

58.271/SZE

66427

KIVONAT

Anionos polimerek által okozott sejtinvázió-és  
fibrózis-gátláson alapuló ~~eljárások és~~ készítmények

GLIATECH INC., BEACHWOOD, AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Bejelentés napja: 1992. ~~május~~ 29.

Elsőbbsége: 1991. ~~május~~ 31. (708.660) AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A találmány azon felismeréssel áll kapcsolatban, hogy biokompatibilis anionos polimerek hatékonyan meg tudják gátolni a fibrózist, hegesevést és a műtéti összenövéseket. ~~A találmány azon a felismerésen alapul, hogy az anionos polimerek hatékonyan gátolják a káros~~ <sup>Ezek</sup> ~~gyógyulási folyamatokkal kapcsolatos sejtinváziót, és különösen azon a felismerésen, hogy az~~ <sup>Káros</sup> ~~anionos polimer sejtinváziót gátló hatása összefüggésben van a polimer anionos töltéssűrűségével, így a jelen találmány nagyon sok olyan anyagot szolgáltat, amely alkalmazható a fibrózis és a fibroblasztinvázió gátlására szolgáló módszerekben.~~ <sup>A</sup> A találmány szerint alkalmazható anionos polimerekhez tartoznak ~~(nem kizárólag)~~ természetes proteoglikánok és proteoglikánok glikozaminoglikán-származékai. Alkalmazhatók továbbá anionos szénhidrátok és egyéb anionos polimerek. Az anionos polimerek közül előnyös a dextrán-szulfát és a pentoán-poliszulfát, ~~Egy~~ még előnyösebb



Kereskedelmi pályázat

16365

58.271/SZE

S.B.G. & K.  
Budapesti Nemzetközi  
Szabadalmi Iroda  
H-1061 Budapest, Daiszaúti u. 10.  
Telefon: 153-3733, Fax: 153-3664

36.274

*Handwritten notes in Hungarian:*  
Anionos polimerok alkalmazása  
sejtinvázió gátlására  
szabadalmi eljárások és készítmények

Anionos polimerek által okozott sejtinvázió és  
fibrózis-gátláson alapuló eljárások és készítmények

CH10

GLIATECH INC., BEACHWOOD, AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

Feltalálók: ROUFA Dikla, St. Louis, Missouri

HAREL Adrian, Nes-Ziona, ~~Hebrea~~ <sup>Israel</sup>

FREDERICKSON Robert C., Bentleyville, Ohio

AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A bejelentés napja: 1992. május 29.

05

Elsőbbsége: 1991. május 31. (708.660) AMERIKAI EGYESÜLT ÁLLAMOK

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US92/04474

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/21354

A nemzetközi közzététel dátuma: 1992. december 10.

## ANIONOS POLIMEREK ÁLTAL OKOZOTT SEJTINVÁZIÓ ÉS FIBRÓZIS-GÁTLÁSON ALAPULÓ ELJÁRÁSOK ÉS KÉSZÍTMÉNYEK

### 1. A TALÁLMÁNY TÁRGYKÖRE

A jelen találmány biokompatibilis anionos polimerekből álló készítményekre és ilyen készítményeket fibrózis-gátlásra és a fibrózist kísérő olyan bonyodalmak, mint hegesedés és műtéti összenövések gátlására alkalmazó módszerekre irányul. Olyan készítményeket és módszereket is nyújtunk, amelyek a gliasejt-inváziót, az axonkinövést és a csontnövekedést gátolják.

### 2. A TALÁLMÁNY ELMÉLETI HÁTTERE

A műtéti összenövések - szervek vagy szövetek hegszöveten keresztül történő összekapcsolódása - klinikai problémákat tudnak okozni. A hegszövet keletkezése a műtét vagy egyéb szövet-sérülés természetszerű következménye és szükséges a seb megfelelő gyógyulásához. Azonban néha előfordul, hogy a hegszövet nagyobbra nő, mint az a terület, ahol a hegszövet jelenléte kívánatos, és ez a jelenség műtéti összenövéseket eredményez. Ezek a hegszövet okozta műtéti összenövések korlátozzák az érintett testrészek szabályszerű mozgékonyságát és szerepét. Abban az esetben, ha a jelenség perifériális idegeket is érint, a fibrózis eredetű összenövés normális mozgás közben fellépő fájdalmat is eredményezhet. Továbbá, a hegek és keloid szövetek (megnövekedett hegszövet) gyakran csúnya látványt keltenek és emiatt pszichológiai és lelki problémákat okoznak.

## 2.1. PERIDURÁLIS FIBRÓZIS

A káros hegyszövet-képződés egyik klinikailag fontos példája tapasztalható a peridurális fibrózis során. Ez az állapot ismétlődő hátfájást okoz, ágyéktáji csigolya-megnyitás és diszkektomia után (Cauchoix és szerzőtársai, 1978, Spine 3:256-259; Jackson, 1971, J. Bone Joint Surg. 53B:409-616, Pheasant, 1985, Orthop. Clin. North Am. 6:319-329; Yong-Hing és szerzőtársai, 1980, Spine 5:59-64). A szöveti hegesedés korlátozza az ideggyökér mozgékonytását és összefüggésben van ismétlődő gyökérfájdalommal, gyakran azonos eloszlásban, mint a korábban kitüremkedő korong (Benoist, M. és szerzőtársai, 1980, Spine 5:432-436).

## 2.2 A KÁROS HEGESEDÉS MEGELŐZÉSE

Számos kutató tanulmányozta már a peridurális fibrózis megelőzésére szolgáló különböző kezelések hatékonyságát. Az átültetett zsírszöveteket néhány esetben sikerrel alkalmazták a hegesedés megakadályozására illetve jobbítására (LaRocca és Macnab, 1974, J. Bone Joint Surg. 56B:545-550; Langensköld és Kivilvoto, 1976, Clin. Orthop. 115:82-85; Gill és szerzőtársai, 1985, Spine 10:662-667; Gill és szerzőtársai, 1979, Spine 4:176-185; Yong-Hing és szerzőtársai, 1980, Spine 5:59-64). Gélhab (denaturált kollagén gél) és Silastic membránok néhány esetben hatékonynak mutatkoztak az összenövések megakadályozásában (LaRocca és Macnab, mint fent); ugyanakkor későbbi tanulmányok arról számoltak be, hogy a gélhab hatástalan volt, illetve elősegítette a hegesedést (Gill, 1985, mint fent; Gill, 1979, mint fent; Yong-Hing, mint fent). Songer és szerzőtársai szerint - kutya modellen végzett vizsgálatok alapján - a nátrium-hialuronát, nem pedig a gélhab, vagy az előbbi átültetett zsírszövet-

tek, gátolja a fibrózist és csökkenti a fibroblaszt-inváziót (1990, Spine 15:550-554).

### 2.3. SEJTINVÁZIÓ ÉS KAPCSOLÓDÁS

Korábbi munkájukban Snow és szerzőtársai (1990, Exp. Neurol. 309: 111-130) bemutatták, hogy a keratán-szulfát/kondroitin-szulfát proteoglikán (KS/CS-PG) gátolja az axon-kinövést embrionális (E-9) csirke hátulsó gyökér idegdúcaiból (DRG-k). Az axonok vagy hirtelen leálltak, vagy elfordultak és elmozdultak a KS/CS-PG-csík széle mentén. A jelenség a proteoglikán koncentrációjától való függést mutatott, a közbelső koncentrációk változó áthaladási mintát eredményeztek.

Számos tanulmány tekintette a proteoglikánok szerepét a sejtkapcsolódásban. Megállapították, hogy szét nem választott porc-proteoglikánok és, kisebb mértékben, egy tisztított porc-komponens, a kondroitin-szulfát gátolja in vitro körülmények között a kötőszöveti sejt kapcsolódását kollagénhez és fibronectinhez (Rich és szerzőtársai, 1981, Nature 293:224-226). A dermatán-szulfát proteoglikán (DS-PG) gátolja a 3T3 kötőszöveti sejteknek a kapcsolódását és terjedését plazma fibronectinnel bevont tenyészet-alapon (Lewandowska és szerzőtársai, 1987, J. Cell Biol. 105:1443-1454; Rosenberg, L. C. és szerzőtársai, 1986, CIBA Foundation Symposium 124:47-68). A dextrán-szulfát és nagy molekulatömegű heparin csökkentette kínai hörcsög petefészek-sejtjei és G-8 típusú egér izomsejtjei kollagénhez történő kapcsolódásának kezdeti sebességét (Klebe, R. J. és P. J. Mock, 1982, J. Cell. Physiol. 112:5-9). Porcból izolált olyan proteoglikán, amelyet mentesítettek glikoproteinektől és hialuronsavtól, gátolja különböző sejttypusoknak, például csirkeembrió

kötőszöveti sejtjeinek szövettenyészteti műanyaghoz és kollagénhez történő kapcsolódását (Knox, P. és P. Wells, 1979, J. Cell Sci. 40:77-88). Ugyanakkor olyan glikozaminoglikánok esetében, mint a keratán-szulfát, kondroitin-szulfát és hialuronsav, nem volt tapasztalható a sejtkapcsolódás gátlása (Knox, P. és P. Wells, mint fent).

A glikozaminoglikánokat (GAG-k), alapvetően a heparán-szulfátot és a hialuronsavat közvetítőként azonosították a fibroblaszt (patkány 3T3 sejt) fibronectinhez történő kapcsolódásának folyamatában (Latera és szerzőtársai, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:6662-6666). Megállapították, hogy hialuronsav vagy fibronectin, vagy mindkettő együttes jelenléte egy háromdimenziós, I típusú kollagén szivacsban in vivo körülmények között javítja a seb gyógyulását és in vitro körülmények között segíti a kötőszöveti sejtinváziót, ami kollagén-lerakódást eredményez (Doillon, C. J. és szerzőtársai, 1987, Biomaterials 8:195-200).

Két glia-, két hám- és egy fibroblaszt sejtvonal a kollagénhez képest összemérhető, vagy csökkent kötődést mutatott kollagén-glikozaminoglikánhoz (Reichard-Brown és Akesson, mint fent). A hialuronsav gátolja a 3T3 fibroblasztokaggregációját (Underhill, C. és Dorfmann, A., 1978, Exp. Cell. Res. 117:155-164), és úgy tűnik, hogy a kondroitin-szulfát meggátolja a fehérvérsejteknek a belhámmal történő összetapadását (Fibbi, G. és szerzőtársai, 1983, Biochem. Biophys. Acta 762:512-518).

Azon vizsgálatok, amelyek a fibroblasztok szubsztrátum tapadási helyének összetételére vonatkoznak mutatják, hogy a sejtfelületi proteoglikánok, túlnyomóan a heparán-szulfát proteoglikán, fontos szerepet játszanak a közeli és fokális érint-

kezési összetapadásban (Culp, L. A. és szerzőtársai, 1986, CIBA Foundation Symposium 124:158-83; Izzard, C. S. és szerzőtársai, 1986, Exp. Cell Res. 165:320-336; Lark, M. W. és szerzőtársai, 1985, Fed. Proc. 44:394-403; Rollins, B. J. és L. A. Culp, 1979, Biochem. 18:141-148; Culp, L. A. és szerzőtársai, 1979, J. Supramol. Struct. 11:401-427; Culp, L. A. és szerzőtársai, 1978, J. Cell Biol. 79:788-801; Culp, L. A. és H. Bensusan, 1978, Nature 273:680-682; Cornic, M. és szerzőtársai, 1980, Eur. J. Cell Biol. 22:262). A szubsztráthoz kötött anyagban a fibronektintől és kollagéntől különböző egyéb kiválasztott glikozaminoglikánok sebességkorlátozó szerepet játszanak az egér csontváz izomsejtvonalainak összetapadási folyamatában (Schubert, D. és M. La Corbiere, 1980, J. Biol. Chem. 255:11564-569). Egy, a patkány peteburok tumorsejtjei által kiválasztott proteoglikán megakadályozta a tumorsejtnek fibronektinhez és I-típusú kollagénhez való kötődését, de nem gátolta a IV-típusú kollagénhez való kötődést, amely tizenkétszer kevesebb proteoglikánt kötött meg, mint a I-típusú kollagén (Brennan, M. J. és szerzőtársai, 1983, Cancer Res. 43:4302-4307).

#### 2.4. ADHEZÍV FEHÉRJÉK

A kagylók, osztrigák és a hajók oldalára tapadó kagylók bioadhezív fehérjéi nagy kötőerővel tapadnak hozzá számos vízalatti felülethez. Egyéb DOPA (3,4-dihidroxifenilalanin) tartalmú fehérjék szintén mutatnak adhezív tulajdonságokat. Brown bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy gerinctelenek, például Mytilus és a Fasciola hepatica májmétely petetokjának szerkezeti fehérjéi esetében kinon-átalakulás történik (1950, Nature 165:275). Jensen és Morse karakterizálta a Phragmatopoma californica tengeri

féreg által, védővezetékének felépítésére használt adhezív proteint (1988, J. Comp. Physiol. B 158:317-324). Ugyanúgy, mint a Mytilus, a Phragmatopoma esetében is a DOPA a fő alkotója az adhezív fehérjének; lizin, szerin és hidroxil-tartalmú aminosavak szintén jelen vannak (Jensen és Morsen, 1988, mint fent).

Azonfelül a fibrin-kötőanyagok szintén népszerűek és számos esetben alkalmazták (lásd Strausberg, R. L. és R. P. Link, 1990, Trends Biotech 8:53-57).

### 3. A TALÁLMA NY ÖSSZEFOGLALÁSA

A jelen találmány azon felismeréssel áll kapcsolatban, hogy bizonyos biokompatibilis anionos polimerek hatásosan meg tudják gátolni a hegesedést, különösen a műtéti összenövéseket, továbbá, hogy ezen anionos polimerek általában gátolják a fibrózist. A találmány azon a felismerésen alapul, hogy az anionos polimerek hatásosan gátolják a gyógyulási folyamattal járó káros jelenségekkel, így például a fibrózissal és hegesedéssel kapcsolatos sejtinváziót. Főként a jelen találmány körébe tartozó anionos polimerek, amelyeket gátló anionos polimereknek neveznek, hasznosak a fibroblaszt-invázió gátlásában, így szabályozzák a gyógyulási folyamatot és megakadályozzák a fibrózist. A jelen találmány körébe tartozó anionos polimerek a gliasejtinváziót, a csontnövekedést és az axonkinövést is gátolják. A jelen találmány továbbá azzal a felismeréssel is kapcsolatban áll, hogy az anionos polimernek a sejtinvázió gátlásában, például a fibroblaszt esetében, mutatkozó hatékonysága részben a polimeren található, anionos töltéssel rendelkező csoportok számával is összefüggésben van. Ennek következtében a jelen találmány nagyon sok olyan anyagot szolgáltat, amelyeket a hegesedés és a fibrózis, és

különösképpen a műtéti összenövések gátlására lehet használni, továbbá egy módszert, amely arra szolgál, hogy egy adott anyagról, részben a hatásos anionos töltéstartalma alapján, megállapítsuk, hogy alkalmas-e a találmány szerinti felhasználásra.

A találmány szerint alkalmazható anionos polimerek között van a dextrán-szulfát (DX) és a pentozán-poliszulfát (PS). Továbbá természetes proteoglikánokat, vagy a proteoglikánok glikozaminoglikán származékait, köztük dermatán-szulfátot (DS), kondroitin-szulfátot (CS), keratán-szulfátot (KS), heparán-szulfátot (HS) és heparint (HN) is lehet használni. Alginátot (AL) szintén lehet használni. Az előbb említett molekulák megfelelő koncentrációban meg tudják gátolni a fibroblaszt invázióját vagy migrációját, még megfelelő olyan migrációt elősegítő anyagok jelenléte esetén is, mint a laminin. A jelen találmány különösképpen olyan módszerekre vonatkozik, amelyek DX-t és DX-t tartalmazó molekulákat és készítményeket alkalmaznak a fibroblaszt-invázió és fibrózis gátlása, megakadályozása vagy szabályozása céljából, és amennyiben az előbb említettek kívánatosak, terápiásan. A találmány továbbá olyan módszerekre vonatkozik, amelyek egy vagy több anionos polimert, vagy olyan készítményeket, amelyek egy vagy több anionos polimert tartalmaznak, alkalmaznak fibroblaszt-invázió és fibrózis, vagy monocyta/falósejt-invázió gátlására, és ezek terápiai alkalmazására. Ilyen molekulákhoz tartozik a KS, CS, DS, HS, vagy HN, és ezek - bár nem kizárólag - diszacharid, glikozaminoglikán és proteoglikán szerkezeteket tartalmaznak. Egy kedvező létező megoldás szerint DX-t lehet használni a fibroblaszt gátló készítményekben és a jelen találmány módszereit.

A találmány további olyan gátló anionos polimereket is szolgáltat, amelyek a hegesedés megakadályozására alkalmasak. Egy létező megoldás szerint olyan anionos polimert lehet alkalmazni, amely egy olyan savas szulfátot tartalmaz, amelyben a kéntartalom nagyobb, mint 5 tömegszázalék. Egy még kedvezőbb létező megoldás szerint a kéntartalom nagyobb, mint körülbelül tíz tömegszázalék.

Egy másik létező megoldás szerint, a találmány olyan további módszerekre is vonatkozik, amelyek egy gátló anionos polimert, előnyösen dextrán-szulfátot vagy pentozán-szulfátot egy adhezív fehérjével együtt alkalmaznak a fibroblaszt-invázió és fibrózis, továbbá a gliasejtinvázió, az axonkinövés és a csontnövekedés gátlása céljából. Az adhezív fehérjék a gátló molekulákkal és egy megfelelő célponttal keresztkötéseket képesek létrehozni. Ezért a találmány módszereket szolgáltat egy gátló molekulának azon helyen való rögzítésére, ahol a gátló vagy szabályozó aktivitás jelenléte szükséges.

Egy kedvező létező megoldás szerint az adhezív fehérjét a dihidroxi-fenilalanin (DOPA) egységek kinonná történő kémiai vagy enzimatis oxidációja révén aktiváljuk, és az aktivált fehérjét a kívánt helyen, olyan molekulákkal, mint KS, CS, DS, HS, HN, DX, vagy hialuronsav (HA), együtt alkalmazzuk és engedjük a gyógyító hatás létrejöttét. Az említett adhezív fehérjék magukba foglalják - de nem kizárólag - a kagylókból, osztrigákból, a hajó oldalára tapadó kagylókból, Phragmatopoma californica-ból, vagy Fasciola hepatica-ból származó adhezív fehérjéket, vagy fibrint, vagy bármely rekombinánsan, kémiai szintézissel, vagy egy természetes adhezív fehérjéből lebontással vagy újrapolimerizációval előállított adhezív fehérjét.

Egy további létező megoldás szerint a gátló anionos polimerek valamelyikét együtt lehet alkalmazni egy vagy több másik anionos polimerrel és egy adhezív fehérjével.

A jelen találmány továbbá olyan készítményeket is szolgáltat, amelyek gátló anionos polimerekből és egy alkalmas gyógyszerészeti hordozóanyagból állnak, továbbá módszereket a készítmény orvossággént való beadására a hegesedés és fibrózis gátlásának céljából általában, és a nemkívánt csontnövekedés, gliasejtinvasió és/vagy axonkinövés gátlása céljából.

A jelen találmány olyan készítményeket is szolgáltat, amelyek egy gátló anionos polimer, előnyösen dextrán-szulfát vagy pentozán-poliszulfát hatásos mennyiségéből, egy adhezív protein egy hatásos mennyiségéből és egy gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozóanyagból állnak.

A leírásban az alábbi rövidítéseket és definíciókat használjuk:

AL: alginát  
CS: kondroitin-szulfát  
DS: dermatán-szulfát  
DX: dextrán-szulfát  
GAG: glikozaminoglikán  
HA: hialuronsav  
HN: heparin  
HS: heparán-szulfát  
KS: keratán-szulfát  
LN: laminin  
PG: proteoglikán  
PS: pentozán-poliszulfát

- 11 -

Sejtadhézió: a sejtfelület és a szubsztrátum közötti kezdeti kölcsönhatás, amely összekapcsolódást és azután sejttetherjedést eredményez.

Sejtmigráció: sejtmozgás azonos szubsztrátumon belül.

Sejtinvázió: sejtmozgás egy adott típusú szubsztrátumból egy másik típusú szubsztrátumba.

A leíráshoz a következő ábrák tartoznak:

1. ábra. A sávanalízis-lemez vázlatos ábrája, amely a lamininhez (LN) és a proteoglikán (PG) plusz LN-hez tartozó váltakozó sávokat mutatja, és egy borítást, amely az LN-t ábrázolja a lemez minden részében.

2. ábra. DS-PG 3T3 sejt adhéziójára, migrációjára és inváziójára gyakorolt hatásának dóziszfüggése. Élő 60 mm-es, a 7.1.2. fejezetben leírt (lásd lejjebb) módon bevont szövettenyészeti edényekben növesztett 3T3 sejtek fotomikrográfja, az LN és DS-PG/LN váltakozó sávjaival, különböző DS-PG koncentráció esetén, 3 nap időtartamon át. (A) 0.8 mg/ml DS-PG, (B) 0.4 mg/ml DS-PG, (C) 0.2 mg/ml DS-PG, és (D) 0.1 mg/ml DS-PG. (100X)

3. ábra. DS-PG C6 sejt adhéziójára, migrációjára és inváziójára gyakorolt hatásának időfüggése. Élő, 60 mm-es, a 7.1.2. fejezetben leírt módon (lásd lejjebb) bevont szövettenyészeti edényekben növesztett C6 sejtek fotomikrográfja, az LN és DS-PG/LN váltakozó sávjaival 0.8 mg/ml DS-PG koncentrációt alkalmazva (A) 2 óra (B) 1 nap (C) 2 nap és (D) 6 nap időtartamon át. Figyeljük meg a gátlás 6 napig fennálló stabilitását és a hatodik

napon fennálló korlátozott sejtinváziót. (100X)

4. ábra. A DS-PG hatása az adhézióra és a sejtmigrációra DRG kiültetések esetében. A fotomikrográfok élő DRG explantációkat mutatnak, amelyeket 60 mm-es, a 7.1.2. fejezetben leírt (lásd lejjebb) módon bevont szövettenyészetű edényen növesztettek, az LN és DS-PG/LN váltakozó sávjaival. (A) 0.8 mg/ml DS-PG, (B) 0.4 mg/ml DS-PG. Az explantációk az (A) esetben csak az LN-t tartalmazó csíkhöz kapcsolódtak; DS-PG-t tartalmazó csíkhöz nem tapadt explantáció. Figyeljük meg a sejtmigráció drámai gátlását, amelyet legvalószínűbb, hogy feloldódott DS-PG okoz. 0.4 mg/ml DS-PG jelenléte esetén az explantációk az LN-csíkhöz tapadnak és ezen sejtmigráció történik, de sejtheadhézió, sejtmigráció vagy sejtinvázió a DS-PG/LN sávon nem látható. (100X)

5. ábra. KS/CS-PG C6 sejt inváziójára, migrációjára és inváziójára gyakorolt hatásának időfüggése. Élő, 60 mm-es, a 7.1.2. fejezetben leírt (lásd lejjebb) módon bevont szövettenyészetű edényekben növesztett C6 sejtek fotomikrográfja, az LN és KS/CS-PG/LN váltakozó sávjaival 2.7 mg/ml koncentrációt alkalmazva (A) 2 óra (B) 1 nap (C) 2 nap és (D) 3 nap időtartamon át. Figyeljük meg az adhézió hiányát a KS/CS-PG-vel borított sávban, a lemezre történt felvitel után 2 óráig és a keletkező sáv stabilitását a lemezre történt felvitel után 24 óráig. A KS/CS-PG sáv C6 inváziója 2 nappal a lemezre történt felvitel után történik, és a 3. napon nincs nyilvánvaló bizonyíték kedvezményezett adhéziora. (100X)

6. ábra. Heparin, dextrán-szulfát és dextrán hatása a sejtmigrációra DRG kiültetések esetében. A fotomikrográfok élő DRG explantáció-tenyészeteket mutatnak 24 órával a táptalajban történő tenyésztés után. A táptalaj 10% FCS DMEM/F12-ben, ki-

egészítve 50 ng/ml NGF-fel. A lemezre történt felvitel időpontjában a táptalajhoz hozzáadtuk a teszt-oldatokat. Az ábra az idegsejti és a nem-idegsejti migrációra gyakorolt hatást mutatja. (A) vivőanyag-kontroll, (B) 400 mikrogramm/ml heparin, (C) 200 mikrogramm/ml dextrán-szulfát, (D) 400 mikrogramm/ml dextrán. Figyeljük meg a heparin által okozott sejtmigráció-gátlást és a dextrán-szulfát drámai gátló hatását. (100X)

7. ábra. Szulfatált szénhidrátok hatása fibroblaszt és 3T3 sejt adhéziójára. Patkány agyburki fibroblasztokat (RMF) és 3T3 sejteket tartalmazó elsődleges tenyészeteket vittünk fel PLL által borított, 96 üreget tartalmazó mikrotiter lemezekre, 4 órán keresztül inkubáltuk a teszt-vegyületek jelenlétében és a 7.1.5. fejezetben (lásd lejjebb) ismertetett kolorimetriás sejtadhézió-analízissel feldolgoztuk. Az adatok a mintánkénti 6 ismétlés átlagából kapott eredményeket mutatják (a rendszeres hiba nem haladta meg a  $\pm 5\%$ -ot). A kísérletet kétszer megismételtük és lényegében ugyanazt az eredményt kaptuk.

8. ábra. Dextrán-szulfát 3T3 sejt adhéziójára gyakorolt hatásának dózis-válasz görbéje. A 3T3 sejteket felvittük PLL által borított, 96 üreget tartalmazó mikrotiter lemezekre, 24 órán keresztül inkubáltuk különböző koncentrációjú dextrán-szulfát vagy dextrán jelenlétében és a 7.1.5. fejezetben ismertetett (lásd lejjebb) kolorimetriás sejtadhézió-analízissel feldolgoztuk. Minden pont három ismétlés átlagát képviseli.

9. ábra. Különböző molekulatömegű dextrán-szulfát 3T3 sejt adhéziójára gyakorolt hatásának dózis-válasz görbéje. A 3T3 sejteket felvittük poli-L-lizinnel borított, 96 üreget tartalmazó mikrotiter lemezekre, 24 órán keresztül inkubáltuk különböző

koncentrációjú dextrán-szulfát jelenlétében és a 7.1.5. fejezetben (lásd lejjebb) ismertetett kolorimetriás sejtdhézió-analízissel feldolgoztuk. Minden pont három ismétlés átlagát képviseli.

## 5. A TALÁLMÁNY RÉSZLETES LEÍRÁSA

A jelen találmány azon felismeréssel áll kapcsolatban, hogy bizonyos biokompatibilis anionos polimerek hatásosan meg tudják gátolni a hegesedést, különösen a műtéti összenövéseket, továbbá, hogy ezen anionos polimerek, amelyeket "gátló anionos polimereknek" nevezünk, általában gátolják a fibrózist. A találmány azon a felismerésen alapul, hogy az anionos polimerek hatásosan gátolják a gyógyulási folyamattal járó káros jelenségekkel, így például a fibrózissal és hegesedéssel kapcsolatos sejtinváziót. Főként a jelen találmány körébe tartozó anionos polimerek hasznosak a fibroblaszt-invázió gátlásában, így szabályozzák a gyógyulási folyamatot és megakadályozzák a fibrózist. A jelen találmány körébe tartozó anionos polimerek a gliasejtinváziót, a csontnövekedést, az axonkinövést és a monocyta/falósejt-invázióját is gátolják. A jelen találmány továbbá azzal a felismeréssel is kapcsolatban áll, hogy az anionos polimernek a sejtinvázió gátlásában, például a fibroblaszt esetében, mutatkozó hatékonysága részben a polimeren található, anionos töltéssel rendelkező csoportok számával is összefüggésben van. Ennek következtében a jelen találmány nagyon sok olyan anyagot szolgáltat, amelyeket a hegesedés és a fibrózis, és műtéti összenövések gátlására lehet használni. Egyéb, a jelen találmány szerint alkalmazható anionos polimerek hatásos anionos töltéstartalom vagy töltéssűrűség alapján ismerhetők fel.

A találmány szerint alkalmazható anionos polimerek között van a dextrán-szulfát (DX) és a pentozán-poliszulfát (PS). Továbbá természetes proteoglikánokat, vagy a proteoglikánok glikozaminoglikán származékait, köztük dermatán-szulfátot (DS), kondroitin-szulfátot (CS), keratán-szulfátot (KS), heparán-szulfátot (HS) és heparint (HN) is lehet használni. Alginátot, amely egy anionos szénhidrát, szintén lehet használni. Megfelelő koncentrációban az előbb említett molekulák meg tudják gátolni a fibroblaszt-inváziót vagy migrációt, még megfelelő olyan migrációt elősegítő anyagok jelenléte esetén is, mint a laminin.

További, a jelen találmány szerint alkalmazható anionos polimerek között vannak a cellulóz-származékok. A jelen találmány egy előnyös létező megoldása olyan módszerekre vonatkozik, amelyek DX-t és DX-t tartalmazó molekulákat és készítményeket alkalmaznak a fibroblaszt- invázió és fibrózis gátlása, megakadályozása vagy szabályozása céljából, és amennyiben az előbb említettek kívánatosak, terápiásan. A találmány továbbá olyan módszerekre vonatkozik, amelyek egy vagy több anionos polimert, vagy olyan készítményeket, amelyek egy vagy több anionos polimert tartalmaznak, alkalmaznak fibroblaszt-invázió és fibrózis gátlására, és ezek terápiái alkalmazására. Ilyen molekulákhoz tartozik a KS, CS, DS, HS, vagy HN, és ezek - bár nem kizárólag - diszacharid, glikozaminoglikán és proteoglikán szerkezeteket tartalmaznak.

A jelen találmány továbbá olyan gyógyszerészeti készítményeket is szolgáltat, amelyek gátló anionos polimerekből vagy gátló anionos polimerekből és egy adhezív fehérjéből állnak, továbbá egy alkalmas gyógyszerészeti hordozóanyagból, valamint módszereket a készítmény beadására a hegesedés és fibró-

zis gátlásának céljából általában, és a nemkívánt csontnövekedés, gliasejtinvázió és axonkinövés gátlása céljából.

A jelen találmány szerinti készítmények és módszerek alkalmasak állatok, előnyösen emlősök, még előnyösebben emberek gyógykezelésére. Egy, a találmány szerinti anionos polimert tartalmazó keverék terápiásan hatásos mennyisége alkalmazható egy állati sérülés helyén, bármely olyan módon, amit a továbbiakban ismertettek magukba foglalnak.

#### 5.1. EGYÉB, A TALÁLMÁNY SZERINT ALKALMAZOTT ANIONOS POLIMEREK

A találmány szerint alkalmazható dextrán-szulfáton, pentozán-poliszulfáton, a glikozaminoglikánokon és más anionos polimereken (lásd fent) kívül a jelen találmány további, a találmány szerint alkalmazható anionos polimereket is szolgáltat, azt a felismerést véve alapul, hogy a polimer hatásos anionos jellege részben segít megállapítani a polimer gátlóképességét (lásd 7. fejezet, lejjebb). Egy létező megoldás szerint olyan anionos polimert lehet alkalmazni, amely egy olyan savas szulfátot tartalmaz, amelyben a kéntartalom nagyobb, mint 5 tömegszázalék. Egy még előnyösebb létező megoldás szerint a kéntartalom nagyobb, mint 10 tömegszázalék.

A jelen találmány szerint alkalmazható anionos polimerek bőségesen megtalálhatók a természetben, példaként említjük a proteoglikánokat. Választhatjuk az alternatív megoldást is: polimereket kémiaiilag átalakíthatjuk olyan származékokká, amelyek anionos polimerek. Például a poliglükóz-polimer-dextránt kénsavban forralva és klórszulfonsavval észterezve dextrán-szulfátot lehet előállítani (lásd pl. A Merck Index, Tizedik Kiadás, 1983, 2915, 427). A kémiai módszerekkel előállított anionos polimerek

további példáit szolgáltatják a cellulóz-származékok. A polimer-vázak nincsenek szénhidrát-polimerekre korlátozva. Biokompatibilis anionos polimerek hozzáférhetők kereskedelmi forgalomban is (pl. lásd 7.1.6. fejezet, lejjebb). Választhatjuk az alternatív megoldást is: a jelen találmány szerint alkalmazható anionos polimerek természetes forrásból tisztíthatók, vagy szintetikusán előállíthatók.

## 5.2. KOMBINÁCIÓK A FIBRÓZIS ÉS SEJTINVÁZIÓ MEGAKADÁLYOZÁSÁRA

A találmány a fibroblaszt-invázió, gliasejtinvázió, axonkinövés és macrocyta/falósejt-invázió gátlására alkalmazható készítményeket nyújt. Főként a készítmények hasznosak a fibrózis és hegesedés, pl. műtéti összenövések megakadályozásában. A készítmények a találmány szerinti gátló anionos polimereket tartalmaznak. Abban az esetben, ha a készítményt terápiás módszer vagy kezelés összetevőjeként szándékozzák alkalmazni, olyan gyógyszerészeti készítményként lehet előállítani, amely egy anionos polimer egy terápiásan hatásos mennyiségét és egy gyógyszerészeti szempontból elfogadható kötőanyagot vagy hordozóanyagot tartalmaz, tehát in vivo alkalmazásra megfelelő. Előnyösen az anionos polimer nagyobb, mint 1 mg/ml koncentrációban kell jelen legyen. A találmány szerinti készítményeket a továbbiakban "gátló készítményeknek" fogjuk nevezni, mivel ezek egy sejtinváziót gátló anionos polimert tartalmaznak.

Például egy, a találmány szerinti készítményben az anionos polimer lehet dextrán-szulfát (DX), keratán-szulfát (KS), dermatán-szulfát (DS), kondroitin-szulfát (CS), heparin (HN), heparán-szulfát (HS), alginát (AL), vagy pentozán-poliszulfát (PS). Egy előnyös létező megoldás szerint az anionos polimer

dextrán-szulfát vagy pentozán-poliszulfát. Egy még előnyösebb létező megoldás szerint az anionos polimer dextrán-szulfát, amelyben a kéntartalom nagyobb, mint 10 tömegszázalék. Egy még előnyösebb létező megoldás szerint a dextrán-szulfát átlagos molekulatömege körülbelül 40 000 és 500 000 Dalton között van. Előnyösen a dextrán-szulfát átlagos molekulatömege 40 000 Dalton. A dextrán-szulfát oldatbeli koncentrációja előnyösen körülbeül 2-20 mg/ml kell legyen.

Az előbb említett anionos polimerekkel együtt alkalmazható hordozóanyagok és kötőanyagok az alábbiak lehetnek: vizes oldatok, úgymint víz, sóoldat, fiziológiásan pufferált sóoldat, dextróz-oldat, vagy bármely ismert hordozóanyag. Az anionos polimer és a hordozóanyag keveréke viszkózus folyadékot vagy gélt eredményezhet. A folyadék vagy gél viszkóзитásának növelése úgy érhető el, hogy az anionos polimer keresztkötéseket hozhat létre bármely ismert keresztkötéseket létrehozó anyaggal, feltéve, hogy a keresztkötéseket létrehozott anionos polimer alapjában véve megtartja anionos jellegét, vagyis, hogy a polimer negatív töltésének sűrűsége alapvetően nem változik.

Egy másik előnyös létező megoldás szerint a találmány szerinti biokompatibilis anionos polimert egy szilárd, vagy félig szilárd kötőanyaggal vagy hordozóanyaggal kombináljuk, például kenőccsel, géllal, habbal, vagy szilárd réteggel. A találmány szerinti anionos polimert össze lehet keverni az említett hordozóanyaggal vagy kötőanyaggal egy kolloidális szuszpenzióban vagy keverékben; alternatív megoldás, hogy a készítmény előállításának céljából a hordozóanyagot vagy kötőanyagot átítatjuk az anionos polimerrel. Mint azt a későbbiekben meg fogjuk látni, az anionos

polimer és a hordozóanyag, vagy a kötőanyag közötti kapcsolat lehet kovalens vagy nem-kovalens.

A találmány szerint a következő anionos polimerek bármelyike: DX, DS, KS, CS, HN, HS, hialuronsav (HA), PS, AL, továbbá bármely, alkalmasnak talált anionos polimer, pl. lásd az 5.1. fejezetet, kombinálható az előbb említett hordozóanyagokkal.

Egy előnyös létező megoldás szerint az anionos polimer dextrán-szulfát vagy pentozán-poliszulfát lehet. Egy előnyös létező megoldás szerint a hordozóanyag, vagy a kötőanyag egy, gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozóanyag vagy kötőanyag lehet, vagyis alkalmas in vivo felhasználásra. Az előnyös félig-szilárd hordozók között vannak dextrán gélek, mint a HYS-KON-70 (Pharmacia), INTERCEED (Johnson és Johnson), természetes kollagén gélek és denaturált kollagén gélek, mint a GELFOAM (Upjohn).

Mint az a későbbiekben nyilvánvalóvá fog válni, ezek a készítmények, amelyek egy anionos polimer és egy gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozóanyagot vagy beültetett anyagot tartalmaznak, előnyösen bio-abszorbeálható tulajdonságúak, előnyösen egy hónapon belül. Előnyös anionos polimerek a dextrán-szulfát és a pentozán-poliszulfát, a dextrán-szulfát előnyösebb. Az ilyen bio-abszorbeálható hordozóanyagok közé tartozik a dextrán, a természetes kollagén és denaturált kollagén, mint azt feljebb már leírtuk, a felsorolás nem korlátozó jellegű. Ha egy olyan hordozóanyagot, mint például a kollagén gél, alkalmazunk, a kollagén előnyösen ne tartalmazzon keresztkötéseket azért, hogy in vivo könnyebben tudjon felszívódni.

Egy létező megoldás szerint a GELFOAM-ot be lehet áztatni egy olyan oldatba, amely 2-20 mg/ml dextrán-szulfát

kalcium/magnézium-mentes foszfát pufferált sódata (lásd a 6. fejezetet, lejjebb).

Mint az a későbbiekben nyilvánvalóvá fog válni, az ilyen készítményekben a gyógyszerészeti szempontból elfogadható műtéti polimer beültetett anyag, például dextrán, természetes kollagén vagy denaturált kollagén, a készítmény 5% (w/v)-át teszi ki, előnyösen legalább 10%-át, és, egy másik létező megoldás szerint nagyobb, mint körülbelül 20%. Egy ilyen készítmény az anionos polimert, például dextrán-szulfátot tartalmazza, és, mint azt a példák mutatják (lejjebb), vizes közeget is tartalmazhatnak.

#### 5.2.1. GÁTLÓ MOLEKULÁKBÓL ÉS ADHEZÍV FEHÉRJÉKBŐL ÁLLÓ KÉSZÍTMÉNYEK: GÁTLÓ-ADHEZÍVEK

Egy különleges létező megoldás szerint a gátló anionos polimert egy adhezív fehérje vagy fehérjék megfelelő koncentrációjával vagy mennyiségével kombináljuk, amely készítmény "gátló-adhezívet" eredményez, abból a célból, hogy az 5.3. fejezetben (lásd lejjebb) leírt gyógyászati funkciókat megvalósítsuk. A gátló molekulának egy adhezív fehérjével való együttes alkalmazása meggátolná a gátló molekula diszperzióját, mivel az adhezív protein arra szolgálna, hogy a gátló molekulát egy adott helyhez rögzítse. Egy adhezív fehérje megfelelő koncentrációja vagy mennyisége az a koncentráció illetve mennyiség, amely az adhezív tulajdonságok fellépéséhez szükséges.

Az előbbiekben használt "adhezív fehérje" kifejezés egy olyan fehérjére vagy peptidre utal, amely képes egy vagy több molekulához vagy felülethez nonspecifikusan hozzátapadni. Bármely olyan természetes, mesterséges, vagy rekombináns fehérjét lehet a

találmány szerint alkalmazni, amely a dihidroxi-fenilalanin (DOPA) egy megfelelő mennyiségét és hidroxil-tartalmú aminosav-egységeket tartalmaz, és ennek következtében a későbbiekben ismertettek szerint aktiválható és kezelhető. A bejelentők úgy látják, hogy funkcionális peptidok és teljes fehérjék egyaránt alkalmazhatók a találmány szerint. Egy funkcionális peptid egy olyan peptid, amely egy olyan minimális számú aminosavat tartalmaz, amely már létrehozza a fehérje adhezív tulajdonságait. Példaként elmítjük, de nem korlátozásként, hogy az adhezív fehérje lehet fibrin, vagy kereskedelmi forgalomban hozzáférhető fibrin-alapú termék, mint pl. TUSSUCOL, TISSEEL, vagy HUMAN IMMUNO. Az adhezív fehérje lehet kagylóból származó polifenolos adhéziós fehérje, hajó oldalára tapadó kagylóból származó polifenolos adhéziós fehérje, vagy osztrigából származó polifenolos adhéziós fehérje. Egyes bioadhezív fehérjék hozzáférhetők a kereskedelmi forgalomban, pl. ADHERACELL (Genex Corp., Gaithersburg, MD) és MAP ("kagylóból származó adhezív fehérje", Bio-Polymers Inc., Farmington, CT). Az adhezív fehérje lehet Phragmatopoma californica- vagy Fasciola hepatica (májmértely)-eredetű DOPA-fehérje. Kagylóból, hajóra tapadó kagylóból, vagy osztrigából származó polifenolos adhéziós fehérjéket lehetséges ezen állatok fenolos mirigyéből extrahálni és tisztítani, illetve rekombinánsan is elő lehet állítani (International Patent Publications WO 88/03953, 1988 és WO 88/07076, 1988; Strausberg és szerzőtársai, 1989, "Adhezívek megújítható forrásokból", ACS Symposium Series 385, Hemingway és Conner szerk., 453-464.)

Szándékunk szerint a jelen találmány szerinti gyógy-szerészeti készítményekben alkalmazhatók a kagylóból, hajóra tapadó kagylóból, vagy osztrigából származó polifenolos adhéziós

- 22 -

fehérjéknek az extrahált természetes molekula kémiai vagy proteolitikus hasítása útján, illetve rekombinánsan előállított fragmensei is alkalmazhatók. Egy másik létező megoldás szerint az adhezív fehérjét egy adhezív fehérjepeptidjeinek kémiai polimerizációjával állítjuk elő, pl. a Mytilus edulis proteinjének proteolitikus vagy kémiai digesztálása után a fragmensek glutáraldehides polimerizációja útján (4585585. számú USA-szabadalom).

Egy további létező megoldás szerint az adhezív fehérje lehet a rekombinánsan előállított adhéziós fehérje egy analógja. A rekombinánsan előállított analóg adhéziós fehérje származtatható kagylóból, hajóra tapadó kagylóból, vagy osztrigából származó polifenolos adhéziós fehérjéből, vagy bármely más adhezív fehérjéből. A jelen találmány gyakorlatában adhezív fehérjéként alkalmazhatók adhezív fehérjék konzervatív aminosavszubsztitúciókat tartalmazó fragmensei és analógjai. A rekombinánsan előállított analóg adhéziós fehérje tartalmazhat részleteket egynél több, kagylóból, hajóra tapadó kagylóból, vagy osztrigából, vagy Phragmatopoma californica-ból, Fasciola hepatica-ból származó, vagy bármely más összehasonlítható adhéziós fehérjéből. Ha szükséges, egy adhezív fehérje lehet kémiailag, vagy enzimatikusan hidroxilezett. Például, a tirozin gombából származó tirozinázzal, vagy Streptomyces antibioticus-szal való kezelés tud módosítani egy adhezív prekursor fehérjét. Így a találmány szerinti gyógyszerészeti készítmények tartalmazhatnak egy tisztán konstruált adhezív fehérjét, amely megtestesíti a természetben előforduló adhéziós fehérjék alapjait.

Egy létező megoldás szerint a gátló molekula és az adhezív fehérje nem kovalens módon össze lehet kapcsolódva az adhezív fehérje aktiválását és kezelését megelőzően. Egy másik

létező megoldás szerint a gátló molekula és az adhezív fehérje kovalens módon lehet összekapcsolódva az adhezív fehérje aktiválását és kezelését megelőzően.

A találmány szerinti adhezív proteineket kezelni kell, hogy lehetséges legyen a tapadás a kívánt felülethez. A kezelés során aktiválunk egy gátló-adhezív készítményt, speciálisan az adhezív fehérjét, majd hagyjuk, hogy az aktivált adhezív fehérje a kívánt molekulával reakcióba lépjen. A kezelést enzimatis vagy kémiai folyamatok indítják. Polifenolos adhéziós fehérjék esetében a kezelést DOPA-nak kinonná történő oxidációjával lehet indítani. Az oxidáció történhet úgy, hogy az oxidálandó anyagot levegőnek tesszük ki, vagy egy enzimmel, pl. pirokatechin-oxidázzal, vagy egy, a kereskedelmi forgalomban hozzáférhető, keresztkötéseket létrehozó oxidázzal, pl. COX (Bio-Polymers, Inc.) kezeljük. Az előbbieket példaként és nem korlátozásként említettük; a szakemberek egyéb oxidáló anyagokat és eljárásokat is ismernek. A fibrinkezelés a fibrinogén hasításával indul, pl. trombin segítségével. A fibrin-monomerek spontán polimerizálódnak; további művelet a kovalens keresztkötések kialakulása, amit egy transzamináz katalizál. A kezelési eljárás akkor fejeződik be, amikor az aktivált fehérje kovalens vagy nem-kovalens módon hozzákötődik a közvetlen környezetében lévő molekulákhoz vagy felületekhez.

Így a gátló-adhezív készítményt a sérülés helyén alkalmazhatjuk és ott az kifejtheti gyógyító hatását. A gátló molekulának ezen helyhez, adhezív fehérje segítségével történő rögzítése növelné a gátló molekulák hatását, mivel kiterjesztené a helyi hatásos koncentráció időtartamát, így a hatékonyabbá tenné a fibroblaszt-invázió- és fibrózis-, gliasejtinvázió-,

axonkinövés- és csontnövekedés-gátló eseményt. Előnyös eredményeket várhatnánk abban az esetben, ha a gátló molekulákat és adhezív fehérjét tartalmazó készítményeket a műtéti vágás helyén, a sebhelyeken és az általános sérülés helyén alkalmaznánk.

### 5.3. TERÁPIAI MÓDSZEREK

A jelen találmány szerinti készítmények különböző olyan állapotok kezelésére alkalmazhatók, ahol egy állat olyan kezelésére van szükség, hogy meggátoljuk a fibroblaszt-inváziót és fibrózist, sarjadzást, és főként a hegesedést. Módszereket nyújtunk a fibrózis, sarjadzás és sebhegesedés gátlására, amely módszerek azzal jellemezhetők, hogy egy gátló készítményt vagy gátló-adhezív készítményt alkalmazunk a sebhelyen. A gyógyszerészeti készítményeknek a terápiás kezelés során történő beadására szolgáló módszereket is ajánlunk.

#### 5.3.1. ÁLTALÁNOS JAVALLATOK

A gátló készítményeket, amelyek egy gátló anionos polimert vagy egy gátló-adhezív készítményt tartalmaznak, sérülés, műtét, fertőzés (vírusos vagy bakteriális), anyagcserebetegség, rosszindulatúság, mérgezőanyagoknak való kitevés, és egyéb túlfejlődéses esetek által okozott sejtmigráció vagy sejt-invázió gátjaiként tudjuk alkalmazni. A gátló készítmények egy burkoló eljárás formájában egy előnyös módszert nyújtanak arra, hogy egy szervet, vagy szövetet megvédjünk az előbb említett állapotoktól. Például, a hátulsó gyökér-idegdúc, a látóideg, vagy a látóideg-kereszteződés burkolható a gátló készítménnyel, abból a célból, hogy megvédjük őket a féktelen sejtinváziótól és összetapadástól. A gliasejtinvázió, az axonkinövés, és a csont-

növekedés, ugyanúgy, mint a fibroblasztinvázió szintén gátolható a jelen találmány módszerei segítségével. Egy szervnek vagy szövetnek egy gátló készítménnyel történő bevonása lehet preventív vagy profilaktikus (a betegség megelőzésére irányuló). A gátló-adhezív készítmények egy előnyös burkoló-készítményt szolgáltatnak.

### 5.3.2. MŰTÉT

Egy létező megoldás szerint a jelen találmány szerinti készítményt a műtéti seben alkalmazva gátolható az epidurális (vagy peridurális) fibrózis. Egy létező megoldás szerint valamely, találmány szerinti anionos polimert tartalmazó oldatban áztatott kollagén gél alkalmazható a seben. Egy másik létező megoldás szerint az anionos polimert egy hordozóanyagban vagy kötőanyagban, pl. kenőcsben, gélben, vagy lemezben alkalmazzuk. Egy további létező megoldás szerint az anionos polimert egy olyan hordozóanyagban oldjuk fel vagy szuszpendáljuk, mint pl. a fiziológiásan pufferált sóldat, és öblítőszer vagy permet formájában alkalmazzuk. Egy előnyös létező megoldás szerint egy gyógyszerészeti hordozóanyagot vagy kötőanyagot lehet alkalmazni.

A jelen találmány anyagokat és módszereket nyújt a csigolyamegnyitást követő fibrózis gátlására, főként az ágyéki csigolyamegnyitást követő epidurális (peridurális) fibrózis gátlására (lásd 6. fejezet, lejjebb). Példaként, de nem korlátozásként említjük félig szilárd, gyógyszerészeti szempontból elfogadható hordozóanyag szeleteinek dextrán-szulfáttal, vagy a jelen találmány szerinti egyéb anionos polimerrel történő áztatását. Az áztatott hordozóanyagot el lehet készíteni előre,

vagy a műtét időpontjában. A hordozóanyagot dextrán-szulfát, vagy a találmány szerinti egyéb anionos polimer oldatában lehet áztatni, kalcium- és magnézium-mentes, pufferált foszfát sóoldatban (CMF-PBS), vagy bármely egyéb olyan oldatban, amely in vivo alkalmazásra megfelelő. Miután átítattuk a hordozóanyagot az anionos polimerrel, a szeleteket behelyezzük a csigolyamegnyitás helyére. Az előbb ismertetett módszer alkalmazása esetén, ismételt műtétkor a csigolyamegnyitás helyén minimális hegyszövet-képződés és csontnövekedés látható, a hordozóanyag könnyen eltávolítható, és a kemény agyburok egyenletes átlátszó membránként látható. Nem lesznek jelen a káros fibrózissal járó anatómiai jellegzetességek, vagyis a hegesedés és műtéti összenövések, amelyek veszélyeztetik az ideggyökereket.

A találmány szerinti anionos polimerek, illetve a felhasználásukkal előállított készítmények a nemkívánt csontnövekedés gátlására is használhatók oly módon, hogy az anionos polimer egy terápiásan hatásos mennyiségét azon a helyen alkalmazzuk, ahol a csontnövekedés gátlása kívánatos (lás a 6. fejezetet, lejjebb). Továbbá, az anionos polimerek felhasználhatók egyéb olyan tünetek kezelésére is, ahol a csontnövekedés gátlása kívánatos. Ez különösen gyermekek esetében áll fenn, ahol bizonyos folyamatok, pl. craniostemostosis után a csontnövekedés nem kívánatos.

Egy létező megoldás szerint a jelen találmány egy készítményt és egy módszert nyújt a Fallopp-szövet fibrózisának és hegesedésének gátlására. Főként műtét után a petevezetékben és a petevezeték körül keletkező sebek fibrózisát és hegesedését lehet gátolni. A petevezetékek fertőzés, vagy más okból bekövetkező fibrózisa az esetek 25-30 százalékában terméketlenséget okoz.

A medencei oldalfal-összepatadások szintén szerepet játszanak a terméketlenségben. Mivel a hegyszövet műtét után keletkezik, az összetapadások sebészeti eltávolítása önmagában nem megfelelő kezelés. Így a jelen találmány egy jelentős alkalmazása a terméketlenség kezelése.

A következő példa a találmány számos felhasználása közül javasol egyet a Fallopp-szövet műtét utáni kezelésére. Anionos polimert tartalmazó készítményeket aszerint tudunk tesztelni, milyen a gátlóképességük patkány-méhkürt szabványos sérüléssel roncsolást követő fibrózisának gátlásában. Az állatmodell, pl. nőtény Lewis patkány hasi bőrét és izmát el lehet vágni a has(hártya)űr kinyitása céljából. A vágást a méhkürt falában lehet végezni. A méhnyálkahártya szabványos sérüléssel roncsolást szenved, és ezt követően a félig szilárd, gyógyszerészeti szempontból elfogadható, megfelelő anionos polimerrel, pl. dextrán-szulfáttal áztatott hordozóanyagot be lehet helyezni a roncsolás helyére.

Egy, a Fallopp-szövet műtét utáni kezelésére szolgáló előnyös módszer szerint egy anionos polimert tartalmazó gél, vagy kenőcs is beültethető úgy, hogy a gátló készítményt a test a sérülés gyógyulása után természetes módon felszívja, vagy a seb nedvedzése kimossa. A gátló készítmény beültetése után a hasi izmokat és izomburkot bezárjuk és bevarrjuk. A bőrön végzett vágást szintén bezárjuk.

Egy átlagos szakember az előzőek alapján felismerné, hogy a jelen találmány egy előnyös kezelési módszert nyújt bármely műtéttel kombinálva. Az említett módszereket műtét utáni fibrózis, hegesezés és keloid-képződés gátlására lehet alkalmazni. A találmány szerinti módszerek hasznosak lesznek olyan műtéti

eljárásokban, ahol minimális hegesedés kívánatos, különösen  
plasztikai, vagyis rekonstrukciós vagy kozmetikai sebészetben.  
Egyéb sebészeti javallatok (a felsorolás nem korlátozó jellegű):  
hasi sebészet, ízület-sebészet, ínsebészet, medencei oldalfal-  
összetapadások sebészete, hashártya-sebészet, mellkasi sebészet,  
érsebészet, és szívsebészet, különösen bypass-sebészet, billen-  
tyűcsere-sebészet, keringési-sebészet, vagy egyéb, nyitott szív-  
sebészet.

A jelen találmány továbbá a hipertóniás és keloid-hegek  
kezelésére is alkalmazható. A torzító és mozgékony-ság-korlátozó  
hegek gyakran visszatérnek az eltávolításuk céljából végzett  
műtétek után. A gátló vagy gátló-adhezív készítmények alkalmazása  
korlátozza vagy megakadályozza azt, hogy a hegek eltávolítása  
céljából végzett kezelések után hipertóniás hegek vagy keloidok  
keletkezzenek.

Egy további létező megoldás szerint a találmány szerin-  
ti anionos polimerek alkalmazhatók egy beültetett anyag körüli  
fibrózis gátlására szolgáló módszerben, amely azzal jellemezhető,  
hogy egy, a találmány szerinti anionos polimer egy terápiásan  
hatásos mennyiségét a beültetett anyag helyén alkalmazzuk. Az  
alábbiakban példaként felsorolunk olyan beültetett anyagokat,  
amelyek esetében a hegesedés és fibrózis gátlása kívánatos, a  
felsorolás nem korlátozó jellegű: nephrostomia-vezeték, hashártya  
dréncső, mesterséges csípőizület, mesterséges szívbillentyű,  
perifériális ideghelyreállítás és egyéb protézisek és intravénás  
katéter. A beültetett anyagokat burkolhatjuk vagy átíthatjuk a  
találmány szerinti készítményekkel. A találmány továbbá tökélete-  
sített beültetett anyagokat is nyújt, amelyek esetében a töké-  
letesítés abban áll, hogy a beültetett anyagot egy gátló-adhezív

készítmény egy megfelelő mennyiségével burkoljuk. A beültetett anyagok lehetnek polimer beültetett anyagok. Az említett polimer beültetett anyagoknak különböző összetételük, pórusméretük és geometriájuk lehet, és tartalmazhatnak -nem kizárólagosan- olyan biokompatibilis polimereket, amelyek nitrocellulózból, polianhidridekből és akril-polimerekből készülnek. A beültetett anyagot képező polimer maga is lehet egy anionos polimer.

### 5.3.3. AZ IZÜLETEKBEN LÉTREJÖVŐ FIBRÓZISOS ELVÁLTOZÁSOK KEZELÉSE

A jelen találmány szerinti gátló készítmények különféle, az ízületekben létrejövő fibrózisos elváltozások kezelésére alkalmazhatók. A traumás sebeket gyakran fizikai erőfeszítés okozza és sportolással kapcsolatosak. A traumás sebek következtében, amelyeket pl. esés vagy összeütközés okoz, az ízületekben létrejövő fibrózis a sérült ízületet merevvé és a mozgást fájdalmasná teszi. Ínsérülés után a sérült területen hegszövet képződik. Az alsó állkapocsizület rendellenes működése esetén az állkapocs mozgása korlátozott és fájdalmas lehet.

Az egyik lehetséges módszer az ízületi sérülések kezelésére az ízület műtéti felnyitása vagy az ízület endoszkópiás megközelítése és az összenövések eltávolítása. Ezen eljárásoknak az a hátránya, hogy a gyógyulási folyamat során további fibrózist okoznak. Egy, a találmány szerinti egy gátló anionos polimert tartalmazó készítmény gyógyászati alkalmazása meggátolná az újabb fibrózis és összetapadás keletkezését az ízületben, így növelné a sikeres terápia esélyét.

A találmány hasznos lesz az ortopédiai sebészek számára is, a sportolás vagy baleset következtében szerzett ízületi sérülések kezelésében. A szájsebészek hasznosnak fogják találni

a találmányt az alsó állkapocsizület rendellenes működése néhány formájának kezelésében. A kezelési módszerekben alkalmazható anionos polimereket az 5. és 5.1. fejezetben (lásd fent) ismertettük, a készítményeket pedig az 5.2. és 5.2.1. fejezetben (lásd fent). Egy előnyös létező megoldás szerint olyan dextrán-szulfátot lehet alkalmazni, amelyben a kén tartalom nagyobb, mint 10 tömegszázalék. Egy még előnyösebb megoldás szerint a dextrán-szulfát átlagos molekulatömege körülbelül 40000 és 500000 dalton között van.

#### 5.3.4. A GLIASEJTINVÁZIÓ GÁTLÁSA

A jelen találmány szerinti anionos polimerek, mint pl. a dextrán-szulfát, pentozán-poliszulfát, alginát, továbbá az olyan anionos polimerek, amelyek nagyfokú anionos karakterrel rendelkeznek, pl. a körülbelül 10%-ot meghaladó kén tartalmú szulfatált anionos polimerek, amelyekben a kén savas szulfát formájában van jelen, alkalmazhatók egy olyan, gliasejtinváziót gátló módszerben, amely azzal jellemezhető, hogy az említett anionos polimert azon a helyen alkalmazzuk, ahol a gliasejtinvázió kívánatos. A gliasejtinvázióknak számos oka lehet: sérülés, műtét, fertőzés (vírusos vagy bakteriális), anyagcserebetegség, rosszindulatúság, mérgezőanyagoknak való kitevés, vagy egyéb túlfejlődéses eset. A gliasejt lehet csillagsejt.

Egy létező megoldás szerint a gátló-adhezív készítményeket fel tudjuk használni a gliasejt migrációjának vagy inváziójának gátjaiként. A gátló-adhezív készítmények egy burkoló eljárás formájában egy előnyös módszert nyújtanak egy szervet vagy szövetet megvédjünk az előbb említett állapotoktól. Például a hátulsó gyökér idegdúcai, a látóideg, vagy a

látóideg-kereszteződés burkolhatók a gátló-adhezív

készítménnyel, abból a célból, hogy megvédjük őket a féktelen sejtinváziótól és összetapadástól. A fibroblaszt-inváziót ugyanúgy, mint a gliasejtinváziót szintén gátolná ez a módszer. Egy szervnek vagy szövetnek egy gátló-adhezív készítménnyel történő bevonása lehet preventív vagy profilaktikus (a betegség megelőzésére irányuló), vagy lehet egy olyan beteg kezelése, akinek esetében a rendellenesség már nyilvánvaló.

#### 5.3.5. AZ IDEGSEJTINVÁZIÓ GÁTLÁSA

Az axonkinövés gátlására alkalmazni tudjuk a sejtinváziót gátló azon módszereket, amelyek során olyan anionos polimereket, amelyek nagyfokú anionos karakterrel rendelkeznek, pl. a körülbelül 10%-ot meghaladó kéntartalmú szulfatált anionos polimereket, illetve az ezeket tartalmazó készítményeket alkalmazzuk. Egy sajátos létező megoldás szerint egy gátló-adhezív készítményt lehet alkalmazni. Az anionos polimert azon a helyen lehet alkalmazni, ahol az axonkinövés vagy gliasejtinvázió gátlása kívánatos. Egy létező megoldás szerint a gátló készítmény alkalmazható a gliadaganatos, vagy idegszöveti daganatos, vagyis rosszindulatú daganatos (pl. neuroblastoma) betegek kezelésére.

Egy másik létező megoldás szerint egy gátló készítményt az idegdaganat (irányítatlan axonnövekedés, olyan helyzetekkel összekapcsolódva, amikor az idegi fejlődéshez szükséges megfelelő axon-célpont vagy szubsztrátum-pálya hiányzik) kezelésére tudunk alkalmazni. Például a gátló készítményt alkalmazhatjuk az olyan idegdaganat kezelésére, amely csonkolással, sérülésből származó vagy veleszületett idomtalansággal jár együtt, hogy csak néhány példát említsünk. Jelenleg egy nyílást szoktak fúrni a közeli

csontba és az axont belehelyezik a nyílásba. Ez a módszer gyakran kudarcot vall, mert az axon kiszabadul a nyílásból és egy idegdaganat képződik. Egy, a találmány szerinti gátló készítményt alkalmazása az idegvégződés és a csont befedésére legyőzné ezt a jelenlegi fogyatékossgot azáltal, hogy az irányítatlan axonnövekedés számára egy gátló környezetet biztosít. Választhatunk egy másik megoldást is: a gátló készítményt egy polimersapkában alkalmazzuk, vagyis egy olyan polimer-hengerben, amelynek az egyik vége zárt. Egy, a jelen találmány szerinti anionos polimert a sapka belsejének borítására alkalmazhatunk, így biztosítva az axonkinövés és idegdaganat számára egy gátló környezetet. Egy másik létező megoldás szerint a polimersapka tartalmazhat egy anionos polimert.

Egy kedvező létező megoldás szerint egy gátló-adhezív készítményt alkalmazhatunk az idegdaganat kezelésére. Ha az axont és a csontot befedjük találmány szerinti gátló-adhezív készítménnyel, akkor (1) az axon rögzíthető a csonton létesített nyílásban, és (2) egy gátló környezetet biztosítunk. Az alternatív megoldás szerint a gátló-adhezív készítmény felhasználásával az idegvégződést egy polimersapkában rögzítjük.

Az idegnövekedést elősegítő faktorok, példaként, de nem korlátozásként, az idegnövekedési faktor, csillós neurotróf faktor, agyi eredetű növekedési faktor, laminia, NCAM, L2 és SSEA-1 túltermeléséből származó rendellenességeket szintén lehet kezelni a gátló vagy gátló-adhezív készítményekkel. A gátló vagy gátló-adhezív készítményeket a központi és/vagy perifériális idegrendszeri rendellenességek kezelésére is lehet használni.

#### 5.3.6. A BEADÁS MÓDJAI

A találmány szerinti anionos polimereknek vagy a gátló-adhezív készítményeknek a szervezetbe történő bejuttatására szolgáló módszerek között vannak a szakemberek által ismert módszerek. Kíváncos lehet a találmány szerinti gátló készítményeknek vagy gátló-adhezív készítményeknek a számunkra érdekes helyre történő eljuttatása bármely alkalmas úton. Ezt elérhetjük, például a következő módszerekkel (a felsorolás nem korlátozó jellegű): helyi infúzió vagy műtét során történő alkalmazás, injekció, permet, katéter segítségével, vagy egy beültetett anyag segítségével, a beültetett anyag lehet porózus, nemporózus vagy kocsonyás anyag, beleértve a membránokat, úgymint a Silastic membránok, vagy rostanyagok. Egy előnyös létező megoldás szerint a beültetett anyagot a találmány szerinti egy gátló-adhezív készítménnyel fedjük be, vagy itatjuk át. Gátló molekulával kezelt, vagy még előnyösebb esetben gátló-adhezív készítménnyel átitatott polimer beültetett anyagokat a kívánt kezelés helyén lehet alkalmazni vagy behelyezni. Ezen polimereknek különböző összetételük, pórusméretük és geometriájuk lehet. Azon polimerek, amelyeket alkalmazni tudunk, például nitrocellulózból, polianhidridekből és akril-polimerekből készülnek, a felsorolás nem korlátozó jellegű.

A találmány szerint lehetséges egy gátló vagy gátló-adhezív készítményt sebészeti eljárásokban is alkalmazni. Alkalmazhatjuk a gátló anionos polimert vagy gátló adhezívet a műtéti seb helyén. Alkalmazhatjuk az anionos polimert vagy gátló adhezívet közvetlenül a szöveti sérülés helyén, vagy arra, hogy befedjük vele az egész szervet, vagy a műtéti vágás lezárására.

Ahol megfelelő, az anionos polimer vagy gátló adhezív készítmény alkalmazása orthroszkópiás eljárásokkal is lehetséges.

Abban az esetben, amikor a gátló-adhezív készítményeket bejuttatjuk a szervezetbe, az adhezív fehérjék képesek gyógyító hatást kifejteni a kívánt helyen (lásd 5.2.1. fejezet, fent) és a gátló molekulát az optimális hatékonyság elérése céljából rögzíteni. A kezelés történhet levegő jelenlétében, például amikor a gátló-adhezív készítményt műtéti vágáson, sérüléssel, vagy klasszikus nyitott műtét esetén szerven vagy szöveten alkalmazzuk. Választhatunk más megoldást is: a kezelést in situ módon végezzük, vagyis gyenge oxidálószernek kiteve, vagy természetes módon, amikor a készítmény viszkozitása olyan, hogy a készítmény a kívánt hely közelében marad a kezelés során.

#### 6. PÉLDA: EPIDURÁLIS FIBRÓZIS ÁLLATMODELLEK

Az epidurális (kemény agyhártya feletti) fibrózis a csigolyamegnyitást követő hegyszövet-képződésre utal. A hegyszövet a csigolyamegnyitás helyén keletkezik és a gerincmerevítő izmok alsó felületét a kemény agyburok hátulsó és oldalsó felületéhez és a kemény agyburkon keresztül ingerlő ideggyökerekhez köti. Feltehető, hogy a hegyszövetnek az ideggyökerekhez történő kapcsolódása okozza a csigolyamegnyitási eljárások utáni hosszú, visszatérő fájdalmat.

Az epidurális fibrózist ágyéki csigolyamegnyitást követően, patkányokban, nyulakban és kutyaiban vizsgáltuk. Ezen modellek esetében elvégeztük a csigolyamegnyitást, majd a tesztanyagokat a csigolyamegnyitás helyén alkalmaztuk. Ezt követően a csigolyamegnyitások helyét fibrózis szempontjából vizsgáltuk, átfogó boncolással vagy szövettani elemzéssel.

Ezen példákban az epidurális fibrózis gátlása céljából tesztanyagként alkalmazott készítményt általában 40 kDa molekula-tömegű dextrán-szulfátból, Gélhabporból és pufferált foszfát-sóoldatból készítettük. Ez a három összetevő hosszú, biztonságos múltra tekint vissza az intravénás, szájon keresztül történő és a parenterális humángyógyászati alkalmazásban. A következő fejezetben tárgyalt tesztek némelyikében 500 kDa molekula-tömegű dextrán-szulfátot alkalmaztunk és vivőanyagként Gélhab-szivacsot használtunk fel Gélhabpor helyett. Azt tapasztaltuk, hogy a patkány-, nyúl- és kutya-modellekben ezen változtatásoknak nincs hatása a klinikai eredményre.

Az alábbiakban ismertetett állat-modellek az antifibrózisos hatékonyság szempontjából nem mutattak különbséget a 40 kDa molekula-tömegű és 500 kDa molekula-tömegű dextrán-szulfát anyagok között. Az irodalmi adatok ugyanakkor azt mutatják, hogy az alacsonyabb molekula-tömegű anyag lehet, hogy kevésbé mérgező, mint a magasabb molekula-tömegű anyagok (habár az alábbiakban ismertetett koncentrációértékek esetén mérgező hatást nem tapasztaltunk). A fentiek alapján hozott döntés értelmében a további vizsgálatokat a 40 kDa molekula-tömegű dextrán-szulfát felhasználásával végeztük.

A dextrán-szulfáttal együtt alkalmazásra kerülő megfelelő vivőanyag kiválasztása céljából több anyagot teszteltünk: Gélhab-szivacsot, Pluronic gélt, zselatint, kollagént és Gélhabport. A teszt-eredményeket és a műtéti szempontokat figyelembe véve, dextrán-szulfátot tartalmazó, Gélhabporból előállított gélt választottunk. Az alábbi fejezetben tárgyalt tesztek közül néhány esetében Gélhab-szivacsot használtunk Gélhabpor helyett. Az Upjohn Company, amely vállalat a szivacsot és a port is

gyártja, által szolgáltatott információ szerint a por valójában szivacsanyagból áll, amelyet por-formává alakítottak át. Mi nem találtunk klinikai különbségeket a Gélhab-szivaccsal és a Gélhab-porral elért eredmények között.

## 6.1. PATKÁNY-MODELL

### 6.1.1. KÍSÉRLETI TERVEZÉS

A csigolyamegnyitásokat (lásd később) az L3 és L5 ágyékcsigolyáknál végeztük, hogy minden állat esetében saját kontrollt biztosítsunk. GELFOAM (Upjohn)-szeleteket kísérleti, illetve kontroll oldatokban áztattunk, majd bejuttattuk őket a csigolyamegnyitás helyére. A beáztatott GELFOAM-szeleteket 24 órával előbb készítettük el és kódoltuk. A GELFOAM-szeleteket dextrán-szulfát kalcium/magnézium-mentes pufferált foszfát-sóoldatában(CMF-PBS), dextrán CMF-PBS-sel készült oldatában, vagy CMF-PBS-ben áztattuk. Néhány csigolyamegnyítási hely esetében a GELFOAM-szeleteket kihagytuk, ezek az esetek ál-operációkként szolgálnak. Ezt követően értékelésként elvégeztük az átfogó boncolást, anélkül, hogy tudtuk volna, mely oldatokat melyik csigolyamegnyítási helyen alkalmaztuk, így a kísérletek kétszeresen is vakok voltak.

### 6.1.2. CSIGOLYAMEGNYITÁS

Lewis beltenyésztésű patkányokat 4%-os klorál-hidráttal (34 mg/100 g testsúly) érzéstelenítettünk. A hátulsó bőrt felmetszettük és a gerinc körüli izmokat elválasztottuk az L2-L6 ágyékcsigolyák tövisnyúlványaitól. Az L3 és L5 ágyékcsigolyák tövisnyúlványait egy csontfogóval eltávolítottuk; ezután a csigolyalemezt egy mikro-csontfogóval eltávolítottuk, így egy

4x2 mm méretű, derékszögű csigolyamegnyitási hiányt hoztunk létre. A vérzéscsillapítást adrenalinba áztatott vattagolyócskák és enyhe nyomás alkalmazásával végeztük. Miután a vérzést elállítottuk, a GELFOAM-szeleteket behelyeztük a csigolyamegnyitás helyére, egy szabálytalan sorrend szerint. A burkoló, gerinc körüli izmokat a megnyitás helye fölé zártuk, úgy, hogy a felszíni izompólyát felszívódó 6-0 PDS II-vel (Ethicon) varrtuk össze. A bőrön történt vágást sebkapcsokkal zártuk össze.

#### 6.1.3. ELEMZÉS

Az átfogó kiértékelést megelőzően az állatokat két hétig megtartottuk. Az időbeli lefolyás vizsgálatára végzett kísérletek esetén az állatokat 4, 8, 16, 26 és 36 hétig tartottuk meg. Ezen idő elteltével a patkányokat 4 %-os klorál-hidráttal érzéstelenítettük és a sebet újra felnyitottuk, felmetszve a bőrt és elválasztva a gerinc körüli izmokat. A csigolyamegnyitás helye felett képződött hegyszövet minőségét és mennyiségét, a GELFOAM megjelenését és az új csont növekedésének mértékét vizuális és tapintásos megfigyeléssel becsültük meg, a kemény agyburokig hatoló éles szétvágás során. Miután befejeztük az átfogó kiértékelést, a patkányoknak érzéstelenítőszer-túladagolással szenvedésmentes halált okoztunk.

#### 6.1.4. EREDMÉNYEK

Minden átfogó kiértékelést a kezelési kódok megfejtése előtt végeztünk el, de a különböző kezelésben részesített csoportokra vonatkozó megfigyeléseket táblázatos formában feljegyeztük. Az adatokat az alábbiakban közöljük. Az epidurális fibrózis mértékének értékelése és számszerűsítése soránt alkalmazott

kritériumok az 1. Táblázatban láthatók.

# 1. TÁBLÁZAT

## AZ ÁTFOGÓ KIÉRTÉKELÉS KRITÉRIUMAI

|                      |                                                                |
|----------------------|----------------------------------------------------------------|
| Felszíni heg         | 1 - Vékony és porló                                            |
|                      | 2 - Közepes vastagság                                          |
|                      | 3 - Vastag és kemény                                           |
| A Gélhab megjelenése | 0 - Egy darabban eltávolítva                                   |
|                      | 1 - Több összetapadt részben eltávolítva                       |
|                      | 2 - A környező szövethez részben hozzákapcsolódva              |
|                      | 3 - Erősen rögzített és nehéz eltávolítani                     |
| Mély heg             | 1 - Tisztán látható a kemény agyburok                          |
|                      | 2 - A kemény agyburok felett egy vékony hegszövet réteg        |
|                      | 3 - A kemény agyburok felett egy közepes hegszövet réteg       |
|                      | 4 - A kemény agyburok felett egy vastag hegszövet réteg        |
| Csontnövekedés       | 0 - A csigolyamegnyitás helye felett nincs új csontnövekedés   |
|                      | 1 - A csigolyamegnyitás helye felett mini-új csontnövekedés    |
|                      | 2 - A csigolyamegnyitás helye felett közepes új csontnövekedés |
|                      | 3 - A csigolyamegnyitás helye felett sűrű új csontnövekedés    |

- 39 -

A bőrön lévő vágás és az alatta lévő izompólya, valamint a gerinc körüli izmok minden állat esetében jól gyógyultak. A gerinc körüli izmok elválasztása minden csigolyamegnyitási helyen láthatóvá tett egy hegyszövet-réteget.

A dextrán-szulfáttal kezelt helyek esetében a felszíni hegyszövetet vékonynak találtuk, és könnyen el lehetett választani az alatta lévő GELFOAM-tól. A GELFOAM-ot egy, vagy két darabban könnyen el lehetett távolítani a csigolyamegnyitás helyétől. A GELFOAM eltávolítása után a kemény agyburok láthatóvá vált egy sima, átlátszó membrán formájában. Maga a csigolyamegnyitási hely, méretét tekintve, nem változott érezhető mértékben; a hely határai egyenletesek voltak.

A negatív kontroll helyek (dextránnal vagy CMF-PBS-sel kezelt) drámaian különbözőek voltak. Az első különbséget a hegyszövet felszíni rétegénél tapasztaltuk: ez a réteg hozzá volt tapadva a GELFOAM-hoz. Amikor a hegyszövetet eltávolítottuk, a GELFOAM belsejében és körül vérzés indult meg (a dextrán-szulfátban áztatott GELFOAM eltávolításakor nem tapasztaltunk vérzést). Egy további különbséget jelentetett a GELFOAM szerkezete: könnyen porló volt és szétesett, amikor eltávolítottuk. A GELFOAM eltávolítása után nyilvánvalóvá vált, hogy a csigolyamegnyitás helye drámaian összeszűkült egy keskeny nyílássá. A csigolyamegnyitási hely határának szerkezete és keménysége azt mutatta, hogy a csigolyamegnyitás helye új csont növekedése miatt szűkült össze.

- 40 -  
2. TÁBLÁZAT:

EPIDURÁLIS FIBRÓZIS: ÁTFOGÓ ANATÓMIAI ELEMZÉS

| Ható-<br>anyag                | Felszíni<br>heg | Gélhab meg-<br>jelenése | Mély<br>heg     | Csont-<br>növekedés | Teljes<br>pontszám |
|-------------------------------|-----------------|-------------------------|-----------------|---------------------|--------------------|
| Dextrán-<br>szulfát<br>(n=11) | $1.2 \pm 0.4^2$ | $0.1 \pm 0.3^2$         | $0.3 \pm 0.5^2$ | $0.1 \pm 0.3^2$     | $1.7 \pm 0.9^*$    |
| Dextrán<br>(n=12)             | $2.7 \pm 0.5$   | $2.2 \pm 0.8$           | $2.3 \pm 0.9$   | $1.6 \pm 0.9$       | $8.8 \pm 2.4$      |
| Puffer<br>(n=17)              | $2.6 \pm 0.5$   | $2.4 \pm 0.5$           | $2.4 \pm 0.7$   | $1.9 \pm 0.8$       | $9.3 \pm 1.9$      |

<sup>1</sup>A dextrán-szulfát molekulatömege 500 kDa.

<sup>2</sup>A dextrán-szulfáthoz tartozó pontszámok, azonos kategóriákat összehasonlítva, jelentősen különböznek ( $p < 0.001$ ) a dextránhoz vagy a pufferhez tartozó pontszámoktól.

A 2. Táblázatban közölt adatok összehasonlítják a dextrán-szulfát, dextrán és a pufferált foszfátoldat hatását minden egyes kritérium, valamint az összpontszám szempontjából (az alacsonyabb pontszám a hegesedés nagyobb mértékű gátlását

- 41 -

jelenti). Mind a négy kritériumra teljesül, hogy a csigolyamegnyitás helyére történt dextrán-szulfát-beültetés lényegesen alacsonyabb pontszámot eredményezett, mint a dextrán- vagy a foszfát-puffer-beültetés. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a dextrán-szulfát egy drámaian hatásos szer volt a patkány csigolyamegnyitás-modell esetében az epidurális fibrózis korlátozásában.

A dextrán-szulfát-koncentráció különböző értékének az epidurális fibrózisra gyakorolt hatását a patkány csigolyamegnyitás-modellben vizsgáltuk és a fentiekben, az 1. Táblázattal kapcsolatban ismertetett módon alakítottuk ki a pontszámokat. Az eredmények a 3. Táblázatban láthatók.

## 3. TÁBLÁZAT:

## DEXTRÁN-SZULFÁT DÓZIS-VÁLASZA

| KONCENTRÁCIÓ       | TELJES PONTSZÁM |
|--------------------|-----------------|
| 20 mg/ml           | 1.3±0.5         |
| 2 mg/ml            | 3.0±2.3         |
| 0.2 mg/ml          | 7.8±1.9         |
| Kontroll (0 mg/ml) | 9.3±1.9         |

- 42 -

A hegesedés-gátlás a dextrán-szulfát 20 mg/ml-es koncentráció-értékénél volt a leghatékonyabb. Tizedrészére, 2 mg/ml értékre csökkentve a koncentrációt, a hegesedés gátlásának mértéke kissé csökkent, de még mindig észrevehetően nagyobb volt, mint a kontroll. 0.2 mg/ml koncentrációban a dextrán-szulfát gátlóhatása nem volt jelentősen különböző a kontrollétól.

Vizsgáltuk a dextrán-szulfátnak, dextránnak és foszfát-puffernek az epidurális fibrózisra gyakorolt gátlóhatását a beültetés után eltelt idő függvényében és az 1. Táblázattal kapcsolatban elmondottak szerint alakítottuk ki a pontszámokat.

- 43 -  
4. TÁBLÁZAT:

AZ EPIDURÁLIS FIBRÓZIS GÁTLÁSA  
IDŐFÜGGÉS - PATKÁNY-MODELL

| IDŐ    | DEXTRÁN-SZULFÁT              | KONTROLL <sup>2</sup> |
|--------|------------------------------|-----------------------|
| 2 hét  | 1.2 ± 0.5                    | 9.5 ± 2.1             |
| 4 hét  | 1.8 ± 0.8 <sup>1</sup> (n=4) | 10.3 ± 0.8 (n=8)      |
| 8 hét  | 1.3 ± 0.4 <sup>1</sup> (n=4) | 9.4 ± 1.7 (n=8)       |
| 16 hét | 3.0 ± 1.9 <sup>1</sup> (n=4) | 10.4 ± 1.8 (n=8)      |
| 26 hét | 1.8 ± 0.8 <sup>1</sup> (n=4) | 9.3 ± 3.0 (n=8)       |
| 36 hét | 1.1 ± 0.1 <sup>1</sup> (n=4) | 10.9 ± 1.3 (n=8)      |

<sup>1</sup> A dextrán-szulfáthoz tartozó pontszámok lényegesen különböztek ( $p < 0.001$ ; Student-féle t-teszt) a kontrollhoz tartozó pontszámoktól, minden időpontban.

<sup>2</sup> A kontroll olyan patkányokból állt, amelyeket PBS-ben vagy dextrán+PBS-ben áztatott, vagy semmiben sem áztatott szivaccsal kezeltünk. Az itt közölt adatok átlageredmények, mivel a különböző kontrollok által szolgáltatott eredmények között nem volt jelentős különbség.

Mint azt a 4. Táblázat mutatja, a hegesedésnek a dextrán-szulfát hatására létrejövő gátlása ugyanolyan erős volt 4 héttel a beültetés után, mint 2 héttel (nem jelentős különbség). Hasonló eredményeket kaptunk 4, 8, 16, 26 és 36 héttel a kezelés után (5. Táblázat). A dextrán és a puffer egyik időpontban sem mutatott hegesedés-gátló hatást. Az eredmények azt mutatják, hogy a hegesedésnek a dextrán-szulfát által okozott gátlása hosszú életű és hatásos is.

A patkány csigolyamegnyitási modellt alkalmazva számos, egy anionos polimert tartalmazó készítményt teszteltünk az epidurális fibrózis-gátlás szempontjából. A heparin és hialuronsav poliszulfatált glikozaminoglikánok, a pentozán egy poliszulfatált xilán, és az alginát egy karboxilezett szénhidrát-polimer. A vegyületeknek a hegesedésre gyakorolt hatását az 1. Táblázattal kapcsolatban ismertetett módon pontoztuk (5. Táblázat).

- 45 -  
5.TÁBLÁZAT:

## KÜLÖNBÖZŐ POLIANIONOS VEGYÜLETEK HATÁSA AZ EPIDURÁLIS FIBRÓZISRA

| HATÓANYAG (20 mg/ml)   | TELJES PONTSZÁM |
|------------------------|-----------------|
| Dextrán-szulfát (n=11) | 1.7 ± 0.9       |
| Dextrán (n=11)         | 8.8 ± 2.4       |
| Pentozán (n=2)         | 5.0 ± 1.0       |
| Heparin (n=4)          | 7.3 ± 2.5       |
| Alginát (n=4)          | 7.3 ± 1.9       |
| Hialuronsav (n=4)      | 9.3 ± 0.5       |
| Puffer (n=17)          | 9.3 ± 1.9       |

Ezen összes vegyület közül csak a dextrán-szulfát gátolta hatékonyan a hegesedést. A pentozán részlegesen gátolta a hegesedést; a heparin és az alginát a pufferhez (kontroll) képest jelentéktelen különbséget mutatott. A heparin továbbá vérzést és vérömleny-képződést is okozott a patkányok esetében a csigolyamgnyitás helyén, ezeket a jelenségeket azonos módon alkalmazott dextrán-szulfát esetében nem tapasztaltuk. A kísérletek alapján a hialuronsav nem képes gátolni a hegesedést.

## 6.2. NYÚL CSIGOLYAMEGNYITÁSI MODELL

Az új-zélandi fehér nyulakon végzett teljes csigolya-megnyitást követő epidurális fibrózist jelentősen csökkentette a dextrán-szulfát (molekulatömeg=500 kDa; 400 mikrogramm) műtét során történő alkalmazása. Az epidurális fibrózis mértékét átfogó boncolás segítségével becsültük meg, ugyanazt a pontozási módszert alkalmaztuk, mint a fentiekben tárgyalt patkány-modell esetében. A kiértékelés eredményeit a 6. Táblázat mutatja.

## 6. TÁBLÁZAT:

EPIDURÁLIS FIBRÓZIS 2, ILLETVE 4 HÉTTTEL A MŰTÉT UTÁN  
NYÚL-MODELL

| HATÓ-<br>ANYAG              | FELSZÍNI<br>HEG | KÖZEPES<br>HEG | MÉLY HEG | CSONT-<br>NÖVEKEDÉS | TELJES<br>PONTSZÁM |
|-----------------------------|-----------------|----------------|----------|---------------------|--------------------|
| 2 HÉT UTÁN:                 |                 |                |          |                     |                    |
| Dextrán-<br>sulfát<br>(n=4) | 1.0±0.0         | 0.0±0.0        | 0.0±0.0  | 0.0±0.0             | 1.0±0.0            |
| Puffer<br>(n=4)             | 2.5±1.0         | 0.3±0.5        | 2.3±1.5  | 0.5±1.0             | 5.6±3.1            |
| 4 HÉT UTÁN:                 |                 |                |          |                     |                    |
| Dextrán-<br>sulfát<br>(n=5) | 2.6±0.5         | 0.0±0.0        | 1.4±0.8  | 0.8±0.4             | 4.8±1.5            |
| Puffer                      | 3.0±0.0         | 3.0±0.0        | 3.0±0.0  | 0.5±0.4             | 9.5±0.4            |

A pufferrel kezelt helyek esetében a tömör hegesedés nyilvánvaló volt mindkét időtartam esetében. A dextrán-szulfáttal kezelt helyeken lényegében nem látható bizonyíték hegesedés vagy kemény agyburki összetapadások létrejöttére. A csigolyamegnyitás helyének dextrán-szulfátos kezelése a bőr és az ágyéki izompólya gyulladását nem befolyásolta. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a dextrán-szulfát nyulakban megakadályozza a kemény-agyburki összetapadásokat és az epidurális fibrózist.

### 6.3. KUTYA CSIGOLYAMEGNYITÁSI MODELL

A csigolyamegnyitást követő epidurális fibrózis kiértékelésére egy kutya-modellt használtunk. A kemény agyburkot 1x2 cm-es csigolyamegnyitásnak tettük ki a hatodik, negyedik, és második ágyéki szinteken. Az első helyre dextrán-szulfátos Gélhabot helyeztünk, a második helyre dextrán-szulfátot tartalmazó, poralakú Gélhabbal készített gél-szuszpenziót, a harmadik helyen pedig nem alkalmaztunk kezelést. A három különböző kezelési módot véletlenszerűen osztottuk el a három különböző ágyéki szint között. Az epidurális hegesedést a műtét után 4, 8 és 16 héttel, átfogó anatómiai kiértékeléssel (4 kutya minden időponthoz) elemeztük.

A csigolyamegnyitási helyen jelenlévő kötőszövetet, a kemény agyburki kapcsolódást és csontnövekedést a 7. Táblázatban látható kritériumok alapján pontoztuk. A bőr, az ágyéki izompólya, vagy a gerinc körüli izomzat gyulladásában nem tapasztaltunk különbséget.

- 49 -  
7. TÁBLÁZAT

AZ EPIDURÁLIS FIBRÓZIS ÁTFOGÓ ANATÓMIAI KIÉRTÉKELÉSE  
KUTYA-MODELL ESETÉBEN

---

HÁTULSÓ HEG:

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| A kemény agyburok tisztán látható | 0 |
| Vékony fedés                      | 1 |
| Közepes fedés                     | 2 |
| Vastag fedés                      | 3 |

---

KEMÉNY AGYBURKI KAPCSOLÓDÁS:

|                                                    |   |
|----------------------------------------------------|---|
| A kemény agyburok könnyen egy oldalra nyomható     | 0 |
| A kemény agyburok nem nyomható könnyen egy oldalra | 1 |
| A kemény agyburok nehezen nyomható egy oldalra     | 2 |
| A kemény agyburok nem nyomható egy oldalra         | 3 |

---

CSONTNÖVEKEDÉS:

|                                                                            |   |
|----------------------------------------------------------------------------|---|
| Minimális növekedés                                                        | 1 |
| Jelentős növekedés, de van még nyílás                                      | 2 |
| Teljesen zárt; vékony csont, csontcsípőfogóval vagy anélkül távolítható el | 3 |
| Teljesen zárt; vastag csont, csontcsípőfogóval kell eltávolítani           | 4 |

---

A kezelést nem kapott hely, illetve a dextrán-szulfáttal kezelt hely összetett pontszámainak (8. Táblázat) összevetése azt mutatta, hogy a dextrán-szulfát jelentősen gátolta az epidurális hegese­dést.

8. TÁBLÁZAT:  
AZ EPIDURÁLIS FIBRÓZIS ÁTFOGÓ ANATÓMIAI KIÉRTÉKELÉSE  
KUTYA-MODELL ESETÉBEN

| A CSIGOLYAMEGNYITÁS UTÁN ELTELT IDŐ |                        |                        |                        |
|-------------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| HATÓANYAG                           | 4 HÉT                  | 8 HÉT                  | 16 HÉT                 |
| Kezelés nélkül                      | 7.3 ± 1.3              | 5.8 ± 0.8              | 7.0 ± 1.6              |
| DexSulf/Szivacs                     | 1.5 ± 1.1 <sup>2</sup> | 2.5 ± 2.6 <sup>3</sup> | 4.3 ± 2.9 <sup>4</sup> |
| DexSulf/Gél                         | 2.3 ± 0.8 <sup>2</sup> | 1.3 ± 0.9 <sup>2</sup> | 1.5 ± 1.5 <sup>2</sup> |

<sup>1</sup>DexSulf=dextrán-szulfát (40 kDa; 20 mg/ml)

Minden egyes időpont esetében a "GT402 szivacsban"-t vagy "GT402 gélben"-t hasonlítottuk a kezelés nélkülihez, a Student-féle t-tesztet alkalmazva.

<sup>2</sup> p < 0.005 megbízhatósági szint.

<sup>3</sup> p < 0.05 megbízhatósági szint.

<sup>4</sup> p < 0.1 megbízhatósági szint.

### 6.3. KÖVETKEZTETÉSEK

A patkány, nyúl és kutya epidurális fibrózis-modellek világosan mutatják, hogy a dextrán-szulfát jelenléte egy jelentős terápiai előnnyel jár, mivel gátolja a fibrózist és a hegesedést. A dextrán-szulfáttal kezelt GELFOAM a csontnövekedést is gátolta. Az előző példában egy műtéti seb dextrán-szulfát-GELFOAM-os kezelése egy vékony hegyszövet-réteg létrejöttétől eltekintve megakadályozta a hegesedést és a kemény agyburok sima és átlátszó maradt. A dextrán-szulfáttal átitatott GELFOAM-ot könnyen, egy darabban távolítottuk el, bizonyítva azt, hogy fibrózis-gátlás történt. Ezzel szemben a negatív, kontroll csigolyamegnyitási helyek felszíni hegesedést mutattak, egy vastag és ragadó mély heget, és tömör csontnövekedést.

Mind a patkány, mind a nyúl csigolyamegnyitási modell a legtöbb szempontból követi a humán hátsebészetet. A hegesedés a fibroblasztok, belhámsejtek és az immunrendszer sejtjeinek burjánzásán és a sérülés szélétől a műtéti hely belseje felé történő migrációján alapul. Ezt követően rostos kötőszövet és véredények keletkeznek a műtéti hely belsejében. Az epidurális fibrózis ezen jellegzetességei azonosak az emberek, a patkányok és a nyulak esetében.

A különbségek a méretbeli különbségekkel és a műtéti eljárások részleteivel kapcsolatosak. A patkányok és nyulak viszonylag kis mérete gátat szab a műtét kifinomultságának. A patkányok és nyulak esetében egy teljes csigolyamegnyitást végeznek, ugyanakkor az emberi hátsebészetben általában részleges csigolyamegnyitást. Továbbá, az egyik leggyakoribb oka az emberi hátműtéteknek a diszkektómia. Egy ilyen operáció nem lehetséges a kisállatok esetében, ezért a gerinckorong-sebesülés utóhatásai

nem vizsgálhatók a patkány- és nyúlmodellben. A kutya-modellben ugyanakkor ez lehetséges, mert ez közelebb áll a tényleges humán sebészethez.

Az ebben a példában használt dextrán-szulfát egy nagy effektív anionos töltéssűrűségű és 15.3 tömegszázalék ként tartalmazó anionos polimer. A dextrán-szulfát előállítható oly módon, hogy dextránt kénsavval forralunk és klórszulfonsavval észterezünk. Mind a dextránnak, mind pedig dextrán-szulfátnak poliglükóz szénhidrát-váza van. A dextrán-szulfáttal, illetve a dextránnal átitatott GELFOAM-ok esetében kapott eredmények összehasonlítása azt mutatja, hogy a polimernek az anionos jellege befolyásolja a gátlóképességét és a hasznosságát a jelen találmány szempontjából, mivel a dextrán-szulfát (erősen anionos) hatékonyabban gátolja az epidurális fibrózist, mint a dextrán (nem anionos).

Ugyanakkor az 5. Táblázatban mutatott, egyéb anionos polimerekkel kapott eredmények azt mutatják, hogy a töltéssűrűség önmagában nem jelent gátlóképességet in vivo. A természetes proteoglikánok, amelyek in vitro erősen gátló hatásúak (lásd lejjebb, 7. Fejezet), in vivo minimális aktivitást mutattak (alginát, heparin), vagy egyáltalán nem mutattak aktivitást (hialuronsav). A pentozán közepesen hatékony volt az epidurális fibrózis gátlásában, ugyanakkor nagyon hatékony volt a sejtinvázió gátlásában in vitro.

#### 7. PÉLDA: A SEJTINVÁZIÓ GÁTLÁSA IN VITRO

Az anionos polimerek gátolják a sejtinváziót. A sávanalízis (lásd lejjebb) egy használható in vitro modellt nyújt a sejtinvázióra. A gátlási aktivitást a szubsztrát molekulával,

pl. lamininnel borított sávból a szubsztrát molekulával és egy gátló molekulával, pl. anionos polimerrel borított sávba történő sejtmigráció szintjéből lehet megállapítani. Az anionos polimerek, különösképpen DS és KS/CS sejtadhézió-gátló képességét szintén meghatároztuk.

## 7.1. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 7.1.1. SEJTTENYÉSZET

Sejtvonalak. 3T3 patkány-fibroblasztot (NIH), C6 patkány gliadaganatot (Paganetti és szerzőtársai, 1988, J. Cell Biol. 107:2281) és MCG-28 fiatal, korlátlan életű egér-asztrocitát (egy egér-újszülötti asztrocita-vonal SV-40-nel korlátlan életűvé téve) a következő összeállítású táptalajban tenyésztettünk: Dulbecco által módosított Eagle-féle táptalaj (DMEM) , 10 % magzati borjú-szérum (Gibco Laboratories), és penicillin G, illetve sztreptomycin (100 egység/ml, illetve 100 mikrogramm/ml). A sávanalízis céljából a konfluens lemezeket 0.05 % tripszinnel, 0.53 mM EDTA-val (Gibco Laboratories) szétválasztottuk és 200000 sejt/ml (3 ml/lemez) értékkel végeztük a ráolást. A sejtadhéziós elemzésekre a konfluens tenyészetet 0.03 % EDTA-val szétválasztottuk és a tenyésztést 96 üreget tartalmazó mikrotiter lemezen, 20-100000 sejt/üreg értéknél végeztük. PC12 sejteket - egy phaeochromocytoma (a mellékvese egy velőállományának a daganata) sejtvonal (Green L. A. & Tischler A. S., 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73:2424) - a következő összeállítású táptalajban tenyésztettünk: Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640-es táptalaja (Gibco Laboratories), 10 % lószérum, 5 % magzati borjú-szérum (FCS) és penicillin G, illetve sztreptomycin (100 egység/ml, illetve 100 mikrogramm/ml, Gibco

Laboratories). A sejteket 0.03 % EDTA-val szétválasztottuk és a tenyésztést 96 üreget tartalmazó mikrotiter lemezen, 3000 sejt/üreg értéknél végeztük.

Elsődleges sejttenyészetek. A patkány agyburki fibroblasztok (RMF) elsődleges tenyészetét P-3 kölyökpatkányokból nyertük. Az állatokból eltávolított szövetet Leibovitz-féle, L-15-t és L-glutamint tartalmazó táptalajba tettük. Ezután a szövetet egy szikével kis darabokra vágtuk, 0.25 % tripszint tartalmazó  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -mentes Hank-féle egyensúlyi sóoldatban (CMF-HBSS, Gibco Laboratories) 20 percig, 37 °C hőmérsékleten enzimatikusan bontottuk és mechanikailag szétmorzszoltuk. A sejteket DMEM plusz 10 % FCS-vel öblítettük, centrifugálással töményítettük, majd ezt követően DMEM + 10 % FCS-vel hígítottuk az  $5.0 \times 10^6$  sejt/ $75 \text{ cm}^2$  lombik értékkel végzett tenyésztés céljára. Felnőtt patkány-eredetű ülőideg-fibroblasztokhoz (RSF) felnőtt patkány ülőidegéből származó, 1 mm-es szelettel végzett szövettenyésztéssel jutottunk.

Patkány asztrocita-tenyészeteket (RAST) P-1-3 patkány-agykéregből készítettünk. A kérgeket elválasztottuk a kötőszövettől és a véredényektől, kis darabokra vágtuk és 0.5 %-os kollagenázzal (Gibco Laboratories) 20 percen át, 37 °C hőmérsékleten enzimatikusan bontottuk; ezt követően az enzimátikus bontást 0.25 %-os tripszinnel 15 percen át, majd 0.04 mg/ml-es DNA-ázzal (Sigma) és 0.52 mg/ml-es szójabab eredetű tripszin-inhibitorral, 5 percen át, 37 °C hőmérsékleten végeztük. Ezt követően a sejteket mechanikusan szétmorzszoltuk egy Pasteur-pipetta segítségével, és a tenyésztést  $1.5 \times 10^7$  sejt/ $75 \text{ cm}^2$  lombik (poli-L-lizinnel (PLL, Sigma) borított) értékkel végeztük. A tenyésztés megkezdése után az üveget 4 órán keresztül rázogattuk

a kevésbé tapadó nem-asztrocita oligodendrociták és neuronok eltávolítása céljából.

Elsődleges kiültetett tenyészetek. Hátsó gyökér idegdúcokat (DRG-k) E8-E9 csirkeembriókból nyertünk. A preparálást CMF-HBSS-ben végeztük. A gerincvelőt feltártuk, a DRG-ket eltávolítottuk és megtisztítottuk a környező kötőszövettől. A DRG-ket a következő összetételű táptalajon tenyésztettük: DMEM/F12, 50 ng/ml idegnövekedési faktort (NGF) tartalmazó 10 %-os magzati borjú-szérum. A ráoltás lamininnel (LN, Gibco Laboratories) vagy poli-L-lizinnel (PLL, Sigma) borított edényekre történt.

#### 7.1.2. SÁVANALÍZIS

A sávanalízist lényegében a Snow és szerzőtársai által leírt módon (1990, Exp. Neural. 309:111-130) végeztük. A szövet-tenyészeti Petri-csészéket (Falcon, 60 mm) 0.5 ml, 5 cm<sup>2</sup>-es nitrocellulóz-szelet (Schleicher & Schüll, BA 85 típus) 6 ml metanollal készült oldatával bevontuk, és lamináris áramlású elszívókamrában levegőn szárítottuk. Cellulóz szűrőpapírt (Whatman #1) 12 x 0.35 mm-es csíkokra vágunk egy McIlwain szövetdarabolóval (The Mickle Laboratory Engineering Co., LTD). Egy szűrőpapír-csíkot 20 mikroliter, DS-PG vagy KS/CS-PG és LN adott koncentrációjú oldatába merítettünk, 30 másodpercig rajta tartottuk a nitrocellulózzal borított edényen, majd eltávolítottuk. A tesztoldatot hagytuk megszáradni. Ezt az eljárást néhányszor megismételtük, hogy egyértelműen meghatározott, térben egyformán elhelyezett, azonos szélességű párhuzamos sávokat hozzunk létre. Ezután 0.1 vagy 1 mg/ml LN-t vékony rétegben egyenlően elosztot-

tunk a sávok között egy hajlított üveg Pasteur-pipettával, és a szövettenyésztettel befedtük (Fig.1.).

A lemezekre ráoltottuk a  $2.0 \times 10^5$  sejt/ml értékkel jellemezhető sejtszuszpenziókat vagy 4-10 DRG kiültetéseket. A tenyészeteket a tapadás mértéke és a DS-PG vagy KS/CS-PG sávok legfeljebb 7 nap időperiódus alatt lezajló migrációjának és/vagy inváziójának mértéke szerint, egy Leitz Fluovert mikroszkóp segítségével értékeltük ki.

Azok a sávok, amelyek teljes mértékben gátolták a sejtadhéziót, sejtmigrációt és/vagy sejtinváziót, (-) minősítést, azok, amelyek korlátozott sejtadhéziót, sejtmigrációt és/vagy sejtinváziót tesznek lehetővé, (+/-) minősítést, azok amelyek megengedik a sejtadhéziót, sejtmigrációt és/vagy sejtinváziót, (+) minősítést kaptak. A sejtadhézió alatt értjük a sejt-felület és a szubsztrátum között létrejövő azon kezdeti kölcsönhatást, amely sejtkapcsolódást és sejtterjedést eredményez. A sejtmigráció alatt értjük a sejtmozgást az azonos szubsztrátumon belül, és a sejtinvázió alatt értjük az egyik típusú szubsztrátumból egy másik típusú szubsztrátum felé történő sejtmozgást.

#### 7.1.3. KIÜLTETÉS-KINÖVÉS ELEMZÉS

DRG-kiültetéseket felvittünk LN-nel vagy PLL-lel borított edényekre, majd Leitz Fluovert mikroszkóppal 1, 2 és 3 napig megfigyeltük az idegsejti és nem-idegsejti (fibroblaszt és Schwann-sejt) kinövésük udvarát. A relatív kinövés mértékét, a nem-kezelt kontrollhoz tartozó kinövéshez viszonyítva, a következő osztályokba soroltuk: 1: a kontroll 0-19 %-a; 2: a kontroll

20-39 %-a; 3: a kontroll 40-59 %-a; 4: a kontroll 60-79 %-a; 5: a kontroll 80-100 %-a.

#### 7.1.4. PC12 AXONKINÖVÉS ELEMZÉSE

PC12 sejteket 20 ng/ml NGF-fel 8 napig kezeltük, majd 0.03 % EDTA+PBS-sel és a tenyésztést 96 üreget tartalmazó mikrotiter lemezekben, 3000 sejt/üreg értéknél végeztük. A mikrotiter lemezeket poli-L-lizinnel borítottuk és adhéziós közeggel (1 % BSA RPMI-ben) 20 percig blokkoltuk a sejtek hozzáadása előtt. A sejteket 20 ng/ml NGF-fel kiegészített adhéziós közegben tenyésztettük. A tesztvegyületek hozzáadása előtt, 2 órán át lehetővé tettük a sejtösszekapcsolódást (Akeson és Warren, 1986, Exp. Cell Res. 162:347-362).

#### 7.1.5. KOLORIMETRIÁS SEJTADHÉZIÓ-ELEMZÉS

A mikrotiter lemezeket poli-L-lizinnel borítottuk és 1 % BSA-t tartalmazó DMEM-mel 20 percig blokkoltuk a sejtek hozzáadása előtt. A sejteket felvittük az előborított 96-üregű lemezekre és a táptalajhoz hozzáadtuk a tesztvegyületeket. 4-24 órás, 36 °C hőmérsékleten, 5 % CO<sub>2</sub>-ben, egy nedvesített inkubátorban történő inkubálás után MTT tetrazólium-sót (3-(4,5-dimetiltazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium-bromid) adagoltunk be. A tenyészeteket 2 órán át inkubáltuk, amely idő alatt az életképes sejtekben található mitokondriális szukcinát-dehidrogenáz hidrolizálhatta az MTT-t a formazán-kék reakciótermékévé. A táptalajt lecsapoltuk és az üregeket kiöblítettük az összes elkülönült sejt eltávolítása céljából. Az összekapcsolódott sejtek formazán-kék reakciótermékét 0.08 N HCl izopropanolos oldatával kioldottuk és a lemezeket egy mikrotiter lemez-olvasóban (Dynatech MR4000) 570

nm-en, egy 630 nm-es referencia-szűrőt alkalmazva, értékeltük ki. A leolvasott optikai sűrűség-eredmények egyenes arányban vannak az üregben található életképes sejtek számával (Mosmann, T., 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63). A mintákat pontonként 3-6 ismétléssel futtattuk és a rendszeres hiba kisebb volt, mint 5 %.

#### 7.1.6. REAGENSEK

Heparin, H-7005 Sigma, tétel:19FO268 II. osztályú, sertés eredetű, nátrium-só; 90 %-os dermatán-szulfát, (kondroitin-szulfát B) C-4259 Sigma, tétel:59FO848, nátrium-só, sertésbőr; kondroitin-szulfát A, C-0914 Sigma, nátrium-só, sertés eredetű; dextrán-szulfát, D-6001 Sigma, tétel:50HO458, molekulatömeg 500 kDa; dextrán, Sigma, D-5251 Sigma, tétel:40HO4211, molekulatömeg 485 kDa; pentozán-poliszulfát, Sigma, P-8275, tétel:114FO194.

#### 7.2. EREDMÉNYEK

##### 7.2.1. DS-PG HATÁSA A SEJTADHÉZIÓRA, SEJTMIGRÁCIÓRA ÉS SEJTINVÁZIÓRA

A DS-PG-nek a sejtkapcsolódásra (vagyis adhézióra), sejtmigrációra és sejtinvázióra gyakorolt hatását fibroblaszt- és gliasejtvonalak elsődleges sejttenyészeteivel vizsgáltuk. A sejtszuszpenziókat felvittük a sávanalízisre készített szövettényészeti lemezekre, a fentiekben leírtak szerint. A szövettényészeti lemezeket váltakozva DS-PG/LN-nel (0.1-0.8 mg/ml, illetve 20 mikrogramm/ml), és LN-nel (20 mikrogramm/ml) borítottuk, és a lemezre történő felvitel után 2 nappal kiértékeljük a sejtheadhéziót, sejtmigrációt és sejtinváziót.

Azon szubsztrátum-sávok, amelyek 0.8 mg/ml DS-PG és 20 mikrogramm/ml LN keverékét tartalmazták, gátolták a 3T3 sejtek adhézíóját. A sejtek az LN szubsztrátum azon részeihez kapcsolódtak inkább, amelyek DS-PG-mentesek voltak. A sejtek váltakozó sávjai a DS-PG/LN- és LN-tartalmú sávok találkozásánál éles határokat képeztek (2A. & B. ábra; (-) minősítés). 0.2 mg/ml értéknél enyhe inváziót figyeltünk meg (2C. ábra, (+/-) minősítés), és 0.1 mg/ml értéknél a sejtek képesek voltak a sávokon történő invázióra és migrációra (2D. ábra, (+) minősítés). Minden vizsgált sejttípus esetén megfigyeltük a DS-PG-nek a sejtheadhézióra, sejtmigrációra és sejtinvázióra gyakorolt gátlóhatását (9. Táblázat). Mind az elsődleges sejtek, mind a sejtvonalak kialakítottak sejtmentes sávokat 0.8 mg/ml DS-PG-értéknél, és az elsődleges asztrociták kivételével 0.4 mg/ml DS-PG-értéknél is. A hatás dóziszfüggő volt, a gátlás csökkenése körülbelül 0.2 mg/ml DS-PG esetében, a gátlóhatás elvesztése 0.1 mg/ml DS-PG esetében mutatkozott.

- 60 -  
9. TÁBLÁZAT:

A DS-PG ADHÉZIÓRA, MIGRÁCIÓRA ÉS INVÁZIÓRA GYAKOROLT DÓZIS ÉS  
SEJTTÍPUS-FÜGGŐ HATÁSA

| Dózis<br>(mg/ml) | Sejttípus |     |     |      |     |       |     |
|------------------|-----------|-----|-----|------|-----|-------|-----|
|                  | RMF       | RSF | 3T3 | RAST | C6  | MCG28 | DRG |
| 0.8              | -         | -   | -   | -    | -   | -     | -   |
| 0.4              | -         | -   | -   | +/-  | -   | -     | -   |
| 0.2              | +/-       | +/- | +/- | +/-  | +/- | +     | +/- |
| 0.1              | +         | +/- | +   | +    | +   | +     | +   |

A DS-PG C6 sejtekre gyakorolt gátlóhatásának stabilitását 6 napon át követtük (3. ábra) és ugyanezt 3T3 sejtekre 7 napig (10. Táblázat). A sejtek konfluens rétegei között kialakuló váltakozó átlátszó sávok 0.8 mg/ml DS-PG esetében legalább 4 napig stabilak voltak (3A-C. ábra). A 6. napra a sejtek egy kis része megkezdte a behatolást a DS-PG sávokba (3D. ábra). Hasonló eredményeket kaptunk a 3T3 sejtekkel is (4. Táblázat).

- 61 -  
10. TÁBLÁZAT:

A DS-PG 3T3 SEJTEK MIGRÁCIÓJÁRA GYAKOROLT IDŐFÜGGŐ HATÁSA

| Koncentráció<br>(mg/ml) | 1 nap | 2 nap | 3 nap | 4 nap | 7 nap |
|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 0.8 (10 mikromM)        | -     | -     | -     | -     | +/-   |
| 0.4 ( 5 mikromM)        | -     | -     | -     | -     | +/-   |
| 0.2 (2.5 mikromM)       | +/-   | +/-   | +/-   | +/-   | +     |
| 0.1 (1.25 mikromM)      | +     | +     | +     | +     | +     |

A gátlóhatás 0.8 és 0.4 mg/ml DS-PG esetében legalább 4 napig stabil volt; a 7. napon csak enyhe invázió volt nyilvánvaló. Hasonlóképpen, az enyhe gátlást 0.2 mg/ml DS-PG esetében a 7. napra le lehetett győzni. 0.1 mg/ml DS-PG esetében kezdetben nem lehetett gátlást megfigyelni, és a gátlás hiánya fennmaradt legalább 7 napig.

A fibroblasztok és asztrociták elsődleges sejttenyészetein túlmenően a DS-PG-nek DRG-k kiültetett tenyészetéből történő fibroblaszt-migrációra és Schwann-sejtek migrációjára gyakorolt hatását is vizsgáltuk. Embrionális (E-8) csirke DRG-ket váltakozva DS-PG/LN és LN csíkokra vittünk fel, a fentiekben leírtak szerint. 0.8 mg/ml DS-PG/20 mikrogramm/ml LN esetében csak néhány DRG kapcsolódott az LN-szubsztrátumhoz és korlátozott

axonkinövés és nem-idegsejti sejtmigráció mutatkozott (4A. ábra). 0.4 mg/ml DS-PG esetében a DRG-k hozzákapcsolódtak az LN-szubsztrátumhoz és mind axonkinövés, mind nem-idegsejti sejtmigráció is jelentkezett (4B. ábra). Az LN és DS-PG/LN sávok találkozásánál az axonhosszabbodás és a nem-idegsejti sejtmigráció vagy hirtelen leállt, vagy elfordult és elmozdult az LN és DS-PG/LN sávok határa mentén. A DS-PG gátlóhatása dóziszfüggő volt, az alacsonyabb koncentrációk (0.2 mg/ml) korlátozott sejtinváziót eredményeztek. 0.1 mg/ml DS-PG esetében az axon és a nem-idegsejti sejtinvázió gátlását nem tapasztaltuk (6. Táblázat).

#### 7.2.2. KS/CS-PG HATÁSA A SEJTADHÉZIÓRA, SEJTMIGRÁCIÓRA ÉS SEJTINVÁZIÓRA

KS/CS-PG-nek a sejtheadhézióra, sejtmigrációra és/vagy sejtinvázióra gyakorolt hatását fibroblasztok és gliasejtek elsődleges sejttenyészetével és sejtvonalaival vizsgáltuk. A vizsgált sejttípusok között voltak a patkány agyburki fibroblasztok (RMF), felnőtt patkány-eredetű ülőideg-fibroblasztok (RSF), patkány asztrociták (RAST), 3T3-egér fibroblaszt sejtvonal, C6-patkány gliadaganat sejtvonal, és MCG-28 fiatal, korlátlan életű egér-asztrociták. A sejteket ráoltottuk a 7.1.2. fejezetben (lásd fent) ismertetett módon elkészített tenyészeti lemezekre, majd kiértékeltek a sejtheadhézió, sejtmigráció és sejtinvázió szempontjából.

A 2.7 mg/ml KS/CS-PG és 20 mikrogramm/ml LN keverékét tartalmazó szubsztrátum gátolta az összes vizsgált sejttípus adhézióját és migrációját. A KS/CS-PG által okozott gátlásra a patkány agyburki fibroblasztok, a 3T3 sejtek, a patkány asztrociták és a csirke DRG axonok voltak a legérzékenyebbek (12.

Táblázat). A dózis-válasz kiértékelés azt mutatja, hogy a DRG axonok a legérzékenyebbek a KS/CS-PG által okozott gátlásra, és a C6 gliadaganat sejtvonalak valamint az MCG-28 a legkevésbé érzékenyek. A C6 sejt adhézíójának kezdeti gátlása (5A. ábra) , és később a sejtmigráció és sejtinvázió részleges gátlása (5B. ábra), amit a 2.7 mg/ml KS/CS-PG esetében észleltünk, rövid életű volt. 48 órával a lemezre történt felvitel után a C6 legyőzte a KS/CS-PG gátló hatását (5C. ábra), és a vizsgált sejtsűrűség esetében 72 óra múlva a sávképzés nem volt nyilvánvaló.

- 64 -  
10. TÁBLÁZAT:

KS/CS-PG HATÁSA A SEJTMIGRÁCIÓRA

| Dózis<br>(mg/ml) | Sejttípus |     |     |      |     |       |     |
|------------------|-----------|-----|-----|------|-----|-------|-----|
|                  | RMF       | RSF | 3T3 | RAST | C6  | MCG28 | DRG |
| 2.7              | -         | +/- | -   | -    | +/- | +/-   | -   |
| 1.0              | +/-       | +/- | +/- | +/-  | +   | +     | -   |
| 0.5              | +/-       | +/- | +/- | +/-  | +   | +     | -   |
| 0.25             | +/-       | +   | +   | +/-  | +   | +     | +   |
| 0.12             | +         |     |     | +    |     |       |     |

7.2.3. A DS-PG ÉS KS/CS-PG AKTIVITÁSÁNAK ÖSSZEHA-SONLÍTÁSA

Úgy tűnik, az adatok azt mutatják, hogy a DS-PG hatásosabban gátolja a sejtheadhéziót, sejtmigrációt és sejtinvá-  
ziót, mint a KS/CS-PG (9. Táblázat és 11. Táblázat összevetése). Ez a hatásosság-beli különbség nyilvánvaló, amikor a két proteo-  
glikánt azonos száraztömeg/térfogat (mg/ml) koncentráció-alapon hasonlítjuk össze. Ugyanakkor a DS-PG becsült molekulatömege körülbelül tizede a KS/CS-PG molekulatömegének. Ha a moláris koncentrációt figyelembe véve korrigálunk, a DS-PG és KS/CS-PG

hatásossága közötti különbség nagymértékben csökken. Például a KS/CS-PG becsült moláris koncentrációja 1.0 mg/ml esetén 1.25 mikrom. A DS-PG azonos moláris koncentrációban (1.25 mikrom, 0.1 mg/ml) már nem mutat gátló hatást, tehát ugyanazt az eredményt tükrözi, mint amit a KS/CS-PG-nél láttunk (hasonlítsuk össze a 9. és 11. Táblázatot).

#### 7.2.4. HEPARIN ÉS DEXTRÁN-SZULFÁT HATÁSA A SEJTMIGRÁCIÓRA

A heparinnak és a dextrán-szulfátnak a sejtmigrációra gyakorolt hatását csirke DRG-k kiültetett tenyészetével vizsgáltuk. DRG-ket felvittünk előzőleg PLL-lel vagy LN-nel borított tenyészetű edényekre és heparin, dextrán-szulfát, vagy dextrán-oldatok különböző koncentrációit tartalmazó táptalajon tenyésztettük őket. Teszt-vegyület távollétében 24-48 órán belül nyilvánvalóvá vált az idegdúcok körül egy axonkinövési udvar és nem-idegsejti, tehát fibroblaszt- és Schwann-sejt-migráció (6A. ábra). A DRG-kiültetésből történő migráció következtében létrejött sejtudvar mérete csökkent, amikor a kiültetést 0.4 mg/ml heparin jelenlétében tenyésztettük (6B. ábra). Amikor a kiültetést 0.2 mg/ml dextrán-szulfát jelenlétében tenyésztettük, a DRG-kiültetés körüli sejtudvar mérete drámaian csökkent (6C. ábra). Ugyanakkor a 0.4 mg/ml dextránnak nem volt hatása (6D. ábra). A tesztvegyületek jelenlétében tenyésztett DRGk-ból eredő sejtudvar méretét a nem-kezelt kontrollhoz képest értékeltük ki és a minősítést a 8.1.3. fejezetben (lásd fent) leírtaknak megfelelően (12. Táblázat) végeztük.

## 12. TÁBLÁZAT:

A heparin és dextrán-szulfát gátolja a DRG-kiültetésekből történő sejtmigrációt

| Koncentráció<br>(mikrogramm/ml) | Heparin |     | Dextrán-szulfát |     | Dextrán |     |
|---------------------------------|---------|-----|-----------------|-----|---------|-----|
|                                 | LN      | PLL | LN              | PLL | LN      | PLL |
| 400                             | 5       | 1   | 1               | 1   | 5       | 5   |
| 200                             | 5       | 2   | 1               | 1   | 5       | 5   |
| 50                              | 5       | 2   | 1               | 1   | 5       | 5   |
| 10                              | 5       | 2   | 1               | 1   | 5       |     |
| 2                               |         | 2   | 3               | 1   | 5       |     |
| 1.25                            | 5       | 2   | 5               | 2   |         |     |
| 1                               |         | 4   |                 | 3   |         |     |
| 0.5                             |         | 5   |                 | 5   |         |     |

Minősítési skála (lásd 8.1.3. fejezet, fent)

1 = a kontroll 0-19 %-a

2 = 20-39 %

3 = 40-59 %

4 = 60-79 %

5 = 80-100 %

A heparin és dextrán-szulfát hatását két táptalajon vizsgáltuk: LN és PLL. Mindkét táptalaj segíti a kiültetés kapcsolódását, az axonkinövést és a kiültetésből történő nem-idegsejti migrációt. A két táptalaj a hozzájuk történő sejtkapcsolódás mechanizmusában és ezen kapcsolódás erősségében különböznek. Az LN-hez történő sejtkapcsolódás feltehetően egy receptor-közvetített esemény, ugyanakkor a PLL, amely egy polikationos polimer, ionos kölcsönhatásokon keresztül működik. A sejtek különbözőek abból a szempontból, hogy az LN-hez vagy a PLL-hez történő kapcsolódást részesítik előnyben. A DRG esetében az LN az adhezívebb táptalaj. Mint azt a 12. Táblázat mutatja, a heparin gátolta a PLL-n tenyésztett DRG-ből történő sejtmigrációt, de az LN-n tenyésztett esetében nem. Ez egy gyengébb gátló aktivitást jelent, mint amit a dextrán-szulfátnál tapasztaltunk, ami PLL-en és LN-en tenyésztett DRG-k esetében egyaránt kifejtette a gátló hatását. 1 mikrogramm/ml koncentráció esetében PLL-en a heparin gyenge gátlóhatást mutatott. A dextrán-szulfát 1 mikrogramm/ml koncentráció esetében PLL-en és 2 mikrogramm/ml koncentráció esetében LN-en erősebb gátlóhatást mutatott. PLL-en és LN-en tenyésztett DRG-k esetében a dextrán nem gyakorolt gátlóhatást a sejtmigrációra.

#### 7.2.5. A FIBROBLASZT-ADHÉZIÓ GÁTLÁSA GLIKOZAMINOGLIKÁNOK ÉS EGYÉB SZULFATÁLT SZÉNHIDRÁTOK ÁLTAL

Mivel a szövettenyészteti műanyag vagy egyéb táptalajok nem könnyen szívják magukba a GAG-eket és egyéb szulfatált szénhidrátokat, egy olyan mennyiségi elemzési módszert alkalmaztunk, amellyel az oldatbeli aktivitásukat lehet meghatározni. A fibroblasztoknak PLL-bevonatú mikrotiter lemezekhez történő

adhézióját tesztvegyületeket tartalmazó táptalaj esetében egy, a 8.1.5. fejezetben (lásd fent) ismertetett MTT-analízissel értékeltük ki, és a kapcsolódó sejtek számát a kontroll százalékában fejeztük ki. A 7. ábra mutatja a heparin, pentozán-poliszulfát, dextrán-szulfát, illetve dextrán jelenlétében történő 4 órás inkubálás hatását patkány agyburki fibroblasztoknak (RMF) és 3T3 sejteknek PLL-hez történő adhéziójára.

A heparin, pentozán-poliszulfát és dextrán-szulfát a nem-kezelt kontrollhoz képest csökkentette a kapcsolódó sejtek számát, míg a dextrán-kezelés a kapcsolódó sejtek számának egy mérsékelt növekedését eredményezte. Az elsődleges patkány agyburki fibroblasztokkal, illetve a 3T3 fibroblaszt sejtvonallal végzett vizsgálatok eredményeként kapott hatásossági sorrend hasonló volt. Az elsődleges fibroblasztok adhézióját a heparin, a pentozán-poliszulfát és a dextrán-szulfát erősebben gátolja, mint a 3T3 sejtvonalat. A 8. ábra mutatja a dextrán és a dextrán-szulfát hatását a kapcsolódó sejtek számára, 24 órával a kezelés után.

#### 7.2.6. GAG-K ÉS EGYÉB POLIANIONOS VEGYÜLETEK HATÁSA A SEJTMIGRÁCIÓRA

A GAG-k és egyéb polianionos molekulák sejtadhézióra és sejtmigrációra gyakorolt hatását PC12 sejt axonkinövés egyszerű és gyors modellével vizsgáltuk. A PC12 sejteket NGF-fel megnyújtott axonok jelenlétében tenyésztettük. Az axonok csúcsán lévő növekedési kúp közvetíti a kinövést a kapcsolódás, szétválás és migráció ismételt ciklusain keresztül. Ezen folyamat nettó hatása axon-nyúlás.

NGF-fel alapozott PC-12 sejteket felvittünk 96 üreget tartalmazó mikrotiter lemezekre. Az üregekbe betöltöttük a tesztoldatokat és a sejteket 2 nap elteltével minősítettük: a (+) minősítés azt jelenti, hogy a sejtek többségén az axonok hossza legalább két sejtestátmérő hosszúságú, a (-) minősítés azt jelenti, hogy nem, vagy rövid folyamatok voltak jelen. Minden tesztvegyületre teljes dózis-válasz görbék készültek, és az eredményeket  $IC_{100}$  (g/ml) szerint fejeztük ki, ez azt a minimális koncentrációt jelenti, amelynél a tesztvegyület az axonkinövés 100 %-os gátlását okozta (10. Táblázat). A toxicitás hiányáról minden vizsgált vegyület esetében a következők szerint győződünk meg: mikroszkópiusan nem látható bizonyíték sejtpusztulásra és szétkapcsolódásra; a sejtek tripánkék hatására nem eredményeztek pozitív festődést; a gátló vegyületnek a táptalajból történő eltávolítása axon-kinövést eredményezett. A vizsgált vegyületek között voltak GAG-k (heparin, dermatán-szulfát, kondroitin-szulfát A, keratán-szulfát és hialuronsav), szulfatált szénhidrát-polimerek (dextrán-szulfát és pentozán-poliszulfát) és egyéb polianionos polimerek (például alginsav).

- 70 -  
13. TÁBLÁZAT:

A SEJTMIGRÁCIÓ-GÁTLÁS ÉS A KÉNTARTALOM ÖSSZEFÜGGÉSE

| GAG                                      | IC <sub>100</sub> (g/ml) | Kéntartalom                          |
|------------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Heparin                                  | $2.6 \times 10^{-7}$     | 11.8%                                |
| Pentozán-poliszulfát                     | $3.9 \times 10^{-7}$     | 16.5%                                |
| Dextrán-szulfát                          | $5.2 \times 10^{-7}$     | 15.3%                                |
| Alginát                                  | $3.1 \times 10^{-6}$     | 0% (COO <sup>-</sup> ,<br>nincs kén) |
| Dermatán-szulfát 90%                     | $1.5 \times 10^{-5}$     | 6.0%                                 |
| Hialuronsav                              | $2.0 \times 10^{-4}$     | 0.6-0.8%                             |
| Kondroitin-szulfát A<br>(sertés-eredetű) | $5.0 \times 10^{-4}$     | 5.6%                                 |
| Keratán-szulfát                          | $>2.0 \times 10^{-4}$    | 6.4%                                 |
| Dextrán                                  | $>1.0 \times 10^{-3}$    | 0%                                   |

A vegyület relatív gátlóképessége határozott összefüggést mutatott a kén tartalmukkal in vitro. A kén tartalmú funkció csoport járulékos hatását legtegyértelműbben a dextrán-szulfát és a dextrán aktivitásának összehasonlítása bizonyítja. A GAG-k esetében szulfát formájában jelenlévő kén a sejtinvasziót valószínűleg az anionos töltéssűrűsége keresztül befolyásolja. Ezt a feltevést úgy ellenőriztük, hogy polianionos polimerként alginsavat (alginát) használtunk, amelynek a negatív töltése kizárólag a karboxil-csoportokból származik. Mint azt a 13. Táblázat mutatja, az alginsav szintén gátolja a sejtmigrációt. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy egy adott polimernek az anionos (negatív) töltéssűrűsége az egyik aktív gátló eleme.

#### 7.2.7. DEXTRÁN-SZULFÁT MOLEKULAMÉRETÉNEK HATÁSA A FIBROBLASZT-INVÁZIÓRA

Hasonló kén tartalmú (15-16 tömegszázalék) és különböző molekulaméretű szulfatált dextránoknak a fibroblaszt-adhézióra gyakorolt hatását vizsgáltuk. A 8.1.5. fejezetben (lásd fent) ismertetett kolorimetriás sejtheadhézió-analízist végeztünk, 3T3 sejteket 24 órán át tenyésztettünk 5 kDa, 8 kDa, 500 kDa és 2000 kDa molekulatömegű dextrán-szulfát jelenlétében és dózis-válasz görbéket készítettünk (9. ábra). Az 5 kDa, 8 kDa, 500 kDa és 2000 kDa molekulatömegű dextrán-szulfát mindegyike estében tapasztaltunk 3T3 sejtheadhézió-gátlást, de a gátlóképesség jelentősen különbözött. A dextrán-szulfát  $EC_{50}$ -értékeire a 3T3 sejtheadhézió-gátlás vonatkozásában a következőket kaptuk: 5 kDa - 6 mg/ml; 8 kDa - 4 mg/ml; 500 kDa - 0.006 mg/ml; és 2000 kDa - 20 mg/ml. Ezen vizsgálat során a leghatásosabb molekula az 500 kDa molekulatömegű dextrán volt.

### 7.3. KÖVETKEZTETÉSEK

A hegesedés és fibrózis nem kontrollált, egy sebesülés vagy sérülés helye felé történő fibroblaszt-invázió következtében jön létre. A nem-kontrollált sejtinvázióknak vannak egyéb hátrányos következményei is, mint például az axonkinövés, glia-sejtinvázió és monocyta/falósejt-invázió. A fibroblaszt-invázió gátlása megakadályozná a hegesedést és a velejáró egyéb olyan hátrányos következmények megjelenését, mint a műtéti összenövések, például epidurális fibrózis és a kozmetikailag nem megfelelő hegeket, például azokat, amelyek kozmetikai vagy ujjaépítő műtéteket követően keletkeznek. Az előzőekben ismertetett eredmények azt mutatják, hogy a glikozaminoglikánok és egyéb anionos polimerek gátolják a fibroblaszt-inváziót, ugyanúgy, mint egyéb nem-idegsejti sejtinváziókat, például a gliasejtinváziót, és az axonkinövést is, így megakadályozzák a járulékos hátrányos következmények létrejöttét.

Az előzőekben ismertetett eredmények azt is mutatják, hogy a gátlás mértéke összefüggésben van az anionos töltéssűrűséggel, és ez a kapcsolat hasznos lehet abból a szempontból, hogy meg tudjuk jósolni, vagy azonosítani tudjuk azon anionos polimereket, amelyek a jelen találmány gyakorlatában használhatók. Ugyanakkor az in vivo eredmények azt mutatják, hogy a töltéssűrűség csak részben határozza meg a gátlóképességet.

A jelen találmány nem korlátozandó az itt ismertetett jellemző létező megoldások területére. Valójában a szakértő számára a találmány számos módosított változata - az itt leírtakon túlmenően - nyilvánvaló lesz a fenti leírás és a mellékelt

- 73 -

ábrák alapján. Az ilyen változatok szándékunk szerint beleesnek a mellékelt igénypontok által behatárolt oltalmi körbe.

Számos közleményre hivatkoztunk, amelyek teljes tartalma beletartozik a leírásba.

- 74 -  
SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Készítmény, azzal jellemezve, hogy dextrán-szulfát egy olyan mennyiségét, amely hatékonyan gátolja a sejtinváziót vagy fibrózist, és amelyben a kéntartalom nagyobb, mint körülbelül 10 tömegszázalék, és gyógyszerészeti szempontból elfogadható sebészeti beültetett anyagot tartalmaz, amely beültetett anyag lényegében egy polimerből áll.

2. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy körülbelül 40 000 és 500 000 Dalton közötti átlagos molekulatömegű dextrán-szulfátot tartalmaz.

3. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy polimerként természetes kollagént tartalmaz.

4. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy polimerként denaturált kollagént tartalmaz.

5. Az 1. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy polimerként dextránt tartalmaz.

6. Készítmény, azzal jellemezve, hogy egy körülbelül 2-20 mg/ml koncentrációjú dextrán-szulfát és denaturált kollagén oldatát tartalmazza, és a dextrán-szulfát kéntartalma nagyobb, mint körülbelül 10 tömegszázalék, és a dextrán-szulfát átlagos molekulatömege körülbelül 40 000 Dalton.

7. Készítmény, azzal jellemezve, hogy keresztkötéseket tartalmazó dextrán-szulfát egy olyan mennyiségét, amely hatékonyan gátolja a sejtinváziót vagy fibrózist, és amelyben a kéntartalom nagyobb, mint körülbelül 10 tömegszázalék és gyógyszerészeti szempontból elfogadható olyan oldatot tartalmaz, amelyben a keresztkötéseket tartalmazó dextrán-szulfát nagyobb oldatbeli viszkozitást mutat, mint a keresztkötéseket nem tartalmazó dextrán-szulfát ugyanolyan térfogatu oldatban.

8. A 7. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy körülbelül 40 000 és 500 000 Dalton közötti átlagos molekulatömegű dextrán-szulfátot tartalmaz.

9. Készítmény, azzal jellemezve, hogy

(a) egy anionos polimer egy olyan mennyiségét, amely hatékonyan gátolja a sejtinváziót vagy fibrózist, és

(b) egy adhezív fehérje egy olyan mennyiségét, amely elegendő az adhezív tulajdonságok demonstrálására, tartalmazza.

10. A 9. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anionos polimer és az adhezív protein között kovalens kötés van.

11. A 9. vagy 10. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anionos polimerként a következő anyagok valamelyikét tartalmazza: dermatán-szulfát, kondroitin-szulfát, keratán-szulfát, heparán-szulfát, heparin, dextrán-szulfát, pentozán-poliszulfát, alginát és hialuronsav.

12. Készítmény, azzal jellemezve, hogy

(a) dextrán-szulfát egy olyan mennyiségét, amely hatékonyan gátolja a sejtinváziót vagy fibrózist, és amelyben a kéntartalom nagyobb, mint körülbelül 10 tömegszázalék, és

(b) egy adhezív fehérje egy olyan mennyiségét, amely elegendő az adhezív tulajdonságok demonstrálására, tartalmazza.

13. A 12. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a dextrán-szulfát és az adhezív protein között kovalens kötés van.

14. A 12. vagy 13. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy körülbelül 40 000 és 500 000 Dalton közötti átlagos molekulatömegű dextrán-szulfátot tartalmaz.

15. A 9., 10., 12. vagy 13. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az adhezív proteinként a következők valamelyikét tartalmazza: fibrin, kagylóból származó polifenolos adhéziós fehérje, hajó oldalára tapadó kagylóból származó polifenolos adhéziós fehérje, osztrigából származó polifenolos adhéziós fehérje, kémiaailag polimerizált, egy adhezív fehérjéből származó peptid, és egy rekombinánsan előállított analóg adhezív protein.

16. Egy olyan mennyiségű dextrán-szulfátot, amely hatékonyan gátolja a fibrózist, sarjadzást vagy hegesedést, azzal a kikötéssel, hogy a dextrán-szulfát oldatbeli koncentrációja nem haladja meg a 20 mg/ml értéket, tartalmazó készítmény,

amelyben a dextrán-szulfát kéntartalma nagyobb, mint körülbelül 10 %, alkalmazása fibrózis, sarjadzás vagy egy seb hegesedésének gátlására szolgáló gyógyszer előállítására.

17. Egy

(a) egy adhezív fehérje egy olyan mennyiségét, amely elegendő az adhezív tulajdonságok demonstrálására; és

(b) egy anionos polimer egy gyógyászatilag hatásos mennyiségét tartalmazó készítmény gyógyszerként történő alkalmazása.

18. Egy

(a) egy adhezív fehérje egy olyan mennyiségét, amely elegendő az adhezív tulajdonságok demonstrálására; és

(b) dextrán-szulfát egy olyan gyógyászatilag hatásos mennyiségét, amelyben a kéntartalom nagyobb, mint körülbelül 10 tömegszázalék, tartalmazó készítmény gyógyszerként történő alkalmazása.

19. A 17. igénypont szerinti készítmény fibrózis, sarjadzás vagy egy seb hegesedésének gátlására szolgáló gyógyszerként történő alkalmazása.

20. A 18. igénypont szerinti készítmény fibrózis, sarjadzás vagy egy seb hegesedésének gátlására szolgáló gyógyszerként történő alkalmazása.

21. A 16. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a seb egy műtéti seb.

22. A 16. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a seb egy sérüléssel seb.

23. A 21. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a műtéti seb csigolyamegnyitás, diszkektómia, petevezeték-műtét, vagy olyan műtét eredménye, amellyel alsó-állkapocs ízületi rendellenességet kezelnek.

24. A 21. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a seb hasműtét, ízület-műtét, ínműtét, medencei oldalfal-összetapadások eltávolítására végzett műtét, hashártyaműtét, mellkasi műtét, érműtét, szívműtét, szív bypass-műtét, szívbíllentyűcsere-műtét vagy nyitott szívműtét eredménye.

25. A 19. vagy 20. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a seb egy műtéti seb.

26. A 19. vagy 20. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a seb egy sérüléssel seb.

27. A 25. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a műtéti seb csigolyamegnyitás, diszkektómia, petevezeték-műtét, vagy olyan műtét eredménye, amellyel alsó-állkapocs ízületi rendellenességet kezelnek.

28. A 25. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a seb hasműtét, ízület-műtét, ínműtét, medencei oldalfal-összetapadások eltávolítására végzett műtét, hashártya-

műtét, mellkasi műtét, érműtét, szívűtét, szív bypass-műtét, szívbillentyűcsere-műtét vagy nyitott szívűtét eredménye.

29. Egy olyan mennyiségű dextrán-szulfátot, amely hatékonyan gátolja a fibrózist, tartalmazó készítmény, amelyben a dextrán-szulfát kéntartalma nagyobb, mint körülbelül 10 %, alkalmazása csigolyamegnyitást vagy diszkektómiát követő fibrózis gátlására szolgáló gyógyszer előállítására.

30. A 29. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a készítmény tartalmaz továbbá egy gyógyszerészeti szempontból elfogadható sebészeti beültetett anyagot is, amely beültetett anyag lényegében egy polimerből áll.

31. Egy olyan mennyiségű dextrán-szulfátot, amely hatékonyan gátolja az axonkinövést, tartalmazó készítmény, amelyben a dextrán-szulfát kéntartalma nagyobb, mint körülbelül 10 %, alkalmazása axonkinövés gátlására szolgáló gyógyszer előállítására.

32. Egy olyan mennyiségű dextrán-szulfátot, amely hatékonyan gátolja az axonkinövést, tartalmazó készítmény, amelyben a dextrán-szulfát kéntartalma nagyobb, mint körülbelül 10 %, alkalmazása állati gliadaganatok, idegszöveti daganatok, idegdaganatok, vagy idegnövekedést elősegítő faktorok túltermelésének kezelésére szolgáló gyógyszer előállítására.

33. A 17. vagy 18. igénypont szerinti készítmény alkalmazása axonkinövés gátlására szolgáló gyógyszerként.

34. Egy olyan mennyiségű anionos polimert, amely hatékonyan gátolja állatokban a csontnövekedést, tartalmazó készítmény alkalmazása állati csontnövekedés gátlására szolgáló gyógyszer előállítására.

35. Egy olyan mennyiségű dextrán-szulfátot, amely hatékonyan gátolja az állati csontnövekedést, tartalmazó készítmény, amelyben a dextrán-szulfát kéntartalma nagyobb, mint körülbelül 10 %, alkalmazása állati csontnövekedés gátlására szolgáló gyógyszer előállítására.

36. A 17. vagy 18. igénypont szerinti készítmény alkalmazása állati csontnövekedés gátlására szolgáló gyógyszerként.

37. A 34. vagy 35. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a csontnövekedés egy craniostemostosis követ.

38. A 36. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a csontnövekedés egy craniostemostosis követ.

39. Egy olyan mennyiségű dextrán-szulfátot, amely hatékonyan gátolja a gliasejtinváziót, és amelyben a dextrán-szulfát kéntartalma nagyobb, mint körülbelül 10 tömegszázalék, tartalmazó készítmény alkalmazása gliasejtinvázió gátlására szolgáló gyógyszer előállítására.

40. A 17. vagy 18. igénypont szerinti készítmény alkalmazása gliasejtinvázió gátlására szolgáló gyógyszerként.

41. A 39. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy a gliasejtinvázió oka olyan betegség vagy rendellenesség, amely a következő csoportba tartozik: sérülés, műtét, vírusfertőzés, bakteriális fertőzés, anyagcserebetegség, rosszindulatúság, mérgezőanyagoknak való kitevés, vagy egyéb túlfejlődéses eset.

42. A 40. igénypont szerinti készítmény, amelyben a gliasejtinvázió oka olyan betegség vagy rendellenesség, amely a következő csoportba tartozik: sérülés, műtét, vírusfertőzés, bakteriális fertőzés, anyagcserebetegség, rosszindulatúság, mérgezőanyagoknak való kitevés, vagy egyéb túlfejlődéses eset.

43. A 39. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a gliasejt egy asztrocita.

44. A 40. igénypont szerinti alkalmazás, azzal jellemezve, hogy a gliasejt egy asztrocita.

45. A 17. vagy 18. igénypont szerinti készítmény alkalmazása idegdaganat-képződés gátlására szolgáló gyógyszerként.

46. A 17. igénypont szerinti készítmény azzal jellemezve, hogy az anionos polimerként a következő anyagok valamelyikét tartalmazza: dermatán-szulfát, kondroitin-szulfát, keratán-szul-

fát, heparán-szulfát, heparin, dextrán-szulfát, pentozán-poli-szulfát, alginát és hialuronsav.

47. A 17. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anionos polimer (a) tartalmaz egy savas szulfátot; és (b) a kéntartalma nagyobb, mint körülbelül 5 %.

48. A 47. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az anionos polimer kéntartalma nagyobb, mint körülbelül 10 %.

49. A 17. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy az adhezív proteinként a következők valamelyikét tartalmazza: fibrin, kagylóból származó polifenolos adhézión fehérje, hajó oldalára tapadó kagylóból származó polifenolos adhézión fehérje, osztrigából származó polifenolos adhézión fehérje, kémiaailag polimerizált, egy adhezív fehérjéből származó peptid, és egy rekombinánsan előállított analóg adhezív protein.

50. A 16., 29., 32., 35. vagy 39. igénypont szerinti készítmény alkalmazása, azzal jellemezve, hogy a készítmény körülbelül 40 000 és 500 000 Dalton közötti átlagos molekulatömegű dextrán-szulfátot tartalmaz.

51. A 18. igénypont szerinti készítmény, azzal jellemezve, hogy körülbelül 40 000 és 500 000 Dalton közötti átlagos molekulatömegű dextrán-szulfátot tartalmaz.

52. Egy körülbelül 2-20 mg/ml koncentrációjú dextrán-szulfát-oldatot tartalmazó készítmény, amelyben a dextrán-szulfát kéntartalma nagyobb, mint körülbelül 10 tömegszázalék, és amelyben a dextrán-szulfát átlagos molekulatömege körülbelül 40 000 Dalton, alkalmazása állati csigolyamegnyitást követő fibrózis-gátlásra szolgáló gyógyszer előállítására.

53. Eljárás fibrózis-gátlásra szolgáló műtéti beültetett anyag előállítására, azzal jellemezve, hogy a beültetett anyag tartalmazza egy anionos polimer egy olyan mennyiségét, amely hatékonyan gátolja a fibrózist, és amely beültetett műtéti beültetett anyag a következők valamelyike: nephrostomia-vezeték, hashártya dréncső, mesterséges csípőizület, mesterséges szívbillentyű, perifériális ideghelyreállítási protézis és egyéb protézisek.

54. Az 53. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az anionos polimer a következő anyagok valamelyike: dermatán-szulfát, kondroitin-szulfát, keratán-szulfát, heparán-szulfát, heparin, dextrán-szulfát, pentozán-poliszulfát, alginát és hialuronsav.

55. Az 53. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az anionos polimer (a) tartalmaz egy savas szulfátot; és (b) a kéntartalma nagyobb, mint körülbelül 5 %.

56. Az 53. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az anionos polimer kéntartalma nagyobb, mint körülbelül 10 %.

57. Eljárás fibrózis-gátlásra szolgáló műtéti beültetett anyag előállítására, azzal jellemezve, hogy a beültetett anyag dextrán-szulfát egy olyan mennyiségét tartalmazza, amely hatékonyan gátolja a fibrózist, és amelyben a dextrán-szulfát kéntartalma nagyobb, mint körülbelül 10 %.

58. Az 57. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a dextrán-szulfát átlagos molekulatömege körülbelül 40 000 és 500 000 Dalton közötti.

59. Az 57. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a beültetett anyag a következők valamelyike: nephrostomia-vezeték, hashártya dréncső, mesterséges csípőizület, mesterséges szívbillentyű, perifériális ideghelyreállítási protézis és egyéb protézisek.

60. Egy továbbfejlesztett beültetett anyag, azzal jellemezve, hogy a továbbfejlesztés abban áll, hogy a beültetett anyagot a 9., 10., 12. vagy 13. igénypont szerinti gátló-adhezív készítmény egy megfelelő mennyisége borítja.

61. Egy továbbfejlesztett beültetett anyag, azzal jellemezve, hogy a továbbfejlesztés abban áll, hogy a beültetett anyagot dextrán-szulfát borítja, ami kovalensen kapcsolódik a beültetett anyaghoz, és a dextrán-szulfát kéntartalma nagyobb, mint 10 %.

62. Egy továbbfejlesztett beültetett anyag, azzal jellemezve, hogy a továbbfejlesztés abban áll, hogy a beültetett

anyagot dextrán-szulfát borítja, ami nem kovalensen kapcsolódik a beültetett anyaghoz, és a dextrán-szulfát kéntartalma nagyobb, mint 10 %.

63. A 60., 61. vagy 62. igénypont szerinti továbbfejlesztett beültetett anyag, azzal jellemezve, hogy a polimer beültetett anyag a következők valamelyike: nephrostomia-vezeték, hashártya dréncső, mesterséges csípőízület, mesterséges szívbírlentyű, perifériális ideghelyreállítási protézis és egyéb protézisek.

64. Eljárás állati fibrózis, sarjadzás vagy egy seb hegesedésének gátlására, azzal jellemezve, hogy dextrán-szulfát egy olyan mennyiségét, amely hatékonyan gátolja az állati fibrózist, sarjadzást vagy egy seb hegesedését az állati sérülés helyén alkalmazzuk, azzal a kikötéssel, hogy a dextrán-szulfát oldatbeli koncentrációja nem haladja meg a 20 mg/ml értéket, és a dextrán-szulfát kéntartalma nagyobb, mint körülbelül 10 %.

65. Eljárás állati fibrózis, sarjadzás vagy egy seb hegesedésének gátlására, azzal jellemezve, hogy a következő lépéseket tartalmazza:

(a) egy készítményt, amely egy adhezív fehérje egy olyan mennyiségét, amely elegendő az adhezív tulajdonságok demonstrálására és egy anionos polimer egy olyan mennyiségét tartalmazza, amely hatékonyan gátolja a fibrózist, sarjadzást vagy egy seb hegesedését, egy állati sérülés helyén alkalmazzunk; és

(b) lehetővé tesszük, hogy a készítmény a sérülés helyén gyógyító hatást fejtsen ki.

66. Eljárás állati fibrózis, sarjadzás vagy egy seb hegesedésének gátlására, azzal jellemezve, hogy a következő lépéseket tartalmazza:

(a) egy készítményt, amely egy adhezív fehérje egy olyan mennyiségét, amely elegendő az adhezív tulajdonságok demonstrálására és dextrán-szulfát egy olyan mennyiségét tartalmazza, amely hatékonyan gátolja a fibrózist, sarjadzást vagy egy seb hegesedését, és amelyben a dextrán-szulfát kéntartalma nagyobb, mint 10 %, egy állati sérülés helyén alkalmazunk; és

(b) lehetővé tesszük, hogy a készítmény a sérülés helyén gyógyító hatást fejtsen ki.

67. Eljárás állati fibrózis, sarjadzás vagy egy seb hegesedésének gátlására, azzal jellemezve, hogy egy készítményt, amely egy körülbelül 2-20 mg/ml koncentrációjú dextrán-szulfát-oldatot tartalmaz, amelyben a dextrán-szulfát kéntartalma nagyobb, mint körülbelül 10 tömegszázalék, és amelyben a dextrán-szulfát átlagos molekulatömege körülbelül 40000 Dalton, egy állati sérülés helyén alkalmazunk.

68. Eljárás csigolyamegnyitást vagy diszkektómiát követő állati fibrózis gátlására, azzal jellemezve, hogy egy készítményt, amely dextrán-szulfát egy olyan mennyiségét tartalmazza, amely hatékonyan gátolja a fibrózist, és amelyben a dextrán-szulfát kéntartalma nagyobb, mint körülbelül 10 %, egy állati csigolyamegnyitás helyén alkalmazunk.

69. Eljárás egy beültetett anyag körüli állati fibrózis gátlására, azzal jellemezve, hogy egy gyógyszerészeti szempontból

elfogadható polimer beültetett anyagot alkalmazunk egy állatra, amely polimer beültetett anyag egy anionos polimer egy olyan mennyiségét tartalmazza, amely hatékonyan gátolja a fibrózist, és amely polimer beültetett anyag a következők valamelyike: nephrostomia-vezeték, hashártya dréncső, mesterséges csípőizület, mesterséges szívbillentyű, perifériális ideghelyreállítási protézis és egyéb protézisek.

70. Eljárás egy beültetett anyag körüli állati fibrózis gátlására, azzal jellemezve, hogy egy gyógyszerészeti szempontból elfogadható polimer beültetett anyagot alkalmazunk egy állatra, amely polimer beültetett anyag dextrán-szulfát egy olyan mennyiségét tartalmazza, amely hatékonyan gátolja a fibrózist, és amelyben a dextrán-szulfát kéntartalma nagyobb, mint 10 %.

101. sz. melléklet  
az EEC. 3. sz. melléklet  
Kiadás: 1990. 12. 10.  
H-1011 Budapest, Dózsa Gy. u. 10.  
Telefon: 154-5713, Fax: 154-7044

13 lap  
mim

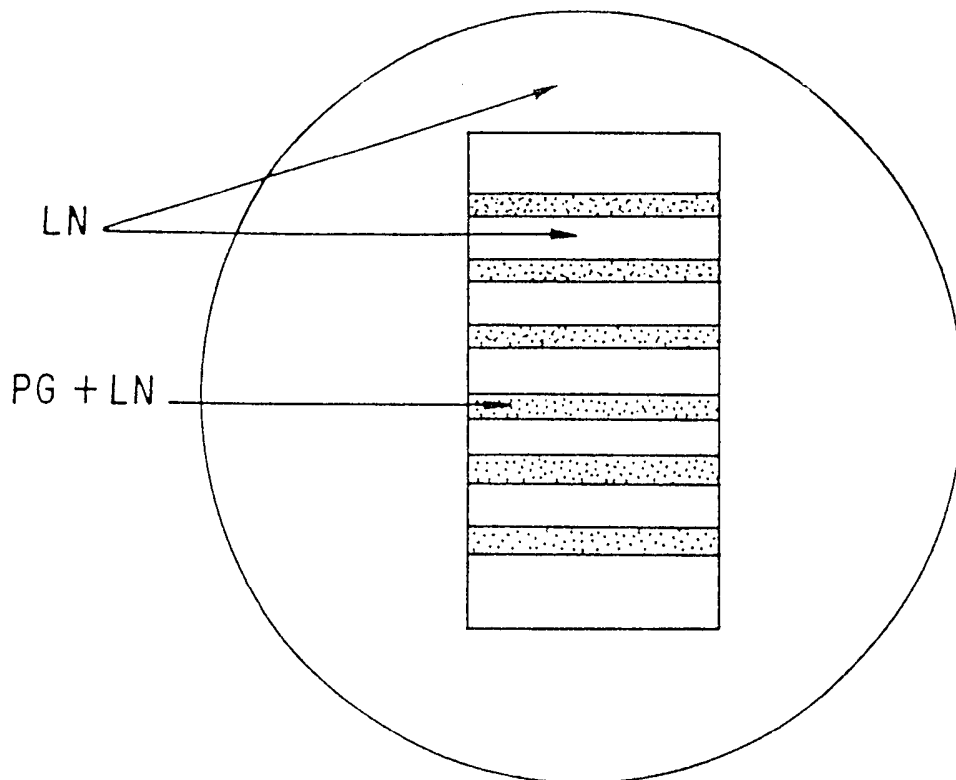
B 3389

Közzétettai pldd ✓

18365

13/1

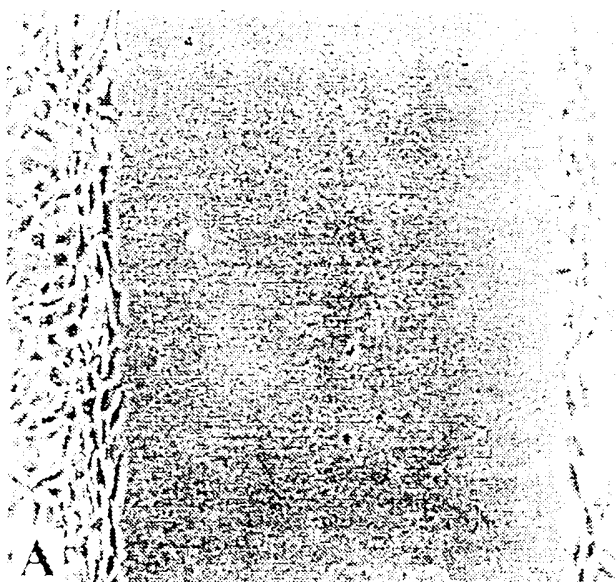
66127



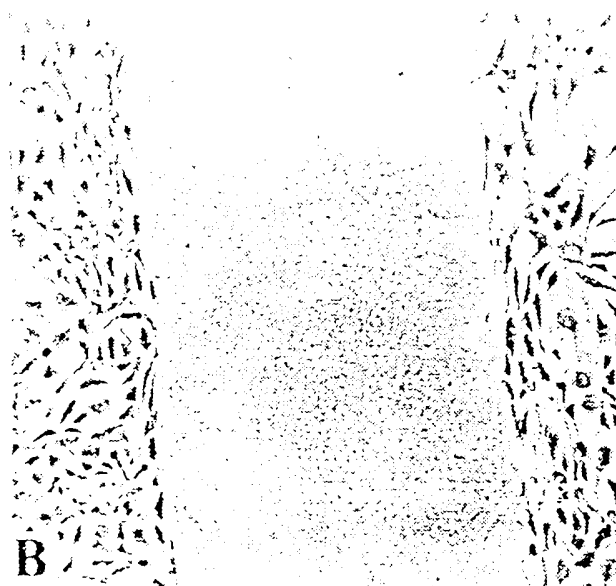
1. ábra

SUBSTITUTE SHEET

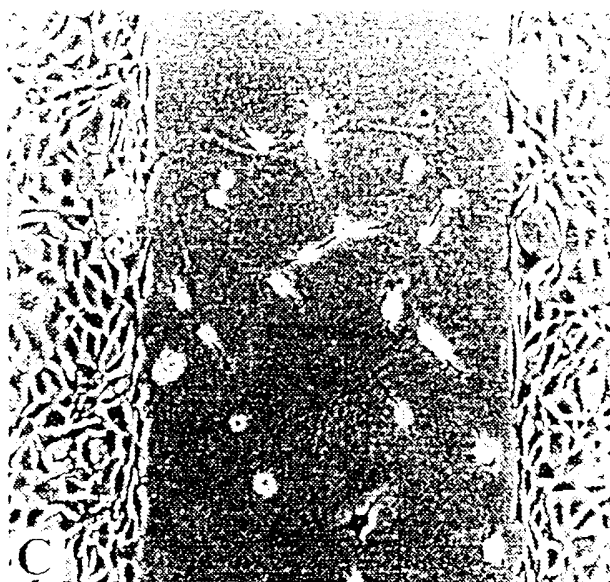
Dr. Szendrői Ádám  
Magyarországi Magyarok  
szövetsége Magyarországi  
Hírszerzői Szervezet  
H-1011 Budapest, Fehérvári út 10.  
Telefon: 141-4725 Fax: 141-0564



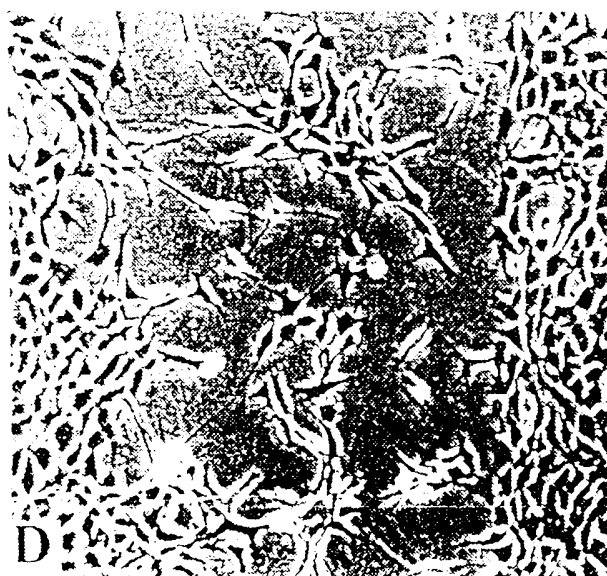
2A. ábra



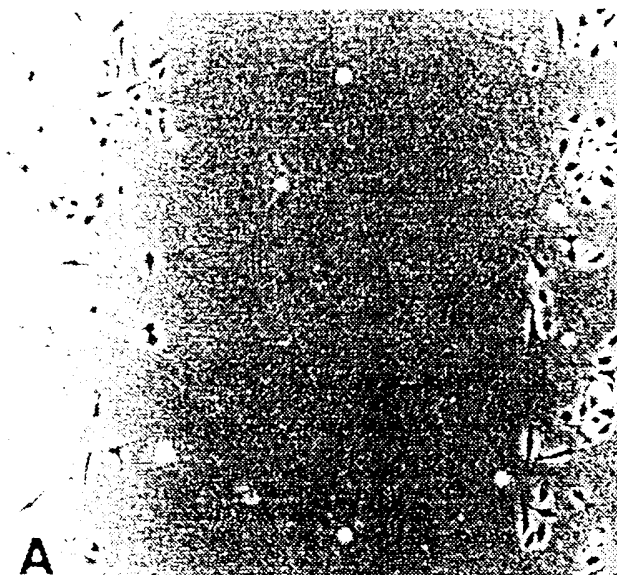
2B. ábra



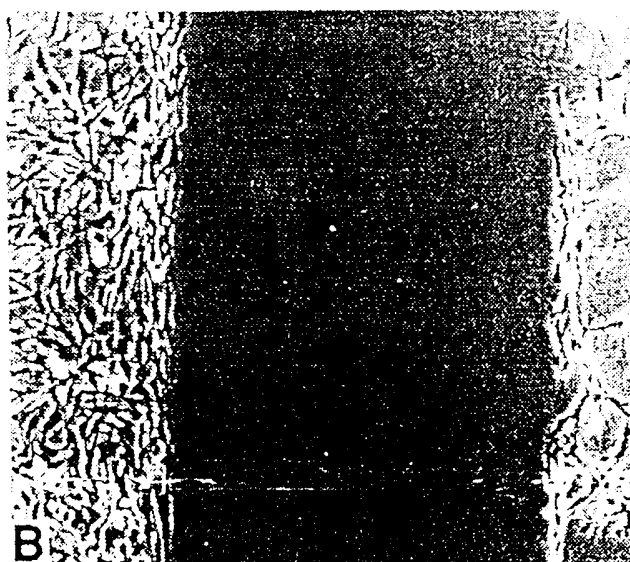
2C. ábra



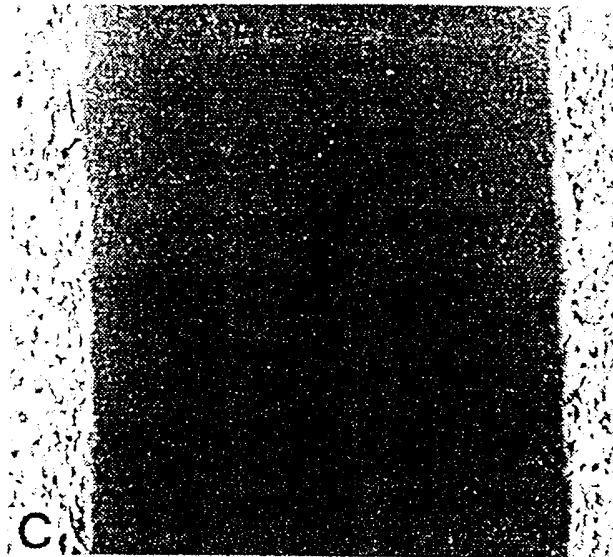
2D. ábra



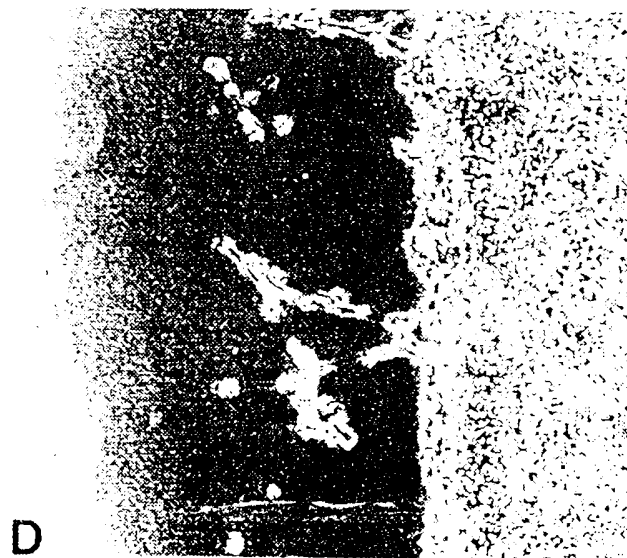
3A. ábra



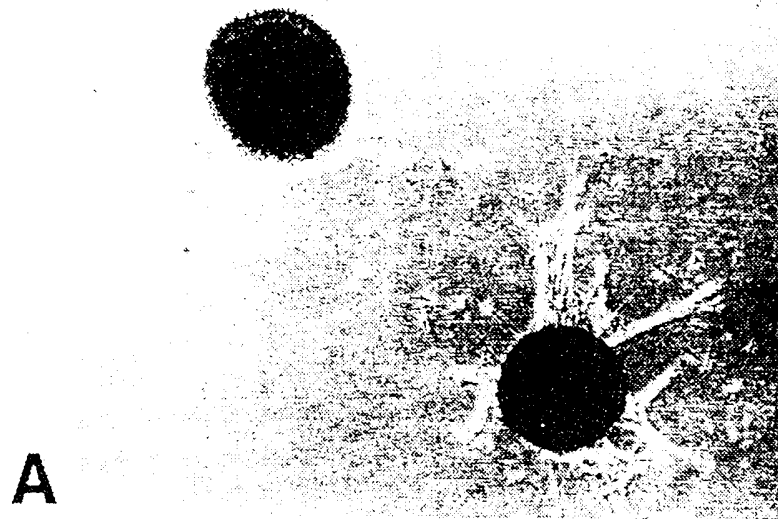
3B. ábra



3C. ábra

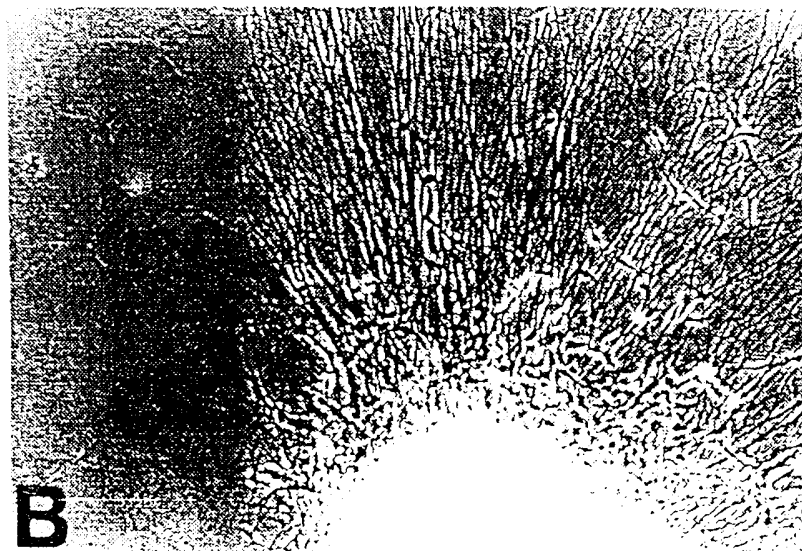


3D. ábra



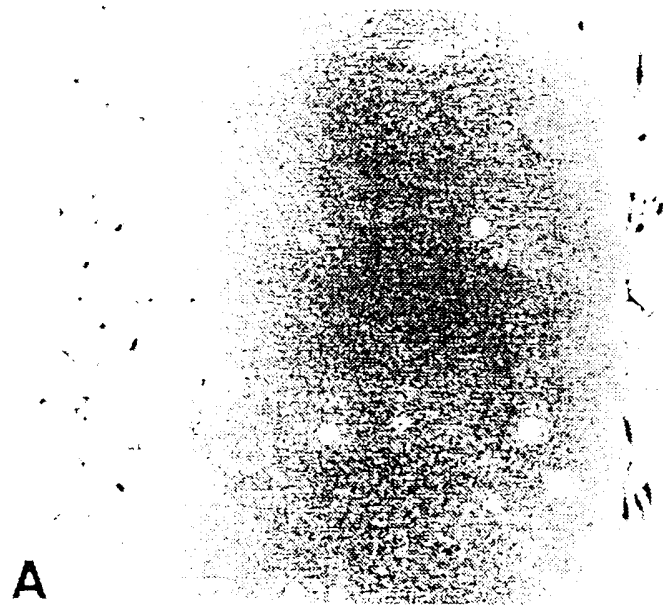
**A**

4A. ábra



**B**

4B. ábra

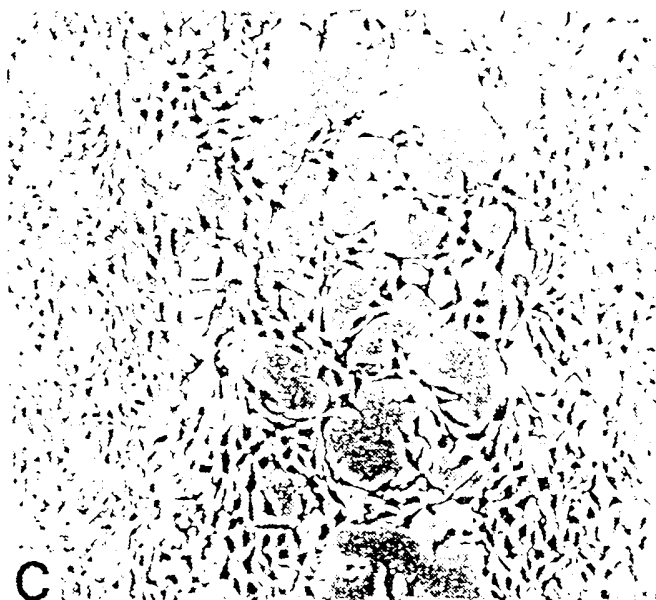


5A. ábra

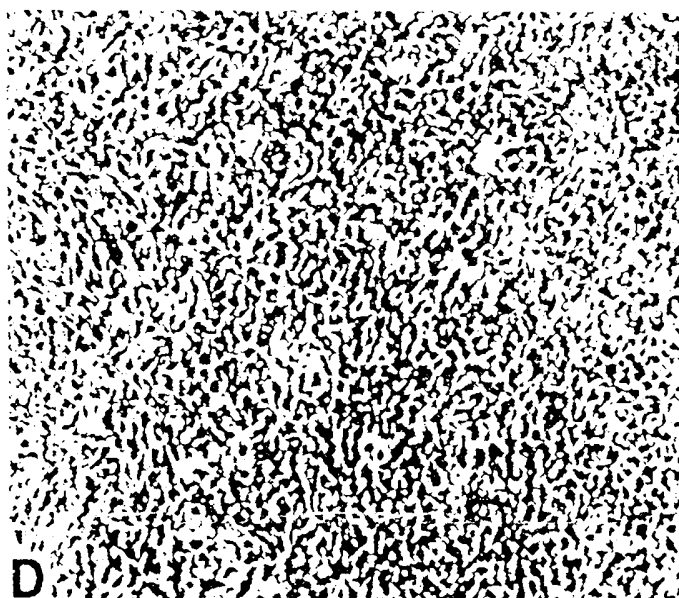


5B. ábra

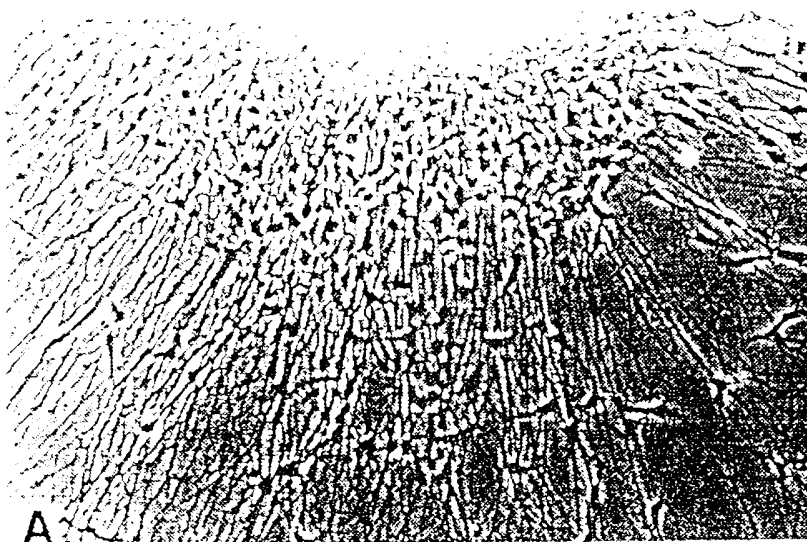
100-443881-1060



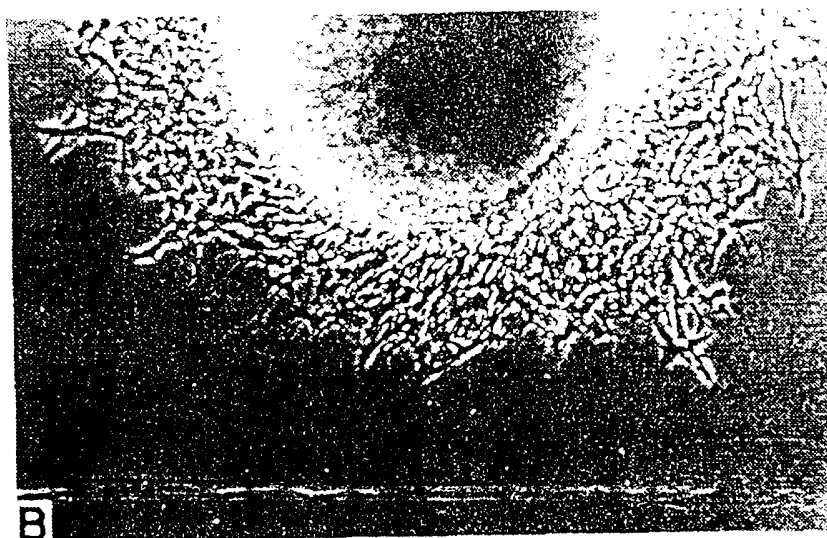
5C ábra



5D ábra

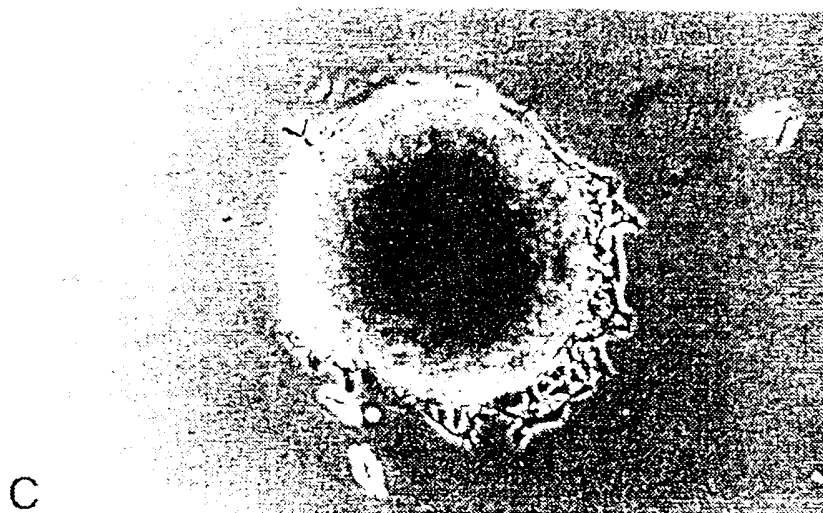


6A. ábra



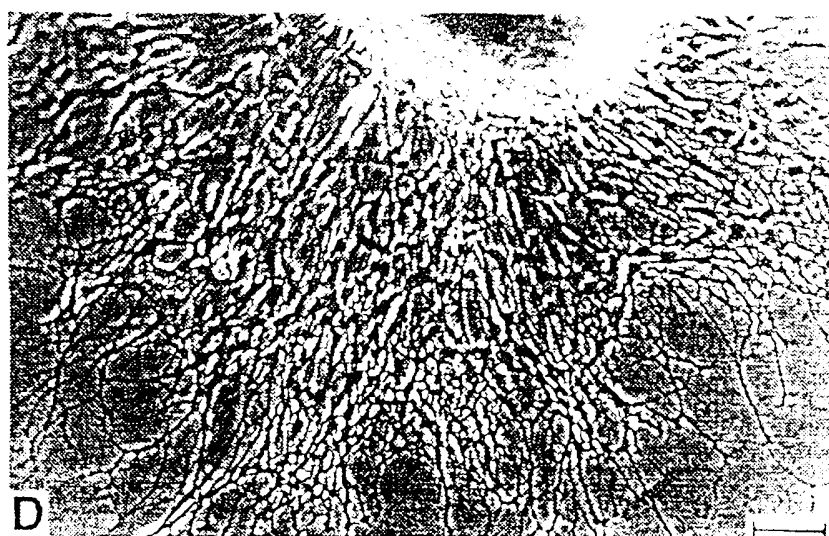
6B. ábra

6. sz. ábra  
 1950  
 153-3644



C

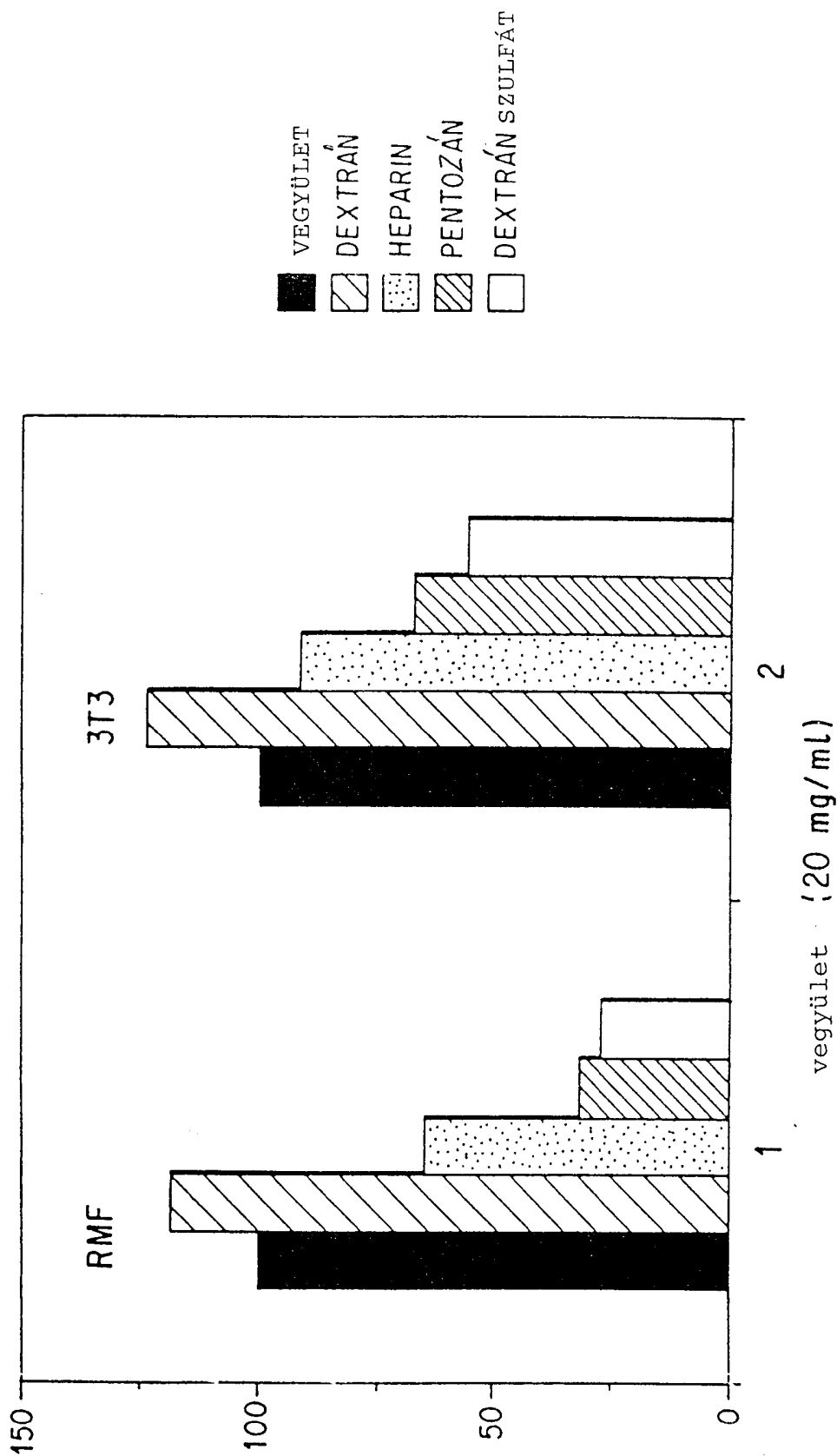
6C. ábra



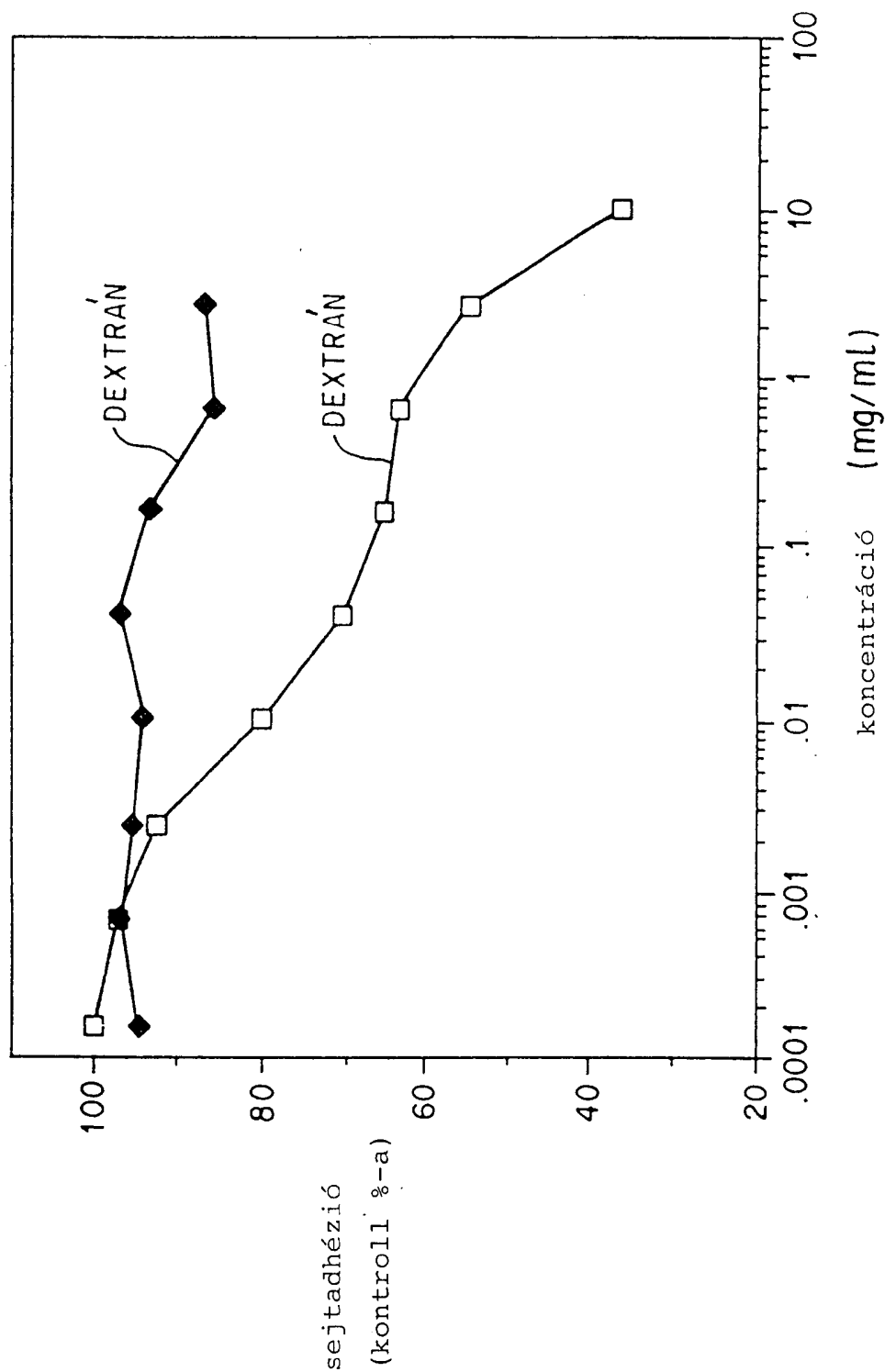
D

6D. ábra

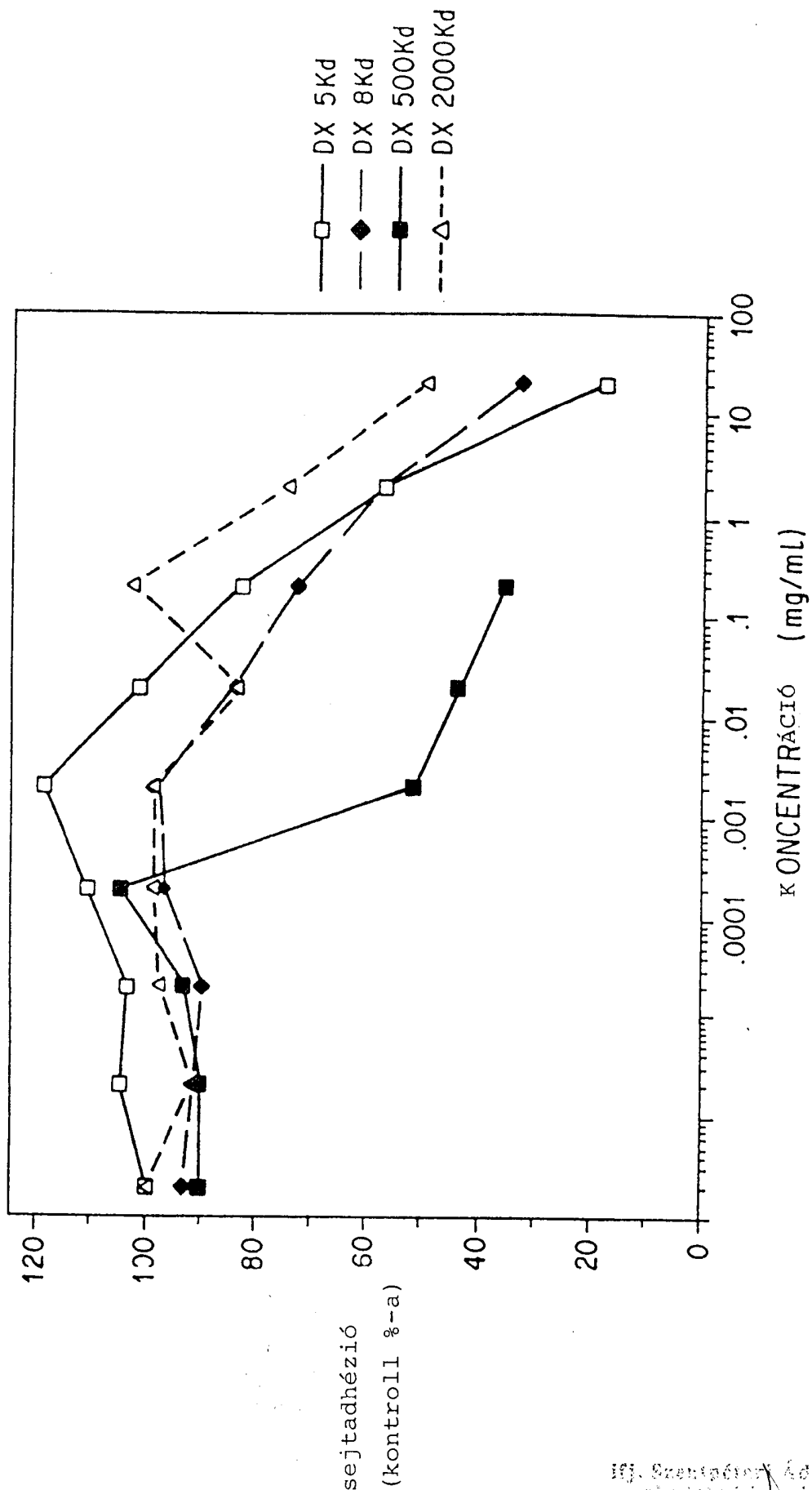
18365  
P-33 3387  
13/10  
6C. ábra  
6D. ábra



7. ábra



8. ábra



9. ábra