(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 935345 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 935345

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
A61K 31/735
A61K 47/42
A61K 47/36
C08B 37/02
C08L 5/02
A61K 31/73 (2006.01)

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **29.05.1992**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **30.11.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **13.01.1994**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **29.05.1992 PCT/US1992/004474**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

31.05.1991 US 708660

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •**Gliatech Inc.,** 23420 Commerce Park Road Beachwood, Ohio 44122, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •**Roufa, Dikla,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •**Harel, Adrian,** Israel, ISRAEL, (IL)
3 •**Frederickson, Robert C.A.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Solujen tunkeutumisen ja fibroosin estoon aniomisten polymeerien avull a perustuvia menetelmiä ja koostumuksia

Förfarande och kompositioner baserade på inhibition av cellernas inträ ngande och fibros med anioniska polymerer

Menetelmiä ja koostumuksia, jotka perustuvat soluinvaasion ja fibroosin inhibitioon anionisten polymeerien avulla

Förfaranden och kompositioner, som baserar sig på inhibition av cellinvasion och fibrosis med hjälp av anjoniska polymerer

1. Keksinnön ala

Esillä oleva keksintö koskee koostumuksia, jotka käsittävät biologisesti sopivia anionisia polymeerejä, ja menetelmiä, joissa tällaisia koostumuksia käytetään fibroosin ja siitä seuraavien komplikaatioiden, kuten arvenmuodostuksen ja kirurgisiin toimenpiteisiin liittyvien kiinnikkeiden, estämiseen. Keksintö koskee myös koostumuksia ja menetelmiä gliasoluinvaasion, hermosolun viejähaarakkeen liikakasvun ja luunkasvun estämiseksi.

2. Keksinnön tausta

Kirurgiaan liittyvät kiinnikkeet - elinten tai kudosten tarttuminen toisiinsa arpikudoksen avulla - voivat aiheuttaa kliinisiä ongelmia. Arpikudoksen muodostuminen on normaali jälkiseuraus kirurgiasta tai muusta kudosvauriosta ja se on tarpeen haavan kunnollisen paranemisen kannalta. Joissakin tapauksissa arpikudos kuitenkin kasvaa tarkoitetun alueen yli ja aikaansaa leikkauskiinnikkeitä. Nämä arpikudoksen muodostamat leikkauskiinnikkeet rajoittavat kysymyksessä olevien kehonosien normaalia liikkuvuutta ja toimintaa. Kun ääreishermot tulevat mukaan, sidekudoskiinnikkeet saattavat tuoda esiin kovaa kipua normaalin liikkeen aikana. Lisäksi arvet ja keloidikudos (ympäristöstään kohoava arpikudos) ovat usein pahannäköisiä ja aiheuttavat psyykkisiä ja emotionaalisia ongelmia.

2.1. Periduraalinen fibroosi

Eräs kliinisesti tärkeä esimerkki haitallisesta arvenmuodostuksesta tulee esiin periduraalisen fibroosin yhteydessä. Tämä tila johtaa toistuvaan alaselkäkipuun lumbaalilaminektomian ja diskektomian jälkeen (Cauchoix ym., 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 ym., 1980, Spine 5:59-64). Arpikudoksen muodostuminen rajoittaa hermojuuren liikkuvuutta ja sen on katsottu korreloituvan toistuvaan säteittäiskipuun, usein samalla alueella kuin aikaisemmin esiinluiskahtaneen välilevyn aiheuttama kipu (Benoist, M. ym., 1980, Spine 5:432-436).

2.2. Haitallisen arpeutumisen estäminen

Koko joukko tutkijoita on tutkinut erilaisten käsittelyjen tehoa periduraalisen fibroosin estoon. Rasvakudossiirteitä on käytetty jonkinlaisella menestyksellä arvenmuodostuksen ehkäisemiseen ja parantamiseen (LaRocca ja MacNab, 1974, J. Bone Joint Surg. 56B:545-550; Langenskiöld ja Kiviluoto, 1976, Clin. Orthop. 115:82-85; Gill ym., 1985, Spine 10:662-667; Gill ym., 1979, Spine 4:176-185; Yong-Hing ym., 1980, Spine 5:59-64). Geelivaahto (denaturoitua kollageenigeeliä) ja silastiset kalvot ovat osoittaneet jonkinlaista tehoa kiinnikkeiden ehkäisemisessä (LaRocca ja MacNab, supra); myöhemmät tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet geelivaahdon olevan tehotonta tai edistävän arvenmuodostusta (Gill, 1985, supra; Gill, 1979, supra; Yong-Hing, supra). Songer ym. ovat raportoineet, että natriumhyaluronaatti, mutta ei geelivaahto eivätkä aikaisemmat rasvakudossiirteet, hidastaa fibroosia ja vähentää fibroblastien invaasiota koiramallissa (1990, Spine 15:550-554).

2.3. Soluinvaasio ja kiinnittyminen

Snow'n ym. aikaisempi tutkimus (1990, Exp. Neurol. 309:111-130) on osoittanut, että kerataanisulfaatti/kondroitiinisulfaattiproteoglykaani (KS/CS-PG) estää hermosolun viejähaarakkeen kasvua kananpoika-alkion takajuuren hermosolmuista (DRG:t). Hermosolun viejähaarakkeet joko pysähtyivät äkkiä tai muuttivat suuntaa ja vaelsivat KS/CS-PG-juovan reunaa pitkin. Tämä ilmiö oli riippuvainen proteoglykaanin konsentraatiosta, välikonsentraatioiden tuottaessa epäsäännöllisiä crossing-malleja.

Monissa tutkimuksissa on tarkasteltu proteoglykaanien osuutta solujen kiinnittymisessä. Fraktioimattomien rusto-proteoglykaanien ja vähemmässä määrin erään puhdistetun rustokomponentin, kondroitiinisulfaatin, on huomattu estävän fibroblastien sitoutumista kollageeniin ja fibronektiiniin in vitro (Rich ym., 1981, Nature 293:224-226). Dermataanisulfaattiproteoglykaanin (DS-PG) on havaittu estävän 3T3-fibroblastien kiinnittymistä ja leviämistä plasma-fibronektiinillä päällystetyillä viljelyalustoilla (Lewandowska ym., 1987, J. Cell Biol. 105:1443-1454; Rosenberg, L.C. ym., 1986, CIBA Foundation Symposium 124:47-68). Dekstraanisulfaatti ja suuren molekyylipainon omaava hepariini pienensivät kiinalaisen hamsterin munasarjan ja G-8 hiiren myoblastisolujen alkuperäistä kiinnittymisnopeutta kollageeniin (Klebe, R.J. ja P.J. Mock, 1982, J. Cell Physiol. 112:5-9). Rustosta eristetty proteoglykaani, josta on poistettu glykoproteiinit ja hyaluronihappo, hidastaa erilaisten solutyyppien, mukaanluettuina kananpojan alkion fibroblastit, kiinnittymistä kudosviljelmämuoviin ja kollageeniin (Knox, P. ja P. Wells, 1979, J. Cell Sci. 40:77-88). Glykosaminoglykaanit, kerataanisulfaatti, kondroitiinisulfaatti ja hyaluronihappo eivät kuitenkaan estäneet solujen kiinnittymistä (Knox ja Wells, supra).

Glykosaminoglykaanit (GAG:t), pääasiassa heparaanisulfaatti ja dermataanisulfaatti, on myös identifioitu fibroblastin (muriini-3T3-solun) kiinnittymisen fibronektiiniin välittäjiksi (Laterra ym., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77:6662-6666). Fibronektiinin tai hyaluronihapon tai molempien läsnäolon 3-ulotteisessa tyypin I kollageenisienessä havaittiin edistävän haavan parantumista in vivo ja tukevan fibroblastien invaasiota, mistä oli seurauksena kollageenin kerrostuminen, in vitro (Doillon, C.J. ym., 1987, Biomaterials 8:195-200).

Kaksi gliasolulinjaa, kaksi epiteelisolulinjaa ja yksi fibroblastisolulinja osoittivat verrattavissa olevaa tai vähäisempää sitoutumista kollageeni-glykosaminoglykaaniin

kollageeniin verrattuna (Reichard-Brown ja Akeson, supra). Hyaluronihappo estää 3T3-fibroblastien aggregaatiota (Underhil, C. ja Dorfman A., 1978, Exp. Cell. Res. (117:155-164). Kondroitiinisulfaatti näyttää estävän leukosyyttien tarttumista endoteeliin (Fibbi, G. ym., 1983, Biochem. Biophys. Acta 762:512-518).

Fibroblastien alustaantarttumiskohtien tutkiminen osoittaa, että solun pinnan proteoglykaanit, hallitsevasti heparaanisulfaattiproteoglykaani, näyttelevät tärkeää osaa lähi- ja fokaalikosketusadheesioissa (Culp, L.A. ym., 1986, CIBA Foundaton Symposium 124:158-83; Izzard, C.S. ym., 1986, Exp. Cell Res. 165:320-336; Lark, M.W. ym., 1985, Fed. Proc. 44:394-403; Rollins, B.J. ja L.A. Culp, 1979, Biochem. 18:141-148; Culp, L.A. ym., 1979, J. Supramol. Struct. 11:401-427; Culp, L.A. ym., 1978, J. Cell Biol. 79:788-801; Culp, L.A. ja H. Bensusan, 1978, Nature 273:680-682; Cornic, M. ym., 1980, Eur. J. Cell Biol. 22:262). Sekretoituneilla glykosaminoglykaaneilla substraattiin tarttuneessa materiaalissa, pikemminkin kuin fibronektiinissä ja kollageenissa, näyttää olevan nopeutta rajoittava rooli hiiren selkärangan myoblastisolulinjan adheesioprosessissa (Schubert, D. ja M. La Corbiere, 1980, J. Biol. Chem. 255:11564-569). Eräs rotan yolk-sac tuumorisolujen erittämä proteoglykaani esti tuumorisolujen sitoutumisen fibronektiiniin ja tyypin I kollageeniin, mutta ei tyypin IV kollageeniin, joka sitoi 12 kertaa huonommin proteoglykaania kuin tyypin I kollageeni (Brennan, M,.J. ym., 1983, Cancer Res. 43:4302-4307).

2.4. Adheesioproteiinit

Simpukoiden, ostereiden ja hanhenkaulojen bioadhesiiviset proteiinit tarttuvat erilaisiin vedenalaisiin pintoihin suurella tarttumisvoimalla. Muilla DOPAa (3,4-dihydroksifenyylialaniinia) sisältävillä proteiineilla on myös tarttumisominaisuuksia. Brown huomautti kinoniparkitusaineen ilmeisyydestä selkärangattomien rakenneproteiineissa, mukaanlukien Mytiluksen tarttumisrihmat ja maksamadon, Fas-

ciola hepatica, munakotelo, (1950, Nature 165:275). Jensen ja Morse karakterisoivat adheesioproteiinit, joita merimato Phragmatopoma californica käyttää suojakotelonsa rakentamiseen (1988, J. Comp. Physiol. B 158:317-324). Samoin kuin Mytiluksen adheesioproteiinissa, DOPA on Phragmatopoman adheesioproteiinin pääkomponentti; lysiiniä, seriiniä ja hydroksyyliä sisältäviä aminohappoja oli myös läsnä (Jensen ja Morse, 1988, supra).

Lisäksi fibriiniliimat ovat yleisiä ja niitä käytetään moniin sovelluksiin (katso Strausberg, R.L. ja R.P. Link, 1990, Trends Biotech 8:53-57).

3. Yhteenveto keksinnöstä

Esillä oleva keksintö liittyy sen keksimiseen, että tietyt biologisesti sopivat anioniset polymeerit voivat tehokkaasti estää arvenmuodostusta, erityisesti kirurgisia adheesioita, ja että nämä anioniset polymeerit yleensä estävät fibroosia. Keksintö perustuu sen keksimiseen, että anioniset polymeerit estävät tehokkaasti solujen invaasiota, joka liittyy haitallisiin paranemisprosesseihin, esim. fibroosiin ja arpeutumiseen. Esillä olevan keksinnön mukaisia anionisia polymeerejä, joita nimitetään termillä estävät anioniset polymeerit, voidaan käyttää estämään fibroblastien invaasiota säädellen siten paranemisprosessia ja ehkäisten fibroosia. Esillä olevan keksinnön mukaiset anioniset polymeerit inhiboivat myös gliasolujen invaasiota, luunkasvua ja hermosolun viejähaarakkeen liikakasvua. Esillä oleva keksintö liittyy myös sen keksimiseen, että teho, jolla jokin anioninen polymeeri inhiboi solujen, esim. fibroblastien, invaasiota, korreloi osaksi polymeerillä olevien anionisten varausryhmien lukumäärän kanssa. Siten esillä oleva keksintö tuo käyttöön suuren määrän materiaaleja, joita voidaan käyttää estämään arvenmuodostusta ja fibroosia ja erityisesti kirurgiaan liittyviä kiinnikkeitä, ja menetelmän jonkin annetun materiaalin tähän keksintöön sopivuuden määrittämiseksi osaksi sen tehokkaan anionisen varaussisällön perusteella.

Tässä keksinnössä käytettäviä anionisia polymeerejä ovat dekstraanisulfaatti (DX) ja pentosaanipolysulfaatti (PS). Lisäksi voidaan käyttää luonnon proteoglykaaneja tai proteoglykaanien glykosaminoglykaaniosia, mukaanlukien dermataanisulfaatti (DS), kondroitiinisulfaatti (CS), keratataanisulfaatti (KS), heparaanisulfaatti (HS) ja hepariini (HN). Myös alginaattia (AL) voidaan käyttää. Sopivina konsentraatioina edellä olevat molekyylit voivat inhiboida fibroblastien invaasiota tai migraatiota, vieläpä sopivien migraatiota edistävien substraattien, kuten laminiinin, läsnäollessa. Erään erityisaspektin mukaan esillä oleva keksintö koskee DX:n käyttömenetelmiä, DX:ää sisältäviä molekyylejä ja koostumuksia fibroblastien invaasion ja fibroosin inhiboimiseen, ehkäisemiseen tai säätelemiseen ja terapeuttisesti, kun niin halutaan. Edelleen keksintö koskee menetelmiä yhden tai useamman anionisen polymeerin käyttämiseksi ja yhden tai useamman anionisen polymeerin sisältäviä koostumuksia fibroblasti-invaasion ja fibroosin tai monosyytti/makrofaagi-invaasion inhiboimiseksi ja niiden terapeuttista käyttöä. Tällaiset KS:a, CS:a, DS:a, HS:a tai HN:a sisältävät molekyylit käsittävät, rajoittumatta kuitenkaan niihin, disakkaridi-, glykosaminoglykaani- ja proteoglykaanirakenteet. Eräässä suositeltavassa suoritusmuodossa DX:a voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisissa fibroblasteja inhiboivissa koostumuksissa ja menetelmissä.

Keksintö tuo lisäksi käyttöön muita estäviä anionisia polymeerejä, jotka sopivat käytettäviksi ehkäisemään arvenmuodostusta. Eräässä suoritusmuodossa voidaan käyttää rikkihappoa sisältävää anionista polymeeriä, jossa rikkipitoisuus on suurempi kuin noin 5 paino-%. Eräässä vielä suositeltavammassa suoritusmuodossa rikkipitoisuus on suurempi kuin noin 10 paino-%.

Eräässä toisessa suoritusmuodossa keksintö koskee lisäksi menetelmiä jonkin estävän anionisen polymeerin, suositeltavimmin dekstraanisulfaatin tai pentosaanipolysulfaatin, käyttämiseksi yhdistettynä johonkin adhesiiviseen prote-

iiniin fibroblasti-invaasion ja fibroosin inhiboimiseksi ja myös gliasolujen invaasion, hermosolun viejähaarakkeen liikakasvun ja luunkasvun estämiseksi. Adhesiiviset polymeerit kykenevät silloittumaan estävään molekyyliin ja johonkin sopivaan kohteeseen. Keksintö tuokin sen vuoksi käyttöön menetelmiä jonkin estävän anionisen polymeerin ankkuroimiseksi kohtaan, jossa estävää tai säätelevää aktiivisuutta halutaan.

Eräässä suositeltavassa toteutusmuodossa adhesiivinen proteiini aktivoidaan hapettamalla kemiallisesti tai entsymaattisesti dihydroksifenyylialaniini(DOPA)-tähteitä kinonien muodostamiseksi, joita käytetään haluttuun kohtaan molekyyleillä, jotka sisältävät KS, CS, DS, HS, HN tai DX tai hyaluronihappoa (HA), ja annetaan kovettua. Adhesiiviset proteiinit käsittävät, rajoittumatta kuitenkaan niihin, adheesioproteiineja, jotka ovat peräisin simpukoista, ostereista, hanhenkauloista, Phragmatopoma californicasta tai Fasciola hepaticasta, tai fibriinin tai minkä tahansa adheesioproteiinin, joka on tuotettu yhdistelmä-DNA-tekniikalla, kemiallisella synteesillä tai degradoimalla ja uudelleenpolymeroimalla jotakin luonnon adheesioproteiinia.

Vielä eräässä suoritusmuodossa molekyylejä, jotka sisältävät estäviä anionisia polymeerejä, voidaan käyttää yhden tai useamman muun estävän anionisen polymeerin ja jonkin adheesioproteiinin kanssa.

Esillä oleva keksintö tuo lisäksi käyttöön koostumuksia, jotka käsittävät estäviä anionisia polymeerejä ja jonkin sopivan farmaseuttisen kantajan, ja menetelmiä koostumusten antamiseksi potilaille arvenmuodostuksen ja fibroosin yleensä estämiseksi ja epäsuotavan luunkasvun, gliasolujen invaasion ja/tai hermosolun viejähaarakkeen liikakasvun estämiseksi.

Esillä oleva keksintö tuo edelleen käyttöön koostumuksia, jotka käsittävät tehokkaita määriä jotakin estävää anionis-

ta polymeeriä, suositeltavimmin dekstraanisulfaattia tai pentosaanipolysulfaattia, tehokkaan määrän jotakin adheesioproteiinia ja jonkin farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan.

3.1. Määritykset

AL	alginaatti
CS	kondroitiinisulfaatti
DS	dermataanisulfaatti
DX	dekstraanisulfaatti
GAG	glykosaminoglykaani
HA	hyaluronihappo
HN	hepariini
HS	heparaanisulfaatti
KS	kerataanisulfaatti
LN	laminiini
PG	proteoglykaani
PS	pentosaanipolysulfaatti

Soluadheesio - alkuperäinen solun pinnan ja alustan välinen vuorovaikutus, jonka tuloksena on kiinnittyminen ja sitä seuraava solun leviäminen.
Solumigraatio - solun liike samassa alustassa.
Soluinvaasio - solun liike yhdentyyppisestä alustasta toisentyyppiseen alustaan.

4. Kuvioiden kuvaus

Kuvio 1. Kaavakuva juova-analyysilevystä, jossa näkyvät vuorottaiset laminiini- (LN) ja proteoglykaani- (PG) plus LN-kaistat ja koko levyn kattava LN-päällyste.
Kuvio 2. DS-PG:n annoksesta riippuva vaikutus 3T3-solun adheesioon, migraatioon ja invaasioon. Mikrovalokuvia elävistä 3T3-soluista, joita on kasvatettu 60 mm:n kudosviljelymaljoissa, jotka on päällystetty kuten kappaleessa 7.1.2., infra, kuvataan, ja näissä kuvissa näkyy vuorottelevia LN- ja DS-PG/LN-kaistoja eri DS-PG-konsentraatioina 3 vuorokauden kasvatuksessa. (A) 0,8 mg/ml DS-PG, (B) 0,4

mg/ml DS-PG, (C) 0,2 mg/ml DS-PG ja (D) 0,1 mg/ml DS/PG. (100X).

Kuvio 3. DS-PG:n ajasta riippuva vaikutus C6-solun adheesioon, migraatioon ja invaasioon. Mikrovalokuvia elävistä C6-soluista, joita on kasvatettu 60 mm:n kudosviljelymaljoissa, jotka on päällystetty kuten kappaleessa 7.1.2., infra, kuvataan, ja näissä näkyy vuorottelevia LN- ja DS-PG/LN-kaistoja konsentraatioilla 0,8 mg/ml DS-PG (A) 2 tunnin, (B) 1 päivän, (C) 2 päivän ja (D) 6 päivän kasvatuksessa. Huomaa eston pysyvyys 6 päivään asti ja rajoittunut soluinvaasio 6. päivänä. (100X).

Kuvio 4. DS-PG:n vaikutus DRG-eksplanttien adheesioon ja solumigraatioon. Mikrovalokuvat esittävät eläviä DRG-eksplantteja, joita on kasvatettu 60 mm:n kudosviljelymaljoissa, jotka on päällystetty kuten kappaleessa 7.1.2., infra, kuvataan, ja niissä näkyy vuorottelevia LN- ja DS-PG/LN-kaistoja. (A) 0,8 mg/ml DS-PG ja (B) 0,4 mg/ml DS-PG. Eksplantit kuviossa (A) ovat kiinnittyneet juovaan, joka sisältää ainoastaan LN:a; yksikään eksplantti ei kiinnittynyt DS-PG:tä sisältävään juovaan. Huomaa dramaattinen solumigraation estyminen, jonka todennäköisimmin saa aikaan liukoistunut DS-PG. Kun läsnä on 0,4 mg/ml DS-PG:tä, eksplantit tarttuvat LN-juovaan ja solumigraatiota esiintyy sillä, mutta DS-PG/LN-kaistalla ei esiinny solun adheesiota, migraatiota eikä invaasiota. (100X).

Kuvio 5. KS/CS-PG:n ajasta riippuva vaikutus C6-solun adheesioon, migraatioon ja invaasioon. Mikrovalokuvia elävistä C6-soluista, joita on kasvatettu 60 mm:n kudosviljelymaljoissa, jotka on päällystetty kuten kappaleessa 7.1.2., infra, kuvataan, ja näissä näkyy vuorottelevia LN- ja KS/CS-PG/LN-kaistoja konsentraatioilla 2,7 mg/ml (A) 2 tunnin, (B) 1 päivän, (C) 2 päivän ja (D) 3 päivän kasvatuksessa. Huomaa adheesion KS/CS-PG-päällystettyyn kaistaan puuttuminen 2:tena ensimmäisenä tuntina maljauksen jälkeen ja muodostuneen kaistan stabiilius 24 vuorokauden ajan maljauksen jälkeen. C6-invaasiota esiintyy KS/CS-PG-kaistassa 2 vuorokautta maljauksen jälkeen ja mitään näyttöä prefe-

rentiaalisesta adheesiosta ei ole havaittavissa 3. päivänä (100X).

Kuvio 6. Hepariinin, dekstraanisulfaatin ja dekstraanin vaikutus solumigraatioon DRG-eksplanteista. Mikrovalokuvia elävistä DRG-eksplanttiviljelyistä 24 tunnin kasvatuksen jälkeen viljelyväliaineessa, joka sisälsi 10 % FCS:ää DMEM/F12:ssa, johon oli lisätty 50 ng/ml NGF:ää. Koeliuoksia lisättiin viljelyväliaineeseen maljauksen yhteydessä ja kuvat esittävät vaikutusta hermosolujen ja ei-hermosolujen migraatioon. (A) kantajaverrokki, (B) 400 µg/ml hepariinia, (C) 200 µg/ml dekstraanisulfaattia, (D) 400 µg/ml dekstraania. Huomaa solumigraation esto hepariinilla ja dramaattinen esto dekstraanisulfaatilla. (100X).

Kuvio 7. Sulfatoitujen hiilihydraattien vaikutus fibroblastien ja 3T3-solujen adheesioon. Rotan aivo-selkäydinkalvofibroblastien (RMF) primaariviljelyjä ja 3T3-soluja pantiin PLL-päällystetyille 96-kuoppaisille mikrotiitterilevyille, joita inkuboitiin 4 tuntia koeyhdisteiden läsnäollessa ja käsiteltiin kappaleessa 7.1.5., infra, kuvattua kolorimetrista soluadheesiokoetta varten. Tiedot ovat tuloksia, jotka saatiin keskimäärin 6 replikaatista per näyte (standardipoikkeama ei noussut yli ±5 %). Koe toistettiin kahdesti olennaisesti samoin tuloksin.

Kuvio 8. Annosvastekäyrä dekstraanisulfaatin vaikutuksesta 3T3-solujen adheesioon. 3T3-soluja pantiin PLL-päällystetyille 96-kuoppaisille mikrotiitterilevyille, inkuboitiin 24 tuntia eri dekstraanisulfaatti- ja dekstraanikonsentraatioilla ja käsiteltiin kappaleessa 7.1.5., infra, kuvattua kolorimetrista soluadheesiokoetta varten. Kukin piste edustaa kolmen replikaation keskiarvoa.

Kuvio 9. Annosvastekäyrät koskien eri molekyylipainon omaavia dekstraanisulfaatteja: vaikutus 3T3-solujen adheesioon. 3T3-soluja pantiin PLL-päällystetyille 96-kuoppaisille mikrotiitterilevyille, inkuboitiin 24 tuntia eri dekstraanisulfaattikonsentraatioilla ja käsiteltiin kappaleessa 7.1.5., infra, kuvattua kolorimetrista soluadheesiokoetta varten. Kukin piste edustaa kolmen replikaation keskiarvoa.

5. Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Esillä oleva keksintö liittyy sen keksimiseen, että tietyt biologisesti sopivat anioniset polymeerit voivat tehokkaasti estää arvenmuodostusta, erityisesti kirurgisisiin toimenpiteisiin liittyviä kiinnikkeitä, ja että nämä anioniset polymeerit, joita nimitetään termillä "estävät anioniset polymeerit", yleensä estävät fibroosia. Keksintö perustuu sen keksimiseen, että anioniset polymeerit estävät tehokkaasti solujen invaasiota, joka liittyy haitallisiin paranemisprosesseihin, s.o. fibroosiin ja arpeutumiseen. Esillä olevan keksinnön mukaisia anionisia polymeerejä voidaan käyttää estämään fibroblastien invaasiota säädellen siten paranemisprosessia ja ehkäisten fibroosia. Esillä olevan keksinnön mukaiset anioniset polymeerit estävät myös gliasolujen invaasiota, luun liikakasvua, hermosolun viejähaarakkeen liikakasvua ja monosyytti/makrofaagi-invaasiota. Esillä oleva keksintö liittyy vielä sen keksimiseen, että teho, jolla jokin anioninen polymeeri estää solujen, esim. fibroblastien, invaasiota, korreloi osaksi polymeerillä olevien anionisten varausryhmien lukumäärän kanssa. Siten esillä oleva keksintö koskee suurta määrää materiaaleja, joita voidaan käyttää estämään arvenmuodostusta ja fibroosia ja erityisesti kirurgisiin toimenpiteisiin liittyviä kiinnikkeitä. Muita anionisia polymeerejä, joita voidaan käyttää keksinnössä, voidaan identifioida tehollisen anionisen kokonaisvarauksen eli tiheyden perusteella.

Keksinnössä käytettäviä estäviä anionisia polymeerejä ovat dekstraanisulfaatti (DX) ja pentosaanipolysulfaatti (PS). Lisäksi voidaan käyttää luonnon proteoglykaaneja tai proteoglykaanien glykosaminoglykaaniosia, mukaanlukien dermataanisulfaatti (DS), kondroitiinisulfaatti (CS), kerataanisulfaatti (KS), heparaanisulfaatti (HS) ja hepariini (HN). Myös alginaattia (AL) voidaan käyttää. Sopivina konsentraatioina edellä olevat molekyylit voivat estää fibroblastien invaasiota tai migraatiota, vieläpä sopivien migraatiota edistävien substraattien, kuten laminiinin, läsnäollessa. Muita anionisia polymeerejä, joita voidaan käyttää esillä

olevassa keksinnössä, ovat selluloosajohdokset. Erään suositeltavan suoritusmuodon mukaan esillä oleva keksintö koskee DX:n käyttömenetelmiä, DX:ää sisältäviä molekyylejä ja koostumuksia fibroblastien invaasion ja fibroosin inhiboimiseen, ehkäisemiseen tai säätelemiseen ja terapeuttisesti, kun niin halutaan. Edelleen keksintö koskee menetelmiä yhden tai useamman anionisen polymeerin käyttämiseksi ja yhden tai useamman anionisen polymeerin sisältäviä koostumuksia fibroblasti-invaasion ja fibroosin inhiboimiseksi ja niiden terapeuttista käyttöä. Tällaiset KS:a, CS:a, DS:a, HS:a tai HN:a sisältävät molekyylit käsittävät, rajoittumatta kuitenkaan niihin, disakkaridi-, glykosaminoglykaani- ja proteoglykaanirakenteet.

Esillä oleva keksintö tuo edelleen käyttöön farmaseuttisia koostumuksia, jotka käsittävät estäviä anionisia polymeerejä tai estäviä anionisia polymeerejä ja jonkin adheesioproteiinin ja jonkin farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan, ja menetelmiä koostumusten antamiseksi potilaille arvenmuodostuksen ja fibroosin yleensä estämiseksi ja epäsuotavan gliasolujen invaasion, luun liikakasvun ja hermosolujen viejähaarakkeen liikakasvun estämiseksi.

Esillä olevan keksinnön mukaiset koostumukset ja menetelmät soveltuvat eläinten, suositeltavimmin nisäkkäiden, ja erityisesti ihmisten hoitamiseen. Terapeuttisesti tehokas määrä koostumusta, joka käsittää jonkin keksinnön mukaisen anionisen polymeerin, voidaan antaa eläimessä olevaan leesioon mitä tahansa tuonnempana selitettyä menetelmää varten.

5.1. Muita anionisia polymeerejä tässä keksinnössä käytettäväksi

Dekstraanisulfaatin, pentosaanipolysulfaatin, glykosaminoglykaanien ja muiden tässä keksinnössä käytettävien anionisten polymeerien (supra) lisäksi esillä oleva keksintö tuo käyttöön muita anionisia polymeerejä, joita voidaan käyttää keksinnössä, perustuen sen keksimiseen, että jonkin

polymeerin tehollinen anionisuus auttaa osaksi määrittämään sen estopotentiaalin (katso kappale 7., infra). Eräässä suoritusmuodossa sellainen käyttöön sopiva anioninen polymeeri on anioninen jonkin happosulfaatin käsittävä polymeeri, jossa rikkipitoisuus on suurempi kuin noin 5 paino-%. Eräässä vielä suositeltavammassa suoritusmuodossa rikkipitoisuus on suurempi kuin noin 10 paino-%.

Esillä olevassa keksinnössä käyttökelpoisia anionisia polymeerejä löytyy runsaasti luonnosta, esim. proteoglykaanit. Vaihtoehtoisesti polymeerejä voidaan johtaa kemiallisesti anionisen polymeerin luomiseksi. Esimerkiksi polyglukoosipolymeeridekstraania voidaan käsitellä keittämällä rikkihapossa ja esteröimällä kloorisulfonihapolla dekstraanisulfaatin tuottamiseksi (katso esim. The Merck Index, 10. painos, 1983, nro 2915, sivu 427). Muita esimerkkejä kemiallisesti valmistetuista anionisista polymeereistä ovat selluloosajohdokset. Polymeerirangat eivät rajoitu hiilihydraattipolymeereihin. Biologisesti sopivia anionisia polymeerejä voidaan hankkia kaupallisista lähteistä (esim. katso kappale 7.1.6., infra). Vaihtoehtoisesti esillä olevassa keksinnössä käytettäviä anionisia polymeerejä voidaan puhdistaa luonnon lähteistä tai valmistaa synteettisesti.

5.2. Koostumuksia fibroosin ja soluinvaasion estämiseksi

Keksintö tuo käyttöön koostumuksia käytettäväksi fibroblastien invaasion, gliasolujen invaasion, hermosolujen viejähaarakkeen liikakasvun, luun liikakasvun ja monosyytti/makrofaagi-invaasion estämisessä. Koostumukset ovat erityisen käyttökelpoisia fibroosin ja arvenmuodostuksen, esim. kirurgisiin toimenpiteisiin liittyvien kiinnikkeiden, ehkäisemisessä. Koostumukset sisältävät keksinnön mukaisia estäviä anionisia polymeerejä. Kun koostumus on tarkoitettu käytettäväksi terapeuttisessa menetelmässä tai hoidossa, se voidaan valmistaa farmaseuttiseksi koostumukseksi, joka sisältää terapeuttisesti tehokkaan määrän jotakin anionista polymeeriä ja jonkin farmaseuttisesti hyväksyttävän täyteaineen tai kantajan, s.o. sopivan käytettäväksi in vivo.

Anionista polymeeriä tulisi suositeltavimmin olla läsnä konsentraationa, joka on suurempi kuin noin 1 mg/ml. Keksinnön mukaisia koostumuksia nimitetään tästedes "estäviksi koostumuksiksi", koska ne sisältävät jonkin soluinvaasiota estävän anionisen polymeerin.

Esimerkiksi eräässä keksinnön mukaisessa estävässä koostumuksessa anioninen polymeeri voi käsittää dekstraanisulfaatin (DX), kerataanisulfaatin (KS), dermataanisulfaatin (DS), kondroitiinisulfaatin (CS), hepariinin (HN), heparaanisulfaatin (HS), alginaatin (AL) tai pentosaanipolysulfaatin (PS). Eräässä suositeltavassa toteutusmuodossa anioninen polymeeri on dekstraanisulfaatti tai pentosaanipolysulfaatti. Eräässä vielä suositeltavammassa toteutusmuodossa anioninen polymeeri on dekstraanisulfaatti, jossa rikkipitoisuus on suurempi kuin noin 10 paino-%. Eräässä vieläkin suositeltavammassa toteutusmuodossa dekstraanisulfaatin keskimääräinen molekyylipaino on noin 40 000 - 500 000 daltonia. Suositeltavimmin dekstraanisulfaatin keskimääräinen molekyylipaino on noin 40 000 daltonia. Dekstraanisulfaatin tulisi mieluiten olla läsnä liuoksessa noin 2-20 mg/ml pitoisuutena.

Kantajia tai täyteaineita, joita voidaan käyttää edellä mainituissa anionisissa polymeereissä, ovat vesiliuokset, kuten vesi, keittosuolaliuos, fysiologisesti puskuroitu keittosuolaliuos, dekstroosiliuos tai mikä tahansa tällainen alalla tunnettu kantaja. Kun anioninen polymeeri sekoitetaan kantajaan, tuloksena voi olla viskoosi neste tai geeli. Nesteen tai geelin viskositeetin lisäämiseksi anioninen polymeeri voidaan verkkouttaa käyttämällä mitä tahansa alaan perehtyneen tuntemaa verkkoutusainetta edellyttäen, että verkkoutettu anioninen polymeeri olennaisesti säilyttää anionisuutensa, s.o. että se ei olennaisesti vaikuta polymeerin negatiiviseen kokonaisvaraukseen.

Eräässä toisessa suoritusmuodossa keksinnön mukainen biologisesti sopiva anioninen polymeeri voidaan yhdistää johon-

kin kiinteään tai puolikiinteään kantajaan, kuten tahnaan, geeliin, vaahtoon tai levyyn. Keksinnön mukainen anioninen polymeeri voidaan sekoittaa mainittuun kantajaan tai täyteaineeseen kolloidiseksi suspensioksi tai seokseksi; vaihtoehtoisesti kantaja tai täyteaine voidaan impregnoida anionisella polymeerillä koostumuksen muodostamiseksi. Kuten ymmärretään, anionisen polymeerin ja kantajan tai täyteaineen sidos voi olla kovalenttinen tai ei-kovalenttinen.

Keksinnön mukaan voidaan käyttää mitä tahansa seuraavista anionisista polymeereistä, mukaanlukien DX, DS, KS, CS, HN, HS, hyaluronihappo (HA), PS tai AL tai mikä tahansa sopivaksi katsottu anioninen polymeeri, katso esim. kappale 5.1. supra, yhdistettynä edellä mainittuihin kantajiin.

Eräässä suositeltavassa suoritusmuodossa anioninen polymeeri voi olla dekstraanisulfaatti tai pentosaanipolysulfaatti. Eräässä suositeltavassa suoritusmuodossa kantaja tai täyteaine voi olla jokin farmaseuttisesti hyväksyttävä kantaja tai täyteaine, s.o. sopiva käytettäväksi in vivo. Suositeltavia puolikiinteitä kantajia ovat dekstraanigeelit, kuten HYSKON-70 (Pharmacia), INTERCEED® (Johnson & Johnson), natiivit kollageenigeelit ja denaturoidut kollageenigeelit, kuten GELFOAM® (Upjohn).

Kuten on selvää, tällaiset koostumukset, jotka sisältävät jonkin anionisen polymeerin ja jonkin farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan tai implantin, ovat suositeltavimmin biologisesti absorboituvia ajan mittaan, mieluiten kuukauden kuluessa. Suositeltavia anionisia polymeerejä ovat dekstraanisulfaatti ja pentosaanipolysulfaatti, dekstraanisulfaatin ollessa suositeltavampi. Tällaisiin biologisesti absorboituviin kantajiin kuuluvat dekstraani, natiivikollageeni ja denaturoitu kollageeni, rajoittumatta kuitenkaan näihin. Jos käytetään jotakin kantajaa, kuten kollageenigeeliä, kollageenin tulisi mieluiten olla verkkoutumaton, jolloin se absorboituu helpommin in vivo.

Eräässä suoritusmuodossa GELFOAMia® voidaan liottaa liuoksessa, jossa on 2-20 mg/ml dekstraanisulfaattia kalsium/-magnesiumvapaassa fosfaattipuskuroidussa keittosuolaliuoksessa (katso kappale 6., infra).

Kuten on selvää, tällaisissa koostumuksissa farmaseuttisesti hyväksyttävä kirurginen polymeeri-implantti, esim. dekstraani, natiivi kollageeni tai denaturoitu kollageeni, käsittää noin 5 % (paino/tilavuus) koostumuksesta, mieluiten enemmän kuin noin 10 % ja eräässä toisessa suoritusmuodossa enemmän kuin noin 20 %. Sellainen koostumus sisältää anionisen polymeerin, esim. dekstraanisulfaatin ja, kuten esimerkeissä, infra, osoitetaan, ne voivat sisältää myös vesiväliainetta.

5.2.1. Estävien molekyylien ja adhesiivisten proteiinien seokset: estävät adheesioaineet

Eräässä erityissuoritusmuodossa estävää anionista polymeeriä voidaan käyttää yhdistettynä sopivaan konsentraatioon tai määrään jotakin adheesioproteiinia tai -proteiineja, jolloin koostumus muodostaa "estävän adhesiivisen aineen", infra, kappaleessa 5.3. kuvattujen terapeuttisten toimintojen aikaansaamiseksi. Käytettäessä estävää molekyyliä liitettynä johonkin adheesioproteiiniin se estäisi estävän molekyylin dispergoitumisen, koska adheesioproteiini toimisi estävän molekyylin paikalleenankkuroijana. Sopiva konsentraatio tai määrä jotakin adhesiivista polymeeriä on konsentraatio tai määrä, joka tarvitaan adhesiivisten ominaisuuksien aikaansaamiseksi.

Tässä käytettynä termi "adheesioproteiini" viittaa proteiiniin tai peptidiin, joka kykenee ei-spesifisesti tarttumaan yhteen tai useampaan molekyyliin tai pintoihin. Keksinnössä voidaan käyttää mitä tahansa luonnon tai yhdistelmä-proteiinia, joka sisältää olennaisen määrän dihydroksifenyylialaniinia (DOPA) ja hydroksyyliä sisältäviä aminohappotähteitä, niin että proteiini voidaan aktivoida tai kovettaa (katso infra). Hakijat ajattelevat, että tässä keksinnössä

voidaan käyttää funktionaalisia peptidejä yhtä hyvin kuin kokoproteiineja. Funktionaalinen peptidi on sellainen, joka sisältää minimimäärän aminohappoja, jotka antavat proteiinille sen tarttumisominaisuudet. Adheesioproteiini voi esimerkiksi, ja keksintöä rajoittamatta, olla fibriini tai jokin kaupallisesti saatavilla oleva fibriiniin perustuva tuote, kuten TUSSUCOL®, TISSEEL® tai HUMAN IMMUNO®. Vaihtoehtoisesti adheesioproteiini voi olla simpukasta peräisin oleva polyfenoliadheesioproteiini, hanhenkaulasta peräisin oleva polyfenoliadheesioproteiini tai osterista peräisin oleva polyfenoliadheesioproteiini. Eräitä bioadhesiivisia proteiineja on kaupallisesti saatavilla, esim. ADHERACELL® (Genex Corp.) Gaithesburg, MD) ja MAP ("mussel adhesive protein", Bio-Polymers, Inc., Farmington, CT). Adheesioproteiini voi käsittää Phragmatopoma californicasta tai Fasciola hepaticasta (maksamato) peräisin olevan DOPA-proteiinin. Simpukasta, hanhenkaulasta tai osterista peräisin oleva polyfenoliadheesioproteiini voidaan uuttaa ja puhdistaa eläimen fenolirauhasesta tai se voidaan tuottaa yhdistelmätekniikalla (kansainväliset patenttijulkaisut WO 88/03953, 1988, ja WO 88/07076, 1988; Strausberg ym., 1989, julkaisussa "Adhesives from Renewable Sources", ACS Symposium Series 385, Hemingway and Conner, toim., ss. 453-464).

Tämän keksinnön mukaisissa farmaseuttisissa koostumuksissa voidaan ajatella käytettäväksi polyfenoliadheesioproteiineja, jotka ovat peräisin simpukasta, hanhenkaulasta tai osterista ja jotka on tuotettu kemiallisesti tai proteolyyttisesti pilkkomalla uutettua luonnon molekyyliä tai yhdistelmätekniikalla. Eräässä toisessa suoritusmuodossa adheesioproteiinina voi olla peptidejä, jotka on kemiallisesti polymeroitu jostakin adheesioproteiinista, esim. proteolyyttisesti tai kemiallisesti digeroimalla ja sen jälkeen polymeroimalla glutaraldehydillä Mytilus edulis -proteiinin fragmentteja (US-patentti nro 4585585).

Vielä eräässä toisessa suoritusmuodossa adheesioproteiini voi olla jokin yhdistelmätekniikalla tuotettu adheesioproteiinin analogi. Yhdistelmätekniikalla tuotettu adheesioproteiinianalogi voi olla johdettu simpukan, hanhenkaulan tai osterin polyfenoliadheesioproteiinista tai mistä tahansa muusta adheesioproteiinista. Adheesioproteiinien fragmentteja ja analogeja, jotka sisältävät tavanomaisia aminohapposubstituutioita, voidaan käyttää adheesioproteiineina tätä keksintöä käytännössä toteutettaessa. Yhdistelmätekniikalla tuotettu adheesioproteiinianalogi voi sisältää osia useammasta kuin yhdestä proteiinista, jotka ovat peräisin simpukasta, hanhenkaulasta tai osterista tai Phragmatopoma californicasta, Fasciola hepaticasta tai mistä tahansa niihin verrattavissa olevasta proteiinista. Jos on tarpeen, adheesioproteiini voidaan hydroksyloida kemiallisesti tai entsymaattisesti. Esimerkiksi käsittelemällä tyrosiinia sieniperäisellä tyrosinaasilla tai Streptomyces antibioticuksella voidaan muuntaa jokin adheesioproteiinin prekursori. Niinpä tämän keksinnön mukaiset farmaseuttiset koostumukset voivat käsittää puhtaasti rakennetun adheesioproteiinin, johon sisältyvät luonnossa esiintyvien adheesioproteiinien periaatteet.

Eräässä suoritusmuodossa estävä molekyyli ja adheesioproteiini voidaan liittää toisiinsa ei-kovalenttisesti ennen adheesioproteiinin aktivoimista ja kovettamista. Eräässä toisessa suoritusmuodossa estävä molekyyli voidaan sitoa kovalenttisesti adheesioproteiiniin ennen aktivoimista ja kovettamista.

Keksinnön mukaiset adheesioproteiinit täytyy kovettaa, jotta niiden tarttuminen haluttuun pintaan käy mahdolliseksi. Kovettaminen käsittää estävän adheesiokoostumuksen, erityisesti adheesioproteiinin, aktivoimisen, minkä jälkeen aktivoidun proteiinin annetaan reagoida halutun molekyylin kanssa. Entsymaattiset tai kemialliset prosessit initioivat kovettumisen. Kun kysymyksessä ovat polyfenoliset adheesioproteiinit, kovettuminen voidaan saattaa käyntiin hapetta-

malla DOPA kinoniksi. Hapettuminen voi seurata ilmalle altistumisesta, käsittelystä jollakin entsyymillä, esim. katekolioksidaasilla, tai jollakin kaupallisella oksidaasiverkkoutusaineella, esim. COXilla (Bio-Polymers, Inc.). Edellä mainitut tarjotaan käyttöön esimerkkeinä eikä keksinnön rajoittamiseksi; alaan perehtynyt tuntee muita hapettavia aineita tai menetelmiä. Fibriinin kovettuminen saatetaan käyntiin pilkkomalla fibrinogeeni, esimerkiksi trombiinilla. Fibriinimonomeerit polymeroituvat spontaanisti; sitä seuraava transamiinin vaikutus katalysoi kovalentin verkkoutumisen. Kovetusprosessi täydentyy aktivoidun proteiinin sitoutuessa kovalenttisesti tai ei-kovalenttisesti ympäristön molekyyleihin tai pintoihin.

Niinpä estävä adheesiokoostumus voidaan levittää leesiokohtaan ja sen voidaan antaa kovettua. Estävän molekyylin ankkuroituminen paikalleen adheesioproteiinin avulla lisännee estävien molekyylien tehoa pidentämällä paikallisen vaikuttavan konsentraation viipymisaikaa, jolloin se estää tehokkaammin fibroblastien invaasion tapahtumista ja fibroosia, gliasolujen invaasiota, hermosolujen viejähaarakkeen liikakasvua ja luun liikakasvua. Edullisia tuloksia voitaisiin odottaa, kun estävän molekyylin ja adheesioproteiinin koostumuksia käytettäisiin ja kovetettaisiin kirurgisten leikkausten, haavojen ja yleisten traumojen kohdalla.

5.3. Terapeuttisia menetelmiä

Tämän keksinnön käyttöön tuomia koostumuksia voidaan käyttää erilaisten tilojen hoitamiseen, joissa toivotaan sellaista menetelmää eläimen hoitamiseksi, jolla estetään fibroblastien invaasio ja fibroosi, granuloituminen ja erityisesti arven muodostuminen. Keksintö tuo siis käyttöön menetelmiä fibroosin, granuloitumisen ja arven muodostumisen estämiseksi johonkin leesioon, joissa menetelmissä leesiokohtaan käytetään jotakin estävää koostumusta tai estävää adheesiokoostumusta. Se tuo käyttöön myös menetel-

miä farmaseuttisten koostumusten antamiseksi terapeuttista hoitoa silmällä pitäen.

5.3.1. Yleiset indikaatiot

Estäviä koostumuksia, jotka käsittävät jonkin estävän anionisen polymeerin tai estävän adheesiokoostumuksen, voidaan käyttää sulkuina solujen migraatiolle, jonka aiheuttaa trauma, kirurgiset toimenpiteet, infektio (virus- tai bakteeri-infektio), aineenvaihduntasairaus, pahanlaatuiset kasvaimet, altistuminen myrkyllisille aineille ja muut tilanteet, joissa esiintyy liikakasvua. Esimerkiksi takajuuren hermosolmuke, näköhermo tai näköhermoristi voidaan päällystää estävällä koostumuksella sen suojaamiseksi kontrolloimattomalta soluinvaasiolta ja adheesiolta. Gliasolujen invaasio, hermosolujen viejähaarakkeen liikakasvu ja luun liikakasvu samoin kuin fibroblastien invaasio voidaan estää esillä olevan keksinnön mukaisilla menetelmillä. Jonkin elimen tai kudoksen suojaaminen estävällä koostumuksella voi olla ennalta ehkäisevää eli profylaktista. Estävistä adheesiokoostumuksista saadaan suositeltava päällystyskoostumus.

5.3.2. Kirurgia

Eräässä suoritusmuodossa epiduraalinen (tai periduraalinen) fibroosi voidaan estää aplikoimalla tämän keksinnön mukaista koostumusta kirurgiseen leesioon. Eräässä suoritusmuodossa leesioon voidaan käyttää kollageenigeelin kappaletta, johon on imeytetty liuosta, joka sisältää jonkin keksinnön mukaisen anionisen polymeerin. Eräässä toisessa suoritusmuodossa anioninen polymeeri voidaan käyttää jossakin kantajassa tai täyteaineessa, kuten tahnana, geelinä tai levynä. Vielä eräässä suoritusmuodossa anioninen polymeeri voidaan liuottaa tai suspendoida johonkin kantajaan, kuten fysiologisesti puskuroituun keittosuolaliuokseen, ja levittää sumuttamalla tai aerosolina. Eräässä suositeltavassa suoritusmuodossa voidaan käyttää jotakin farmaseuttista kantajaa tai täyteainetta.

Esillä oleva keksintö tuo käyttöön materiaaleja ja menetelmiä laminektomiaa seuraavan fibroosin estämiseksi, erityisesti lumbaalilaminektomiaa seuraavan epiduraalisen (periduraalisen) fibroosin estämiseksi (katso kappale 6., infra). Keksintöä rajoittamattomana esimerkkinä puolikiinteän farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan palasia liotetaan dekstraanisulfaatissa tai muussa esillä olevan keksinnön mukaisessa anionisessa polymeerissä. Liotettu kantaja voidaan valmistaa etukäteen tai kirurgisen toimenpiteen aikana. Kantaja voidaan liottaa dekstraanisulfaattiliuoksessa tai jonkin muun keksinnössä käytettävän anionisen polymeerin liuoksessa kalsium/magnesiumvapaassa fosfaatilla puskuroidussa keittosuolaliuoksessa (CMF-PBS) tai missä tahansa in vivo käytettäväksi sopivassa liuoksessa. Kun kantaja on kyllästetty anionisella polymeerillä, palaset insertoidaan laminektomiakohtaan. Kun käytetään edellä selostettua menetelmää, kohdassa, johon laminektomia on tehty, esiintyy uusintaleikkauksessa minimaalisen vähän arpikudoksen muodostusta ja luun ylimääräistä kasvua, kantaja voidaan helposti poistaa ja dura mater nähdään sileänä läpinäkyvänä kalvona. Haitalliseen fibroosiin liittyviä anatomisia piirteitä, s.o. arpeutumista ja leikkauskiinnikkeitä, jotka pitävät pinteessä hermojuuria, ei ole.

Keksinnön mukaisilla anionisilla polymeereillä ja niitä sisältävillä koostumuksilla on käyttöä myös ei-toivotun luunkasvun estämisessä, jolloin kohtaan, jossa luunkasvu halutaan estää (katso kappale 6., infra), pannaan terapeuttisesti tehokas määrä anionista polymeeriä. Lisäksi anionisia polymeerejä voidaan käyttää muiden indikaatioiden, joissa luunkasvua halutaan estää, hoitamiseen. Tämä pätee erityisesti lapsiin, kun tietyissä proseduureissa, kuten kraniostenoosissa, luunkasvu ei ole toivottavaa.

Vielä eräässä suoritusmuodossa esillä oleva keksintö tuo käyttöön koostumuksen ja menetelmän munanjohtimen kudoksen fibroosin ja arpeutumisen estämiseksi. Erityisesti voidaan estää munanjohtimessa ja sen ympäristössä kirurgisten toi-

menpiteiden aiheuttamien leesioiden fibroosi ja arpeutuminen. Munanjohtimien fibroosi, joka on seurauksena infektiosta tai muista syistä, on hedelmättömyyden syy 25-30 %:ssa tapauksista. Lantion seinämien kiinnikkeet aiheuttavat myös hedelmättömyyttä. Koska arpikudosta muodostuu kirurgisten toimenpiteiden jälkeen, kiinnikkeiden poistaminen yksinomaan kirurgisesti ei ole asianmukaista hoitoa. Siten esillä olevan keksinnön tärkeä sovellus on hedelmättömyyden hoito.

Seuraavassa esimerkissä ehdotetaan erästä keksinnön monista käyttötavoista munanjohdinkudoksen hoidossa kirurgisten toimenpiteiden jälkeen. Jotakin anionista polymeeriä sisältävien koostumusten kyky estää rotan munatorven fibroosia standardin mukaisten leesioiden jälkeen voidaan testata. Eläinmallin, esim. naaraspuolisen Lewisin rotan vatsanahka ja -lihas voidaan leikata vatsaontelon avaamiseksi. Munatorven seinämään voidaan tehdä viilto. Kohdun limakalvoon tehdään standardin mukainen traumaattinen leesio ja sitten puolikiinteä farmaseuttisesti hyväksyttävä kantaja, joka on kyllästetty jollakin sopivalla anionisella polymeerillä, esim. dekstraanisulfaatilla, voidaan työntää leesiokohtaan.

Eräässä suositeltavassa menetelmässä munanjohdinkudoksen hoitamiseksi leikkauksen jälkeen geeli tai tahna, joka sisältää jonkin anionisen polymeerin, voidaan insertoida leesiokohtaan, jolloin keho resorboi luonnollisesti estävän koostumuksen vaurion parantumisen jälkeen tai työntää sen ulos hydrotubaation kautta. Kun estävä koostumus on viety sisään, vatsalihakset ja vatsakalvo suljetaan ja ommellaan. Ihoviilto suljetaan myös.

Alan tavallisen tuntemuksen omaava ymmärtänee edellä sanotusta, että esillä oleva keksintö tuo käyttöön hoitomenetelmän, joka on suositeltava minkä tahansa kirurgisen toimenpiteen yhteydessä. Edellä selostettuja menetelmiä voidaan käyttää estämään fibroosia, arven muodostumista ja keloidin muodostumista kirurgisen toimenpiteen jälkeen.

Keksinnön mukaisia menetelmiä voidaan käyttää kirurgisissa toimenpiteissä, joissa halutaan saada mahdollisimman vähäinen arpi, erityisesti plastiikkakirurgiassa, s.o. rekonstruktiivisessa tai kosmeettisessa kirurgiassa. Muita kirurgisia indikaatioita ovat vatsakirurgia, nivelkirurgia, jännekirurgia, lantion seinämien kiinnikkeet, vatsaontelokirurgia, thorax-kirugia, verisuonikirurgia ja sydänkirurgia, erityisesti ohitusleikkaukset, läpänvaihtoleikkaukset, sydänverisuonikirurgia tai muu avosydänkirurgia.

Esillä oleva keksintö tuo vielä käyttöön hypertonisten ja keloidiarpien hoidon. Epämuotoiset ja liikkuvuutta haittaavat arvet palaavat usein takaisin, kun ne on kirurgisesti poistettu. Estävien tai estävien adheesiivisten koostumusten käyttäminen saattaa rajoittaa tai estää hypertonisten tai keloidisten arpien muodostumista arven poistamiseksi suoritetun hoidon jälkeen.

Vielä eräässä suoritusmuodossa keksinnön mukaisia anionisia polymeerejä voidaan käyttää menetelmässä fibroosin estämiseksi implantin ympäristössä ja tässä menetelmässä implantiin levitetään koostumusta, joka sisältää terapeuttisesti tehokkaan määrän jotakin keksinnön mukaista anionista polymeeriä. Esimerkkejä implanteista, joiden yhteydessä arven muodostuminen ja fibroosi halutaan estää, ovat munuaisavanneputki, peritoneaalinen valutusputki, keinotekoinen hiippaläppä, keinotekoinen sydämen läppä, ääreishermon korjaus ja muut proteesit ja laskimonsisäinen katetri, keksinnön kuitenkaan rajoittumatta näihin. Implantit voidaan käsitellä päällystämällä tai kyllästämällä ne keksinnön mukaisella koostumuksella. Keksintö tuo vielä käyttöön parannetun implantin, jossa parannus käsittää implantilla olevan päällysteen, joka muodostuu sopivasta määrästä jotakin estävää adheesikoostumusta. Implantit voivat olla polymeeri-implantteja. Mainituilla polymeeri-implanteilla voi olla erilaisia koostumuksia, huokoskokoja ja muotoja ja niitä voivat olla nitroselluloosasta tehdyt biologisesti yhteensopivat polymeerit, polyanhydridit ja akryylipolymeerit,

keksinnön kuitenkaan rajoittumatta näihin. Implantin muodostava polymeeri voi itse olla jokin anioninen polymeeri.

5.3.3. Nivelissä olevien fibroottisten leesioiden hoito

Esillä olevan keksinnön mukaisia estäviä koostumuksia voidaan käyttää erilaisten fibroottisten nivelleesioiden hoidossa. Urheiluun liittyvästä fyysisestä harjoittelusta ja kosketuksesta on usein tuloksena tapaturmavammoja. Tapaturmavamman, kuten putoamisen tai törmäyksen, aiheuttama nivelien fibroosi tekee vammautuneen nivelen jäykäksi ja liikkeen kivuliaaksi. Vammautuneelle alueelle muodostuu arpikudosta jännevaurion jälkeen. Ohimo-alaleukanivelen toimintahäiriössä leuan liike on rajoittunut ja se saattaa olla kivulias.

Eräs menetelmä nivelvaurioiden hoitamiseksi on avata nivel kirurgisesti tai mennä niveleeseen nivelentähystyksen avulla ja poistaa kiinnikkeet. Näiden menetelmien haittana on, että ne indusoivat edelleen fibroosia paranemisprosessin aikana. Koostumuksen, joka sisältää jotakin keksinnön mukaista estävää anionista polymeeriä, käyttäminen estäisi myöhemmän fibroosin ja kiinnikkeiden muodostumisen nivelessä lisäten siten onnistuneen terapian mahdollisuutta.

Ortopedikirurgit voivat käyttää keksintöä urheilun tai onnettomuuksien aiheuttamien nivelvammojen hoidossa. Suukirurgit havaitsevat keksinnön käyttökelpoiseksi ohimo-alaleukanivelen toimintahäiriöiden eräiden muotojen hoidossa. Hoitomenetelmissä käytettäviä anionisia polymeerejä kuvataan kappaleessa 5. ja 5.1., supra, ja koostumuksia kuvataan kappaleessa 5.2. ja 5.2.1., supra. Eräässä suositeltavassa suoritusmuodossa voidaan käyttää dekstraanisulfaattia, jossa rikkipitoisuus on suurempi kuin 10 paino-%. Eräässä vielä suositeltavammassa suoritusmuodossa dekstraanisulfaatin keskimääräinen molekyylipaino on noin 40 000-500 000 daltonia.

5.3.4. Gliasoluinvaasion estäminen

Esillä olevan keksinnön mukaisia anionisia polymeerejä, kuten dekstraanisulfaattia, pentosaanipolysulfaattia, alginaattia ja anionisia polymeerejä, joilla on korkea-asteinen anionisuus, esim. sulfatoituja anionisia polymeerejä, joiden rikkipitoisuus on noin 10 % ja joissa rikki on happamana sulfaattina, voidaan käyttää gliasoluinvaasion estämismenetelmässä, jossa mainittua anionista polymeeriä annetaan kohtaan, jossa gliasoluinvaasio halutaan estää. Erilaisissa suoritusmuodoissa gliasoluinvaasion aiheuttaa jokin sairaus tai häiriö, kuten tapaturma, leikkaushoito, virusinfektio, bakteeri-infektio, aineenvaihduntasairaus, pahanlaatuinen kasvan, altistuminen myrkyllisille aineille tai hyperplastiset tilanteet. Gliasolu voi olla astrosyytti.

Eräässä toisessa suoritusmuodossa estäviä adhesiivisia koostumuksia voidaan käyttää gliasolumigraation tai -invaasion sulkuina. Estävät adhesiiviset koostumukset tuovat käyttöön erään suositeltavan menetelmän jonkin elimen tai kudoksen suojaamiseksi edellä mainituilta tiloilta päällystysmenettelyn avulla. Esimerkiksi takajuuren hermosolmu, näköhermo tai näköhermoristi voidaan päällystää estävällä adheesiokoostumuksella sen suojaamiseksi hallitsemattomalta soluinvaasiolta tai -adheesiolta. Fibrolastit samoin kuin gliasoluinvaasio voitaisiin estää tällä menetelmällä. Jonkin elimen tai kudoksen päällystäminen estävällä adheesioaineella voi olla ennalta ehkäisevää eli profylaktista tai se voi olla hoitotapahtuma potilailla, joissa häiriö on jo ilmennyt.

5.3.5. Hermosoluinvaasion estäminen

Menetelmiä soluinvaasion estämiseksi antamalla anionisia polymeerejä, joiden anionisuus on korkea-asteista, esim. sulfatoituja anionisia polymeerejä, joiden rikkipitoisuus on suurempi kuin noin 10 %, ja niitä sisältäviä farmaseuttisia koostumuksia, voidaan käyttää hermosolujen hallitsemattoman kasvun estämiseksi. Eräässä erityissuoritusmuodos-

sa voidaan käyttää jotakin estävää adheesiokoostumusta. Anioninen polymeeri voidaan aplikoida alueelle, jossa hermosolujen hallitsematon kasvu tai gliasoluinvaasio halutaan estää. Eräässä suoritusmuodossa estävää koostumusta voidaan käyttää potilaiden, joilla on hermotukikudoskasvaimia tai hermokudoskasvaimia, esim. pahanlaatuisia kasvaimia, kuten neuroblastooma, hoitaminen.

Eräässä toisessa suoritusmuodossa estävää koostumusta voidaan käyttää neurooman (ohjaamaton aksonin kasvu, joka liittyy tilanteisiin, joissa aksonilla ei joko ole sopivaa kohdetta tai substraattireittiä hermosolujen kehittymiselle) hoitoon. Estävää koostumusta voidaan esimerkiksi käyttää amputaatioon, leesioon tai synnynnäisiin epämuodostumiin liittyvän neurooman hoitoon, vain muutamia tiloja mainitaksemme. Tavallisesti lähellä olevaan luuhun porataan reikä ja aksoni sijoitetaan reikään. Usein tämä menetelmä epäonnistuu, koska aksoni irtoaa reiästä ja muodostuu neurooma. Käyttämällä keksinnön mukaista estävää koostumusta hermopäätteen ja luun päällystämiseen päästäisiin tästä tavallisesta puutteesta tarjoamalla ympäristö, joka estää aksonin ohjaamattoman kasvun. Vaihtoehtoisesti estävää koostumusta voidaan käyttää polymeeri-"hatussa", s.o. polymeerisylinterissä, jossa on yksi suljettu pää. Jotakin esillä olevan keksinnön mukaista anionista polymeeriä voidaan käyttää hatun sisäpinnan päällystämiseen muodostaen siten ympäristön, joka estää hermosolujen viejähaarakkeen hallitsemattoman kasvun ja neurooman muodostumisen. Eräässä toisessa suoritusmuodossa polymeerihattu voi käsittää jonkin anionisen polymeerin.

Eräässä suositeltavassa suoritusmuodossa estävää adheesiokoostumusta voidaan käyttää neurooman hoitoon. Keksinnön mukaisen estävän adheesiokoostumuksen käyttö aksonin ja luun päällystämiseen (1) ankkuroisi aksonin luussa olevaan reikään ja (2) toisi käyttöön estävän ympäristön. Vaihtoehtoisesti estävää adheesiokoostumusta voidaan käyttää hermopäätteen ankkuroimiseen polymeeri-"hattuun".

Häiriöitä, jotka ovat seurausta hermon kasvua edistävien tekijöiden, mukaanlukien hermonkasvutekijä, siliaarinen neurotrofinen tekijä, aivojohteinen kasvutekijä, laminia, NCAM, L2 ja SSEA-1, rajoittumatta kuitenkaan näihin, ylituotannosta, voidaan myös hoitaa käyttämällä jotakin estävää koostumusta tai estävää adheesiokoostumusta. Estävää koostumusta tai estävää adheesiokoostumusta voidaan käyttää keskushermoston ja/tai ääreishermoston häiriöiden hoitoon.

5.3.6. Antotavat

Menetelmiä keksinnön mukaisten estävien anionisten polymeerien tai estävien liimakoostumusten sisäänviemiseksi ovat alaan perehtyneen tuntemat menetelmät. Saattaa olla suotavaa viedä keksinnön mukaiset estävät koostumukset tai estävät liimakoostumukset kysymyksessä olevaan kohtaan mitä tahansa sopivaa tietä. Tämä voidaan suorittaa esimerkiksi, mutta rajoittumatta kuitenkaan tähän, paikallisena infuusiona tai aplikoimalla leikkauksen aikana, injektoimalla, aerosolina, katetrin avulla tai implantin avulla, mainitun implantin ollessa huokoista, ei-huokoista tai geelimäistä ainetta, mukaanlukien kalvot, kuten silastiset kalvot, tai kuidut. Eräässä suositeltavassa suoritusmuodossa implantti päällystetään tai impregnoidaan jollakin tämän keksinnön mukaisella estävällä liimakoostumuksella. Polymeeri-implantit, jotka on käsitelty estävällä molekyylillä tai suositeltavammin päällystetty estävällä liima-aineella, voidaan aplikoida tai insertoida haluttuun hoitokohtaan. Tällaiset polymeerit voivat vaihdella koostumukseltaan, huokoskooltaan ja muodoltaan. Polymeerejä, joita voidaan käyttää, ovat nitroselluloosasta, polyanhydrideistä ja akryylipolymeereistä valmistetut, rajoittumatta kuitenkaan niihin.

Keksintö tuo käyttöön estävän koostumuksen tai estävän liimakoostumuksen aplikoimisen kirurgisilla toimenpiteillä. Estävä anioninen polymeeri tai estävä liima-aine voidaan aplikoida leikkaushaavaan. Anioninen polymeeri tai estävä liima-aine voidaan aplikoida suoraan kudosvauriokohtiin tai

päällystää koko elin sillä tai sulkea leikkaushaava sillä. Milloin sopivaa, estävän anionisen polymeerin tai estävän liimakoostumuksen käyttö voidaan suorittaa ortoskooppisilla toimenpiteillä.

Ajatellaan, että kun estäviä liimakostumuksia viedään sisään, adheesioproteiinilla on mahdollisuus kovettua (katso kappale 5.2.1, supra) halutussa kohdassa ja ankkuroida estävä molekyyli optimaalisen tehokkaasti. Kovettuminen voi tapahtua ilmaympärstössä, kuten silloin kun estävä adheesiokoostumus aplikoidaan leikkaushaavaan, tapaturmahaavaan tai elimeen tai kudokseen klassisen avokirurgian aikana. Vaihtoehtoisesti kovettuminen voi tapahtua in situ koostumuksen altistuessa heikoille hapettaville molekyyleille, tai luonnostaan, kun koostumuksen viskositeetti on sellainen, että koostumus jää halutun kohdan läheisyyteen kovettumisen tapahtuessa.

6. Esimerkki: Epiduraalisen fibroosin eläinmallit

Epiduraalinen fibroosi viittaa arpikudokseen, joka muodostuu laminektomian jälkeen. Arpikudos muodostuu kohtaan, josta laminektomia on suoritettu ja se sitoo selän ojentajalihasten alapinnan kovakalvon taka- ja sivupintohin ja hermojuuriin, jotka kulkevat kovakalvon läpi. Arpikudoksen kiinnittymisen hermojuuriin uskotaan olevan syynä pitkäaikaiseen toistuvaan kipuun laminektomian jälkeen.

Epiduraalista fibroosia tutkittiin lumbaalilaminektomian jälkeen rotissa, kaniineissa ja koirissa. Näissä malleissa suoritettiin laminektomia ja sitten koeainetta aplikoitiin laminektomiakohtaan. Sen jälkeen laminektomiakohtia tutkittiin fibroosin kannalta karkean dissektion avulla tai histologisella analyysillä.

Näissä esimerkeissä koostumus, joka oli tarkoitettu käytettäväksi koeaineena estämässä epiduraalista fibroosia yleensä, valmistettin käyttäen dekstraanisulfaattia, jonka molekyylipaino oli 40 kDa, Gelfoam-jauhetta ja fosfaattipusku-

roitua keittosuolaliuosta. Näillä kolmella komponentilla on pitkä turvallisuushistoria kliinisessä käytössä ihmisille laskimoon annettuna, suun kautta annettuna ja parenteraalisesti annettuna. Eräissä seuraavassa kappaleessa käsitellyistä kokeista käytettiin dekstraanisulfaattia, jonka molekyylipaino oli 500 kDa, ja Gelfoam-sientä Gelfoam-jauheen sijasta vehikkelinä. Näillä variaatioilla ei näyttänyt olevan vaikutusta kliiniseen tulokseen rotta-, kaniini- ja koiramalleissa.

Näissä alla kuvatuissa eläinmalleissa ei esiintynyt eroja antifibroositehossa 40 kDa:n ja 500 kDa:n dekstraanisulfaattimateriaalien välillä. Kirjallisuudessa esiintyvät tiedot kuitenkin osoittivat, että molekyylipainoltaan pienempi materiaali saattaa olla vähemmän toksinen kuin suuremman molekyylipainon omaavat materiaalit (vaikkakaan alla kuvatuilla konsentraatioilla mitään toksisuutta ei havaittu). Kun tämä määritys oli tehty, suoritettiin seuraava koe käyttäen 40 kDa:n dekstraanisulfaattia.

Päätettäessä sopivasta vehikkelistä käytettäväksi dekstraanisulfaatin yhteydessä testattiin useita materiaaleja, Gelfoam-sientä, Pluronic-geeliä, gelatiinia, kollageenia ja Gelfoam-jauhetta. Koetulosten ja kirurgin preferenssin perusteella valittiin Gelfoam-jauhe formuloituna geeliksi, joka sisältää dekstraanisulfaattia. Monissa seuraavassa kappaleessa käsitellyistä kokeista käytettiin Gelfoam-sientä jauheen sijasta. The Upjohn Companyn, sekä sienen että jauheen valmistajan, antamassa informaatiossa sanotaan, että jauhe on itse asiassa sienimateriaalia, joka on prosessoitu jauhemuotoon. Emme ole havainneet minkäänlaisia kliinisiä eroja Gelfoam-sienellä ja Gelfoam-jauheella saaduissa tuloksissa.

6.1. Rottamalli

6.1.1. Koemalli

Laminektomiat (kuvataan alla) suoritettiin lannenikamien L3 ja L5 kohdalta itseohjautuvien verrokkien saamiseksi kussa-

kin eläimessä. GELFOAM®-kappaleita (Upjohn), jotka oli liotettu koeliuoksessa tai verrokkiliuoksessa, insertoitiin laminektomiakohtaan. Liotetut GELFOAM®-kappaleet valmisteltiin ja merkittiin koodeilla 24 tuntia etukäteen. GELFOAM®-kappaleet liotettiin kalsium/magnesiumvapaaseen fosfaattipuskuroituun keittosuolaliuokseen (CMF-PBS) liuotetussa dekstraanisulfaatissa, CMF-PBS:ään liuotetussa dekstraanissa tai pelkästään CMF-PBS:ssä. Joistakin laminektomiakohdista GELFOAM®-kappaleet jätettiin pois, jotta ne toimivat näennäisleikkauksina. Sen jälkeen suoritettiin arviointi karkeadissektion avulla tietämättä mitä liuoksia mihinkin laminektomiakohtaan oli pantu. Kokeet olivat näin kaksoissokkokokeita.

6.1.2. Laminektomia

Lewisin sisäsiittoisia rottia nukutettiin 4-prosenttisella kloraalihydraatilla (34 mg/100 g ruumiinpainoa). Selkänahka viillettiin auki ja selkärangan viereiset lihakset erotettiin lannenikamien L2-L6 okahaarakkeista. L3:n ja L5:n okahaarakkeet poistettiin jyrsimillä; sitten nikamalevy poistettiin mikrojyrsimillä ja nikamankaareen tehtiin suorakulmainen defekti, jonka koko oli 4x2 mm. Hemostaasi suoritettiin käyttämällä epinefriiniillä kasteltuja vanupellettejä ja hellävaraista painantaa. Kun verenvuoto oli lakannut, laminektomiakohtaan pantiin GELFOAM®-kappale satunnaisprotokollan mukaan. Päällä olevat selkärangan viereiset lihakset suljettiin kohdan päältä ompelemalla pintapeitinkalvot resorboituvalla 6-0 PDS II:lla (Ethicon). Ihoviilto suljettiin haavaklipseillä.

6.1.3. Analyysi

Eläimiä pidettiin kaksi viikkoa ennen silmämääräistä arviointia. Aikakokeissa eläimiä pidettiin 4, 8, 16, 26 ja 36 viikkoa. Tuolloin rotat nukutettiin 4-prosenttisella kloraalihydraatilla ja haava avattiin uudelleen viiltämällä iho ja erottamalla selkärangan viereiset lihakset. Laminektomiakohdan päällä olevan arpikudoksen laatu ja määrä, GELFOAMin® esiintyminen ja uuden luun kasvun laajuus arvi-

oitiin visuaalisesti ja koskettamalla terävässä dissektiossa kovakalvoon saakka. Kun silmämääräinen arviointi oli suoritettu, rotat tapettiin nukutusaineen yliannoksella.

6.1.4. Tulokset

Kaikki silmämääräiset arvioinnit tehtiin ennen hoitokoodin murtamista, mutta havainnot taulukoitiin ja ne on esitetty alla käsittelyryhmittäin. Kriteerit arviointia ja epiduraalisen fibroosin määrän määrittämistä varten on esitetty taulukossa 1.

Taulukko 1

Kriteerit silmämääräistä arviointia varten

Pinta-arpi	1 - Ohut ja mureneva
	2 - Keskipaksu
	3 - Paksu ja kova
GELFOAMin® esiintyminen	0 - Poistettiin yhtenä kappaleena
	1 - Poistettiin useana kappaleena
	2 - Osittain kiinnittynyt ympäröivään kudokseen
	3 - Lujasti kiinnittynyt ja vaikea poistaa
Syväarpi	0 - Kovakalvo selvästi näkyvissä
	1 - Ohut arpikudoskerros kovakalvon päällä
	2 - Kohtalainen arpikudoskerros kovakalvon päällä
	3 - Paksu arpikudoskerros kovakalvon päällä
Luunkasvu	0 - Ei uutta luuta kasvanut laminektomiakohdan päälle
	1 - Minimaalista luunkasvua laminektomiakohdan päällä
	2 - Kohtalaista luunkasvua laminektomiakohdan päällä
	3 - Paksua luunkasvua laminektomiakohdan päällä

Kaikilla eläimillä ihoviilto ja alla oleva pintakalvo ja selkärangan viereiset lihakset olivat parantuneet hyvin.

Kaikissa laminektomiakohdissa selkärangan viereisten lihasten irrottaminen paljasti arpikudoskerroksen.

Dekstraanisulfaattikohdissa pinnalla oleva arpikudos todettiin ohueksi kerrokseksi ja se oli helposti kuorittavissa alla olevasta GELFOAMista®. GELFOAM® voitiin poistaa helposti laminektomiakohdasta yhtenä tai kahtena kappaleena. Kun GELFOAM® oli poistettu, kovakalvo oli näkyvissä sileänä ja läpinäkyvänä kalvona. Itse laminektomiakohta ei ollut havaittavasti muuttunut kooltaan; kohdan reunat näyttivät sileiltä.

Negatiiviset verrokkikohdat (dekstraani tai CMF-PBS) olivat dramaattisesti erilaiset. Ensimmäinen ero havaittiin arpikudoksen pintakerroksessa: tämä kerros tarttui GELFOAMiin®. Kun arpikudos oli poistettu, verenvuoto alkoi GELFOAMissa® ja sen ympärillä (verenvuotoa ei esiintynyt, kun dekstraanisulfaatilla kasteltu GELFOAM® poistettiin). Toinen ero oli GELFOAMin® rakenteessa: se oli erittäin murenevaa ja hajosi, kun poistimme sen. Kun GELFOAM® oli poistettu, oli nähtävissä, että laminektomiakohdan koko oli dramaattisesti pienentynyt kapeaksi raoksi. Laminektomiakohdan reunan rakenne ja kovuus osoitti, että laminektomiakohta oli kaventunut uuden luun kasvun vuoksi.

Taulukko 2

Epiduraalinen fibroosi: Anatominen karkea-arvio

Aine	Pinta-haava	GELFOAMin[a] esiintyminen	Syväarpi	Luun kasvu	Kokonais-pisteet
Dekstraani-sulfaatti[1] (n=11)	1,2±0,4[2]	0,1±0,3[2]	0,3±0,5[2]	0,1±0,3[2]	1,7±0,9*
Dekstraani (n=12)	2,7±0,5	2,2±0,8	2,3±0,9	1,6±0,9	8,8±2,4
Puskuri (n=17)	2,6±0,5	2,4±0,5	2,4±0,7	1,9±0,8	9,3±1,9

[1] Dekstraanisulfaatin molekyylipaino = 500 kDa.

[2] Dekstraanisulfaatin tulokset ovat merkittävästi erilaiset ($p < 0,001$) kuin dekstraanin tai puskurin tulokset samassa kategoriassa.

Taulukossa 2 esitetyissä tuloksissa verrataan dekstraanisulfaatin, dekstraanin ja fosfaattipuskurin vaikutusta kuhunkin yksittäiseen kriteeriin sekä kokonaistulosta (pienempi pistemäärä osoittaa arvenmuodostuksen suurempaa estoa). Kaikkien neljän kriteerin kohdalla dekstraanisulfaatin implantoiminen laminektomiakohtaan antoi pisteet, jotka olivat merkittävästi alhaisemmat kuin joko dekstraanin tai fosfaattipuskurin implantoimisesta saadut. Nämä tulokset osoittavat, että dekstraanisulfaatti oli dramaattisen voimakas aine epiduraalisen fibroosin vähentämisessä rotan laminektomiamallissa.

Erilaisten dekstraanisulfaattikonsentraatioiden vaikutusta epiduraaliseen fibroosiin kokeiltiin rotan laminektomiamallissa ja pisteytettiin kuten edellä taulukossa 1 kuvattiin. Tulokset on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3

Dekstraanisulfaatin annosvaste

Konsentraatio	Kokonaispisteet
20 mg/ml	1,3 ± 0,5
2 mg/ml	3,0 ± 2,3
0,2 mg/ml	7,8 ± 1,9
Verrokki (0 mg/ml)	9,3 ± 1,9

Dekstraanisulfaatti esti parhaiten arven muodostumista konsentraatiolla 20 mg/ml. Konsentraation pienentäminen kymmenkertaisesti konsentraatioon 2 mg/ml huononsi hieman arvenmuodostuksen estoa, mutta esto oli silti havaittavasti parempaa kuin verrokissa. 0,2 mg/ml konsentraatiolla dekstraanisulfaatin esto ei merkittävästi eronnut verrokista.

Dekstraanisulfaatin, dekstraanin ja fosfaattipuskurin vaikutusta epiduraalisen fibroosin estoon kokeiltiin ajan funktiona implantoinnin jälkeen ja pisteytettiin kuten taulukossa 1 kuvattiin.

Taulukko 4

Epiduraalifibroosin esto ajan funktiona

Rottamalli

Aika	Dekstraanisulfaatti	Verrokki[2]
2 viikkoa	1,2 ± 0,5	9,5 ± 2,1
4 viikkoa	1,8 ± 0,8[1] (n=4)	10,3 ± 0,8 (n=8)
8 viikkoa	1,3 ± 0,4[1] (n=4)	9,4 ± 1,7 (n=8)
16 viikkoa	3,0 ± 1,9[1] (n=4)	10,4 ± 1,8 (n=8)
26 viikkoa	1,8 ± 0,8[1] (n=4)	9,3 ± 3,0 (n=8)
36 viikkoa	1,1 ± 0,1[1] (n=4)	10,9 ± 1,3 (n=8)

[1] Dekstraanisulfaatin pisteet olivat huomattavasti erilaiset ($p < 0,001$; Studentin t-testi) kuin verrokin pisteet kunakin ajankohtana.

[2] Verrokit olivat rottia, jotka oli käsitelty sienillä, jotka oli kasteltu pelkästään PBS:llä tai dekstraanilla PBS:ssä, tai kastelemattomilla sienillä. Pisteet on tässä yhdistetty, koska käytettyjen verrokkien välillä ei ollut tilastollisia eroja.

Kuten taulukossa 4 on osoitettu, dekstraanisulfaatin aikaansaama arvenmuodostuksen esto oli yhtä voimakasta 4 viikon kohdalla kuin 2 viikon kohdalla implantoinnin jälkeen (ei merkittävää eroa). Samanlaisia tuloksia havaittiin 4, 8, 16, 26 ja 36 viikkoa käsittelyn jälkeen (taulukko 5). Ei dekstraani eikä puskuri estänyt arvenmuodostusta minkään ajan jälkeen. Tulokset osoittavat, että dekstraanin aikaansaama arvenmuodostuksen esto on pitkäaikaista ja voimakasta.

Käyttäen rotan laminektomiamallia kokeiltiin useita erilaisia koostumuksia, jotka sisälsivät jonkin anionisen polymeerin, epiduraalifibroosin eston kannalta. Hepariini ja hyaluronihappo ovat polysulfatoituja glykosaminoglykaaneja; pentosaani on polysulfatoitu ksylaani ja alginaatti on karboksyloitu hiilihydraattipolymeeri. Kunkin yhdisteen vaikutus arvenmuodostukseen pisteytettiin, kuten taulukossa 1 kuvattiin (taulukko 5).

Taulukko 5

Eri polyanionisten yhdisteiden vaikutus epiduraaliseen fibroosiin

Aine		Kokonaispisteet
Dekstraanisulfaatti	(n=11)	1,7 ± 0,9
Dekstraani	(n=11)	8,8 ± 2,4
Pentosaani	(n=2)	5,0 ± 1,0
Hepariini	(n=4)	7,3 ± 2,5
Alginaatti	(n=4)	7,3 ± 1,9
Hyaluronihappo	(n=4)	9,3 ± 0,5
Puskuri	(n=17)	9,3 ± 1,9

Kaikista näistä yhdisteistä ainoastaan dekstraanisulfaatti esti voimakkaasti arvenmuodostusta. Pentosaani esti osittain arvenmuodostusta; hepariini ja alginaatti osoittivat

marginaalista paremmuutta puskuriin verrattuna (verrokki). Hepariini aiheutti myös verenvuotoa ja verenpurkaumia rotilla laminektomiakohdassa, mitä ei havaittu samalla tavoin käytetyn dekstraanisulfaatin yhteydessä. Hyaluronihappo ei kyennyt estämään arvenmuodostusta.

6.2. Kaniinin laminektomiamalli

Epiduraalisen fibroosin muodostuminen totaalilaminektomian jälkeen Uuden Seelannin valkoisilla kaniineilla väheni merkittävästi, kun leikkauksen aikana käytettiin dekstraanisulfaattia (MW = 500 kDa; 400 µg). Epiduraalisen fibroosin laajuus määritettiin karkeadissektiolla käyttäen samaa pisteytystä kuin edellä käsitellyssä rottamallissa. Tämän arvioinnin tulokset on esitetty taulukossa 6.

Taulukko 6

Epiduraalinenfibroosi
kaksi ja neljä viikkoa leikkauksen jälkeen
Kaniinimalli

Aine	Pinta-arpi	Keskiarpi	Syväarpi	Luunkasvu	Kokonaispisteet
Kaksi viikkoa: Dekstaani-sulfaatti (n=4)	1,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,0
Puskuri (n= 4)	2,5 ± 1,0	0,3 ± 0,5	2,3 ± 1,5	0,5 ± 1,0	5,6 ± 3,1
Neljä viikkoa: Dekstraani-sulfaatti (n=5)	2,6 ± 0,5	0,0 ± 0,0	1,4 ± 0,8	0,8 ± 0,4	4,8 ± 1,5
Puskuri	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	3,0 ± 0,0	0,5 ± 0,4	9,5 ± 0,4

Tiheä arvenmuodostus oli nähtävissä molempina ajanjaksoina puskurilla käsitellyissä kohdissa. Dekstraanisulfaatilla käsitellyissä kohdissa ei esiintynyt käytännöllisesti katsoen ollenkaan kovakalvon ulkopuolista arvenmuodostusta eikä kiinnikkeitä kovakalvoon. Laminektomiakohdan käsitteleminen dekstraanisulfaatilla ei vaikuttanut arven pa-

ranemiseen eikä lanneselän pintakalvoon. Nämä tulokset osoittavat, että dekstraanisulfaatti estää kovakalvoon muodostuvia kiinnikkeitä ja kovakalvon ulkopuolista fibroosia kaniineissa.

6.3. Koiran laminektomiamalli

Koiramallia käytettiin epiduraalisen fibroosin arvioimiseen laminektomian jälkeen. Kovakalvoon tehtiin 1 x 2 cm:n laminektomia kuudennen, neljännen ja toisen lannenikaman tasolle. Dekstraanisulfaattia Gelfoam-sienessä pantiin yhteen kohtaan, dekstraanisulfaattia geelisuspensiossa, joka valmistettiin jauhemaisesta Gelfoamista, pantiin toiseen kohtaan ja kolmas kohta ei saanut minkäänlaista käsittelyä. Nämä kolme erilaista käsittelytapaa suoritettiin sattumanvaraisesti kolmeen eri lannenikamatasoon. Kovakalvon ulkopuolinen arpeutuminen analysoitiin 4, 8 ja 16 viikkoa leikkauksen jälkeen anatomisella karkea-arvioinnilla (neljä koiraa kutakin aikaväliä kohti).

Laminektomiakohdassa esiintyvä sidekudos, tarttuminen kovakalvoon ja luunkasvu pisteytettiin käyttäen taulukossa 7 annettuja kriteereitä. Mitään eroa ei havaittu ihon paranemisessa, lantion pintakalvossa tai selkärangan viereisessä lihaksistossa.

Taulukko 7

Epiduraalisen fibroosin anatominen karkea-arvio

Koiramalli

Leikkauksen jälkeinen arpi:	
Kovakalvo selvästi näkyvissä	0
Ohutta peittoa	1
Kohtalaista peittoa	2
Paksua peittoa	3
Tarttuminen kovakalvoon:	
Kovakalvo helposti työnnettävissä toiselle puolelle	0
Kovakalvo ei helposti työnnettävissä toiselle puolelle	1
Kovakalvo vaikeasti työnnettävissä toiselle puolelle	2
Kovakalvoa mahdotonta työntää toiselle puolelle	3
Luunkasvu:	
Minimaalista kasvua	0
Merkittävää kasvua, mutta aukko silti jäljellä	1
Täysin sulkeutunut; ohutta luuta, poistettu ilman jyrsintä	2
Täysin sulkeutunut; paksua luuta, täytyy poistaa jyrsimellä	3

Ilman käsittelyä jääneiden kohtien yhteispistemäärän vertailu dekstraanisulfaatilla käsiteltyjen kohtien pisteisiin (taulukko 8) osoitti, että dekstraanisulfaatti oli merkittävästi estänyt kovakalvon ulkopuolista arpeutumista.

Taulukko 8

Epiduraalifibroosin karkea arviointi

Koiramalli

	Kulunut aika laminektomian jälkeen		
Aine	4 viikkoa	8 viikkoa	16 viikkoa
Ei käsittelyä	7,3 ± 1,3	5,8 ± 0,8	7,0 ± 1,6
DexSulf[1]/sieni	1,5 ± 1,1[2]	2,5 ±2,6[3]	4,3 ± 2,9[4]
DexSulf[1]/geeli	2,3 ± 0,8[2]	1,3 ± 0,9[2]	1,5 ± 1,5[2]

[1] DexSulf = dekstraanisulfaatti (40 kDa; 20 mg/ml)

Kunakin ajankohtana GT402:ta sienessä tai GT402:ta geelissä verrattiin käsittelemättömään käyttäen Studentin t-testiä.

[2] $p < 0,005$ luotettavuustaso.

[3] $p < 0,05$ luotettavuustaso.

[4] $p < 0,1$ luotettavuustaso.

6.3. Johtopäätökset

Rotan, kaniinin ja koiran epiduraalifibroosimallit osoittavat selvästi, että dekstraanisulfaatin läsnäolo tarjoaa olennaisen terapeuttisen hyödyn estämällä fibroosia ja arvenmuodostusta. Dekstraanisulfaatilla käsitelty GELFOAM® esti myös luun kasvua. Edellä olevassa esimerkissä leikkausleesion käsittely dekstraanisulfaatti-GELFOAMilla® esti kaiken muun paitsi ohuen arpikudoskerroksen ja kovakalvo pysyi sileänä ja läpinäkyvänä. Dekstraanisulfaatilla kyllästetty GELFOAM® poistettiin helposti yhtenä kappaleena, mikä osoitti, että fibroosi oli estynyt. Sitä vastoin negatiivisissa vertailukohdissa esiintyi pinnan arpeutumista, paksu ja sitkeä syvähaava ja tiheää luunkasvua.

Sekä rotan että kaniinin laminektomiamallit mimitoivat useimpia selkäkirurgian aspekteja ihmisellä. Arvenmuodostus perustuu fibroblastien, endoteelisolujen ja immuunisysteemisolujen leviämiseen ja migraatioon haavan reunasta leikkauskohtaan. Sen jälkeen leikkauskohtaan muodostuu fibroottista sidekudosta ja verisuonia. Nämä epiduraalifibroosin tunnusmerkit ovat samanlaisia ihmisillä, rotilla ja kaniineilla.

Erot liittyvät kokoeroihin ja kirurgisten menettelytapojen yksityiskohtiin. Rottien ja kaniinien suhteellisen pieni koko rajoittaa leikkauksen hienosäätöä. Rotilla ja kaniineilla tehdään täydellinen laminektomia, kun taas ihmisten selkäleikkauksissa suoritetaan perinteen mukaan osittaislaminektomia. Nikamavälilevyn poistoleikkaus on myös eräs ihmisen selkäkirurgian yleisimpiä syitä. Sellainen leikkaus ei ole mahdollinen pienissä eläinmalleissa ja sen vuoksi selkärangan välilevyjen leikkausten jälkivaikutuksia ei voida tutkia rotta- ja kaniinimaleissa. Tämä voidaan kuitenkin tehdä koiramallissa, joka läheisemmin mimitoi todellista ihmiskirurgiaa.

Dekstraanisulfaatti on tässä esimerkissä käytettynä anioninen polymeeri, jonka tehollinen anioninen varaustiheys on

suuri ja rikkipitoisuus 15,3 paino-%. Dekstraanisulfaatti voidaan valmistaa keittämällä dekstraania rikkihapon kanssa ja esteröimällä kloorisulfonihapolla. Sekä dekstraanissa että dekstraanisulfaatissa on polyglukoosihiilihydraattiranka. Dekstraanisulfaatilla kyllästetyllä GELFOAMilla® saatujen tulosten vertailu dekstraanilla kyllästetyllä GELFOAMilla® saatuihin tuloksiin osoittaa, että polymeerin anionisuus vaikuttaa sen estopotentialiin ja käyttökelpoisuuteen esillä olevassa keksinnössä, koska dekstraanisulfaatti (erittäin anioninen) oli paljon tehokkaampi kuin dekstraani (ei anioninen) epiduraalisen fibroosin estämisessä.

Muilla anionisilla polymeereillä saadut tulokset, jotka on esitetty taulukossa 5, osoittavat kuitenkin, että varaustiheys yksinään ei osoita estopotentiaalia in vivo. Luonnon proteoglykaanit, jotka ovat voimakkaita estäjiä in vitro (katso kappale 7., infra), olivat minimaalisen aktiivisia (alginaatti, hepariini) tai inaktiivisia (hyaluronihappo) in vivo. Pentosaanilla oli keskinkertainen teho epiduraalisen fibroosin estämisessä, vaikka se oli erittäin tehokas soluinvaasion estämisessä in vitro.

7. Esimerkki: soluinvaasion esto in vitro

Anionisten polymeerien on todettu estävän soluinvaasiota. Liuskakoe (kuvataan alla) tarjoaa käyttökelpoisen in vitro -mallin soluinvaasiosta. Estoaktiivisuus voidaan määrittää solujen migraatiotasolla liuskoista, jotka on päällystetty jollakin substraattimolekyylillä, kuten laminiinilla, liuskoihin, jotka on päällystetty substraattimolekyylillä ja jollakin estomolekyylillä, esim. jollakin anionisella polymeerillä. Anionisten polymeerien, erityisesti DS:n ja KS/CS:n, kyky estää soluadheesiota määritettiin myös.

7.1. Materiaaleja ja menetelmiä

7.1.1. Soluviljely

Solulinjat. Muriini-3T3-fibrolasteja (NIN), rotan C6-glioomasoluja (Paganetti ym., 1988, J. Cell Biol. 107:2281) ja

MCG-28 nuoria jatkuvasti lisääntyviä hiiren astrosyyttejä (muriini neonataali astrosyyttilinja, joka on tehty jatkuvasti lisääntyväksi SV-40:llä) kasvatettiin väliaineessa, joka muodostui Dulbeccon muunnetusta Eagle-väliaineesta (DMEM), 10-prosenttisesta vasikansikiöseerumista (Gibco Laboratories) ja penisilliini G/streptomysiinistä (100 yksikköä/ml, 100 µg/ml vastaavasti, Gibco Laboratories). Liuskakoetta varten konfluenssilevyjä hajoitettiin 0,05-prosenttislla trypsiinillä, 0,53 mM EDTA:lla (Gibco Laboratories) ja kylvettiin 200 000 solua/ml (3 ml/levy). Soluadheesioanalyysejä varten konfluenssiviljelyjä hajoitettiin 0,03-prosenttisella EDTA:lla ja siirrostettiin 96-kuoppaiselle mikrotitrauslevylle 20 000-100 000 solua/kuoppa. PC12-soluja, erästä feokromosytoomasolulinjaa (Green L.A. & Tischler A.S., 1976, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73:2424), kasvatettiin väliaineessa, joka sisälsi Roswell Park Memorial Instituten (RPMI) väliainetta 1640 (Gibco Laboratories), 10-prosenttista hevosen seerumia, 5-prosenttista vasikan sikiön seerumia (FCS) ja penisilliini G/streptomysiiniä (100 yksikköä/ml, 100 µg/ml vastaavasti, Gibco Laboratories). Solut desaggregoitiin 0,03-prosenttisella EDTA:lla ja siirrostettiin 96-kuoppaiselle mikrotitrauslevylle 3 000 solua/kuoppa.

Primaarisoluviljelyt. Rotan aivokalvofibroblastien (RMF) primaariviljelyjä saatiin P-3 rotan pennuista. Kudos poistettiin eläimistä ja siirrettiin Leibovitzin L-15:een L-glutamiiniväliaineen kanssa. Sitten kudos leikeltiin pieniksi paloiksi leikkausveitsen terällä, hajoitettiin entsymaattisesti 0,25-prosenttisella trypsiinillä Ca^{2+}/Mg^{2+}-vapaassa Hankin balansoidussa suolaliuoksessa (CMF-HBSS, Gibco Laboratories) 20 minuutin ajan 37 ^{0}C:ssa ja jauhennettiin mekaanisesti. Solut huuhdottiin DMEM:llä plus 10-prosenttisella FCS:llä, väkevöitiin sentrifugoimalla ja sen jälkeen laimennettiin DMEM:ssä 10-prosenttisella FCS:llä siirrostamista varten 5,0 x 10^6 solua/75 cm^2:n pullo. Täysikasvuisen rotan lonkkahermofibroblasteja (RSF) saatiin

eksplantoimalla 1 mm:n kappaleita täysikasvuisen rotan lonkkahermosta.

Rotan astrosyyttiviljelyjä (RAST) valmistettiin P-1-3 rotan aivokuorista. Aivokuorista poistettiin sidekudos ja verisuonet, ne leikattiin pieniksi palasiksi ja hajoitettiin 0,5-prosenttisessa kollagenaasissa (Gibco Laboratories) 20 minuuttia 37 ^{o}C:ssa, minkä jälkeen niitä hajoitettiin edelleen 0,25-prosenttisessa trypsiinissä 15 minuuttia ja 0,04 mg:ssa/ml DNAasia (Sigma) ja 0,52 mg:ssa/ml soijapaputrypsiiniestäjää 5 minuuttia 37 ^{o}C:ssa. Sen jälkeen solut hajoitettiin mekaanisesti jauhentamalla Pasteur-pipetillä ja siirrostettiin 1,5 x 10^{7} solua poly-L-lysiinillä (PLL, Sigma) päällystettyyn 75 cm^{2}:n pulloon. Pulloja ravisteltiin 4 tuntia siirrostamisen jälkeen vähemmän tarttuvien ei-astrosyyttisten oligodendrosyyttien ja neuronien irrottamiseksi.

Primaariset eksplanttiviljelyt. Selän takajuuren hermosolmukkeita (DRG:t) saatiin E8-E9 kanan alkioista. Irrotusleikkaus suoritettiin CMF-HBSS:ssä. Selkäranka otettiin esiin ja DRG:t irrotettiin ja puhdistettiin ympäröivästä sidekudoksesta. DRG:t siirrostettiin DMEM/F12:een, 10-prosenttiseen vasikan sikiön seerumiin, joka sisälsi 50 ng/ml hermokasvutekijää (NGF). DRG:t kylvettiin lamiiniinilla (LN, Gibco Laboiratories) tai poly-L-lysiinillä (PLL, Sigma) päällystettyihin maljoihin.

7.1.2. Liuska-analyysi

Liuska-analyysi suoritettiin olennaisesti kuten kuvaavat Snow ym. (1990, Exp. Neural. 309:111-130). Kudosviljely-Petri-maljat (Falcon, 60 mm) esipäällystettiin 0,5 ml:lla seosta, jossa oli 5 cm^{2}:n kappale nitroselluloosaa (Schleicher & Schuell, Type BA 85) liuotettuna 6 ml:aan metanolia, ja kuivattiin ilmassa laminaarisessa virtaushormissa. Selluloosasuodatinpaperi (Whatman #1) leikattiin 12 x 0,35 mm:n liuskoiksi McIlwain-kudosleikkurilla (The Mickle Laboratory Engineering Co., LTD). Suodatinpaperiliuska kastel-

tiin 20 µl:ssa liuosta, jossa oli DS-PG:tä tai KS/CS-PG:tä annettuna konsentraationa, täplitettiin nitroselluloosalla päällystetylle maljalle 30 sekunniksi ja poistettiin. Koeliuoksen annettiin kuivua ilmassa. Tämä menettely toistettiin useita kertoja luoden näin selvästi erottuvia, saman välimatkan päässä toisistaan olevia rinnakkaisia leveydeltään yhdenmukaisia kaistoja levyille. Ohut kerros 0,1 tai 1 mg/ml LN:ää levitettiin sitten tasaisesti yli kaistojen taivutetulla lasisella Pasteur-pipetillä ja peitettiin viljelyväliaineella (Kuvio 1).

Levyille kylvettiin solususpensioita 2,0 x 10^5 solua/ml eli 4-10 DRG-eksplanttia. Viljelyt arvosteltiin adheesioasteen, DS-PG- tai KS/CS-PG-kaistojen migraation ja/tai invaasion kannalta aina 7 päivän ajanjaksolta käyttäen Leitz Fluovert -mikroskooppia.

Kaistat, jotka estivät täysin soluadheesion, -migraation ja/tai -invaasion, arvosteltiin (-):ksi, kaistat, jotka sallivat rajoitetusti soluadheesion, -migraation ja/tai -invaasion, arvosteltiin (+/-):ksi ja ne, jotka sallivat soluadheesion, -migraation ja/tai -invaasion, arvosteltiin (+):ksi. Soluadheesio määriteltiin lähtövuorovaikutukseksi solun pinnan ja substraatin välillä, mistä on tuloksena solujen kiinnittyminen ja leviäminen. Solumigraatio määritettiin operatiivisesti solun liikkeeksi samassa substraatissa ja soluinvaasio määritettiin operationaalisesti solun liikkeeksi yhdentyyppisestä substraatista toisentyyppiseen substraattiin.

7.1.3. Eksplantin kasvuanalyysi

DRG-eksplantteja siirrostettiin LN:llä tai PLL:llä päällystetyille maljoille ja neuronien ja ei-neuronien (fibroblastien ja Schwann-solujen) kasvukehiä tarkkailtiin 1, 2 ja 3 päivän ajan Leitz Fluovert -mikroskoopilla. Suhteellinen kasvu, verrattuna käsittelemättömien verrokkien kasvuun, luokiteltiin seuraavasti: 1: 0-19 % verrokista; 2:

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

7.1.4. PC12:n viejähaarakkeen kasvu-analyysi

PC12-soluja esikäsiteltiin 20 ng:lla/ml NGF:ää 8 päivää, koottiin 0,03-prosenttisella EDTA:lla PBS:ssä ja siirrostettiin esipäällystetyille 96-kuoppaisille mikrotitrauslevyille määrän ollessa 3 000 solua/kuoppa. Mikrotitrauslevyt oli esipäällystetty poly-L-lysiinillä ja suojattu adheesioväliaineella (1-prosenttinen BSA PRMI:ssä) 20 minuuttia ennen solujen lisäystä. Soluja kasvatettiin adheesioväliaineessa, johon oli lisätty 20 ng/ml NGF:ää. Solujen annettiin kiinnittyä 2 tuntia ennen koeyhdisteiden lisäämistä (Akeson ja Warren, 1986, Exp. Cell Res. 162:347-362).

7.1.5. Kolorimetrinen soluadheesiokoe

Mikrotitrauslevyt esipäällystettiin poly-L-lysiinillä ja suojattiin 1-prosenttisella BSA:lla DMEM:ssä 20 minuuttia ennen solujen lisäämistä. Solut siirrostettiin esipäällystetyille 96-kuoppaisille levyille ja koeyhdisteet lisättiin viljelyväliaineeseen. 4-25 tunnin 36 ^{o}C:ssa, 5 % CO_2, kostutetussa inkubaattorissa inkuboinnin jälkeen lisättiin tetratsoliumsuolaa MTT [3-(4,5-dimetyylitatsol-2-yyli)-2,5-difenyylitetratsoliumbromidi). Viljelyjä inkuboitiin 2 tuntia, jotta mitokondrinen sukkinaattidehydrogenaasi, jota todettiin elinkelpoisissa soluissa, pääsi hydrolysoimaan MTT:n formatsaanisiniseksi reaktiotuotteeksi. Väliaine imettiin pois ja kuopat huuhdottiin kaikkien irronneiden solujen poistamiseksi. Formatsaanisininen reaktiotuote kiinnittyneissä soluissa tehtiin liukoiseksi 0,08 N HCl:llä isopropanolissa ja levyt luettiin mikrotitrauslevyjen lukijassa (Dynatech MR4000) 570 nm:ssä käyttäen 630 nm viitesuodatinta. Saadut optista tiheyttä ilmaisevat lukemat ovat suoraan sidoksissa kuopassa olevien elinkelpoisten solujen lukumäärään (Mosmann, T., 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63). Näytteet ajettiin 3-6 replikaatteina/piste ja SD oli pienempi kuin 5 %.

7.1.6. Reagenssit

Siasta saatu hepariini, H-7005 Sigma, erä:19FO268 Grade II, natriumsuola; dermataanisulfaatti 90 % (kondroitiinisulfaatti B) C-4259 Sigma, erä 59FO848, natriumsuola, siannahka; kondroitiinisulfaatti A, C-0914 Sigma, natriumsuola, sika; dekstraanisulfaatti D-6001 Sigma, erä 50HO458, MW 500 kD; dekstraani, Sigma, D-5251 Sigma, erä 40HO4211, MW 485 kD; pentosaanipolysulfaatti, Sigma, P-8275, erä 114FO194.

7.2. Tulokset

7.2.1. DS-PG:n vaikutus soluadheesioon, -migraatioon ja -invaasioon

DS-PG:n vaikutus solun kiinnittymiseen (s.o. adheesioon), migraatioon ja invaasioon testattiin käyttäen primaariviljelyjä ja fibroblasti- ja gliasolulinjoja. Solususpensioita siirrostettiin kudosviljelylevyille, jotka oli valmisteltu edellä kuvattua liuskakoetta varten. Viljelylevyt päällystettiin vuorotellen DS-PG/LN- (0,1-0,8 mg/ml ja 20 µg/ml vastaavasti) ja LN-liuskoilla (20 µg/ml) ja soluadheesio, -migraatio ja -invaasio arvioitiin 2 päivän kuluttua siirrostamisesta.

Substraattiliuskat, jotka sisälsivät seoksen, jossa oli 0,8 mg/ml DS-PG:tä ja 20 µg/ml LN:ää, estivät 3T3-solujen adheesion. Solut tarttuivat preferentiaalisesti LN-substraattialueisiin, joissa ei ollut DS-PG:tä. Vuorottelevat solukaistat muodostivat teräviä rajoja DS-PG/LN:ää ja LN:ää sisältävien liuskojen välipinnoille [kuviot 2A ja B; laatu arvioitiin (-):ksi]. Konsentraatiolla 0,2 mg/ml havaittiin vähäistä invaasiota [kuvio 2C; laatu arvioitiin (+/-):ksi], ja konsentraatiolla 0,1 mg/ml solut kykenivät invaasioon ja migraatioon kaistoilla [kuvio 2D; laatu arvioitiin (+):ksi]. DS-PG:n estävä vaikutus soluadheesioon, -migraatioon ja -invaasioon todettiin kaikissa testatuissa solutyypeissä (taulukko 9). Sekä primaarisolut että solulinjat muodostivat soluttomia kaistoja konsentraatiolla 0,8 mg/ml ja lukuunottamatta primaarisia astrosyyttejä konsentraatiolla 0,4 mg/ml DS-PG:tä. Vaikutus oli annoksesta riippu-

vainen eston heikentymisen tapahtuessa suunnilleen konsentraatiolla 0,2 mg/ml ja estokyvyn menetyksen konsentraatiolla 0,1 mg/ml DS-PG:tä.

Taulukko 9

Annoksesta ja solutyypistä riippuvainen DS-PG:n vaikutus adheesioon, migraatioon ja invaasioon

Annos (mg/ml)	Solutyyppi						
	RMF	RSF	3T3	RAST	C6	MCG28	DR
0,8	-	-	-	-	-	-	-
0,4	-	-	-	+/-	-	-	-
0,2	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+/-
0,1	+	+/-	+	+	+	+	+

DS-PG:n estovaikutuksen stabiiliutta C6-soluihin seurattiin 6 vuorokauteen saakka (kuvio 3) ja 3T3-soluihin 7 vuorokauteen saakka (taulukko 10). Vuorottelevat kirkkaat liuskat, jotka muodostuivat solujen konfluenttien kerrosten väliin konsentraatiolla 0,8 mg/ml DS-PG:tä, olivat stabiileja ainakin 4 vuorokautta (kuviot 3A-C). 6. päivään mennessä pieni määrä soluja aloitti invaasion DS-PG-liuskoihin (kuvio 3D). Samankaltaisia tuloksia saatiin 3T3-soluilla (taulukko 4).

Taulukko 10

DS-PG:n ajasta riippuvainen vaikutus solumigraatioon

Konsentraatio (mg/ml)	1vrk	2vrk	3vrk	4vrk	7vrk
0,8 (10 µM)	-	-	-	-	+/-
0,4 (5 µM)	-	-	-	-	+/-
0,2 (2,5 µM)	+/-	+/-	+/-	+/-	+
0,1 (1,25 µM)	+	+	+	+	+

Estovaikutus oli konsentraatioilla 0,8 ja 0,4 mg/ml DS-PG:tä stabiili vähintään 4 vuorokautta; 7. päivään mennessä ainoastaan heikkoa invaasiota oli havaittavissa. Samaten heikko invaasionestovaikutus konsentraatiolla 0,2 mg/ml DS-PG:tä oli ylitetty 7. päivään mennessä. Konsentraatiolla 0,1 mg/ml DS-PG:tä estovaikutusta ei todettu alunperinkään ja estokyvyn puuttuminen pysyi entisellään ainakin 7 vuorokautta.

Fibroblastien ja astrosyyttien primaarisoluviljelyjen lisäksi DS-PG:n vaikutus testattiin fibroblasteihin ja Schwann-soluihin, jotka migratoituivat DRG-eksplanttiviljelyistä. Kanan sikiön (E-8) DRG:itä siirrostettiin levyille vuorotellen DS-PG/LN- ja LN-liuskoille, kuten edellä kuvattiin. Konsentraatioilla 0,8 mg/ml DS-PG/20 µg/ml vain muutamia DRG:itä tarttui LN-substraattiin ja esiintyi rajoittunutta hermosolun viejähaarakkeen kasvua ja ei-hermosolujen migraatiota (kuvio 4A). Konsentraatiolla 0,4 mg/ml DS-PG:tä DRG:t tarttuivat LN-substraattiin ja niissä esiintyi sekä hermosolun viejähaarakkeen kasvua että ei-hermosolujen migraatiota (kuvio 4B). LN- ja DS-PG/LN-liuskojen välipinnalla pidentyvät hermosolujen viejähaarakkeet ja migratoituvat ei-hermosolut joko pysähtyivät äkisti tai kääntyivät ja vaelsivat pitkin LN- ja DS-PG/LN-liuskojen rajaa. DS-PG:n estovaikutus oli annoksesta riippuvai-

nen, pienten konsentraatioiden (0,2 mg/ml) tuottaessa rajoittunutta soluinvaasiota. Minkäänlaista hermosolujen viejähaarakkeiden kasvua ja ei-hermosolujen invaasion estoa ei todettu konsentraatiolla 0,1 mg/ml DS-PG:tä (taulukko 6).

7.2.2. KS/CD-PG:n vaikutus soluadheesioon, -migraatioon ja -invaasioon

KS/CS-PG testattiin sen vaikutuksen kannalta fibroblastien ja gliasolujen primaariviljelyjen ja solulinjojen adheesioon, migraatioon ja/tai invaasioon. Testattuihin solutyyppeihin kuuluivat rotan aivokalvofibroblastit (RMF), täysikasvuisen rotan lonkkahermofibrolastit (RSF), rotan astrosyytit (RAST), 3T3-rotan fibroblastisolulinja, C6-rotan glioomasolulinja ja MCG-28 nuoren hiiren jatkuvasti lisääntyviksi tehdyt astrosyytit. Solut kylvettiin viljelylevyille, jotka oli valmisteltu, kuten kuvattiin edellä kappaleessa 7.1.2., ja arvioitiin soluadheesion, -migraation ja -invaasion kannalta.

Alusta, joka sisälsi seoksen, jossa oli 2,7 mg/ml KS/CS-PG:tä ja 20 µg/ml LN:ää, esti kaikkien testattujen solutyyppien adheesion ja migraation. Rotan aivokalvofibroblastit, 3T3-solut, rotan astrosyytit ja kananpojan DRG-hermosolujen viejähaarakkeet olivat herkimpiä KS/CS-PG-estolle (Taulukko 12). Annosvasteen arviointi osoittaa, että DRG-neuronit ovat herkimpiä soluja KS/CS-PG-estolle ja gliasolulinjat C6 ja MCG-28 vähiten herkkiä. C6-soluadheesion alkuperäinen esto (kuvio 5A) ja solumigraation ja invaasion myöhempi osittainen estyminen, joka havaittiin konsentraatiolla 2,7 mg/ml KS/CS-PG:tä (kuvio 4B) oli lyhytaikaista. 48 tunnin kuluessa levyille siirrostamisesta C6 voitti KS/CS-PG-eston (kuvio 5C) ja minkäänlaista kaistanmuodostusta ei ollut näkyvissä 72 tunnin kuluttua testatulla solutiheydellä.

Taulukko 11

KS/CS-PG:n vaikutus solumigraatioon

Annos (mg/ml)	Solutyyppi						
	RMF	RSF	3T3	RAST	C6	MCG28	DRG
2,7	-	+/-	-	-	+/+	+/-	-
1,0	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	-
0,5	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	-
0,25	+/-	+	+	+/-	+	+	+
0,12	+			+			

7.2.3. DS-PG:n ja KS/CS-PG:n aktiivisuuden vertailu

Saadut tulokset näyttävät siis osoittavan, että DS-PG on voimakkaampi soluadheesion, -migraation ja -invaasion estäjä kuin KS/CS-PG (taulukko 9 vs. taulukko 11). Tämä voimakkuusero on selvä, kun kahta proteoglykaania verrataan toisiinsa samanlaisella kuivapaino/tilavuus (mg/ml) -konsentraatiolla. DS-PG:n arvioitu molekyylipaino on kuitenkin suunnilleen 10 kertaa pienempi kuin KS/CS-PG:n. Kun korjaus suoritetaan moolikonsentraation osalta, erot voimakkuudessa DS-PG:n ja KS/CS-PG:n välillä pienenevät kovasti. Esimerkiksi KS/CS-PG:n arvioitu moolikonsentraatio arvossa 1,0 mg/ml on 1,25 µM. DS-PG ei samalla moolikonsentraatiolla (1,25 µM, 0,1 mg/ml) enää estä, mikä heijastaa KS/CS-PG:llä saatuja tuloksia (vertaa taulukoita 9 ja 11).

7.2.4. Hepariinin ja dekstraanisulfaatin vaikutus solumigraatioon

Testattiin hepariinin ja dekstraanisulfaatin vaikutus solujen migraatioon kananpojan DRG-eksplanttiviljelyistä. DRG:t siirrostettiin viljelymaljoihin, jotka oli esipäällystetty joko PLL- tai LN-subtraatilla ja kasvatettiin viljelyväliaineessa, joka sisälsi eri pitoisuuksina hepariini-, dekstraanisulfaatti- tai dekstraaniliuoksia. Ilman koeyhdistet-

tä 24-48 tunnissa näkyi hermosolmukkeen ympärillä selvästi hermosolun viejähaarakkeiden kasvun kehä ja migratoituvia ei-hermosoluja, s.o. fibroblasteja ja Schwann-soluja (kuvio 6A). DRG-eksplantista migratoituvan solukehän koko pieneni, kun eksplanttia kasvatettiin siten, että läsnä oli 0,4 mg/ml hepariinia (kuvio 6B). Kun eksplanttia kasvatettiin siten, että läsnä oli 0,2 mg/ml dekstraanisulfaattia, DRG-eksplantin ympärillä olevan solukehän koko pieneni dramaattisesti (kuvio 6C). Sitä vastoin 0,4 mg:lla /ml dekstraania ei ollut mitään vaikutusta (kuvio 6D). Koeyhdisteiden läsnäollessa kasvatetuista DRG:istä lähtevän solukehän koko arvioitiin suhteessa käsittelemättömään verrokkiin ja sille annettiin pisteet, kuten on kuvattu edellä kappaleessa 7.1.3. (taulukko 12).

Taulukko 12

Hepariini ja dekstraanisulfaatti estävät solumigraation DRG-eksplanteista

Konsentraatio (µg/l)	Hepariini		Dekstraani-sulfaatti		Dekstraani	
	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		

Arvosteluasteikko (katso kappale 8.1.3., supra).
1 = 0-19 %
2 = 20-39 %
3 = 40-59 %
4 = 60-79 %
5 = 80-100 % verrokista.

Hepariinin ja dekstraanisulfaatin vaikutus testattiin kahdella eri substraatilla, LN ja PLL. Molemmat substraatit tukevat eksplantin kiinnittymistä, hermosolun viejähaarakkeen kasvua ja ei-hermosolujen migraatiota eksplantista. Nämä kaksi substraattia eroavat toisistaan mekanismin, jolla solut tarttuvat niihin, ja tuon kiinnittymisen lujuuden osalta. Solujen kiinnittymisen LN:ään ajatellaan olevan reseptorivälitteinen tapahtuma, kun sen sijaan PLL, polyanioninen polymeeri, toimii ioni-vuorovaikutuksen kautta. Soluilla on erilainen preferenssi joko LN:ää tai PLL:ää kohtaan. Kun kysymyksessä on DRG, adhesiivisempi subtraatti on LN. Kuten taulukossa 12 on osoitettu, hepariini esti solujen migraation DRG:stä, kun sitä kasvatettiin PLL:llä, mutta ei silloin, kun sitä kasvatettiin LN:llä. Tämä osoittaa heikompaa estoaktiivisuutta kuin mikä on dekstraanisulfaatilla, joka estää migraation silloinkin, kun DRG:t kasvatetaan LN:llä. Hepariini oli heikosti estävä konsentraatiolla 1 µg/ml PLL:llä. Dekstraanisulfaatti oli vomakkaampi estäjä konsentraatiolla 1 µg/ml PLL:llä ja konsentraatiolla 2 µg/ml LN:llä. Solumigraation estoa ei havaittu dekstraanilla, kun DRG:tä kasvatettiin joko PLL:llä tai LN:llä.

7.2.5. Fibroblastiadheesion estäminen GAG:illä ja muilla sulfatoiduilla hiilihydraateilla

Koska GAG ja muut sulfatoidut hiilihydraatit eivät helposti absorboidu kudosviljelymuoviin tai muihin substraatteihin, otimme käyttöön kvantitatiivisen analyysin niiden aktiivisuuden testaamiseksi liuoksessa. Fibroblastien adheesiota PLL-päällystettyihin mikrotitrauslevyihin koeyhdisteiden läsnäollessa viljelyväliaineessa arvioitiin käyttäen MTT-analyysiä, kuten kuvataan kappaleessa 7.1.5., supra, ja kiinnittyneiden solujen lukumäärä ilmoitettiin prosentteina verrokista. 4 tunnin inkubaation vaikutus hepariinin, pentosaanipolysulfaatin, dekstraanisulfaatin ja dekstraanin läsnäollessa rotan aivokalvon fibroblastien (RMF) ja 3T3-solujen adheesioon PLL:ään on esitetty kuviossa 7.

Hepariini, pentosaanipolysulfaatti ja dekstraanisulfaatti vähensivät kiinnittyneiden solujen lukumäärää verrattuna käsittelemättömään verrokkiin, kun sen sijaan dekstraanilla käsittely antoi tulokseksi vähäisen nousun tarttuneiden solujen lukumäärässä. Voimakkuusjärjestys oli samanlainen, kun koe suoritettiin joko primaarisilla rotan aivokalvon fibroblasteila tai fibroblastisolulinjalla 3T3. Primaarifibroblastien adheesion hepariini, pentosaanipolysulfaatti ja dekstraanisulfaatti estivät voimakkaammin kuin 3T3-solulinjan adheesion. Dekstraanin ja dekstraanisulfaatin vaikutus kiinnittyneiden solujen lukumäärään 24 tunnin kuluessa käsittelyn jälkeen on esitetty kuviossa 8.

7.2.6. GAG:iden ja muiden polyanionisten yhdisteiden vaikutus solumigraatioon

GAG:iden ja muiden polyanionisten molekyylien vaikutus soluadheesioon ja -migraatioon testattiin käyttäen PC12-solujen viejähaarakkeen kasvun yksinkertaista ja nopeaa mallisysteemiä. PC12-soluista, jotka kasvatetaan NGF:n läsnäollessa, kasvaa ulos hermosolun viejähaarakkeita. Kasvukartio viejähaarakkeiden päässä välittää kasvua toistuvien tarttumis-, irtoamis- ja migraatiosyklien kautta. Tämän prosessin nettotuloksena on hermosolujen viejähaarakkeiden laajentuminen.

NGF:llä esikäsiteltyjä PC-12-soluja siirrostettiin 96-kuoppaisille levyille. Koeliuokset lisättiin kuoppiin ja solut korjattiin 2 päivää myöhemmin (+):ina, jos hermosolun viejähaarakkeita, joiden pituus oli ainakin kaksi solurungon läpimittaa, oli läsnä suurimmalla osalla soluista, ja (-):ina, jos ei ollenkaan tai vain lyhyitä prosesseja oli havaittavissa. Kustakin koeyhdisteestä tehtiin täydelliset annosvastekäyrät ja tulokset ilmoitettiin IC_{100}:na (g/ml), s.o. minimikonsentraationa, jolla yhdiste aikaansai hermosolun viejähaarakkeiden 100-prosenttisen eston (taulukko 10). Kunkin testatun yhdisteen myrkyttömyys vahvistettiin seuraavasti: mikroskoopilla tarkasteltuna mitään osoitusta solukuolemista ja irtoamisesta ei ollut nähtävissä; solut

eivät värjääntyneet positiivisesti trypaanisinisellä; ja estoyhdisteen poistaminen viljelyväliaineesta sai aikaan hermosolun viejähaarakkeen kasvua. Testattuihin yhdisteisiin kuuluivat GAG:t (hepariini, dermataanisulfaatti, kondroitiinisulfaatti A, kerataanisulfaatti ja hyaluronihappo), sulfatoidut hiilihydraattipolymeerit (dekstraanisulfaatti ja pentosaanipolysulfaatti) ja eräs toinen polyanioninen polymeeri (s.o. algiinihappo).

Taulukko 13

Solumigraation eston ja rikkipitoisuuden korrelaatio

GAG	IC_{100} (g/ml)	Rikkipitoisuus
Hepariini	$2,6x10^{-7}$	11,8 %
Pentosaanipolysulfaatti	$3,9x10^{-7}$	16,5 %
Dekstraanisulfaatti	$5,2x10^{-7}$	15,3 %
Alginaatti	$3,1x10^{-6}$	0 % (COO, ei rikkiä)
Dermataanisulfaatti 90 %	$1,5x10^{-5}$	6,0 %
Hyaluronihappo	$2,0x10^{-4}$	0,6-0,8 %
Kondroitiinisulfaatti A (sika)	$5,0x10^{-4}$	5,6 %
Kerataanisulfaatti	$>2,0x10^{4}$	6,4 %
Dekstraani	$>1,0x10^{-3}$	0 %

Yhdisteen suhteellinen estovoimakkuus in vitro näytti korreloivan positiivisesti rikkipitoisuuden kanssa. Funktionaalisen rikkiryhmän myötävaikutus osoitetaan selvimmin vertaamalla dekstraanisulfaatin aktiivisuutta dekstraanin aktiivisuuteen. GAG:issä todettu sulfaattina oleva rikki mitä todennäköisimmin vaikuttaa solujen invaasioon anionisella varaustiheydellä. Tämän olettamuksen testaamiseksi

käytimme algiinihappoa (alginaattia), erästä polyanionista polymeeriä, jolla on negatiivinen varaus, joka johtuu ainoastaan karboksyyliryhmistä. Kuten taulukossa 13 on osoitettu, myös algiinihappo estää solumigraation. Nämä tulokset osoittavat, että annetun polymeerin aktiivinen estävä elementti on sen anioninen (negatiivinen) varaustiheys.

7.2.7. Dekstraanisulfaattimolekyylin koon vaikutus fibroblastiadheesioon

Rikkipitoisuudeltaan samanlaisia (15-16 paino-%) ja molekyylipainoltaan erilaisia sulfatoituja dekstraaneja testattiin niiden vaikutuksen suhteen fibroblastiadheesioon. Käyttäen kolorimetrista soluadheesioanalyysiä, jota kuvataan kappaleessa 7.1.5., supra, tehtiin annosvastekäyrät 3T3-soluista, joita kasvatettiin 24 tuntia 5 kD:n, 8 kD:n, 500 kD:n ja 2 000 kD:n dekstraanisulfaatin läsnäollessa (kuvio 9). Estävä vaikutus 3T3-solujen adheesioon todettiin 5 kD:n, 8 kD:n, 500 kD:n ja 2 000 kD:n dekstraanisulfaatilla, mutta voimakkuus vaihteli merkittävästi. EC_{50}-arvot koskien dekstraanisulfaatilla aikaansaatua 3T3-solujen adheesion estoa olivat: 5 kD - 6 mg/ml; 8 kD - 4 mg/ml; 500 kD - 0,006 mg/ml; ja 2 000 kD - 20 mg/ml. Voimakkain molekyyli tässä analyysissä on 500 kD:n dekstraanisulfaatti.

7.3. Johtopäätökset

Arvenmuodostus ja fibroosi ovat tulosta fibroblastien kontrolloimattomasta invaasiosta vaurio- tai leesiokohtaan. Hallitsemattomasta soluinvaasiosta on seurauksena muitakin haitallisia tiloja, kuten hermosolujen viejähaarakkeen kasvua, gliasolujen invaasiota ja monosyytti/makrofaagi-invaasiota. Estämällä fibroblastien invaasiota ehkäistäisiin arpeutumista ja siihen liittyviä haitallisia vaikutuksa, kuten leikkauskiinnikkeitä, esim. epiduraalista fibroosia ja kosmeettisesti sopimattomia arpia esim. kosmeettisen tai korjausleikkausten seurauksena. Edellä esitetyt tulokset osoittavat, että glykosaminoglykaanit ja muut anioniset polymeerit estävät fibroblastien invaasiota sekä muiden ei-

hermosolujen, kuten gliasolujen, invaasiota ja hermosolujen viejähaarakkeen ylikasvua ja siten ehkäisevät niihin liittyviä haitallisia vaikutuksia.

Edellä olevat tulokset osoittavat myös, että eston laajuus korreloi anionisen varaustiheyden kanssa ja että tämä suhde voi olla käyttökelpoinen määrättäessä tai identifioitaessa anionisia polymeerejä käytettäväksi tätä keksintöä käytäntöön sovellettaessa. In vivo -tulokset kuitenkin osoittavat, että varaustiheys määrää ainoastaan osittain estopotentiaalin.

Esillä oleva keksintö ei ole tarkoitettu rajoittumaan tässä kuvattuihin erityissuoritusmuotoihin. Edellä olevasta selityksestä ja liitteenä olevista kuvioista selviää nimittäin alaan perehtyneille keksinnön erilaisia muunnelmia tässä kuvattujen lisäksi. Sellaiset muunnelmat ovat tarkoitetut sisältymään liitteenä olevien patenttivaatimusten määrittelemään suoja-alaan.

Tässä on mainittu erilaisia julkaisuja, joiden sisältö liitetään tähän kokonaisuudessaan viitteeksi.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä terapeuttisen bioyhteensopivan anionisen polymeerin valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että dekstraania keitetään rikkihapon kanssa ja esteröidään klorosulfonihapolla dekstraanisulfaatin tuottamiseksi.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että dekstraanisulfaatin keskimääräinen molekyylipaino on välillä noin 40,000 ja 500,000 daltonia.

3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että polymeerinen kantaja kyllästetään liuoksella, joka käsittää dekstraanisulfaattia sellaisen määrän, joka on tehokas estämään fibroosia, hermosolujen viejähaarakkeiden liikakasvua, neurooman muodostumista, gliasoluinvaasiota tai luunkasvua nisäkkäässä.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että polymeerinen kantaja on natiivi kollageeni tai dekstraani.

5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että polymeerinen kantaja käsittää denaturoidun kollageenin.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että denaturoitu kollageeni käsittää ainakin 5 % koostumuksesta.

7. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että denaturoitu kollageeni käsittää ainakin 10 % koostumuksesta.

8. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että polymeerinen kantaja käsittää sienen, jauheen tai geelin.

9. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että dekstraanisulfaatin konsentraatio liuoksessa on noin 2-20 mg/ml.

10. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että se määrä dekstraanisulfaattia, joka tehokkaasti estää fibroosia nisäkkäässä yhdistetään sellaiseen määrään adhesiivista proteiinia, joka on tehokas ankkuroimaan dekstraanisulfaatin paikalleen nisäkkäässä.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että yhdistäminen suoritetaan kovalenttisesti sitomalla dekstraanisulfaatti adhesiiviseen proteiiniin.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että adhesiivinen proteiini valitaan ryhmästä, joka sisältää fibriinin, simpukan polyfenolisen adheesioproteiinin, hanhenkaulan polyfenolisen adheesioproteiinin, osterin polyfenolisen adheesioproteiinin, kemiallisesti polymerisoituvan peptidin adheesioproteiinista ja rekombinanttisesti tuotetun adheesioproteiinianalogin.

13. Jonkin edellä olevan patenttivaatimuksen mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että dekstraanisulfaatin rikkipitoisuus on suurempi kuin 5 paino-%, edullisesti yli 10 paino-%.

