



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 32 079 T2** 2008.12.18

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 272 127 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 32 079.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/09079**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 922 531.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/072241**

(86) PCT-Anmeldetag: **22.03.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **04.10.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.01.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **26.12.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **18.12.2008**

(51) Int Cl.⁸: **A61F 2/08** (2006.01)

C12N 5/06 (2006.01)

D02G 3/44 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

191999 P 24.03.2000 US

(73) Patentinhaber:

Drexel University, Philadelphia, Pa., US

(74) Vertreter:

Berendt und Kollegen, 81667 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**LAURENCIN, Cato T., Elkins Park, PA 19027-3032,
US; KO, Frank K., Philadelphia, PA 19124-1741,
US; COOPER, James A., Philadelphia, PA
19150-2002, US; LU, Helen H., New York, New York
10069, US; ATTAWIA, Mohamed A., Canton, MA
02021, US**

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Herstellung eines Ersatzkonstrukts für Ligamente**

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

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Fasertechnologien, um nützliche Matrizen in der Gewebetechnik zu gestalten. Insbesondere wird ein brauchbares Ersatzkonstrukt für ein humanes vorderes Kreuzband (ACL) bereitgestellt. Dieses Ersatzkonstrukt besteht aus einem abbaubaren, porösen, auf Polymer-Fasern basierenden dreidimensionalen umspinnenen Gerüst, das unter Verwendung einer dreidimensionalen Spinntechnik gebildet wird, wobei die dreidimensional Spinntechnik ein Vierschrittverfahren umfaßt, für das ein Spur- und Säulenverfahren verwendet wird. Für die biologische Verträglichkeit dieses Ersatzkonstrukts, das mit der auf Gewebetechnik-basierenden Gestaltung verbunden ist, wird angenommen, das sie die Heilung und Reparatur von beschädigtem ACL fördert.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Bei der orthopädischen Rekonstruktion ersetzen Chirurgen häufig beschädigtes Gewebe, das von einem Trauma, einer pathologischen Degeneration oder einer kongenitalen Fehlbildung mit autogenen Transplantaten herrührt (Langer, R. und Vacanti, J. P. Science 1993, 260: 929).

[0003] Rekonstruktive Chirurgie basiert auf dem Prinzip des Ersatzes dieser Arten an gestörtem Gewebe mit brauchbaren funktionsfähigen Alternativen. Die Transplantation von Knochen bei der skeletalen Rekonstruktion wurde zu einer üblichen Maßnahme der orthopädischen Chirurgie mit über 863200 Transplantationsverfahren, die jedes Jahr in den USA durchgeführt werden. Bei Knorpelersatz werden über 1.000.000 Verfahren der verschiedenen Arten jedes Jahr durchgeführt und bei Ligamentreparaturen werden ungefähr 90.000 Verfahren pro Jahr durchgeführt (Langer, R. und Vacanti, J. P. Science 1993, 260: 920). Derzeitige Autotransplantate (Friedman et al. Clin. Ortho. 1985, 196: 9; Jackson et al. Amer. J. Sports Med. 1990, 18: 1) (Gewebe wurde dem Patienten entnommen) und Allotransplantate (Gaszag et al. J. Amer. Acad. Ortho. Surg. 1995, 3: 1; Shino et al. J. Bone and Joint Surg. 1988, 70(11): 556; Jackson et al. Arthroscopy 1994 10: 442) (Gewebe wurde einem Kadaver entnommen) sind die häufigsten üblichen Ersatzquellen für die Behandlung von muskuloskeletalen Problemen. Bei der Reparatur von vorderen Kreuzbandbeschädigungen wurde häufig ein Segment der Patellasehne verwendet (Jackson et al. Amer. J. Sports Med. 1990, 18: 1). Für Knorpel- und Knochenreparatur wurde die autogene Transplantation zur häufigsten Behandlung der Wahl.

[0004] Dennoch sind verschiedene Probleme mit diesen Behandlungen verbunden. Zum Beispiel sind

bei autogenem Gewebe die entscheidenden Beschränkungen die Morbidität der Spenderseite, bei der das verbleibende Gewebe an der Entnahmestelle durch die Entfernung des Transplantats beschädigt wird und die beschränkte Menge an Gewebe, das für die Entnahme verfügbar ist. Die Verwendung von Allotransplantaten macht den Versuch, diese Probleme zu erleichtern. Dennoch wird dieser Typ an Transplantat häufig vom Wirtskörper infolge der Immunantwort gegenüber dem Gewebe abgestoßen. Allotransplantate sind auch zur Übertragung von Krankheiten in der Lage. Obwohl ein gründliches Screeningverfahren die meisten Krankheiten, die das Gewebe aufweist, eliminiert, ist dieses Verfahren nicht zu 100% wirksam.

[0005] Als ein Ergebnis der Beschränkungen mit herkömmlichen wiederherstellenden Transplantationsmaterialien haben die Chirurgen nach synthetischen Alternativen gesucht.

[0006] Synthetische ACL-Transplantate oder Transplantatträgermaterialien schließen Kohlenstofffasern, Leeds-Keio-Ligamente (Polyethylenterephthalat), die Gore-Tex-Prothese (Polytetrafluorethylen), die Stryker-Dacron-Ligament-Prothese, die aus Dacronbändern hergestellt wird, die von einer Dacronhülse umwickelt sind und die Gore-Tex Ligament-Vergrößerungs-Vorrichtung (LAD), die aus Polypropylen hergestellt wird, ein. Diese Transplantate weisen gute Kurzzeitergebnisse auf, stoßen aber in klinischen Langzeitstudien auf Schwierigkeiten. Einschränkungen dieser synthetischen Transplantate schließen die Dehnung des Ersatzmaterials, schwache mechanische Festigkeit verglichen mit der Originalstruktur und -fragmentation des Ersatzmaterials während der Beanspruchung ein.

[0007] Das ideale ACL-Ersatzmaterial ist biologisch abbaubar, porös, biologisch verträglich, weist eine ausreichende mechanische Festigkeit auf und fördert die Bildung von Ligamentgewebe.

[0008] Viele Forscher haben potentielle ACL-Konstrukte offenbart, die Kollagenfasern, biologisch abbaubare Polymere und deren Verbundstoffe einschließen. Zum Beispiel wurde ein Kollagengerüst für die ACL-Rekonstruktion, das mit Fibroblasten aus ACL und Haut beimpft wurde, beschrieben (Dunn et al. The Tissue Engineering Approach to Ligament Reconstruction. Material Research Society Symposium Proceedings 331, 13-18, 1994, Boston, Materials Research Society; Bellincampi et al. J. Orthop. Res. 1998, 16: 414-420). Die WO 95/2550 offenbart ebenfalls eine prothetische Vorrichtung für die Ligamentreparatur, die ein Arrangement an Kollagenfasern umfaßt.

[0009] Ein biologisch-gestaltetes Ligamentmodell, das sich von den anderen Ligamentmodellen durch

die Zugabe von ACL-Fibroblasten zu der Struktur, in Abwesenheit eines quernetzenden Mittels und der Verwendung von Knochendübeln, um das biologisch-gestaltete Gewebe zu verankern, unterscheidet, wurde auch beschrieben (Goulet et al. Tendons and Ligaments. In R. P. Lanza, R. Langer and W. L. Chick (eds.), Principles of Tissue Engineering, pp. 639–645, R. G. Landes Company and Academic Press Inc. 1997).

[0010] Das US-Patent Nr. 5 376 118 beschreibt ein Trägermaterial, das aus einem semiabsorbierbaren Verbundgarn hergestellt wird, das ein nicht-absorptionsfähiges, elastisches Kerngarn und ein absorptionsfähiges, relativ unelastisches Hüllgarn umfaßt.

[0011] Das US-Patent Nr. 4 792 336 offenbart eine Vorrichtung mit einer absorptionsfähigen Komponente, die eine Glykol- oder Milchsäureesterbindung umfaßt. Die Vorrichtung umfaßt eine Vielzahl an Fasern, die die absorptionsfähige Komponente umfassen, die als eine ebenes Geflecht bei der Reparatur des Ligaments oder Sehne verwendet werden kann.

[0012] Die WO 97/4547 offenbart ein resorbierendes Biomaterial zur Implantation beim Menschen und anderen Wesen umfassend amorphes oder kristallines kondensiertes Calciumphosphat der allgemeinen Formel: $[\text{Ca}(\text{PO}_3)_2]_n$, wobei n gleich 3 oder größer ist und das molare Verhältnis von Ca:P zwischen 0,4 und 0,6 liegt.

[0013] Die WO 95/10810 beschreibt eine implantationsfähige Prothese umfassend ein biologisch verträgliches, synthetisches im wesentlichen bioabsorptionsfähiges Matrixmaterial, das mit Fibroblastenzellen beimpft wurde.

Zusammenfassung der Erfindung

[0014] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung eines Ersatzkonstrukts für Ligamente bereitgestellt, wobei das Ersatzkonstrukt aus einem abbaubaren, porösen, auf Polymer-Fasern basierenden, dreidimensionalen umspinnenen Gerüst, das unter Verwendung einer dreidimensionalen textilen Spinntechnik gebildet wird, besteht, gekennzeichnet dadurch, daß die dreidimensionale Spinntechnik eine Vierschrittverfahren umfaßt, für das ein Spur- und Säulenverfahren verwendet wird.

[0015] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird das Ersatzkonstrukt mit Zellen beimpft, deren Einwachsen durch das Gerüst unterstützt wird. Vorzugsweise sind die Zellen Wirtszellen (host cells) aus dem vorderen Kreuzband.

[0016] Vorzugsweise ist das Ersatzkonstrukt zur Implantation bei einem Menschen konfiguriert, um ein

beschädigtes Ligament zu reparieren.

[0017] Gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung eines Transplantationsmaterials bereitgestellt, das aus lebenden Zellen in einer abbaubaren Matrix besteht, umfassend:

- (a) Ernten, Wachsen und Passagieren von Zellen in Gewebekultur; und
- (b) Aussäen der kultivierten Zellen auf einem abbaubaren, auf Polymer-Fasern basierenden, dreidimensionalen gesponnenen Gerüst, wie oben beschrieben.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0018] Es sollte erwähnt werden, das der Schutzbereich der in den Ansprüchen definierte ist.

[0019] Die vorliegende Erfindung betrifft einen Ansatz zur Gewebereparatur, der auf den Prinzipien der Verwendung von bioresorbierbaren Gerüsten basiert, die als Matrice für die Geweberegeneration dienen. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung abbaubare Gerüste und insbesondere polymere, faserbasierende dreidimensionale (3-D) umspinnene Gerüste.

[0020] Faserbasierende umspinnene Gerüste der vorliegenden Erfindung werden mit Mikrofaser-Vliesstoff-Matrizen für Gewebeersatzanwendungen verglichen.

[0021] Eine Elektrospinnntechnik wurde verwendet, um die Mikrofaser-Vliesstoff-Matrizen herzustellen. Die Grundlage dieser Technik ist die Erzeugung einer elektrischen Feldes zwischen einer entgegengesetzt geladenen Polymerflüssigkeit und einem Sammel-sieb. Eine Polymerlösung wird in eine Glasspritze mit einer Kapillarspitze gegeben.

[0022] Eine Elektrode wird in der Lösung plaziert, die eine Verbindung mit einem Kupfersieb hergestellt. Wenn die Antriebskraft erhöht wird, wird die Polymerlösung elektrisch geladen und wird von dem Sieb angezogen. Wenn die Spannung einen kritischen Wert erreicht, überwindet die Ladung die Oberflächenspannung der Tropfen und ein Strom an Mikrofasern ist hergestellt. Wenn sich die geladenen Fasern ausdehnen, verdampft das Lösungsmittel schnell und die Fasern akkumulieren zufällig auf der Oberfläche des Sammel-siebs. Dieses Ergebnis führt zu einem Vliesstoffnetz aus mikroschuppigen Fasern. Der Faserdurchmesser und die Netzdicke können durch eine Vielzahl von verschiedenen Parametern einschließlich der Lösungsviskosität, der Spannung, dem Abstand zwischen Sieb und Spitze und der Dauer des Elektrospinnvorgangs kontrolliert werden.

[0023] Die 3-D-gesponnenen Gerüste der vorliegenden Erfindung werden durch eine Textilspinntechnik, die als ein Vierschrittverfahren bekannt ist, hergestellt, bei der ein Spur- und Spinnverfahren verwendet wird, um die Fasermatrix herzustellen. Die Vierschrittspinnrüstung besteht aus genuteten Spuren, wo Garnspulen und Garnträger lokalisiert sind. Die Bewegung der Garnspulen und Träger innerhalb der Spuren wird verwendet, um vertikale Spalten in der 3-D-Struktur zu erzeugen. Alternierende Reihen und Spalten der Träger in dem Spinnmuster werden verschoben, um das 3-D-Geflecht zu erzeugen. Die geometrischen Parameter, die die Gestalt und Faserarchitektur des 3-D-Geflechts bestimmen, schließen Spinnwinkelverteilung, Garnvolumenanteile, Anzahl der Träger und Spinngarnbreite ein. Dieses höchst vielfältige System ermöglicht die Bildung einer Vielzahl von 3-D-gesponnenen Strukturen mit unterschiedlichem Aufbau und mechanischen Eigenschaften.

[0024] Basierend auf diesen Fasertechnologien wurde ein Mikrofaser-Vliesstoff-Netz und zwei rechtwinkelige 3-D-Geflechte für Zellkulturexperimente hergestellt.

[0025] In diesen Experimenten wurde die Antwort von Zellen gegenüber hierarchischen Strukturen der auf zwei Fasern-basierenden Matrizen verglichen. Insbesondere wurde die Fähigkeit dieser Matrizen bestimmt, um als zelluläres Gerüst zu dienen, wozu Osteoblasten und Fibroblasten in einer in vitro Umgebung verwendet wurden.

[0026] Zuerst wurde Elektronenmikroskopie der drei Matrixstrukturen durchgeführt. Schwache Vergrößerungsbilder zeigten die Basismatrixstrukturen und -organisation. Die SEM-Analyse der Mikrofasermatrix zeigte eine hoch poröse, fibröse Struktur, die sich aus der zufälligen Anordnung der Fasern ergibt. PLA-GA [50:50]-Fasern dehnen sich mit einem Durchmesser von ungefähr 2 bis 7 μm aus. Abbildungen der 3-D-gesponnenen Matrizen zeigten eine hoch organisierte fibröse Struktur, die sich aus dem 3-D-Spinnverfahren ergibt. Die Unterschiede in der Anzahl der Fasern/Fäden sind klar aus diesen beiden Strukturen ersichtlich. Geflecht #1, das aus einem 30-Garn mit 30 Fasern/Fäden hergestellt wurde, hatte ein individuelleres Geflecht über die Struktur als das Geflecht #2-Matrix, die aus 60-Garn mit 60 Fasern/Fäden hergestellt wurde. Diese Strukturen können der Packungsdichte der Fasern zugeordnet werden. Mit halb so vielen Fasern pro Garn war das 30-Garn des Geflechts #1 in der Lage, eine dichter gepackte Struktur mit einer Spinneneinheit, die kleiner als die der 60-Garnmatrix ist, zu schaffen. Die SEM-Abschätzung dieser Strukturen deutete darauf hin, daß alle Matrizen, die die strukturellen Eigenschaften entwickelt hatten, diese benötigten, um als zelluläres Gerüst zu funktionieren.

[0027] Dennoch machen die Ergebnisse der in vitro Untersuchungen deutlich, daß die zelluläre Antwort von der Matrixstruktur abhängig ist. Sowohl Fibroblasten als auch Osteoblasten hatten die gleiche Morphologie auf der Mikrofaser-Vliesstoff-Matrix. Nach einem Tag in Kultur auf der Mikrofasermatrix sahen die Zellen spindelförmig aus und zeigten sich auf der Oberfläche verteilt. Schwache cytoplasmatische Projektionen wurden beobachtet, die sich vom Zellkörper zu der Oberfläche der Matrix ausdehnen. Dennoch machte die SEM in keiner der Proben eine Mikrofaserstruktur ungeachtet des Zeitpunkts deutlich. Weil nur 50000 Zellen auf einer 1 cm^2 Matrix platziert wurden, wird angenommen, daß die Zellen vollständig über der Oberfläche verteilt waren, die die Mikrofaserstruktur undurchsichtig machen. Die spindelförmige Morphologie, die nach einem Tag beobachtet wurde, ist ein Hinweis auf die anfängliche Anheftung und nicht die Bildung einer zellulären Monoschicht.

[0028] Es wurde auch eine Abbaustudie durchgeführt, um beliebige Änderungen der Matrixstruktur infolge des Abbaus in dem Gewebezellmedium zu bestimmen. Diese Studie macht deutlich, daß die Matrix schnell in dem Zellkulturmedium abgebaut wird. Es wird angenommen, daß die Einwirkung von DMEM das Aufquellen und die Aggregation der Mikrofasern bewirkt. Das Aufquellen war in einigen Proben so signifikant, daß die Struktur fast vollständig ihre Porosität verloren hatte. Daher ändert dieser Abbau die Matrix während der Dauer der Zellkulturuntersuchung von einer porösen Mikrofasermatrix zu einer nicht-porösen Masse an Polymer.

[0029] Im Gegensatz zu der Mikrofasermatrix unterscheidet sich die Zellmorphologie des 3-D-Geflechts zwischen Osteoblasten und Fibroblasten. Über die Dauer des 2-wöchigen Experiments folgten beide Zelltypen der charakteristischen Sequenz von Abläufen, die Zellanheftung, Verteilung und Proliferation beschreiben. Dennoch unterscheidet sich die Rate mit der diese Abläufe für Osteoblasten und Fibroblasten vorkommen. Des weiteren scheint die zelluläre Anheftung mit Osteoblasten stärker betont zu sein als mit Fibroblasten. Zum Beispiel zeigten nach einem Tag Zellkultur auf 3-D-Geflecht #1 die Osteoblasten eine signifikante Verbreitung über die Oberfläche und die Bildung einer zellulären Schicht. Zum Vergleich behielten an Tag 1 die Fibroblasten noch eine spindelförmige Morphologiecharakteristik des anfänglichen Anheftens. Zusätzlich hatten sich die Fibroblasten entlang der Länge der Fasern organisiert. Die Zellen schienen, als hätten sie sich zusammen entlang der Rinne gruppiert, die durch zwei benachbarte Fasern erzeugt wurde.

[0030] Daher spielen, wie durch die zelluläre Antwort demonstriert wird, die in diesen Experimenten beobachtet wurde, hierarchische Strukturen in der zellulären Morphologie und Organisation eine wichti-

ge Rolle. Zellen antworten dynamisch auf die Änderungen der Struktur der schnell abbaubaren Matrix, die Vliestoffmikrofasern umfaßt. Die Zellen organisierten sich nicht auf solch einer Struktur und die Morphologie der spezifischen Zellarten war ähnlich. Demgegenüber organisierten sich in langsam abbaubaren Faserstrukturen des 3-D-Geflechts die Fibroblasten entlang der Länge der Fasern und die Oestoblasten zeigten eine merklich unterschiedliche Morphologie als die Fibroblasten.

[0031] Demgemäß weist die Verwendung der Faserstechnologie bei der Gewebegestaltung etliche Vorteile gegenüber einer Zahl von nicht-fibrösen 3-D-Strukturen auf. Wichtig ist die Fähigkeit in hohem Maß eine strukturelle Organisation der Matrix zu verleihen, um die genaue Kontrolle der Matrixstruktur zu ermöglichen. Die 3-D-gesponnenen und ungewebte Matrizen sind im Bereich der 3-D-Faserarchitektur beispielhaft, die erzeugt und produziert werden können. Die gesponnene Matrix besteht aus hoch organisierten PLAGA-Fäden, die in 3-D-Struktur verwoben sind. Obwohl die ungewebte Matrix das Ergebnis von zufällig orientierten Mikrofasern ist, ist die Struktur höchst einheitlich. Daher ist sowohl die Vierschritt-3-D-Spinn-Technik als auch des Elektrospinnverfahren nützliche Herstellungsverfahren, die höchste Niveaus an Einsatzflexibilität für verschiedene Gewebegestaltungsanwendungen zeigen. Die Fähigkeit zur Herstellung einer Vielzahl von unterschiedlichen Matrizen und die Erhaltung der genauen Kontrolle über die Matrizenherstellung sind extrem wichtige Faktoren bei der Erzeugung von gewebegeplanten Gerüsten.

[0032] Zum Beispiel enthält das menschliche Knie große Ligamente, wie das vordere Kreuzband (ACL), das das Femur mit der Tibia verbindet und an der motorischen Kontrolle beteiligt ist, wobei es als Stabilisator der Bewegungsverbindung wirkt. ACL ist das häufigste Ersatzligament des Knies, bei über 250000 Patienten wird eine ACL-Verletzung jedes Jahr diagnostiziert. Dieser Typ an Verletzung kommt oft während des Sports und körperlicher Übungen vor und führt häufig zu Behinderungen, die permanent und behindernd für den Patienten sind.

[0033] Es wird angenommen, daß die 3-D-gesponnenen Gerüste insbesondere nützlich als Ersatzkonstrukte für Ligamente, wie das ACL-Ligament im menschlichen Knie sind, da diese Gerüste abbaubar, porös, biologisch verträglich, eine ausreichende Festigkeit aufweisen und die Bildung von Ligamentgewebe fördern. Die faserbasierte Gestaltung des Geflechts ahmt das natürliche Ligament nach und die gesponnene Struktur bietet mechanische Festigkeit sowie die benötigte Porosität für das Anheften und Einwachsen der Zelle. Während PLAGA-Fasern für die gesponnenen Gerüste, die hier in den Experimenten beschrieben werden, verwendet werden, können

abbaubare Polymerfasern, die auf Poly(hydroxy)estern basieren, einschließlich aber nicht beschränkt auf Polylactic, Polyglykol und deren Copolymere, verwendet werden.

[0034] Um die Auswahl an Polymerfasern, die für das Spinnen der 3-D-Konstrukte für den ACL-Ersatz verwendet werden können, zu unterstützen, wurden die Abbaueigenschaften der drei Arten an Polymerfaserbündeln und der Effekt des Abbaus der langfristigen mechanischen Eigenschaften dieser Polymere untersucht. Die drei untersuchten Polymere waren Multifilamentfasern von L-Polylactid (PLA, 70 Denier), Polyglykolid (PGA, 60 Denier) und deren 82:18 Copolymer (PLAGA, 70 Denier), die zu 10 Multifaserbündeln zusammengeschnürt waren. Die Massenretention und die mechanischen Eigenschaften aller Polymere nahmen mit ansteigender Eintauchzeit sowohl in Phosphat-gepuffertem Salz (PBS) und dem Zellkulturmedium (α NEM) ab. Dennoch zeigten die PGA-Bündel den schnellsten Verlust an Festigkeit, Masse und Fadenintegrität und dieses Polymer war nach 2 Wochen stark abgebaut und zu kleinen Fasern zerbrochen. PLA- und PLAGA-Bündel wurden langsamer abgebaut, was sich in der Abnahme ihrer mechanischen Festigkeit, Massenretention und Molekulargewicht wiederspiegelte. Nach 4 Wochen erhielt PGA eine höhere maximale Zugbelastung als PLAGA aufrecht. Es wurde gefunden, daß die Polymermassenretention abhängig ist von Änderungen der mechanischen Festigkeit und des Molekulargewichts.

[0035] Das Molekulargewicht von PLAGA nahm auf die Hälfte seines Ursprungswertes nach 2 Wochen Eintauchen in α NEM ab, was zu schnell ist, damit die Ligamentheilung stattfindet. Wenn die Polymere abgebaut werden, nimmt der pH-Wert von PBS ab, weil saure Abbauprodukte freigesetzt werden. Während eine anfängliche Abnahme des pH-Wertes in α NEM gemessen wurde, kehrt die Lösung später zu Kontrollwerten zurück. Dies ist wahrscheinlich auf die Proteinabsorption und das höhere Pufferpotential von α NEM zurückzuführen, was eine realistischere Lösung wiedergibt, in der der Polymerabbau in vivo modelliert wird.

[0036] Daher hat, basierend auf den Untersuchungen der Änderungen des Molekulargewichts, der mechanischen Festigkeit und der Massenretention, wenn das Polymer abgebaut wird, PLA (im Vergleich mit PLAGA 82:18 oder PGA) besondere Vorteile bei der Verwendung als gesponnene gewebegeplanten 3-D-ACL-Ersatzkonstrukte der vorliegenden Erfindung. Infolge seines beschleunigten Abbaus und Verlusts an mechanischen Eigenschaften ist PGA allein nicht für den ACL-Ersatz geeignet.

[0037] Mechanische Tests können verwendet werden, um das Spannungs-Dehnungs-Verhältnis des fi-

brösen 3-D-Konstrukts zu charakterisieren. Es wird angenommen, daß ähnliche Spannungs-Dehnungs-Verhältnisse gegenüber Kaninchen-ACL mit einem hierarchischen Design unter Verwendung von 3-D-Geflechten einer Faser basierend auf einem absorbierbaren Gerüst gestaltet werden kann. Demgemäß kann eine Struktur erzeugt werden, die ein Kaninchenligament modelliert. Dieses synthetische Ligament sollte eine Gesamtzuglänge von 1 cm haben. Mechanische Tests werden vorzugsweise mit einer Probenanzahl von 6 für jeden einzelnen Test durchgeführt.

[0038] Zugtests werden vorzugsweise bei Dehnungsraten von 0,01%/s, 2,2%/s und 50%/s durchgeführt, weil dies hilft, zu bestimmen, ob das Material abhängig von der Dehnungsrate ist. Es ist bevorzugt, daß eine Probengröße von 18 getestet wird, wie von der Food and Drug Administration vorgeschlagen wird (Guidance Document for the Preparation of Investigational Device Exemptions and Premarket Approval Applications for Intra-Articular Prosthetic Knee Ligament Devices, 1987).

[0039] Das gesponnene Konstrukt kann aus drei Regionen zusammengesetzt sein, mit zwei Endabschnitten, die für die Befestigung des Konstrukts an die Femur und Tibia gestaltet sind und der mittleren Region, die als Ersatz-ACL dient. In diesem Beispiel unterscheidet sich die mittlere Region von den beiden Endregionen in der Größe, dem Spinnwinkel, der Porosität und der mechanischen Festigkeit. Die Länge und Breite des Ersatzkonstrukts kann, wie benötigt, maßgeschneidert werden.

[0040] Zur ACL-Reparatur und -rekonstruktion werden die 3-D-umspunnenen Gerüste mit ACL-Wirtszellen beimpft. Die ACL-Wirtszellen werden zuerst geerntet, wachsen gelassen und in Gewebekulturen passagiert. Mit diesen kultivierten Zellen wird dann das 3-D-umspunnenen Gerüst beimpft, um Transplantationsmaterial zu erzeugen, das aus lebenden Zellen und abbaubarer Matrix zusammengesetzt ist. Dieses Transplantationsmaterial kann dann durch einen chirurgischen Eingriff bei einem Patienten an der Stelle der Ligamentverletzung implantiert werden, um die Heilung und Reparatur der beschädigten ACL zu fördern. Zusätzliche Vorteile der gesponnenen Struktur schließen ihre leichte Handhabung bei der Implantation ein, verglichen mit dem den aus dem Stand der Technik bekannten Konstrukten, die aus Faserbündeln hergestellt werden.

[0041] Es wurden die Gestaltungsparameter, wie Polymerzusammensetzung und die Antwort von primären ACL-Zellen gegenüber dem 3-D-umspunnenen Konstrukten bestimmt. Für Fibronectin (FN), eines der am meisten vorhandenen extrazellulären Adhäsionsproteine, die im Körper gefunden werden, wird angenommen, daß es während der Ligamentbildung

hoch dosiert ist. Demgemäß werden bei diesen Experimenten die Konstrukte mit FN vorbeschichtet, um die anfängliche Zelladhäsion zu verstärken. Das Anheften und das Wachstum von ACL-Zellen auf drei Arten der abbaubaren Polymere mit verschiedenen Porositäten wurde bestimmt.

[0042] Die Porosität des Gerüsts lag im Bereich von 54% bis 63%, mit PLA-Konstrukt mit einer Porosität von $53,5 \pm 6,9\%$, mit PGA mit einer Porosität von $63,3\% \pm 7,3\%$ und PLAGA-Konstrukten mit einer durchschnittlichen Porosität von $62,9\% \pm 3,6\%$. Der durchschnittliche Porendurchmesser war zwischen PLAGA- und PLA-Konstrukten (235–250 μm) ähnlich, aber für PGA am kleinsten (177 μm).

[0043] Primäre ACL-Ligament-ähnliche Zellen zeigten eine semi-eiförmige, fibroblasten-ähnliche Morphologie und wenn sie konfluent waren, bildeten sie mehrfach haufenförmige Kulturen mit besonderen Wachstumsorientierungen. Zellwachstum und Morphologie waren abhängig von der Polymerzusammensetzung und Porosität. Extensive Zellschichten wurden bei allen drei Polymertypen beobachtet, aber die Morphologie und Zellausdehnung waren bei PLA-GA- bis PLA-Gerüsten unterschiedlich. Die Zellausdehnung war bei PLAGA geringer, während die Oberfläche sowohl von PGA als auch PLA glatter war und weniger zelluläre Bündel hatte. Quantitatives zelluläres Wachstum ($n = 4$) wurde auch bei höheren Zellzahlen bei PLAGA und PLA erreicht, wenn sie mit PGA verglichen wurden. Die Vorbeschichtung des Konstrukts mit Fibronectin führte zu einem Anstieg bei der Proliferation, was sich in der schnellen Abnahme des Lösungs-pH-Wertes widerspiegelte, wenn sie mit nicht beschichteten Konstrukten und Kontrollzellen oder Fibronectin verglichen wurden. Es ist möglich, daß Fibronectin die anfängliche Zellzahl ansteigen läßt, die sich an das Konstrukt anheften und demgemäß das Zellwachstum und den Metabolismus in Langzeitkulturen ansteigen läßt. Deshalb ist die ACL-zelluläre Antwort von der Polymerzusammensetzung und der Porosität abhängig. Des weiteren läßt die Vorbeschichtung der Konstrukte mit Fibronectin das Zellanheften und das Wachstum auf diesen Gerüsten ansteigen.

[0044] Die folgenden nicht beschränkenden Beispiele werden bereitgestellt, um die vorliegende Erfindung weiter zu veranschaulichen.

Beispiele

Beispiel 1: Mikrofaser Matrizen

[0045] Es wurde eine Elektrospinntechnik verwendet, um biologisch abbaubare Vliesstoff-Fasergerüste mit einer ungefähren Dicke von 0,5 mm herzustellen. Bei diesem Verfahren wurde PLAGA (50:50) in Methylenchlorid gelöst, um eine 1:4 Gewicht:Volu-

men-Lösung zu erzeugen. Bei dem Elektrospleinverfahren wurde ein elektrisches Potential von 20 kV an die Polymerlösung und ein Sammelsieb angelegt, um eine elektrische Feld zu erzeugen. Die Polymerlösung wurde dann auf das Sammelsieb für 30 Minuten gesprüht. Dies führte zu einer einheitlichen Vliesstoff-Mikrofasermatrix, die an dem Sieb befestigt war. Die Matrix wurde entfernt und in 1 cm² große Stücke geschnitten.

Beispiel 2: 3-dimensionales Fasergeflecht

[0046] Dreidimensionale fibröse Matrizen wurden unter Verwendung eines 3-D-Spleinverfahrens hergestellt, wie von Ko, F. R. in *Textile Structural Composites*, eds. Chou, T. W. and Ko, F. K. (Elsevier, Amsterdam, 1989) beschrieben. Bei diesem Verfahren werden PLAGA-Fasern (5:95 PLAGA) gebündelt, um Garne mit einer Faserdichte von 30 und 60 Fasern pro Faden herzustellen. Die Fäden werden dann in einem gewöhnlich gebauten Spleinwebstuhl mit einem 6 an 12 Trägerarrangement platziert. Sequentielle Bewegung der Träger [alternierende Reihen und Spalten] führte zu der Bildung von zwei rechteckigen 3-D-Geflechten: einem 30-Faden-Geflecht [Geflecht #1] und einem 60-Faden-Geflecht [Geflecht #2].

Beispiel 3: In vitro Zellkultur

[0047] Die Matrizen wurden in einer 2-wöchigen Zellkulturuntersuchung abgeschätzt, wobei Fibroblasten und primäre Osteoblasten in Kultur verwendet wurden. Alle Matrizen wurden mit UV für 24 Stunden pro Seite vor der Zellkultur sterilisiert. Primäre Osteoblasten in Kultur, die aus neugeborenen Rattencalvaria isoliert wurden, wurden bis zur Konfluenz in Ham's F-12-Medium (Gibco), ergänzt mit 12% fötalem Rinderserum (PBS) (Sigma) wachsen gelassen, wie von Jarcho, M. Clin. Ortho. 1981, 157; 259, beschrieben. Mausfibroblastzellen (BALG/C C7 bezogen von ATTC: Arlington Virginia) wurden bis zur Konfluenz in DMEM, ergänzt mit 10% FBS wachsen gelassen. UV sterilisierte Matrizen wurden mit Zellen mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Matrix beimpft. Zellen wurden auf den Matrizen für 1, 3, 7, 10 und 14 Tage kultiviert und in DMEM (10% FBS) gehalten. Zu den verschiedenen Zeitpunkten wurden Zellen mit Glutaraldehyd fixiert und mit einer Reihe von Ethanolverdünnungen dehydriert. Proben zur Rasterelektronenmikroskopie (SEM) wurden mit Gold sputterbeschichtet (Denton Desk-1 Sputter Coater). Matrix und zelluläre Struktur wurden mit SEM (Array 300) bei einer Beschleunigungsspannung von 20 kV sichtbar gemacht.

Beispiel 4: Abbaueigenschaften von verschiedenen Polymeren

[0048] Multifilamentfasern von L-Polylactid (PLA, 70 Denier), Polyglykolid (PGA, 60 Denier) und deren

82:18 Copolymer (PLAGA, 70 Denier) wurden in 10 Multifaserbündel gebündelt, um für Abbaustudien verwendet zu werden. Die Bündel wurden auf eine Länge von 6 cm geschnitten und mit 70% Alkohol und anschließender UV-Bestrahlung sterilisiert. Die Polymerbündel wurden in 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, pH = 7,3) und in 10 ml Kulturmedium (α MEM, pH = 7,3) ergänzt mit 10% fötalem Rinderserum, L-Glutamin und 1% Antibiotika getaucht. Die Proben wurden geschüttelt und bei 37°C im Wasserbad für bis zu 3 Wochen gehalten. Die Eintauchverhältnisse für beide Lösungen waren, wie folgt, PLA bei 0,6 mg/ml, PLAGA bei 0,8 mg/ml und PGA bei 0,7 mg/ml. Die Lösungen wurden wöchentlich ausgetauscht und nach 1, 2, 3 und 4 Wochen wurden der pH-Wert (n = 8) gemessen und die Menge an Monomer in der Lösung wurden durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen.

[0049] Nach 2 und 4 Wochen nach dem Eintauchen wurden das Molekulargewicht, die Massenretention und die mechanischen Eigenschaften der Bündel (n = 5) bestimmt. Abbaubezogene morphologische Änderungen wurden mit Rasterelektronenmikroskopie bestimmt. Für die Massenretentionsmessungen wurden die Bündel gespült und für 24 Stunden lyophilisiert. Das Trockengewicht wurde aufgenommen (n = 4) und die gleiche Probe wurde für die Bestimmung des Molekulargewichts verwendet. Molekulargewichte (n = 3) für PLA und PLAGA (82:18) wurden mit Gelpermeationschromatographie in Tetrahydrofuran mit Polystyrolstandards gemessen. Die mechanischen Eigenschaften des Garns unter Spannung wurden mit einer Instron-Vorrichtung (Modell 4442, Instron Inc., MA) mit einer 500 N Belastungszelle (Zuglänge = 3 cm) mit einer Dehnungsrate von 2% pro Sekunde getestet.

Beispiel 5: Wirkung des Polymerkonstrukts auf die Morphologie und das Wachstum von vorderen Kreuzbandzellen

[0050] Fibröse Gerüste wurden unter Verwendung des in Beispiel 2 beschriebenen 3-D-Spleinverfahrens hergestellt. Fasern von L-Polylactid (PLA, 70 Denier), Polyglykolid (PGA, 60 Denier) und deren 82:18 Copolymer (PLAGA, 70 Denier) wurden in 10 Multifaserbündel gebündelt und diese Garne wurden dann unter Verwendung einer 3-D-zirkulären Spleinmaschine gesponnen. Zirkuläre 3-D-Geflechte mit 24 Fäden wurden gebildet und auf eine Länge von 1,5 cm für diese Experimente geschnitten. Dacron-Konstrukte wurden ähnlich hergestellt und als Kontrollen verwendet.

[0051] Die Porosität, der Porendurchmesser und die Gesamtporenfläche dieser Konstrukte wurden unter Verwendung des Autopore III Porosimeter (Micromeritics) bestimmt. Rasterelektronenmikroskopie (SEM) wurden verwendet, um die Porenverteilung

lung zu bestätigen und die Porengeometrie zu untersuchen. Die Proben wurden vor der Kultivierung UV-sterilisiert. Die Konstrukte wurden jeweils mit rekonstituiertem humanen Fibronektin (10 µg/ml) für 30 Minuten beschichtet.

[0052] Primäre ACL-Zellen wurden aus 1 kg weißen Neuseeland-Kaninchen isoliert. Die herausgeschnittenen ACL wurden mit einer 0,1%igen Kollagenasolösung verdaut und nur Zellen, die aus der vierten Verdauung gesammelt wurden, wurden für die Untersuchung ausgewählt. Zellen wurden in α MEM + 10% fötalem Rinderserum, L-Glutamin und 1% Antibiotika bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Gerüst wird mit ACL-Zellen mit einer Dichte von 80000 Zellen/Gerüst beimpft und bis zu 28 Tage wachsen gelassen. Gewebekulturplastik und Dacron dienten als Kontrollgruppen. Das Medium wurden alle zwei Tage ausgetauscht und zu jedem Zeitpunkt wurde der pH-Wert gemessen. Das Zellwachstum wurde unter Verwendung des Zelltiter-96-Assays bestimmt. Die Zellmorphologie und -wachstum auf dem Gerüst wurden mit SEM-Anwendung sichtbar gemacht.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung eines Ersatzkonstrukts für Ligamente, das Ersatzkonstrukt besteht aus einem abbaubaren, porösen, auf Polymer-Fasern basierenden, dreidimensionalen umspinnenen Gerüst, das unter Verwendung einer dreidimensionalen textilen Spinntechnik gebildet wird, gekennzeichnet dadurch, daß die dreidimensionale Spinntechnik ein Vierschrittverfahren umfaßt, für das ein Spur- und Säulenverfahren verwendet wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem das Ersatzkonstrukt mit Zellen beimpft ist, deren Einwachsen durch das Gerüst unterstützt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem die Zellen Wirtszellen (host cells) aus dem vorderen Kreuzband sind.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, das zur Implantation in einem Menschen konfiguriert wird, um ein beschädigtes Ligament zu reparieren.

5. Verfahren zur Herstellung eines Transplantationsmaterials, das aus lebenden Zellen in einer abbaubaren Matrix besteht, umfassend:

(a) Ernten, Wachsen und Passagieren von Zellen in Gewebekultur; und

(b) Aussäen der kultivierten Zellen auf einem abbaubaren, auf Polymer-Fasern basierenden, dreidimensionalen gesponnenen Gerüst, das nach dem Verfahren nach Anspruch 1 hergestellt wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen