



PATENTDIREKTORATET  
TAASTRUP



(21) Patentansøgning nr.: 3006/82

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> A 61 L 25/00

(22) Indleveringsdag: 05 jul 1982

(41) Alm. tilgængelig: 29 jan 1983

(44) Fremlagt: 12 mar 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 28 jul 1981 AT 3337/81

(71) Ansøger: \*Immuno Aktiengesellschaft fuer Chemisch-Medizinische Produkte; Industriestrasse 72; 1220 Wien, AT

(72) Opfinder: Heinz \*Redl; AT, Thomas \*Seelich; AT, Yendra \*Linnau; AT

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af et vævsklæbestof

(56) Fremdragne publikationer

AT pat. nr. 359.652, 359.653

(57) Sammendrag: 3006-82

Dybfrosset eller lyofiliseret vævsklæbestof på basis af humane eller animalske proteiner, der indeholder faktor XIII, fibrinogen og et antibiotikum.

Til opnåelse af en høj belastningsevne af de ved hjælp af vævsklæbestoffet fremstillede klæbninger samtidig med antimikrobiel forsinkelsesvirkning af præparatet andrager forholdet mellem faktor XIII og fibrinogen, udtrykt i enheder faktor XIII pr. g fibrinogen, mindst 500, og et antibiotikum fra gruppen omfattende aminoglycosid, betalactam, polypeptid og tetracyclin er indeholdt deri. Yderligere kan en plasmin-inhibitor eller plasminogen-aktivator-inhibitor være indeholdt i vævsklæbestoffet.

Ved fremstillingen af vævsklæbestoffet indstilles i en fibrinogenholdig blodplasmafraktion, som eventuelt er vasket med en pufferopløsning, et koncentrationsforhold mellem faktor XIII og fibrinogen, udtrykt i enheder faktor XIII/g fibrinogen, på mindst 500 ved tilsætning af faktor XIII. Antibiotiket tilsættes forud for dybfrysning eller lyofilisering af præparatet eller efter dets optøning eller genfortyndning.

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af et vævsklæbestof på basis af humane eller animalske proteiner og med et indhold af faktor XIII, fibrinogen og et antibiotikum valgt blandt aminoglycosid, betalactam, polypeptid og tetracyclin.

5

Fremgangsmåder til fremstilling af et vævsklæbestof med et indhold af fibrinogen og faktor XIII er allerede kendt fra AT-patentskrifterne 359.652 og 359.653, ved hvilke bestemte koncentrationsforhold mellem faktor XIII og fibrinogen og eventuelt albumin indstilles, og præparaterne dybfryses eller lyofiliseres. Disse præparater havde i det væsentlige tilfredsstillende egenskaber, nemlig en høj belastnings-  
10 evne af klæbningerne og en god resorberbarhed. Det er dog ønskeligt at forbedre disse præparater med hensyn til en  
15 antimikrobiel virkning.

Det blev ganske vist allerede i US patentskrift nr. 2.533.004 og af Fellingner og andre i tidsskriftet "Der Tuberkulosearzt" (6/11, 1952) foreslået, at sætte antibiotika til fibrinogenopløsninger og anvende disse som sårklæbestof, men disse opløsninger, der først fremstilles ved sygesengen, resulterer ikke i tilstrækkelig holdbarhed og belastnings-  
20 evne af det deraf dannede fibrinkoagulat.

25 Det er endvidere kendt fra et arbejde af Bösch et al, Archiv für Orthopädische und Unfall-Chirurgie, bind 90 (1977), side 63 til 75, i forbindelse med knogletransplantater at anvende et fibrinklæbesystem til udfyldelse af knogledefekter, hvorved fibrinet dannes direkte på det  
30 valgte sted i knoglehulrummet ved tilsætning af thrombin til en fibrinogenopløsning. Efter behov tilsattes også i handelen gående kombinationspræparater af neomycin i pulverform.

35 Endeligt blev det ifølge PCT-ansøgning WO 81/00516 foreslået at fremstille en fibrinogen-antibiotikumgel, hvorved en til fremstilling ved sygesengen bestemt blanding af kryopræcipitat

med tobramycin og gentamycin som antibiotikum kommer til anvendelse.

Ifølge egne forsøg blev det fastslået, at de beskrevne og kendte vævsklæbestoffer, som indeholder fibrinogen, faktor XIII og et antibiotikum, ikke har den ønskede kombination af egenskaber, nemlig en høj belastningsevne af klæbningerne og en antimikrobiel virkning, men at der indtræder en uheldig vekselvirkning mellem antibiotika og faktor XIII, med den virkning, at fibrinogenets tværbindingsevne falder stærkt, og koagulationsevnen påvirkes ugunstigt. Som følge deraf bevirker det en forringet styrke og adhæsionsevne af klæbemidlet til sår- eller vævsfladerne.

En yderligere ulempe ved de kendte præparater består i at afgivelsen af antibiotikum til vævet foregår for hurtigt, således at antibiotikumretardationen ikke er tilstrækkelig til at virke i længere tid og til opnåelse af en høj afgivelse af virksomt stof.

Opfindelsen tager sigte på at undgå disse ulemper og vanskeligheder og tilvejebringe et vævsklæbestof af human eller animalsk oprindelse, som har de ovenfor anførte kombinationsegenskaber og sikrer en bedre virkning af antibiotiket.

Den stillede opgave løses ved hjælp af en fremgangsmåde af den indledningsvis nævnte art, som er ejendommelig ved, at man i en fibrinogenholdig blodplasmafraktion, eventuelt efter vaskning med en pufferopløsning og tilsætning af en plasmin-inhibitor eller plasminogen-aktivator-inhibitor indstiller et koncentrationsforhold mellem faktor XIII og fibrinogen, udtrykt i enheder faktor XIII/g fibrinogen, på mindst 500 ved tilsætning af faktor XIII, hvorpå antibiotiket tilsættes, og præparatet dybfryses eller lyofiliseres, eller efter indstilling af faktor XIII-/fibrinogenindholdet dybfryser eller lyofiliserer præparatet og efter optøning eller genfortynding forener det med en antibiotikumholdig opløsning.

Ifølge en foretrukken udførelsesform, ved hvilken den fibrinogenholdige blodplasmafraktion vaskes med en pufferopløsning, gennemføres vaskeprocessen indtil opnåelse af en faktor XIII-koncentration på 200 enheder faktor XIII/g fibrinogen, hvorefter faktor XIII tilsættes i en mængde på mindst 300 enheder/g fibrinogen i form af et koncentrat eller lyofilisat.

Fordelagtigt er der i et dybfrosset vævsklæbestof indeholdt faktor XIII i en mængde på mindst 40 enheder/ml. I tilfælde af et lyofiliseret vævsklæbestof skal der være indeholdt mindst 33 vægt% fibrinogen, idet faktor XIII er til stede i en mængde på mindst 170 enheder/g lyofilisat.

Som plasmininhibitor eller plasminogen-aktivator-inhibitor kan der hensigtsmæssigt anvendes en valgt blandt aprotinin,  $\alpha_2$ -antiplasmin,  $\alpha_2$ -makroglobulin,  $\alpha_1$ -antitrypsin,  $\epsilon$ -aminocaprønsyre og tranexamsyre.

Vævsklæbestoffet foreligger fordelagtigt som et tokomponentpræparat, hvor faktor XIII, fibrinogen og plasmin-inhibitoren eller plasminogen-aktivator-inhibitoren er indeholdt i den første komponent, medens antibiotiket, thrombin og divalent calcium er indeholdt i den anden komponent.

Fortrinsvis anvendes antibiotiket i form af et tungt opløseligt derivat. En variant af denne udførelsesform kan bestå i, at der foruden det tungt opløselige derivat også anvendes et let opløseligt, eventuelt fordelt i vævsklæbestoffets to komponenter. Denne udførelsesform har den fordel, at det let opløselige derivat hurtigt afgives og sikrer en høj begyndelsesvirkning, hvorimod det tungt opløselige begrunder en langvarig virkning.

Fremgangsmåden til fremstilling af vævsklædestoffet ifølge opfindelsen belyses nærmere i de efterfølgende eksempler.

## Eksempel 1.

Ud fra humant nedfrosset, frisk plasma blev der ved opvarmning til 2°C udvundet kryopræcipitat (100 g), som blev fraskilt ved  
5 centrifugering og vasket to gange i en pufferopløsning indeholdende Na<sub>3</sub>-citrat, NaCl, glycin, glucose, aprotinin og heparin ved en pH-værdi på 6,5, og det fraskilte bundfald blev opløst i en glycinholdig pufferopløsning (255 ml) ved en pH-værdi på 7,9. Det blev fastslået, at der i denne  
10 opløsning fandtes et forhold mellem faktor XIII og fibrinogen på 226 enheder faktor XIII/g fibrinogen. Til indstilling af det ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen ønskede forhold på mere end 500 E/g fibrinogen blev opløsningen tilsat et faktor XIII-præparat i pulverform med 9.000 enheder, hvorved opløsningens koncentrationsforhold nu blev forøget til 823  
15 enheder faktor XIII/g fibrinogen. Denne opløsning blev sterilfiltreret, hvorpå 1,7 g gentamycin tilsattes under sterile betingelser, og blandingen blev fyldt på slutbeholdere (2,5 ml), dybfrosset og lyofiliseret.

20

## Eksempel 2.

Fremstillingen af vævsklæbestofgrundlag ud fra kryopræcipitat blev udført på samme måde som i eksempel 1, med den forskel, at kryopræcipitattbundfaldet efter én enkelt vask blev gjort  
25 flydende ved opvarmning til 37°C og 13.600 enheder af faktor XIII i pulverform blev tilsat. Derved opnåedes et forhold mellem faktor XIII og fibrinogen på 967 faktor XIII-enheder/g fibrinogen.

30

Opløsningen blev som antibiotikum tilsat 5,67 g 7-[(thienyl)-(2)-acetamido]-cephalosporansyre. Den således opnåede suspension blev fyldt på slutbeholdere (1 ml) og dybfrosset. Faktor XIII er i det påfyldte præparat indeholdt  
35 i en mængde på 87 E/ml.

Administrationen af de ifølge eksempel 1 og 2 fremstillede vævsklæbestoffer sker fordelagtigt ved, at den optøede eller rekonstituerede blanding blandes med thrombin og calciumchlorid og påføres på vævet, som skal forbindes. Det er også muligt, at påføre de to komponenter-  
5 ne separat på vævet, der skal forbindes eller udfyldes.

#### Eksempel 3.

10 Fremgangsmåden ifølge eksempel 1 blev gentaget indtil til-  
sætning af antibiotiket. Den vaskede udfældning blev efter  
opløsning i pufferopløsning sterilfiltreret, fyldt på  
slutbeholdere (2,5 ml), dybfrosset og lyofiliseret, hvor-  
ved den første komponent af vævsklæbestoffet fremstillet ved  
15 fremgangsmåden ifølge opfindelsen blev gjort lagringseget.  
Den anden komponent blev forud for administrationen fremstil-  
let ud fra en opløsning af thrombin og calciumchlorid ved til-  
sætning af 7-[(thienyl)-(2)-acetamido]-cephalosporansyre (30  
mg/ml).

20

#### Eksempel 4.

Fremgangsmåden ifølge eksempel 2 blev gentaget, hvorved gentamycin (1,89 g) blev tilsat efter opløsning af kryopræcipitat-  
25 bundfaldet, og opløsningen blev fyldt på slutbeholdere (1 ml)  
og dybfrosset. Dermed foreligger den første komponent af klæ-  
bestoffet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen i  
en lagringseget form. Den anden komponent indeholdende 30 mg  
7-[(thienyl)-(2)-acetamido]-cephalosporansyre pr. ml af en  
30 calciumchlorid-throminopløsning blev fremstillet før admini-  
strationen.

I stedet for det ifølge eksemplerne 1 - 4 tilsatte apro-  
tinin kan der som plasmin-inhibitor eller plasminogen-  
35 aktivator-inhibitor anvendes én eller flere af følgende:  
 $\alpha_2$ -antiplasmin,  $\alpha_2$ -makroglobulin,  $\alpha_1$ -antitrypsin,  $\epsilon$ -amino-  
capronsyre og tranexamsyre.

De ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremstillede vævsklæbestoffer har en generel anvendelighed til sømløs forbindelse af menneskers eller dyrs væv- eller organdele til sårbehandling og blodstandsning samtidig med væsentligt forbedret antimikrobiel virkning.

De forbedrede klæbeegenskaber samtidig med på samme måde forbedret antimikrobiel virkning af vævsklæbestoffet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen fremgår af de følgende i tabel sammenfattede sammelnigningseksempler. Herved blev tværbindingsgraden af vævsklæbestoffet fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen med forhøjet faktor XIII/fibrinogenforhold sammenlignet med tværbindingsgraden af kendte vævsklæbestoffer uden forhøjet faktor XIII/fibrinogenforhold under anvendelse af forskellige antibiotika.  $\alpha$ -tværbindingsgraden er bestemt ifølge natriumlaurylsulfat-(SDS)-polyacrylamid-gel-elektroforesemetoden, som gennemføres således, at man, efter blanding af vævsklæbestoffet med det samme volumen af en opløsning indeholdende 40  $\mu\text{mol}$   $\text{CaCl}_2$  og 15 NIH-enheder (US National Institute of Health-enheder) thrombin pr. ml, inkuberer blandingen ved 37°C.  $\alpha$ -tværbindingsgraden bestemmes ved hjælp af gelelektroforese efter standsning af reaktionen og reduktiv spaltning af de i proteinerne indeholdte disulfidbroer ved tilsætning af en blanding af urinstof, natriumdodecylsulfat og  $\beta$ -mercaptoethanol.

I den yderligere del af tabellen blev clotstyrken i thrombelastograf af et vævsklæbestof fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen sammenholdt med styrken af et kendt, idet gentamycin blev tilsat som antibiotikum.

Endelig indeholder tabellen trækstyrkesammenligningsværdier for et vævsklæbestof fremstillet ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen og et kendt, idet gentamycin anvendes som antibiotikum.

Fibrin- $\alpha$ -tværbinding (ved 37°C efter 60 minutter).

Antibiotikum-tilsætning	Vævsklæbestof ifølge opfindelsen med forhøjet faktor XIII-indhold, >500 E/g fibrinogen.	Vævsklæbestof uden forhøjet faktor XIII-indhold.	
5			
	Gentamycin	70%	30%
	Neomycin	41%	21%
	Fosfomycin	47%	24%
10	Azlocillin	66%	42%
	Doxycyklin	65%	26%
	Cefoxitin	54%	44%

15 Clotstyrke i thrombelastograf  
(37°C-60 min.)  $\epsilon$  = Elasticitetskoefficient.

20	Gentamycin	1.150	426
----	------------	-------	-----

Trækstyrke i  $\text{g/cm}^2$   
(37°C-30 min.)

25	Gentamycin	1.283	999
----	------------	-------	-----

30 Endelig blev endnu et sammenligningseksempel vedrørende antibiotikaafgivelsen fra et ifølge eksempel 4 fremstillet vævsklæbestof gennemført, hvorved der i et in vitro forsøg efter 72 timer allerede var afgivet 85% af gentamycin fra en med dette klæbestof fremstillet clot. Efter 96 timer blev en afgivelse af gentamycin ikke mere konstateret, medens 7-[(thienyl)-(2)-acetamido]-cephalosporansyre stadig var påviselig efter 8 dage.

35



## P a t e n t k r a v .

-----

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et vævsklæbestof på basis af humane eller animalske proteiner og med et indhold af faktor XIII, fibrinogen og et antibiotikum valgt blandt aminoglycosid, betalactam, polypeptid og tetracyclin, k e n d e t e g n e t ved, at man i en fibrinogenholdig blodplasmafraktion, eventuelt efter vaskning med en pufferopløsning og tilsætning en plasmin-inhibitor eller plasminogen-aktivator-inhibitor, indstiller et koncentrationsforhold mellem faktor XIII og fibrinogen, udtrykt i enheder faktor XIII/g fibrinogen, på mindst 500 ved tilsætning af faktor XIII, hvorpå antibiotiket tilsættes, og præparatet dybfryses eller lyofiliseres, eller efter indstilling af faktor XIII-/fibrinogenindholdet dybfryses eller lyofiliserer præparatet og efter optøning eller genfortynding forener det med en antibiotikumholdig opløsning.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, ved hvilken den fibrinogenholdige blodplasmafraktion vaskes med en pufferopløsning, k e n d e t e g n e t ved, at vaskeprocessen gennemføres indtil opnåelse af en faktor XIII-koncentration på 200 enheder faktor XIII/g fibrinogen, hvorpå faktor XIII tilsættes i en mængde på mindst 300 enheder/g fibrinogen i form af et koncentrat eller lyofilisat.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at der anvendes en plasmin-inhibitor eller plasminogen-aktivator-inhibitor valgt blandt aprotinin,  $\alpha_2$ -antiplasmin,  $\alpha_2$ -makroglobulin,  $\alpha_1$ -antitrypsin,  $\epsilon$ -aminocaprønsyre og tranexamsyre.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at vævsklæbestoffet fremstilles som tokomponentpræparat, hvor faktor XIII, fibrinogen og plasmin-inhibitoren eller plasminogen-aktivator-inhibitoren er indeholdt i den første komponent, medens antibiotikum, thrombin og divalent calcium er indeholdt i den anden komponent.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 1, kendt tegnet ved, at antibiotiket anvendes i form af et tungt opløseligt derivat.

5

10

15

20

25

30

35