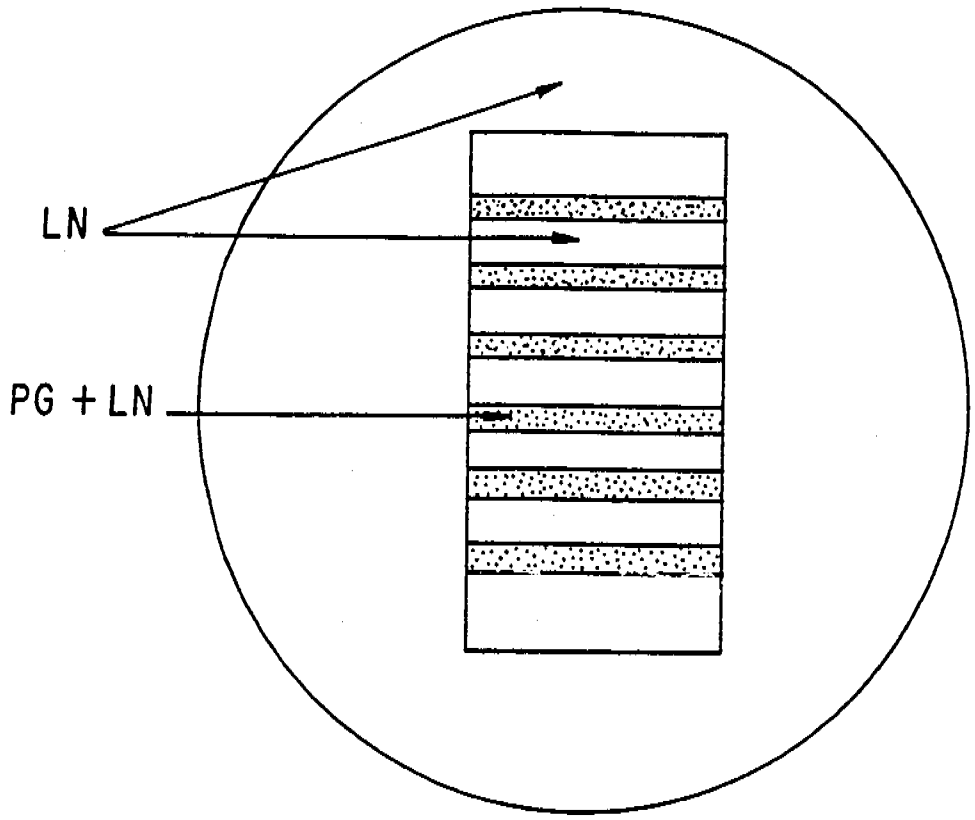

FIG. 1

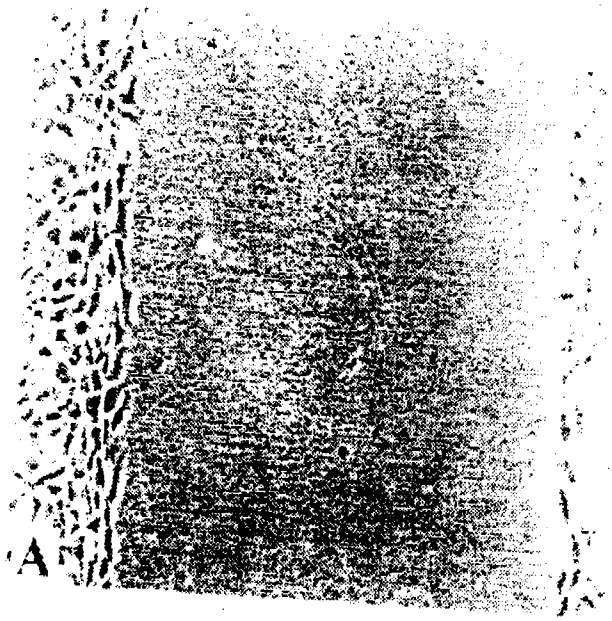

FIG. 2A

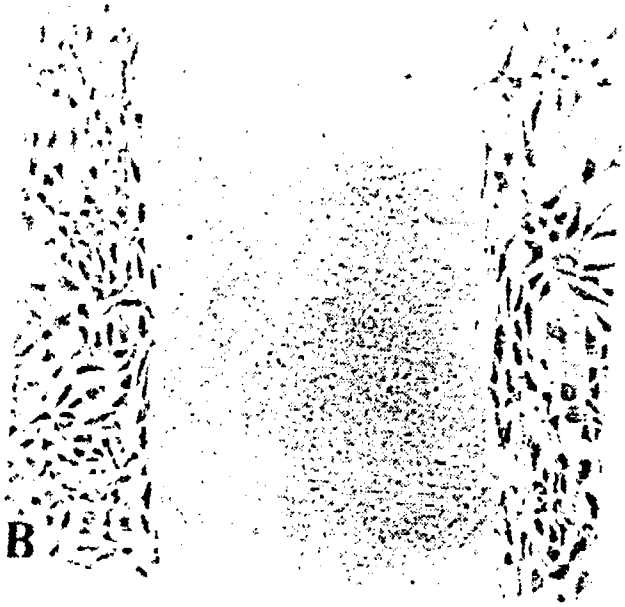

FIG. 2B

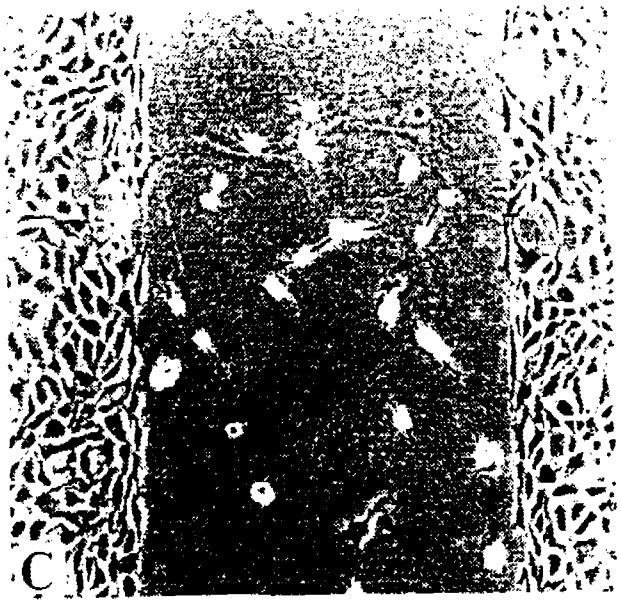

FIG. 2C

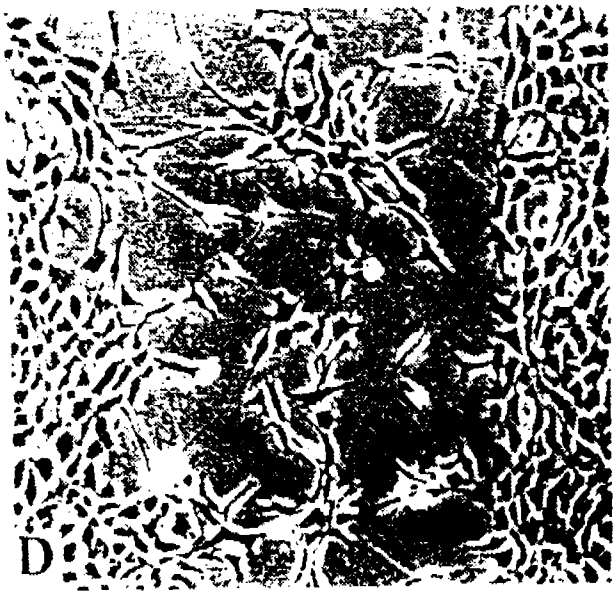

FIG. 2D

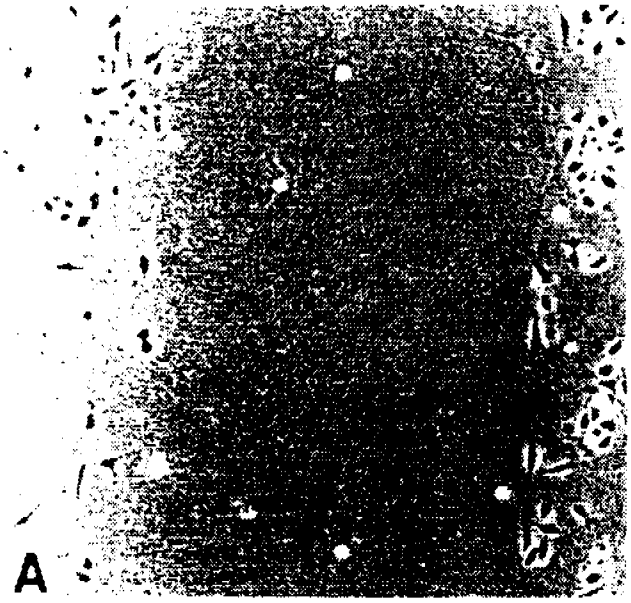

FIG. 3A

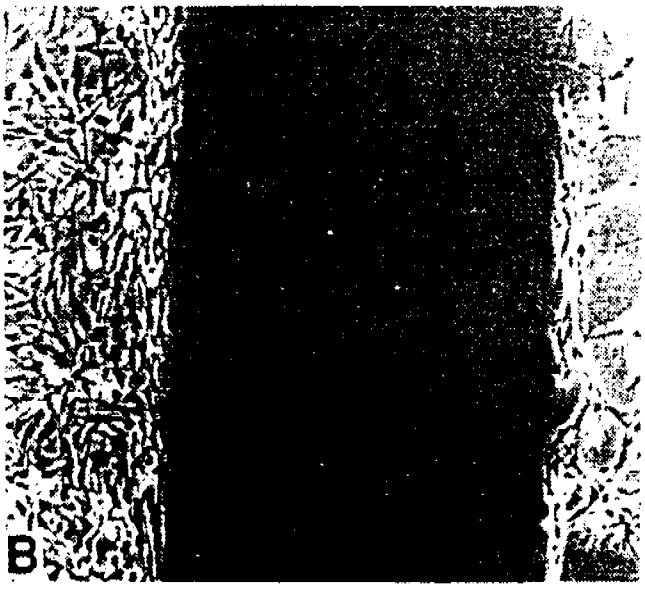

FIG. 3B

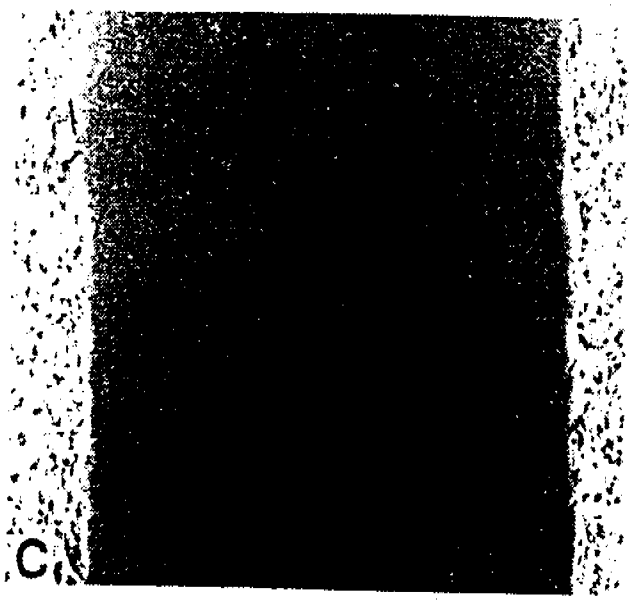

FIG. 3C

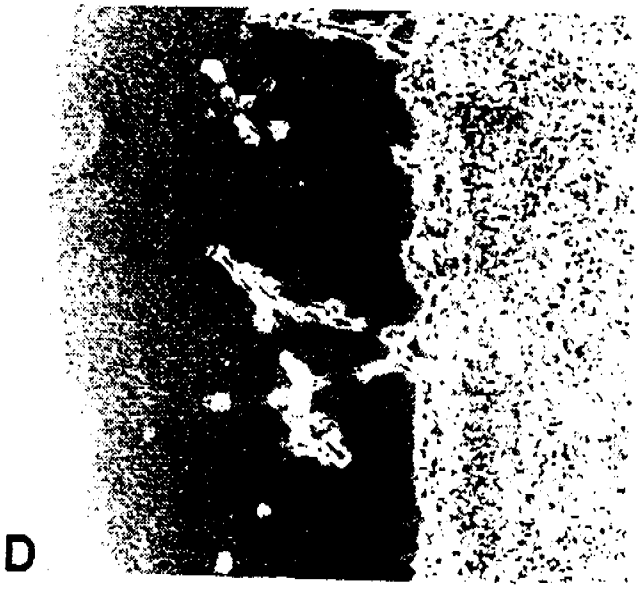

FIG. 3D

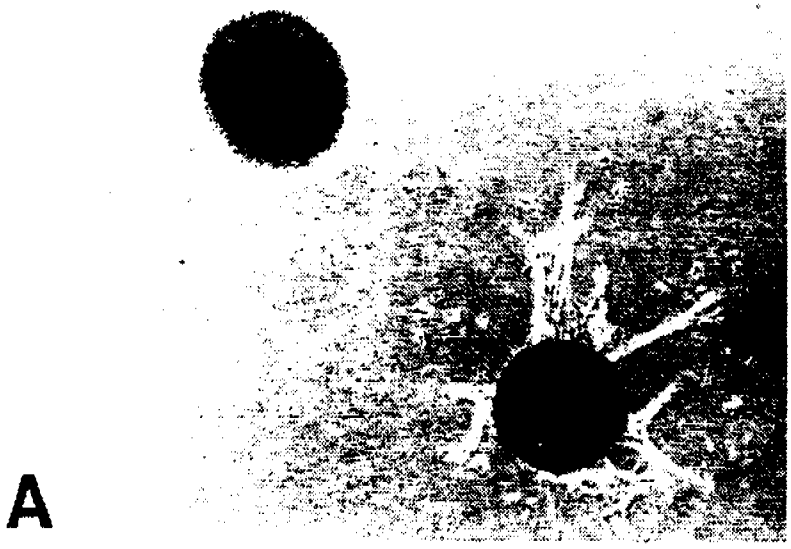

FIG. 4A

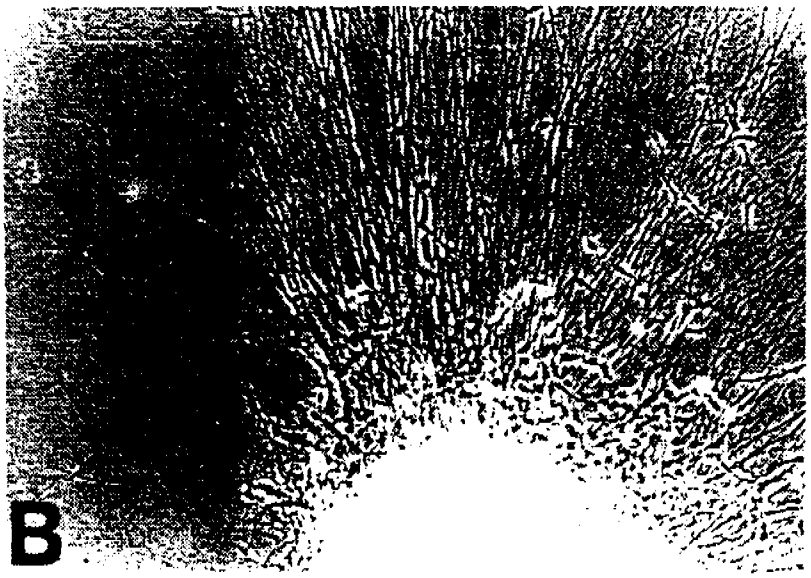

FIG. 4B

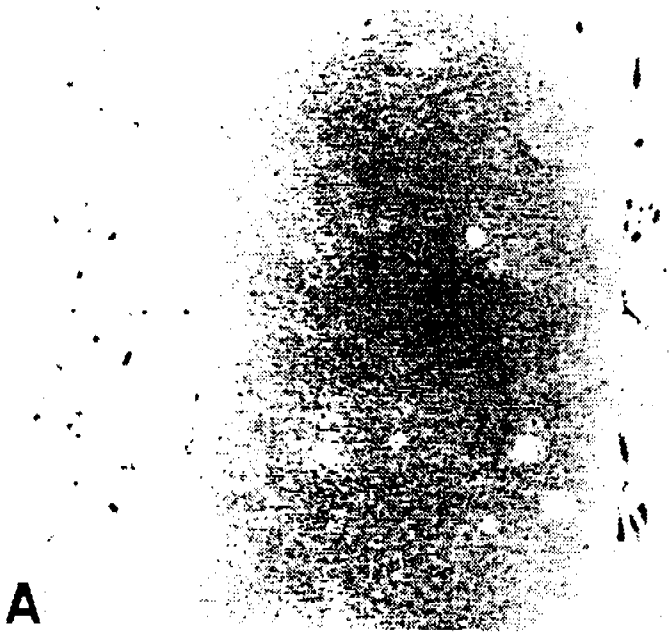

FIG. 5A

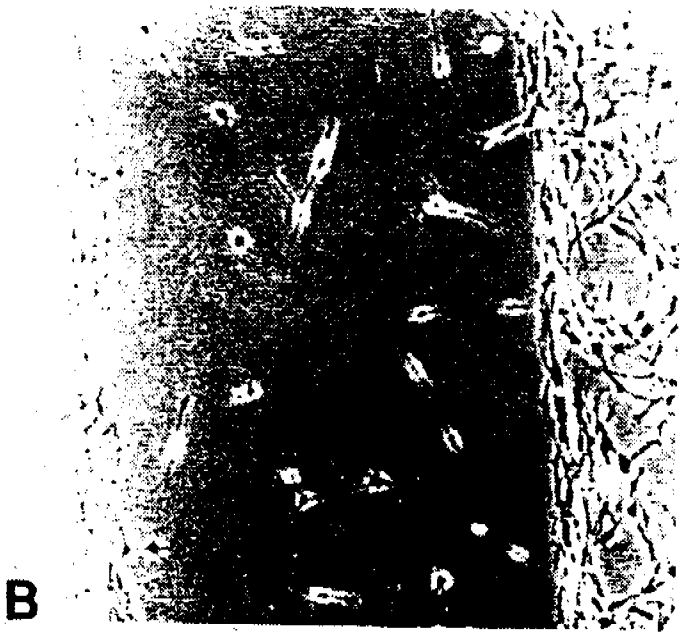

FIG. 5B

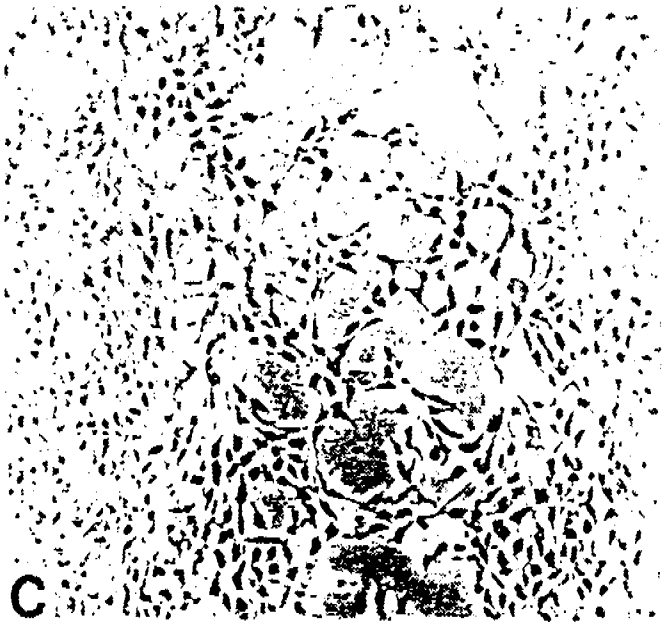

FIG. 5C

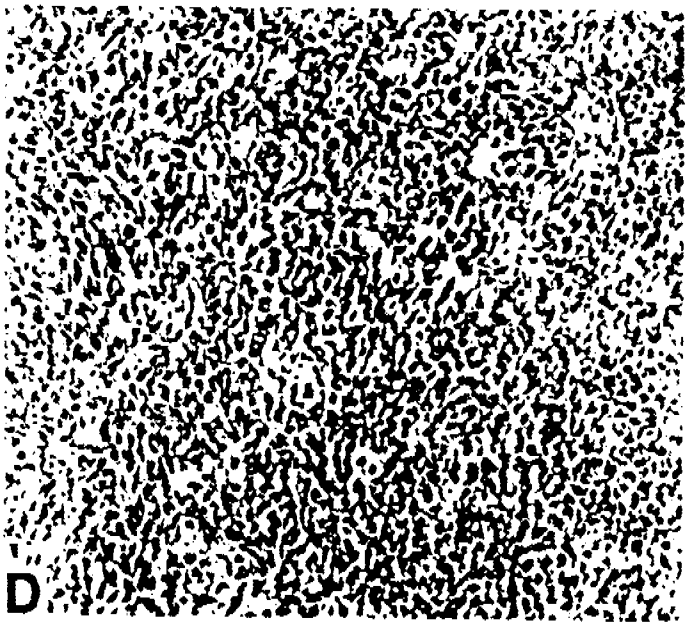

FIG. 5D

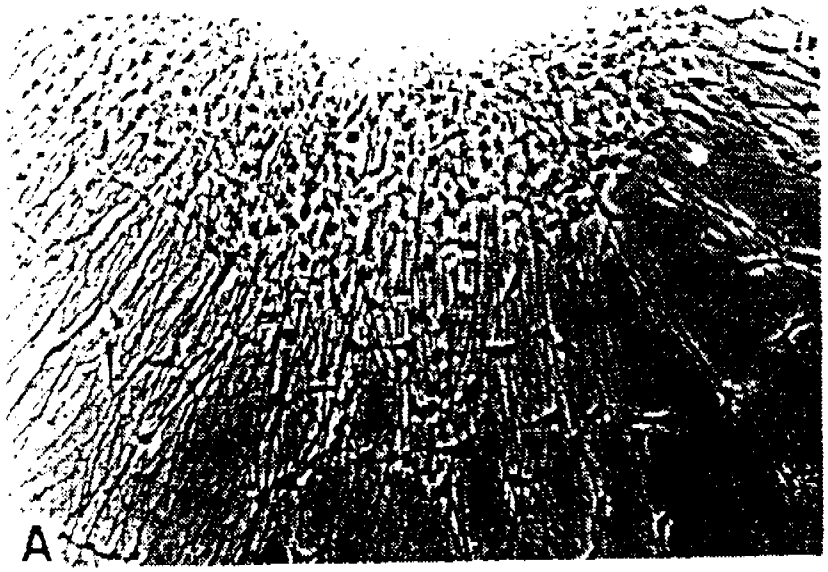

FIG. 6A

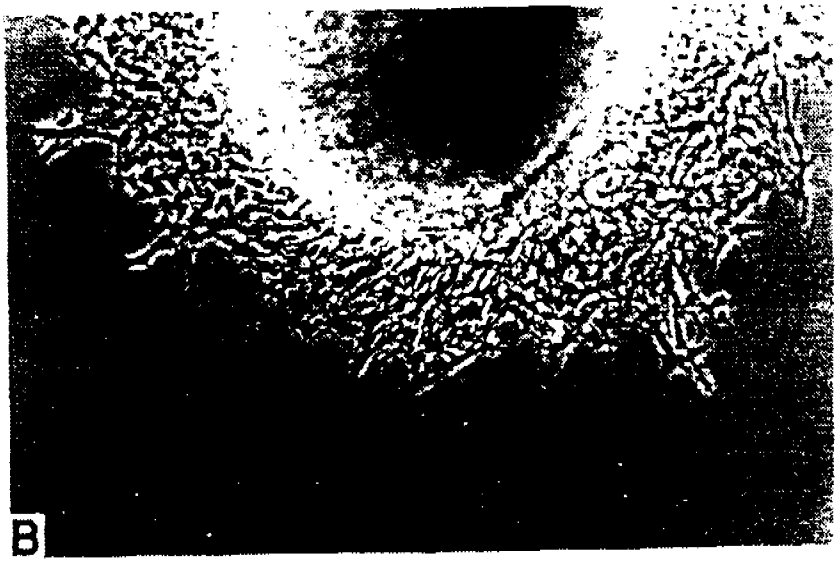

FIG. 6B

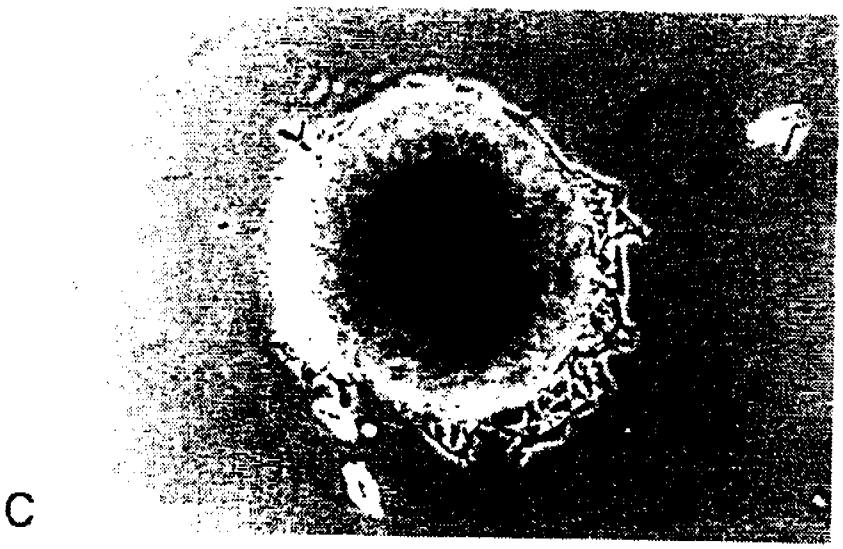

FIG. 6C

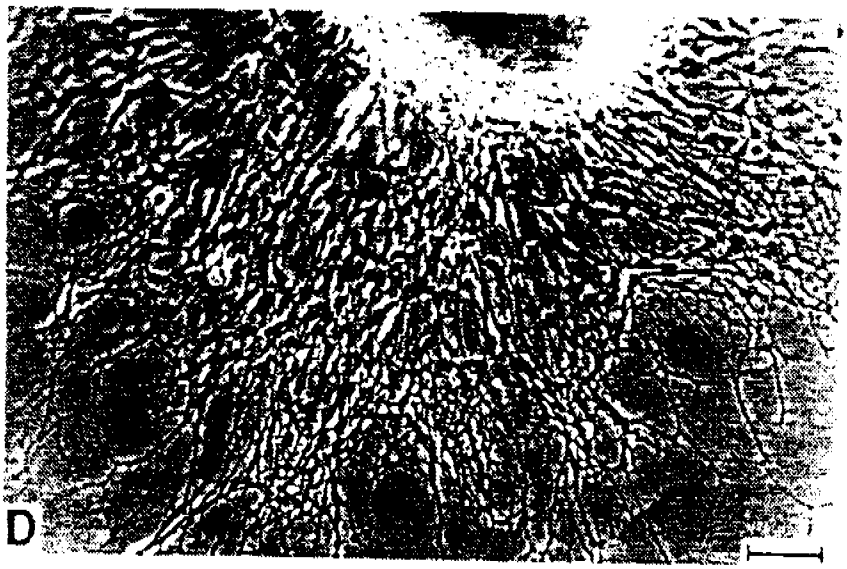

FIG. 6D

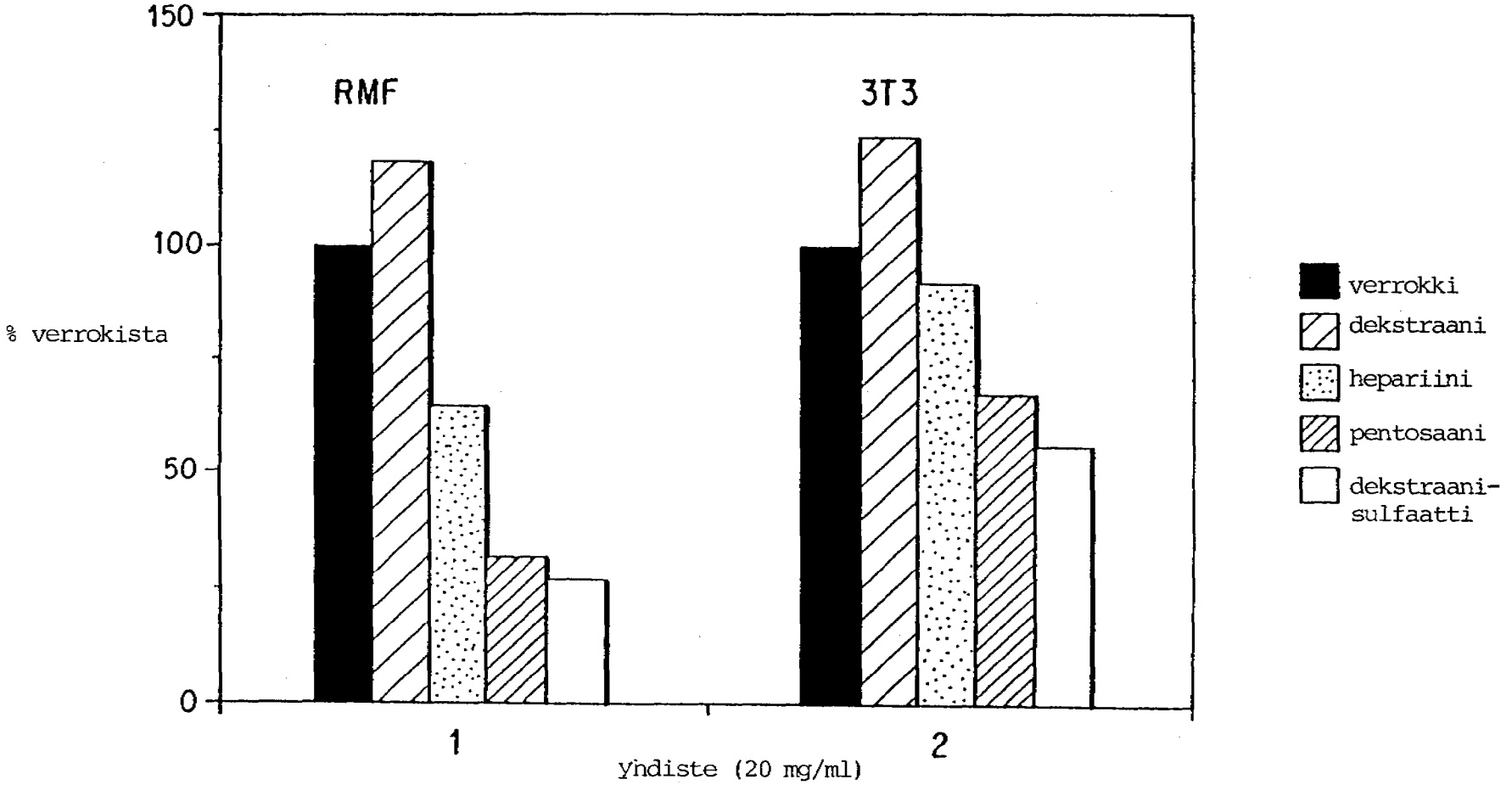
150
100
50
0
% verrokista
RMF
3T3
1
2
yhdiste (20 mg/ml)
verrokki
dekstraani
hepariini
pentosaani
dekstraani-
sulfaatti

FIG. 7

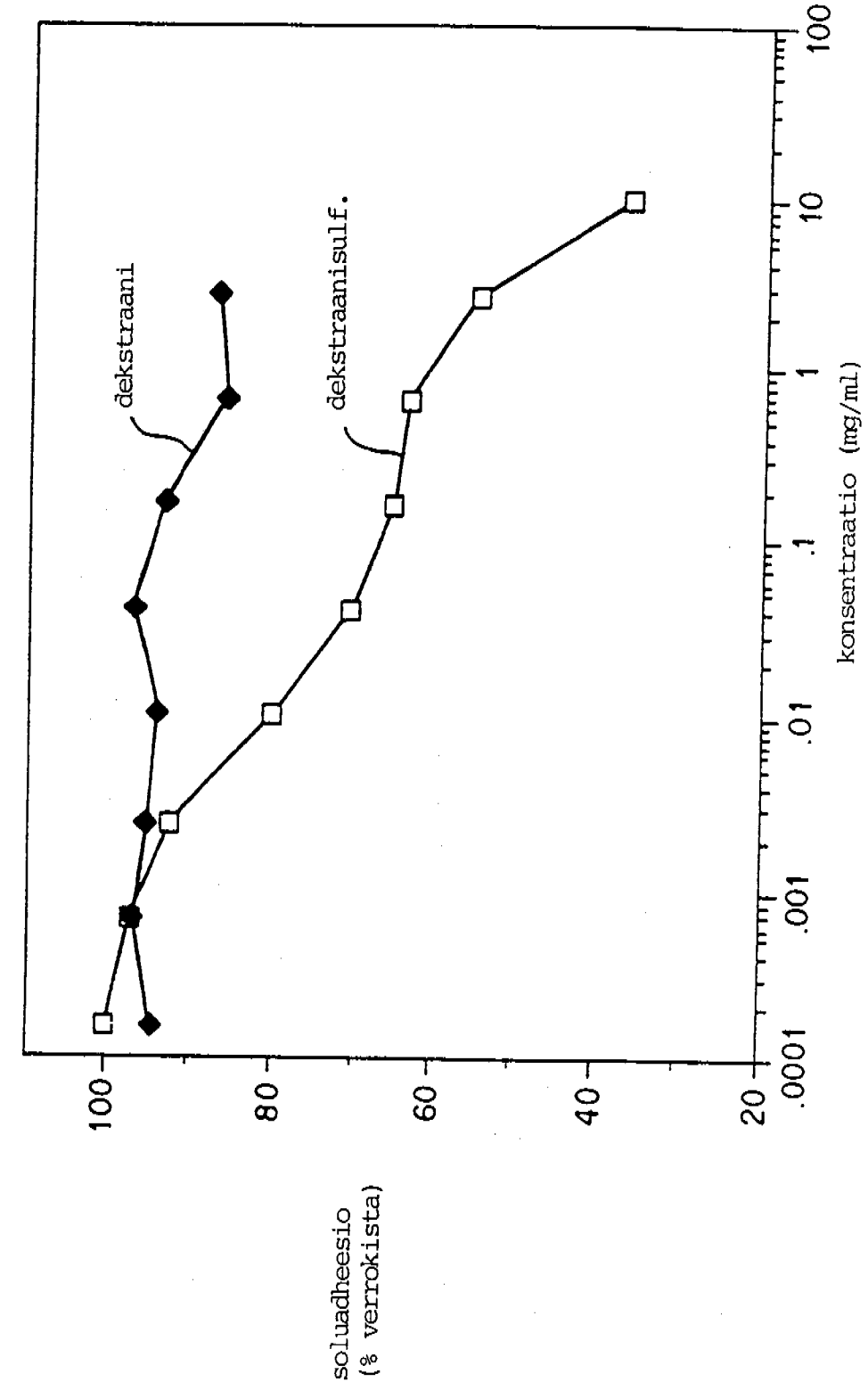
dekstraani
dekstraanisulf.
soluadheesio
(% verrokista)
konsentraatio (mg/ml)
100
80
60
40
20
.0001
.001
.01
.1
1
10
100

FIG. 8

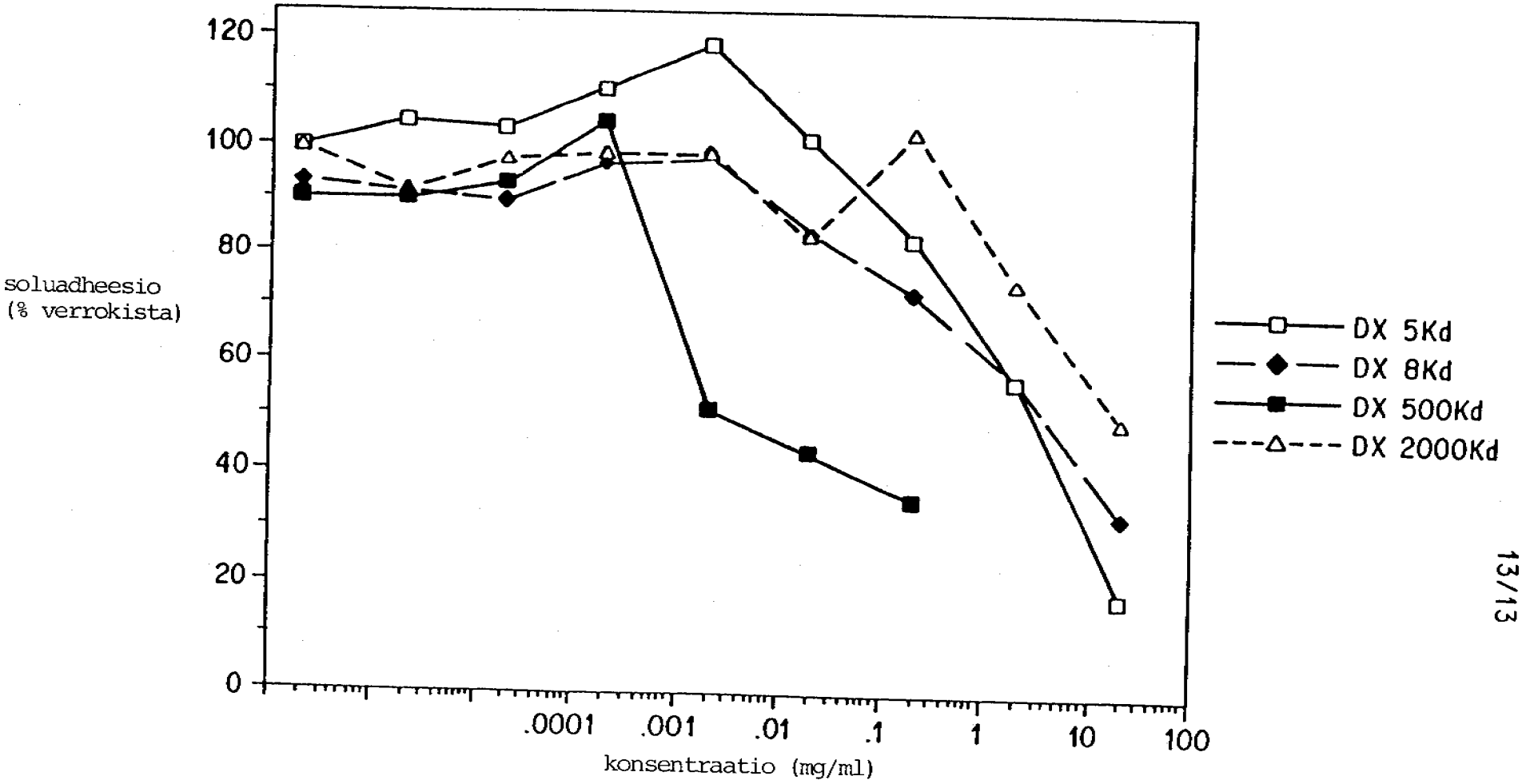
120
100
80
60
40
20
0
soluadheesio
(% verrokista)
.0001
.001
.01
.1
1
10
100
konsentraatio (mg/ml)
DX 5Kd
DX 8Kd
DX 500Kd
DX 2000Kd

FIG. 9

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS **TUTKIMUSRAPORTTI**
Patentti- ja innovaatiolinja

PATENTTIHAKEMUS NRO	LUOKITUS
935345	A61K31/735

TUTKITTU AINEISTO
Patenttijulkaisukokoelma (FI, SE, NO, DK, DE, CH, EP, WO, GB, US), tutkitut luokat
Tiedonhaut ja muu aineisto

VIITEJULKAISUT

Kategoria*)	Julkaisun tunnistetiedot	Koskee vaatimuksia
	The Merck Index, 10. laitos, s. 427, viite 2915	

*) X Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu yksinään tarkasteltuna
Y Patentoitavuuden kannalta merkittävä julkaisu, kun otetaan huomioon tämä ja yksi tai useampi samaan kategoriaan kuuluva julkaisu
A Yleistä tekniikan tasoa edustava julkaisu, ei kuitenkaan patentoitavuuden este

Päiväys	Tutkija
24.8.98	[signature]