



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 20 480 T2 2004.10.07**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 039 916 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 20 480.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR98/02758**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 962 487.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/032099**

(86) PCT-Anmeldetag: **17.12.1998**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **01.07.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.10.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **10.12.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **07.10.2004**

(51) Int Cl.7: **A61K 31/715**  
**A61P 1/02**

(30) Unionspriorität:

**9716080 18.12.1997 FR**

(73) Patentinhaber:

**Institut Francais de Recherche pour l'Exploitation de la mer (IFREMER), Issy-les-Moulineaux, FR; Centre National de la Recherche Scientifique (C.N.R.S.), Paris, FR; Université René Descartes-Paris V, Paris, FR**

(74) Vertreter:

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

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**SENNI, Karim, F-93600 Aulnay sous Bois, FR; PELLAT, Bernard, F-92120 Montrouge, FR; GOGLY, Bruno, F-77840 Crouy/Ourcq, FR; BLONDIN, Catherine, F-75012 Paris, FR; LETOURNEUR, Didier, F-92350 Le Plessis Robinson, FR; JOZEFONVICZ, Jacqueline, F-60260 Lamorlaye, FR; SINQUIN, Corinne, F-44300 Nantes, FR; COLLIEC-JOUAULT, Sylvia, F-44300 Nantes, FR; DURAND, Patrick, F-44400 Reze-les-Nantes, FR**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON WENIGSTEN EINEM FUKAN ZUR HERSTELLUNG EINES ARZNEIMITTELS FÜR DIE BEHANDLUNG PARIODONTALER ERKRANKUNGEN**

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

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

### Beschreibung

- [0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf neue Verwendungen von Fucanen im Rahmen der Reparatur von Läsionen des Bindegewebes und insbesondere zur Regulation der Fibroblastenfunktionen.
- [0002] Die Fibroblasten spielen eine wesentliche Rolle im Gleichgewicht und der Reparatur der Bindegewebe. Sie sind insbesondere für die Erneuerung der extracellulären Matrix verantwortlich und umgekehrt werden ihre Funktionen durch die in dieser Matrix vorhandenen Substanzen moduliert.
- [0003] Insbesondere im Wundheilungs- und Geweberemodulierungsprozess, der nach einer Verletzung eintritt, ist das Bindegewebe der Bereich konstanter Austauschvorgänge zwischen allen Zellen, die in diesem Prozess beteiligt sind. Diese Austauschvorgänge erfolgen insbesondere mit Hilfe von Cytokinen oder löslichen Mediatoren, die durch die extracelluläre Matrix transportiert werden.
- [0004] In den Bedeckungsbindegeweben, wie z. B. den gingivalen Geweben und den Hautgeweben, beginnt der Wundheilungsprozess nach Bildung einer vorläufigen Matrix (roter Thrombus) mit der Rekrutierung von Entzündungszellen (Leukozyten, Makrophagen und segmentkernigen Leukozyten), die eine Phase der Zerstörung des geschädigten Gewebes initiieren.
- [0005] Diese Entzündungszellen beteiligen sich an der Zerstörung:
- indem sie Matrixproteasen, wie z. B. Kollagenase (MMP8), leukozytäre Elastase oder Kathepsin G sezernieren,
  - indem sie Cytokine und insbesondere Interleukin 1 (IL1) freisetzen, die die Proliferation und Migration der Fibroblasten und der Epithelzellen und die Expression bestimmter Metalloproteasen, wie z. B. interstitielle Kollagenase (MMP1) oder Gelatinase B (MMP9), durch diese Zellen stimulieren.
- [0006] Diese Phase der Zerstörung, die sehr bald nach der Verletzung beginnt, endet, wenn das Epithel und seine Basalmembran wiederhergestellt sind.
- [0007] Sie wird durch die Phasen der Reparatur und des Rückgangs (bzw. der Auflösung, resolution) verlängert, bei denen die Fibroblasten das Kollagengerüst wiederaufbauen und neu organisieren; man beobachtet insbesondere die Expression von Gelatinase A (MMP2), Matrixmetalloprotease, die aktiv an allen Phänomenen der Gewebeneumodulierung teilnehmen, durch die Fibroblasten.
- [0008] Bestimmte Pathologien sind von einem chronischen Entzündungszustand des Bindegewebes begleitet, in dem das Gleichgewicht zwischen den Phasen der Zerstörung, der Reparatur und des Rückgangs gestört ist, was zu einem fehlerhaften Wiederaufbau des verletzten Gewebes führt.
- [0009] Dieses Phänomen wird insbesondere im Fall von parodontalen Krankheiten oder Parodontopathien beobachtet.
- [0010] Das Parodont stellt die Gesamtheit der Strukturen dar (Zahnfleisch, dento-alveoläres Ligament, alveolärer Knochen und Zement), die den Halt des Zahns in seiner Zahnalveole sicherstellen.
- [0011] Die Parodontopathien zeigen sich durch inflammatorische Episoden infektiösen Ursprungs, die mehr oder weniger lokalisiert sind, oft zurückkehren und an deren Ende sich das parodontale Gewebe nicht richtig wiederaufbaut.
- [0012] Bei dieser Pathologie spielen sich die Initiierung der inflammatorischen Antwort und die Zellproliferation als Reaktion auf die infektiöse Läsion in fast normaler Weise ab. Dagegen ist die Rückgangsphase (bzw. Auflösungsphase) selten zufrieden stellend; man beobachtet bestenfalls eine Reparatur des zerstörten Gewebes, nicht aber seine vollständige Regeneration und jede Episode der Krankheit induziert einen Gewebeverlust.
- [0013] Die Parodontopathien, die nicht behandelt werden, entwickeln sich zur Beweglichkeit, dann zum Verlust von Zähnen bei einem Erwachsenen mit über 40 Jahren. In dem Maße, wie diese parodontalen Krankheiten in mehr oder weniger ausgedehnter Form etwa 10 bis 15% der Bevölkerung betreffen, haben sie wichtige Konsequenzen für die öffentliche Gesundheit.
- [0014] Derzeit zielt die Mehrzahl der vorgeschlagenen Behandlungen darauf ab, die Läsion mechanisch auszuscheiden und den mikrobiellen Angriff durch Verabreichung von Antiseptika und Antibiotika zu reduzieren.
- [0015] Ein weiterer therapeutischer Ansatz besteht darin, die Qualität des Reparaturprozesses zu verbessern, damit er zu einer vollständigen Regeneration führen kann. Jedenfalls muss dieser Ansatz insbesondere in der Lage sein, im gewünschten Augenblick die geeignete Zellpopulation zu stimulieren um die Zellproliferationen zu steuern und so die Verfahren der Gewebeumbildung zu kontrollieren.
- [0016] Zu diesem Zweck haben die Erfinder die Wirkung verschiedener Polysaccharide untersucht; es ist bekannt, dass bestimmte dieser Moleküle, wie die Glycosaminoglycane, in die Zusammensetzung der Proteoglycane eintreten, welche an der Grenzfläche Zelle/extracelluläre Matrix vorliegen, und bei der Regulierung der Zellfunktionen eine Rolle spielen. Es ist ebenfalls bekannt, dass Glycosaminoglycane in löslicher Form, z. B. Heparin oder Dextranderivate, die Zellfunktionen durch Wechselwirkung mit verschiedenen Bestandteilen der extracellulären Matrix modifizieren können.
- [0017] Im Fall von Heparin z. B. wurde eine stimulierende Wirkung auf die Zellproliferation bei Hamster-Lun-

genfibroblasten, epithelialen Zellen der bovinen Linse [ULRICH et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 139, S. 728–732, (1986)] oder endothelialen Kapillarzellen nachgewiesen [SUDLALTER et al., *J. Biol. Chem.*, 264, S. 6892–6897, (1989)].

[0018] Dagegen wurde auch beobachtet, dass Heparin in dosisabhängiger Weise die Proliferation bestimmter Zelltypen inhibierte; dieser antiproliferative Effekt wurde hauptsächlich im Fall von Zellen der glatten Muskeln (CML) untersucht, für die die Inhibierung für Konzentrationen von 1 µg/ml Heparin in Kulturmedium auftrat. Heparin stellt sich gleichzeitig der Migration und der Proliferation der CML entgegen, beeinträchtigt aber die Reendothelialisierung nicht und auch das Volumen des Bindegewebes nicht [CLOWES et CLOWES, *Lab. Invest.*, 52, S. 611–615, (1985); CLOWES et CLOWES, *Circ. Res.*, 58, S. 839–845, (1986); CLOWES et al., *J. Cell. Biol.*, 107, S. 1939–1945, (1988)].

[0019] Eine Inhibierung der Proliferation wurde auch für andere Zelltypen beobachtet, z. B. sklerotische Fibroblasten [DEL VECCHIO et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 29, S. 1272–1276, (1988)], die Fibroblasten 3T3 (Mausembryo-Fibroblasten, die eine Kontaktinhibierung konservieren) [PAUL et al., *Thromb. Res.*, 18, S. 883–888, (1980)], Epithelialzellen des Rattengebärmutterhalses [LYONS-GIORADANO et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 148, S. 1264–1269, (1987)], humane Hautfibroblasten.

[0020] FERRAO et MASON [*Biochim. Biophys. Acta.* 1180, 225–230, (1993)] haben die Wirkung verschiedener Polysaccharide auf die Proliferation von humanen Hautfibroblasten untersucht und geben an, dass Heparin, Heparansulfat, das Pentosanpolysulfat und ein Fucoidan bei Konzentrationen in der Größenordnung von 800 µg/ml diese Proliferation hemmen, während Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Hyaluronat diese Wirkung nicht haben. Es wird angegeben, dass der Inhibitoreffekt auf die Proliferation eine Stimulation der Synthese von Kollagen, Typ I, mit sich zieht. Andererseits wird eine Inhibierung der Synthese des Kollagens I beobachtet, wenn die Polysaccharide Kulturen, die zur Konfluenz gekommen sind, zugesetzt werden.

[0021] Es hatte jedoch den Anschein, dass die Wirkung der Polysaccharide auf die Zellfunktionen komplex ist und entsprechend dem Polysaccharid, dem Zelltyp und dem betroffenen Gewebe sowie entsprechend der verwendeten Polysaccharidkonzentration und dem Zustand der Zellen variieren kann.

[0022] Im Rahmen der Forschungen, die sich darauf richten, den Wirkmechanismus verschiedener Polysaccharide auf die Fibroblastenfunktionen und insbesondere Zellen, die bei der Geweberegeneration impliziert sind, zu klären, haben die Erfinder besonderes Interesse auf die Fucane gerichtet.

[0023] Die Fucane sind sulfatierte Polysaccharide, die in den Aufbau der Zellwände der Thalli von Braunalgen (Pheophyceae) eintreten sie sind ebenfalls bei bestimmten Meerestieren vorhanden, wie z. B. Seeigel und Seegurke. Das rohe Fucan, auch Fucoidan genannt, das durch saure Extraktion, ausgehend von Zellwänden der Thalli von Braunalgen erhalten wird, besteht aus einer heterogenen Molekülgruppe, die hauptsächlich Polymere von sulfatierter L-Fucose mit erhöhter durchschnittlicher Molmasse (100.000 bis 800.000 g/mol) umfasst.

[0024] Die Fucane besitzen verschiedene biologische Aktivitäten: so wurde gezeigt, dass sie Aktivität gegen Haarausfall und als Wundheilungsmittel für die Haut (EP-A-0730867) haben, Aktivitäten als Antikoagulans, Antithrombotikum haben [T. NISHINO et T. NAGUMO, *Carbohydr. Res.*, 229, S. 355–362, (1992); Anmeldung EP 0 403 377; S. COLLIEC et al., *Thromb. Res.*, 64, S. 143–154 (1991); S. SOEDA et al., *Thromb. Res.*, 72, S. 247–256 (1993); MAURAY et al., *Thromb. Haemost.* (5), 1280–1285 (1995)], antivirale Aktivitäten [M. BABA et al., *J. AIDS*, 3, S. 493–492, (1990)]; antiangiogene Aktivitäten [R. HAHNENBERGER et A. M. JACKOBSON, *Glycoconjugate J.*, 8, 350–353, (1991)] und Antikomplement-Aktivitäten (C. BLONDIN et al., *Mol. Immunol.*, 31, S. 247–253, (1994)] besitzen. Es wurde auch beobachtet, dass sie wie Modulatoren der Kollagensynthese [D. LOGEART et al., *J. Biomed. Materials Res.*, 30, 4, 1996, S. 501–508], Modulatoren der Zelladhäsion [C. G. GLABE et al., *J. Cell Sci.*, 61, S. 475–490, (1983)], der Abtrennung von Wachstumsfaktoren [D. A. BELFORT et al., *J. Cell. Physiol.*, 157, S. 184–189, (1993)], der Proliferation von Tumorzellen [M. ELLOUALI et al., *Anticancer Res.*, 13, S. 2011–2020 (1993); D. R. COOMBE et al., *Int. J. Cancer*, 39, S. 82–90, (1987); D. RIOU et al., *Anticancer Res.*, 16, 1213–1218, (1996)] und der vaskulären glatten Muskelzellen [LOGEART et al., *Eur. J. Cell. Biol.*, 74, S. 376–384, (1997)] wirken können und die Wechselwirkungen Spermatozoid/Ei bei verschiedenen Arten [M. C. MAHONY et al., *Contraception*, 48, S. 277–289, (1993)] blockieren können.

[0025] Präparationen von Fucanen mit einer mittleren Molmasse von unter 20.000, sogar mit 10.000 g/mol, was ihre Verwendung auf therapeutischem Gebiet erleichtert, wurden z. B. durch Säurehydrolyse, die an Fucan mit erhöhter Molmasse durchgeführt wird (Patent EP 0 403 377 von IFREMER) oder durch radikalische Depolymerisation (PCT-Anmeldung WO/9708206 von IFREMER und CNRS) erhalten.

[0026] In der folgenden Beschreibung umfasst der Ausdruck "Fucan" sowohl die Fucane mit erhöhter Molmasse wie auch Präparationen mit geringerer Molmasse, die ausgehend von diesen erhalten wurden.

[0027] Die Erfinder haben festgestellt, dass die Fucane ein Aktivitätsprofil gegenüber den Fibroblastenfunktionen besitzen, das sich von dem von Heparin unterscheidet. Sie haben insbesondere festgestellt, dass bei Testversuchen dieser beiden Polysaccharide unter denselben Bedingungen Heparin die Proliferation der Hautfibroblasten und die der gingivalen Fibroblasten inhibiert, die Fucane die Proliferation der Hautfibroblasten aktivieren, jedoch die der gingivalen Fibroblasten inhibieren. Darüber hinaus haben die Erfinder auch festgestellt,

dass die Fucane die Morphologie der Hautfibroblasten modifizieren, die rund werden, während die gingivalen Fibroblasten dagegen einen Fibroblasten-Morphotyp konservieren.

[0028] Die Erfinder haben auch festgestellt, dass die Fucane die Menge an Proteinen in der Zellschicht, die Aktivität der MMP-2 (Gelatinase A) erhöhen und die leukozytäre Elastase inhibieren.

[0029] Diese Wirkungen zeigen sich sowohl an den Hautfibroblasten wie auch den gingivalen Fibroblasten.

[0030] Die Fucane ermöglichen es, die Expression und/oder die Aktivität der Fibroblasten-Metalloproteinasen und insbesondere der MMP-2 zu modulieren und die leukozytäre Elastase zu inhibieren.

[0031] Die Fucane ermöglichen es auch, die proteolytische Aktivität in den Bindegeweben wie auch in den Hautgeweben und gingivalen Geweben zu kontrollieren und insbesondere die Elastaseaktivität zu begrenzen, die einen potentiellen bedeutenden Zerstörer gegenüber makromolekularen Strukturen des Bindegewebes darstellt, während andererseits gleichzeitig die Aktivität von Proteasen begünstigt wird, die am Wiederaufbau von Gewebe beteiligt sind, wie z. B. MMP-2.

[0032] Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit die Verwendung mindestens eines Fucans zur Herstellung eines Medikaments, das zur Behandlung von parodontalen Pathologien und insbesondere zur Regeneration der gingivalen Gewebe bestimmt ist.

[0033] Das Medikament ist fähig, die Proliferation der gingivalen Fibroblasten zu inhibieren und ihre Kollagensynthese zu aktivieren. Es erlaubt somit die Behandlung von parodontalen Pathologien durch Verbesserung der Rückgangsphase (phase de resolution).

[0034] Infolge der Kombination einer Regulierung der proteolytischen Aktivitäten (insbesondere Aktivierung der MMP-2 und Inhibierung der Elastase) mit einer Inhibierung der Proliferation der gingivalen Fibroblasten, einer Erhöhung der Synthese einer physiologischen Matrix und der Konservierung des Fibroblasten-Morphotyps ermöglichen es Fucane, dass diese gingivalen Fibroblasten in den Remodellierungsweg eingreifen, der für jedes Verfahren zur Gewebereparatur oder Geweberegeneration erforderlich ist.

[0035] Die erfindungsgemäß erhaltenen Medikamente können auf allgemeinem Weg (oral oder parenteral) verabreicht werden. Sie können auch lokal in Form von Gelen, Cremes, Salben, Lotionen, Lutschpastillen, Mundspülungen usw. verabreicht werden. Sie können auch in situ mittels Substraten, resorbierbaren oder nicht-resorbierbaren Vorrichtungen, wie z. B. Träger mit unterschiedlicher Freisetzung oder Schwämme mit langsamer Spaltung, verabreicht werden.

[0036] Die vorliegende Erfindung wird mit Hilfe der Vervollständigung der folgenden Beschreibung besser verständlich, wobei sich diese auf Beispiele bezieht, die die Aktivität von Fucanen auf Hautfibroblasten und gingivale Fibroblasten zeigt.

#### BEISPIEL 1: WIRKUNG DES FUCANS AUF DIE PROLIFERATION VON GINGIVALEN FIBROBLASTEN UND HAUTFIBROBLASTEN

##### Polysaccharide

##### Fucan

[0037] Das verwendete Fucan ist eine Fraktion mit einer mittleren Molmasse von  $20.000 \pm 2000$ , erhalten ausgehend von der Braunalge *Ascophyllum nodosum* nach dem Verfahren, das im Patent EP 0 403 377 beschrieben ist. Dieses Fucan hat einen erhöhten Fucosewert ( $44 \pm 5\%$ ), wenig Uronsäuren ( $7 \pm 3\%$ ),  $28 \pm 3\%$  Sulfatgruppen und keine Proteine.

##### Zellen

[0038] Die verwendeten Fibroblasten wurden ausgehend von Explantaten von gesunden Haut- und gingivalen Geweben erhalten, wobei diese von drei verschiedenen Spendern (Alter 15 bis 30 Jahre) stammten.

##### Durchführung einer Kultur

[0039] Das Protokoll zur Durchführung einer Kultur ist für die gingivalen Fibroblasten und die Hautfibroblasten das gleiche.

[0040] Ausgehend vom Explantat werden die Zellen in DMEM-Kulturmedium (DULBECCO'S modifiziert Eagle Medium), das 1 g/l D-Glucose und 0,862 g/l GLUTAMAX, ein Antibiotikum (Penicillin-Streptomycin 1000 E/ml), Fungizon (Amphotericin B mit 250 E/ml; GIBCO BRL) und 20% fötales Kälberserum (serum de veau foetal = SVF) enthält, kultiviert.

[0041] Die Proben werden aus dem Transportmedium entnommen. Nach dreimaligem Spülen im Kulturmedium werden sie in kleine Stücke mit etwa  $1 \text{ mm}^2$  fein zerschnitten. Sie werden so angeordnet, dass die Epithelschicht nach oben gerichtet ist und dass die Bindegewebsschicht nach unten in Kontakt mit der Kultur-

flasche mit 25 cm<sup>2</sup> gerichtet ist. Die Flasche wird für eine halbe Stunde senkrecht in einen Inkubator mit 37°C (95% Luft, 5% CO<sub>2</sub>) gestellt um die Adhäsion zu begünstigen.

[0042] Nach Zusatz eines Tropfens Medium auf jedes Gewebefragment wird die Flasche für eine Nacht zurück in den Inkubator gestellt.

[0043] Am nächsten Morgen wird das Kulturmedium durch das gleiche frische Medium ersetzt. So wird die Flasche vier Tage im Inkubator gelassen.

[0044] Das Medium wird dann alle drei Tage gewechselt und die Explantate werden herausgenommen, sobald die Fibroblasten an der Wand haften. Wenn die Fibroblasten den Boden der Flasche ganz befallen haben, ist die Primärkultur beendet.

#### Weitere Arbeitsgänge

[0045] Das Kulturmedium wird entfernt, die Flasche wird dreimal mit PBS (DULBECCO'S Phosphat-gepufferte Salzlösung) gespült um Spuren an SVF zu entfernen, dann wird mit Trypsin behandelt (Trypsin, verdünnt in DPBS auf 0,05% und filtriert). Nach 5 Minuten lösen sich die Fibroblasten ab und werden rund.

[0046] Die Zellen werden in drei Flaschen in DMEM (10 bis 12 ml) mit 10% SVF und 1000 E/ml Penicillin-Streptomycin verteilt.

[0047] Das Medium wird regelmäßig bis zur vollständigen Kolonisierung der neuen Flasche gewechselt.

#### Protokoll der Zellproliferation

[0048] Die konfluenten Zellen werden trypsinisiert, in DMEM mit 7000 bis 10.000 Zellen/ml suspendiert, dann in Platten mit 24 Vertiefungen verteilt. Die Vertiefungen werden mit Medium mit 10% SVF gefüllt und die beimpften Platten werden für zwei Stunden zurück in den Inkubator gelegt um eine Adhäsion zu ermöglichen. Drei Stunden nach der Beimpfung wird das Medium durch DMEM/10% SVF-Medium (Vergleichsgruppe) oder auch DMEM/10% SVF mit 1, 10 oder 100 µg/ml untersuchtem Polysaccharid (Fucan oder Heparin) ersetzt. Die Zellen werden bis zum 4. Tag jeden Tag gezählt.

[0049] Die Proliferation wird als Prozentwert durch die folgende Beziehung errechnet:

$$\%P = \frac{(\text{Netto-Proliferation mit Produkt} - 1)}{\text{Netto-Proliferation der Vergleiche}} \times 100$$

[0050] Wenn der errechnete Wert positiv ist, gibt es eine Zellproliferation, wenn er negativ ist, gibt es eine Inhibierung der Zellproliferation.

[0051] Die Resultate, die den Prozentwert der Proliferation in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an Fucan betreffen, sind in den folgenden Tabellen 1a (gingivale Fibroblasten) und 2b (Hautfibroblasten) angegeben:

TABELLE 1a

Tage	Fucankonzentration	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
	1		-6	-8
2		-9	-36	-32
3		-11	-41	-44
4		-22	-39	-55

TABELLE Ib

Tage	Fucankonzentration	1 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml
	1		14	41
2		13	43	11
3		17	46	21
4		37	56	41

[0052] Diese Resultate zeigen, dass Fucan die Proliferation der gingivalen Fibroblasten und der Hautfibroblasten unterschiedlich beeinflusst:

- gingivale Fibroblasten (Tabelle Ia): man kann eine Inhibierung der Proliferation beobachten, die ihr Maximum in der exponentiellen Wachstumsphase erreicht. Diese Inhibierung scheint dosisabhängig zu sein.
- Hautfibroblasten: (Tabelle 2b): die verschiedenen Untersuchungen zeigen eine proproliferative Wirkung des Fucans auf die Hautfibroblastenkulturen. Diese Wirkung ist am 4. Kulturtag maximal und die Konzentration von 10 µg/ml ist am wirksamsten.

#### BEISPIEL 2: EINFLUSS DES FUCANS AUF DIE AKTIVITÄT DER MMP-2 (GELATINASE A) UND AUF DIE MORPHOLOGIE DER FIBRO-BLASTEN

[0053] Die Zellen werden in Platten mit 24 Vertiefungen ausgesät (7000 bis 10.000 Zellen/ml) und in Gegenwart von DMEM/10% SVF kultiviert. Bei Konfluenz wird das Medium durch DMEM für die Vergleiche und durch DMEM, das verschiedene Konzentrationen an Fucan enthält (1, 10, 100 µg/ml) während 24 Stunden ersetzt. Die Medien werden dann zum Nachweis der gelatinolytischen Aktivität der pro-MMP-2 wiedergewonnen und die fixierten und gefärbten (Methanol/GIEMSA)-Zellen werden gezählt und durch Morphometrie an einer BIOCOM 200-Station analysiert.

#### Bestimmung der gelatinolytischen Aktivität

[0054] Die gelatinolytischen Eigenschaften, die in den Kulturmedien vorliegen, werden durch Zymographie nach Elektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen auf SDS-Polyacrylamidgel + Gelatine, danach Eliminierung des SDS, nachgewiesen.

[0055] Die Resultate werden durch halb-automatische Bildanalyse an der BIOCOM 200-Station quantifiziert. Für jede Bande, die auf dem Gel auftritt, bestimmt man die Graudichte (D) durch die Oberfläche der Bande (S). Dieses Produkt, das als Zellenzahl angegeben wird, erlaubt es, die verschiedenen gelatinolytischen Aktivitäten abzuschätzen und zu vergleichen.

[0056] Die Resultate werden in der folgenden Tabelle II angegeben:

TABELLE II

	DxS für 1000 Zellen		Variationsindices	
	Hautfibroblasten	gingivale Fibroblasten	FD	FG
Vergleiche	16669±5563	16453±5066	100	100
1 µg/ml	36652±6829	21450±2880	219	130
10 µg/ml	25316±3030	25816±2304	151	157
100 µg/ml	27613±5710	22656±5656	165	137

[0057] Diese Resultate zeigen, dass Fucan selbst bei den schwächsten Konzentrationen die Sekretion der pro-MMP2 bei den zwei untersuchten Fibroblastentypen erhöht.

#### Zellmorphometrie

[0058] Es werden vier Parameter untersucht: der Umfang (ausgedrückt in µm), die Oberfläche der Zelle (aus-

gedrückt in  $\mu\text{m}^2$ ), ihr äquivalenter Durchmesser (ausgedrückt in  $\mu\text{m}$ ) und ihr Formfaktor.

[0059] Der äquivalente Durchmesser ist der Durchmesser des kleinsten Kreises, der die Zelle ganz enthält. Er definiert die größte Länge der Zelle.

[0060] Der Formfaktor wird durch die Beziehung  $4\pi S/P^2$  bestimmt, worin S die Oberfläche und P den Umfang darstellen: wenn er gegen null tendiert, gibt er eine längliche Struktur wieder; wenn der zunimmt, gibt er eine Rundung der Form wieder.

[0061] Die Resultate werden durch die folgenden Tabellen IIIa (gingivale Fibroblasten) und IIIb (Hautfibroblasten) dargestellt:

TABELLE IIIa

	Umfang	Oberfläche	Durchmesser	Formfaktor
Vergleiche	1050±234	6942±1682	93±11	0,08
1 $\mu\text{g/ml}$	1039±180	6154±1396	87±10	0,07
10 $\mu\text{g/ml}$	1182±209	5203±1389	82±10	0,04
100 $\mu\text{g/ml}$	910±111	4753±1036	77±9	0,07

TABELLE IIIb

	Umfang	Oberfläche	Durchmesser	Formfaktor
Vergleiche	924±154	5446±1241	82±9	0,08
1 $\mu\text{g/ml}$	878±125	5665±807	84±6	0,11
10 $\mu\text{g/ml}$	919±136	6770±889	92±6	0,13
100 $\mu\text{g/ml}$	851±89	7556±1580	97±10	0,13

[0062] Diese Resultate zeigen, dass die gingivalen Fibroblasten und die Hautfibroblasten unterschiedlich auf Fucan reagieren:

gingivale Fibroblasten: die Oberfläche sowie der Durchmesser dieser Zelle nimmt ab, wenn ihr Umfang zunimmt. Diese Parameter ermöglichen es, einen Formfaktor zu errechnen, der gegen null tendiert, was eine längliche Zelle des Fibroblastentyps beinhaltet.

[0063] Hautfibroblasten: unter dem Einfluss des Fucans zeigen diese Zellen eine zunehmende Oberfläche und einen zunehmenden Durchmesser, während ihr Umfang konstant bleibt. Der Formfaktor steigt an, was eine Rundung der Zellen impliziert.

BEISPIEL 3: EINFLUSS DES FUCANS AUF DIE LEUKOZYTENELASTASEAKTIVITÄT

[0064] Die Aktivität der Leukozytenelastase in Gegenwart von Fucan (1  $\mu\text{g/ml}$  oder 10  $\mu\text{g/ml}$ ) oder Heparin H108 (1 IE/ml oder 10 IE/ml) wird gemessen, indem als synthetisches Substrat:

N-MeO-Succ-Ala-Ala-Pro-Val-PA,

nach dem Protokoll, beschrieben von BIZTO-FOULON et al. (International Journal of Cosmetic Science, 17, S. 255–264, (1995)), verwendet wird.

[0065] Die Resultate werden in der folgenden Tabelle IV angegeben:

TABELLE IV

FUCAN		HEPARIN	
Konzentration	% Inhibierung	Konzentration	% Inhibierung
1 $\mu\text{g/ml}$	51,8	1 IE/ml	16,95
10 $\mu\text{g/ml}$	54,5	10 IE/ml*	9,25

\*1 IE/ml = 5,8  $\mu\text{g/ml}$

[0066] Diese Resultate zeigen, dass die Inhibierung der Leukozytenelastase im Fall von Heparin begrenzt ist und dass die Inhibitorwirkung sich verringert, wenn die Konzentration an Heparin zunimmt; im Fall des Fucans dagegen wird die Inhibierung ab der Konzentration von 1 µg/ml viel wichtiger.

#### BEISPIEL 4: EINFLUSS DES FUCANS AUF DIE BIOSYNTHESE DER FIBRILLÄREN KOLLAGENE

[0067] Die Biosynthese der Kollagene wird nach Einbau von tritiiertem Prolin (<sup>3</sup>H-Pro) gemessen.

[0068] Die Zellen werden in DMEM/10%SVF bis zur Konfluenz kultiviert. Die Medien werden dann durch DMEM, das Ascorbinsäure (50 µg/ml) und <sup>3</sup>H-Pro (25 µCi/ml) enthält, für die Vergleiche oder dasselbe Medium, das mit Fucan in verschiedenen Konzentrationen (1, 10, 100 µg/ml) oder auch mit Heparin H108 in einer Konzentration von 400 µg/ml versetzt ist, ersetzt. Nach 24 Stunden werden die Medien und die Zellschicht wiedergewonnen.

[0069] Die spezifische Extraktion des Prolins und des Hydroxyprolins, die radioaktiv markiert sind, durch das Verfahren von ROJKIND und GONZALES [Anal. Biochem. 57: 1-7 (1974)] ermöglicht die Bestimmung des Verhältnisses Gesamtkollagensynthese/Gesamtproteinsynthese.

[0070] Die Resultate sind in der Tabelle Va (gingivale Fibroblasten und Vb (Hautfibroblasten) nachfolgend angegeben:

TABELLE Va

	Kollagen- synthese/ Protein- synthese	% der Kollagene, die in der Zellschicht vorliegen	% der Proteine, die in der Zellschicht vorliegen
Vergleiche	5	29	34
1 µg	5	26	38
10 µg	5	38	44
100 µg	5	40	51

TABELLE Vb

	Kollagen- synthese/ Protein- synthese	% der Kollagene, die in der Zellschicht vorliegen	% der Proteine, die in der Zellschicht vorliegen
Vergleiche	7	33	43
1 µg	5	38	55
10 µg	4,5	38	55
100 µg	5	32	63

[0071] Diese Resultate zeigen, dass die zwei Fibroblastentypen unter der Wirkung des Fucans dazu neigen, eine Matrix zu synthetisieren, die sich vorzugsweise in der Zellschicht abscheidet. Diese Matrixabscheidung scheint die Gesamtheit der Proteine und nicht nur das Kollagen zu betreffen, was für die beiden Zelltypen jedes Fibroserisiko ausschließt.

– Gingivale Fibroblasten: das Verhältnis Gesamtkollagensynthese/Gesamtproteinsynthese variiert nicht. Der prozentuale Anteil der Kollagene in der Zellschicht steigt parallel zum prozentualen Anteil der Proteine in dosisabhängiger Weise.

– Hautfibroblasten: der prozentuale Anteil der Kollagene, die in der Zellschicht vorliegen (intra- + pericellulär) steigt bei schwacher Dosis an und ändert sich bis 100 µg/ml nicht, während die Menge der Proteine, die in diesem Kompartiment vorliegt, mit der Fucankonzentration zunimmt. Das Verhältnis Gesamtkollagensynthese/Gesamtproteinsynthese nimmt ab.

Einfluss von Fucan oder Heparin auf die Abscheidung von pericellulären Kollagenen, die durch die gingivalen Fibroblasten synthetisiert werden.

[0072] Die Zellen werden wie oben beschrieben in Gegenwart von tritiiertem Prolin kultiviert; man gibt Fucan in einer Konzentration von 100 µg/ml oder Heparin H108 (mittlere Molekülmasse  $21.000 \pm 2000$ , Aktivität 173 IE/mg, im Handel von CHOAY SANOFI) in einer Konzentration von 400 µg/ml zu.

[0073] Um die Menge an fibrillärem Kollagen zu bestimmen, führt man eine differentielle Extraktion der intracellulären und pericellulären Kollagene durch Desoxycholat (das im Wesentlichen das intracelluläre Prokollagen extrahiert) und SDS (welches das pericelluläre Kollagen, das in der extracellulären Matrix akkumuliert ist, löst) durch.

[0074] Die Resultate werden in der folgenden Tabelle VI angegeben:

TABELLE VI

	% pericelluläres Kollagen	Variation/ Vergleiche
Vergleiche	19	0
H108	29	+35
Fucan	44	+56

[0075] Diese Resultate ermöglichen es, zu bestätigen, dass die Erhöhung der Kollagene in der Zellschicht infolge einer Matrixabscheidung (demnach pericellulär) und nicht auf eine übermäßige intracelluläre Retention zurückzuführen ist. Sie zeigen außerdem, dass die Matrixabscheidung in Gegenwart von Fucan bedeutender als in Gegenwart von Heparin ist.

#### Patentansprüche

1. Verwendung mindestens eines Fucans zur Herstellung eines Medikaments, das zur Behandlung parodontaler Pathologien bestimmt ist.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Medikament zur Regeneration gingivaler Gewebe bestimmt ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Fucan in eine Vorrichtung zur verzögerten Freisetzung eingearbeitet ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen