journal of Immunopharmacology*, 9, 261–267 (1987)
- [0101] Williams D L, Pretus H A, McNamee R B, Jones E L, Ensley H E, Browder I W, Di Luzio N R, "Development, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of a water soluble glucan sulfate derived from *Saccharomyces cerevisiae*" *Immunopharmacol*, 22, 139–156 (1991).
- [0102] Williams D L, Cook J A, Hoffmann E O, Di Luzio N R, "Protective effect of glucan in experimentally induced candidiasis", *Journal of the Reticuloendothelial Society* 23, 479–490 (1978)
- [0103] Williams D L, Browder I W, Di Luzio N R, "Immunotherapeutic modification of *E. coli*-induced experimental peritonitis and bacteremia by glucan", *Surgery*, 93, 448–454 (1983)
- [0104] Williams D L, Sherwood E R, McNamee R B, Jones E L, Di Luzio N R, "Therapeutic efficacy of glucan in a murine model of hepatic metastatic disease", *Hepatology*, 5, 198–206 (1985)
- [0105] Williams D L, McNamee R B, Jones E L, Pretus H A, Ensley H E, Browder I W, Di Luzio N R. "A method for the solubilization of a (1-3)- β -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*", *Carbohydrate Research*, 219, 203–213 (1991)

Patentansprüche

1. Verwendung von Glucan zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung von Hautulceration, Knochenbruch oder zur Verstärkung der Fixierung implantierter, orthopädischer Hilfsmittel.
2. Verwendung nach Anspruch 1, worin die genannte Hautulceration Ulceration in Verbindung mit Reizung der Haut oder Druck, eingeschränkter Blutversorgung oder vermindertem Blutfluss, physischer Verletzung, Infektion, Neoplasie oder Nervenschaden ist.
3. Verwendung nach Anspruch 2, worin die physische Verletzung strahlungs-, thermische Verbrennungen, Decubitus- oder Insektenbissverletzung der Haut ist.

4. Verwendung nach Anspruch 2, worin die Infektion Knochen-, pyrogenes, synergistisches Gangrän, Syphilis, Tuberkulose, Tropen- oder Pilzinfektion ist.
5. Verwendung nach Anspruch 2, worin die Neoplasie ein primärer Hauttumor, Metastasen oder Leukämie ist.
6. Verwendung nach Anspruch 2, worin der Nervenschaden eine Rückenmarksverletzung oder eine periphere Neuropathie ist.
7. Verwendung nach Anspruch 2, worin die genannte Hautulceration ausgewählt ist aus Decubitus, venöser Stasis und arteriellen, ischämischen Geschwüren.
8. Verwendung nach Anspruch 1, worin Glucan die Callus-Bildung und den Aufbau von Verknüpfungsgebe bei Knochenbrüchen beschleunigt.
9. Verwendung nach Anspruch 8, worin das Glucan in Form einer Formulierung zur langsamen Freisetzung vorliegt.
10. Verwendung nach Anspruch 1, worin ein implantiertes, orthopädisches Hilfsmittel ein Nagel, eine Schraube, ein künstliches Gelenk oder eine befestigte oder in den Knochen implantierte Prothese ist.
11. Verwendung nach Anspruch 1, worin das Glucan in Form von Mikropartikeln, in löslicher Form oder in Form eines Gels aus Glucan vorliegt.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen