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

(10) **DE 696 32 313 T2** 2004.09.09

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 810 888 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 32 313.3**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB96/00399**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 903 128.5**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/025961**
(86) PCT-Anmeldetag: **22.02.1996**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **29.08.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.12.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **28.04.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.09.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61L 27/00**
A61L 15/32, A61L 15/40, A61L 31/00

(30) Unionspriorität:
9503492 22.02.1995 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI, NL, SE

(73) Patentinhaber:
Ed. Geistlich Söhne AG für chemische Industrie, Wolhusen, Luzern/Lucerne, CH

(74) Vertreter:
TER MEER STEINMEISTER & Partner GbR Patentanwälte, 33617 Bielefeld

(72) Erfinder:
GEISTLICH, Peter, CH-6362 Stansstad, CH; SPECTOR, Myron-Dep.Orth.Surg.-Brigham Hospita, Boston, US; ECKMAYER, Zdenek, D-69469 Weinheim, DE

(54) Bezeichnung: **DESORBIERBARE EXTRAZELLULÄRE MATRIX FÜR REKONSTRUKTION EINES KNORPELGEWEBES**

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 betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer resorbierbaren extrazellulären Matrix für die Rekonstruktion von Knorpelgewebe, durch dieses Verfahren erhältliche Matrixprodukte und die Verwendung solcher Produkte bei der Herstellung von Implantaten für die gelenkte Regeneration von Gewebe.
[0002] In der Gewebetechnologie hat es sich seit langem als schwierig erwiesen, Knorpelgewebe zu rekonstruieren. Allgemein umfaßt die Rekonstruktion von Gewebe die Bereitstellung einer Matrix, die als eine Führung für Zellen dient, die entlang und zwischen den Fasern der Matrix wachsen. Bisher erforderten es Versuche, Knorpelgewebe unter Verwendung von Matrizen auf der Basis von Poly-Milchsäure, Polyglykolsäure und Collagen I oder III zu rekonstruieren, daß die Matrizen in vitro mit Chondrocyten beladen wurden, bevor die beladene Matrix an einer geeigneter Stelle in vivo implantiert wurde. Es hatte sich nicht als möglich herausgestellt, die Matrizen dieses Typs einfach an der in vivo Stelle zu implantieren und sich auf das Wachstum der körpereigenen Chondrocyten auf der Oberfläche der Matrix zu verlassen. Die Notwendigkeit, die Matrix vor der Implantation in vitro mit Chondrocyten zu beladen, führte zu Komplikationen und Schwierigkeiten hinsichtlich der sterilen Kultur der Chondrocyten.
[0003] Es besteht somit ein Bedarf an einem Matriximplantat für die Rekonstruktion von Knorpelgewebe, das das Wachstum von körpereigenen Chondrocyten nach der Implantation in vivo gestattet. Wir haben nun gefunden, daß diese Anforderungen durch eine Matrix erfüllt werden können, die vorwiegend Fasern aus Collagen II enthält und die hergestellt werden kann, indem Collagen-Gewebe entfettet und anschließend mit einer Base behandelt wird.
[0004] Collagen tritt im tierischen Körper in einer Anzahl von Formen auf, und verschiedene Gewebe enthalten unterschiedliche Anteile der jeweiligen Typen. Während Knochen-Collagen vorwiegend Collagen I und III enthält, enthält Knorpelgewebe vorwiegend Collagen II zusammen mit kleineren Mengen an Collagen VI, IX, X, XI und XIII. Dieses Material unterscheidet sich signifikant von schwammförmigem Collagenmaterial, das in der Medizin und in der Kosmetik verwendet wird und, da es aus Haut und Sehnen gewonnen wird, aus Collagen I und/oder III besteht.
[0005] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung einer resorbierbaren extrazellulären Matrix geschaffen, die vorwiegend Fasern aus Collagen II enthält und zur Rekonstruktion von Knorpelgewebe geeignet ist, wobei dieses Verfahren eine Entfettungsbehandlung von Knorpelgewebe und eine nachfolgende Behandlung mit einer Base umfaßt.
[0006] Die Erfindung zeigt weiterhin eine resorbierbare extrazelluläre Matrix auf, die durch das oben genannte Verfahren erhältlich ist.
[0007] Wie oben angegeben wurde, kann eine solche Matrix kleinere Mengen an Collagen VI, IX, X, XI und XIII enthalten. Es ist wünschenswert, daß die gemäß der Erfindung erhältliche Matrix auch ein hydrogelartiges Material enthält, z. B. Glykosaminoglycane wie etwa Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Dermatansulfat oder Hyaluronsäure, die ein natürliches Medium schaffen, in das Chondrocyten eingebettet werden können, und in dem sie wachsen können. Im allgemeinen enthält die gemäß der Erfindung herstellbare Matrix 0.1 bis 40 Gew.-% Glykosaminoglycan, z. B. 5–55%, z. B. etwa 10 Gew.-%: Weitere Additive wie z. B. Chondronektin oder Anchorin II können zugegeben werden, um die Haftung der Chondrocyten an den Fasern aus Collagen II zu unterstützen.
[0008] Es ist wünschenswert, die Collagen-Matrix in einem gewissen Ausmaß einer Quervernetzung zu unterziehen, um das Ausmaß der Quellung zu begrenzen, wenn die Matrix mit wässrigen Fluiden in Kontakt kommt, während die Resorbierbarkeit der Matrix erhalten wird, da die Quellung zu einem Verlust an Festigkeit und Form führt. Die chemische Quervernetzung kann jedoch physiologische Nachteile mit sich bringen hinsichtlich der Porengröße, die die Eigenschaften des Collagens ungünstig beeinflussen könnte; die Porengröße sollte wahlweise um 40 μm betragen, um die Chemotaxis und andere Funktionen der Zellen zu begünstigen.
[0009] Das Knorpelgewebe, das in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet wird, wird normalerweise aus ohne weiteres verfügbaren tierischen Quellen stammen, etwa von Rindern, Schafen oder Schweinen. Das bevorzugte Material ist hyaliner Knorpel von Schweinen. Dieser enthält die richtigen Typen von Collagen und Glykosaminoglycan in wünschenswerten Proportionen und ist in hinreichend großen Mengen verfügbar.
[0010] Der Knorpel wird vorzugsweise nach der Schlachtung gefroren und einer Größenreduktion unterzogen, z. B. auf einen Partikeldurchmesser von etwa 8 mm. Vor der Größenreduktion wird der Knorpel vorzugsweise in Wasser eingeweicht und mechanisch von Fleisch, Knochen und anderen unerwünschten Materialien getrennt.
[0011] Der partikelförmige Knorpel wird dann vorzugsweise durch Behandlung mit einem mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittel wie etwa Aceton entwässert, was auch dazu dient, gewisse Mengen an Fett zu entfernen. Die Entwässerung führt zu einer Schrumpfung der Collagenfasern und trennt sie voneinander, so daß der anschließende Entfettungsschritt optimiert wird. Das Material wird dann mit einem Fett-Lösemittel wie etwa einem Kohlenwasserstoff (z. B. Hexan) oder einem halogenierten Kohlenwasserstoff entfettet.
[0012] Nach der Entfettung wird das Material vorzugsweise gründlich gewaschen; dies wird vorzugsweise

fortgesetzt, bis so viel Wasser aufgenommen wurde, wie ursprünglich vorhanden war. Durch diese Prozedur wird das Material für die nachfolgende Behandlung mit einer Base optimiert.

[0013] Die Behandlung mit einer Base kann mit einer starken Lauge ausgeführt werden, z. B. einem Alkalimetallhydroxid, z. B. Natriumhydroxid, z. B. in einer Konzentration von 1–8 Gew.-%. Die Behandlungszeit, die je nach Rohmaterial und Alkalikonzentration variieren wird, beträgt allgemein 10–48 Stunden. Die Behandlungstemperatur liegt allgemein unterhalb von 20°C. Der pH-Wert liegt normalerweise im Bereich von 12–14. Die obigen Bedingungen sind diejenigen, die für eine Behandlung mit Natriumhydroxid optimal sind. Die Behandlung mit anderen Basen kann leicht modifizierte Bedingungen erfordern.

[0014] Die Behandlung mit einer Base hat die folgenden Wirkungen:

kleine Mengen an restlichem Fett werden verseift;

die in Laugen löslichen Nicht-Collagen-Proteine werden denaturiert, zerstört, gelöst und beseitigt;

die Amidgruppen im Collagen werden verseift, wodurch sich die elektrische Ladung und der isoelektrische Punkt des Collagens ändern; und

Bakterien, Prione und Viren werden inaktiviert, und das Collagen wird so sterilisiert.

[0015] Es hat sich gezeigt, daß durch diese Behandlung Proteoglykane eine nützliche Modifikation erfahren, die wie folgt beschrieben werden kann: Die kovalente Bindung von Glykosaminoglykanen an dem Kernprotein in Proteoglykanen wird gespalten. Auf diese Weise können die Glykosaminoglykane von dem Protein des Proteoglykans befreit werden. Dies wird β-Elimination genannt.

[0016] Durch die Behandlung mit der Base wird das Kernprotein in kleine Peptide gespalten, die durch Dialyse oder Ultrafiltration aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden. Aufgrund der starken negativen Ladung bilden die Glykosaminoglykane wasserlösliche Salze, die zum Teil von dem Collagen abgewaschen werden können. Diese werden jedoch durch die Behandlung mit der Base nicht oder nur wenig gespalten und können durch Dialyse von den Peptiden getrennt werden. Ein Teil des Glykosaminoglykans (etwa 3 Gew.-% des Collagens) wird an das Collagen gebunden.

[0017] Durch Dialyse oder Ultrafiltration des Extrakts, der in dem Schritt der Behandlung mit einer Base entsteht, können gereinigte Glykosaminoglykane erhalten werden.

[0018] Bei dem Verfahren nach der vorliegenden Erfindung wird in Anbetracht der vorhandenen Varietät an unterschiedlichen Substanzen im allgemeinen keine enzymatische Behandlung eingesetzt. Weitere wahlfreie Schritte umfassen jedoch die Behandlung des Materials mit einer organischen oder anorganischen Säure wie etwa Salzsäure. Dies hat die folgenden WIrkungen:

unerwünschte säureempfindliche Materialien werden entfernt; und

die Faserstruktur wird gelockert.

[0019] Anschließend kann das Material gewaschen werden, im allgemeinen bis der pH-Wert des Materials zwischen 2,5 und 4,0 liegt. Der pH-Wert des Materials wird vorzugsweise genau kontrolliert und sollte über den Querschnitt des Knorpels einheitlich sein.

[0020] Nach einer solchen Säurebehandlung befindet sich der Knorpel in einem durch Wasser aufgequollenen Zustand und kann einer mechanischen Größenreduktion unterzogen werden, z. B. mit Hilfe einer Colloidmühle. Die Konzentration des Collagens in dem wässrigen Medium beträgt dann etwa 2,5–3,5 Gew.-%. Der pH-Wert dieses Gemisches sollte etwas sauer sein, z. B. 3,5–4,5.

[0021] An diesem Punkt kann Glykosaminoglykan zu der gereinigten Collagenmasse zugegeben werden, z. B. im Bereich von 0.1–40 Gew.-%, vorzugsweise 5– 15 Gew.-% des Collagens.

[0022] Bei diesem zu dem Collagen zugegebenen Glykosaminoglykan handelt es sich vorzugsweise um dasjenige, das aus dem natürlichen Knorpel extrahiert wurde, wie oben im Zusammenhang mit der Basenbehandlung beschrieben wurde; eine solche Verwendung von Glykosaminoglykan aus Knorpel ist bevorzugt gegenüber der Einbringung von Glykosaminoglykanen aus anderen Quellen, die nicht die gleiche Zusammensetzung, das gleiche Molekulargewicht und die gleichen physiologischen Eigenschaften haben wie die Glykosaminoglykane aus Knorpel. Die Matrix enthält dann neben Collagen II die Glykosaminoglykane Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Keratansulfat. Das Chondroitinsulfat und das Keratansulfat sind kovalent an das Kernprotein gebunden, während die Hyaluronsäure zwar auch an das Proteoglycan gebunden ist, jedoch nicht kovalent. Durch die Wirkung der Base wird die Bindung an das Kernprotein gespalten, und das Glykosaminoglykan wird von dem Protein befreit. Außerdem wird das Kernprotein in kleine Peptide gespalten, die sich durch Dialyse oder Ultrafiltration leicht entfernen lassen. Es ist wichtig, daß das Kernprotein entfernt wird, weil dieses immunologisch aktiv sein könnte. Die Möglichkeit, daß Kernprotein zu entfernen, ist somit ein wichtiger Vorteil des Verfahrens nach der vorliegenden Erfindung.

[0023] Die Rückgewinnung der Glykosaminoglykane aus dem Basenextrakt kann wie folgt bewirkt werden:

das Medium wird auf einen pH-Wert im Bereich von 6–8 neutralisiert;

die Nicht-Collagen-Proteine werden durch Behandlung mit einem Adsorbens wie etwa Kaolin entfernt;

die Flüssigkeit wird ultrafiltriert unter Verwendung einer Membran, die den Durchtritt von Molekülen mit einem Gewicht von weniger 10 000 Dalton zuläßt;

die Flüssigkeit wird zu einem Feststoffgehalt von etwa 2–5 Gew.-% aufkonzentriet.

[0024] Nach dem Mischen des Glykosaminoglykans mit dem Collagen II wird das Material vorzugsweise in einer Kolloidmühle weiter homogenisiert, und der Feststoffgehalt wird auf 1,5–2,5 Gew.-% eingestellt. Diese Masse kann dann für die Herstellung von zwei Typen von Produkten dienen, nämlich einem Schwamm oder einem Collagenblatt.

[0025] Für die Herstellung eines Schwammes wird die durch Homogenisierung erhaltene Masse gefroren. Das Gefrieren muß präzise gesteuert werden, wobei die Gefrierzeit, der pH-Wert und die Partikelgröße exakt eingehalten werden, damit man eine reproduzierbare Porengröße erhält. Das gefrorene Produkt wird dann gefriergetrocknet. Nach dem Gefriertrocknen wird der Schwamm wenigstens zwei Stunden lang auf 120–140°C erhitzt. Auf diese Weise wird das Material durch leichte Quervernetzung stabilisiert. Nach dem Gefriertrocknen wird das Material auf eine gewünschte Dicke geschnitten, in die gewünschte Form gepreßt, sterilisiert und verpackt.

[0026] Da die Verwendung von Schwämmen infolge unzureichender Festigkeit für den Einsatz in gewissen Bereichen begrenzt ist, kann die gemäß der Erfindung herstellbare Collagenmatrix vorteilhaft für die Herstellung von Collagenblättern verwendet werden, die für den Einsatz in einem weitem Bereich von medizinischen Indikationen geeignet sind.

[0027] Für die Herstellung von Collagenblättern sollte die Konzentration von gereinigten Fasern aus Collagen II in der flüssigen Suspension im Bereich von 0,2 –3 Gew.-%, vorteilhaft im Bereich von 0,5–2 Gew.-% liegen. Die Luft wird vorzugsweise entfernt.

[0028] Als ein Zwischenschritt wird dann ein Gel gebildet. Die Herstellung des Gels aus Collagen kann mit verschiedenen Techniken erfolgen, die für die Gelbildung bekannt sind.

[0029] Das Gel wird dann getrocknet, normalerweise auf einer Platte. Auf diese Weise wird nicht nur das Wasser entfernt, sondern es werden auch unlösliche Collagen-Glykosaminoglykan-Produkte gebildet, die für das Wachstum der Zellen sehr hilfreich sind.

[0030] Für jedes der obigen Produkte kann die gemäß der Erfindung herstellbare Matrix mit aktiven Substanzen angereichert werden. So können irgendwelche physiologisch aktiven Substanzen verwendet werden, die in Wasser löslich oder in Wasser dispergierbar sind. Somit kann die Matrix vorteilhaft medizinische Substanzen enthalten, wie etwa antibakterielle Mittel, z. B. Taurolidin, oder Antibiotika wie etwa Tetracycline und Gentamyzine.

[0031] Die Erfindung zeigt auch die Verwendung einer gemäß der Erfindung herstellbaren Matrix bei der Herstellung eines Implantats für gelenkte Geweberegeneration und bei der Herstellung eines Implantats für den Einsatz in einem Verfahren zur Regeneration von Knorpelgewebe im menschlichen Körper oder in einem nichtmenschlichen Tierkörper. Die nachstehenden Beispiele dienen lediglich zur Illustration:

Beispiel 1

[0032] Gefrorener Knorpel von frisch geschlachteten Schweinen wurde in kaltem Wasser eingeweicht, gründlich durchgewaschen und mechanisch von Fleischresten, Knochen und harten Teilen gesäubert. Anschließend wurde das Material 30 Minuten lang unter fließendem Wasser gewaschen.

[0033] Danach wurde das Material drei mal in einem Homogenisierer gemahlen. Die optimale Partikelgröße am Ende der Größenreduktion betrug etwa 8 mm.

[0034] Die Knorpelstücke wurden entwässert durch viermaliges Waschen mit Azeton, jeweils 8 Stunden lang. Der Knorpel wurde dann entfettet durch viermalige Extraktion mit n-Hexan. Jede Behandlung dauerte zumindest 8 Stunden. Das Verhältnis von Hexan zu Knorpel betrug 1 : 10.

[0035] Nach dem Entfetten ließ man den Knorpel in Trinkwasser aufgellen. Das Verhältnis Wasser : Material betrug 10 : 1. Die Behandlungszeit betrug 24 Stunden.

[0036] Das Material wurde dann mit NaOH (5 Gew.-%) behandelt, wobei das Verhältnis von Knorpel zu Flüssigkeit 1 : 4 betrug und die Behandlungszeit 32 Stunden betrug. Während der Behandlung wurden die Knorpelstücke gut gerührt. Anschließend wurde die Lauge vom Knorpel abgewaschen. Der ursprüngliche pH-Wert von 14 wurde dadurch auf 9–11 verringert. Die gelösten Verunreinigungen wurden ausgewaschen und vom Knorpel getrennt. Die aus der Basenbehandlung erhaltene Flüssigkeit wurde für die Rückgewinnung von Glykosaminoglykan gesammelt.

[0037] Das Collagenmaterial wurde dann mit starker Salzsäure (etwa 3 Gew.-%) behandelt, anfänglich bei einem pH-Wert von unter 1,0. Die Behandlungszeit betrug 4–6 Stunden.

[0038] Anschließend wurde das Material mit kaltem Wasser lange genug gewaschen, damit der pH-Wert auf 3–3,5 anstieg. Alle Verunreinigungen wurden entfernt, und das Produkt war eine salzfreie Collagenmasse, geeignet für die Herstellung eines Schwammes oder eines anderen Collagenmaterials. Zu diesem Zweck kann die Knorpelmasse je nach beabsichtigtem Ergebnis entgast, gefroren und gefriergetrocknet werden.

Beispiel 2

[0039] Der durch die Behandlung mit einer Base im Beispiel 1 erhaltene Extrakt enthielt Glykosaminoglykan, Lauge, denaturierte Proteine und Salze. Der Extrakt wurde zunächst mit HCl neutralisiert, wobei der pH-Wert nach der Neutralisierung 6 betrug. Der Extrakt wurde dann mit einem Filterungsmittel behandelt, nämlich mit Kieselgur, was die Wirkung hatte, daß die denaturierten Proteine entfernt wurden. 0,5 Gew.-% Kieselgur wurden zu dem Extrakt zugegeben und durch Filtration zusammen mit dem denaturierten Protein entfernt.
[0040] Der Überstand wurde dann einer Ultrafiltration unterzogen, unter Verwendung einer Membran mit einer Molkulargewichtsschranke von etwa 10 000 Dalton. Auf diese Weise wurden Salze entfernt, so daß gereinigtes Glykosaminoglykan übrig blieb.
[0041] Die so erhaltene Lösung von Glykosaminoglykan wurde mit dem Collagenmaterial von oben gemischt, um eine Matrix aus Collagen II zu schaffen, die Glykosaminoglykan enthielt.

Beispiel 3

(1) Bestimmung von Hexosamin und Aminosäureresten in Schwämmen und Vliesen aus Collagen

[0042] Jede Probe, exakt abgewogen (etwa 10 mg), wurde 15 oder 20 Stunden lang bei 1,05°C in einem versiegelten Rohr unter gereinigtem Stickstoff in 10 ml 3 M oder 6 M HCl hydrolisiert. Nach dem Kühlen des Rohres in einem Kühlschrank und Öffnen des Rohres wurde der Inhalt in einen 25 ml Kolben mit langem Hals überführt und bei 40°C in einen Vakuum-Rotationstrockner (Rotavapor RE 120, Büchi, Schweiz) unter Wasserstrahl-Vakuum getrocknet. Nach dem Auflösen des Rückstands in 5 ml Wasser wurde der Rückstand wieder unter Wasserstrahl-Vakuum getrocknet. Danach wurde der Rückstand in 5 ml Ladepuffer (0,2 M relativ zu Na^+) bei pH 2,2 aufgenommen. Zur Bestimmung der Glykosamin- und Galaktosamin-Werte wurden nach vorheriger Auflösung eines Aliquots mit Ladepuffer (1 + 10) 150 µl der in 3 M HCl hydrolisierten Probe in die Kartusche eines Aminosäure-Analysierers (AlphaPlus, Typ 4151, Pharmacia-LKB, Freiburg) injiziert und durch Vergleich mit einem Standard mit Hilfe eines Computers (Shimadzu, Düsseldorf) evaluiert. Dieselbe Prozedur wurde mit der in 6 M HCl hydrolisierten Probe durchgeführt, wobei 50 µm in eine weitere Testkartusche injiziert wurden. Die zweifache Hydrolyse in 3 M und 6 M HCl ist notwendig für die Optimierung der Hexosamin- und Aminosäure-Analyse, da die Maximalwerte für Hexosamin und auch Tyrosin nur nach Hydrolyse in 3 M HCl erhalten werden, während Maximalwerte für Valin, Isoleucin und Leucin nur nach Hydrolyse in 6 M HCl erhalten werden.

2. Bestimmung des Gehalts an körpereigenem Collagen in Collagenschwämen und Vliesen

[0043] 25–30 mg (exakt abgewogen) der Probe wurden in 30 ml 0,1 M Natriumhydrogenkarbonatlösung (pA, Merck, Darmstadt) pH 8,2 gegeben zu der 1,5 ml einer 6 mg/ml Trypsinlösung (lyophilierte Zubereitung aus Rinderpankreas, Böhringer, Mannheim), und 8 Stunden lang bei 23 ± 1°C in einem gerüttelten Wasserbad (Julabo SWI, Seelbach) inkubiert. Nach Abkühlen der Probe in einem kalten Raum auf 4°C wurde sie 30 Minuten lang bei 4°C in einem 60 Ti-Rotor (Beckmann, München) bei 32 000 min^{-1} zentrifugiert. Der Rückstand wurde in einer gerührten Ultrafiltrationszelle (Mod 8010, Amicon, Witten) durch einen Diaflow-Filter PM 10 (Amicon, Witten) mit 25 mm Durchmeser gefiltert, und 1 ml des Filtrats wurde 20 Stunden lang bei 105°C in 6 M HCl hyrolisiert. Die weitere Aufarbeitung und Analyse des Hydrolysats ist identisch mit der oben unter (1) beschriebenen, mit dem Unterschied, daß die weitere Aufnahme der Probe nach zweifacher Verdampfung bis zur Trockenheit in 150 µl Ladepuffer erfolgte, wobei 150 µl in die Testkartusche des Aminosäure-Analysierers injiziert wurden. Der nach der Aminosäure-Analyse erhaltene Hydroxiprolin-Wert (in µmol/g Ausgangssubstanz) repräsentiert den Anteil des abbaubaren Collagens in der Probe. Wenn der Hydroxiprolin-Wert einer parallel hydrolisierten (6 M HCl) und analysierten Probe (siehe oben (1)), der den Gesamtgehalt an Collagen repräsentiert, mit dem Hydroxiprolin-Wert verglichen wird, erhält man den Prozentanteil des körpereigenen ("native"), d. h. nicht mit Trypsin abbaubaren Collagens. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle gezeigt.

Tabelle

	µmol/g	mol/1000 mol
Hydroxiprolin	795,4	97
Aspartansäure	381,7	47
Threonin	190,1	23
Serin	257,0	31
Glumtaminsäure	691,3	84
Prolin	913,2	112
Glyzin	2614,6	320
Alanin	864,9	106
Cystein/2	11,5	2
Valin	195,7	24
Methionin	62,7	8
Isoleucin	92,8	11
Leucin	229,9	28
Tyrosin	27,0	3
Phenylalanin	119,9	15
Histidin	39,8	5
Hydroxilysin	126,4	15
Lysin	173,5	21
Arginin	395,5	48
Gesamt	**8182,9**	**1000**
Glukosamin	9,68	1,18
Galaktosamin	46,30	5,66

Gesamtgehalt Hydroxiprolin	795,4 µmol/g
Trpypsin-abbaubares Hydroxiprolin	36,9 µmol/g

Gehalt an "natürlichem" Collagen 95,4 %

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung einer resorbierbaren extrazellulären Matrix, die vorwiegend Fasern aus Collagen II enthält und zur Rekonstruktion von Knorpelgewebe geeignet ist, welches Verfahren eine Entfettungsbehandlung von Knorpelgewebe einschließt, gefolgt von einer Behandlung mit einer Base.

2. Verfahren nach Anspruch 1, mit dem weiteren Schritt der Zugabe von 0,1–40 Gewichtsprozent, z. B. 5–15 Gewichtsprozent, eines Glycosaminoglycans zu der Matrix.

3. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem das Glycosaminoglycan Chondroitinsulfat, Keratansulfat, Dermatansulfat oder Hyaluronsäure ist.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, mit dem weiteren Schritt der Zugabe von Chondronectin und/oder Anchorin II zu der Matrix.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, bei dem das Collagen einer Quervernetzung unterzogen wird, ohne daß es nicht-resorbierbar wird.

6. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem das Knorpelgewebe von natürlichem Knorpel abgeleitet ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, bei dem das Knorpelgewebe von Rindern, Schafen oder Schweinen stammt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, bei dem das Knorpelgewebe hyaliner Knorpel von Schweinen ist.

9. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, bei dem das Knorpelgewebe mit einem Fett-Lösungsmittel entfettet wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, bei dem das Fett-Lösungsmittel ein Kohlenwasserstoff oder ein halogenierter Kohlenwasserstoff ist.

11. Verfahren nach Anspruch 10, bei dem das Fett-Lösungsmittel Hexan ist.

12. Resorbierbare extrazelluläre Matrix, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11.

13. Verwendung einer Matrix nach Anspruch 12 bei der Herstellung eines gelenkten Geweberegenerationsimplantats.

14. Verwendung einer Matrix nach Anspruch 12 bei der Herstellung eines Implantats für den Gebrauch in einem Verfahren zur Regeneration von Knorpelgewebe im menschlichen Körper oder im nichtmenschlichen Tierkörper.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen