(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 32 976 T2** 2005.05.04

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 871 414 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 32 976.6**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/02350**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 911 929.8**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 95/024873**
(86) PCT-Anmeldetag: **27.02.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **21.09.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.10.1998**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **28.04.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **04.05.2005**

(51) Int Cl.[7]: **A61F 2/24**
A61L 27/38

(30) Unionspriorität:
213754 **14.03.1994** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Cryolife, Inc., Marietta, Ga., US

(72) Erfinder:
GOLDSTEIN, Steven, Atlanta, US

(74) Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser, 80538 München

(54) Bezeichnung: **HERSTELLUNGSVERFAHREN VON GEWEBE ZUR IMPLANTATION**

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

Hintergrund

[0001] Chirurgischer Herzklappenersatz kann die Implantation eines von drei unterschiedlichen Prothesentypen umfassen; mechanisch (synthetisch), als Bioprothese (chemisch fixierte Schweineklappe oder Rinderperikard), oder als Allograft vom Menschen. Diese Prothesen bieten eine effektive hämodynamische Verbesserung für den Ersatz von nativen Aortenklappen, die entweder kongenital missgebildet sind oder durch degenerative Prozesse oder eine Erkrankung beschädigt worden sind, was entweder zu einer Aortenklappeninsuffzienz oder zu einer Aortenklappenstenose führt. Von den etwa 55.000 Aortenklappenimplantaten pro Jahr in den Vereinigten Staaten sind 75% mechanische Klappen. Der Rest der Ersatzstücke stammt von transplantierten Geweben. Davon sind über 80% Bioprothesen vom Schwein; die verhältnismäßig geringe Zahl von Allografts (2.500 pro Jahr) ist vornehmlich auf ihre beschränkte Verfügbarkeit zurückzuführen.

[0002] Die Kriterien für eine ideale Prothese würden eine natürliche Hämodynamik, lange Haltbarkeit, niedrige Inzidenz thrombembolischer Komplikationen, Freiheit von Verkalkung, nachgewiesenes Fehlen von Immunogenitiät und keine unangemessenen hyperplastischen Reaktionen nach der Implantation einschließen. Auch in Situationen mit autologen Transplantaten kann die chirurgische Handhabung des Gewebes – wie zum Beispiel Venentransplantaten – selbst ein Stimulus für Gewebshyperplasie und folgendes Transplantatversagen sein.

[0003] Gemäß dieser Erfindung können Herzklappen – Aortenklappen und Pulmonalklappen – mit vorteilhaften Eigenschaften im Hinblick auf Verschleiß, Verkalkungsneigung, Stimulation von Immunreaktionen und verringerten Schwierigkeiten bei der Beschaffung hergestellt werden. Sie ist auch auf andere Gewebsformen anwendbar, spezielle auf solche, die aus strukturellen interstitiellen Kollagenen zusammengesetzt sind.

[0004] Es wurden verschiedene synthetische Transplantate und mechanische Organe entwickelt und sind derzeit in Gebrauch. Von diesen synthetischen Ersatzteilen ist jedoch bekannt, dass sie bei langen Implantationszeiten zu embolischen Komplikationen oder Materialermüdung neigen. Obwohl strukturelle Veränderungen bei mechanischen Prothesen wie zum Beispiel Herzklappen im Hinblick auf deren Verschleißeigenschaften verbessert wurden, bleiben sie verantwortlich für Klappenfehlfunktionen, die plötzlich und ohne Warnung auftreten und zu Notfallsituationen, die eine chirurgische Intervention und den Ersatz der künstlichen Prothese erfordern, führen können. Infolge der Oberflächeneigenschaften von synthetischen/mechanischen im Gefäßsystem verwendeten Prothesen erhöht die Anhaftung von Blutplättchen die Wahrscheinlichkeit einer Thrombenbildung, und es muss für die Lebensdauer des Implantats eine Antikoagulationstherapie verordnet werden, was solche Implantate für bestimmte Gruppen potenzieller Empfänger nicht wünschenswert macht (zum Beispiel. Frauen im gebärfähigen Alter).

[0005] Eine Alternative, Herzklappen-Bioprothesen, werden aus Klappengewebe vom Schwein oder vom Rind hergestellt. Da dies Arten sind, die immunologisch zum Menschen diskordant sind, werden sie vom Implantatempfänger trotz des Einsatzes einer immunsuppressiven medikamentösen Therapie, die sonst ein Allograft erhalten würde, schnell abgestoßen. Bezeichnenderweise unterliegen diese Gewebe einer hyperakuten Abstoßung durch den Empfänger aufgrund der Gegenwart präformierter natürlicher Antikörper im Empfänger, die Antigene auf der Oberfläche der fremden Zellen erkennen, besonders solcher, die zur Endothel-Auskleidung von Herzklappen und Blutgefäßen gehören. Während Klappengewebe vom Rind oder Schwein strukturell und biomechanisch für die Verwendung im Menschen geeignet sind, erforderte die Fähigkeit von solchem Fremdgewebe, im Empfänger eine immunologische Abstoßung in Gang zu setzen, in der Vergangenheit Behandlungen mit vernetzenden Agenzien wie zum Beispiel Glutaraldehyd. Eine derartige Behandlung des Gewebes verringert die Stimulation einer immunologischen Reaktion des Empfängers auf das Fremdgewebe und stabilisiert auch das Kollageneiweiß des resultierenden nicht lebensfähigen Klappengewebes und macht es gegen Abbau durch proteolytische Enzyme widerstandsfähiger. Jedoch gibt es, weil diese Gewebstransplantate nicht lebensfähig sind, keinen biosynthetischen Mechanismus zur Reparatur von strukturellen Proteinen, die während der Funktion des Gewebes im Empfänger versagt haben. Solche Gewebstransplantate neigen mit der Zeit dazu, zu verkalken und erhöhen damit des Risiko eines strukturellen Schadens und eines daraus folgenden Versagens. Obwohl sie im Vergleich mit mechanischen Transplantaten seltener auftritt, ist Thrombembolie auch ein Thema beim Patientenmanagement für Empfänger dieser Transplantate.

[0006] In ähnlicher Weise wurden im Bestreben, immunologisch vermittelte Reaktionen im Transplantatempfänger, die zur Organabstoßung führen würden, zu minimieren, Organe wie zum Beispiel Nieren allogen von einem Geschwisterteil auf ein anderes transplantiert. Diesen Patienten werden ebenso wie Patienten, die Transplantatorgane von Spendern, die nicht ihre Geschwister sind, erhalten, häufig Medikamente zur Suppression ihres Immunsystems verabreicht. Während die immunologische Reaktion auf Transplantatgewebe oder -organe durch die Verwendung immunsuppressiver Medikamente unterdrückt

werden kann, um Abstoßung zu minimieren, ist immunsuppressive Therapie naturgemäß breit. Infolgedessen neigen immunsuppressive Medikamente auch dazu, die Immunantwort generell zu supprimieren, was die Fähigkeit des Transplantatempfängers, Infektionen zu bekämpfen, herabsetzt.

[0007] Vor kurzem wurden Verfahren zur Erzeugung verbesserter Bioprothesen zur Implantation in Menschen oder Säuger durch Behandlung von Gewebe nicht-menschlichen Ursprungs beschrieben. Siehe Orton, E. Christopher, U.S. 5,192,312. Orton berichtet über die Erzeugung von Implantatgewebe durch Entfernung nativer Zellen aus Gewebe, welches beispielsweise vom Schwein stammt, und anschließende Wiederbesiedelung des Gewebes mit neuen Zellen in Gegenwart von Wachstumsfaktor. Die zur Wiederbesiedelung verwendeten Zellen sind immunologisch mit dem geplanten Implantatempfänger kompatibel. Die mit diesem Verfahren hergestellten Biotransplantate sind von vielen der Nachteile, die andere Bioprothesen auf dem Stand der Technik haben, frei.

Zusammenfassung der Erfindung

[0008] Diese Erfindung stellt neue und vorteilhafte Verfahren zur Erzeugung von Implantatgewebe, das zur Implantation in Menschen oder anderen Säugern geeignet ist, zur Verfügung. Das Verfahren dieser Erfindung bezieht sich allgemein auf die Behandlung von xenogenem oder allogenem Gewebe, um eine lebensfähige Bioprothese zu erzeugen, die keine ungünstige Immunreaktion des Empfängers nach Implantation hervorruft und die Regenerationsfähigkeit von Allografts besitzt, während sie nur beschränkte Neigung zur Verkalkung und geringe Thrombogenität zeigt.

[0009] Den obigen Ausführungen entsprechend umfasst das Verfahren dieser Erfindung die Schritte der Herstellung einer xenogenen (oder allogenen) Gewebsmatrix für die weitere Verarbeitung durch Entfernung nativer Zellen und anderer Antigene und Zelldebris aus der zellfreien Gewebsmatrix, sowie der Behandlung der Matrix, um die Bildung neuer immunologischer Erkennungsstellen zu hemmen. Diese Gewebsmatrix wird dann mit den unten beschriebenen zellulären Adhäsionsfaktoren behandelt, um das Anhaften von Zellen an die Matrix während des Prozesses der Wiederbesiedelung der Gewebsmatrix mit solchen neuen Zellen zu fördern.

[0010] Abhängig von den zur Wiederbesiedelung der natürlichen Gewebsmatrices verwendeten Zellen können unterschiedliche Eigenschaften der in Bezug auf die Art hybriden Bioprothesen zu erreichen sein, wie zum Beispiel die Fähigkeit, Proteine, die sonst für das natürliche Gewebe am Ort der Implantation atypisch oder auf bestimmte Altersgruppen beschränkt sind, zu synthetisieren Diese hybriden Transplantate würden die strukturellen Vorteile von Bioprothesen mit der funktionellen und regenerativen Leistungsfähigkeit von Allografts verbinden und auch abgeschwächte oder keine Immunreaktion, beschränkte Neigung zur Verkalkung und geringe Thrombogenität zeigen. Wie bei allen derzeit in Gebrauch befindlichen Bioprothesen wären auch diese modifizierten Gewebe vom Angebot her nicht limitiert und würden mehr Empfängern die Funktionalität des Transplantats bieten. Darüber hinaus würden diese Transplantate nicht notwendigerweise chemisch verändert werden, um sie im Immunsystem des Empfängers haltbar zu machen; folglich würden solche Materialien biomechanische Eigenschaften zeigen, die denen des Gewebes, zu dessen Ersatz sie verwendet werden, ähnlicher sind.

[0011] Die hier beschriebene Erfindung ist für die Erzeugung von xenogenen Bioprothesen, die zur Implantation in Menschen geeignet sind, verwendbar. Sie ist zur Erzeugung von xenogenen Transplantaten, in denen die strukturelle Hauptkomponente eine Bindegewebsmatrix ist, wie zum Beispiel in Herzklappen, vor allem in Herzklappen vom Schwein oder Rind, besonders gut geeignet. Beispiele anderer Gewebe, die zur Verwendung in dieser Erfindung geeignet sind, können Aortenklappen, Pulmonalklappen, Fascia lata, Dura mater, Perikard, Meniskus, Haut, Bänder, Sehnen und andere bindegewebige Strukturen sein, sind aber nicht darauf beschränkt.

Kurze Beschreibung der Abbildungen

[0012] Abb. 1. Mikrophotographie eines frischen Aortenklappensegels.

[0013] Abb. 2a. Mikrophotographie, die ein Pulmonalklappenkonduit nach Dezellularisierung zeigt.

[0014] Abb. 2b. Mikrophotographie, die Myokard nach Dezellularisierung zeigt.

[0015] Abb. 3a. Mikrophotographie eines zellfreien Aortenklappensegels.

[0016] Abb. 3b. Mikrophotographie eines wiederbesiedelten Aortenklappensegels.

[0017] Abb. 4. Proteinsynthese von Kollagen und Nicht-Kollagen in Aortenklappensegeln vom Schwein.

[0018] Abb. 5. Reaktivität von Antisera vom Kaninchen gegen Extrakte kryokonservierter oder zellfrei gemachter Aortenklappensegel vom Schwein – Antikörperbindung.

[0019] Abb. 6a. Mikrophotographie, die die minimale zelluläre Reaktion, die von zellfrei gemachten Aor-

tenklappensegeln vom Schwein nach der Implantation hervorgerufen wird, zeigt.

[0020] Abb. 6b. Mikrophotographie, die die zelluläre Reaktion, die von kryokonservierten Aortenklappensegeln vom Schwein nach der Implantation hervorgerufen wird, zeigt.

[0021] Abb. 7a. Mikrophotographie eines frischen Aortenklappensegels vom Schwein, das auf Antigen, das mit Zellen vom Schwein assoziiert ist, untersucht wurde.

[0022] Abb. 7b. Mikrophotographie eines zellfrei gemachten Aortenklappensegels vom Schwein, das auf Antigen, das mit Zellen vom Schwein assoziiert ist, untersucht wurde.

[0023] Abb. 8. Spannungs-Dehnungs-Beziehungen von Aortenklappensegeln vom Schwein.

[0024] Abb. 9. Spannungs-Relaxations-Kurven von Aortenklappensegeln vom Schwein nach Präkonditionierung.

[0025] Abb. 10. Zugspannungsbruchdaten für Aortenklappensegel vom Schwein.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0026] Abhängig von der Art des geplanten Transplantats kann, wenn der Empfänger ein Mensch ist, das ursprüngliche Transplantatgewebe oder -organ nicht-menschlichen Ursprungs sein. Diese Gewebe oder Organe sind bei zugelassenen Schlachthöfen von Tieren, die für den menschlichen Verzehr geeignet sind, oder von Herden domestizierter Tiere, die zum Zweck der Bereitstellung dieser Gewebe oder Organe gehalten werden, erhältlich. Die Gewebe oder Organe werden steril gehandhabt, und jede weitere Präparation der Gewebe oder Organe wird unter aseptischen Bedingungen ausgeführt.

[0027] Transplantatgewebe, welches von nicht-menschlichen Quellen stammt und für die Verwendung in einem menschlichen Empfänger gedacht ist, kann bearbeitet werden, um ein hybrides Xenograft oder xenogenes Implantatgewebe zu erzeugen, welches von einer nicht-menschlichen Gewebsmatrix, die frei von Zellen und anderen antigenen Komponenten ist, gebildet wird und mit lebensfähigen menschlichen Zellen besiedelt ist. Die Schritte des Verfahrens zur Erzeugung solcher immunologisch tolerierbarer Implantate sind unten beschrieben.

[0028] Nach Gewinnung und Präparation kann das Transplantatgewebe durch Inkubation in einer sterilen, gepufferten Nährlösung, die antimikrobielle Agenzien, zum Beispiel ein antibakterielles, ein antimykotisches oder ein sterilisierendes Agens, das mit dem Transplantatgewebe kompatibel ist, enthält, sterilisiert werden.

[0029] Das sterilisierte Transplantatgewebe kann dann für eine weitere Verarbeitung zu einem späteren Zeitpunkt kryokonserviert werden oder es kann den nächsten Schritten dieses Verfahrens entsprechend unmittelbar weiterverarbeitet werden, einschließlich einer späteren Kryokonservierung der Gewebsmatrix oder anderer Gewebsprodukte des Verfahrens.

Dezellularisierung

[0030] Ein vorbereitender Schritt dieser Erfindung erfordert die Elimination nativer, lebensfähiger Zellen sowie anderer zellulärer und nicht-zellulärer Strukturen und Komponenten, die eine ungünstige Immunreaktion des Implantatempfängers auslösen können.

[0031] Es sind verschiedene Wege bekannt, die Lebensfähigkeit von nativen Zellen in Geweben und Organen zu reduzieren, einschließlich physikalischer, chemischer und biochemischer Methoden. Siehe zum Beispiel U.S. Patent Nr. 5,192,312. Solche Methoden können in Übereinstimmung mit dem hier beschriebenen Verfahren eingesetzt werden. Jedoch sollte die zur Dezellularisierung angewandte Technik nicht zu einer groben Störung der Anatomie des Transplantatgewebes führen oder die biomechanischen Eigenschaften seiner strukturellen Elemente wesentlich verändern. Die Behandlung des Gewebes zur Herstellung einer zellfreien Gewebsmatrix sollte auch keine cytotoxische Umgebung zurücklassen, die einer nachfolgenden Wiederbesiedelung der Matrix mit Zellen, die im Hinblick auf den Empfänger allogen oder autolog sind, entgegenwirkt. Zellen und Gewebe, die für den Empfänger allogen sind, sind solche, die mit einem Spender, der zur selben Art wie der Empfänger gehört, entstehen oder von ihm abgeleitet sind. Autologe Zellen oder Gewebe sind solche, die mit dem Empfänger entstehen oder von ihm abgeleitet sind.

[0032] Physikalische Kräfte, zum Beispiel die Bildung von intrazellulärem Eis, können verwendet werden, um Transplantatgewebe zellfrei zu machen. Zum Beispiel kann Dampfphasen-Einfrieren (langsame Geschwindigkeit des Temperaturabfalls) von intakten Herzklappen die Zelldichte der Herzklappensegel im Vergleich zum Flüssigphasen-Einfrieren (schnell) vermindern. Jedoch können langsame Gefrierprozesse in Abwesenheit von Gefrierschutzmittel zum Auseinanderreißen von Gewebe wie zum Beispiel zu Rissen in Herzklappenkonduits führen. Kolloidbildende Stoffe können während der Frier-Tau-Zyklen zugegeben werden, um die Muster der Eisbildung im Gewebe zu verändern. Polyvinylpyrrolidon (10% Gewicht pro Volumen) und dialysierte Hydroxyethylstärke (10% Gewicht pro Volumen) können den

Standard-Kryokonservierungslösungen (DMEM, 10% DMSO, 10% fetales Rinderserum) zugegeben werden, um die Bildung von extrazellulärem Eis zu reduzieren, während die Bildung von intrazellulärem Eis zugelassen wird. Dies ermöglicht ein Ausmaß an Dezellularisierung, während der Kollagen-Gewebsmatrix einiger Schutz vor Eisschaden geboten wird. Zusätzlich wird vermerkt, dass Gewebe, speziell Herzklappenkonduits, ungeachtet der Gegenwart von Gefrierschutzmittel einreißen werden, wenn sie schnell eingefroren werden.

[0033] Alternativ können verschiedene enzymatische oder andere chemische Verfahren verwendet werden, um lebensfähige native Zellen aus Implantatgeweben oder -organen zu entfernen. Zum Beispiel führt eine ausgedehnte Einwirkung von Proteasen wie zum Beispiel Trypsin auf Zellen zum Zelltod. Da jedoch zumindest ein Teil des Typ-I-Kollagenmoleküls empfindlich auf eine Vielzahl von Proteasen einschließlich Trypsin ist, kann dies nicht der Ansatz der Wahl für Kollagen-Transplantate sein, die zur Implantation an Stellen mit hoher mechanischer Beanspruchung gedacht sind.

[0034] Kombinationen verschiedener Klassen von Detergenzien, zum Beispiel ein nicht-ionisches Detergens, Triton X-100, und ein anionisches Detergens, Natriumdodecylsulfat können Zellmembranen aufbrechen und zur Entfernung von Zelldebris aus dem Gewebe beitragen. Es sollten jedoch Schritte unternommen werden, um jegliche verbleibende Detergens-Schwellwerte in der Gewebsmatrix zu eliminieren, um eine Beeinträchtigung der späteren Wiederbesiedelung der Gewebsmatrix mit lebensfähigen Zellen zu verhindern.

[0035] Die Dezellularisierung des Transplantatgewebes wird vorzugsweise durch die Anwendung einer Lösung, welche die Lyse nativer Zellen im Transplantatgewebe bewirkt, bewerkstelligt. Vorzugsweise kann die Lösung eine wässrige hypotone Lösung oder eine Lösung geringer Ionenstärke sein, die zur effektiven Lyse nativer Zellen formuliert wurde. Eine derartige wässrige hypotone Lösung kann entionisiertes Wasser oder ein wässriger, hypotoner Puffer sein. Vorzugsweise kann der wässrige, hypotone Puffer Zusatzstoffe enthalten, die für suboptimale Bedingungen für die Aktivität ausgewählter Proteasen, die als Ergebnis der Zelllyse freigesetzt werden können, zum Beispiel Kollagenase, sorgen. Zusatzstoffe wie zum Beispiel Chelatbildner für Metallionen, zum Beispiel 1,10-Phenanthrolin und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) schaffen eine Umgebung, die für viele proteolytische Enzyme ungünstig ist. Die Schaffung suboptimaler Bedingungen für Proteasen wie zum Beispiel Kollagenase kann beim Schutz der Gewebsmatrix vor Abbau während des Lyseschritts behilflich sein. Besonders können suboptimale Bedingungen für Proteasen erreicht werden, indem die hypotone Lösung für die Lyse so formuliert wird, dass die in der Lösung verfügbare Menge an Calcium- und Zinkionen beseitigt oder limitiert wird. Viele Proteasen sind in der Gegenwart von Calcium- und Zinkionen aktiv und verlieren einen Großteil ihrer Aktivität in Umgebungen, die frei von Calcium- und Zinkionen sind.

[0036] Vorzugsweise wird die hypotone Lösung für die Lyse hergestellt werden, indem die Bedingungen des pH, eingeschränkter Verfügbarkeit von Calcium- und Zinkionen, Gegenwart von Chelatbildnern für Metallionen und der Verwendung von für Kollagenase spezifischer Inhibitoren proteolytischer Enzyme, wie zum Beispiel β_1-Antikollagenase, gewählt werden, so dass die Lösung die nativen Zellen optimal lysieren wird, während sie die darunter liegende Gewebsmatrix vor ungünstigem proteolytischem Abbau schützen wird. Zum Beispiel kann eine hypotone Lösung für die Lyse eine gepufferte Wasserlösung, pH 5,5 bis 8, vorzugsweise pH 7 bis 8, die frei von Calcium- und Zinkionen ist und einen Chelatbildner für Metallionen wie zum Beispiel EDTA enthält, umfassen. Zusätzlich kann eine Kontrolle der Temperatur und Zeitparameter während der Behandlung der Gewebsmatrix mit der hypotonen Lösung für die Lyse eingesetzt werden, um die Aktivität von Proteasen zu begrenzen.

[0037] Es wird bevorzugt, dass die Behandlung zur Dezellularisierung der Gewebsmatrix auch die Bildung neuer immunologischer Erkennungsstellen einschränkt. Während Kollagen typischerweise im Wesentlichen nicht immunogen ist, kann partieller enzymatischer Abbau von Kollagen zu erhöhter Immunogenität führen. Dementsprechend beinhaltet ein bevorzugter Schritt dieses Verfahrens eine Behandlung des Gewebes mit Enzymen, wie zum Beispiel Nucleasen, welche eine Hemmung des Zellmetabolismus', der Proteinsynthese und der Zellteilung bewirken ohne die darunter liegende Kollagenmatrix abzubauen. Nucleasen, die für den Verdau von DNA und RNA nativer Zellen verwendet werden können, umfassen sowohl Exonucleasen wie auch Endonucleasen. Von diesen ist ein breitgefächertes Angebot für eine Verwendung in diesem Schritt geeignet und kommerziell erhältlich. Zum Beispiel umfassen Exonucleasen, die die Zellaktivität effektiv hemmen, DNAase I (SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO.) und RNAase A (SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO.), und Endonucleasen, die die Zellaktivität effektiv hemmen, schließen EcoR I (SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO.) und Hind III (SIGMA Chemical Company, St. Louis, MO.) ein.

[0038] Es wird bevorzugt, dass die ausgewählten Nucleasen in einer physiologischen Pufferlösung, die Ionen, die optimal für die Aktivität der Nuclease sind, enthält, eingesetzt werden; solche Ionen schließen Magnesium- und Calciumsalze ein. Es wird auch be-

vorzugt, dass die Ionenkonzentration der Pufferlösung, die Temperatur während der Behandlung und die Dauer der Behandlung zur Sicherstellung des gewünschten Grades der effektiven Aktivität der Nuclease gewählt werden. Der Puffer ist vorzugsweise hypoton, um den Zugang der Nucleasen in die Zellinnenräume zu fördern. Zur Behandlung endogener Endothelzellen vom Herzklappengewebe nicht-menschlichen Ursprungs, besonders von Klappen vom Schwein oder Rind, wird das Gewebe vorzugsweise mit einem physiologisch gepufferten Medium, welches die Nucleasen DNAase I und RNAase A enthält, behandelt. Vorzugsweise enthält die Nucleasenlösung für den Abbau etwa 0,1 µg/ml bis 50 µg/ml, möglichst 10 µg/ml, von der Nuclease DNAase I und 0,1 µg/ml bis 10 µg/ml, möglichst 1,0 µg/ml, von RNAase A. Das Gewebe kann durch Anwendung des Vorgenannten bei einer Temperatur von etwa 20°C bis 38°C, möglichst bei etwa 37°C, über etwa 30 Minuten bis 6 Stunden zellfrei gemacht werden, während gleichzeitig die Bildung neuer immunologischer Erkennungsstellen als Ergebnis des Kollagenabbaus beschränkt wird.

[0039] Andere enzymatische Abbaumethoden können für die Verwendung hier geeignet sein, zum Beispiel können Enzyme, die die Funktion nativer Zellen in einem Transplantatgewebe stören werden, verwendet werden. Zum Beispiel kann Phospholipase, insbesondere Phospholipase A oder C, in einer gepufferten Lösung zur Hemmung der Zellfunktion durch Zerreißen der Zellmembran endogener Zellen verwendet werden. Vorzugsweise sollte das eingesetzte Enzym keinen nachteiligen Einfluss auf das Eiweiß der Gewebsmatrix haben. Die für die Verwendung geeigneten Enzyme können auch im Hinblick auf die Störung der Integrität der Zellen ausgewählt werden und auch Enzyme umfassen, welche die Proteinsynthese der Zellen störend beeinflussen können. Das pH des Mediums wird auch ebenso wie die Zusammensetzung des Mediums im Hinblick auf das pH-Aktivitätsprofil des für die Verwendung gewählten Enzyms angepasst werden. Darüber hinaus sollte die während der Einwirkung des Enzyms auf das Gewebe herrschende Temperatur angepasst werden, um die Aktivität des Enzyms zum optimieren.

[0040] Nach der gewählten Behandlung zur Dezellularisierung wird die sich hieraus ergebende Transplantat-Gewebsmatrix gewaschen, um die Beseitigung von Zelldebris, die Zellprotein, Zelllipide und zelluläre Nucleinsäuren enthalten kann, und auch von jeglicher extrazellulärer Debris wie zum Beispiel von extrazellulären, löslichen Proteinen, Lipiden und Proteoglykanen sicherzustellen. Die Beseitigung dieser zellulären und extrazellulären Debris vermindert die Wahrscheinlichkeit, dass die Transplantat-Gewebsmatrix nach der Implantation eine ungünstige Immunreaktion durch den Empfänger auslöst. Zum Beispiel kann das Gewebe in einer gepufferten Salzlösung wie zum Beispiel Hanks' gepufferter Salzlösung (HBSS) inkubiert werden. Die Zusammensetzung der gepufferten Salz-Waschlösung und die Bedingungen, unter denen man sie auf die Transplantat-Gewebsmatrix einwirken lässt, können zur Verringerung oder Ausschaltung der Aktivität der Nuclease oder eines anderen Enzyms, das während des Prozesses der Dezellularisierung eingesetzt worden ist, gewählt werden. Eine derartige gepufferte Salz-Waschlösung würde vorzugsweise keine Magnesium- oder Calciumsalze enthalten, und der Waschvorgang kann eine Inkubation bei einer Temperatur zwischen etwa 2°C und 42°C, idealerweise 4°C umfassen. Die Transplantat-Gewebsmatrix kann bis zu 10 bis 12 Tage in der gepufferten Salz-Waschlösung mit einem Wechsel der Waschlösung an jedem zweiten oder dritten Tag inkubiert werden. Wahlweise kann ein Antibioticum, ein Antimycoticum oder ein Sterilisationsmittel oder eine Kombination davon in die gepufferte Salz-Waschlösung aufgenommen werden, um die Transplantat-Gewebsmatrix vor einer Kontamination mit Krankheitserregern aus der Umwelt zu schützen.

[0041] Die der obigen Beschreibung gemäß hergestellte Gewebsmatrix ist frei von ihren nativen Zellen, und zusätzlich wurden zelluläre und extrazelluläre antigene Komponenten aus der Gewebsmatrix herausgewaschen. Vorzugsweise wurde die Gewebsmatrix in einer Art und Weise behandelt, die die Bildung neuer immunologischer Erkennungsstellen in der Kollagenmatrix beschränkt. Jedoch behält die Gewebsmatrix die wesentliche biochemische Festigkeit, die erforderlich ist, um das Gerüst für eine weitere Verarbeitung der Matrix zur Verfügung zu stellen.

[0042] Die gemäß dieser Erfindung aufgearbeitete Gewebsmatrix kann für eine spätere Verwendung kryokonserviert werden. Die Kryokonservierung von zellfrei gemachtem Transplantatgewebe würde einen Vorrat oder Bestand von im Wesentlichen nicht immunogenen Gewebsmatrices sicherstellen, welche nach dem Auftauen für eine weitere Behandlung gemäß den folgenden Schritten dieser Erfindung bereit wären oder wie gewünscht weiterverarbeitet würden, um ein Gewebsprodukt zur Implantation zur Verfügung zu stellen. Zum Beispiel können Gewebsmatrices bis zu dem Zeitpunkt, zu dem die jeweiligen Zellen, die während der Wiederbesiedelung eingesetzt werden sollen, identifiziert sind, inventarisiert werden. Dies kann von besonderem Nutzen sein, wenn die Gewebsmatrix mit Zellen, die vom Empfänger stammen, oder mit Zellen, die auf der Grundlage ihrer immunologischen Kompatibilität mit einen bestimmten Empfänger zur Verwendung ausgewählt wurden, wiederbesiedelt werden soll.

[0043] Es ist auch vorgesehen, dass das native Transplantatgewebe kryokonserviert werden kann, bevor es irgendeinem der Arbeitsvorgänge dieser Er-

findung unterzogen wird. Gewebe, die nicht zellfrei gemacht worden sind, behalten ihre nativen Zellen in Verbindung mit der kollagenartigen Gewebsmatrix. Nach dem Auftauen können diese Gewebe weiterverarbeitet werden. Vorteilhafterweise kann die Kryokonservierung von intaktem Transplantatgewebe auch bei der Dezellularisierung des Gewebes als Ergebnis von durch Kryokonservierung hervorgerufenem Zelltod helfen.

[0044] Verfahren zur Kryokonservierung von Gewebe sind im Fachgebiet gut bekannt. Brockbank, K. G. M. Basic Principles of Viable Tissue Preservation. In: Transplantation Techniques and Use of Cryopreserved Allograft Cardiac Valves and Vascular Tissue. D. R. Clarke (ed.), Adams Publishing Group, Ltd., Boston. pp 9–23 diskutiert die Knokonservierung von Geweben und Organen.

[0045] Die Gewebsmatrix, ob kryokonserviert oder nicht, kann zunächst in vitro behandelt werden, um die Adhäsion und Einwanderung allogener oder autologer Zellen zu steigern, was zur Wiederbesiedelung der Transplantatmatrix verwendet werden wird.

Zelladhäsion

[0046] Ohne an Theorie gebunden sein zu wollen, gibt es verschiedene Faktoren, von denen angenommen wird, dass sie die Anlagerung von Zellen an Gewebe herbeiführen. Zum Beispiel geht die Adhärenz von Fibroblasten an Gewebsoberflächen mit Wechselwirkungen zwischen der Zellmembran und extrazellulären Matrixkomponenten des nativen Gewebes wie zum Beispiel fibrillen- und geflechtbildendes Kollagen, Proteoglykane und Glykoproteine einher. In vitro lagern sich ohne Serum kultivierte Fibroblasten schnell und gleichmäßig an Typ-I- und Typ-IV-Kollagen an. Das Ausmaß der Anlagerung wird durch die Zugabe von Serum (vom Menschen oder vom fetalen Rind, maximale Bindung mit 1% Serum) und von gereinigtem Fibronektin in das Kulturmedium erhöht. Jede der beiden homologen Untereinheiten des Fibronektins hat zwei Zellerkennungsregionen, von denen die wichtigste die Sequenz Arg-Gly-Asp (RGD) hat. Eine zweite Stelle, die Glykosaminoglykane bindet, agiert synergistisch und scheint die von der RGD-Sequenz vermittelten Wechselwirkungen zwischen dem Fibronektin und der Zelle zu stabilisieren. Heparinsulfat zusammen mit Chondroitinsulfat sind die beiden auf Zelloberflächen identifizierten Glykosaminoglykane. Heparinsulfat ist an Kernproteine (Syndecan oder Hyaluronectin), welche entweder integral oder die Membran überspannend sein können. Zelluläre Bindungsstellen für Glykoproteine der extrazellulären Matrix werden Integrine genannt und diese vermitteln eine enge Bindung der Zellen an die Adhäsionsfaktoren. Jeder Adhäsionsfaktor scheint ein spezialisiertes Integrin zu haben, obwohl ein einzelnes Integrin an verschiedene Faktoren der extrazellulären Matrix binden kann. Wenn Fibroblasten an intaktes Fibronektin (zell- und heparin-bindende Domänen) gebunden sind, zeigen sie eine kompakte Morphologie mit fokalen Adhäsionen. Ohne die heparin-bindende Domäne werden sich Fibroblasten ausbreiten, aber nicht imstande sein, fokale Adhäsionen zu entwickeln.

[0047] Folglich kann eine Kombination von Faktoren den Grad, zu dem Zellen an eine Gewebsoberfläche binden können, bestimmen. Viele davon sind Produkte von Fibroblasten, obwohl einige wie Fibronektin auch aus der Zugabe von Serum stammen können. Die Geschwindigkeit, mit der diese Faktoren von den Zellen exprimiert und sezerniert werden, wird die Anlagerung von Zellen an Oberflächen beeinflussen, und Cytokine wie zum Beispiel Fibroblasten-Wachstumsfaktor oder transformierender Wachstumsfaktor-β sind positive Regulatoren der Produktion von Kollagen und Fibronektin durch Fibroblasten.

[0048] Es wird angenommen, dass eine effektive Anlagerung von Zellen an die Gewebsmatrix von der Wechselwirkung zwischen der Zellmembran und extrazellulären Komponenten, die mit dem entsprechenden Implantatgewebe verbunden sind, gefördert wird. Dementsprechend beinhalten für einen gegebenen Zelltyp und einen für die Verwendung ausgewählten Gewebstyp geeignete Verfahren, die die Anlagerung von Zellen an die zellfrei gemachte Gewebsmatrix fördern, eine Behandlung mit extrazellulären Gewebskomponenten und besonders mit extrazellulären Proteinen wie zum Beispiel Glykoproteinen und/oder Proteoglykanen oder Glykosaminoglykanen, die die Anlagerung von Zellen an die zellfrei gemachte Gewebsmatrix fördern können. Das Verfahren zur Wiederbesiedelung der Gewebsmatrix mit Zellen wird durchgeführt, indem zuerst die zellfrei gemachte Gewebsmatrix mit einem zellulären Adhäsionsfaktor, der die Anlagerung der zur Wiederbesiedelung verwendeten Zellen an die zellfrei gemachte Matrix fördern kann, behandelt wird.

[0049] Zum Beispiel kann die zellfrei gemachte Gewebsmatrix in einer Nährlösung, welche Protein der extrazellulären Matrix wie zum Beispiel Fibronektin und ein Glykosaminoglykan enthält, über eine für die Bindung des Fibronektins an Oberflächen der wiederzubesiedelnden Transplantat-Gewebsmatrix wirksame Zeitspanne inkubiert werden. Bevorzugte Puffer für die Verwendung mit Fibronektin/Glykosaminoglykan schließen Natriumphosphat/Glycerin/Serumalbumin vom Rind (fetales Rinderserum, BIOWHITTAKER) und Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (DMEM), (GIBCO) ein. Diese Puffer werden typischerweise verwendet, um für ein physiologisches pH von etwa 7,0 bis 7,6 zu sorgen. Die Gegenwart von Proteinen der extrazellulären Matrix bildet eine Oberfläche auf der Gewebematrix, an die sich die

Zellen, die zur Wiederbesiedelung der Matrix ausgewählt wurden, anlagern. Der Stimulus des Proteins der extrazellulären Matrix fördert im Transplantat die Wiederbesiedelung mit Zellen.

[0050] Das bevorzugte Protein der extrazellulären Matrix für die Verwendung hier ist die intakte molekulare Form des Fibronektins (Human Plasma Fibronectin, UPSTATE Biotechnology, Inc.). Dieses heterofunktionelle Glykoprotein hat Affinität zu Proteinen der extrazellulären Matrix, Proteoglykanen und bestimmten Zelltypen. Die Lösung für die Fibronektin-Behandlung enthält vorzugsweise auch ein Proteoglykan, welches eines der Glykosaminoglykane Heparin, Heparinsulfat, Chondroitin, Chrondroitinsulfat, Dermatin oder Dermatinsulfat sein kann. Es wird angenommen, dass das Glykosaminoglykan die Bindung zwischen dem Fibronektin und dem der Gewebsmatrix zugehörigen Kollagen fördert und stabilisiert. Vorteilhafterweise kann die Matrix mit Fibronektin wechselwirken, weil es nicht chemisch querverbunden ist.

[0051] Eine Quelle von Fibronektin ist menschliches Blut, welches verarbeitet wurde, um virale Kontamination zu beschränken. Das bevorzugte Glykosaminoglykan ist Heparin. Die Konzentration des Glykoproteins, das als Adhäsionsfaktor zur Behandlung der Gewebsmatrix verwendet wird, kann von etwa 1 bis etwa 100 µg/ml reichen, wobei eine Fibronektin-Konzentration von 10 µg/ml bevorzugt wird. Das bevorzugte Gewichtsverhältnis des Fibronektins zu Heparin ist etwa 10 Teile Fibronektin auf etwa 1 Teil Glykosaminoglykan, zum Beispiel Heparin. Dies ist optimal für die Wiederbesiedelung von Herzklappensegeln vom Schwein, kann aber abhängig vom verwendeten Gewebe von etwa 0,1 : 1 bis etwa 10 : 0,1 reichen. Vorzugsweise sind die Komponenten der Nährlösung, die die Adhäsionsfaktoren enthält, so gewählt, dass die Lösung mit Wachstumsfaktoren, die später dem Nährmedium, in dem die Transplantat-Gewebsmatrix inkubiert, zugegeben wird, kompatibel ist. Diese Wachstumsfaktoren werden eingesetzt, um das Zellwachstum und die Wiederbesiedelung der Matrix zu fördern.

Wiederbesiedelung mit Zellen

[0052] Ein wichtiger Aspekt dieser Erfindung ist, dass die zellfrei gemachte Transplantat-Gewebsmatrix in vitro mit Zellen wiederbesiedelt wird. Die Zellen, die zur Wiederbesiedelung der zellfrei gemachten Matrix eingesetzt werden, können allogene Zellen sein, welche von derselben Art wie der geplante Implantatempfänger gezüchtet wurden, oder können autologe Zellen, die vom geplanten Implantatempfänger gezüchtet wurden, sein. In jedem Fall werden die autologen oder allogenen Zellen in der wiederbesiedelten Gewebsmatrix, bekannt als Heterograft oder chimäres Transplantat, eine geringere ungünstige Immunreaktion auslösen als ein unbehandeltes xenogenes Transplantatgewebe.

[0053] Es ist auch vorgesehen, dass die Zellen, die zur Wiederbesiedelung der zellfrei gemachten Matrix eingesetzt werden, Zellen sein können, die genetisch manipuliert wurden, um die Produktion bestimmter Proteine zu steigern. Im Fachgebiet sind zahlreiche rekombinante DNA-Technologien zur Änderung, Steigerung und Modifikation des Zellstoffwechsels bekannt.

[0054] Die Wiederbesiedelung kann durchgeführt werden, indem die mit Zelladhäsionsfaktoren behandelte Matrix in einem Nährmedium inkubiert wird, welches die Zellen und die Wachstumsfaktoren, die die Förderung der Zellproliferation und infolgedessen der Wiederbesiedelung der Gewebsmatrix bewirken, enthält. Ein bevorzugter Zelltyp für die Verwendung hier sind Fibroblastenzellen.

[0055] Eine Vielfalt von Substanzen kann eingesetzt werden, um die Chemotaxis der Zellen zu verbessern, was die Geschwindigkeit der gerichteten Bewegung entlang eines Konzentrationsgradienten der Substanz in der Lösung erhöht. Hinsichtlich von Fibroblastenzellen sind Fibroblasten-Wachstumsfaktor, Plättchen-Wachstumsfaktor, transformierender Wachstumsfaktor-β, und die Substratadhäsionsmoleküle fibrilläres Kollagen, Kollagenfragmente und Fibronektin für Fibroblasten chemotaktisch. Im Gegensatz zur Zelladhäsion erfordert die Migration von Fibroblasten eine Proteinsynthese de novo; die Proteinsynthese in normalen Fibroblastenzellen wird durch die Adhäsion der Zellen an Fibronektin angeregt, so wird angenommen, dass die Vorgänge der Zelladhäsion und der Zellmigration während der Wiederbesiedelung in einer Wechselbeziehung stehen.

[0056] Zellmigration erlaubt es den Zellen auch, sich durch die Gewebsmatrix zu bewegen und sowohl innere interstitielle Zwischenräume als auch die Oberflächen der Transplantat-Gewebsmatrix wiederzubesiedeln.

[0057] Die Zahl der Zellen, die erforderlich ist, um bestimmte Transplantat-Gewebsmatrices vollständig wiederzubesiedeln, hängt vom Volumen des verwendeten Gewebes und vom Typ der bereitgestellten Zellen ab. Jedoch können Konzentrationen von 20.000 bis 125.000 Fibroblasten pro Milliliter für eine geeignete Bedeckung des Herzklappensegels und des Gewebes des Aortenkonduits sorgen.

Zellproliferation

[0058] Die Schritte der Wiederbesiedelung der Gewebsmatrix mit Zellen werden vorzugsweise in Gegenwart von Wachstumsfaktoren, die eine Förderung der Proliferation der gezüchteten Zellen, die zur Wie-

derbesiedelung der Matrix eingesetzt werden, bewirken, durchgeführt. Zum Beispiel kann, wenn Fibroblasten eingesetzt werden, ein Wachstumsfaktor für die Verwendung hier Fibroblasten-Wachstumsfaktor sein, idealerweise basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) (rekombinanter bFGF vom Menschen, UPSTATE Biotechnology, Inc.).

[0059] Die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (heparin-bindend) sind eine Familie von Mitogenen, die auf mesenchymale Zellen wirken. FGFs werden nicht frei im konditionierten Medium nachgewiesen, stattdessen werden die FGFs in der extrazellulären Matrix im Verbund mit Heparinsulfat gefunden, in der Fibronektin-Heparin-Schicht, die vorher an die Gewebsmatrix gebunden wurde, gelegen. Die Glykosaminoglykane stabilisieren die Aktivität des FGF und werden für die Bindung des FGF an die Rezeptoren in der Zelloberfläche benötigt, wo sie autokrines/parakrines Wachstum stimulieren.

[0060] Die Matrix und die Zellen werden dem bFGF während des Schritts der Wiederbesiedelung vorzugsweise fortlaufend ausgesetzt, um für die Stimulation der Zellreplikation und die Expression der Kollagen-Proteinsynthese, wie sie für eine normale Klappenfunktion erforderlich ist, zu sorgen. Die Kultivierungsdauer der Matrix mit Wachstumsfaktor reicht von 10 bis 21 Tagen. Die Konzentration des zur Behandlung der Gewebsmatrix verwendeten Wachstumsfaktors kann von 100 ng/ml bis 10 µg/ml reichen, wobei für bFGF eine Konzentration des Wachstumsfaktors von 2,5 µg/ml bevorzugt wird.

[0061] Wenn Fibroblasten als Zellen zur Wiederbesiedelung des Transplantats verwendet werden, kann das Kultivierungsmedium Dulbeccos modifiziertes Eagle-Medium (GIBCO) mit 5–15% Serumzugabe enthalten. Es wird autologes Serum vom Empfänger bevor zugt, aber die Erfahrung mit der Implantation allogener Herzklappentransplantate legt nahe, dass Serum vom Rind ohne nachteilige immunologische Konsequenzen für den Empfänger des Implantats im Wachstumsmedium verwendet werden kann. Eine beständige Stimulation der Zellen mit Serum und von den wiederbesiedelnden Zellen konditioniertem Medium kann eine schnellere Wiederbesiedelung der Gewebsmatrix mit Zellen bewirken. Die Matrix, Zellen und Wachstumsfaktoren können während der ganzen Kultivierungsdauer in befeuchteter Atmosphäre, die mit einer Mischung aus 95% Luft und 5% CO_2 ausgestattet ist, bei 37°C inkubiert werden.

[0062] Die Transplantat-Gewebsmatrix wird für eine Zeitdauer kultiviert, welche für die Herstellung eines wiederbesiedelten Transplantats mit einer interstitiellen Histologie, die der von frischem Gewebe ähnelt, ausreicht. Nach Abschluss des Vorgangs der Wiederbesiedelung mit Zellen wird das Gewebe vorzugsweise auch metabolische Parameter, die denen von frischem Gewebe ähnlich sind, zeigen.

Lebensfähigkeit der Zellen

[0063] Ein wichtiger Aspekt dieser Erfindung ist, dass die wiederbesiedelten Transplantatgewebe darüber hinaus, dass sie für den Empfänger des Implantats immunologisch akzeptabel oder im Wesentlich nicht immunogen sind, vor der Implantation funktionsfähig und lebensfähig sind. Es gibt verschiedene Tests zur Messung der Zellaktivität, und die Anwendung dieser Tests auf die Implantatgewebe dieses Vorgangs stellt ein Verfahren zur Überwachung und Bewertung der Lebensfähigkeit der Zellen, die das Implantatgewebe wiederbesiedeln, zu Verfügung.

[0064] Es wird bevorzugt, dass ein Testverfahren ausgewählt wird, welches eine Zellaktivität misst, die in einer Beziehung zur geplanten Funktion des Transplantatgewebes steht. Zum Beispiel ist die Produktion von Kollagen für die Aufrechterhaltung der Funktion einer Herzklappe wichtig. In Herzklappensegeln sind 5 bis 15% des gesamten produzierten Proteins Kollagen. Davon werden mindestens 75% Typ-I-Kollagen sein. Daher wird es bei der Prüfung einer wiederbesiedelten Herzklappe bevorzugt, als genaues Maß für die Lebensfähigkeit der Zellen auf das gesamte Kollagen, das von den wiederbesiedelnden Zellen produziert wird, zu untersuchen. Die Untersuchung auf Zellaktivität durch Messung der Kollagenproduktion ist im Fachgebiet gut bekannt. Beispiele von Literaturstellen, in denen Untersuchungen auf Kollagenproduktion durch Zellen diskutiert werden, sind Buckley, A. et al., 1980 Collagen Metabolism., Methods of Enzymology, 163: 674–69 und Hayashi, T. und Nagai, Y. 1979. Separation of the a Chains of Type I and III Collagens by SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis, Journal of Biochemistry. 86: 453–459.

[0065] Es sind andere Untersuchungen, die die Lebensfähigkeit der Zellen messen können, zur Verwendung in dieser Erfindung vorgesehen. Die gesamte Proteinsynthese, gemessen an der Aufnahme von [^{3}H]-Prolin, ist ein solcher Test. Zusätzliche Untersuchungen, die bei der Messung der Lebensfähigkeit der Zellen nützlich sein können, schließen Prüfungen auf die Verstoffwechselung von Glucose und eine Vielzahl von Untersuchungen, die auf die Aktivität von Mitochondrien gerichtet sind, ein.

[0066] Es ist vorgesehen, das jede Untersuchung, die eine auf lebensfähige Zellen hinweisende Zellfunktion quantifizierbar misst, verwendet werden kann.

Differenzierte Funktionen

[0067] Fibroblastenzellen sind für die Produktion der meisten Bindegewebskomponenten verantwort-

lich. Sie synthetisieren verschiedene Kollagen-Typen, und der Phänotyp scheint durch spezifische Umfelder der Gewebes bestimmt zu sein; d. h. gezüchtete Fibroblasten synthetisieren Kollagen-Typen, die ihren Ursprungsstellen entsprechen. Fibroblasten produzieren auch verschiedene Glykosaminoglykane, Fibronektin und Wachstumsfaktoren. Es ist die Fähigkeit von Hautfibroblasten, Kollagene der Typen I, III und IV in dem in der Matrix von Herzklappensegeln vorliegenden Verhältnis zu synthetisieren, was sie zu Zellen macht, die zur Wiederbesiedelung der Transplantat-Gewebsmatrix und zur Bildung des hier beschriebenen hybriden Transplantats geeignet sind.

[0068] Die Zellen, die zur Wiederbesiedelung eines bestimmten Transplantats verwendet werden, können innerhalb eines weiten Rahmens variiert werden, und verschiedene Zelltypen können unter verschiedenen Umständen verwendet werden, abhängig von der Funktion des Transplantats, der Beschaffenheit des Gewebes, das ersetzt oder vermehrt wird, und der allergischen Sensitivität des Empfängers zusätzlich zu anderen Faktoren.

[0069] Eine bevorzugte Ausführungsform dieser Erfindung verwendet in dem hier beschriebenen Ablauf autologe Zellen. Vor dem Transplantations- oder Implantationseingriff wird dem Empfänger eine Gewebsprobe entnommen. Das Gewebe wird gemäß den hier unten beschriebenen Verfahren behandelt, um Fibroblasten oder andere Zellen hervorzubringen, die dann diesem Verfahren entsprechend zur Wiederbesiedelung der allogenen oder xenogenen Gewebsmatrix verwendet werden. Durch die Wiederbesiedelung der vorher vorbereiteten, zellfrei gemachten und behandelten Transplantat-Gewebsmatrix mit Zellen, die von dem resezierten Gewebe, das dem Empfänger entnommen wurde, stammen, kann die Wahrscheinlichkeit einer ungünstigen Reaktion des Immunsystems und letztlich einer Transplantatabstoßung minimiert oder vermieden werden.

[0070] Die Herkunft der Zellen kann so gewählt werden, dass sie dem zu transplantierenden Gewebe entspricht. Zum Beispiel können Zellen, wenn ein Blutgefäß transplantiert werden soll, einem gesunden Blutgefäß des Empfängers entnommen und als Ausgangspunkt der Zellen für die Wiederbesiedelung des Transplantats verwendet werden. Auf diese Art kann das gesunde Transplantat dem erkrankten Gewebe des Empfängers sehr nahe angepasst werden.

[0071] Dieser Aspekt der Erfindung ist besonders nützlich, wenn der Transplantatempfänger hochgradig allergisch ist oder wenn das Gewebe hochgradig immunogen ist, wie zum Beispiel im Hinblick auf transplantierbare Blutgefäße.

[0072] Alternativ können allogene Zelllinien, die nach der Implantation wahrscheinlich keine inakzeptable Immunantwort hervorrufen, zur Wiederbesiedelung der Matrix verwendet werden. Zellen, die nicht mehr als eine schwache oder tolerierbare allergische Reaktion hervorrufen, können zur Wiederbesiedelung der Matrix verwendet werden, um ein im Wesentlichen nicht-immunogenes Implantat zur Verfügung zu stellen. Diese Zellen können natürlicherweise schwach immunogen sein oder aufgrund rekombinanter Zelltechnologie auf schwache Immunogenität ausgelegt sein.

Verfahren zur Isolierung von Fibroblasten

[0073] Das Gewebe, das verwendet wird, um die Verbindung zu den Fibroblastenzellen zur Verfügung zu stellen, zum Beispiel Haut (Gesäß, Oberschenkel oder Rücken) oder Herzklappensegel, wird steril gewonnen und einem Bearbeiter in gepuffertem Nährmedium zur Verfügung gestellt. Das Gewebe wird unter Verwendung eines sterilen Präparationsverfahrens in Stücke von 1 mm^3 geschnitten. Gruppen mit 10 Stücken werden dann in 35 mm Gewebskulturschalen gelegt, mit einer limitierenden Menge Kultivierungsmedium (DMEM plus 10% fetales Rinderserum), welches ausreicht, das Gewebe zu benetzen, was aber nicht ausreicht, dass die Stücke schwimmen. Die Inkubation erfolgt für eine Woche bei 37°C in einem befeuchteten Kultivierungsinkubator in einer Atmosphäre von 5% CO_2 in Luft. Nach einer Woche Inkubation ist jedes Gewebsstück von dichtem Fibroblastenbewuchs umgeben. Es können auch Epithelzellen vorhanden sein, gehen aber während der folgenden Zellkultivierung unter. Nach Spülung der Zellen mit einer sterilen, gepufferten Salzlösung, die frei von Calcium und Magnesium ist, werden die Fibroblasten durch einen Standard-Trypsin-Verdau entfernt und in größere Zellkulturgefäße mit frischem Kultivierungsmedium gebracht. Auf diese Art können die Zellkulturen erweitert werden. Der Inhalt eines Kolbens kann aufgeteilt und in drei größere Gefäße gebracht werden, und dieser Vorgang kann etwa einmal pro Woche wiederholt werden. Zellen, die aus diesen Kolben gewonnen werden, werden als Ausgangspunkt der Zellen für die Wiederbesiedelung verwendet. Zellen, die man auf diese Art erhält, sind kommerziell erhältlichen Zelllinien vorzuziehen, weil die meisten Zelllinien im Hinblick auf den Phänotyp verändert sind und nicht länger in einer normalen Art und Weise auf Wachstumsregulatoren (wie zum Beispiel bFGF) reagieren. Zusätzlich synthetisieren die meisten kommerziell erhältlichen Zelllinien wichtige Proteinprodukte (wie zum Beispiel Kollagen) nicht in natürlichen Mengen und Verhältnissen.

[0074] Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung umfasst ein Xenograft, das behandelt wurde, um native Zellen und lösliche Proteine zu entfernen; die Bedingungen sind so gewählt, dass sie für die Zellen, die zur Wiederbesiedelung des Xenografts verwendet werden, nicht toxisch sind, und dass die

endgültige Gewebsmatrix des Xenografts biochemisch einwandfrei und intakt erhalten wird. Die zellfrei gemachte Gewebsmatrix des Xenografts wird dann mit einem Glykoproteinfaktor der extrazellulären Matrix und Glykosaminoglykan behandelt. Das Xenograft wird dann mit einem Wachstumsfaktor und Glykosaminoglykan behandelt und mit exogenen Zellen, die am Transplantat anhaften, inkubiert. Diese exogenen Zellen wandern in das Transplantat, vermehren sich im Transplantat und exprimieren wesentliche Proteine und andere Faktoren, die für die Funktion des Transplantats entscheidend sind. Das wiederbesiedelte Xenograft wird von den Zellen, die es wiederbesiedeln, biochemisch funktionsfähig gemacht und zeigt im Vergleich mit einem entweder unbehandelten Xenograft oder einem chemisch fixierten Xenograft verringerte oder minimale Immunogenität. Die verringerte Antigenität ist eine Folge der Entfernung von Xenoantigenen oder Alloantigenen während der anfänglichen Dezellularisierung des Gewebes und der Gegenwart von wiederbesiedelnden Zellen, die vom Empfänger nicht als fremd erkannt werden. Diese chimären Transplantate sollten auch eine verringerte Neigung zur Verkalkung zeigen, weil Zelldebris, die sich entweder als Resultat von Zelltod während der Gewinnung des Gewebes oder während der Dezellularisierung des Gewebes bildet, durch den Waschschritt entfernt wird. Da diese chimären Transplantate eine verkleidende Zelllage als Resultat des oben beschriebenen Verfahrens behalten, sollte die Neigung zur Bildung von Thromben oder Mikroemboli im Vergleich zu mechanischen Strukturen, zu aus gereinigten biologischen Molekülen hergestellten Strukturen und zu chemisch fixierten Geweben von Bioprothesen auch verringert sein.

Beispiel 1

Dezellularisierung von Aortenklappensegeln, Aortenkonduit und damit verbundenem Myokard vom Schwein nach einem hypotonen Lyse-/Nucleasenverdau-Verfahren

[0075] Schweineherzen wurden innerhalb von zwei Stunden nach der Schlachtung besorgt, um die Auswirkungen eines unkontrollierten Zellabbaus auf die Gewebsstuktur zu beschränken, und bei 4°C in einer sterilen DMEM-Lösung zur weiterverarbeitenden Einrichtung zurückgebracht. Die Aortenklappen wurden unter sterilen Bedingungen herausgeschnitten, in einem antibiotischen Gemisch über 16 Stunden bei 37°C in Nährmedium in einer 5%-CO2-Atmosphäre inkubiert und in DMEM, das 10% DMSO und 10% fetales Rinderserum enthielt, kryokonserviert (Kühlgeschwindigkeit = –1°C/min). Nach Lagerung bei –179°C wurden die Klappen bei 37°C schnell aufgetaut. Die Segel, Aortenkonduit und Myokard wurden aus der Klappe herausgeschnitten und getrennte Anteile von jedem Gewebstyp wurden entweder für eine spätere histologische Untersuchung direkt in 10% gepuffertes Formalin eingelegt oder für die Dezellularisierung weiterverarbeitet. Nach dreimaliger Waschung für jeweils 15 Minuten bei Raumtemperatur in mit Lactat versetzter Ringers-5%-Dextroselösung wurden die Gewebe in 18 MΩ Wasser über 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von einem Verdau in 10 µg/ml DNAase I und 1 µg/ml RNAase A in 10 Mm Tris-Cl, pH 7,6 mit 3 mM Magnesium- und 1 mM Calciumsalzen bei 37°C über 120 Minuten.

[0076] Nach den lytischen Behandlungen wurden die Gewebe über 8 Tage in DMEM-5% FBS inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt wurden die behandelten Gewebe in Formalin fixiert. Alle fixierten Gewebe wurden in Paraffin eingebettet, geschnitten und mit Haematoxylin und Eosin gefärbt, um die Zellen sichtbar zu machen. Eine typische Mikrophotographie in **Abb. 1** zeigt das Muster der Verteilung der Zellen auf einem frischen Aortenklappensegel mit einer Endothelschicht sowohl auf der fibrösen als auch auf der ventrikulären Oberfläche und mit Fibroblasten überall in der gesamten Dicke des Gewebes. Die **Abb. 2a** und **Abb. 2b** zeigen Mikrophotographien jeweils eines Pulmonalklappenkonduits und von Myokard nach Dezellularisierung mit einem im Wesentlichen zellfreien Erscheinungsbild.

Beispiel 2

Wiederbesiedelung von zellfrei gemachten Aortenklappensegeln vom Schwein mit Hautfibroblasten vom Rind

[0077] Aortenklappensegel vom Schwein wurden wie in Beispiel 1 festgelegt gewonnen und zellfrei gemacht. Die Segel wurden in 5 ml NaH_2PO_4/Glycerin/BSA-Puffer bei 37°C inkubiert. Menschliches Plasma-Fibronektin wurde dem Puffer zu einer Konzentration von 10 µg/ml zusammen mit 1 µg/ml Heparin für 16 Stunden zugegeben, gefolgt von der Zugabe von menschlichem rekombinanten bFGF zu einer Konzentration von 2,5 µg/ml zusammen mit 0,83 µg/ml Heparin für weitere 6 Stunden. Nach dieser Inkubation wurden Hautfibroblasten vom Rind, die zuvor mit Standard-Explantations- und -Kultivierungsverfahren isoliert worden waren, den Herzklappensegeln mit 2×10^4 Zellen/ml zugegeben. Die Segel und die Zellen wurden über 11 Tage inkubiert. Nach der Inkubation wurden Schnitte der Klappen zur histologischen Untersuchung in Formalin eingelegt. **Abb. 3a** ist eine typische Mikrophotographie eines zellfrei gemachten Aortenklappensegels. **Abb. 3b** ist eine typische Mikrophotographie eines zellfrei gemachten Aortenklappensegels, das sowohl mit Fibronektin als auch mit bFGF behandelt wurde und eine Wiederbesiedelung mit exogenen Fibroblasten zeigt.

Beispiel 3

Biochemische Aktivität von Fibroblasten in wiederbesiedeltem Gewebe im Vergleich mit frischem und zellfrei gemachtem Gewebe

[0078] Herzklappensegel vom Schwein wurden wie in Beispiel 1 zellfrei gemacht und mit zwei unterschiedlichen Isolaten von Hautfibroblasten vom Schaf nach dem Verfahren in Beispiel 2 wiederbesiedelt. Nach 10 Tagen Wiederbesiedelung wurden die Segel in frische Gefäße eingelegt und über 48 Stunden in 1,0 µCi/ml [^{3}H]-Prolin in DMEM mit Gentamicin, 50 µg/ml Ascorbinsäure und 50 µg/ml β-Aminopropionitril inkubiert. Die Gesamtmenge der synthetisierten Proteine wurde durch aus dem Medium wiedergewonnene Radioaktivität, die mit 10% Trichloressigsäure ausgefällt worden war, bestimmt, und die Gewebsextrakte wurden 10 mM an N-Ethylmaleimid, 25 mM an EDTA und 10 mM an Phenylmethylsulfonylfluorid gemacht, um Proteolyse zu verhindern; das ausgefällte Protein wurde weiter mit Verdau durch Kollagenase aus Clostridien, welche frei von unspezifischer Kollagenaseaktivität war, untersucht, um den Gehalt an Kollagen zu bestimmen. Wie in **Abb. 4** gezeigt war die Proteinsyntheseaktivität des zellfrei gemachten Gewebes null. Nach der Wiederbesiedelung wurde eine signifikante Proteinsynthese durch [^{3}H]-Prolinaufnahme erfasst, welche mit der selben Geschwindigkeit, wie sie in frischem Gewebe vom Schwein bestimmt worden war, synthetisiert wurde; Kollagen stellte 3,6% der gesamten Proteinsynthese dar, und der größte Teil davon wurde in das Medium sezerniert. Diese Ergebnisse zeigen, dass Segel vom Schwein, die einer Behandlung durch in der bevorzugten Ausführungsform der Erfindung beschriebene Verfahren der Dezellularisierung unterworfen wurden, keine Fähigkeit zur Proteinsynthese im Allgemeinen und keine Kollagensynthese im Besonderen zeigen. Die erfolgreiche Anwendung der Verfahren zur Wiederbesiedelung wird durch die Fähigkeit, dem zellfrei gemachten Segel durch die Bereitstellung exogener Fibroblasten während des Vorgangs der Wiederbesiedelung die Zellfunktion der Proteinsynthese zu vermitteln, angezeigt.

Beispiel 4

Demonstration verringerter humoraler Immunantwort auf in Kaninchen injizierte Extrakte von zellfrei gemachten Segeln vom Schwein

[0079] Die Beseitigung von Zellen und löslichen Proteinen wurde mit den in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren erreicht. Die immunologischen Konsequenzen der Dezellularisierung von Segeln wurden durch den Vergleich mit kryokonservierten lebensfähigen Segeln untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen der humoralen Immunantwort sind in **Abb. 5** dargestellt. Die humorale Immunantwort wurde unter Verwendung eines Antikörperbindungsverfahrens beurteilt, worin Antigenextrakte von unmodifizierten kryokonservierten Segeln in 0,1 M NaCl verwendet wurden, um Seren von Kaninchen, die mit NaCl-Extrakten entweder von modifizierten, zellfrei gemachten Segeln oder von Kontrollsegeln immunisiert worden waren, zu überprüfen. Emulsionen solcher Extrakte wurden in 50% (v/v) Freund's kompletten Adjuvans' hergestellt; 0,1 ml-Portionen dieser Emulsionen wurden in zehn intradermale Stellen entlang der Rücken von separaten, männlichen, weißen Neuseeland-Kaninchen eingebracht. Nach zwei Wochen wurden die Tiere mit zusätzlichen, in Freund's inkompletten Adjuvans emulgierten Extrakten kryokonservierter oder zellfrei gemachter Segel erneut gefordert. Nach 1,5 Monaten wurden die Tiere ausgeblutet. Es wurden Immunseren hergestellt und unter Verwendung von an alkalische Phosphatase konjugierten Antiseren von der Ziege gegen IgG vom Kaninchen und gegen IgM vom Kaninchen sowohl auf IgG- als auch auf IgM-Antikörper untersucht. In **Abb. 5** zeigte das Serum von Empfängern von zellfrei gemachtem Gewebe ~50% der IgG-Antwort und < 5% der IgM-Antwort, die bei Kaninchen, die mit Extrakten von kryokonservierten Segeln immunisiert worden waren, beobachtet worden war. Diese Ergebnisse zeigen eine Abschwächung der humoralen Immunantwort auf Gewebe, das mit den in der besonderen Ausführungsform der Erfindung beschriebenen Verfahren zellfrei gemacht worden ist.

Beispiel 5

Demonstration verringerter zellulärer Immun- und Entzündungsantworten auf zellfrei gemachte, in Kaninchen implantierte Segel vom Schwein

[0080] Die Beseitigung von Zellen und löslichen Proteinen wurde mit den in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren erreicht. Abgeteilte Stücke von zellfrei gemachten (azellulären) und von kryokonservierten (zellulären) Aortenklappensegeln vom Schwein wurden in Taschen, die in den dorsalen Subcubitae von männlichen, weißen Neuseeland-Kaninchen gebildet worden waren, eingesetzt. Die Taschen wurden verschlossen und nach zwei Wochen wurden die Implantate und die umgebenden Gewebe (Haut bis Muskel) chirurgisch wiedergewonnen und in Formalin fixiert für die histopathologische Untersuchung nach der Anfärbung von in Paraffin eingebetteten Schnitten mit Haematoxylin und Eosin. **Abb. 6** zeigt, dass die zellfrei gemachten Segel minimale zelluläre Antworten im Vergleich mit den kryokonservierten Kontrollen erzeugten. Das kryokonservierte Gewebe, das sowohl eine Endothelzellschicht als auch Fibroblasten enthält, stimulierte eine erhebliche zelluläre Immun- und Entzündungsantwort mit vielen Heterophilen, Lymphozyten und Plasmazellen im Bereich des Implantats ebenso wie in den Implantaten selbst. In Implantaten aus zellfrei gemachtem Gewebe waren

die Entzündungs- und Immunzellen weniger an Zahl und in der Verbreitung eingeschränkter.

Beispiel 6

Demonstration der Beseitigung von Antigenen, die für die hyperakute Abstoßung von Geweben vom Schwein in einem menschlichen Empfänger verantwortlich sind

[0081] Die Beseitigung von Zellen und löslichen Proteinen aus Aortenklappensegeln und Aortenkonduit vom Schwein wurde mit den in Beispiel 1 beschriebenen Verfahren erreicht. Abgeteilte Stücke dieser Gewebe und ihre Entsprechungen aus frischen und kryokonservierten Aortenklappen vom Schwein wurden in flüssigem Stickstoff in Medium zur Einbettung für Gefrierschnitte schockgefroren, in 8–10 µm dicke Schnitte geschnitten, und auf ladungsmodifizierte Objektträger aus Glas aufgebracht. Nach Fixierung in Aceton mit 4°C wurden die Gewebe mit Biotin-konjugiertem Lectin-I von Bandeiraea simplicifolia untersucht, welches an spezifische, Galactose-α1,3-galactose-modifizierte Proteine, die auf den Membranen von Zellen von Schweinen gefunden werden, bindet. Diese modifizierten Proteine sind die Stellen der Bindung präformierter, natürlicher, gegen Antigene vom Schwein gerichteter Antikörper, die hyperakute Abstoßungsreaktionen gegen Gewebe vom Schwein in Primaten (einschließlich des Menschen) einleiten. Proteine, die dieses Lectin binden, wurden durch eine nachfolgende Reaktion der Schnitte mit einer Biotin-konjugierten Meerrettich-Peroxidase-Avidin-Mischung, Wasserstoffperoxid und 3,3'-Diaminobenzidin erfasst. Die Gegenwart von Antigenen vom Schwein wird durch Entstehung von Farbe aufgedeckt. In **Abb. 7a** zeigt die mikroskopische Untersuchung der Schnitte mit Zellen verbundenes Antigen im kryokonservierten Aortenklappensegel. **Abb. 7b** zeigt eine deutlich verringerte Antigenbindung nach der Dezellularisierung des Aortenklappensegels. Diese Untersuchung zeigt, dass das Verfahren der Dezellularisierung, wie es in der bevorzugten Ausführungsform der Erfindung dargelegt ist, entscheidende Antigene, die wahrscheinlich eine Abstoßung eines Transplantats vom Schwein durch einen menschlichen Empfänger verursachen, vermindert.

Beispiel 7

Biomechanische Eigenschaften von zellfrei gemachten Aortenklappensegeln vom Schwein – Spannungs-Dehnungs-Analysen

[0082] Frisch gewonnene Aortenklappen vom Schwein wurden mit einer antibiotischen Mischung sterilisiert und unter Bedingungen, die die zelluläre Lebensfähigkeit erhalten, kryokonserviert. Zur Dezellularisierung wurden die Aortenklappen bei 37°C schnell aufgetaut und dann mit einer hypotonen Lösung, Nucleasen und gepufferter Salzlösung über 10 Tage behandelt. Für die biomechanischen Untersuchungen wurden die Segel in umlaufende und radiale Streifen geschnitten und unter geeichtem Spanndruck in einem Instron Model 1011 Materials Tester angebracht. Während der Untersuchung wurde das Gewebe in Hanks' gepufferter Salzlösung bei 37°C oder bei 4°C gebadet. Nach Bestimmung der Messlänge und 20 präkonditionierenden Zyklen (100 g Last für umlaufende Streifen und 180 g für radiale Streifen) wurde jedes Exemplar wie folgt getestet:

1) Ein einzelner Last-gegen-Dehnung-Test, dessen Ergebnisse in **Abb. 8** gezeigt sind. Radiale Streifen waren unter allen Bedingungen dehnbarer als umlaufende. Der Elastizitätsmodul des Gewebes wurde durch keine Behandlung beeinflusst, aber zellfrei gemachte radiale Streifen waren signifikant dehnbarer als frisches Gewebe (113 ± 11,8 vs. 85,9 ± 8,6 mm/mm);
2) Ein Spannungs-Relaxations-Test, dessen Ergebnisse in **Abb. 9** gezeigt sind. Für umlaufende und radiale Streifen wurden etwa 10% der ursprünglichen Spannung in den ersten 10 Sekunden abgebaut. Insgesamt erschien die Geschwindigkeit des Rückgangs der Spannung im Allgemeinen in den radialen Streifen höher und war in den kryokonservierten radialen Streifen am schnellsten. Bei Beendigung des Tests war die verbleibende Spannung in zellfrei gemachten umlaufenden Streifen bei 37°C signifikant höher als in frischem Gewebe; bei den radialen Streifen gab es keine signifikanten Unterschiede; und
3) Ein Zugspannungsbruch-Test, dessen Ergebnisse in **Abb. 10** gezeigt sind. Unter jeder Bedingung waren die umlaufenden Streifen stabiler, steifer und zäher als radiale Streifen. Kryokonservierung und Dezellularisierung beeinflußten diese in umlaufender Richtung gemessenen Parameter nicht. Radiale Streifen, die aus dem zellfrei gemachten Gewebe geschnitten wurden, zeigten bei jeder der beiden Temperaturen eine größere Zähigkeit im Vergleich zu frischem Gewebe.

[0083] Die hier enthaltene Beschreibung beinhaltet die bevorzugte Ausführungsform der Erfindung. Es wird jedoch in Erwägung gezogen, dass zahlreiche alternative Ausführungsformen in den Geltungsbereich dieser Erfindung fallen. Durch Belehrung und Beispiel werden die wichtigen Charakteristika der Erfindung gezeigt: 1) Entfernung der xenogenen Zellen und Zellmembranen aus einem Gewebe, welches möglicherweise als implantierbares oder transplantierbares Transplantat in Menschen von Nutzen ist (gezeigt durch histologische und biochemische Untersuchungen); 2) das zellfreie Gewebe kann unter dem Einfluss von Glykoprotein der extrazellulären Matrix, von Glykosaminoglykan und von Wachstumsfaktor mit exogenen Zellen, die möglicherweise vom Empfänger des Transplantats stammen, wiederbesiedelt werden; 3) Erhaltung der biomechanischen

Eigenschaften, ähnlich denen von kryokonservierten Geweben, die selbst als stabile Transplantatmaterialien verwendet werden; und 4) als Resultat des Verfahrens der Dezellularisierung ist die Neigung des zellfrei gemachten Gewebes zur Stimulation einer Entzündungsreaktion und einer zellulären und humoralen Immunantwort im Empfänger vermindert.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Erzeugung von Implantatgewebe oder Transplantaten für einen Implantatempfänger, worin das Implantatgewebe oder die Transplantate eine verbesserte Kompatibilität mit dem Immunsystem des Implantatempfängers haben, umfassend:
A. Elimination nativer Zellen und anderer extrazellulärer Komponenten aus einem Spendergewebe, um eine zellfreie Gewebsmatrix bereitzustellen;
B. Behandlung der zellfreien Gewebsmatrix mit einem zellulären Adhäsionsfaktor, um das nachfolgende Anhaften kultivierter allogener oder autologer Zellen in der Gewebsmatrix zu fördern, wobei besagte Zellen für den Empfänger allogen oder autolog sind; und
C. Wiederbesiedelung der Gewebsmatrix mit den kultivierten allogenen oder autologen Zellen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Implantatgewebe aus natürlichem Kollagengewebe, Herzklappengewebe, Bindegewebe oder Blutgefäßen erzeugt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, worin das Herzgewebe Pulmonal- oder Aortenklappengewebe ist.

4. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Implantat durch Behandlung von Gewebe nicht-menschlichen Ursprungs erzeugt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Zellen, die zur Wiederbesiedelung der Gewebsmatrix verwendet werden, menschlichen Ursprungs sind.

6. Verfahren nach Anspruch 1, worin das erzeugte Gewebe nach Implantation im Wesentlichen nicht immunogen ist.

7. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Implantat durch Behandlung von Gewebe nicht-menschlichen Ursprungs erzeugt wird, wobei die zur Wiederbesiedelung der Gewebsmatrix verwendeten Zellen menschlichen Ursprungs sind, und wobei das erzeugte Gewebe nach Implantation im Wesentlichen nicht immunogen ist.

8. Verfahren nach Anspruch 7, worin die Wiederbesiedelung des Gewebes durch Inkubation der Gewebsmatrix in Anwesenheit von Fibroblastenzellen und Fibroblasten-Wachstumsfaktor erfolgt.

9. Verfahren nach Anspruch 8, worin die Fibroblastenzellen allogene Zellen sind.

10. Verfahren nach Anspruch 8, worin die Fibroblastenzellen aus stabilen Zelllinien stammen.

11. Verfahren nach Anspruch 8, worin die Fibroblastenzellen genetisch mit Methoden der stabilen Transfektion mit exogenem genetischen Material modifiziert werden.

12. Verfahren nach Anspruch 8, worin die Fibroblastenzellen menschlichen Ursprungs sind und modifiziert werden, damit sie für den Empfänger des Gewebeimplantats im Wesentlichen nicht immunogen sind.

13. Verfahren nach Anspruch 8, worin die Fibroblastenzellen menschlichen Ursprungs sind und modifiziert werden, damit sie spezifische Proteine exprimieren.

14. Verfahren nach Anspruch 1, worin die nativen Zellen durch Behandlung des Gewebes mit einer Lösung, die die Lyse der Zellen bewirkt, eliminiert werden.

15. Verfahren nach Anspruch 14, welches weiterhin eine Behandlung des Gewebes mit enzymatischer Nuklease umfasst, was die Zellentfernung aus der Gewebsmatrix und die Bereitstellung einer Gewebsmatrix mit eingeschränkter Immunogenität bewirkt.

16. Verfahren nach Anspruch 15, worin das Gewebe mit einer aus der Gruppe, die RNAase A, DNAase I, EcoR I und Hind III umfasst, ausgewählten Nuklease behandelt wird.

17. Verfahren nach Anspruch 1, worin Schritt (A) das Behandeln des Gewebes mit einer Lösung geringer Ionenstärke und DNAase I und RNAase A umfasst, was die Elimination nativer Zellen und die Bereitstellung einer Gewebsmatrix mit eingeschränkter Immunogenität bewirkt, und worin Zelldebris, lösliches Protein und anderes Material durch Waschen des Gewebes entfernt werden, um eine Gewebsmatrix bereitzustellen, die im Wesentlichen frei von nativen Gewebekomponenten ist, die in Bezug auf den Implantatempfänger antigen sind.

18. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Gewebsmatrix mit einem zellulären Adhäsionsfaktor behandelt wird, der Glycoprotein und Glycosaminoglycan umfasst, um die Anhaftung der Zellen an die Gewebsmatrix während des Schrittes der zellulären Wiederbesiedelung zu fördern.

19. Verfahren nach Anspruch 18, worin das Glycosaminoglycan Heparin, Heparinsulfat, Chondroitin,

Chondroitinsulfat, Dermatin oder Dermatinsulfat ist.

20. Verfahren nach Anspruch 18, worin das Glycoprotein Fibronectin ist.

21. Verfahren nach Anspruch 1, worin die Gewebsmatrix während des Schrittes (B) mit einem zellulären Adhäsionsfaktor behandelt wird, der ein oder mehrere extrazelluläre Proteine umfasst, die gewöhnlich mit dem nativen Gewebe verbunden sind, was bewirkt, dass die Anhaftung von Zellen an die Gewebsmatrix während des Wiederbesiedelungs-Schrittes (C) gefördert wird.

22. Verfahren nach Anspruch 21, worin das native Gewebe Herzklappengewebe vom Schwein ist.

23. Verfahren nach Anspruch 22, worin die Klappengewebsmatrix durch Inkubation der entsprechend Schritt (B) behandelten Gewebsmatrix in Anwesenheit allogener oder autologer Fibroblastenzellen und Fibroblasten-Wachstumsfaktors wiederbesiedelt wird, um ein xenogenes Klappenimplantat bereitzustellen, das durch die besagten Fibroblastenzellen wiederbesiedelt und revitalisiert ist und das im Wesentlichen nach Implantation nicht immunogen ist.

24. Verfahren nach Anspruch 23, worin die Klappengewebsmatrix durch Elimination nativer Gewebszellen und durch Behandlung mit Enzymen oder Nukleasen aufbereitet wird, um die Gewebsmatrix bereitzustellen.

25. Verfahren nach Anspruch 24, worin die Nuklease DNAase I ist.

26. Verfahren nach Anspruch 24, worin die Nuklease RNAase A ist.

27. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Implantatgewebe allogenes oder xenogenes Implantatgewebe ist.

28. Verfahren nach Anspruch 1, worin das xenogene Gewebe behandelt wird, um seine Kompatibilität mit dem Immunsystem eines Implantatempfängers einer Art, die sich von der Art, von der das native Gewebe stammt, unterscheidet, zu verbessern; worin die Zellen während des Schritts (A) aus dem Gewebe entfernt werden; worin der zelluläre Anhaftungsfaktor des Schritts (B) ein oder mehrere extrazelluläre Proteine, die gewöhnlich mit dem nativen Gewebe verbunden sind, in einem flüssigen Medium umfasst; und worin die Gewebsmatrix dann in Schritt (C) mit Zellen, die für den Implantatempfänger autogen oder allogen sind, wiederbesiedelt wird, um ein im Wesentlichen nicht immunogenes und biomechanisch akzeptables Implantat oder Transplantat bereitzustellen, welches durch die Wiederbesiedelung mit Zellen belebt und histologisch und biochemisch dem entsprechenden natürlichen Gewebe ähnlich ist.

29. Verfahren nach Anspruch 28, worin das behandelte native Gewebe Herz-, Gefäß-, Binde- oder Kollagengewebe ist.

30. Verfahren nach Anspruch 29, worin die Adhäsionsfaktoren ein Glycoprotein und ein Glycosaminoglycan umfassen.

31. Verfahren nach Anspruch 30, worin die Gewebsmatrix mit Fibroblastenzellen, die immunologisch mit dem Implantatempfänger kompatibel sind, wiederbesiedelt wird.

32. Verfahren nach Anspruch 31, worin die Fibroblastenzellen genetisch mit Methoden der stabilen Transfektion mit exogenem genetischen Material modifiziert werden

33. Verfahren nach Anspruch 31, worin die Fibroblastenzellen menschlichen Ursprungs sind und modifiziert werden, damit sie nach Implantation im Wesentlichen nicht immunogen sind.

34. Verfahren nach Anspruch 31, worin die Fibroblastenzellen menschlichen Ursprungs sind und modifiziert werden, damit sie spezifische Proteine exprimieren.

35. Verfahren nach Anspruch 31, worin der Adhäsionsfaktor Fibronectin und ein Glycosaminoglycan umfasst, welches aus der Gruppe, die aus Dermatin, Dermatinsulfat, Chondroitin, Chondroitinsulfat, Heparinsulfat und Heparin besteht, ausgewählt wird.

36. Verfahren nach Anspruch 35, worin das native Gewebe Herzklappengewebe vom Schwein ist und worin der Schritt der Wiederbesiedelung mit Zellen durch Inkubation der Gewebsmatrix in einem Nährmedium und in Anwesenheit von Fibroblastenzellen und einer wirksamen Menge von Fibroblasten-Wachstumsfaktor ausgeführt wird.

37. Verfahren nach Anspruch 1, worin Implantate oder Transplantate aus Kollagen-, Binde- oder Gefäßgewebe, was für einen menschlichen Empfänger xenogen ist, in vitro erzeugt werden, indem das natürliche Gewebe in Schritt (A) zellfrei gemacht und gewaschen wird, um zelluläre Antigene oder extrazelluläre Antigene, oder beide, zu entfernen, gefolgt von einer Behandlung der Gewebsmatrix in Schritt (B) mit Adhäsionsfaktoren, welche Fibronectin und Heparin umfassen, was bewirkt, dass eine Anhaftung daran von Fibroblastenzellen, welche immunologisch für den Implantat- oder Transplantatempfänger verträglich sind, gefördert wird; worin die mit Adhäsionsfaktor behandelte Gewebsmatrix in Schritt (C) wiederbesiedelt wird, indem die Matrix in Anwesenheit von Fibroblastenzellen und Fibroblasten-Wachs-

tumsfaktor inkubiert wird, bis eine derartige Wiederbesiedelung mit Zellen ein belebtes Gewebe, das dem entsprechenden natürlichen Gewebe histologisch ähnlich ist, bildet, und wobei das erzeugte Implantatgewebe mechanisch, biochemisch und immunologisch zur Implantation geeignet ist.

38. Verfahren nach Anspruch 37, worin das Fibronectin menschliches Plasmafibronectin oder menschliches Gewebsfibronectin umfasst.

39. Verfahren nach Anspruch 38, worin das Gewebe Kollagengewebe ist.

40. Verfahren nach Anspruch 38, worin das Gewebe Bindegewebe ist.

41. Verfahren nach Anspruch 39, worin die Fibroblastenzellen kultivierte menschliche Fibroblastenzellen sind.

42. Verfahren nach Anspruch 41, worin das native Gewebe Herzklappengewebe ist, und worin die Zellen zur Wiederbesiedelung menschliche Fibroblastenzellen sind.

43. Verfahren nach Anspruch 37, das weiterhin den Schritt der Kryokonservierung der Gewebsmatrix in einem Stadium vor dem Schritt der Wiederbesiedelung mit Zellen umfasst.

44. Verfahren nach Anspruch 40, worin das native Gewebe durch Verfahren, die eine Behandlung mit Nukleasen umfassen, zellfrei gemacht wird, um die Bildung neuer immunologischer Erkennungsstellen zu beschränken.

45. Verfahren nach Anspruch 37, worin das Heparin Fibronectin an Teile der Gewebsmatrix bindet, und worin basischer rekombinanter Fibroblasten-Wachstumsfaktor vom Menschen eingesetzt wird.

46. Verfahren nach Anspruch 45, worin die Gewebsmatrix Gewebe aus Aorten- oder Pulmonalklappen ist.

47. Verfahren nach Anspruch 37, worin die Fibroblastenzellen autogene Zellen sind.

48. Verfahren nach Anspruch 37, worin die Fibroblastenzellen allogene Zellen sind.

49. Verfahren nach Anspruch 37, worin die Fibroblastenzellen aus stabilen Zelllinien stammen.

50. Verfahren nach Anspruch 37, worin die Fibroblastenzellen genetisch mit Methoden der stabilen Transfektion mit exogenem genetischen Material modifiziert werden.

51. Verfahren nach Anspruch 37, worin die Fibroblastenzellen menschlichen Ursprungs sind und modifiziert werden, damit sie nach Implantation im Wesentlichen nicht immunogen sind.

52. Verfahren nach Anspruch 37, worin die Fibroblastenzellen menschlichen Ursprungs sind und modifiziert werden, damit sie spezifische Proteine exprimieren.

53. Verfahren nach Anspruch 37, worin das Gewebe vom Schwein oder vom Rind stammt, der Matrixadhäsionsfaktor gereinigtes Fibronectin und Heparin umfasst, und worin die Zellen zur Wiederbesiedelung menschliche Fibroblastenzellen in Anwesenheit wirksamer Mengen von basischem oder saurem Fibroblasten-Wachstumsfaktor sind, und das erzeugte Implantatgewebe ein xenogenes Implantat ist, das im Wesentlichen keine ungünstige Immunantwort nach Implantation in einen Menschen hervorruft.

54. Verfahren nach Anspruch 37, worin der Schritt zur Elimination von Zellen die Behandlung der Gewebe mit einer Lösung geringer Ionenstärke und Nukleasen umfasst.

55. Verfahren nach Anspruch 54, worin die Nukleasenlösung geringer Ionenstärke mindestens ein Mitglied, welches aus der aus RNAase A, DNAase I, EcoR I und Hind III bestehenden Gruppe ausgewählt wurde, enthält.

56. Verfahren nach Anspruch 37, worin das natürliche Gewebe Kollagengewebe ist; das Gewebe in Schritt (A) zellfrei gemacht und mit einer Lösung geringer Ionenstärke und DNAase I und RNAase A behandelt wird, was die Elimination nativer Zellen und die Bereitstellung einer Gewebsmatrix von eingeschränkter Immunogenität bewirkt; und die Gewebsmatrix in Schritt (B) mit einer Menge einer gepufferten Lösung, die Fibronectin und Heparinsulfat enthält, behandelt wird, was die Bereitstellung von der Gewebsmatrix angegliederten Bindungsstellen bewirkt, welche die Anhaftung von Fibroblastenzellen daran ermöglichen; und worin die Gewebsmatrix in Schritt (C) wiederbesiedelt wird, indem sie zusammen mit Fibroblastenzellen menschlichen Ursprungs in Anwesenheit einer Menge von Fibroblasten-Wachstumsfaktur inkubiert wird, was eine Förderung des Zellwachstums und der Wiederbesiedelung der Gewebsmatrix mit Fibroblastenzellen bewirkt.

57. Verfahren nach Anspruch 56, worin das Transplantatgewebe Herzklappengewebe vom Schwein ist.

58. Verfahren nach Anspruch 56, worin die Fibroblastenzellen autogen sind.

59. Verfahren nach Anspruch 56, worin die Fibro-

blastenzellen allogen sind.

60. Verfahren nach Anspruch 1, worin während des Schrittes (A) eine im Wesentlichen nicht immunogene Gewebsmatrix hergestellt wird, die für die Weiterverarbeitung zu einem Transplantatgewebe geeignet ist, wobei die nativen Zellen eliminiert werden, indem das Gewebe mit Komponenten, die aus der Enzyme und Nukleasen umfassenden Gruppe ausgewählt werden, behandelt wird, was bewirkt, dass nachfolgendes Wachstum nativer Zellen in dem behandelten Gewebe gehemmt wird und die Bildung neuer immunologischer Erkennungsstellen in dem Gewebe beschränkt wird.

61. Verfahren nach Anspruch 60, worin das Gewebe mit einer Nukleasenlösung geringer Ionenstärke behandelt wird, was bewirkt, dass Zellen aus der Gewebsmatrix eliminiert werden und dass eine Gewebsmatrix mit eingeschränkter Immunogenität bereitgestellt wird.

62. Verfahren nach Anspruch 61, worin die Nukleasenlösung geringer Ionenstärke mindestens ein Mitglied der Gruppe aus RNAase A, DNAase I, EcoR I und Hind III enthält.

63. Verfahren nach Anspruch 61, worin die eingesetzten Nukleasen Ribonuklease A und Desoxyribonuklease I sind.

64. Verfahren nach Anspruch 60, welches weiterhin die Kryokonservierung der Gewebsmatrix nach Schritt (A) und vor der Weiterverarbeitung umfasst.

65. Verfahren nach Anspruch 61, welches weiterhin die Kryokonservierung der Gewebsmatrix nach Schritt (A) und vor der Weiterverarbeitung umfasst.

66. Verfahren nach Anspruch 64, welches weiterhin die Sterilisation des Gewebes oder der Gewebsmatrix oder von beiden umfasst.

67. Verfahren nach Anspruch 60, worin das Verfahren die Kryokonservierung von Gewebe von einem natürlichen Spender, der ein Säuger ist, und die anschließende Entfernung des Gewebes aus der Kryokonservierung vor der Behandlung entsprechend Anspruch 53 umfasst.

68. Verfahren nach Anspruch 67, worin die Gewebsmatrix von einer Herzklappe vom Schwein stammt.

69. Verfahren nach Anspruch 68, worin die Herzklappe eine Pulmonal- oder Aortenklappe ist.

70. Verfahren nach Anspruch 60, worin die besagte Elimination von Zellen eine Behandlung mit einer hypotonen wässrigen Lösung umfasst.

71. Verfahren nach Anspruch 70, worin besagte hypotone wässrige Lösung eine gepufferte wässrige Lösung ist, welche die Herbeiführung der Zelllyse bewirkt.

72. Verfahren nach Anspruch 71, worin das Gewebe Herzklappengewebe vom Schwein ist.

73. Verfahren nach Anspruch 72, worin die Herzklappe eine Pulmonal- oder Aortenklappe ist.

74. Verfahren nach Anspruch 73, welches weiterhin den Schritt der Kryokonservierung der hergestellten Herzklappenmatrix vom Schwein umfasst.

75. Verfahren nach Anspruch 1, worin eine xenogene Herzklappe, die histologisch und immunologisch zur Herzklappenimplantation in einen menschlichen Empfänger oder einen Empfänger, der ein Säuger ist, geeignet ist, aus Klappengewebe vom Schwein oder Rind hergestellt wird; wobei Zellen aus dem nativen Klappengewebe in Schritt (A) eliminiert werden, um eine zellfreie Herzklappengewebsmatrix bereitzustellen, die im Wesentlichen frei von nativen zellulären Antigenen ist und behandelt wurde, um die Bildung neuer immunologischer Erkennungsstellen zu beschränken; und während Schritt (B) Anhaftungsfaktoren, welche ein oder mehrere extrazelluläre, gewöhnlich mit dem natürlichen Gewebe verbundene Proteine umfassen, auf die Klappengewebsmatrix aufgebracht werden, was bewirkt, dass die Anhaftung von Fibroblastenzellen an die Matrix gefördert wird; und die Klappengewebsmatrix während Schritt (C) mit allogenen oder autologen Fibroblastenzellen in Anwesenheit von Fibroblasten-Wachstumsfaktor in einer immunologisch für den Empfänger verträglichen Weise wiederbesiedelt wird, um belebtes Klappengewebe bereitzustellen.

76. Verfahren nach Anspruch 75, worin die Herzklappe eine Pulmonal- oder Aortenklappe ist.

77. Verfahren nach Anspruch 1, worin ein Transplantat vom Schwein oder ein Herzklappenimplantat, welches für die Anwendung in einem menschlichen Empfänger geeignet ist, hergestellt wird durch: die Elimination der Zellen aus dem nativen Gewebe während Schritt (A), wobei die Behandlung des Gewebes mit Enzymen oder Nukleasen die Elimination der Zellen aus der Gewebsmatrix und die Bereitstellung einer Gewebsmatrix mit eingeschränkter Immunogenität bewirkt; und durch die Applikation einer wirksamen Menge von menschlichem Plasmafibronectin und von Heparin auf die Klappengewebsmatrix während Schritt (B), um die zelluläre Anhaftung von allogenen oder autologen Fibroblastenzellen zu fördern; und durch die Wiederbesiedelung der Klappengewebsmatrix in Schritt (C) mit Fibroblastenzellen, indem die Klappenmatrix in einem Nährmedium, das kultivierte menschliche Fibroblastenzellen und

menschlichen, rekombinanten Fibroblasten-Wachstumsfaktor enhält, inkubiert wird.

78. Verfahren nach Anspruch 77, worin die Herzklappe eine Pulmonal- oder Aortenklappe ist.

79. Verfahren nach Anspruch 77, worin Schritt (A) die Schritte der Auflösung des nativen Gewebes und der Behandlung mit RNAase A und DNAase I umfasst.

80. Verfahren nach Anspruch 79, worin die Fibroblastenzellen autologe Zellen sind.

81. Verfahren nach Anspruch 79, worin die Adhäsionsfaktoren appliziert werden, indem die Gewebsmatrix in einem Nährmedium, welches die Adhäsionsfaktoren enthält, inkubiert wird, und worin die Fibroblastenzellen und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor danach eingesetzt werden, um die Matrix wiederzubesiedeln, indem sie in wirksamen Mengen dem Nährmedium, welches die Gewebsmatrix enthält, zugesetzt werden.

82. Verfahren nach Anspruch 79, worin die Fibroblastenzellen allogen sind.

83. Verfahren nach Anspruch 79, worin die Fibroblastenzellen autolog sind.

84. Verfahren nach Anspruch 79, welches weiterhin den Schritt der Kryokonservierung der Gewebsmatrix vor der Weiterverarbeitung umfasst.

85. Verfahren nach Anspruch 77, worin die Fibroblastenzellen aus stabilen Zelllinien stammen.

86. Verfahren nach Anspruch 77, worin die Fibroblastenzellen genetisch mit Methoden der stabilen Transfektion mit exogenem genetischen Material modifiziert werden.

87. Verfahren nach Anspruch 77, worin die Fibroblastenzellen menschlichen Ursprungs sind und modifiziert werden, damit sie nach Implantation im Wesentlichen nicht immunogen sind.

88. Verfahren nach Anspruch 77, worin die Fibroblastenzellen menschlichen Ursprungs sind und modifiziert werden, damit sie spezifische Proteine exprimieren.

89. Verfahren nach Anspruch 2, worin das Klappengewebe aus Klappensegeln, aus der Klappe anhaftendem Myocardgewebe, aus Aortenrohr, welches sich auf die Ausflussseite der Klappe erstreckt, oder aus der Klappenbasis, welche sich auf den Vorhof erstreckt, besteht.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Abbildung 1



Abbildung 2a

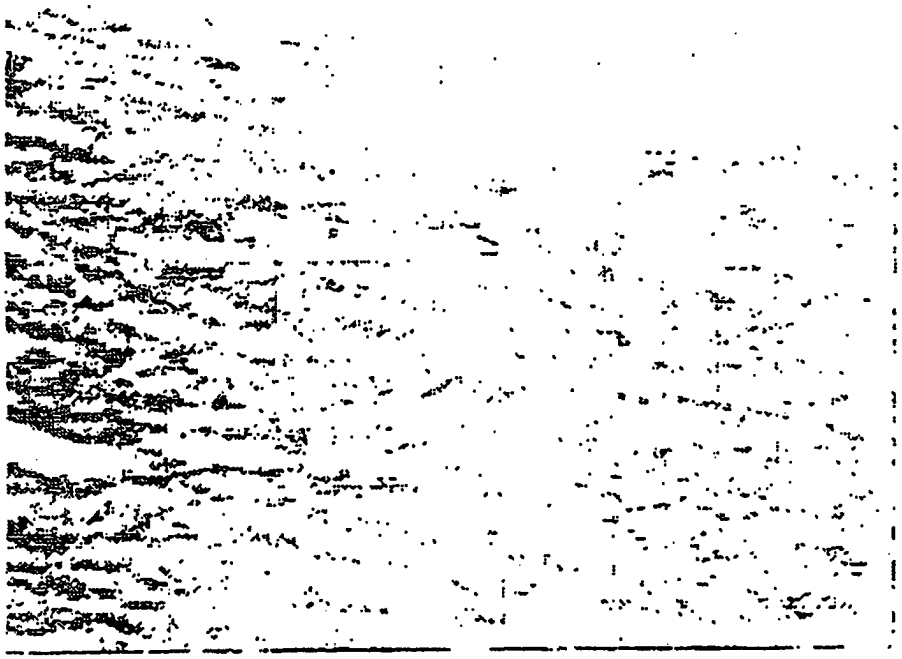

Abbildung 2b

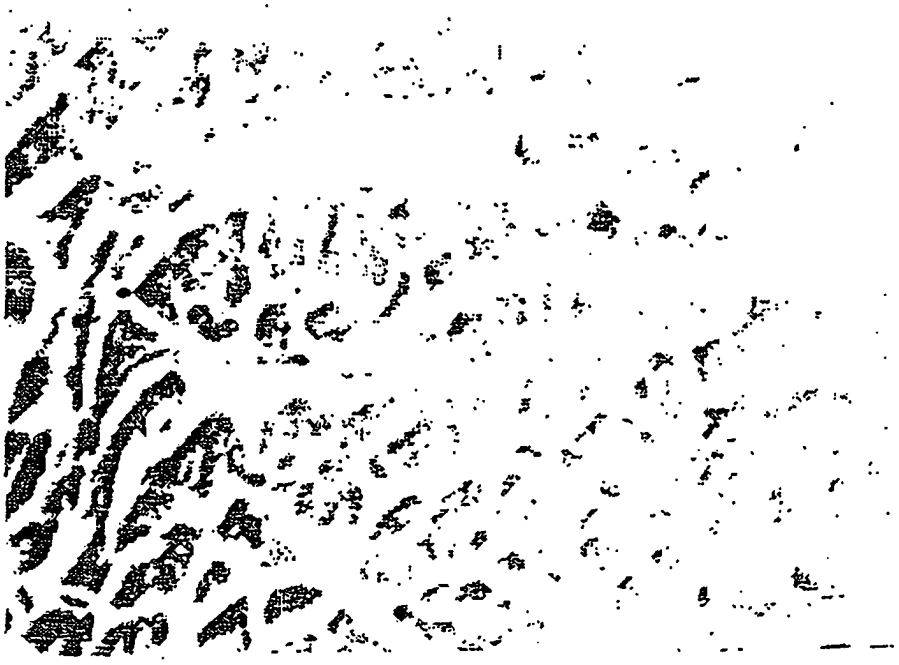

Abbildung 3a

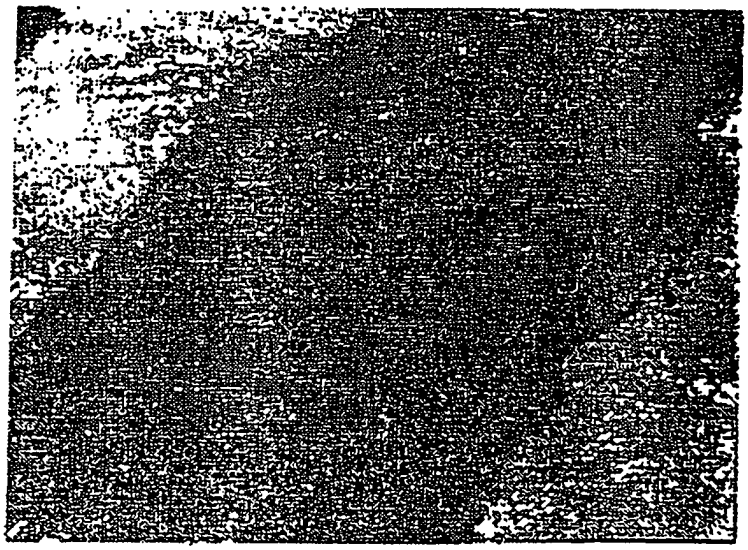

Abbildung 3b

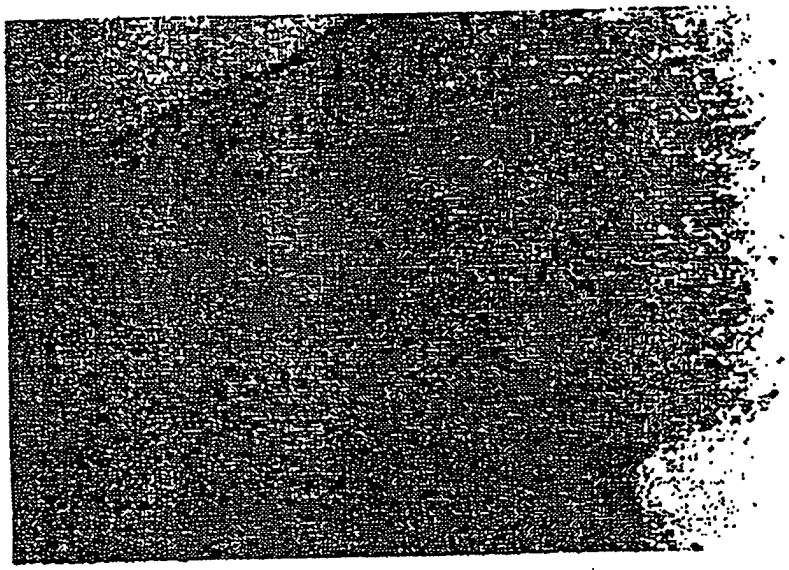

Abbildung 4

KOLLAGEN- UND NICHT-KOLLAGEN PROTEINSYNTHESE IN AORTENKLAPPENSEGELN VOM SCHWEIN

Frisch, zellfrei gemacht (azellulär), vs. mit Hautfibroblasten vom Kaninchen wiederbesiedelt

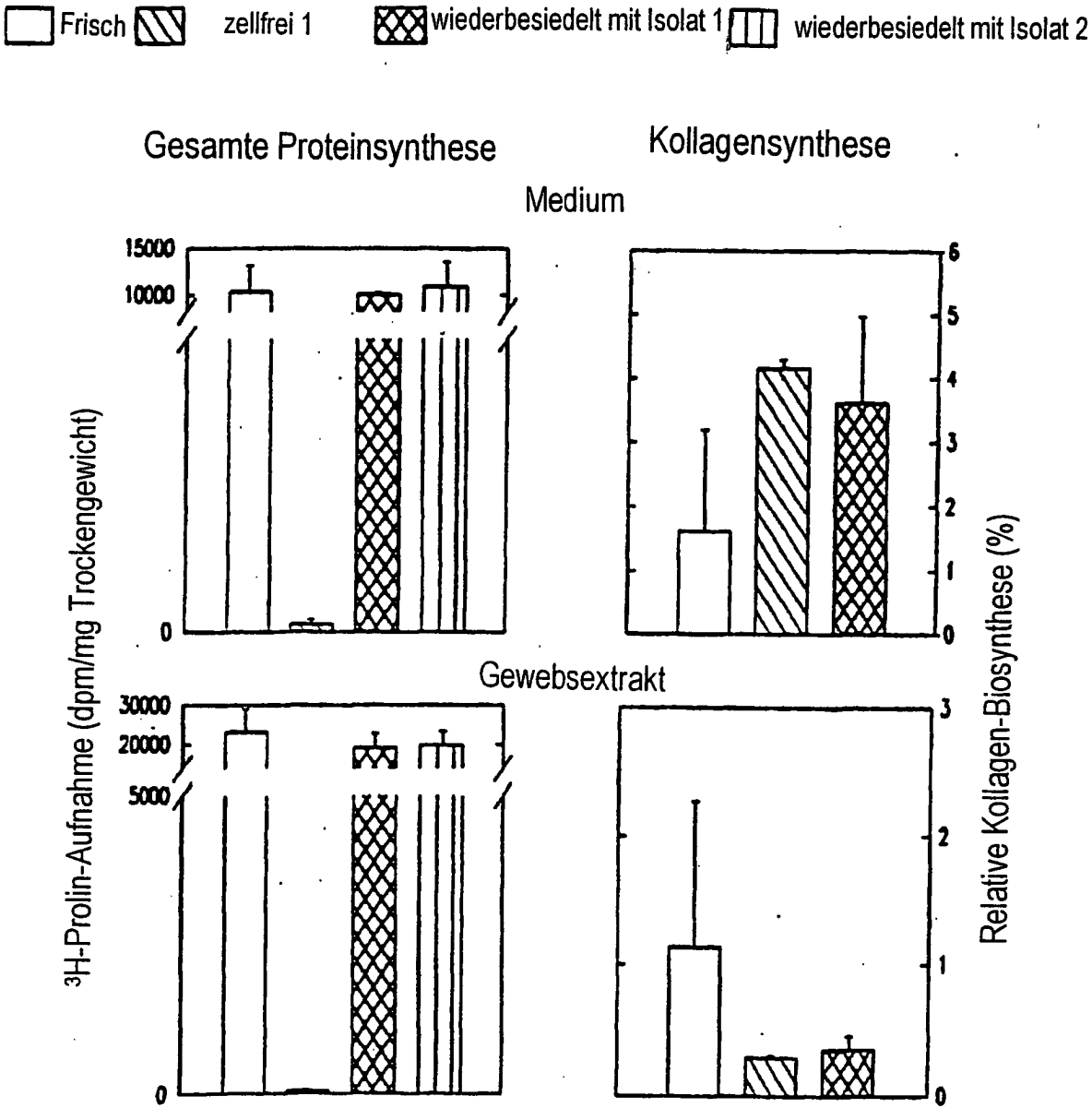

Abbildung 5

REAKTIVITÄT VON ANTISEREN VOM KANINCHEN GEGEN EXTRAKTE VON KRYOKONSERVIERTEN (o) ODER ZELLFREI GEMACHTEN (□) AORTENKLAPPENSEGELN VOM SCHWEIN - ANTIKÖRPERBINDUNG

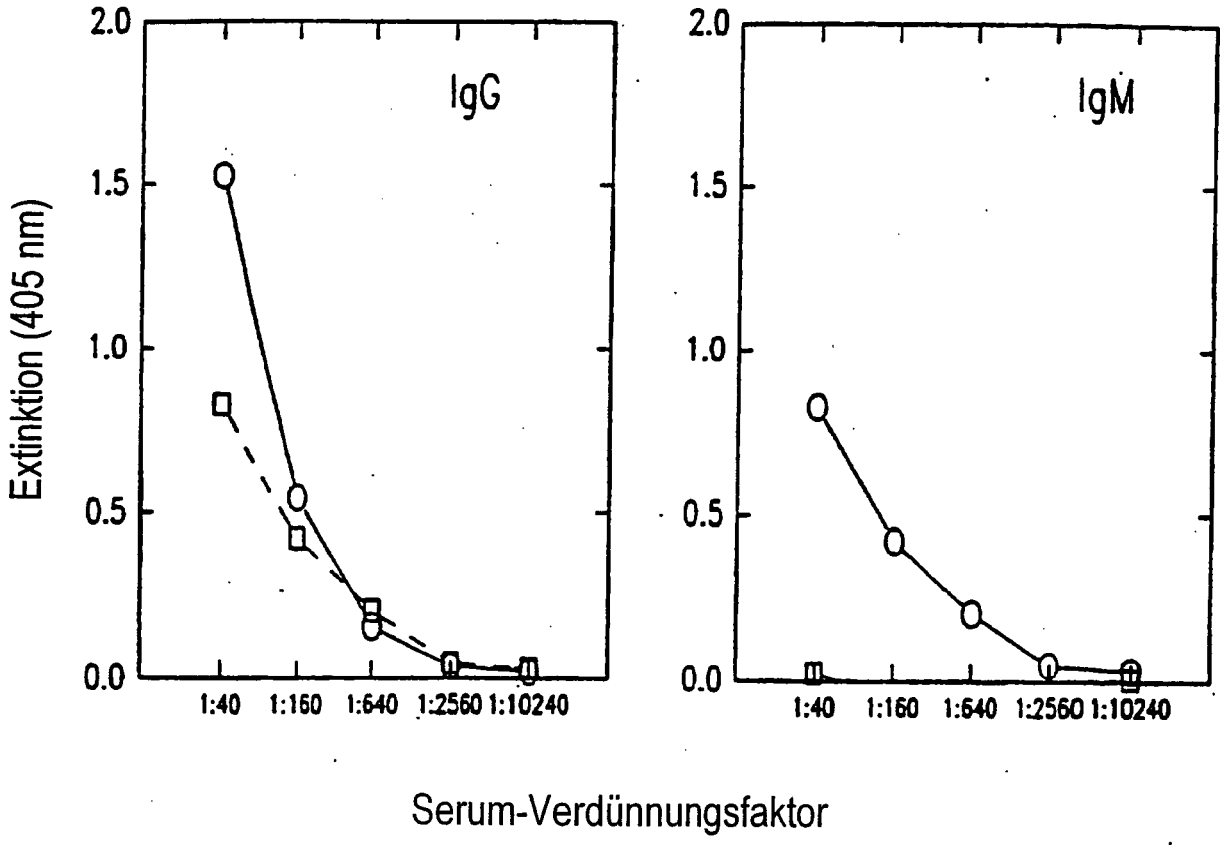

Abbildung 6a

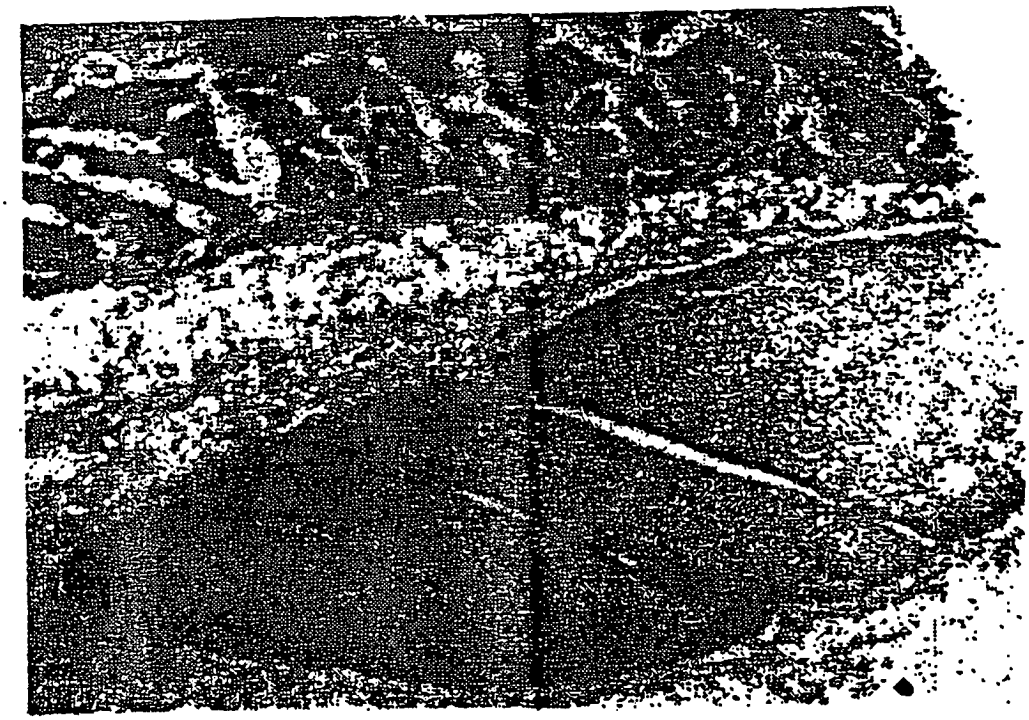

Abbildung 6b



Abbildung 7a

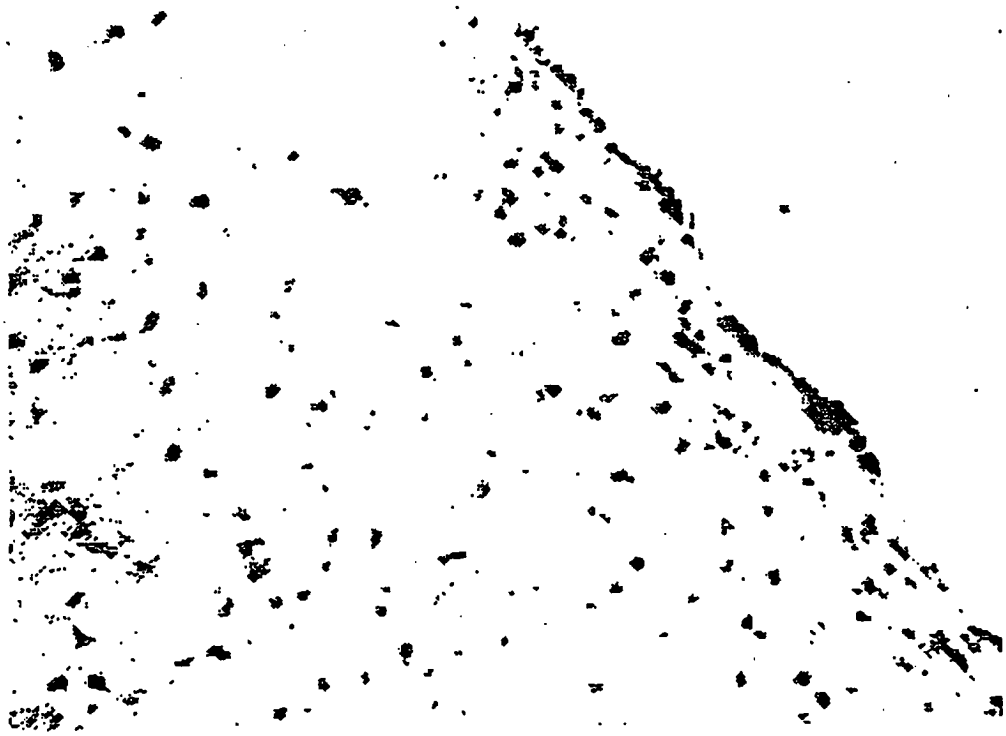

Abbildung 7b



Abbildung 8

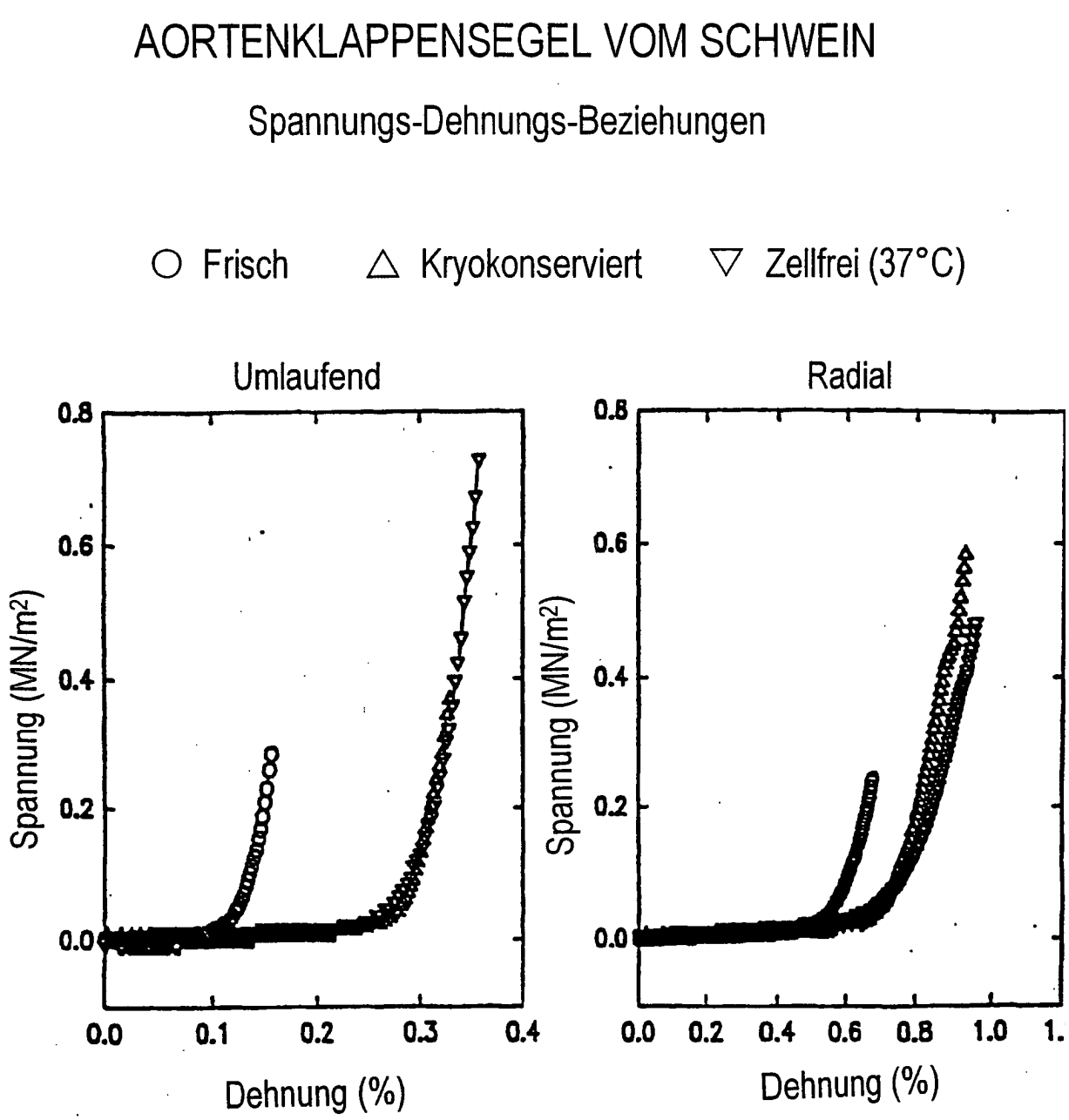
AORTENKLAPPENSEGEL VOM SCHWEIN
Spannungs-Dehnungs-Beziehungen
○ Frisch
△ Kryokonserviert
▽ Zellfrei (37°C)
Umlaufend
Radial
Spannung (MN/m²)
Dehnung (%)
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
0.1
0.3
1.0

Abbildung 9

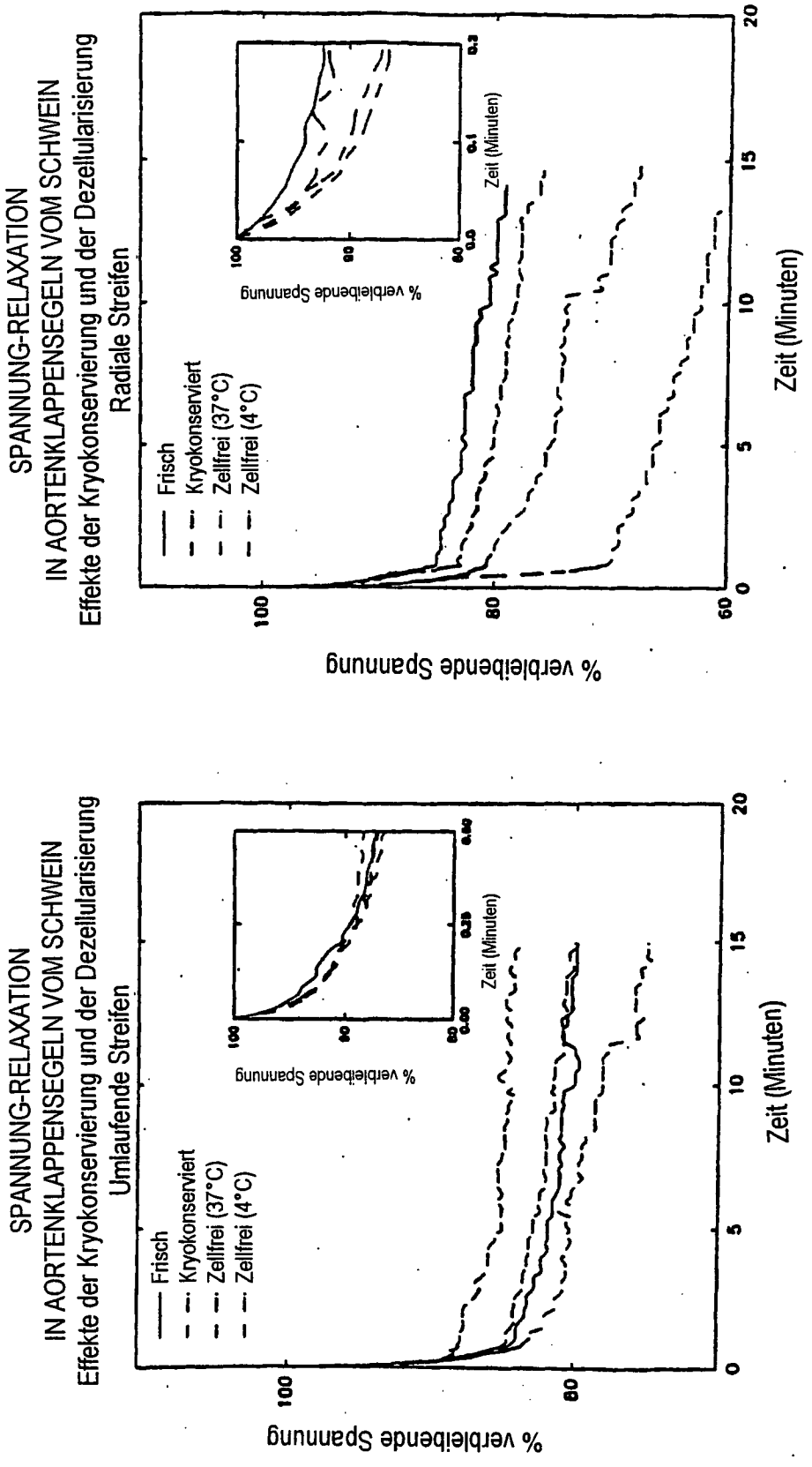
SPANNUNG-RELAXATION
IN AORTENKLAPPENSEGELN VOM SCHWEIN
Effekte der Kryokonservierung und der Dezellularisierung
Radiale Streifen
Frisch
Kryokonserviert
Zellfrei (37°C)
Zellfrei (4°C)
% verbleibende Spannung
Zeit (Minuten)
SPANNUNG-RELAXATION
IN AORTENKLAPPENSEGELN VOM SCHWEIN
Effekte der Kryokonservierung und der Dezellularisierung
Umlaufende Streifen
Frisch
Kryokonserviert
Zellfrei (37°C)
Zellfrei (4°C)
% verbleibende Spannung
Zeit (Minuten)

Abbildung 10

ZUGSPANNUNGSBRUCH-DATEN FÜR AORTENKLAPPENSEGEL VOM SCHWEIN
EFFEKTE DER KRYOKONSERVIERUNG UND DER DEZELLULARISIERUNG

Umlaufende Streifen

	FRISCH	KRYO-KONSERVIERT	ZELLFREI (37°C)	ZELLFREI (4°C)
Gewebsmodul	43,8 ± 8,3	35,8 ± 7,0[a]	58,3 ± 7,6[a]	46,0 ± 8,2[a]
Reissfestigkeit	7,4 ± 1,6	5,9 ± 1,1[a]	10,7 ± 1,3[a]	9,1 ± 1,5[a]
Zähigkeit (Rückprallelastizität)	1,6 ± 0,3	1,5 ± 0,4[a]	2,5 ± 0,5[a]	2,6 ± 0,6[a]
Bruchdehnung %	43,7 ± 4,5	44,2 ± 7,3[a]	57,7 ± 8,1[a]	67,5 ± 5,0[a]

Einheiten in MN/m^2. Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts. n, Frisch (8), kryokonserviert (8), zellfrei bei 37°C (13) und zellfrei bei 4°C (5). [a] Unterschied nicht signifikant im Vergleich zu frischem Gewebe.

Radiale Streifen

	FRISCH	KRYO-KONSERVIERT	ZELLFREI (37°C)	ZELLFREI (4°C)
Gewebsmodul	4,9 ± 0,4	5,2 ± 0,9[a]	5,1 ± 1,3[a]	7,7 ± 2,9[a]
Reissfestigkeit	0,9 ± 0,07	0,9 ± 0,2[a]	1,2 ± 0,3[a]	1,2 ± 0,2[a]
Zähigkeit (Rückprallelastizität)	0,4 ± 0,03	0,6 ± 0,2[a]	1,5 ± 0,3[b]	0,8 ± 0,1[b]
Bruchdehnung %	117 ± 8,7	96,4 ± 11,5[a]	161 ± 26,4[a]	112 ± 41,9[a]

Einheiten in MN/m^2. Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts. n, Frisch (8), kryokonserviert (5), zellfrei bei 37°C (7) und zellfrei bei 4°C (3). [a] Unterschied nicht signifikant im Vergleich zu frischem Gewebe. [b] Unterschied mit $p < 0,05$ signifikant im Vergleich zu frischem Gewebe.