



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 674**

51 Int. Cl.:
A61K 31/7016 (2006.01)
A61P 41/00 (2006.01)
C07H 3/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06766477 .1**
96 Fecha de presentación : **08.06.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1905443**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.04.2008**

54 Título: **Líquido que comprende trehalosa para su uso en la prevención de la adhesión de tejidos.**

30 Prioridad: **08.06.2005 JP 2005-168744**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
11.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
11.08.2011

73 Titular/es:
OTSUKA PHARMACEUTICAL FACTORY, Inc.
115, Aza Kuguhara Tateiwa, Muya-Cho
Naruto-shi, Tokushima 772-8601, JP
The University of Tokyo y
KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU
KAGAKU KENKYUJO

72 Inventor/es: **Suzuki, Shigeki;**
Miwa, Yoshikatsu;
Sasaki, Nobuo y
Tei, Yuichi

74 Agente: **Miltenyi Null, Peter**

ES 2 363 674 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Líquido que comprende trehalosa para su uso en la prevención de la adhesión de tejidos.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 Esta invención se refiere a la prevención de la adhesión de tejidos, especialmente la prevención de la deshidratación y la oxidación tras la exposición al aire asociada con la cirugía, y a la prevención de complicaciones tales como adhesión de tejidos de órganos en el posoperatorio.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

10 Se conoce bien que cuando los tejidos, incluyendo órganos, están expuestos al aire debido a una incisión en cirugía que estos tejidos pueden deshidratarse y oxidarse conduciendo a su daño. La deshidratación y la oxidación del tejido, incluyendo órganos, durante cirugía conducen a su daño, lo que provoca problemas incluyendo la adhesión de tejidos posoperatoria y el retraso de la cicatrización de heridas.

15 Dado que especialmente la adhesión inhibe a menudo el movimiento normal de tejidos incluyendo órganos, se considera una de las complicaciones graves tras cirugía. Por ejemplo, la adhesión que se produce durante cirugía de tendones puede provocar discinesia. Además, la adhesión de órganos tras cirugía intra-abdominal puede provocar complicaciones tales como íleo, dolor y esterilidad, y a veces puede provocar problemas de manera que la siguiente cirugía se vuelve muy difícil.

20 Los ejemplos de tratamientos actuales para la prevención de la adhesión de tejidos tras cirugía y el retraso de la cicatrización de heridas incluyen un tratamiento en el que se perfunde regularmente solución salina a los órganos expuestos durante la cirugía y el tratamiento en el que tejidos tales como órganos se cubren con gasa empapada en solución salina.

25 Sin embargo, han surgido problemas de manera que en el caso de la perfusión de solución salina, es difícil mantener una cobertura suficiente de los órganos con la capa de fluido de solución salina, impidiendo la exposición de los órganos al medio que puede provocar el estrés oxidativo. En el caso de la cobertura de los órganos con gasa empapada en solución salina, la gasa puede interferir con las operaciones quirúrgicas. Era difícil mantener condiciones en las que toda la superficie del tejido expuesto, incluyendo órganos, se bloquea frente al aire durante cirugía.

30 Por tanto, para solucionar estos problemas, se han propuesto agentes preventivos de la adhesión compuestos por quitina, agentes preventivos de la adhesión compuestos por ácido hialurónico con uniones puente y fármacos para la prevención del retraso de la curación (por ejemplo, remítase a las publicaciones de patente japonesa n^os. 2948254 y 3420851).

35 Sin embargo, los fármacos previos descritos anteriormente carecían de operatividad, tal como la facilidad de uso, debido a que el componente que tiene la función preventiva de la adhesión es una macromolécula y está principalmente en forma de película, que se localiza en la sección deseada o un fluido viscoso que se aplica a la sección deseada. No se conocen entre las sustancias para la prevención de la adhesión o la prevención del retraso de la curación, sustancias solubles en agua que de hecho puedan cubrir fácilmente la sección deseada.

40 La trehalosa (C₁₂H₂₂O₁₁), un sacárido que recientemente se ha usado en diversos campos tales como en alimentos o cosméticos, se sabe que tiene propiedades de hidratación muy altas en comparación con otros sacáridos. Además, dado que la trehalosa tiene una estructura similar a la estructura de agrupación del H₂O, se considera que cuando se administra a superficies celulares persiste en estado vítreo (amorfo) tras la deshidratación, estabilizando las células o proteínas en lugar del H₂O e inhibiendo estas degeneraciones.

45 Se han investigado indicaciones novedosas para la trehalosa de diversas maneras. Por ejemplo, se han propuesto fármacos que contienen trehalosa administrados a una membrana mucosa (tal como la publicación de patente japonesa n.º 6-256219), disoluciones de nutrientes que contienen trehalosa como calorías de sacárido (tales como las publicaciones de patente japonesa n.º 6-72883 y n.º 6-319486), disoluciones para órganos trasplantados que contienen trehalosa (tal como la publicación de patente japonesa n.º 6-40801), agentes de lavado/perfusión intraocular, colirios, pomadas oculares que contiene trehalosa y tienen propiedades de protección corneal (tal como la publicación de patente japonesa n.º 9-235233), agentes de formación de asociación entre la trehalosa y los compuestos insaturados usados para la inhibición de cambios químicos de compuestos insaturados (tal como la publicación de patente japonesa n.º 2002-24832), inhibidores de la degradación de la lipólisis que contienen trehalosa (tal como el documento WO 2004/076602).

50 Se conocen en la técnica disoluciones que comprenden trehalosa en combinación con otros componentes. El documento US-A-6,020,367 da a conocer disoluciones que comprenden trehalosa en combinación con agentes antiinflamatorios, antioxidantes, agentes quelantes y espesantes.

El documento WO 93/15234 da a conocer disoluciones que comprenden trehalosa y agentes quelantes.

El documento WO 00/64254 da a conocer disoluciones que comprenden trehalosa, antioxidantes, expansores del plasma y polisacáridos que tienen propiedades lubricantes.

El documento WO 2004/098285 se refiere a disoluciones que comprenden trehalosa y polisacáridos que pueden actuar como agentes de ajuste de la viscosidad o como polisacáridos que tienen propiedades lubricantes.

5 El documento WO 2005/030248 se refiere a disoluciones que comprenden trehalosa, antioxidantes, agentes quelantes, dextrinas, etc.

El documento WO 00/72872 da a conocer disoluciones que comprenden trehalosa, polipéptidos KGF-2 que actúan como antiinflamatorios y agentes quelantes.

10 El documento EP-A-1 512 404 da a conocer disoluciones que comprenden trehalosa y dextranos, esteroides antiinflamatorios y pectina.

El documento WO 00/07634 da a conocer disoluciones que comprenden trehalosa y compuestos microbicidas (antisépticos) en una disolución espesada y con la osmolaridad ajustada.

15 BASE DE DATOS WPI semana 200349 Thomson Scientific, Londres, GB; documentos AN 2003-517056, XP002554237 y JP 2003 089601 A (MENICON CO LTD) 28 de Marzo del 2003 da a conocer disoluciones que comprenden trehalosa y compuesto desinfectante en una disolución isotónica.

BASE DE DATOS WPI semana 199802 Thomson Scientific, Londres, GB; documentos AN 1998-014641, XP002554238 y JP 09 278610 A (OFUTEKUSU LL) 28 de Octubre de 1997 da a conocer disoluciones que comprenden trehalosa en una disolución antiséptica que comprende agentes quelantes.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

20 El objetivo de la invención es proporcionar un componente para su uso en la prevención de la adhesión de tejidos que es aplicable a cirugía general en la que la condición de cobertura durante la cirugía es estable y conveniente.

25 Dicho objetivo se consigue mediante trehalosa para su uso en la prevención de la adhesión de tejidos, estando la trehalosa en disolución y aplicándose a tejido local. Se descubrió que cuando se pulveriza una disolución en agua de trehalosa sobre la superficie de órganos animales durante cirugía, se previene la adhesión posoperatoria y se prolonga el periodo de supervivencia de las células incluso cuando se deshidrata la superficie tras haberse pulverizado con una disolución en agua de trehalosa.

30 Además, se descubrió sorprendentemente que tras la pulverización con una disolución compuesta por trehalosa y ácido glicosil-L-ascórbico y luego deshidratación, sorprendentemente, se ejercieron sinérgicamente los efectos de ambos compuestos y se mostró un efecto de protección más fuerte en comparación con el uso de trehalosa sola.

35 Por tanto, la invención se basa en el descubrimiento de un efecto novedoso de la trehalosa, y soluciona los problemas descritos anteriormente mediante trehalosa para su uso en la prevención de la adhesión de tejidos, estando la trehalosa en una disolución. La protección del tejido se mejora adicionalmente cuando la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos incluye ácido glicosil-L-ascórbico.

40 La aplicación de la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos previene la deshidratación de tejidos, incluyendo heridas y órganos, expuestos al aire durante cirugía, así como inhibe el estrés oxidativo que conduce a la prevención de la peroxidación lipídica y la degradación lipídica, e, incluso cuando las heridas y los tejidos quedan expuestos al aire durante cirugía, la trehalosa forma un quelato con metales tales como Fe y desactiva el ion metálico que produce radicales libres y, por tanto, inhibe la producción de radicales libres, que conduce a la prevención de la adhesión de tejidos tras cirugía y el retraso de la curación de heridas.

45 Se prefiere que la trehalosa para su uso en la prevención de la adhesión de tejidos esté en una disolución que incluye al menos uno o más antioxidantes, quelatos, antisépticos, hemostáticos, agentes antiinflamatorios, y polisacáridos, mucopolisacáridos, sales de polisacáridos y sales de mucopolisacáridos que tienen propiedades lubricantes.

50 Cuando incluye antioxidantes, la propiedad de protección de tejidos de la trehalosa y la propiedad de eliminación de radicales libres de los antioxidantes se ejercen sinérgicamente para prevenir e inhibir adicionalmente la deshidratación y el estrés oxidativo de los tejidos, incluyendo heridas y órganos, durante cirugía y reducir la producción de radicales libres. Cuando incluye quelatos, se hace posible metabolizar mediante la conjugación de iones Fe divalentes con quelatos, y reducir adicionalmente la producción de radicales libres.

Como resultado, se hace posible prevenir más eficazmente la adhesión de tejidos tras cirugía y el retraso de la curación de heridas.

Quando incluye al menos uno o más antisépticos, hemostáticos y agentes antiinflamatorios, puede usarse como un antiséptico, hemostático y agente antiinflamatorio durante la cirugía o el tratamiento de heridas. Por tanto, no es necesario administrar fármacos tales como antisépticos, hemostáticos y agentes antiinflamatorios por separado.

5 Cuando incluye al menos uno o más polisacáridos, mucopolisacáridos, sales de polisacáridos, sales de mucopolisacáridos que tienen propiedades lubricantes, cuando se aplica para la prevención de la adhesión a tejidos, incluyendo heridas y órganos, durante cirugía, es posible prevenir no sólo la deshidratación debida a la exposición al aire, el estrés oxidativo y la producción de radicales libres, sino también daños mecánicos tales como microlesión durante cirugía.

10 Se conoce bien que a menudo se desarrollan microlesiones de órganos al tocar los órganos con las manos durante cirugía. Debido a la alta biocompatibilidad y a las propiedades lubricantes de la trehalosa en disolución, es posible reducir el daño debido al toque con guantes quirúrgicos o dispositivos quirúrgicos y reducir el daño mecánico de tejidos incluyendo órganos.

Se prefiere que el antioxidante descrito anteriormente sea un derivado del ácido ascórbico.

15 Usando tal composición, la propiedad de protección de tejidos de la trehalosa y la propiedad de eliminación de radicales libres del derivado de ácido ascórbico se ejercen sinérgicamente para prevenir e inhibir adicionalmente la deshidratación y el estrés oxidativo de tejidos, incluyendo heridas y órganos, durante cirugía y reducir la producción de radicales libres.

20 Como resultado, se hace posible prevenir la adhesión de tejidos tras cirugía y el retraso de la curación de heridas.

Además, es conveniente que la trehalosa esté en una disolución, en la que la viscosidad de la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos se ajuste mediante espesantes.

25 Usando tal composición cuando la disolución se administra a la superficie de tejidos, incluyendo heridas y órganos, las membranas que cubren heridas y tejidos se vuelven más gruesas, garantizando que las heridas y los tejidos están cubiertos con un grosor suficiente.

Además, es adecuado que la osmolaridad de la disolución se ajuste mediante al menos una o más disoluciones isotónicas de electrolitos, expansores del plasma, fluidos de reposición extracelular, fluidos de mantenimiento o agua.

30 Usando tal composición, la disolución puede ajustarse isotónicamente y es posible transferir los nutrientes de la composición a los tejidos.

Se prefiere, cuando la trehalosa está en una disolución, que se proporcione como una forma de fluido de perfusión o fluido de pulverización, una disolución para la administración mediante pulverización o vaporización, una preparación de aerosol de tipo espuma, una disolución para inyección de fluidos intravenosos o un fluido intravenoso.

35 Cuando la disolución que comprende trehalosa se proporciona como un fluido de perfusión, es posible inhibir o prevenir deterioros de diversos tejidos incluyendo la adhesión mediante la perfusión durante o tras cirugía con el fluido de la invención.

40 Además, cuando la disolución se proporciona como un fluido de pulverización, es posible cubrir el área deseada dispersando la disolución amplia y uniformemente en el área deseada durante cirugía. El deterioro de los tejidos puede prevenirse debido a un grosor suficiente de la disolución. En comparación con los métodos convencionales en los que se aplican disoluciones viscosas con principios activos de alto peso molecular o se colocan agentes de formación de películas sobre los sitios deseados, la disolución que comprende trehalosa es capaz de prevenir el daño a tejidos y la adhesión de tejidos tras cirugía con un buen grado de certidumbre garantizando que se cubren las áreas deseadas.

45 Además, cuando la trehalosa está en una disolución que se proporciona como una disolución para la administración mediante pulverización o vaporización, la disolución puede pulverizarse en los sitios deseados como una neblina. Es posible dispersar la disolución amplia y uniformemente como una neblina refinada durante cirugía para cubrir el sitio deseado. El deterioro de los tejidos puede prevenirse debido a un grosor suficiente de la disolución. Cuando la trehalosa está en una disolución que se proporciona como una preparación de aerosol de tipo espuma, es posible dispersarla amplia y uniformemente en los sitios deseados durante cirugía para cubrir los sitios deseados. El deterioro de los tejidos puede prevenirse debido a un grosor suficiente de la disolución.

50 Cuando la trehalosa está en una disolución que se proporciona como una disolución para inyección de fluido(s) intravenoso(s), es posible administrar la disolución por medio de la inclusión de la administración

intravenosa durante al menos uno o más procesos mencionados anteriormente, durante y tras cirugía, para estimular una rápida cicatrización de heridas.

Usando trehalosa en una disolución para aplicarse a tejido local, es posible prevenir la adhesión de tejido local o estimular una rápida cicatrización de heridas.

5 La aplicación de la trehalosa en una disolución previene la deshidratación de tejidos, incluyendo heridas y órganos, expuestos al aire durante cirugía e inhibe el estrés oxidativo conduciendo a la prevención de la peroxidación lipídica y la degradación lipídica. Incluso cuando las heridas y los tejidos están expuestos al aire durante cirugía, la trehalosa forma quelatos con metales tales como Fe y desactiva el ion metálico que provocaría la producción de radicales libres y, por tanto, inhibe la producción de radicales libres, conduciendo a la prevención de la adhesión de tejidos tras cirugía y el retraso de la curación de heridas.

10 Además, dado que la disolución que comprende trehalosa contiene además derivados del ácido ascórbico, la propiedad de protección de tejidos de la trehalosa y la propiedad de eliminación de radicales libres del derivado del ácido ascórbico se ejercen sinérgicamente para prevenir e inhibir adicionalmente la deshidratación y el estrés oxidativo de tejidos, incluyendo heridas y órganos, durante cirugía y se reduce la producción de radicales libres. Como resultado, es posible prevenir la adhesión de tejidos tras cirugía y el retraso de la curación de heridas.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[Figura 1]

Es un gráfico que muestra los cambios en la tasa de supervivencia celular debido al secado al aire en el ejemplo 1 de la invención.

20 [Figura 2]

Es un gráfico que muestra los efectos de cada reactivo sobre las células en el ejemplo 1 de la invención.

La trehalosa para su uso en la prevención de la adhesión de tejidos está en una disolución que se administra directamente a tejidos, incluyendo heridas y órganos, durante cirugía. Puede usarse como agente terapéutico que previene el retraso de la curación de heridas.

25 En esta memoria descriptiva, a continuación en el presente documento, "herida" se refiere a lesión, y "tejido" a tejidos corporales tales como piel, órganos, músculos, nervios, cartílago y hueso.

La trehalosa en disolución puede aplicarse a diversos animales, es especialmente adecuada para usarse en especies de mamífero, preferiblemente en humanos.

A continuación en el presente documento, se describe un ejemplo de la invención en detalle.

30 La trehalosa en disolución, según este ejemplo, se administra a una superficie de tejido expuesta durante cirugía. No existe ninguna limitación especial debida al tipo de intervención quirúrgica, puede usarse ampliamente no sólo en laparotomía o toracotomía sino también en procedimientos neuroquirúrgicos, procedimientos ortopédicos relativos a tendón o ligamento, cirugía hepática, en procedimientos ginecológicos, etc.

35 Los tejidos expuestos durante la cirugía incluyen, por ejemplo, excepto las heridas que resultan de incisiones quirúrgicas y los órganos expuestos por incisión, músculos, nervios, cartílago y hueso. También puede aplicarse para médula ósea expuesta por osteotomía ortopédica. Además, se ha notificado que la trehalosa inhibe el desarrollo de trastornos degenerativos nerviosos en ratones, por tanto, puede aplicarse para nervios craneales y nervios periféricos expuestos por procedimientos neuroquirúrgicos.

40 La trehalosa es un disacárido no reductor formado por un enlace α,α -1,1-glicosídico entre dos unidades de α -glucosa.

45 La trehalosa es una sustancia bien conocida, que se aisló, por primera vez, del centeno en 1832. Puede hallarse, por ejemplo, en animales, plantas y microorganismos. Está presente en gran cantidad en levaduras, tales como levadura de panificación y levadura de cerveza, y es un sacárido presente a menudo en alimentos. Además, la trehalosa puede estar relacionada con diversos organismos. Debido a que la trehalosa está presente en insectos, tales como *Macrobiotus* y *Brachionus*, y plantas, tal como *Selaginella tamariscina*, se cree que puede sobrevivir en condiciones rigurosas, tales como en un desierto.

50 En este ejemplo, puede usarse cualquiera de trehalosa cristalina hidratada, trehalosa cristalina anhidra, disolución de hidratos de carbono que contiene trehalosa, alfa,alfa-trehalosa (en el sentido estricto), alfa,beta-trehalosa (neo-trehalosa), beta,beta-trehalosa (iso-trehalosa), sin embargo se prefiere usar trehalosa cristalina hidratada o trehalosa cristalina anhidra compuesta especialmente por alfa,alfa-trehalosa (alfa-D-glucopiranosil-alfa-D-glucopiranosido).

Además, sólo si es la trehalosa descrita anteriormente, pueden usarse cualquiera producida a partir de trehalosa natural, almidón, maltooligosacáridos, glucosas.

Pueden usarse como disolvente para la disolución de trehalosa, fluidos isotónicos de electrolitos, expansores del plasma o fluidos de mantenimiento o agua.

5 Los fluidos isotónicos de electrolitos se refieren a preparaciones de electrolitos que son isotónicas. Los fluidos isotónicos se refieren a fluidos intravenosos que son isotónicos, lo que significa que la osmolaridad es similar con respecto al fluido corporal. Puede usarse como fluido isotónico de electrolitos, por ejemplo, fluido de reposición extracelular.

10 El fluido de reposición extracelular se refiere al fluido isotónico intravenoso de electrolitos usado para la reposición o el ajuste del fluido extracelular en caso de reducción del fluido extracelular debido a problemas tales como hemorragia, diarrea y deshidratación. Los fluidos de reposición extracelulares, por ejemplo, pueden incluir solución salina fisiológica (solución salina al 0,9%), acetato de Ringer y lactato de Ringer.

15 Los expansores del plasma también se refieren a expansores del plasma que se usan como fluidos intravenosos cuando se pierden proteínas tales como la albúmina en el plasma debido a problemas tales como hemorragia. Estos contienen un componente de alto peso molecular tal como dextrano, almidón y albúmina recombinante. Pueden usarse como expansores del plasma, preparación de dextrano 40, preparación de dextrano 70, preparación de hidroxietil-almidón (HES) y preparación de gelatina modificada. El fluido de mantenimiento es un fluido intravenoso usado para la reposición y el mantenimiento de agua/electrolito cuando la ingestión oral es imposible o insuficiente. Pueden usarse como fluido de mantenimiento, fluido de inicio, fluido de mantenimiento y fluido de mantenimiento con glucosa a alta concentración añadida. El agua actúa como disolvente para la disolución de trehalosa.

Puede usarse agua pura o agua destilada. Se prefiere usar agua destilada estéril.

Se prefiere la concentración de trehalosa en la disolución cuando es superior a 10 mM, preferiblemente dentro de 50 a 350 mM.

25 Cuando es inferior a 10 mM, no puede esperarse el efecto de protección celular. Cuando es superior a 350 mM, la disolución se vuelve hipertónica.

Puede añadirse a la trehalosa en disolución al menos uno o más del grupo, que incluyen antisépticos, hemostáticos y agentes antiinflamatorios.

30 Pueden usarse como antisépticos, por ejemplo, antisépticos bien conocidos tales como povidona yodada, peroxomonosulfato de potasio, cloruro de dimetildidecilamonio, como hemostáticos, por ejemplo, hemostáticos bien conocidos tales como trombina, alginato de sodio, como agentes antiinflamatorios, por ejemplo, fármacos antiinflamatorios no esteroideos.

Además, pueden añadirse a la trehalosa en disolución, antioxidantes.

35 Para un antioxidante, puede usarse por ejemplo, vitamina C estable soluble en agua. La vitamina C estable soluble en agua incluye derivados del ácido ascórbico clasificados en los agentes de pro-vitamina C tales como ácido glicosil-L-ascórbico (a continuación en el presente documento denominado AA-2G) y ácido ascórbico-ácido 2-fosfórico (AA-2P).

40 El AA-2G también se refiere al 2-glucósido de ácido ascórbico que está presente en la naturaleza y se degrada *in vivo* por la alfa-glucosidasa para dar ácido L-ascórbico y D-glucosa, desarrollando una actividad fisiológica similar a la del ácido L-ascórbico. AA-2G, incluso a alta concentración, no tiene toxicidad celular y su efecto de fomento de la síntesis del colágeno y su efecto de fomento de la proliferación y la diferenciación celular son significativos, lo que conduce a su uso frecuente no sólo en los campos alimentario y cosmético sino también en el cultivo de tejidos conjuntivos tales como fibroblastos.

45 Como AA-2G, se usa preferiblemente una serie de ácido 2-glucopiranosil-L-ascórbico incluyendo el ácido 2-O-alfa-D-monoglucopiranosil-L-ascórbico compuesto por un enlace glicosídico de ácido L-ascórbico en la posición C-2 y una o más D-glucosas. Además, el AA-2G no se limita al ácido glicosil-L-ascórbico como ácido orgánico y puede ser cualquier sal mineral aceptada fisiológicamente o sal de ácido orgánico tal como la sal de sodio, sal de potasio, sal de calcio, sal de magnesio, sal de amonio que libera el ácido glicosil-L-ascórbico en medio acuoso.

50 La concentración de AA-2G en la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos debe ser preferiblemente superior a 0,01 mM, más preferiblemente dentro de 0,1 a 200 mM. Cuando es inferior a 0,01 mM no se puede esperar el efecto de protección celular.

Como antioxidante, pueden usarse minerales tales como vitamina C, vitamina E, selenio, enzimas antioxidantes *in vivo* tales como SOD (superóxido dismutasa), catalasa, glutatión peroxidasa, antioxidantes derivados de plantas (sustancias similares a SOD) que contienen carotenoides que son pigmentos liposolubles de

plantas tales como alfa-carotina, beta-carotina, gama-carotina, licopeno, xantófila, y polifenoles que están contenidos en la flor, hoja, corteza, tallo tales como flavonoide, catequina, tanino, antocianina, isoflavona, quercetina, ficocianobilina y ficoeritrobilina.

A la trehalosa en disolución, además, pueden añadirse quelatos.

5 Para los quelatos, pueden usarse DMPS (dimercaptopropanolsulfonato), DMSA (dimercaptosuccinato), ALA (ácido alfa-lipoico), EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), ácido L-glutámico-diacético/tetrasodio (GLDA/4Na), gluconato de sodio.

10 Dado que los quelatos pueden metabolizarse conjugando iones Fe divalentes, es posible prevenir la producción de radicales libres producidos por los iones Fe, conduciendo a una prevención adicionalmente más eficaz de la adhesión de tejidos incluyendo órganos tras cirugía y el retraso de la curación de heridas.

Además, a la trehalosa en disolución, puede añadirse al menos uno de los polisacáridos, mucopolisacáridos y las sales de los mismos que tienen propiedades lubricantes.

15 Para los polisacáridos y las sales de los mismos pueden usarse, por ejemplo, polisacáridos que contienen grupo carboxilo o las sales solubles en agua de los mismos o polisacáridos que contienen grupo carboxilo unido por puente mediante enlaces iónicos o las sales solubles en agua de los mismos. Para los polisacáridos que contienen grupo carboxilo pueden usarse carboximetilcelulosa, carboximetilquitina, carboximetilquitosano, carboximetilalmidón, ácido algínico, pectina, carboximetildextrano, etc.

Los mucopolisacáridos incluyen, a excepción del ácido hialurónico (HA), heparina, sulfato de heparina y sulfato de condroitina.

20 Para las sales solubles en agua, pueden usarse sales de sodio, sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos.

25 Además, se prefiere usar ácido hialurónico entre los polisacáridos, mucopolisacáridos y las sales de los mismos. Especialmente, se conocen los mucopolisacáridos tales como el ácido hialurónico por su habilidad de gelificar agua de cientos a miles de veces su cantidad y por garantizar la capacidad de retención de agua, viscosidad y lubricidad con respecto al fluido corporal. Si se añade a la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos, cuando se cubre la superficie de tejidos, tales como heridas y órganos, con la disolución porque se garantiza la lubricidad de la capa de cobertura teniendo un efecto preventivo referente a daños mecánicos de heridas y tejidos.

La disolución se ajusta hasta una osmolaridad de desde 200 hasta 450 Osm y a un pH de desde 7 hasta 8 tras el mezclado de las sustancias descritas anteriormente.

30 La razón de por qué se ajusta la osmolaridad desde 200 hasta 450 Osm es para adaptarse a la osmolaridad del cuerpo humano. Además, la razón de por qué el pH es de desde 7 hasta 8 es para prevenir la acidólisis de las células tisulares de las heridas o los órganos a los que se ha administrado la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos.

35 Para ajustar la osmolaridad, se usan agentes de ajuste de la presión osmótica coloidales tales como hidroxietilalmidón y dextrano-almidón. La osmolaridad se ajusta hasta valores bajos considerando la condensación debida a la deshidratación durante la cirugía.

40 La disolución se ajusta a una temperatura durante el uso que es próxima a la temperatura corporal, es decir, de desde 35 hasta 38°C. Mediante este procedimiento, cuando se administra la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos durante cirugía, los sitios deseados de los tejidos tales como heridas y órganos no se enfriarían y es posible prevenir el enfriamiento durante la cirugía que provoca dolor posoperatorio.

La disolución puede administrarse en cualquier momento antes del progreso de la cicatrización de heridas, aunque es preferible administrarla durante la cirugía o inmediatamente antes de la sutura de las heridas. También puede administrarse continuamente durante la cirugía.

45 Además, la disolución se administra directamente a superficies de los tejidos, incluyendo heridas y órganos, expuestas al aire por incisión durante la cirugía. Como método de administración, tras impregnarse la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos con excipientes tales como gasa o material textil no tejido, estos pueden cubrir la superficie de tejido, incluyendo heridas y órganos. Sin embargo, se prefiere verter la disolución directamente en la superficie de tejido, incluyendo heridas y órganos, o tras la composición de la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos como una disolución de pulverización, se pulveriza con dispositivos de pulverización.

50 Mediante la composición de la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos como disolución de pulverización que puede pulverizarse en el sitio deseado, puede pulverizarse la disolución amplia y uniformemente en los sitios deseados y los sitios deseados en los que se prevendrá el deterioro pueden cubrirse con un grosor suficiente de la disolución.

Como dispositivos de pulverización, pueden usarse tanto pulverizadores con boquillas de dos fluidos en los que se portan las gotas de disolución con aire o dióxido de carbono como pulverizadores con boquilla de un fluido en los que se dispersa la disolución en partículas minúsculas por presión. La boquilla de un fluido no usa gas para proporcionar las gotas. Por tanto, el uso de la boquilla de un fluido previene la deshidratación o la oxidación de los tejidos, incluyendo heridas y órganos, o la disminución de la temperatura por el calor de evaporización. Por tanto, es el dispositivo preferido de pulverización para la prevención de daños de heridas y tejidos.

La boquilla de un fluido incluye una boquilla de cono hueco y una boquilla de cono lleno en la que la disolución se pulveriza en forma de cono mediante flujo rotacional, una boquilla cuyo ángulo del cono de pulverización puede cambiarse, una boquilla plana en la que se pulverizan las gotas en forma de plano, una boquilla sólida en la que las gotas siguen hacia delante, un pulverizador de partículas en el que las gotas se convierten en partículas minúsculas que son todas aplicables.

Por otro lado, cuando la cantidad de polisacáridos, mucopolisacáridos y las sales de los mismos se aumenta para mejorar el efecto preventivo de los daños mecánicos de los tejidos, incluyendo heridas y órganos, durante cirugía, se recomienda usar un pulverizador con boquillas de dos fluidos debido a que la viscosidad de la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos es superior. Cuando la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos se vierte directamente en la superficie del tejido incluyendo heridas y órganos, se necesita una cierta viscosidad, por tanto, la viscosidad se debe ajustar usando espesantes tales como gomas, que incluyen: mucopolisacáridos o heteropolisacáridos, composiciones orgánicas de alto peso molecular sintetizadas que incluyen poli(alcohol vinílico) o poli(ácido acrílico), derivados de celulosa y derivados de almidón.

Además, se prefiere que la disolución que se aplica al tejido local esté compuesta como una disolución para la administración mediante pulverización o vaporización, y que esta disolución para la administración mediante pulverización o vaporización se administre mediante la pulverización de la neblina atomizada con dispositivos tales como un nebulizador y un vaporizador. Mediante la composición de la disolución como una disolución para la administración mediante pulverización o vaporización para pulverizarla en los sitios deseados en estado de neblina atomizada, la disolución que actúa como la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos puede pulverizarse amplia y uniformemente en los sitios deseados y el sitio deseado en el que se prevendrá el deterioro puede cubrirse con un grosor suficiente de la disolución.

Para un nebulizador y vaporizador, puede usarse cualquiera que sea ultrasónico en el que se atomiza la disolución mediante agitación con un oscilador ultrasónico, los de goteo en los que se portan las gotas con gas o uno de inyección por chorro en el que se dispersa la disolución en partículas minúsculas con presión.

Por ejemplo, puede usarse un dispositivo dotado de un calentador, un oscilador ultrasónico, un ventilador de chorro de aire, un orificio de pulverización en el que se calienta la disolución para la administración mediante pulverización o vaporización con un calentador hasta una temperatura dada y se atomiza mediante agitación con un oscilador ultrasónico, y la neblina obtenida mediante la atomización se pulveriza desde un orificio de pulverización con un ventilador de chorro de aire. También es posible usar un vaporizador de dos fases con la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos compuesta por 2 disoluciones, que son, agua y una disolución concentrada de una disolución para la prevención de la adhesión de tejidos, equipado con un tanque de agua con un calentador y un tanque de disolución concentrada con un oscilador ultrasónico. Cuando se usa el vaporizador de dos fases, el vapor producido calentando con un calentador y la neblina de la disolución concentrada atomizada con el oscilador ultrasónico se mezclan en la trayectoria, y la neblina de la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos producida se pulveriza desde el orificio de pulverización.

Además, mediante la composición de la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos como una preparación en aerosol de tipo espuma, y esta preparación de tipo espuma puede administrarse usando un calentador, un dispositivo de presión, un dispositivo de aerosol dotado de boquilla. La preparación en aerosol de tipo espuma comprende tensioactivos conocidos tal como se ha descrito ya.

Además, en la cirugía endoscópica, que se ha usado ampliamente en los últimos años, también se han producido los problemas de complicaciones debidas a la deshidratación y la oxidación de tejidos incluyendo órganos durante cirugía. Aplicando la trehalosa para su uso en la prevención de adhesión de tejidos, estando la trehalosa en una disolución, es posible prevenir las complicaciones tras cirugía endoscópica. Usando un dispositivo de pulverización con boquilla de un fluido fijada a la parte superior de un tubo de extensión, la disolución pulverizada compuesta por la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos puede pulverizarse a los tejidos, incluyendo órganos, implicados en la cirugía durante o tras cirugía endoscópica. Además, se prefiere que el tubo de extensión de la boquilla de un fluido y el cable del dispositivo endoscópico estén fijados entre sí, la operación del dispositivo de pulverización se facilita debido a que se unifican los materiales insertados en el organismo durante los procedimientos endoscópicos.

Además, la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos puede componerse como un fluido de perfusión, un fluido intravenoso, o una disolución para inyección de fluidos intravenosos.

El fluido de perfusión está en disolución acuosa compuesta por trehalosa disuelta y AA-2G en fluidos intravenosos bien conocidos tales como solución salina y disolución de Ringer, y se proporciona envasado en bolsas de fluidos intravenosos. El fluido de perfusión se usa sustituyendo y perfundiendo los campos de operación durante o tras cirugía.

5 Las preparaciones de fluidos intravenosos se preparan disolviendo trehalosa con agentes de tonicidad bien conocidos tales como cloruro de sodio, glicerina y fluidos tampón bien conocidos tales como fosfato y acetato en disolventes bien conocidos tales como solución salina y disolución de Ringer, y se proporciona envasado en bolsas de fluidos intravenosos. Las preparaciones de fluidos intravenosos se usan en al menos uno o más procesos antes, durante y tras cirugía usando medios tales como un goteo intravenoso.

10 Las disoluciones para inyección de fluidos intravenosos se preparan disolviendo trehalosa y AA-2G con agentes de tonicidad bien conocidos tales como cloruro de sodio, glicerina y fluidos tampón bien conocidos tales como fosfato y acetato en disolventes bien conocidos tales como solución salina y disolución de Ringer.

15 La disolución para inyección se usa como una disolución mezclada con fluidos intravenosos bien conocidos tales como inyección de glucosa, inyección de xilitol, inyección de dextrano 40, inyección de aminoácidos y disolución de Ringer.

Estas disoluciones para inyección se usan en al menos uno o más procesos antes, durante y tras cirugía usando medios tales como un goteo intravenoso para inyectar el fluido intravenoso.

20 Se ha descubierto que durante la cirugía, cuando tejidos tales como órganos y heridas se exponen al oxígeno del aire, se produce deshidratación, estrés oxidativo y radicales libres que conducen a los deterioros oxidativos tales como deterioro de fosfolípidos de la membrana, deterioro de proteínas y daños al ADN.

25 Administrando la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos directamente sobre los tejidos, incluyendo órganos y heridas, durante cirugía, la trehalosa previene la deshidratación de tejidos y heridas y también previene deterioros oxidativos debidos a estrés oxidativo durante la cirugía. Además, la trehalosa forma quelatos con metales tales como Fe, desactiva los iones metálicos que producen radicales libres, e inhibe la producción de radicales libres. Previniendo la deshidratación, los deterioros oxidativos debidos a estrés oxidativo y la producción de radicales libres, es posible prevenir la adhesión y el retraso de la curación provocado por los deterioros oxidativos tras la cirugía. Además, dado que la disolución para la prevención de la adhesión de tejidos contiene AA-2G, que es un antioxidante añadiendo radicales, proporciona un efecto sinérgico de forma que las heridas y los tejidos expuestos puedan protegerse más eficazmente mediante la combinación de trehalosa y AA-2G, que tienen diferentes mecanismos de acción.

[Ejemplo]

A continuación en el presente documento, se describe en detalle un ejemplo específico de la invención.

(Ejemplo 1)

Se usaron como células, células HepG2 (líneas celulares derivadas de hepatoma humano).

35 Para todos los reactivos distintos a las células HepG2, AA-2G, trehalosa, medios DMEM, FCS, rojo neutro, se usaron productos químicos de calidad como reactivo. Además, como disolución de muestra en la que se activaron las células HepG2, se prepararon 4 tipos de disolución; disolución de PBS (+), disolución de AA-2G 2,5 mM, disolución de trehalosa 132 mM, disoluciones mixtas de AA-2G 2,5 mM + trehalosa 132 mM.

40 Se disolvió un reactivo de 2-glucósido de ácido ascórbico (AA2G; Hayashihara Biochemical Labs., Inc.) en agua destilada para obtener una disolución de AA-2G 2,5 mM; y se disolvió una trehalosa cristalina hidratada altamente purificada en polvo (Reactivo de trehalosa; Hayashihara Biochemical Labs., Inc) en agua destilada para obtener una disolución de trehalosa 132 mM. Se disolvieron los reactivos 2-glucósido de ácido ascórbico y la trehalosa cristalina hidratada altamente purificada en polvo en agua destilada para obtener una disolución mixta de AA-2G 2,5 mM + trehalosa 132 mM. Luego se ajustaron el pH y la osmolaridad de estos 4 tipos de disoluciones de muestra. Se realizó el ajuste de la osmolaridad de la disolución de AA-2G 2,5 mM, disolución de trehalosa 132 mM, disolución mixta de AA-2G 2,5 mM + trehalosa 132 mM ajustando con cloruro de sodio de PBS (+) que fuesen isotónicas.

50 El pH y la osmolaridad de cada muestra tras el ajuste fueron como siguen; pH 7,2 y 279 Osm para la disolución de PBS (+), pH 6,8 y 265 Osm para la disolución de AA-2G 2,5 mM, pH 7,2 y 283 Osm para la disolución de trehalosa 132 mM y pH 7,0 y 282 Osm para la disolución mixta de AA-2G 2,5 mM+ trehalosa 132 mM.

Luego, se sembraron las células HepG2 con 4×10^4 células/pocillo cada uno en cuatro placas de 12 pocillos, y se incubó en medios DMEM (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd) que contenían FCS al 10% (Gibco) durante 4 días. Luego se reemplazaron los medios DMEM que contenían FCS al 10% por los 4 tipos de disoluciones de

muestra; disolución PBS (+), disolución de AA-2G 2,5 mM, disolución de trehalosa 132 mM, disolución mixta de AA-2G 2,5 mM + trehalosa 132 mM y se activaron a 37°C durante 1 hora.

5 Se prepararon dos placas de control y dos placas de prueba para células activadas con los 4 tipos de disoluciones de muestra, respectivamente. Para cada dos placas de prueba, se secó al aire una placa durante 5 minutos y se secó al aire otra placa durante 3 minutos. No se secaron al aire las dos placas de control.

10 Luego, se reemplazaron las células de cada placa con medios DMEM sin suero y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Tras reemplazarlos por rojo neutro al 0,02% (Wako Pure Chemical Industries, Ltd, denominado a continuación en el presente documento NR), se activaron a 37°C durante 40 minutos. Tras la retirada de la disolución de NR y la adición de PBS(+), se dejaron reposar a 37°C durante 40 minutos, se retiró el PBS (+) y se secaron al aire durante 5 minutos. Se añadieron extractos de NR y se dejaron reposar a 37°C durante 10 minutos, luego se distribuyó cada muestra sobre una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a la longitud de onda de 570 nm.

15 Se consideró que la absorbancia de las placas de control en las que no se realizó el secado al aire tenía una tasa de supervivencia celular del 100%, y se calculó la tasa de supervivencia celular de las placas de prueba en las que se realizó el secado al aire durante 3 minutos. Se muestran los resultados en el gráfico que indican los cambios en la tasa de supervivencia celular por secado al aire en la figura 1.

20 Las tasas de supervivencia celular en las que se realizó el secado al aire durante 3 minutos fueron del 60,4%, 61,8%, 70,7% y 72,3% para la disolución de PBS(+), disolución de AA-2G 2,5 mM, disolución de trehalosa 132 mM, disolución mixta de AA-2G 2,5 mM + trehalosa 132 mM, respectivamente.

La tasa de supervivencia celular de la placa de prueba en la que se realizó el secado al aire durante 5 minutos para la disolución de PBS (+) fue del 54,9%.

25 Tal como se mencionó anteriormente, se calculó el efecto de protección celular para cada disolución de muestra considerando la tasa de supervivencia celular de la placa de control como del 100%, no se observó el efecto de protección celular para la disolución de AA-2G 2,5 mM, y se observó el efecto de protección celular para la disolución de trehalosa 132 mM y la disolución mixta de AA-2G 2,5 mM + trehalosa 132 mM, cuando las placas se secaron al aire durante 3 minutos.

Por tanto, el efecto de protección celular debido al secado al aire de estos reactivos se considera que es eficaz para una deshidratación ligera de aproximadamente 3 minutos.

30 Se calcularon las tasas de supervivencia celular de las placas de control de cada disolución de muestra en las que no se realizó el secado al aire.

35 Se muestran, en la figura 2, los resultados en el gráfico que indican el efecto de cada reactivo sobre las células. Las tasas de supervivencia celular en placas de control, cuando la tasa de supervivencia celular de la placa de control para PBS (+) se considera que es el 100%, fueron del 101,6%, 97,6% y 89,6% para la disolución de AA-2G 2,5 mM, la disolución de trehalosa 132 mM, la disolución mixta de AA-2G 2,5 mM + trehalosa 132 mM, respectivamente.

40 Además, cuando se consideró que la tasa de supervivencia celular de la placa de control para PBS (+) era del 100%, se calcularon los efectos sobre las células de la disolución de AA-2G 2,5 mM, la disolución de trehalosa 132 mM, la disolución mixta de AA-2G 2,5 mM + de trehalosa 132 mM. Cada tasa de supervivencia celular fue del 101,5%, 97,7% y 89,7%, respectivamente, y se encontró que el ajuste del pH y la osmolaridad aliviaban los efectos sobre las células.

Dado que se sabe que el mecanismo de protección de células frente a la deshidratación y la oxidación es similar al mecanismo de protección de los tejidos corporales frente a la deshidratación y la oxidación, se confirmó, mediante este ejemplo 1, que la disolución en agua que contiene trehalosa y antioxidante como principios activos actúa como una disolución para la prevención de la adhesión de tejidos.

45 (Ejemplo 2)

En este ejemplo, se preparó un modelo de adhesión abdominal usando conejos, desecando la superficie de los intestinos durante cirugía abdominal y se analizó el efecto preventivo de la adhesión del intestino por la trehalosa.

50 Como trehalosa, se disolvieron trehalosa en polvo (Reactivo de trehalosa; Hayashihara Biochemical Labs., Inc) y + NaCl en 250 ml de agua destilada esterilizada como una disolución al 2%, se esterilizó mediante filtración con un filtro (Millex; Millipore Co., Bedford) y se vertió en un recipiente estéril y se almacenó a temperatura ambiente. Como animales de prueba, se usaron cinco conejos New Zealand White hembra que pesaban de 2,85 a 3,2 kg, con 14 semanas de edad (Std: NZW, Japan SLC, Inc., Shizuoka). Se mantuvieron los conejos en un laboratorio de animales (temperatura ambiente de 24+/-1°C, humedad del 30 al 70%) en la Universidad de Tokio, Centro Médico-

veterinario de la Escuela de Posgrado de Ciencias de la Vida y la Agricultura. Se aclimataron los conejos durante 1 semana tras la adquisición, y durante este periodo se realizaron pruebas de sangre (hemograma completo, BUN, Cre, ALT, ALP) y pruebas de rayos X generales para confirmar que no estaba presente ninguna anomalía. Se realizó el experimento de este ejemplo según el Manual de Experimentos con Animales de la Universidad de Tokio.

5 Se realizó el experimento de este ejemplo tal como sigue.

10 Como anestesia, se inyectaron por vía intramuscular 5 mg/kg de ketamina (Ketalal 50; Sankyo Lifetech Co., Ltd., Tokio) y 0,1 mg/kg de medetomidina (Domitol; Meiji Seiyaku Co., Ltd., Tokio) como medicación preoperatoria, y tras la intubación mantenida con isoflurano (Isoflu; Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka). Antes de las operaciones, se administró por vía subcutánea como antibiótico 10 mg/kg de enrofloxacino (Baytril; Bayer Medical Ltd., Tokio) y durante las operaciones se administró por vía intravenosa 10 ml/kg/h de disolución de Ringer-lactato (Fuso; Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd., Osaka). Tras las operaciones, se administró por vía subcutánea como analgésico una dosis única de 20 g/kg de buprenorfina (Lepetan; Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokio). Durante la anestesia se monitorizaron el ECG, ETCO₂ y SpO₂ y se mantuvieron dentro de sus variaciones normales.

15 Se aleatorizaron tres conejos de los cinco conejos al grupo control, y se clasificaron los otros dos conejos dentro del grupo con trehalosa. Para los cinco conejos, tras la desinfección del campo operatorio, se realizó una incisión media abdominal y se expusieron en la medida de lo posible los intestinos y se limpió el suero con la gasa. Para el grupo control (tres conejos) se dejaron que se desecaran y para el grupo con trehalosa (dos conejos) se pulverizó la totalidad de los intestinos con trehalosa varias veces. Durante este periodo, se realizó la ovariosterectomía según un método dado. El periodo de tiempo de la laparotomía fue de 30 a 60 minutos para ambos grupos. Se usó fibra de nailon monofilamento 3-0 (sutura quirúrgica Bear; Bear Medic Corporation, Chiba) para la ovariosterectomía y el cierre de la pared abdominal, y se usó fibra de poligliconato monofilamento (MAXON; Synture Co., Ltd., Connecticut) para los tejidos subcutáneos y se usó una grapadora (Manipler AZ-35W; Mani Inc., Tochigi) para la sutura de la piel.

25 Tras las operaciones, se observaron el estado general y las heridas y se sacrificaron mediante una sobredosis de pentobarbital tras 2 semanas. Se observó macroscópicamente y se registró el estado de adhesión en la cavidad peritoneal así como se extrajeron los tejidos de los sitios de adhesión como un material de prueba histopatológico y se fijaron con formalina.

Se muestran en la tabla 1, los hallazgos clínicos tras 2 semanas y los hallazgos macroscópicos del estado de adhesión tras laparotomía, de cada caso.

30 [Tabla 1]

Hallazgos clínicos tras 2 semanas y hallazgos macroscópicos tras laparotomía.

[Tabla 1]

Hallazgos clínicos tras 2 semanas y hallazgos macroscópicos tras laparotomía			
Nº de conejo	Hallazgos clínicos	Hallazgos tras laparotomía	
Grupo control			
		Sitios de la adhesión en los intestinos	Adhesión del muñón uterino
1.	Sin hallazgos anómalos	3 sitios de adhesión	Presente
2.	Sin hallazgos anómalos	3 sitios de adhesión	Presente
3.	Seroma subcutáneo	No menos de 5 sitios de adhesión	Presente
Grupo con trehalosa			
1.	Dehiscencia parcial de la sutura de la piel	2 sitios de adhesión (se sospecha)	Presente
2.	Sin hallazgos anómalos	Ningún sitio de adhesión significativo	Presente

No se observó ninguna anomalía clínica en ninguno de los casos a las 2 semanas tras la operación. Sin embargo, se observó una retención subcutánea moderada de suero justo por debajo de las heridas quirúrgicas en 1 caso en el grupo control. El resultado de cultivos bacteriales de este suero fue negativo. Además, se retiró una parte del sitio de sutura de la piel y mostró úlcera en 1 caso en el grupo con trehalosa.

5 Para la adhesión, se observó, en todos los casos de ambos grupos, una adhesión significativa con el tejido circundante en la sutura de los muñones uterinos por la ovariectomía. Para la adhesión de los intestinos, se confirmaron, en los 3 conejos del grupo control, adhesiones múltiples (más de 3 sitios) de grado leve a moderado. En el grupo con trehalosa, se sospechó, en 1 conejo, de 2 sitios de adhesión leve, sin embargo, pueden considerarse como uniones normales de los intestinos. En el conejo restante, no se observó macroscópicamente
10 ninguna adhesión significativa.

Este ejemplo muestra que un rociador de trehalosa sería eficaz para la prevención de la adhesión abdominal debida a desecación. La trehalosa tiene altas propiedades hidratantes, y se considera que la trehalosa en estado amorfo previene la adhesión cubriendo membranas de los intestinos y estabilizando las células.

[Ejemplo 3]

15 En este ejemplo, se preparó un modelo de adhesión abdominal usando conejos, desecando la superficie de los intestinos durante cirugía abdominal, y se analizó el efecto preventivo sobre la adhesión intestinal por la trehalosa.

20 Como trehalosa, se disolvió trehalosa en polvo (Reactivo de trehalosa; Hayashihara Biochemical Labs., Inc) en 250 ml de agua destilada esterilizada como una disolución al 7%, se esterilizó mediante filtración con un filtro (Millex; Millipore Co., Bedford) y se vertió en un recipiente estéril y se almacenó a temperatura ambiente.

25 Como animales de prueba, se usaron 20 conejos New Zealand White hembra que pesaban de 2,6 a 3,2 kg, con 14 semanas de edad (Std: NZW, Japan SLC, Inc., Shizuoka). Se mantuvieron los conejos en el laboratorio de animales (temperatura ambiente de 24+/-1°C, humedad del 30 al 70%) Se mantuvieron los conejos en un laboratorio de animales (temperatura ambiente de 24+/-1°C, humedad del 30 al 70%) en la Universidad de Tokio, Centro Médico-veterinario de la Escuela de Posgrado de Ciencias de la Vida y la Agricultura. Se aclimataron los conejos durante 1 semana tras la adquisición, y durante este periodo se realizaron pruebas de sangre (hemograma completo, BUN, Cre, ALT, ALP) y pruebas de Rayos x generales para confirmar que no estaba presente ninguna anomalía. Se realizó el experimento de este ejemplo según el Manual de Experimentos con Animales de la Universidad de Tokio.

30 Se realizó el experimento de este ejemplo tal como sigue.

35 Como anestesia, se inyectaron por vía intramuscular 5 mg/kg de ketamina (Ketalal 50; Sankyo Lifetech Co., Ltd., Tokio) y 0,1 mg/kg de medetomidina (Domitol; Meiji Seiyaku Co., Ltd., Tokio) como medicación preoperatoria, y tras la intubación mantenida con isoflurano (Isoflu; Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka). Antes de la operación, se administró por vía subcutánea como antibiótico 10 mg/kg de enrofloxacin (Baytril; Bayer Medical Ltd., Tokio) y durante la operación se administró por vía intravenosa 10 ml/kg/h de disolución de Ringer-lactato (Fuso; Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd., Osaka). Tras la operación, se administró por vía subcutánea como analgésico una dosis única de 20 g/kg de buprenorfina (Lepetan; Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokio). Durante la anestesia se monitorizaron el ECG, ETCO₂ y SpO₂ y se mantuvieron dentro de sus variaciones normales.

40 Para los 20 conejos, tras la desinfección del campo operatorio, se realizó una incisión media abdominal y se expusieron, en la medida de lo posible, los intestinos y se limpió el suero con la gasa. Se realizó la ovariectomía total según un método dado. Se cortaron cuatros secciones de venas y arterias ováricas tras ligarse con sutura de poligliconato monofilamento 4-0 (MAXON; Syneture Co., Ltd., Connecticut). Además, se suturaron los muñones uterovaginales con sutura de poligliconato monofilamento 5-0 (MAXON; Syneture Co., Ltd., Connecticut), se usó la sutura de poligliconato monofilamento 3-0 (MAXON; Syneture Co., Ltd., Connecticut) para el cierre de la pared abdominal, y se usó la sutura de poligliconato monofilamento 4-0 (MAXON; Syneture Co., Ltd., Connecticut) para los tejidos subcutáneos y una grapadora (Manipler AZ-35W; Mani Inc., Tochigi) para la sutura de la piel.

Se aleatorizaron diez conejos de los veinte conejos al grupo control, y se clasificaron los otros diez conejos en el grupo con trehalosa.

50 Se dejó desecar el grupo control (10 conejos). El periodo de tiempo de la laparotomía fue de 60 minutos. Para el grupo con trehalosa, se pulverizó una disolución de trehalosa sobre la totalidad de la cavidad abdominal cada 15 minutos (0 minutos, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos tras el inicio de la operación). El periodo de tiempo de la laparotomía fue de 60 minutos. Tras las operaciones, se observaron los estados generales y las heridas y se sacrificaron los conejos mediante una administración excesiva de pentobarbital dos semanas tras las operaciones.
55

Se observó macroscópicamente y se registró el estado de adhesión en la cavidad peritoneal así como se retiraron los tejidos de los sitios de adhesión como materiales de prueba histopatológicos y se fijaron con formalina. Se muestran en la tabla 2 los hallazgos clínicos tras 2 semanas y los hallazgos macroscópicos del estado de adhesión tras laparotomía, de cada caso.

5 [Tabla 2]

Los hallazgos clínicos tras 2 semanas y los hallazgos macroscópicos del estado de adhesión tras laparotomía

		El grupo control										El grupo con trehalosa									
Nº de conejos		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	yeyuno-pared abdominal	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	ciego-colon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	epiplón mayor-recto	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	epiplón mayor-estómago	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	epiplón mayor-intestino delgado	-	-	-	-	-	-	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	intestino delgado-recto	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-
	pared abdominal-vejiga	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	pared abdominal-grasa	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	colon-grasa	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Puntuación- total		4	3	0	1	0	0	4	2	0	2	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0

"Sin adhesión: -"

"Adhesiones de grado leve (desprendimiento habilitado): +"

10 "Adhesiones de grado grave (desprendimiento deshabilitado): ***"

No se observó ninguna anomalía clínica en ninguno de los casos 2 semanas tras las operaciones.

15 Para la adhesión se observaron, en todos los casos en el grupo control, adhesiones obvias con los tejidos de órganos circundantes en la sutura de los muñones uterovaginales, que son sitios quirúrgicos de la ovariectomía, y ligados vasculares. Para la adhesión entre órganos abdominales de las superficies intestinales desecadas, se confirmaron adhesiones grado leve y grave en 6 de los 10 casos de control y en 2 de los 10 en los casos con trehalosa. Para las puntuaciones de la adhesión ente órganos, el grupo con trehalosa logró +3, mientras que +16 en el grupo control. La razón de prevención fue del 81% (prueba de suma de rangos de Wilcoxon: a p<0,05).

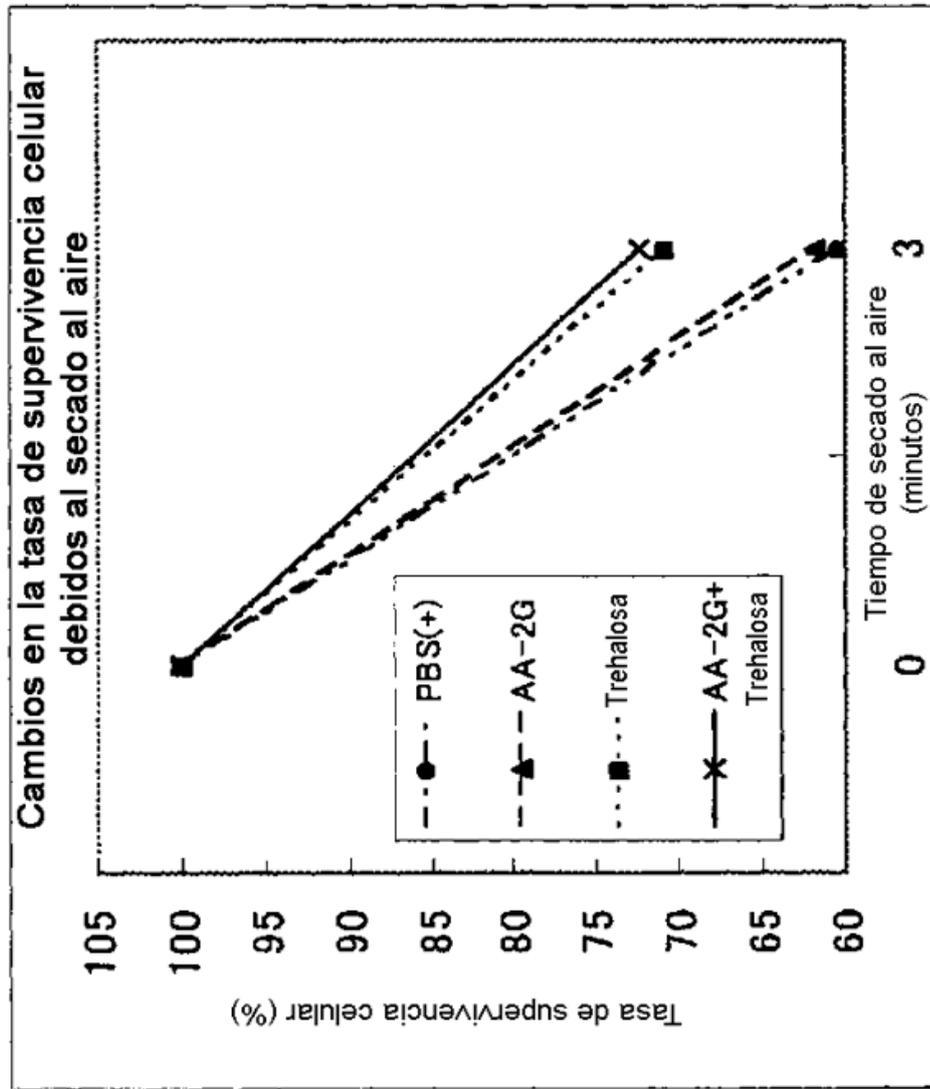
20 Este ejemplo muestra que la trehalosa puede prevenir y reducir obviamente las adhesiones y sería eficaz para la adhesión abdominal debida a desecación.

La trehalosa tiene altas propiedades de hidratación, y se considera que puede prevenir la adhesión cubriendo las membranas serosas de los intestinos y estabilizando las células.

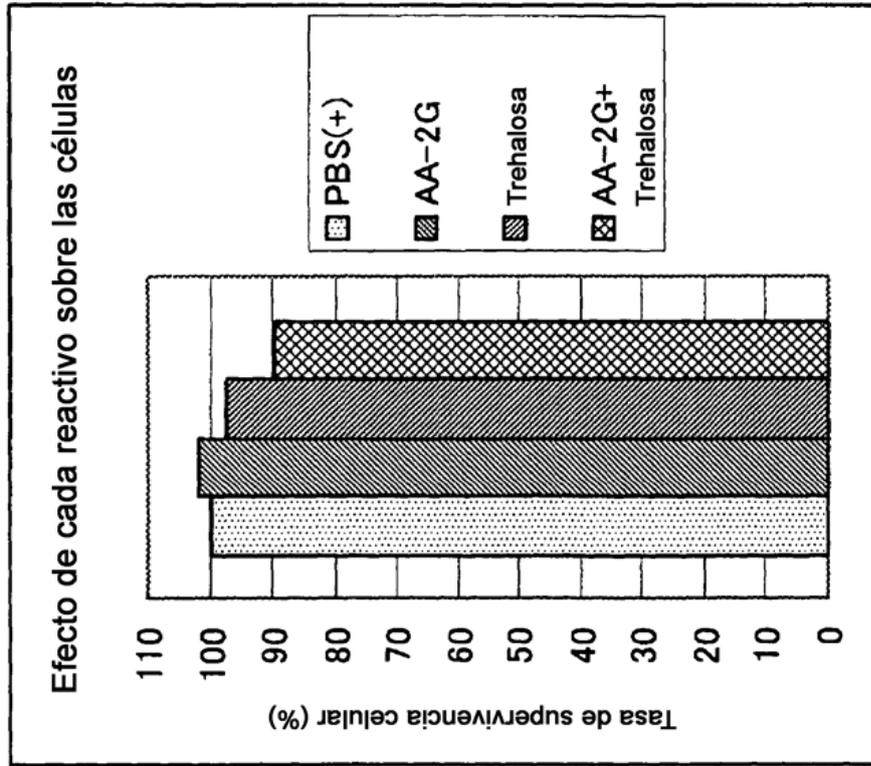
La pulverización de la disolución hizo posible difundir y penetrar en órganos con membranas serosas. Pudo cubrirse la totalidad de los órganos mediante trehalosa.

REIVINDICACIONES

1. Trehalosa para su uso en la prevención de la adhesión de tejidos, estando la trehalosa en disolución y aplicándose a tejido local.
- 5 2. Trehalosa para su uso en la prevención de la adhesión de tejidos según la reivindicación 1, caracterizada porque dicha disolución incluye al menos uno o más antioxidantes opcionalmente seleccionados de derivados de ácido ascórbico, quelatos, antisépticos, hemostáticos, agentes antiinflamatorios, y polisacáridos, mucopolisacáridos y sales de polisacáridos, sales de mucopolisacáridos que tienen propiedades lubricantes.
3. Trehalosa para su uso en la prevención de la adhesión de tejidos según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada porque la viscosidad de dicha disolución se ajusta mediante espesantes.
- 10 4. Trehalosa para su uso en la prevención de la adhesión de tejidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque la osmolaridad de dicha disolución se ajusta mediante al menos uno o más de fluidos de electrolitos isotónicos, expansores del plasma, fluidos de reposición extracelular, fluidos de mantenimiento y agua.
- 15 5. Trehalosa para su uso en la prevención de la adhesión de tejidos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque dicha disolución se proporciona como cualquier forma de fluido de perfusión, fluido de pulverización, disolución para administración mediante pulverización o vaporización, preparación de aerosol de tipo espuma, disolución para inyección de fluidos intravenosos, o fluido intravenoso.



[Fig.1]



[Fig.2]