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

(10) **DE 694 33 920 T2** 2005.06.02

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 696 201 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 920.2**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/02708**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 910 927.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 94/020133**
(86) PCT-Anmeldetag: **14.03.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **15.09.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.02.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **28.07.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.06.2005**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 38/48**
A61K 38/43, A61K 38/08, A61K 38/28, C07K 7/00, A61P 17/02, A61P 31/00, A61P 35/00, A61P 9/00

(30) Unionspriorität:
31164 **12.03.1993** **US**

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

(73) Patentinhaber:
American National Red Cross, Washington, D.C., US; Loyola University of Chicago, Chicago, Ill., US; The Government of the United States of America as represented by the Secretary of the Army, Frederick, Md., US

(74) Vertreter:
Becker, Kurig, Straus, 80336 München

(72) Erfinder:
NUNEZ, A., Hernan, Derwood, US; DROHAN, Nash, William, Springfield, US; BURGESS, Hales, Wilson, Gaithersburg, US; GREISLER, Howard P., Chicago, US; HOLLINGER, Jeffrey O., Gibsonia, Pa., US; LASA, I., Carlos, Germantown, US; MACIAG, Thomas, Rockville, US; MACPHEE, Martin James, Gaithersburg, US; LIAU, Gene, Darnestown, Md., US

(54) Bezeichnung: **SUPPLEMENTIERTE VERDICHTUNGSMITTEL FÜR GEWEBE, METHODEN FÜR IHRE HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG**

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 Erfindung betrifft supplementierte TSs (Versiegelungsmittel für Gewebe, TS), wie beispielsweise Fibrinkleber (FG), sowie Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung. In einer Ausführungsform betrifft die Erfindung TSs, die keine Vollhautwundheilung inhibieren. Die Erfindung betrifft TSs, die mit einem Arzneimittel(n) supplementiert sind, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung. Das besondere Arzneimittel (die besonderen Arzneimittel), die ausgewählt werden, sind eine Funktion seiner Verwendung.

Hintergrund der Erfindung

A. Wundheilung und Wachstumsfaktoren

[0002] Wundheilung, die Reparatur von Läsionen, beginnt meist unmittelbar nach der Verletzung. Sie erfordert die aufeinanderfolgende koordinierte Funktion einer Vielfalt von Zellen und die genaue Regulierung von Abbau- und Regenerationsschritten. Die Proliferation, Differenzierung und Wanderung von Zellen sind wichtige biologische Prozesse, die einer Wundheilung zugrunde liegen, die ebenfalls Fibringerinnselbildung, Resorption des Gerinnsels, Gewebe-Remodellierung, wie beispielsweise Fibrose, Endothelialisierung und Epithelialisierung involviert. Wundheilung involviert die Bildung hoch vaskularisierten Gewebes, das zahlreiche Kapillaren, viele aktive Fibroblasten, und reichlich Kollagenfibrillen umfasst, aber nicht die Bildung von besonders entwickelten Hautstrukturen.

[0003] Der Wundheilungsprozess kann durch Thromboplastin initiiert werden, das aus verletzten Zellen ausströmt. Thromboplastin kontaktiert Plasmafaktor VII, um Faktor X Aktivator zu bilden, der dann mit Faktor V und in einem Komplex mit Phospholipiden und Calcium Prothrombin in Thrombin umwandelt. Thrombin katalysiert die Freisetzung von Fibrinopeptiden A und B aus Fibrinogen, um Fibrinmonomere zu erzeugen, die zur Bildung von Fibrinfilamenten aggregieren. Thrombin aktiviert ebenfalls die Transglutaminase, Faktor XIIIa, der die Bildung von Isopeptidbindungen katalysiert, um die Fibrinfilamente kovalent zu vernetzen. Alpha$_2$-Antiplasmin wird dann durch Faktor XIII auf die Fibrinfilamente gebunden, um dadurch die Filamente vor Abbau durch Plasmin zu schützen (siehe, zum Beispiel. Doolittle et al., Ann Rev. Biochem. 53: 195–229 (1984)).

[0004] Wenn ein Gewebe verletzt wird, werden Polypeptidwachstumsfaktoren, die eine Reihe von biologischen Aktivitäten zeigen, in die Wunde ausgeschüttet, wo sie eine entscheidende Rolle bei der Heilung spielen (siehe, z. B., Hormonal Proteins and Peptides, Li, C.H., Ed., Band 7, Academic Press, Inc. New York, Seiten 231–277 und Brunt et al, Biotechnology 6:25–30 (1988)). Diese Aktivitäten umfassen Rekrutieren von Zellen, wie beispielsweise Leukozyten und Fibroblasten, in den verletzten Bereich und Induzieren von Zellproliferation und – differenzierung. Wachstumsfaktoren, die an der Wundheilung teilnehmen, umfassen: Plättchenwachstumsfaktoren (PDGFs); Insulinbindungswachstumsfaktor-1 (IGF-1); Insulinbindungswachstumsfaktor-2 (IGF-2); epidermalen Wachstumsfaktor (EGF); Transformationswachstumsfaktor-α (TGF-α); Transformationswachstumsfaktor-β (TGF-β); Plättchenfaktor 4 (PF-4), und Heparinbindungswachstumsfaktor eins und zwei (HBGF-1 bzw. HBGF-2).

[0005] PDGFs werden in den alpha-Granula von zirkulierenden Plättchen gespeichert und werden an Wundstellen während der Blutgerinnung ausgeschüttet (siehe, z. B., Lynch et al., J. Clin. Invest. 84:640–646 (1989)). PDGFs umfassen: PDGF; Plättchenangiogenesefaktor (PDAF); TGF-β; und PF-4, der ein Chemotaktin für neutrophile Zellen ist (Knighton et al., in Growth Factors and Other Aspects of Wound Healing: Biological and Clinical Implications, Alan R. Liss, Inc., New York, New York, Seiten 319–329 (1988)). PDGF ist ein Mitogen, Chemotaktin und Stimulans der Proteinsynthese in Zellen von mesenchymalem Ursprung, einschließlich Fibroblasten und glatten Muskelzellen. PDGF ist ebenfalls ein nichtmitogenes Chemotaktin für Endothelzellen (siehe, zum Beispiel, Adelmann-Grill et al., Eur. J. Cell Biol. 51:322–326 (1990)).

[0006] IGF-1 wirkt in Kombination mit PDGF, um Mitogenese und Proteinsythese in Mesenchymzellen in Kultur zu fördern. Das Ausbringen von entweder PDGF oder IGF-1 alleine auf Hautwunden verbessert nicht die Heilung, aber Aufbringen von beiden Faktoren zusammen scheint Bindegewebe- und Epithelialgewebewachstum zu fördern. (Lynch et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 76:1279–1283 (1987)).

[0007] TGF-β ist ein Chemotaktin für Makrophagen und Monozyten. In Abhängigkeit des Vorliegens oder der Abwesenheit anderer Wachstumsfaktoren kann TGF-β das Wachstum vieler Zelltypen stimulieren oder inhibieren. Wenn TGF-β, zum Beispiel in vivo aufgebracht wird, steigert er die Zugfestigkeit von heilenden Dermal-

wunden. TGF-β inhiniert ebenfalls Endothelzellenmitose und stimuliert Kollagen- und Glycosaminoglycansynthese durch Fibroblasten.

[0008] Andere Wachstumsfaktoren, wie EGF, TGF-α, die HBGFs und Osteogenin sind ebenfalls bei der Wundheilung wichtig. EGF, der in Magensekreten oder Speichel gefunden wird, und TGF-α, der sowohl von normalen als auch von umgewandelten Zellen hergestellt wird, sind strukturell verwandt und können die gleichen Rezeptoren erkennen, die Zellproliferation auf Epithelzellen weitergeben. Beide Faktoren beschleunigen die Reepithelialisierung von Hautwunden. Exogenes EGF fördert die Wundheilung durch Stimulieren der Proliferation von Keratinozyten und dermalen Fibroblasten (Nanney et al., J. Invest. Dermatol. 83: 385–393 (1984) und Coffey et al., Nature 328:817–820 (1987)). Topische Anwendung von EGD beschleunigt die Heilungsgeschwindigkeit von Teilhautwunden in Menschen (Schultz et al., Science 235: 350-352 (1987)). Osteogenin, das aus demineralisiertem Knochen aufgereinigt wurde, scheint Knochenwachstum zu fördern. (siehe, zum Beispiel, Luyten et al., J. Biol. Chem. 264:13377 (1989)). Zudem wurde eine Plättchenwundheilungsformulierung, ein Plättchenextrakt beschrieben, das zur topischen Anwendung in der Form einer Salbe oder Unguentum dient (siehe, z. B., Knighton et al., Ann. Surg. 204: 322–330 (1986)).

[0009] Die Heparinbindungswachstumsfaktoren (HBGFs), die ebenfalls als Fibroblastwachstumsfaktoren (FGFs) bekannt sind, die saures HBGF (aHBGF, das ebenfalls als HBFG-1 oder FGF-1 bekannt ist) und basisches HBGF (bHBGF, das ebenfalls als HBGF-2 bekannt ist) umfassen, sind potente Mitogene für Zellen mesodermaler und neuroektodermaler Abstammung, einschließlich Endothelzellen (siehe, r. B., Burgess et al., Ann. Rev. Biochem. 58:575–606 (1989)). Zudem ist HBGF-1 für Endothelzellen und Astrozyten chemotaktisch. Sowohl HBGF-1 als auch HBGF-2 binden an Heparin, das sie vor proteolytischem Abbau schützt. Die Reihe biologischer Aktivitäten, die durch die HBGFs gezeigt werden, legen nahe, dass sie eine wichtige Rolle bei der Wundheilung spielen.

[0010] Basischer Fibroblastwachstumsfaktor (FGF-2) ist ein potentes Stimulans der Angiogenese und der Wanderung und Proliferation von Fibroblasten (siehe, zum Beispiel, Gospodarowicz et al., Mol. Cell. Endocinol. 46: 187–204 (1986) und Gospodarowicz et al., Endo. Rev. 8: 95–114 (1985)). Es wurde gezeigt, dass saurer Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF-1) ein potenter angiogenetischer Faktor für Endothelzellen ist (Burgess et al., vorstehend,1989). Es wurde jedoch nicht nachwiesen, ob irgendein FGF Wachstumsfaktor für Fibroblasten chemotaktisch ist.

[0011] Wachstumsfaktoren sind deshalb möglicherweise nützlich, um insbesondere eine Wundheilung und Gewebereparatur zu fördern. Ihre Verwendung zur Förderung von Wundheilung hat jedoch inkonsistente Resultate ergeben (siehe, z. B., Carter et al., in Growth Factors and Other Aspects of Wound Healing: Biological and Clinical Implications, Alan R. Liss, Inc., New York, New York, Seiten 303–317 (1988)). Zum Beispiel wiesen PDGF, IGF-1, EGF, TGF-α, TGF-β und FGF (das ebenfalls als HBGF bekannt ist), die separat auf standardisierte Hautwunden in Schweinen aufgetragen wurden, wenig Wirkung auf die Regeneration von Bindegewebe oder Epithelgewebe in den Wunden auf (Lynch et al., J. Clin. Invest. 84: 640–646 (1989)). Von den getesteten Faktoren stimulierte TGF-β alleine die größte Antwort. Eine Kombination von Faktoren, wie beispielsweise PDGF-bb Homodimer und IGF-1 oder TGF-α erzeugten jedoch einen dramatischen Anstieg bei der Bindegeweberegeneration und Epithelialisierung. (Id.) Tsuboi et al. haben berichtet, dass die tägliche Anwendung von bFGF auf eine offene Wunde eine Wundheilung bei durch Wunden geschädigten Mäusen, aber nicht bei normalen Mäusen stimulierte (J. Exp. Med. 172: 245–251 (1990)). Andererseits erhöhte die Anwendung roher Schweine- oder Rinderplättchenlysatpräparate, die vermutlich Wachstumsfaktoren enthielten, auf menschliche Hautwunden die Geschwindigkeit, mit der sich die Wunden schlossen, die Anzahl an Zellen in dem Heilungsbereich, das Wachstum von Blutgefäßen, die Gesamtgeschwindigkeit der Kollagenabscheidung und die Festigkeit des Narbengewebes (Carter et al., vorstehend).

[0012] Die Gründe für solch widersprüchliche Resultate sind nicht bekannt, aber sie könnten das Resultat der Schwierigkeit beim Ausbringen bzw. Anwenden von Wachstumsfaktoren auf eine Wunde in einer Weise sein, in der sie ihr normales Aufgebot an biologischen Aktivitäten zeigen können. Es wird, zum Beispiel, jetzt angenommen, dass einige Wachstumsfaktorrezeptoren wenigstens zwölf Stunden besetzt sein müssen, um eine maximale biologische Wirkung zu erzeugen (Presta et al., Cell Regul. 2: 719–726 (1991) und Rusnati et al., J. Cell Physiol. 154: 152–161 (1993)). Aufgrund solcher widersprüchlicher Resultaten ist die beim Stimulieren von Wundheilung durch exogen angewendete Wachstumsfaktoren gespielte Rolle nicht klar. Weiterhin ist gegenwärtig nicht ein Mittel bekannt, durch das Wachstumsfaktoren auf interne Wunden aufgebracht werden könnten, um einen verlängerten Kontakt zwischen der Wunde und dem bzw. den Wachstumsfaktoren) zu erzeugen.

B. TSs

[0013] Chirurgische Klebstoffe und TSs, die Plasmaproteine enthalten, werden zum Verschließen von inneren und äußeren Wunden, wie beispielsweise in Knochen und Haut, verwendet, um einen Blutverlust zu vermindern und Hämostase zu erhalten. Solche TSs enthalten typischerweise Blutgerinnselfaktoren und andere Blutproteine. FG, das ebenfalls Fibrin-Versiegelungsmittel genannt wird, ist ein Gel, das einem natürlichen Gerinnsel ähnlich ist, das aus Plasma hergestellt wird. Die genauen Komponenten jedes FG sind eine Funktion der besonderen Plasmafraktion, die als Ausgangsmaterial verwendet wird. Das Fraktionieren von Plasmakomponenten kann durch Standard-Proteinreinigungsverfahren, wie Ethanol-, Polyethylenglycol- und Ammoniumsulfat-Fällung, Ionenaustausch, und Gelfiltrationschromatographie durchgeführt werden. Ein FG enthält typischerweise ein Gemisch aus Proteinen, einschließlich Spuren von Albumin, Fibronektin und Plasminogen. In Kanada, Europa und möglicherweise anderswo kann ein kommerziell erhältlicher FG typischerweise ebenfalls Aprotinin als Stabilisierungsmittel enthalten.

[0014] FGs werden im allgemeinen hergestellt aus: (1) einem Fibrinogenkonzentrat, das Fibronektin enthält, Faktor XIII, und von Willebrand-Faktor; (2) getrocknetem Human- oder Rinderthrombin; und (3) Calciumionen. Kommerziell hergestellte FGs enthalten im allgemeinen Rinderkomponenten. Das Fibrinogenkonzentrat kann aus Plasma durch Kryopräzipitation, gefolgt von Fraktionieren, hergestellt werden, um eine Zusammensetzung zu ergeben, die ein Versiegelungsmittel oder ein Gerinnsel beim Mischen mit Thrombin oder einem Thrombinaktivator, wie beispielsweise Calciumionen, bildet. Die Fibrinogen- und Thrombinkonzentrate werden in lyophilisierter Form hergestellt und unmittelbar vor Verwendung mit einer Lösung aus Calciumchlorid, gemischt. Beim Mischen werden die Komponenten auf ein Gewebe aufgebracht, wo sie auf der Gewebeoberfläche koagulieren und ein Gerinnsel bilden, das quer-vernetztes Fibrin einschließt. Faktor XIII, der in dem Fibrinogenkonzentrat vorhanden ist, katalysiert die Quervernetzung.

[0015] Das Australische Patent 75097/87 beschreibt einen Ein-Komponenten Klebstoff, der eine wässerige Lösung aus Fibrinogen, Faktor XIII, einem Thrombininhibitor, wie beispielsweise Antithrombin III, Prothrombinfaktoren, Calciumionen, und gegebenenfalls einem Plasmininhibitor enthält. Stroetmann, US Patent Nrn. 4,427,650 und 4,427,651, beschreibt die Herstellung eines angereicherten Plasmaderivats in der Form eines Pulvers oder versprühbaren Präparats zum verstärkten Wundverschluss und -heilung, das Fibrinogen, Thrombin und/oder Prothrombin, und einen Fibrinolyseinhibitor enthält, und ebenfalls andere Bestandteile, wie beispielsweise ein Plättchenextrakt, enthalten kann. Rose et al., US Patent Nrn. 4,627,879 und 4,928,603 offenbaren Verfahren zur Herstellung von kryopräzipitierten Suspensionen, die Fibrinogen und Faktor XIII enthalten und ihre Verwendung, um einen FG herzustellen. JP-1-99565 beschreibt ein Kit für die Herstellung von Fibrin-Klebstoffen zur Wundheilung. Alterbaum, R. (U.S. Patent Nr. 4,714,457) und Morse et al. (U.S. Patent Nr. 5,030,215) offenbaren Verfahren, um autogene FG herzustellen. Zudem wurden anderswo verbesserte FG-Liefer- bzw. -Abgabesysteme offenbart (Miller et al., U.S. Patent Nr. 4,932,942; Morse et al., PCT Anmeldung WO 91/09641).

[0016] IMMUNO AG (Wien, Österreich) und BEHRINGWERKE AG (Deutschland) (Gibble et al., Transfusion 30: 741–747 (1990)) haben gegenwärtig FGs auf dem Markt in Europa und anderswo (siehe, z. B., U.S. Patent Nrn. 4,377,572 und 4,298,598, die im Besitz von IMMUNO AG sind). TSs sind in den USA nicht kommerziell erhältlich. Das American National Red Cross und BAXTER/HYLAND (Los Angeles, CA) haben kürzlich zusammen einen FG (ARC/BH/FG) entwickelt, der nun in klinischen Untersuchungen ist.

[0017] Die TSs, die außerhalb der USA klinisch verwendet werden, stellen bestimmte klinische Risiken dar und wurden nicht von der Nahrungs- und Medikamentenbehörde in den USA zugelassen. Die in Europa erhältlichen TSs enthalten zum Beispiel Proteine nicht-humanen Ursprungs, wie beispielsweise Aprotinin und Rinderthrombin. Weil diese Proteine nicht-humanen Ursprungs sind, können Leute allergische Reaktionen zu ihnen entwickeln. In Europa wird eine Wärmeinaktivierung verwendet, um Viren zu inaktivieren, die in den Komponenten des FG vorhanden sein können. Dieses Wärmeinaktivierungsverfahren kann jedoch denaturierte Proteine in dem FG erzeugen, die ebenfalls allergen sind. Zudem bestehen Sorgen, dass dieses Inaktivierungsverfahren nicht Prionen inaktivieren wird, die spongiforme Rinderenzephalopathie, „mad cow disease", verursachen, die in dem TS aufgrund der Verwendung von Rinderproteinen darin vorhanden sein können. Weil angenommen wird, dass diese Krankheit bereits vom Schaf, bei dem es „Scrapies" genannt wird, zu Kühen übergewechselt ist, ist es keine unbedeutende Sorge, dass es Menschen infizieren kann.

[0018] Das ARC/BH FG weist gegenüber den in Europa erhältlichen TSs Vorteile auf, weil es keine Rinderproteine enthält. Das ARC/BH TS enthält zum Beispiel Humanthrombin anstelle von Rinderthrombin und enthält kein Aprotinin. Weil das ARC/BH FG keine Rinderproteine enthält, sollte es in Menschen weniger allergen

sein als jene TSs, die in Europa erhältlich sind. Das ARC/BH FG ist zudem durch ein Lösungsmittel-Detergens-Verfahren viral inaktiviert, das weniger denaturierte Proteine erzeugt und folglich weniger allergen ist als jene, die in Europa erhältlich sind. Das ARC/BH FG besitzt deshalb Vorteile gegenüber den TSs, die in anderen Ländern jetzt kommerziell erhältlich sind.

[0019] Ein FG wird hauptsächlich zur klinischen örtlichen Anwendung formuliert und wird verwendet, um Bluten zu kontrollieren bzw.- zu steuern, Hämostase aufrecht zu erhalten, und Wundheilung zu fördern. Die klinischen Verwendungen vom FG wurden kürzlich beschrieben (Gibble et al., Transfusion 30: 741–747 (1990); Lerner et al., J. Surg. Res. 48: 165–181 (1990)). Ein FG verhindert durch Versiegeln Luft oder Fluidlecke, induziert Hämostase und kann zur Wundheilung indirekt durch Reduzieren oder Verhindern von Ereignissen beitragen, die Wundheilung beeinträchtigen, beispielsweise Bluten, Hämatome, Infektionen usw. Obwohl ein FG die Hämostase aufrecht erhält und einen Blutverlust reduziert, wurde bis jetzt jedoch nicht gezeigt, dass er tatsächliche Wundheilungseigenschaften besitzt. Weil ein FG sowohl für innere und äußere Verletzungen, wie beispielsweise Knochen- und Hautverletzungen, geeignet ist und zur Erhaltung von Hämostase nützlich ist, ist es wünschenswert, seine Wundheilungseigenschaften zu verbessern.

[0020] Ein FG mit einer Fibrinogen-Konzentration von etwa 39 g/l und einer Thrombin-Konzentration von 200–600 E/ml erzeugte Gerinnsel mit beträchtlich höherer Festigkeits-, Energieabsorptions- und Elastizitätswerten (Byrne et al., Br. J. Surg. 78: 841–843 (1991)). Perforierte Teflonzylinder, die mit Fibringerinnsel (5 mg/ml) gefüllt sind, und subkutan implantiert sind, stimulierten die Bildung von Granulationsgewebe, einschließlich einer erhöhten Präzipitation von Kollagen, im Vergleich zu leeren Zylindern (Hedelin et al., Eur. Surg. Res. 15: 312 (1983)).

C. Knochenwunden und ihre Reparatur

[0021] Die Folge der Knocheninduktion wurde zuerst von Urist et al. beschrieben, wobei demineralisierte Kortikalismatrix verwendet wurde (Clip. Orthop. Rel. Res. 71: 271 (1990) und Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3511 (1973)). In allogenetische Empfänger subkutan implantierte, demineralisierte Kortikalismatrix setzt Faktoren frei, die als lokale Mitogene wirken, um die Proliferation von Mesenchymzellen zu stimulieren (Rath et al., Nature (Lond.) 278: 855 (1979)). Eine Bildung neuer Knochen trat zwischen 12 und 18 Tagen nach Implantation auf. Knöchelchenentwicklung, reichlich versehen mit hämopoetischer Markabstammung, trat am Tag 21 auf (Reddi, A., In Extracellular Matrix Biochemistry (Piez et al., Ed) Elsevier, New York, NY, Seiten 375–412 (1984)).

[0022] Demineralisierte Knochenmatrix (DBM) ist eine Quelle osteoinduktiver Proteine, die als morphogenetische Knochenproteine (BMP) bekannt sind, und von Wachstumsfaktoren, die die Proliferation von Voläuferknochenzellen modulieren (siehe, z. B., Hauschka et al., J. Biol. Chem. 261: 12665–12674 (1986) und Canilas et al., J. Clin. Invest. 81: 277–281 (1988)). Es wurden jetzt acht BMPs identifiziert und mit BMP-1 bis BMP-8 abgekürzt. BMP-3 bzw. BMP-7 sind ebenfalls als Osteogenin bzw. Osteogenes Protein-1 (OP-1) bekannt.

[0023] Leider weisen DBM-Materialien wenig klinische Verwendung auf, wenn sie nicht mit Teilchenmarkautotransplantaten kombiniert werden. Es gibt eine Grenze für die Quantität an DBM, die in einen Knochen eines Empfängers chirurgisch platziert werden kann, um eine therapeutische Wirkung zu erzeugen. Zudem wurde berichtet, dass eine Resorption wenigstens 49 % beträgt (Toriumi et al., Arch. Otolaryngo. Head Neck Surg. 116: 676–680 (1990)).

[0024] DBM-Pulver und Osteogenin können mit Gewebefluiden weggewaschen werden, bevor ihr osteoinduktives Potential ausgedrückt wird. Zudem sind das Versickern von Gewebefluiden in mit DBM gefüllte Knochenhohlräume oder Weichteilekollaps in das Wundenbett zwei Faktoren, die die osteoinduktiven Eigenschaften von DBM und Osteogenin beträchtlich beeinflussen. Weichteilekollaps in das Wundenbett kann auch die geeignte Wanderung osteofunktionsfähiger Stammzellen in das Wundenbett hemmen.

[0025] Eine humane DBM in Pulverform wird gegenwärtig von amerikanischen Zahnärzten verwendet, um Kieferknochenhohlräume zu füllen, die während Kieferchirurgie erzeugt werden. Es ist jedoch schwierig DBM in Pulverform zu verwenden.

[0026] Gereinigte BMBs weisen osteoinduktive Wirkungen bei Tieren auf, wenn sie von einer Vielfalt von Mittel, einschließlich FG, (Hattori, T., Nippon. Seikeigeka. Gakkai. Zasshi. 64: 824–834 (1990); Kawamura et al., Clin. Orthop. Rel. Res. 235:302–310 (1988); Schlag et al., Clin. Orthop. Rel. Res. 227: 269–285 (1988) und Schwarz et al., Clin. Orthop. Rel. Res. 238: 282–287 (1989)) und Vollblutgerinnsel (Wang et al., J. Cell Bio-

chem. 15F:Q20 Abstract (1990)) zugeführt werden. Schwarz et al. (vorstehend) zeigten jedoch weder eine klare positive oder negative Wirkung von FG auf ektopische Osteoinduktion oder BMP-abhängige Osteoregeneration. Kawamura et al. (vorstehend) hat eine synergistische Wirkung festegestellt, wenn teilweise gereinigte BMP im FG in einer Nicht-Knochen-Stelle getestet wurde. Diese Resultate sind deshalb inkonsistent und verwirrend.

[0027] TS kann ebenfalls als ein „Gerüst" wirken, dessen Zellen verwendet werden, um in einen verwundeten Bereich zur Herstellung neuer Gewebe bewegt zu werden. Kommerziell erhältliche Präparate aus FG und anderen TSs sind jedoch zu dicht, um eine Zellwanderung in und durch sie zu erlauben. Das schränkt ihre Effektivität in einigen in vivo Verwendungen ein.

[0028] In einem Typ von Knochenverletzung, der Knochenpseudoarthrosedefekte genannt wird, gibt es eine minimale Lücke, oberhalb von der keine neue Knochenbildung natürlich auftritt. Die Behandlung für diese Situationen ist klinisch eine Knochentransplantation. Die Quelle von Knochenautotransplantaten ist jedoch gewöhnlich eingeschränkt, und die Verwendung von allogenetischen Knochen involviert ein hohes Risiko viraler Kontamination. Aufgrund dieser Situation ist die Verwendung von demineralisiertem, viral inaktiviertem Knochenpulvers eine attraktive Lösung.

D. Gefäßprothesen

[0029] Künstliche Gefäßprothesen werden häufig aus Polytetrafluorethylen (PTFE) hergestellt und werden verwendet, um kranke Blutgefäße in Menschen und anderen Tieren zu ersetzen. Um die Durchgängigkeitsgeschwindigkeiten zu maximieren und die Thrombogenität dieser Gefäßprothesen zu minimieren, wurden verschiedene Techniken verwendet, einschließlich Ansetzen einer Kultur nichtautogener Endothelzellen auf der Prothese. Verschiedene Substrate, die sowohl an dem Transplantat als auch an Endothelzellen haften, wurden als ein Zwischensubstrat untersucht, um das Ansetzen einer Kultur von Endothelzellen zu steigern. Diese Substrate umfassen vor-koaguliertes Blut (Herring et al., Surgery 84: 498–504 (1978)), FG (Rosenman et al., J. Vasc. Surg. 2: 778–784 (1985); Schrenk et al., Thorac. Cardiovasc. Surg. 35: 6–10 (1986); Kövecker et al., Thorac. Cardiovasc. Surgeon 34: 49–51 (1986) und Zilla et al., Surgery 105: 515–522 (1989)), Fibronectin (siehe, z. B., Kesler et al., J. Vasc. Surg. 3: 58–64 (1986); Macarak et al., J. Cell Physiol. 116: 76–86 (1983) und Ramalanjeona et al., J. Vasc. Surg. 3: 264–272 (1986)), oder Kollagen (Williams et al., J. Surg. Res. 38: 618–629 (1985)). Ein allgemeines Problem bei diesen Techniken ist jedoch, dass nichtautogene Zellen für das Ansetzen einer Kultur verwendet werden, (siehe, z. B. Schrenk et al., vorstehend), folglich wird die Möglichkeit für eine Gewebeabstoßung angehoben. Zudem wird ein zusammenlaufendes Endothelium im allgemeinen niemals errichtet und es erfordert Monate, dies zu tun, wenn es existiert. Als eine Folge dieses Aufschubs existiert eine hohe Okklusionsgeschwindigkeit von Gefäßprothesen (siehe, z. B. Zilla et al., vorstehend).

E. Angiogenese

[0030] Angiogenese ist die Induktion neuer Blutgefäße. Bestimmte Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise HBGF-1 und HBGF-2 sind angiogenetisch. Ihre in vivo Verabreichung, die jedoch gebunden ist an: Kollagentupfer bzw. -schwämme (Thompson et al., Science 241: 1349–1352 (1988)), Perlen (Hayek et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 147: 876–880 (1987)); feste PTFE-Fasern, die mit Kollagen beschichtet sind, und in einer Schwamm-artigen Struktur angeordnet sind (Thompson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7928–7932 (1989)); oder durch Infusion (Puumala et al., Brain Res. 534: 283–286 (1990)) führte zur Erzeugung zufälliger, unorganisierter Blutgefäße. Diese Wachstumsfaktoren wurden nicht erfolgreich verwendet, um das Wachstum eines neuen Blutgefäßes (neuer Blutgefäße) an einer gegeben Stelle in vivo zu lenken. Zudem induzieren Fibringele (0,5–10 mg/ml), die in Plexiglaskammern subkutan implantiert sind, innerhalb von 4 Implantationstagen Angiogenese im Vergleich zu leeren Kammern oder Kammern, die mit einem sterilen Kulturmedium gefüllt sind (Dvorak et al., Lab. Invest. 57: 673 (1987)).

F. Stellen gerichtete, lokalisierte Arzneimittel-Zuführung

[0031] In verschiedenen Bereichen der Medizin besteht ein großer Bedarf an einem effizienten, Stellengerichteten Arzneimittel-Abgabe- bzw. -Zuführungssystem. Ein lokalisiertes Arzneimittel-Zuführsystem wird zum Beispiel bei der Behandlung lokaler Infektionen, wie beispielsweise Periodontitis, benötigt, wo die systemische Verabreichung antimikrobieller Mittel unwirksam ist. Das Problem nach systemischer Verabreichung liegt im allgemeinen in der niedrigen Konzentration des antimikrobiellen Mittels, die an der Zielstelle erreicht werden kann. Um die lokale Konzentration zu erhöhen kann ein systemischer Dosisanstieg wirksam sein, aber ebenfalls Toxizität, mikrobielle Resistenz und Arzneimittelunverträglichkeit erzeugen. Um einige dieser Probleme zu

umgehen, wurden mehrere alternative Verfahren in Betracht gezogen, aber keines ist ideal. Es wurde zum Beispiel ebenfalls gezeigt, dass Kollagen und/oder Fibrinogen, das in einem wässerigen Medium dispergiert ist, als eine amorphe fließfähige Masse, und eine proteinhaltige Matrixzusammensetzung, die zur stabilen Platzierung fähig ist, Arzneimittel lokal zuführt (Luck et al., U.S. Reissue Patent 33,375; Luck et al., U.S. Patent 4,978,332).

[0032] Es wurde berichtet, dass eine Vielfalt von Antibiotika (AB) vom FG freigesetzt werden, aber nur bei relativ geringen Konzentrationen und für relativ kurze Zeitdauern, die in dem Bereich von einigen Stunden bis zu einigen Tagen liegen (Kram et al., J. Surg. Res. 50: 175–178 (1991)). Die meisten der AB waren in frei wasserlöslichen Formen und wurden zu dem TS zugegeben, während es hergestellt wurde. Die Einfügung von TET HCl und anderen frei wasserlöslichen Formen von ABs in einen FG beeinflusste jedoch die Fibrinpolymerisation während der Bildung des AB-supplementierten FG (Schlag et al., Biomaterials 4:29–32 (1983)). Diese Beeinflussung beschränkte die Menge und Konzentration des TET HCl, die in dem AB-FG Gemisch erreicht werden konnte und schien von der AB-Konzentration abhängig zu sein. Die relativ kurze Freisetzungszeit des AB aus dem FG kann die relativ kurze Lebensdauer des AB-supplementierten TS oder die Form und/oder die Menge des AB in dem AB-TS wiederspiegeln.

G. Kontrollierte Arzneimittelfreisetzung von TSs

[0033] Für einige klinische Anwendungen ist eine kontrollierte bzw. gesteuerte Arzneimittel-Freisetzung wünschenswert. Wie vorstehend diskutiert, wurden einige Arzneimittel, insbesondere ABs, in TSs, wie beispielsweise FG, eingefügt und von ihnen freigesetzt. Es gibt jedoch wenig oder keine Kontrolle bzw. Steuerung über die Dauer der Arzneimittelfreisetzung, was offensichtlich wenigstens teilweise eine Wiederspiegelung des relativ kurzen Lebens des Arzneimittel-supplementierten FG ist. Ein Mittel, um einen FG und andere TSs zum Erlauben einer verlängerten, lokalisierten Arzneimittelfreisetzung zu stabilisieren, ist wünschenswert und notwendig genauso wie neue Techniken zur Einfügung und verlängerter Freisetzung anderer Supplemente aus TS.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0034] In einem ersten Aspekt stellt die Erfindung eine supplementierte Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe bereit, die eine lokale Abgabe bzw. Zuführung von wenigstens einem Arzneimittel fördert, und die enthält: i) einen Fibrin-Kleber enthaltendes Versiegelungsmittel für Gewebe, und ii) wenigstens ein Arzneimittel in fester Form, wobei das Arzneimittel ein Analgetikum, ein antiproliferatives/zytotoxisches Arzneimittel, ein entzündungshemmendes Mittel, ein Antikoagulans, eine osteoinduktive Verbindung, ein Oligonucleotid, ein Antibiotikum, ein antivirales Mittel, ein Antimykotikum, ein antiparasitisches Mittel, ein Anästhetikum, ein kardiovaskuläres Arzneimittel, ein gentherapeutisches Reagens, ein Vitamin oder eine andere Nahrungsmittelergänzung ist; wobei die Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe keinen Wachstumsfaktor enthält.

[0035] In einer Ausführungsform inhibiert das Versiegelungsmittel nicht die Vollhautwundheilung.

[0036] In einer anderen Ausführungsform ist die Gesamtproteinkonzentration des Versiegelungsmittels weniger als 30 mg/ml.

[0037] In einer anderen Ausführungsform ist die Gesamtproteinkonzentration weniger als 30 mg/ml.

[0038] In einer anderen Ausführungsform ist die Gesamtproteinkonzentration größer als 30 mg/ml.

[0039] In verschiedenen anderen Aspekten stellt die Erfindung bereit: ein Biomaterial, das mit einer supplementierten Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe des ersten Aspekts der Erfindung behandelt ist; ein ex vivo Verfahren zur Herstellung eines behandelten Biomaterials, wobei das Verfahren Anwenden bzw. Ausbringen einer supplementierten Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe des ersten Aspekts der Erfindung auf ein Biomaterial umfasst; und die Verwendung einer supplementierten Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe gemäß dem ersten Aspekt der Erfindung zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung und/oder Vorbeugung einer Infektion, zur Behandlung von Neoplasie, zur Beschleunigung von Wundheilung, oder zur Behandlung und/oder Vorbeugung einer kardiovaskulären Erkrankung.

[0040] In noch einem anderen Aspekt stellt die Erfindung die Verwendung einer supplementierten Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe des ersten Aspekts der Erfindung zur Herstellung einer Matrix zur

Bereitstellung einer temporären Gerüststruktur an der Stelle eines Knochendefekts bereit, wobei das Arzneimittel eine osteoinduktive Verbindung ist, um die Form und den Ort eines neu gebildeten Knochens zu bestimmen, wobei dadurch Knochenbildung in der Stelle des Defekts erlaubt wird.

[0041] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur lokalisierten Abgabe bzw. Zuführung wenigstens eines Arzneimittels zu einem Gewebe, das Anwenden bzw. Aufbringen eines TS, das wenigstens ein Arzneimittel enthält, auf das Gewebe umfasst.

[0042] In den Ausführungsformen dieser Erfindung kann das TS FG sein.

[0043] In den verschiedenen Ausführungsformen der Erfindung kann der FG aus dem Mischen von topischem Fibrinogen-Komplex (TFC), Humanthrombin und Calciumchlorid hergestellt werden. Ein Variieren der Konzentration des TFC weist die bedeutendste Wirkung auf die Dichte der FG-Endmatrix auf. Ein Variieren der Konzentration des Thrombins weist eine unbedeutende Wirkung auf die Gesamtproteinkonzentration des End-FG auf, weist aber eine tiefe Wirkung auf die Zeit auf, die zur Polymerisation der Fibrinogen-Komponente des TFC in Fibrin erforderlich ist. Während diese Wirkung wohl bekannt ist, ist nicht allgemein klar, dass es verwendet werden kann, um die Effektivität des FG zu maximieren, wenn es alleine oder supplementiert verwendet wird. Aufgrund dieser Wirkung kann man die Zeit zwischen dem Mischen der FG-Komponenten und dem Gerinnen des FG ändern. Man kann folglich dem FG erlauben, in tiefe Spalten in einer Wunde freier zu fließen, wobei ihm erlaubt wird, die Wunde vollständig zu füllen, bevor der FG gerinnt. Alternativ kann man dem FG erlauben, schnell genug zu gerinnen, um zu verhindern, dass er die Wundstelle verlasst, insbesondere wenn aus der Wunde Fluid unter Druck (d.h., Blut, Lymphe, intrazelluläres Fluid usw.) ausströmt. Diese Eigenschaft ist ebenfalls wichtig, um den FG abzuhalten, Zuführvorrichtungen mit langen Durchgängen, d.h., Katheter, Endoskope usw., zuzusetzen, was wichtig ist, um das Ausbringen des FG oder supplementierten FG auf Stellen in dem Körper zu erlauben, die nur chirurgisch erreichbar sind. Diese Wirkung ist ebenfalls beim Halten der unlöslichen Supplemente in Suspension und Verhindern wichtig, dass sie sich in dem Applikator oder in der Gewebestelle absetzen.

[0044] Wie hier verwendet, ist der TFC ein lyophilisiertes Gemisch aus Humanplasmaproteinen, die gereinigt und viral inaktiviert wurden. Wenn wieder hergestellt bzw. zur ursprünglichen Konzentration verdünnt, enthält TFC:
Gesamtprotein: 100–130 mg/ml
Fibrinogen (als geronnenes Protein) 80 % des Gesamtproteins (minimal)
Albumin (menschlich): 5–25 mg/ml
Plasminogen: 5 mg/ml
Faktor XIII: 10–40 Einheiten/ml
Polysorbat-80: 0,3 % (maximal)
pH: 7,1–7,5.

[0045] Das wieder hergestellte bzw. auf die ursprüngliche Konzentration verdünnte TFC kann ebenfalls Spurenmengen an Fibronektin enthalten.

[0046] Wie hier verwendet, ist Humanthrombin ein lyophilisiertes Gemisch aus menschlichen Plasmaproteinen, die gereinigt und viral inaktiviert wurden. Wenn wieder hergestellt bzw. auf die ursprüngliche Konzentration verdünnt, enthält es:
Thrombinpotenz: 300 ± 50 Internationale Einheiten/ml
Albumin (menschlich): 5 mg/ml
Glycin: 0,3 M ± ,05 M
PH: 6,5–7,1.

[0047] Calciumchlorid wird in ausreichender Konzentration zugegeben, um das Thrombin zu aktivieren. Solange ausreichend Calciumchlorid vorhanden ist, ist seine Konzentration nicht wichtig.

[0048] Eine kosmetische Verwendung für die Zusammensetzungen dieser Erfindung ist die Behandlung von Falten und Narben anstelle der Verwendung von Silikon oder anderen Verbindungen, um dies zu tun. In dieser Ausführungsform kann zum Beispiel das TS Fettzellen enthalten. Die TSs dieser Erfindung können verwendet werden, um die Integration eines, entweder künstlichen oder natürlichen, Transplantats in einen Körper eines Tiers zu unterstützen, wie beispielsweise, wenn das Transplantat aus natürlichem Gewebe besteht. Die TSs dieser Erfindung können verwendet werden, um einige der vielen Probleme zu bekämpfen, die mit bestimmten Zuständen, wie beispielsweise Periodontitis, nämlich anhaltende Infektion, Knochenresorption, Verlust von Li-

gamenten und Frühreepithelialisierung der Dentaltasche, verbunden sind.

[0049] In einer anderen Ausführungsform stellt diese Erfindung ein Gemisch aus FG, DBM und/oder gereinigten BMP's bereit. Dieses Gemisch stellt eine Matrix bereit, die den Zellkomponenten des Körpers erlaubt, in sie zu wandern und eine Osteoinduktion, wo benötigt, zu erzeugen. Die Matrixzusammensetzung in Bezug auf Proteine (wie beispielsweise Fibrinogen und Faktor XIII), Enzyme (wie beispielsweise Thrombin und Plasmin), BMP's und DBM und ihre Konzentrationen sind geeignet formuliert, um die Langlebigkeit dieser temporären Gerüststruktur und die Osteoinduktion zu optimieren, die stattfinden muss. All die FG-Komponenten sind biologisch abbaubar, aber während der Knochenbildung stellt das Gemisch ein nicht-kollabierbares bzw. nicht-zusammenbrechbares Gerüst bereit, dass die Gestalt und ein Ort des neu gebildeten Knochens bestimmen kann. Weichgewebekollabierung bzw. -zusammenbruch in den Pseudoarthrose-Knochendefekt, die bzw. der ein Problem bei der rekonstruktiven Knochenchirurgie ist, wird folglich vermieden. (Ein) Arzneimittel, das bzw. die in den Zusammensetzungen der Erfindung verwendet wird bzw. werden, die DBM und BMP's umfassen, aber nicht darauf beschränkt sind, können zu dem TS zugegeben werden, um eine Wundheilung zu beschleunigen und eine Infektion, Neoplasie und/oder andere Krankheitsprozesse zu bekämpfen. Diese Arzneimittel können umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt: Antibiotika, wie beispielsweise Tetracyclin und Ciprofloxacin; antiproliferative/zytotoxische Arzneimittel, wie beispielsweise 5-Fluoruracil (5-FU, Taxol und/oder Taxotere; antivirale Mittel, wie beispielsweise Gangcyclovir, Zidovudin, Amantidin, Vidarabin, Ribaravin, Trifluoridin, Acyclovir, Dideoxyuridin und Antikörper für virale Komponenten oder Genprodukte; Cytokine, wie beispielsweise α- oder β- oder γ-Interferon, α- oder β-Tumor-Nekrose-Faktor und Interleukine; koloniestimulierende Faktoren; Erythropoietin; Antimykotika, wie beispielsweise Diflucan, Ketaconizole und Nystatin; antiparasitische Mittel, wie beispielsweise Pentamidin; entzündungshemmende Mittel, wie beispielsweise α-1-Antitrypsin und α-1-Antichymotrypsin; Steroide; Anästhetika; Analgetika und Hormone. Andere Verbindungen, die dem TS zugegeben werden können, umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt: Vitamine und andere Nahrungsmittelergänzungen; Hormone; Glycoproteine; Fibronektin; Peptide und Proteine; Carbohydrate (beide einfache und/oder komplexe); Proteoglycane; Antiangiogenine; Antigene; Oligonukleotide (sense und/oder antisense DNA und/oder RNA); BMPs; DBM; Antikörper (zum Beispiel, für infektiöse Mittel, Tumore, Arzneimittel oder Hormone); und gentherapeutische Reagenzien. Genetisch veränderte Zellen und/oder andere Zellen können ebenfalls in den TSs dieser Erfindung enthalten sein. Die osteoinduktiven Verbindungen, die beim Praktizieren dieser Erfindung verwendet werden können, umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt: Osteogenin (BMP3); BMP-2A, -2B und -7.

[0050] Zudem kann irgendetwas, das nicht das TS zerstört, zu den TSs dieser Erfindung zugegeben werden.

[0051] In den Zusammensetzungen der Erfindung ist wenigstens ein Arzneimittel in fester Form enthalten, wobei das Arzneimittel ein Analgetikum, ein antiproliferatives/zytotoxisches Arzneimittel, ein entzündungshemmendes Mittel, ein Antikoagulans, eine osteoinduktive Verbindung, ein Oligonucleotid, ein Antibiotikum, ein antivirales Mittel, ein Antimykotikum, ein antiparasitisches Mittel, ein Anästhetikum, ein kardiovaskuläres Arzneimittel, ein gentherapeutisches Reagens, ein Vitamin oder eine andere Nahrungsmittelergänzung ist. Die Zusammensetzungen der Erfindung enthalten keinen Wachstumsfaktor.

[0052] Die hierin berichteten Studien zeigen unerwartet, dass der Einschluss von Verbindungen, wie beispielsweise die freie Base von TET oder Ciprofloxacin HCL, in einen FG oder die Behandlung eines FG damit dem supplementierten FG eine verlängerte Langlebigkeit erteilt. Dieses Phänomen kann ausgenutzt werden, um die Dauer einer Freisetzung eines Arzneimittels von dem TS zu erhöhen. Alternativ kann dieses Phänomen ausgenutzt werden, um zur Stabilisierung des FG die Freisetzung eines anderen (anderer) Arzneimittel einzustellen, das bzw. die anders als die verwendete Verbindung sind, das bzw. die ebenfalls in dem TET-FG enthalten sind und/oder den FG veranlassen, für eine größere Zeitdauer in vivo oder in vitro stabil zu sein.

[0053] Im allgemeinen erhöhen schlecht wasserlösliche Formen eines Arzneimittels, wie beispielsweise die freie Base von TET, die Abgabe des Arzneimittels von dem TS mehr als frei wasserlösliche Formen davon. Das Arzneimittel kann deshalb an einen unlöslichen Träger, wie beispielsweise Fibrinogen oder Aktivkohle, innerhalb des TS gebunden werden, um die Abgabe des Arzneimittels von dem supplementierten TS zu verlängern.

[0054] In einer anderen Ausführungsform kann das supplementierte TS in Organoiden bzw. Organellen verwendet werden.

[0055] In einer anderen Ausführungsform stellt diese Erfindung eine Zusammensetzung bereit, die die lokalisierte Abgabe einer schlecht wasserlöslichen Form eines Antibiotikums (Antibiotika), wie beispielsweise die freie Basenform von TET, und anderen Arzneimittel(n) fördert, die einen TS und eine wirksame Konzentration

wenigstens einer schlecht wasserlöslichen Form eines Antibiotikums enthält.

[0056] Die vorliegende Erfindung weist einige Vorteile gegenüber den vorherig verwendeten TS-Zusammensetzungen und Verfahren auf. Der erste Vorteil ist, dass die Arzneimittelsupplementierten TSs der vorliegenden Erfindung viele der Eigenschaften eines biologisch abbaubaren Trägers aufweisen, nämlich: sie können formuliert werden, nur menschliche Proteine zu enthalten, wobei dadurch Immunogenitätsprobleme und Fremdkörperreaktionen ausgeschlossen oder minimiert werden; ihre Verabreichung ist vielseitig; und ihre Entfernung aus den Geweben des Wirts ist nicht erforderlich, weil sie durch das eigene natürliche fibrinolytische System des Wirts abgebaut werden.

[0057] Ein zweiter Vorteil ist, dass die vorliegende Erfindung einen guten Weg bereitstellt, um Arzneimittel für eine verlängerte Zeitdauer zu einer internen oder externen Wunde effektiv zuzuführen. Es wird jetzt angenommen, dass einige Wachstumsfaktorrezeptoren wenigstens 12 Stunden besetzt sein müssen, um eine maximale biologische Wirkung zu erzielen.

[0058] Ein dritter Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass Tierzellen in und durch die TSs der vorliegenden Erfindung wandern können. Dies unterstützt eine Eintransplantation der Zellen zu benachbarten Geweben und Prothesen. Basierend auf der Zusammensetzung der TSs, die in Europa erhältlich sind, wird erwartet, dass dies mit diesen Formulierungen nicht möglich ist. Statt dessen müssen tierische Zellen ringsherum wandern oder kommerziellen erhältlichen Fibrin-Kleber digerieren bzw. verdauen. Weil der Import kommerziell erhältlicher TSs aus Europa in die USA illegal ist (ihre Verwendung in der USA ist nicht von dem U.S. FDA genehmigt), können Anmelder dies nicht sofort überprüfen.

[0059] Ein vierter Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass das TS aufgrund seiner anfangs flüssigen Natur Oberflächen gründlicher und vollständiger als viele vorher erhältliche Liefer- bzw. Abgabesysteme bedecken kann. Dies ist insbesondere für die Verwendung der vorliegenden Erfindung bei einem Beschichten von Biomaterialien und bei der Endothelialisierung von Gefäßprothesen wichtig, weil der supplementierte FG das Innere, Äußere und Poren der Gefäßprothese bedecken wird. Als eine Folge von diesem plus der Fähigkeit von Endothelzellen, in und durch den TS zu wandern, wird die Eintransplantation autogener Endothelzellen gleichzeitig entlang der gesamten Länge der Gefäßprothese auftreten, wobei dadurch seine Thrombogenität und seine Antigenität abnimmt. Mit vorher verwendeten TSs begann die Eintransplantation bei den Enden der Gefäßprothese und fuhr, wenn überhaupt, in dem Innern derselben fort, wobei folglich eine längere Zeitdauer zur Entwicklung von Thrombogenität und Antigenität erlaubt wird. Vorher verwendete TSs für Gefäßprothesen wurden auch zuerst mit nichtautogenen Zellen in Kultur angesetzt, die von dem Körper abgestoßen werden konnten und durch Scherkraft von durch die Prothese durchfließendem Blut weggespült werden konnten.

[0060] Ein fünfter Vorteil ist, dass das supplementierte TS dieser Erfindung geformt werden kann und folglich in nahezu jeder gewünschten Gestalt spezialangefertigt werden kann. Zum Beispiel kann TS, wie beispielsweise FG, mit BMPs und/oder DBM supplementiert werden und kann in der benötigten Gestalt spezialangefertigt werden, um eine Knochenwunde am meisten geeignet zu behandeln. Dies kann nicht durch DBM-Pulver alleine ausgeführt werden, weil DBM-Pulver nicht seine Gestalt aufrecht erhalten wird.

[0061] Ein sechster Vorteil ist, dass der AB-supplementierte FG dieser Erfindung, wie beispielsweise TET-FG, die Langlebigkeit und Stabilität des FG im Vergleich zu der des unsupplementierten FG unerwartet erhöht hat. Diese erhöhte Stabilität besteht sogar fort, nachdem merkbare Mengen des AB nicht länger in dem FG verbleiben. Zum Beispiel erzeugt ein Tränken eines neu gebildeten FG-Gerinnsels in einer gesättigten Lösung aus TET, das aus der freien Base von TET erzeugt ist, oder in einer Lösung aus CIP HCl ein FG-Gerinnsel, das sogar nachdem im wesentlichen all das TET oder CIP das FG-Gerinnsel verlassen hat, stabil und erhalten ist. Während nicht gewünscht ist, an irgendeine Theorie gebunden zu sein, wie diese Wirkung erzeugt wird, wird angenommen, dass das AB, wie beispielsweise TET oder CIP, Plasminogen inhibiert, das in dem TFC ist, und den FG abbaut. Wenn das Plasminogen inhibiert wird, scheint seine fortgeführte Inhibition nicht von merkbaren Mengen des TET oder CIP abzuhängen, die in dem FG verbleiben. Als eine Folge dieser stabilisierenden Wirkung kann man ein erhöhtes Lagerbrettleben des TS und möglicherweise ein erhöhtes Fortdauern in vivo erwarten.

[0062] Der siebente Vorteil der vorliegenden Erfindung ist eine direkte Folge der verlängerten Langlebigkeit und Stabilität des TS. Als eine Folge dieses unerwarteten Anstiegs der Stabilität des TS kann ein AB-supplementierter FG verwendet werden, um eine lokalisierte, lang andauernde Abgabe eines Arneimittels (von Arzneimitteln) zu erzeugen. Diese Abgabe wird sogar fortgeführt, nachdem das stabilisierende Arzneimittel, wie beispielsweise TET oder CIP, im wesentlichen das TS verlassen hat. Ein Einschluss einer festen Form, bevor-

zugt eine schlecht wasserlösliche, Form eines Arzneimittels, wie beispielsweise eine freie Base, in ein TS, das zum Beispiel durch TET oder CIP stabilisiert wurde, erlaubt dann dem stabilisierten TS, dieses Arzneimittel lokal für einen verlängerten Zeitraum abzugeben. Einige Formen von Arzneimitteln, wie beispielsweise die freie Base TET, erlaubt sowohl eine Stabilisierung des TS als auch eine verlängerte Arzneimittelabgabe. Andere Arzneimittel können das eine oder das andere, aber nicht beides tun. Nach dem besten Wissen der Anmelderin hat niemand anders eine Verbindung verwendet, um zur Erzeugung einer verlängerten, lokalisierten Arzneimittelabgabe ein TS zu stabilisieren.

[0063] Ein achter Vorteil der Erfindung der Anmelderin ist, dass sie Stellen-gerichteter Angiogenese erlaubt, in vivo aufzutreten. Während andere lokalisierte, nicht-spezifische Angiogenese gezeigt haben, vorstehend, hat nach dem besten Wissen der Anmelderin niemand anders Stellen-gerichtete Angiogenese gezeigt.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0064] Fig. 1 zeigt Western-Blots von Gelen, auf denen HBGF-1β-haltige Proben mit 250 E/ml Thrombin in der Gegenwart von ansteigenden Konzentrationen von Heparin inkubiert waren. Lösungen, die HBGF-1β (10 µg/ml), Thrombin (250 µg/ml) und ansteigende Konzentrationen von Heparin (0, 0,5, 5, 10, 20 und 50 Einheiten/ml) enthielten, wurden bei 37°C 72 Stunden lang inkubiert. Aliquote wurden periodisch von jedem der inkubierenden Gemische entnommen und wurden auf 8% SDS- (Natriumdodecylsulfat-) Polyacrylamidgele geladen, die wie von Laemmli (Nature 227:680 (1970)) beschrieben, hergestellt und laufen gelassen wurden. Das Gel wurde dann auf Nitrozellulose elektrogeblottet und die HBGF-1β entsprechende Bande wurde unter Verwendung eines Affinitäts-gereinigten polyklonalen Kaninchenserums zu HBGF-1β identifiziert.

[0065] Die Konzentrationen von Heparin in den inkubierenden Gemischen waren: Platte A) 0 Einheiten/ml; Platte B) 0,5 Einheiten/ml; Platte C) 5 Einheiten/ml; Platte D) 10 Einheiten/ml; Platte E) 20 Einheiten/ml; und Platte F) 50 Einheiten/ml. Jede Bahn enthält in den in jeder Platte A–F abgebildeten Gelen das Folgende: Bahn 1 enthält SDS-PAGE Standards mit geringer Molekülmasse; Bahn 2 enthält biotinylierte Standards; Bahn 3 enthält 10 µg/ml HBGF-1β, Bahn 4 enthält 250 Einheiten/ml Thrombin; und Bahnen 5–13 enthalten Proben, die aus den inkubierenden Gemischen bei Zeiten von 0, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 48 und 72 Stunden entnommen wurden.

[0066] Fig. 2 zeigt den Einbau von ^{3}H-Thymidin als eine Funktion von relativer HBGF-1β-Konzentration. Proben von HBGF-1β wurden, wie in Fig. 1 und Beispiel 2 beschrieben, in der Gegenwart von 250 E/ml und 5 E/ml Heparin 0 Stunden, 24 Stunden oder 72 Stunden lang inkubiert. Verdünnungen dieser Proben wurden dann zu NIH 3T3 Zellen zugegeben, die, wie in Beispiel 3 beschrieben, plattiert wurden. CPM ist gegen die HBGF-1β-Konzentration aufgetragen.

[0067] Fig. 3. Typische Muster von menschlichen Umbilikalvenen-Endothelzellen nach 7-tägigem Wachsen auf mit 100 ng/ml aktivem Wildtyp FGF-1 supplementiertem FG. Bemerke die große Anzahl von Zellen und ihre längliche Form. Vergleiche mit der Paucitität von Zellen, die auf unsupplementiertem FG gewachsen sind (Fig. 5).

[0068] Fig. 4. Typische Muster von menschlichen Umbilikalvenen-Endothelzellen nach 7-tägigem Wachsen auf mit 10 ng/ml aktivem Wildtyp FGF-1 supplementiertem FG. Bemerke die große Anzahl von Zellen und ihre längliche Form. Vergleiche mit der Paucität von Zellen, die auf unsupplementiertem FG gewachsen sind (Fig. 5).

[0069] Fig. 5. Typische Muster von menschlichen Umbilikalvenen-Endothelzellen nach 7-tägigem Wachsen auf unsupplementiertem FG. Bemerke im Vergleich zu der Anzahl von Zellen in Fig. 3 und Fig. 4 die kleine Anzahl von Zellen, die eine langsamere Proliferationsgeschwindigkeit anzeigt.

[0070] Fig. 6. Typische Muster von menschlichen Umbilikalvenen-Endothelzellen nach 7-tägigem Wachsen auf mit 100 ng/ml inaktiven, mutanten FGF-1 supplementiertem FG. Bemerke im Vergleich zu der Anzahl von Zellen in Fig. 3 und Fig. 4 die kleine Anzahl von Zellen, die eine langsamere Proliferationsgeschwindigkeit anzeigt.

[0071] Fig. 7. Typische Muster von menschlichen Umbilikalvenen-Endothelzellen 24 Stunden nachdem sie in FG bei einer Konzentration von 10^{5} Zellen pro ml FG eingebettet wurden. Die Protein- und die Thrombin-Konzentration des FG betrugen 4 mg/ml bzw. 0,6 NIH Einheiten/ml. Bemerke ihre längliche, multipodiale Morphologie, und dass sie ein zelluläres Netzwerk bildeten, in dem sie alle miteinander in Kontakt gekommen waren. Vergleiche mit der Pflasterstein-Form gleicher Zellen, die in Fibronektin gewachsen waren (Fig. 9).

[0072] Fig. 8. Typische Muster von menschlichen Umbilikalvenen-Endothelzellen 48 Stunden nachdem sie im FG bei einer Konzentration von 10^5 Zellen pro ml FG eingebettet wurden. Die Kulturbedingungen waren wie in Fig. 7 beschrieben. Bemerke die weiterhin hervorgehobene, längliche und multipodiale Morphologie und steigende Entwicklung zellulärer Netzwerke. Vergleiche mit den Pflasterstein-förmigen Zellen, die in Fibrinonektin gewachsen waren (Fig. 10), und bemerke den Mangel an einem zellulären Netzwerk in den Letzteren.

[0073] Fig. 9. Typische Muster von menschlichen Umbilikalvenen-Endothelzellen 24 Stunden nachdem sie auf einer mit Fibronektin bedeckten Oberfläche kultiviert bzw. gezüchtet wurden. Bemerke die Pflasterstein-Form der Zellen und den Mangel an zellulären Netzwerken. Vergleiche mit Fig. 7.

[0074] Fig. 10. Typische Muster von menschlichen Umbilikalvenen-Endothelzellen 48 Stunden nachdem sie in einem allgemein verwendeten Fibronektin-Film kultiviert bzw. gezüchtet wurden. Bemerke die Pflasterstein-Form der Zellen und den Mangel an zellulären Netzwerken. Vergleiche mit Fig. 8.

[0075] Fig. 11. Mikrogaphische Darstellung von Querschnitten von PTFE Gefäßtransplantaten, die aus Hunden nach 7 Tagen (Platten A, C, E) oder 28 Tagen (Platten B, D, F) explantiert wurden. Vor der Implantation waren die Transplantate entweder unbehandelt (A und B), nur mit FG beschichtet (C und D), oder mit Heparin und HBGF-1 supplementiertem FG beschichtet (E und F).

[0076] Unbehandelte Kontrollen (A & B) zeigten minimalen Mesenchymeinwuchs, wobei sowohl ihre Zwischenräume mit Fibrinkoagulum gefüllt waren und ihre Luminaloberflächen mit Fibrinkoagulum beschichtet waren. Die mit FG behandelten Transplantate zeigten einen Mesenchymeinwuchs nur in der äußeren Hälfte der Zwischenräume der Transplantate, wobei der Rest mit Fibrinkoagulum gefüllt war. Sehr wenige Zwischenraumkapillaren waren vorhanden. Im Gegensatz dazu zeigten die Transplantate, die mit FGF-1-haltigem FG behandelt waren, reichlicheren Zwischenraumeinwuchs und zeigten nach 28 Tagen viele Kapillaren, Myofibroblasten und Makrophagen, wobei innere Kapseln aus mehreren Schichten von Myofibroblasten unter zusammenlaufenden Endothelzellenschichten bestanden. Resultate ähnlicher Transplantate nach 128 Implantationstagen waren ähnlich, wobei größere Anzahlen von Kapillaren in der FG + FGF-1 Gruppe waren (Daten nicht gezeigt).

[0077] Fig. 12. Scanning-Elektronen-Mikrogaphien der inneren Auskleidung der in Fig. 11 beschriebenen Gefäßtransplantate 28 Tage nach Implantation. Die Transplantate waren entweder unbehandelt (G), nur mit FG beschichtet (H), oder mit Heparin und HBGF-1 supplementiertem FG beschichtet (n. Unbehandelte Kontrolltransplantate (G) zeigten spärliche Flächen von Endeothelzellenbedeckung inmitten Flächen eines Thrombus, die rote Blutkörperchenzellen, Plättchen und Flächen freigelegten Transplantatmaterials enthielten (in der Mitte und oben auf der Abbildung sichtbar). Transplantate, die nur mit FG beschichtet waren (H), zeigten Inseln von Endothelzellen inmitten Flächen aus Fibrinkoagulum. Im Gegensatz dazu zeigten Transplantate, die mit FG und FGF-1 behandelt waren, zusammenlaufende Endothelzellen, die entlang der Richtung der Durchblutung ausgerichtet waren.

[0078] Fig. 13. Herstellung von scheibenförmigen Implantaten, die 1 mm dick sind und einen Durchmesser von 8 mm aufwisien, die unter Verwendung einer Aluminiumform hergestellt wurden.

[0079] Fig. 14. Diagramm, das einen intramuskulären Bioassay zur Induktion einer Knochenbildung in Ratten durch DBM alleine, durch FG-Implantate oder durch DBM-FG veranschaulicht.

[0080] Fig. 15. Diagramm, das die Induktion einer Knochenbildung in Schädeldachimplantaten durch DBM-FG veranschaulicht.

[0081] Fig. 16. Strahlenundurchlässigkeits-Daten bei 28 Tagen nach Operation von intramuskulären Implantaten aus DBM-FG, DBM oder FG.

[0082] Fig. 17. Strahlenundurchlässigkeits-Daten von DBM-FG (30 mg/ml) Schädeldachimplantaten bei 28 Tagen, 3 Monaten und 4 Monaten nach der Operation.

[0083] Fig. 18. Fig. 18A ist ein Foto einer Kraniotomiestelle bei 28 Tagen nach dem chirurgischen Eingriff in einem behandelten Tier.

[0084] Fig. 18B ist ein Foto der Schädeldachwunde von einer unbehandelten Kontrolle bei 28 Tagen nach der Operation. Bemerke, dass sich nur faserförmiges Bindegewebe entlang der Kraniotomiewunde entwickelt hat.

[0085] Fig. 19. Foto von den Kraniotomierwunden von Tieren, die nur mit DBM-Partikeln behandelt wurden.

[0086] Fig. 20. Foto eines neuen Knochen, der in der Kraniotomiestelle als Antwort auf DBM-FG (15 mg/ml) gebildet wurde.

[0087] Fig. 21. Foto eines neuen Knochen, der in der Kraniotomiestelle als Antwort auf DBM-FG (15 mg/ml) gebildet wurde. Bemerke, dass typischerweise mehr Knochenmark in Kraniotomiewunden, die mit DBM-FG Scheiben implantiert waren, als mit DBM-Implantaten alleine gebildet wurde.

[0088] Fig. 22. Die Freisetzung von TET aus FG-Scheiben mit einem Durchmesser von 3 × 6 mm bei 37 °C Die Konzentration des freigesetzten TET wurde spektrophotometrisch in 2 ml PBS-Überstand gemessen, die täglich ersetzt wurde. Zwei dieser „statischen" in vitro Experimente wurden mit identischen Resultaten durchgeführt. Die Resultate eines von ihnen ist hier gezeigt.

[0089] Fig. 23. Die Freisetzung von TET aus FG-Scheiben mit einem Durchmesser von 3 × 6 mm bei 37 °C Die Scheiben enthielten 100 mg/ml TET und wurden in verschlossene Gefäße platziert, die mit 2 ml PBS gefüllt waren. Die TET-Konzentration wurde in dem PBS-Ausfluss spektroskopisch gemessen, der bei einer Geschwindigkeit von 3 ml/Tag kontinuierlich ausgetauscht wurde. Das Volumen des PBS-Überstand wurde bei etwa 2 ml konstant gehalten. Die Daten sind der Durchschnitt zweier Experimente.

[0090] Fig. 24. Die Freisetzung von TET in Speichel von Scheiben mit einem Durchmesser von 3 × 6 mm, die 50 oder 100 TET mg/ml FG enthielten, bei 37 °C. Die TET-Konzentration wurde in 0,75 ml Speichel-Überstand spektrophotometrisch gemessen, der täglich ersetzt wurde. Der in diesen Experimenten verwendete Speichel wurde von zehn Donoren gepoolt, zentrifugiert, filtriert und bei 4 °C gehalten.

[0091] Fig. 25. Die Stabilität eines TET-supplementierten FG wurde im Vergleich zu der des Kontroll– FG erhöht. Fotos von FG-Matrizen mit einem Durchmesser von 3 × 6 mm ohne TET und mit 50 und 100 mg/ml TET über eine Periode von 15 Tagen. Die Scheiben wurden in 0,75 ml Speichel gehalten, der täglich ausgetauscht wurde. Der Speichel wurde von 10 Donoren gepoolt. Er wurde zentrifugiert, filtriert und vor Verwendung in diesem Experiment bei 4 °C gelagert. Bemerke, dass bei 9 Tagen die FG-Matrix, die kein TET enthielt, mehr zersetzt war als die Matrizen, die entweder 50 oder 100 mg/ml TET enthielten. Bemerke auch, dass bei 15 Tagen die FG-Matrix, die kein TET enthielt, nahezu vollständig zersetzt war, während die FG-Matrizen, die 50 oder 100 mg/ml TET enthielten, nahezu unverändert waren. Der Einschluss von 50 oder 100 mg/ml TET verlängerte die Langlebigkeit von FG-Matrizen in Speichel in vivo dramatisch.

[0092] Fig. 26. Antibakterielle Aktivität von TET, das aus TET-supplementiertem FG freigesetzt wurde. Zwei ml PBS, die die 3 × 6 mm TET-supplementierten FG-Scheiben umgab, wurden täglich ersetzt. Zum Testen der antimikrobiologischen Aktivität des freigesetzten TET wurden 6 mm Papierscheiben, die mit gesammelten Eluaten imprägniert waren, 18 Stunden lang bei 37 °C auf Agar-Platten inkubiert, die E. coli enthielten. Dann wurde der Durchmesser der Inhibierungszone gemessen.

[0093] Fig. 27. Die Freisetzung von Ciprofloxacin, Amoxicillin und Metronidazol aus FG-Matrizen. Einzelne Scheiben mit einem Durchmesser von 3 × 6 mm, die 100 mg/ml der jeweiligen Antibiotika enthielten, wurden in 2 ml Phosphat-gepufferter Salzlösung bei 37 °C geworfen. Der Überstand wurde täglich ersetzt und die Antibiotikum-Konzentration wurde bei 275, 274 bzw. 320 nm spektrophotometrisch gemessen.

[0094] Fig. 28. Die Freisetzung von TET aus TET-supplementierten FG-Scheiben war proportional zu der Temperatur des PBS, die die TET-FG-Scheiben badet.

[0095] Fig. 29. Die Wirkung der FG-Protein-Konzentration auf die Freisetzung von TET aus TET-FG. Bemerke, dass höhere FG-Protein-Konzentrationen zu einer langsameren TET-Freisetzungsgeschwindigkeit aus dem TET-FG führte.

[0096] Fig. 30. Die Freisetzung von 5-FU aus 5-FU-supplementiertem FG wurde durch die Verwendung fester Formen von 5-FU verlängert.

[0097] Fig. 31. Dosis-Antwort- bzw. Dosis-Wirkung-Verhältnis der chemotaktischen Antwort von NIH 3T3 Fibroblasten auf Fibronektin. Ein Stufengradient ansteigender Konzentrationen von Fibronektin wurde zu den unteren Vertiefungen der modifizierten Kammern von Boyden zugegeben. Die Daten sind als Mittel+/– S.E. gewanderter Zellen pro Hochleistungsfeld ausgedrückt und zeigen, dass Fibronektin die Chemotaxis von NIH

3T3 Zellen zu ihm als eine Funktion der Dosis induzierte.

[0098] Fig. 32. Dosis-Antwort-Verhältnis der chemotaktischen Antwort von NIH 3T3 Fibroblasten auf FGF-1. Ein Stufengradient ansteigender Konzentrationen von FGF-1 wurde zu den unteren Vertiefungen der modifizierten Kammern von Boyden in der Gegenwart von Heparin zugegeben. Die Daten sind als das Mittel+/– S.E. gewanderter Zellen pro Hochleistungsfeld ausgedrückt und zeigen, dass FGF-1 die Chemotaxis von Fibroblasten zu ihm als eine Funktion der Dosis induzierte.

[0099] Fig. 33. Dosis-Antwort-Verhältnis der chemotaktische Antwort von NIH 3T3 Fibroblasten auf FGF-2. Ein Stufengradient ansteigender Konzentrationen von FGF-2 wurde zu den unteren Vertiefungen der modifizierten Kammern von Boyden zugegeben. Die Daten sind als das Mittel+/– S.E. gewanderter Zellen pro Hochleistungsfeld ausgedrückt und zeigen, dass FGF-2 die Chemotaxis von Fibroblasten zu ihm als eine Funktion der Dosis induzierte.

[0100] Fig. 34. Dosis-Antwort-Verhältnis der chemotaktische Antwort von NIH 3T3 Fibroblasten auf FGF-4. Ein Stufengradient ansteigender Konzentrationen von FGF-4 wurde zu den unteren Vertiefungen der modifizierten Kammern von Boyden in der Gegenwart von Heparin zugegeben. Die Daten sind als das Mittel+/– S.E. gewanderter Zellen pro Hochleistungsfeld ausgedrückt und zeigen, dass FGF-4 die Chemotaxis von Fibroblasten zu ihm als eine Funktion der Dosis induzierte.

[0101] Fig. 35. Dosis-Antwort-Verhältnis der chemotaktischen Antwort von Humandermalfibroblasten (HDFs) auf FGF-1. Ein Stufengradient ansteigender Konzentrationen von FGF-1 wurde zu den unteren Vertiefungen der modifizierten Kammern von Boyden in der Gegenwart von Heparin zugegeben. Die Daten sind als das Mittel+/– S.E. gewanderter Zellen pro Hochleistungsfeld ausgedrückt und zeigen, dass FGF-1 die Chemotaxis von HDFs zu ihm als eine Funktion der Dosis induzierte.

[0102] Fig. 36. Dosis-Antwort-Verhältnis der chemotaktischen Antwort von HDFs auf FGF-2. Ein Stufengradient ansteigender Konzentrationen von FGF-2 wurde zu den unteren Vertiefungen der modifizierten Kammern von Boyden zugegeben. Die Daten sind als das Mittel+/– S.E. gewanderter Zellen pro Hochleistungsfeld ausgedrückt und zeigen, dass FGF-2 die Chemotaxis von HDFs zu ihm als eine Funktion der Dosis induzierte.

[0103] Fig. 37. Dosis-Antwort-Verhältnis der chemotaktischen Antwort von HDFs auf FGF-4. Ein Stufengradient ansteigender Konzentrationen von FGF-4 wurde zu den unteren Vertiefungen der modifizierten Kammern von Boyden zugegeben. Die Daten sind als das Mittel+/– S.E. gewanderter Zellen pro Hochleistungsfeld ausgedrückt und zeigen, dass FGF-4 die Chemotaxis von HDFs zu ihm als eine Funktion der Dosis induzierte.

[0104] Fig. 38. Dosis-Antwort-Verhältnis der chemotaktischen Antwort von HDFs auf FGF-4 in Lösung und im FG. FGF-4 wurde in einem FG einfügt und in der Bodenvertiefung von Chemotaxiskammern platziert. Die Menge an FGF in dem FG war ausreichend, um zu den angezeigten Konzentrationen zu führen, wenn sie durch den FG und dem Medium in der unteren Kammer gleichmäßig verteilt war. Negative Kontrollen enthielten Medium alleine und FG ohne FGF. Medium, das FGF-4 bei einer Konzentration von 10 ng/ml in der unteren Kammer enthielt, wurde als eine positive Kontrolle verwendet. Die Daten sind als das Mittel+/– S.E. gewanderter Zellen pro Hochleistungsfeld ausgedrückt und zeigen, dass vom FG freigesetztes FGF-4 die Chemotaxis von HDFs zu dem FG als eine Funktion der Dosis induzierte.

[0105] Fig. 39. Diagramm eines in sich geschlossenen TS-Wundverbands.

Beschreibung der Bevorzugten Ausführungsformen

Definitionen

[0106] Falls es nicht anders definiert ist, haben alle hierin verwendeten technischen und wissenschaftlichen Ausdrücke dieselbe Bedeutung, wie sie üblicherweise vom Fachmann auf dem hier in Rede stehenden Gebiet verstanden werden, dem die Erfindung gebührt. Alle hierin erwähnten Patente und Veröffentlichungen sind unter Bezugnahme einbezogen.

[0107] Wie hierin verwendet, umfasst eine Wunde eine Schädigung zu einem Gewebe in einem lebenden Organismus. Das Gewebe kann ein inneres Gewebe sein, wie beispielsweise die Magenauskleidung oder ein Knochen, oder ein äußeres Gewebe, wie beispielsweise die Haut. Die Wunde als solche kann ein Gastrointestinaltraktgeschwür, ein gebrochener Knochen, eine Neoplasie und geschnittene oder abgeschürfte Haut um-

fassen, aber ist nicht darauf beschränkt. Eine Wunde kann in einem Weichteil, wie beispielsweise die Milz, oder in einem Hartteil, wie beispielsweise ein Knochen, sein. Die Wunde kann durch irgendein Mittel, einschließlich Verletzung, Infektion oder chirurgischer Intervention verursacht worden sein.

[0108] Wie hierin verwendet, ist ein TS eine Substanz oder Zusammensetzung, die die Wunde bei Anwendung auf eine Wunde versiegelt, wobei dadurch der Blutverlust vermindert und die Hämostase aufrecht erhalten wird. Wir hierin verwendet, ist ein FG eine Zusammensetzung, die aus Rekombinant oder Plasmaproteinen hergestellt ist, die bei Anwendung auf eine Wunde ein Gerinnsel bildet, wobei dadurch die Wunde versiegelt wird, der Blutverlust vermindert wird und die Hämostase aufrecht erhalten wird. FG, vorstehend, ist eine Form von TS.

[0109] Wie hierin verwendet, umfasst ein supplementierter TS irgendein TS, das ohne bedeutende Modifikation als ein Trägervehikel zur Lieferung bzw. Abgabe eines Wachstumsfaktors, eines Arzneimittels oder einer anderen Verbindung oder Gemischen davon dienen kann und das aufgrund von seinen klebenden oder adsorbierenden Eigenschaften einen Kontakt mit der Stelle für eine Zeitdauer aufrecht erhalten kann, die für das supplementierte TS ausreichend ist, um seine gewünschte Wirkung zu erzeugen, zum Beispiel, um Wundheilung zu beschleunigen.

[0110] Wie hierin verwendet, ist ein Wachstumsfaktor-supplementiertes TS ein TS, dem wenigstens ein Wachstumsfaktor mit einer Konzentration zugesetzt wurde, die für seinen besagten Zweck wirksam ist. Der Wachstumsfaktor kann zum Beispiel Wundheilung oder Gewebe(re)generation beschleunigen, fördern oder verbessern. Die Wachstumsfaktor-supplementierten TSs können ebenfalls zusätzliche Komponenten, einschließlich Arzneimittel, Antikörper, Antikoagulanzien und andere Verbindungen enthalten, die: 1) die biologische Aktivität des (der) Wachstumsfaktors(en) in dem TS verstärken, stimulieren oder weitergeben; oder 2) die Aktivitäten von Komponenten des Wachstumsfaktor-supplementierten TS verringern, die die biologische Aktivitäten des (der) Wachstumsfaktors(en) in dem Versiegelungsmittel inhibieren oder zerstören werden; oder 3) verlängerte Abgabe des Supplements von dem TS erlauben; 4) andere wünschenswerte Eigenschaften besitzen.

[0111] Wie hierin verwendet, ist eine verstärkende Verbindung eine Verbindung, die die biologische Aktivität eines Wachstumsfaktors in dem TS weitergibt oder anders steigert. Heparin ist ein Beispiel einer Verbindung, die die biologische Aktivität von HBGF-1 verstärkt.

[0112] Wie hierin verwendet, ist eine inhibierende Verbindung eine Verbindung, die eine delitäre Aktivität einer Komponente des TS inhibiert, mit ihr interferiert oder anders zerstört, die mit der biologischen Aktivität eines Wachstumsfaktors oder von Faktoren in dem TS interferieren oder sie inhibieren. Inhibierende Verbindungen können ihre Wirkung durch Schützen des Wachstumsfaktors vor Abbau ausüben. Eine inhibierende Verbindung inhibiert jedoch nicht irgendwelche Aktivitäten, die für die gewünschten Eigenschaften, wie beispielsweise Wundheilung des Wachstumsfaktor-supplementierten TS, wesentlich sind. Ein Beispiel einer inhibierenden Verbindung ist Heparin.

[0113] Wie hierin verwendet, umfasst ein Wachstumsfaktor irgendeinen löslichen Faktor, der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Geweberegeneration, Zellanziehung, Wundreparatur und/oder irgendeinen Entwicklungs- oder Proliferationsprozess reguliert oder weitergibt. Der Wachstumsfaktor kann durch irgendwelche geeigneten Mittel, einschließlich Extraktion aus natürlichen Quellen, Herstellung durch Synthesechemie, Herstellung durch die Verwendung von rekombinanten DNA-Techniken und irgendwelchen anderen Techniken, einschließlich viral inaktiviertem, Wachstumsfaktor(en)-reichem Plättchen-Releasate hergestellt werden, die dem Fachmann bekannt sind. Der Ausdruck Wachstumsfaktor ist gemeint, irgendwelche Vorläufer, Mutanten, Derivate oder andere Formen davon, die ähnliche biologische Aktivitäten) besitzen, oder eine Untereinheit davon von jenen des Wachstumsfaktors zu umfassen, von denen er abgeleitet oder anderweitig zugehörig ist.

[0114] Wie hierin verwendet, bezieht sich HBGF-1, der dem Fachmann auch unter alternativen Namen, wie beispielsweise Endothelzellenwachstumsfaktor (ECGF) und FGF-1, bekannt ist, auf irgendeine biologisch aktive Form von HBGF-1, einschließlich HBGF-1β, der der Vorläufer von HBGF-1α ist, und anderen gestutzten Formen, wie beispielsweise FGF. U.S. Patent Nr. 4,868,113 von Jayne et al,. das hiermit unter Bezugnahme mit einbezogen ist, legt die Aminosäurensequenzen von jeder Form von HBGF dar. HBGF-1 umfasst folglich irgendein biologisch aktives Peptid, einschließlich Vorläufer, gestutzte oder anders modifizierte Formen, oder Mutanten davon, die die biologischen Aktivitäten zeigen, oder eine Untereinheit davon, von HBGF-1.

[0115] Andere Wachstumsfaktoren können dem Fachmann ebenfalls unter alternativer Nomenklatur bekannt

sein. Dementsprechend umfasst hierin ein Hinweis auf einen besonderen Wachstumsfaktor durch einen Namen auch irgendwelche anderen Namen, durch die ein solcher Faktor dem Fachmann bekannt ist und ebenfalls irgendwelche biologisch aktiven Derivate oder Vorläufer, gestutzte, mutante oder anderweitig modifizierte Formen davon.

[0116] Wie hierin verwendet, bezieht sich eine biologische Aktivität auf eine oder all die Aktivitäten, die mit einem besonderen Wachstumsfaktor in vivo und/oder in vitro verbunden sind. Im allgemeinen zeigt ein Wachstumsfaktor verschiedene Aktivitäten, einschließlich mitogener Aktivität (die Fähigkeit, Zellproliferation zu induzieren oder zu unterstützen) und auch nicht-mitogene Aktivitäten, einschließlich der Fähigkeit, Differenzierung und/oder Entwicklung zu induzieren oder zu unterstützen. Zudem sind Wachstumsfaktoren in der Lage, besondere Zellen zu rekrutieren oder anzuziehen, von denen die Proliferations- und Entwicklungsprozesse ausgehen. Unter geeigneten Bedingungen kann HBGF-1, zum Beispiel, Endothelzellen rekrutieren und deren Gefäßbildung regeln. Aufgrund dieser Aktivität kann ein Wachstumsfaktor-supplementiertes TS dadurch ein Mittel bereitstellen, um die Durchblutung und Nährstoffe zu spezifischen Stellen zu verbessern.

[0117] Wie hierin verwendet, bedeutet verlängerte Langlebigkeit wenigstens einen zweifachen Anstieg in der visuell beobachtbaren, nützlichen in vitro Lebensspanne eines TS.

[0118] Wie hierin verwendet, bedeutet demineralisierte Knochenmatrix (DBM) die organische Knochenmatrix, die verbleibt, nachdem der Knochen mit Salzsäure oder einer anderen Säure entkalkt ist.

[0119] Wie hierin verwendet bedeutet BMPs (bone morphogenetic proteins) eine Gruppe verwandter bzw. betroffener Proteine, die ursprünglich durch ihre Gegenwart in Knochen-induktiven Extrakten von DBM identifiziert sind. Wenigstens 8 betroffene Elemente wurden identifiziert und werden BMP-1 bis BMP-8 genannt. Die BMPs sind ebenfalls unter anderen Namen bekannt. BMP-2- ist ebenfalls als BMP-2A bekannt. BMP-4- ist ebenfalls als BMP-2B bekannt. BMP-3- ist ebenfalls als Osteogenin bekannt. BMP-6- ist ebenfalls als Vgr-1 bekannt. BMP-7 ist ebenfalls als OP-1 bekannt. Mit BMP ist gemeint, dass sie BMP-1 bis BMP-8- umfassen, aber es ist nicht darauf beschränkt.

[0120] Wie hierin verwendet, bedeutet eine Vermehrung eine Verwendung eines supplementierten oder unsupplementierten TS, um die innere oder äußere Oberflächenkontour einer Komponente eines Körpers eines Tiers zu ändern.

[0121] Wie hierin verwendet, ist ein geschädigter Knochen ein Knochen, der gebrochen, frakturiert ist, bei dem ein Teil fehlt, oder ein anderweitig nicht gesunder, normaler Knochen.

[0122] Wie hierin verwendet, ist ein mangelhafter Knochen ein Knochen, der eine ungeeignete Gestalt oder Volumen aufweist, um seine Funktion auszuführen.

[0123] Wie hierin verwendet, kann ein Knochen oder DBM, die verwendet werden muss, um ein TS zu supplementieren, in der Form eines Pulvers, einer Suspension, von Streifen oder Blöcken oder anderen Formen sein, wie benötigt, um ihre gewünschte Funktion auszuführen.

[0124] Wie hierin verwendet, bedeutet Organoid eine Struktur, die aus natürlichen, künstlichen oder einer Kombination aus natürlichen und künstlichen Elementen besteht, das ganz oder teilweise die Funktion eines natürlichen Organs ersetzt. Ein Beispiel wird ein künstlicher Pankreas sein, der aus einem Netzwerk von Kapillaren besteht, die von Zellen umgeben sind, die mit einem Expressionsvektor transfektiert sind, der das Gen für Insulin enthält. Ein derartiges Organoid wird dazu dienen, um Insulin in den Blutstrom eines Patienten mit Typ I Diabetes freizusetzen.

Herstellung eines supplementierten TS.

[0125] Als ein erster Schritt beim praktischen Durchführen irgendeiner der Ausführungsformen der hierin offenbarten Erfindung müssen das Supplement und das TS ausgewählt werden. Das Supplement und das TS können durch dem Fachmann bekannte Verfahren hergestellt werden oder können von deren Lieferanten käuflich erworben werden, oder können gemäß den Verfahren dieser Anmeldung hergestellt werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein Arzneimittel- oder DBM-supplementierter FG hergestellt.

[0126] In irgendeiner der Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann das Supplement zu der Fibrinogen-, der Thrombin-, der Calcium- und/oder der Wasserkomponente(n) zugegeben werden, bevor die ge-

mischt werden, um das TS zu bilden. Alternativ kann das Supplement zu den Komponenten zugegeben werden, während sie gemischt werden, um den TS zu bilden.

[0127] In Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung kann das Calcium und/oder Thrombin von Körperfluiden, wie beispielsweise jene in einer Wunde, endogen geliefert werden Herstellung von TSs.

[0128] In bestimmten Ausführungsformen dieser Erfindung, wie beispielsweise Gefäßprothesen und bei Knochen- und Knorpelvermehrung, aber nicht darauf beschränkt, kann bevorzugt ein TS verwendet werden, der den Zellen erlaubt, in und/oder durch ihn zu wandern.

[0129] Irgendein TS, wie beispielsweise ein kommerziell erhältlicher FG, kann in einigen Ausführungsformen dieser Erfindung verwendet werden. Zum Beispiel können dem Fachmann bekannte FGs (siehe, z. B., U.S. Patent Nrn. 4,627,879, 4,377,572 und 4,298,598, die hier alle unter Bezugnahme mit einbezogen sind) von deren Lieferanten oder Hersteller, wie IMMUNO AG (Wien, Österreich) und BEHRINGERWERKE AG (Deutschland) käuflich erworben werden. Für diese Verwendungen, wie beispielsweise lokalisierte Arzneimittelabgabe ist die besondere Zusammensetzung des ausgewählten TS nicht kritisch, solange es wie gewünscht funktioniert. Kommerziell erhältliche FGs können mit Antibiotika und/oder anderen Arzneimitteln zur Verwendung in den Ausführungsformen dieser Erfindung, einschließlich in vitro Zellproliferation und/oder differentiation; Arzneimittelabgabe usw. supplementiert werden.

[0130] Für die hierin beispielhaft beschriebenen Experimente wurde der FG aus Kryopräzipitat aus frischem, gefrorenem Plasma hergestellt. Die Komponenten des FG, die verwendet wurden, umfassten Fibrinogenkonzentrat; Thrombin; und Calciumionen.

[0131] In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung beträgt die Gesamtproteinkonzentration in dem hergestellten FG etwa 0,01 bis 500 mg/ml FG. In einer bevorzugteren Ausführungsform beträgt die Gesamtproteinkonzentration in dem hergestellten FG etwa 1 bis 120 mg/ml FG. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform beträgt die Gesamtproteinkonzentration in dem hergestellten FG etwa 4 bis 30 mg/ml FG.

[0132] In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung beträgt die Fibrinogenkonzentration, die verwendet wird, um den FG herzustellen, etwa 0,009 bis 450 mg/ml Lösung. In einer bevorzugteren Ausführungsform beträgt die Fibrinogenkonzentration in dieser Vorbereitungslösung etwa 0,9 bis 110 mg/ml. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform beträgt die Fibrinogenkonzentration in dieser Vorbereitungslösung etwa 3 bis 30 mg/ml.

[0133] In einer bevorzugten Ausführungsform beträgt die Thrombinkonzentration, die verwendet wird, um den FG herzustellen, 0,01–350 E/ml. In einer bevorzugteren Ausführungsform beträgt die Thrombinkonzentration 1–175 E/ml. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform beträgt die Thrombinkonzentration 2–4 E/ml.

[0134] Es ist wichtig, dass die Calciumionenkonzentration ausreichend ist, um die Aktivierung des Thrombins zu erlauben. In einer bevorzugten Ausführungsform beträgt die USP Calciumchloridkonzentration 0–100 mM. In einer bevorzugteren Ausführungsform beträgt die USP Calciumchloridkonzentration 1–40 mM. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform beträgt die USP Calciumchloridkonzentration 2–4 mM. In einigen Ausführungsformen dieser Erfindung kann das Calcium durch das Gewebe oder Körperfluide, wie beispielsweise in der Wundverbandausführungsform, geliefert werden.

[0135] Beim Herstellen des TS sollte steriles Wasser zur Injektion verwendet werden.

[0136] Obwohl die Konzentrationen) von Arzneimitteln und anderen Verbindungen in Abhängigkeit der gewünschten Aufgabe abhängen werden, müssen die Konzentrationen groß genug sein, um ihnen zu erlauben, wirksam zu sein, um ihr besagtes Ziel zu erfüllen. In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung beträgt die TET- oder CIP-Konzentration 0,01 bis 300 mg/ml FG. In einer bevorzugteren Ausführungsform dieser Erfindung beträgt die TET- oder CIP-Konzentration 0,01–200 mg/ml. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung beträgt die TET- oder CIP-Konzentration 1–150 mg/ml. Die Menge der zuzugebenden Supplemente kann durch den Fachmann durch Testen verschiedener Konzentrationen und Auswählen von der empirisch bestimmt, die für den beabsichtigten Zweck und die Anwendungsstelle wirksam ist.

[0137] Herstellung von Wachstumsfaktoren zur Verwendung in den Vergleichsbeispielen, die hierin woanders beschrieben sind.

[0138] Der bzw. die Wachstumsfaktoren) oder deren Gemische können durch irgendein dem Fachmann bekannten Verfahren hergestellt werden oder können käuflich erworben werden. Irgendein Wachstumsfaktor kann ausgewählt werden, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, zum Beispiel Wachstumsfaktoren, die die Proliferation und/oder Anziehung bestimmter Zelltypen, wie beispielsweise Endothelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen, glatte Muskelzellen, Hepatocyten, Keratinocyten stimulieren, und/oder Wachstumsfaktoren, die das Wachstum von den gleichen Zelltypen und auch von glatten Muskelzellen inhibieren. Solch eine Wahl kann von der besonderen Gewebestelle, auf die das Wachstumsfaktor-supplementierte TS aufgebracht werden wird und/oder dem Typ der gewünschten Wirkung abhängen. Zum Beispiel kann ein EGF-supplementiertes TS zum Ausbringen auf Wunden in dem Auge und zum Behandeln von Magengeschwüren bevorzugt werden, während ein Osteogenin-supplementiertes TS zum Ausbringen auf Knochenfrakturen und Knochenbrüche bevorzugt sein kann, um deren Heilung zu beschleunigen oder zu fördern.

[0139] In einem Beispiel wurde HBGF-1β hergestellt und zu einem FG zugegeben. HBGF-1β oder HBGF-1α oder irgendeine aktive Form von HBGF-1 kann aus natürlichen Quellen, aus genetisch manipulierten Zellen, die HBGF-1 oder ein Derivat davon exprimieren, oder durch irgendein dem Fachmann bekannten Verfahren aufgereinigt werden.

[0140] HBGF-1β wurde unter Verwendung rekombinanter DNA Methodiken (Jayne et al., U.S. Patent Nr. 4,868,113; Jayne et al., J. Biol. Chem. 262:16612–16617 (1987)) hergestellt. Kurz gesagt, HBGF-1β kodierende DNA wurde in einem prokaryotischen Expressionsvektor, einem pUC9-Derivat, geklont und intrazellulär in E. coli. exprimiert. Das exprimierte Peptid wurde dann aus den Zellen durch Druck unter Verwendung eines Zell-Disrupters freigesetzt, der auf hohen Kompressions-Dekompressions-Cyclen betrieben wurde. Nach der Disruption wurden Zellreste durch Filtration entfernt und HBGF-1β wurde aus dem Überstand unter Verwendung von Standardproteinreinigungsverfahren, einschließlich Affinitätschromatographie auf Heparin Sepharose™, gefolgt durch Ionenaustauschchromatographie auf CM-Sepharose™ gereinigt.

[0141] Zusätzlich zu dem vorstehend beschriebenen HBGF-1 umfassen andere Wachstumsfaktoren, die dem FG zugegeben werden können, HBGF-2, IGF-1, EGF, TGF-β, TGF-α, irgendeinen Plättchenwachstumsfaktor oder -Extrakt, BMPs und Gemische von irgendwelchen Wachstumsfaktoren, sind aber nicht darauf beschränkt. Plättchenextrakte, die als reiche Quellen von Wachstumsfaktoren dienen, können dem TS zusätzlich zu oder anstelle von anderen Wachstumsfaktoren, wie HBGF-1, zugegeben werden.

[0142] In einem anderen Beispiel wird ein durch irgendein dem Fachmann bekannten Verfahren hergestelltes Plättchenextrakt zu einem TS zugegeben. Solch ein Extrakt wurde aus von Plasma abgeleiteten Plättchen zur Verwendung mit FG hergestellt.

[0143] PDWHF kann hergestellt und zu dem FG zugegeben werden (Knigthon et al., Ann. Surg. 204:322–330 (1986)). Kurz gesagt wird zur Herstellung von PDWHG Blut in eine antikoagulierende Lösung abgefüllt, und durch gekühlte Zentrifugation wird Plättchen-reiches Plasma hergestellt. Die Plättchen werden isoliert und mit Thrombin stimuliert, was den Inhalt des alpha-Granualinhalts freisetzt. Die Plättchen werden entfernt und eine wirksame Konzentration des verbleibenden Extrakts wird zu einem TS zugegeben.

Zusätzliche Komponenten von Wachstumsfaktor-supplementiertem TS.

[0144] Weil sie im wesentlichen Plasmafraktionen sind, enthält das TS, das zur Verwendung mit Wachstumsfaktoren beabsichtigt ist, zahlreiche Komponenten, wobei einige von ihnen mit der biologischen Aktivität des ausgewählten Wachstumsfäktors(en) interferieren können. Thrombin, das eine wesentliche FG-Komponente ist, kann, zum Beispiel, als ein proteolytisches Enzym wirken und insbesondere HBGF-1β spalten. Deshalb kann es notwendig sein, zusätzliche Komponenten, wie beispielsweise Protease oder andere Inhibitoren beizufügen, die den ausgewählten Wachstumsfaktoren) vor der Tätigkeit anderer Komponenten in dem TS schützen, die die biologische Aktivität des Wachstumsfaktors(en) interferieren oder zerstören.

[0145] Eine Auswahl besonderer inhibierender Verbindungen) kann empirisch unter Verwendung der nachstehend diskutierten Verfahren bestimmt werden, die die biologische Aktivität des Wachstumsfaktors(en) in dem TS bewerten. Verfahren, um die biologische Aktivität zu bestimmen, sind dem Fachmann bekannt.

[0146] Damit bestimmte Wachstumsfaktoren ihre biologischen Aktivitäten zeigen, kann es zudem notwendig sein, Verbindungen beizufügen, die die , gewünschte Aktivität verstärken oder weitergeben. Heparin verstärkt, zum Beispiel, die biologische Aktivität von HBGF-1 in vivo (siehe, z. B., Burgess et al., Annu. Rev. Biochem. 58:575-606 (1989)).

Arzneimittel-supplementiertes TS

[0147] Die Wachstumsfaktor-supplementierten TS der vorliegenden Erfindung enthalten wenigstens ein Arzneimittel in fester Form, wie hierin woanders beschrieben ist. Sie können ebenfalls andere Arzneimittel, Chemikalien, und Proteine enthalten. Diese können umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt: Antibiotika, wie beispielsweise TET, Ciprofloxacin, Amoxicillin oder Metronidazol, Antikoagulanzien, wie beispielsweise aktiviertes Protein C, Heparin, Prostacyclin (PGI_2), Prostaglandine, Leukotriene, Antithrombin III, ADPase, und Plasminogenaktivator; Steroide, wie beispielsweise Dexamethason; Inhibitoren von Prostacyclin, Prostaglandinen, Leukotrienen und/oder Kininen zur Entzündungsinhibition; kardiovaskuläre Arzneimittel, wie beispielsweise Calciumantagonisten; Chemotaktine; Lokalanästhetika wie beispielsweise Bubivacain; und antiproliferative/Antitumor-Arzneimittel, wie beispielsweise 5-Fluoruracil (5-FU, Taxol und/oder Taxotere. Diese supplementierten Verbindungen können ebenfalls polyklonale, monoklonale oder rekombinante Antikörper oder deren funktionellen Derivate oder Fragmente umfassen. Sie können Antikörper sein, die zum Beispiel, glatte Muskel-Proliferation, wie beispielsweise Antikörper für PDGF, und/oder TGF-β, oder die Proliferation anderer ungewünschter Zelltypen in und um die mit dem TS behandelte Fläche inhibieren. Diese Antikörper können in Situationen nützlich sein, in denen Anti-Krebs-, Anti-Plättchen- oder entzündungshemmende Aktivität benötigt wird. Im allgemeinen kann irgendein Antikörper, dessen Wirksamkeit durch Stelle-gerichtete Lieferung bzw. Abgabe verbessert werden wird, von der Verwendung mit diesem FG-Liefer- bzw. -abgabesystem einen Nutzen ziehen.

Assays zum Bewerten der Wundheilungseigenschaften eines Wachstumsfaktorsupplementierten TS.

[0148] Um zu ermitteln, ob ein besonderes Wachstumsfaktor-supplementiertes TS Wundheilung beschleunigt und um optimale Konzentrationen des Wachstumsfaktors (der Wachstumsfaktoren) auszuwählen, um das gleiche zu bewirken, kann die Zusammensetzung durch jegliche dem Fachmann bekannte Mittel getestet werden (siehe, z. B., Tsuboi et al., J. Exp. Med. 172:245–251 (1990); Ksander et al., J. Am. Acad. Dermatol. 22:781–791 (1990); und Greenhalgh et al., Am. J. Path. 136:1235 (1990)). Irgendein Verfahren, einschließlich sowohl in vivo als auch in vitro Assays, durch die die Aktivität des ausgewählten Wachstumsfaktors (der ausgewählten Wachstumsfaktoren) in der TS-Zusammensetzung bewertet werden können, können verwendet werden. Die Aktivität von HBGF-1β wurde, zum Beispiel, unter Verwendung von zwei unabhängigen in vitro Assays bewertet. In dem ersten wurde die Proliferation von Endothelzellen gemessen, die in einer flachen Fluidschicht suspendiert worden waren, die eine Kunststoffoberfläche bedeckte, die mit Wachstumsfaktor-supplementiertem FG imprägniert worden war. In dem zweiten wurde der Einbau von ^{3}H-Thymidin in kultivierten Fibroblasten in der Gegenwart von HBGF-1 gemessen.

[0149] In einem in vivo Assay wurde ein FG, der mit HBGF-1β supplementiert worden war, unter Verwendung von Mäusen als ein Modellsystem auf seine Fähigkeit getestet, Wundheilung in vivo zu fördern. In diesem Verfahren wurden identische Stanzbiopsien in der Rückenregion von Mäusen durchgeführt, die dann in Test-, behandelte Kontroll- und unbehandelte Kontrollgruppen getrennt wurden. Die Wunden an den Mäusen in der Testgruppe wurden mit dem Wachstumsfaktor-supplementierten TS behandelt. Die Wunden an den Mäusen in der behandelten Kontrollgruppe wurden mit unsupplementiertem TS behandelt. Die Wunden in der unbehandelten Gruppe wurden nicht mit TS behandelt. Nach einer Zeit, die zum Fortschreiten von detektierbarer Wundheilung ausreichend war, im Allgemeinen eine Woche bis zehn Tage, wurden die Mäuse geopfert und das Wundgewebe wurde mikroskopisch untersucht, um das Wundreparaturausmaß in jeder Gruppe histologisch zu bewerten.

[0150] Die Fähigkeit des Wachstumsfaktor-supplementierten TS, Zellproliferation zu induzieren und Zellen zu rekrutieren, kann ebenfalls durch dem Fachmann bekannte in vitro Verfahren bewertet werden. Die zum Messen der biologischen Aktivität von Wachstumsfaktoren vorstehend beschriebenen und in den Beispielen detailliert beschriebenen in vitro Assays können, zum Beispiel, verwendet werden, um die Aktivität des Wachstumsfaktors in der TS-Zusammensetzung zu testen. Zudem können ebenfalls die Wirkungen vom Zusetzen von inhibierenden und/oder verstärkenden Verbindungen bewertet werden.

[0151] Im Allgemeinen kann die Notwendigkeit der Zugabe inhibierender und/oder verstärkender Verbindungen empirisch bestimmt werden. In den nachstehend beschriebenen Experimenten wurde, zum Beispiel, der HBGF-1β in HBGF-1 supplementiertem FG insbesondere in einer stochastischen Weise mit der Unterstellung gespalten, dass eine Komponente der FG-Zubereitung, höchstwahrscheinlich Thrombin, verantwortlich war. Heparin, von dem bekannt ist, dass es an HBGF-1 bindet und ihn vor bestimmten proteolytischen Aktivitäten schützt, wurde zu dem HBGF-1-supplementierten FG zugegeben. Der Zusatz von relativ geringen Heparin-Konzentrationen schützte HBGF-1β vor einer Spaltung, die seine biologische Aktivität in dem FG zerstören

wird. Deshalb müssen TS-Zusammensetzungen, die HBGF-1 umfassen, Heparin oder irgendeine andere Substanz umfassen, die die Spaltung von HBGF-1 durch Thrombin oder eine andere proteolytische Verbindungen des FG inhibiert.

[0152] In ähnlicher Weise kann die Fähigkeit eines ausgewählten Inhibitors, einen Wachstumsfaktor vor Abbau durch TS-Komponenten zu schützen, durch irgendein dem Fachmann bekannten Verfahren bewertet werden. Heparin wurde, zum Beispiel, auf seine Fähigkeit getestet, HBGF-1-Spaltung durch Thrombin zu inhibieren, das eine wesentliche FG-Komponente ist. Um dies zu tun, wurden Gemische mit verschiedenen Konzentrationen von Heparin und HBGF-1-supplementiertem FG hergestellt und für verschiedene Zeitdauern inkubiert. Die biologische Aktivität von HBGF-1 in dem Gemisch wurde getestet und die Integrität des HBGF-1 wurde unter Verwendung von Western Blots mit SDS- (Natriumdodecylsulfat-) Gelen festgestellt. Relativ geringe Konzentrationen, etwa 1:1 Molverhältnis von Heparin:HBGF-1, sind ausreichend, um HBGF-1 vor Abbau in einem FG zu schützen.

[0153] Es kann ebenfalls empirisch bestimmt werden, ob eine besondere Verbindung verwendet werden kann, um die biologische Aktivität eines Wachstumsfaktors (von Wachstumsfaktoren) in einem TS zu verstärken, weiterzugeben oder zu verbessern.

Topische oder innere Anwendung des Wachstumsfaktor-modifizierten TS auf eine innere oder äußere Wunde.

[0154] Vor einer klinischen Verwendung werden der Wachstumsfaktor und das TS oder das Wachstumsfaktor-supplementierte TS pasteurisiert oder anderweitig behandelt, um irgendwelche pathogenen kontaminierenden Substanzen, wie beispielsweise Viren, zu inaktivieren. Verfahren zum Inaktivieren von kontaminierenden Substanzen sind dem Fachmann wohlbekannt und umfassen Lösungsmittel-Detergensbehandlung und Wärmebehandlung, sind aber nicht darauf beschränkt (siehe z. B. Tabor et al., Thrombosis Res. 22:233–238 (1981) und Piszkiewicz et al., Transfusion 28:198–199 (1988)).

[0155] Das supplementierte TS wird direkt auf die Wunde, anderes Gewebe oder einen anderen gewünschten Ort angewendet bzw. aufgebracht. Es kann typischerweise für äußere Wunden direkt durch irgendwelche Mittel aufgebracht werden, einschließlich über die Wunde versprühen. Es kann ebenfalls intern angewendet werden, beispielsweise während einer chirurgischen Prozedur. Wenn es intern angewendet bzw. aufgebracht wird, beispielsweise auf Knochen, löst sich das Gerinnsel schrittweise mit der Zeit.

[0156] Die folgenden Beispiele sind nur zum Zweck der Veranschaulichung beigefügt und sollen nicht den Schutzumfang der Erfindung beschränken. Die Beispiele, die mit einem Stern * markiert sind betreffen wenigstens teilweise unsupplementiertes TS oder Wachstumsfaktorsupplementiertes TS, die außerhalb des Schutzumfangs der vorliegenden Erfindung sind. Zu diesem Ausmaß sind die Beispiele Vergleichsbeispiele, die zum Verständnis der Erfindung nützlich sind.

Beispiel 1 *

Herstellung von HBGF-1 zur Supplementierung eines FG.

[0157] Eine 800 ml Kultur aus rekombinanten E. coli wurde hergestellt, die ein Plasmid enthält, das HBGF-1β kodierende DNA umfasst. Nach Induktion und Kultivieren für 24 Stunden bei 37°C, wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zell-Pellet wurde in 25 ml 20mM Phosphat-Puffer resuspendiert, der 0,15 M NaCl, pH 7,3 umfasste. Die suspendierten Zellen wurden mit einen Zell-Disruptor auseinandergebrochen und die Zellreste wurden von der resultierenden Lösung durch Zenrifugation bei 5000 g für 20 Min. getrennt.

[0158] Das Pellet wurde verworfen und der Überstand, der den löslich gemachten HBGF-1β und andere Bakterienproteine enthielt, Wurde auf eine 2,6 cm Durchmesser aufweisende und 10 cm hohe Heparin-Sepharose™-Säule (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Schweden) geladen. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen 0,15 M NaCl in 20 mM Phosphat-Puffer, pH 7,3 gewaschen, und dann mit einem 0,15 M NaCl in 20 mM Phosphat-Puffer bis 2,0 M NaCl-Gradienten eluiert.

[0159] Das Eluat wurde durch UV Absorption bei 280 nm überwacht. Drei Peaks von UV absorbierendem Material wurden eluiert und durch SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Peak Nummer Drei elektrophorisierte als eine einzelne Bande bei etwa 17.400 Dalton und enthielt im Wesentlichen reines HBGF-1β.

[0160] Um weiterhin sicher zu stellen, dass das HBGF-1β frei von kontaminierenden Bakterienproteinen war, wurde Peak Nummer Drei, der die Wachstumsfaktoraktivität enthielt, über Nacht gegen 20 mM Histidin, 0,15 M NaCl, pH 7,5 dialysiert. Zwei mg Protein wurden auf eine 1 ml CM-Sepharose™ (Pharmacia, Upsala, Schweden) Ionenaustauschsäule geladen. Die Säule wurde mit zehn Bett- bzw. Schichtvolumen (0,5 ml/Min.) 20 mM Histidin, 0,15 M NaCl, pH 7,5 gewaschen und mit einem Gradienten von 0,15 M NaCl bis 1,0 M NaCl in 20 mM Histidin, pH 7,5 eluiert. Das Eluat wurde durch UV Absorption bei 280 nm überwacht und HBGF-1β wurde durch SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese identifiziert.

[0161] Dieses gereinigte HBGF-1β wurde verwendet, um FG in anschließenden Beispielen zu supplementieren.

Beispiel 2 *

Stabilität von HBGF-1β

[0162] Es war notwendig, dem FG einen Zusatzstoff zuzugeben, welcher die Digestion bzw. Verdauung von HBGF-1β durch Thrombin, das eine Komponente des FG ist, inhibieren oder verhindern wird (Lobb, Biochem. 27:2572–2578 (1988)). Heparin, das an HBGF-1 adsorbiert, wurde ausgewählt und getestet, um zu bestimmen, ob es HBGF-1 vor Digestion bzw. Verdauung durch Thrombin oder irgendwelchen anderen proteolytischen Verbindungen des FG schützen könnte. Die Stabilität von HBGF-1 wurde in der Gegenwart von ansteigenden Heparin-Konzentrationen bewertet.

[0163] Lösungen, die HBGF-1β (10 µg/ml), Thrombin (250 E/ml), und ansteigende Heparin-Konzentrationen (0, 0,5, 5, 10, 20 und 50 E/ml) enthielten, wurden bei 37°C inkubiert. Aliquote wurden periodisch aus den inkubierenden Lösungen entnommen und wurden für weitere Tests bei –70°C eingefroren und gelagert.

[0164] Nachdem die Inkubation vollendet war, wurden die Proben aufgetaut und auf 15% SDS Polyacrylamid Gelen unter reduzierenden Bedingungen gemäß dem Verfahren nach Laemmli (Nature 227:680 (1970)) getrennt. Das Gel wurde dann auf Nitrozellulose elektrogeblottet und die HBGF-1 entsprechende Bande wurde unter Verwendung eines Affinität-gereinigten polyklonalen Kaninchenserums als HBGF-1 identifiziert. Die Western Blots, auf denen die HBGF-1β-Bande bei 17,4 kDa gesehen werden kann, sind in **Fig. 1** gezeigt. Die Resultate zeigten, dass HBGF-1β in der Gegenwart von so geringen Heparin-Konzentrationen wie 5 E/ml vor Digestion bzw. Verdauung durch Thrombin geschützt war. Wie in Beispiel 3 beschrieben ist, wurde zudem seine biologische Aktivität nicht verändert.

Beispiel 3 *

Die biologische Aktivität von HBGF-1β nach Inkubation in der Gegenwart von Heparin und Thrombin

[0165] Die biologische Aktivität von HBGF-1 in dem Inkubationsgemisch, das 5 E/ml Heparin enthielt und in Beispiel 2 beschrieben wurde, wurde unter Verwendung eines ^{3}H-Thyimidin Einbau Assays mit NIH 3T3 Zellen gemessen.

[0166] NIH 3T3 Zellen wurden in Platten mit 96 Vertiefungen eingebracht und bei 37°C unter Nährstoffinangelbedingungen in Dulbecco's Modifiziertem Medium (DMEM; GIBCO, Grand Island, New York) mit 0,5 % fötalem Rinderserum (BCS; GIBCO, Grand Island, New York) inkubiert, bis die Zellen 30 bis 50 % Konfluenz erreichten. Zwei Tage später wurden variierende HBGF-1-Verdünnungen aus den in Beispiel 2 hergestellten Proben zu jeder Vertiefung ohne Änderung des Mediums zugegeben. Verdünnungsmittel (Inkubationspuffer) wurde anstelle vom Wachstumsfaktor für die Negativkontrollen zugegeben und DMEM mit 10 % BCS, das für Wachstum benötigte Wachstumsfaktoren enthielt, wurde anstelle der HBGF-1-Probe für die Positivkontrollen zugegeben.

[0167] Nach 18-stündiger Inkubation bei 37°C wurden 0,25 µCi ^{3}H-Thymidin, spezifische Aktivität 6,7 µCi/mol, zu jeder Vertiefung zugegeben und die Inkubation wurde bei 37°C für 4 zusätzliche Stunden fortgeführt. Die Platten wurden mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gespült und mit 0,5 ml kalter 10%iger Trichloressigsäure (TCA) 15 Min. lang bei 4°C fixiert. Die TCA wurde entfernt, die Platten wurden mit PBS gespült und das säurefällbare Material wurde mit 0,5 ml/Vertiefung 0,1 N Natronlauge 1 Stunde lang bei Raumtemperatur löslich gemacht. Die Proben wurden in Szintillationsvials überführt und 10 ml Szintillationsfluid (New England Nuclear, Aquasure™) wurde pro Vial zugegeben.

[0168] Die Resultate, die in Fig. 2 gezeigt sind, demonstrierten, dass HBGF-1, der in der Gegenwart von Thrombin und Heparin inkubiert worden war, seine biologische Aktivität behielt. Die beobachtete Konzentrationsabhängigkeit vom Thymidineinbau war von der Inkubationszeit unabhängig und sie war typisch für die, die für die Abhängigkeit von Proliferation von Zellen als eine Funktion der Wachstumsfaktorkonzentration erwartet wird. Wachstumsfaktoren zeigen typischerweise eine optimale Konzentration, bei der die Zellproliferation maximal ist.

[0169] Die biologische Aktivität von HBGF-1 in der Gegenwart von Thrombin und Heparin wurde ebenfalls durch Beobachten von Endothelzellproliferation gemessen. Die Oberflächen von Petrischalen wurden mit dem HBGF-1-supplementierten FG imprägniert. Eine flache Schicht von Endothelzellen wurde zugegeben und die Anzahl von Zellen wurde gemessen. Mit der Zeit nahm die Anzahl von Zellen zu. Zudem schienen sich die Zellen in Gefäßen zu organisieren.

[0170] Deshalb behält HBGF-1 seine biologischen Aktivitäten in einem FG, der Heparin umfasst, welches HBGF-1 vor der Abbauaktivität von Thrombin schützt und ebenfalls die biologische Aktivität von dem HBGF-1 in dem Wachstumsfaktor-supplementierten TS verstärken kann.

Beispiel 4 *

HBGF-1-Diffusion aus einem FG-Gerinnsel

[0171] Ein FG-Gerinnsel wurde in einem 5 ml Kunststofftestrohr durch Mischen von 0,3 ml des 10 E/ml Heparin enthaltenden Fibrinogen-Komplexes und Thrombin und 40 mM $CaCl_2$ gebildet. Vier Testrohre wurden wie folgt aufgebaut:

(A) 0,5 E/ml Thrombin und 10 µg/ml HBGF-1;
(B) 0,5 E/ml Thrombin und 50 µg/ml HBGF-1;
(C) 5 E/ml Thrombin und 10 µg/ml HBGF-1; und
(D) 5 E/ml Thrombin und 50 µg/ml HBGF-1.

[0172] Jedes Gerinnsel wurde mit 0,2 M Histidinpuffer, pH 7,3 bedeckt. 30 µl Stichproben des überstehenden Puffer wurden von jedem Rohr alle zwei Stunden entnommen und auf einem Western Blot laufen gelassen.

[0173] Die Resultate des Experiments demonstrierten, dass HBGF-1-Diffusion aus dem Gerinnsel eine Funktion von Zeit und seiner Konzentration in dem Gerinnsel ist, und dass die Thrombinkonzentration in dem Gerinnsel nicht die Geschwindigkeit beeinflusst, mit der HBGF-1 aus dem Gerinnsel freigegeben wird.

Beispiel 5 *

Das Verhalten menschlicher Umbilikal-Venenendothel-Zellen in Wachstumsfaktorsupplementiertem FG: Die Wirkung von Wildtyp- und mutantem FGF-1

[0174] Um die in vitro Wirkungen eines sauren Fibroblasten-Wachstumsfaktors (FGF-1)-supplementierten FG auf menschliche Endothelzellen zu untersuchen, wurden Suspensionen dieser Zellen zu Petrischalen mit 10 cm Durchmesser zugegeben, die gleichmäßig verteilte Schichten aus 2,5 ml FG enthielten, der etwa 9 mg Fibrinogen pro ml und 0,25 NIH Einheiten Thrombin pro ml enthielt. Der FG wurde auf die folgenden Weisen supplementiert:

(A) Kein Wachstumsfaktor zugesetzt;
(B) Mit 100 ng/ml aktivem, Wildtyp FGF-1 supplementiert;
(C) Mit 100 ng/ml inaktivem, mutantem FGF-1 supplementiert; oder
(D)Mit 10 ng/ml aktivem, Wildtyp FGF-1 supplementiert.

[0175] Die auf der FG-Schicht kultivierten Zellen wurden 7 Tage lang in DMEM gehalten, das 10% fötales Rinderserum (FBS) enthielt.

[0176] Die Zellen wurden länglich und proliferierten effizient, wenn sie in Kontakt mit einem FG waren, der mit biologisch aktivem FGF-1 supplementiert war (Fig. 3 und Fig. 4). In Kontakt mit unsupplementiertem FG (Fig. 5) oder mit FG, der mit biologisch inaktivem, mutantem FGF-1 supplementiert war (Fig. 6), wurden die Zellen länglich, aber proliferierten relativ langsam.

Beispiel 6 *

Das Verhalten von menschlichen Umbilikal-Venendothel-Zellen in FGF-1-supplementiertem FG

[0177] Um ihr Wachstum zu untersuchen, wurden menschliche Umbilikalendothelzellen, 10^5 oder mehr Zellen pro ml, in einen FG eingebettet, dessen Protein-Konzentration 4 mg/ml betrug. Die Thrombin-Konzentration in dem FG wurde auf 0,6 NIH E/ml eingestellt. Das in allen Experimenten verwendete Kulturmedium war M199 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), das mit 10% fötalem Rinderserum, 10 µg/ml Streptomycin, 100 E/ml Penicillin, 1 ng/ml FGF-1 und 10 E/ml Heparin supplementiert war.

[0178] Innerhalb von 24 Stunden im FG wurden die Zellen länglich, multipodial und bildeten ein zelluläres Netzwerk, wenn sie in Kontakt miteinander kamen (**Fig. 7**). Dieses Wachstum dauerte für wenigstens 5 Tage an. **Fig. 8** zeigt diese Situation bei 48 Stunden.

[0179] Als Kontrolle wurde eine identische Zellsuspension auf einer Oberfläche kultiviert, die mit Fibronektin bei 10 µg/cm^2 bedeckt war. Die Kontrollzellen erlangten eine Pflastersteingestalt und behielten diese Morphologie wenigstens 5 Tage bei. **Fig. 9** und **Fig. 10** zeigen diese Situation bei 24 bzw. 48 Stunden.

Beispiel 7

Das Verhalten von PMEXNEO-3T3-2.2 Zellen im FG

[0180] PMEXNEO-3T3-2.2 Zellen sind Fibroblastzellen, die ein modifiziertes Genom mit dem Potential enthalten, genmanipulierte Proteine zu exprimieren (Forough et al., J. Biol. Chem. 286:2960–2968 (1993)). Um das Verhalten dieser Zellen im FG zu bestimmen, wurden 10^5 Zellen pro Vertiefung unter drei Bedingungen kultiviert: (1) im FG eingebettet; (2) auf der Oberfläche des FG; und (3) in der Abwesenheit von FG (Kontrollen). Die Experimente wurden in Platten mit 24 Vertiefungen in DMEM-Medien (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) zweifach durchgeführt, die mit 10 % FBS supplementiert waren. Die FG-Proteinkonzentration betrug 4 mg/ml. In identischen Experimenten wurde das Medium, das mit 1,5 % FBS supplementiert war, als Negativkontrollen verwendet.

[0181] In Gegenwart von mit 10% FBS supplementierten Medien wuchsen die Zellen in allen 3 Gruppen und wurden zusammenlaufend. In den Negativkontrollexperimenten, in denen die Medien mit 1,5% FBS supplgmentiert waren, wuchsen die Zellen und überlebten wenigstens fünf Tage in der Gegenwart vom FG, aber nicht ohne ihn. Ihr Wachstum war jedoch im FG, der mit 10 % FBS supplementiert war, schneller als in dem, der mit 1,5 % FBS ergänzt war. In Abwesenheit vom FG, in den Medien, die mit 1,5% FBS supplementiert waren, starben die Zellen innerhalb von 48 Stunden. Das Kriterium zum Überleben war die Fähigkeit der getesteten Zellen, nach dem Überführen zu frischen, mit 10 % FBS supplementierten Medien zu proliferieren.

Beispiel 8 *

Die Endothelialisierung von expandierten Polytetrafluorethylea-Transplantaten durch Vorbehandlung mit HBGF-1

[0182] Zwei Untersuchungen demonstrierten, dass eine Vorbehandlung Blut-kontaktierter Biomaterialien mit Endothelzell(EC)Mitogenen die Endothelialisierung verbesserte. Die erste Untersuchung prüfte die in vivo Auswaschmerkmale einer HBGF-1-supplementierten FG-Suspension, die auf expandierte Polytetrafluorethylen (PTFE)-Transplantate aufgebracht wurde, die in Kaninchen-Aortas implantiert waren. In der zweiten Untersuchung wurden ähnliche Transplantate in der aorto-ilikalen Position in Hunden implantiert. HBGF-1, ein angiogenetischer Faktor, wurde in Untersuchungen verwendet. Andere Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise FGF, FGF-4 und/oder OP-1, können ebenfalls als ein Supplemente) für die Gefäßtransplantate verwendet werden.

A. Auswaschuntersuchung

[0183] Im allgemeinen wurde der modifizierte Fibrin-Kleber durch Zugeben von etwa 1 ng/cm^2 Fläche der inneren und äußeren Transplantatoberfläche von menschlichem, rekombinantem ^{125}I-HBGF-1, 20 µg/cm^2 Schweinedarmschleimhautheparin und 2,86 mg/cm^2 Fibrinogen zu 2,86 × 10^2 E/cm^2 wieder hergestelltem bzw. zur ursprünglichen Konzentration verdünntem, kommerziell erhältlichem Humanthrombin (1000 E/ml) steril hergestellt, um die Polymerisation zu induzieren.

[0184] Das ^{125}HBGF-1 wurde insbesondere folgendermaßen hergestellt. Fibrinogen wurde durch Zugeben von 500 mg Fibrinogen in 25 ml PBS wieder hergestellt bzw. zur ursprünglichen Konzentration verdünnt, um eine Fibrinogen-Konzentration von 20 mg/ml PBS herzustellen. 3 ml dieser Lösung, die 60 mg Fibrinogen enthielt, wurden in 12 Eppendorf-Kunststoffröhrchen gegeben und bei –70°C gehalten. Jeder dieser Aliquote wurde einzeln verwendet.

[0185] Das Thrombin wurde durch Verdünnen einer kommerziell erhältlichen Zubereitung davon (Armour Pharmaceutical Co., Kanakee, IL) bei einer Konzentration von 1000 E/ml um einen Faktor von 1:10 in steriler Lösung wieder hergestellt bzw. zur ursprünglichen Konzentration verdünnt, um eine Konzentration von 100 E/ml herzustellen. Diese Thrombinlösung wurde nochmals 1:10 verdünnt, um eine Lösung von 10 E/ml herzustellen.

[0186] Das Rinderheparin (Upjohn, Kalamazoo, MI) wurde durch Verdünnen der Zubereitung mit einer Konzentration von 1000 E/ml um einen Faktor von 1:1000, unter Verwendung von normaler Salzlösung, wieder hergestellt bzw. zur ursprünglichen Konzentration verdünnt.

[0187] 1 und 48/100 (1,48) ml des wieder hergestellten bzw. zur ursprünglichen Konzentration verdünnten Fibrinogens und 63 µl des wieder hergestellten bzw. zur ursprünglichen Konzentration verdünnten Heparins und 15,66 µL ^{125}I-HBGF-1 wurden in einem Glasszintillationsrohr gemischt. Dieses Gemisch wurde dann in eine 3 ml Kunststoffspritze abgezogen. 5 ml des wieder hergestellten bzw. zur ursprünglichen Konzentration verdünnten Thrombins wurden in einem Glasszintillationsrohr gegeben.

[0188] Ein Ende des expandierten PTFE-Transplantats wurde über eine Kunststoff-3-Wege-Auslaßöffnung mit Hahn angeordnet und dort mit einem 2–0 Seidenband befestigt. Das PTFE wurde dann mit einem 3 × 3 cm Parafilm^{TM}-Quadrat umschlossen, das dann dort mit einer geraden Gefäßklemme gefältelt wurde, um eine wasserdichte Abdichtung herzustellen. Ein zweites 2–0 Seidenband wurde über dem Parafilm, benachbart zu dem Kükenhahn, angeordnet, um eine weitere Abdichtung zu bilden. Eine gerade Gefäßklemme wurde dann verwendet, um die distalen 2 mm des PTFE/Parafilms zur Abdichtung dieses Ende festzuklemmen.

[0189] Gleiche Volumina der oben beschrieben hergestellten Fibrinogen- und Thrombinlösung wurden gemischt und es wurde ihnen erlaubt, für etwa 30 Sekunden zu reagieren, das heißt, bis eine Polymerisation auftritt. Das Thrombin-polymerisierte Fibrin ist undurchsichtig. (Dieser Zeitfaktor ist approximativ und variiert von einer Thrombincharge zur anderen. Die zur Polymerisation geeignete Zeitspanne kann durch Beobachten der Opazität des Gemischs bestimmt werden). Das Fibrin/Thrombin-Gemisch wurde in 1 cm^3 Spritze aufgezogen. (Bemerkung: Das Volumen dieses Transplantats betrug 0,42 ml. Für ein Transplantat mit größerem Volumen muss man eine größere Spritze verwenden.) Die Spritze wurde an den Hahn angeschlossen und das Gemisch wurde manuell während einer Zeitdauer von 5 Sekunden injiziert, bis die Flüssigkeit als „ausschwitzend" durch die PTFE-Zwischenräume angesehen wurde und den Raum zwischen dem PTFE und Parafilm^{TM} füllte. Der 3-Wege-Hahn wurde zu dem PTFE-Transplantat 3 Minuten lang geschlossen und eine Skalpellklinge wurde verwendet, um eine Ligatur am Ende des PTFE über dem Hahn zu schneiden. Der PTFE-Transplantat/Parafilm wurde von dem Hahn entfernt und eine Gefäßklemme wurde verwendet, um das PTFE aus dem Parafilmumschlag zu entfernen. Um restlichen Wachstumsfaktorsupplementierten FG von dem Tranplantatlumen zu beseitigen, wurde eine Zahl 3 Embolektomiekatheter durch das Tranplantat fünfmal geleitet, bis das Tranplantatlumen vollständig klar war. Dem mit Wachstumsfaktor-supplementierten FG behandelten PTFE-Transplantat wurde erlaubt, über Nacht für etwa 12 Stunden unter einer Laminarströmungshaube zu trocknen. Das behandelte Transplantat war dann bereit zur Implantation.

[0190] Alternativ wurde dieser HBGF-supplementierte FG in ein 34 mm (24 mm + 5 mm an jedem Ende) × 4 mm (innerer Durchmesser), dünnwandiges, expandiertes PTFE-Transplantat mit Druck perfundiert, wodurch er die Tranpantatlumenoberflächen bedeckte und sich durch die Knoten der Tranplantataußenoberflächen erstreckte. Das Lumen des Transplantats wurde wie vorstehend erwähnt gereinigt. Diese Transplantate wurden dann in die infrarenalen abdominalen Aorten von 24, 3 – 5 kg weißen Neuseelandkaninchen eingeschoben. In der ersten Untersuchung wurden die Kaninchen geopfert und Untersuchungsmaterial wurde bei einer Zeit 0 (zur Korrektur von Verlusten aufgrund von chirurgischer Manipulation) und nach 5, 30 und 60 Min., und 1, 7, 14 und 30 Tagen explantiert. Restliche Radioaktivität wurde durch Gamma-Zählung bestimmt. Verbleibender ^{125s}I-HBGF-1, der für spontanen Zerfall korrigiert wurde, ist als Prozent des Wertes für den Nullpunkt ausgedrückt.

[0191] Das Auswaschen von ^{125}I-HBGF-1 folgte klassischen Kinetiken mit einem schnellen Anfangsverlust mit der Wiederherstellung von Zirkulation (%/Min = –24,1 zwischen 5 und 60 Minuten), gefolgt von einem langsa-

men Verlust nach 1 Std. (%/Min = 0,03), wobei 13,4% ± 6,9% nach 1 Woche erhalten blieb, und wobei 3,8% ± 1,1% nach 30 Tagen erhalten blieb.

B. In vivo Endothelialisierungsuntersuchung

[0192] Die zweite Untersuchung bewertete die Wirkungen der angewendeten bzw. aufgebrachten HBGF-1 supplementierten FG-Suspension auf die Geschwindigkeit von Endothelialisierung von breit expandierten 60 µm internodaler Distanz expandierten PTFE-Transplantaten, die in Hundeaorto-ilikalen Positionen implantiert wurden; die Proliferationsaktivität dieser Endothelzellen als eine Funktion der Zeit; und die relativen Beiträge von dem HBGF-1 und dem FG beim Stimulieren der beobachteten Endothelzellproliferation. Drei Gruppen von 50 × 4 mm unverstärkten expandierten PTFE-Transplantaten wurden in der aorto-ilikalen Position von 12 Hunden implantiert. Gruppe 1 (n = 6) enthielt 20 µg/cm^2 Heparin, 2,86 mg/cm^2 Fibrinogen und 2,86 × 10^2 E/cm^2 Humanthrombin und 1 ng/cm^2 HBGF-1. Gruppe 2 (n = 3) enthielt den gleichen FG ohne HBGF-1. Gruppe 3 (n = 3) bestand aus identischen, aber unbehandelten Kontrolltransplantaten. Tritiiertes Thymidin (^{3}H-TdR; 0,5 µCi/kg) wurde 10 Stunden vor Explantation injiziert. Die Transplantate wurden bei 7 und 28 Tagen für Licht- und Elektronenmikroskopie, Faktor VIII Immunohistochemie, und en face Autoradiographie für Endothelzellenproliferation in Zufallshochleistungsfeldern explantiert. Jedes Tranplantat wurde durch drei „blinde" Beobachter angesehen, die nicht wussten, aus welcher Behandlungsgruppe das Transplantat stammte. Die Unterschiede in der Endothelzellproliferation wurden statistisch durch Zweiweg ANOVA und unabhängige t-Tests analysiert.

[0193] Bei 7 Tagen zeigten 33 % sowohl die Transplantate mit FG- als auch HBGF-1-supplementiertem FG nicht-angrenzende Foci von Endothelzellen (**Fig. 11**). Die Oberfläche der Kontrolltransplantate behielt ein Fibrinkoagulum. Bei **28** Tagen zeigte jeder HBGF-1-supplementierte FG ausgedehnte Kapillareinwüchse und zusammenlaufende endothelialisierte Blut-berührende Oberflächen; die nicht in irgendeinem Untersuchungsmaterial der anderen zwei Gruppen gesehen wurde (**Fig. 11** und **Fig. 12**). **Fig. 12** zeigt, dass unbehandelte Transplantate bei 28 Tagen wenige sichtbare Endothelzellen auf der Oberfläche aufwiesen (Platte G). Transplantate, die mit FG alleine behandelt waren, wiesen eine Oberfläche auf, die zu etwa 33% mit Endothelzellen bedeckt war, was zeigt, dass eine FG-Behandlung alleine eine Reendothelialisierung unterstützte (Platte H). Transplantate, die mit FG behandelt waren, der mit HBGF-1 supplementiert war (Platte n schienen jedoch vollständig (> 95 %) mit Endothelzellen bedeckt zu sein, die die charakteristische Pflasterstein-Morphologie zeigen. Daher war die Kombination von durch FG abgegebenen Wachstumsfaktoren in der Lage, im wesentlichen die vollständig Bedeckung des Gefäßtransplantats mit einer nicht-thombogenen Endothelzelllinie zu unterstützen. En face Autoradiographie zeigte einen statistisch signifikanten Anstieg ($p < ,05$) beim ^{3}H-TdR Einbau in die DNA von Endothelzellen in den Transplantaten mit HBGF-1-supplementiertem FG bei 28 Tagen gegenüber allen anderen Gruppen sowohl als Funktion von Zeit als auch der Transplantatbehandlung.

[0194] Diese Daten demonstrieren, dass eine Druckperfusion einer HBGF-1 supplementierten FG-Suspension in 60 µ internodaler Distanz expandierten PTFE-Tranplantaten eine Endothelialisierung durch Kapillareinwüchse und erhöhte EC-Proliferation förderte.

[0195] Diese Untersuchungen demonstrieren eine verbesserte spontane Reendothelialisierung von Gefäßtransplantaten mit kleinem Durchmesser, und ebenfalls ein Verfahren zum Stimulieren einer schnelleren Konfluenz von transplantierten Endothelzellen.

Beispiel 9 *

Die Herstellung eines Thrombozytenextrakts zur Verwendung mit FG

[0196] Plasma-reduzierte Plättchen wurden hergestellt und pelletiert. Das überstehende Plasma wurde entfernt. Die pelletierten Plättchen wurden gewaschen, in einen Puffer suspendiert, der 50 mM Histidin und 0,15 M Natriumchlorid bei pH 6,5 enthielt, und mit Rinderthrombin behandelt. Nach der Behandlung wurde der Überstand durch Zentrifugation gesammelt, und Aliqote wurden bei –80 °C eingefroren. Das Extrakt wurde aufgetaut und mit einem FG oder anderen TSs gemischt.

[0197] Das auf dieser Weise erhaltene Plättchenextrakt war biologisch aktiv, weil es den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in DNA von proliferierenden NIH3T3 Fibroblasten im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte.

[0198] Um die Wirkung des Plättchenextrakts auf Wundheilung zu bewerten, wurden Experimente, die identisch sind zu jenen, die nachstehend in Beispiel 10 mit HBGF-1beta ausgeführt wurden, mit Plättchenextrakt

in zuckerkranken Mäusen durchgeführt. Aus den Resultaten dieser Experimente ist klar, dass bei der gegebenen geringen Konzentration von Wachstumsfaktoren in dem Plättchenextrakt eine Dosis, die größer ist als 100 µg Plättchenextraktprotein pro Wunde, verwendet werden muss, um Wundheilung zu fördern.

Beispiel 10

Die Wirkung vom FG auf Hautwundheilung in vivo

Materialien und Verfahren

A. Unsupplementierter FG *

Tiere

[0199] Weibliche C57BL/K_SJ-db/db Mäuse wurden von Jackson Laboratories (Bar Harbor; ME) erhalten und waren bei Beginn des Experiments 8 bis 12 Wochen alt. Sie wurden nach dem chirurgischen Eingriff in getrennten Käfigen in einer Tierpflegeanlage untergebracht.

[0200] Diese Mäuse werden als ein Modell beeinträchtigter Wundheilung bei zuckerkranken Menschen verwendet, weil die Stoffwechselanomalien, die bei diesen Mäusen gesehen werden, ähnlich sind zu jenen, die bei menschlichen Diabetikern festgestellt werden. Die Heilungsbeeinträchtigung, die durch merklich verzögerte Zellinfiltration, Granulationsgewebebildung und die Zeit gekennzeichnet ist, die zur Wundverschließung benötigt wird, deutet zudem an, dass eine Heilung in diesem Mausmodell für die Heilungsbeeinträchtigung relevant sein kann, die bei menschlicher Diabetes gesehen wird.

Fibrin-Kleber

[0201] Der konzentrierte topische Fibrinogen-Komplex (TFC), der in dieser Untersuchung verwendet wird, wurde aus frischem, gefrorenen gepoolten Humanplasma hergestellt. Das TFC-Produkt (American Red Cross-Baxter Hyland Division, Los Angeles, CA) wurde in lyophitiserter Form geliefert. Nach Wiederherstellung bzw. Verdünnung auf die ursprüngliche Konzentration mit 3,3 ml sterilem Wasser, waren die Proteineigenschaften der TFC-Lösung, die in dieser Untersuchung verwendet wurde: Gesamtprotein, 120 mg/ml; Fibrinogen, 90 mg/ml; Fibronektin, 13,5 mg/ml; Faktor XIII, 17 U/ml; und Pasminogen, 2,2 µg/ml.

[0202] Topisches Rinderthrombin (5000-Einheit Vial, Armour Pharmaceutical Co., Kankakee, IL) wurde mit 5 ml sterilem Wasser wieder hergestellt bzw. auf seine ursprüngliche Konzentration verdünnt und wurde in 80 mM Calciumchloridlösung (American Reagent Laboratories, Shirley, NY) auf eine Konzentration von 15 E/ml seriell verdünnt.

[0203] Gleiche Volumen von TFC und wieder hergestelltes bzw. auf seine ursprüngliche Konzentration verdünntes Thrombin wurden gemischt, um einen FG herzustellen. Um eine runde Vollhautwunde mit einem Durchmesser von 6 mm zu füllen, wurden 0,015 ml TFC mit 0,015 ml Thrombin gemischt. Der FG, der hergestellt wurde, wies eine Proteinkonzentration von etwa 60 mg/ml auf.

[0204] Ein verdünnter FG mit einer Proteinkonzentration von etwa 1 mg/ml wurde ebenfalls verwendet.

Chirurgie

[0205] Die Mäuse wurden mit einem Gemisch, das aus 7 ml Ketaminhydrochlorid (100 mg/ml; Ketaset, Aveco Co., Inc., Fort Dodge, IA), 3 ml Xylazin (20 mg/ml; Rompun, Mobey Corp., Shawnee, KA), und 20 ml physiologischer Kochsalzlösung bestand, das intramuskulär verabreicht wurde, bei einer Dosis von 0,1 ml pro 100 g Körpergewicht narkotisiert. Die Rückenhaare wurden geklammert, und die Haut wurde mit Polyvinylpyrrolidon-Iod-Lösung gewaschen und mit 70 % Alkohollösung gerieben. Zwei runde, chirurgische Vollhautwunden (6 mm Durchmesser) wurden auf dem unteren Rücken der Maus, eine auf jeder Seite, äquidistant von der Mittellinie, erzeugt. Die medialen Ränder der zwei Wunden wurden durch eine Grenze von wenigstens 1,5 cm unverwundeter Haut getrennt.

[0206] Sofort nachdem das Verwunden durchgeführt wurde, wurde ein FG und/oder ein Verband über die bestimmte Wunde platziert. Der Verband war ein transparenter, semipermeabler Polyurethan-Haftverband (Opsite™, Smith and Nephew, Masillon, OH). Eine Tinktur einer Benzoinverbindung (Paddock Laboratories, Min-

neapolis, MN) wurde am Umfang der Wundfläche vor Anwendung des Verbands aufgebracht. Es gab eine Grenze von wenigstens 0,5 cm Haut, die den Wundrand umgab, über die keine Benzointinktur aufgebracht wurde, um die möglichen Entzündungswirkungen von Benzoin auf der rohen Wunde zu vermeiden. Keine weiteren Behandlungen wurden für die Dauer des Experiments auf die Wunde angewendet.

Behandlungsgruppen

[0207] Die Mäuse wurden in 4 Behandlungsgruppen geteilt, wobei jede Maus als ihre eigene Kontrolle dient:
Gruppe I: Die Wunde auf einer Seite des Tiers wurde mit FG (60 mg/ml) behandelt, während die kontralaterale Wunde keine Behandlung erhielt. Beide Wunden wurden mit Opsite™ bedeckt.
Gruppe II: Verdünnter FG (1,0 mg/ml) wurde auf die Wunde auf einer Seite topisch angewendet, während die kontralaterale Wunde keine Behandlung erhielt. Beide Wunden wurden mit Opsite™ bedeckt.
Gruppe III: FG (60 mg/ml) wurde auf beide Wunden topisch angewendet. Die Wunde auf einer Seite wurde unbedeckt gelassen, während die kontralaterale Wunde mit Opsite™ bedeckt wurde.
Gruppe IV: Keine topische Behandlung wurde auf die Wunden angewendet. Die Wunde auf einer Seite des Tiers wurde unbedeckt gelassen, während die kontralaterale Wunde mit Opsite™ bedeckt wurde.

Wundanalyse

[0208] Die Tiere wurden am Tag 9 des Experiments euthanisiert. Die Wunden wurden bis zur Muskelschicht, einschließlich einer Grenze von 0,5 nun unverwundeter Haut, heruntergeschnitten und wurden in gepufferte 10 % Formalinlösung platziert. Die Probenstücke wurden an ein Histologielabor zur Verarbeitung geschickt. Die Probenstücke wurden in Paraffin eingebettet, und der mittlere Abschnitt der Wunde wurde in 5 µm Teile geschnitten. Die Objektträger wurden mit Hämatoxylin und Eosin oder mit Masson's Trichrom zur histologischen Analyse angefärbt.

[0209] Jedem Objektträger wurde eine histologische Punktbewertung gegeben, der von 1 bis 15 reichte, wobei 1 keiner Heilung entsprach und 15 einer Narbe mit organisierten Kollagenfasern entsprach (Tabelle 1). Die Punktbewertungsskala basierte auf Skalen, die von früheren Forschern verwendet wurden. Die früher verwendeten Kriterien wurden modifiziert und wurden weiterhin definiert, um präziser wiederzugeben das Ausmaß von: Reepithelialisierung, Grad der Zellinvasion, Granulationsgewebebildung, Koallagenabscheidung, Gefäßbildung und Wundkontraktion. Die histologische Punktbewegung wurde getrennt von wenigstens drei Analytikern zugeordnet. Der Code, der die Wundbehandlung beschreibt, wurde beendet, nachdem die Punktbewertung von allen Beobachtern vervollständigt wurde.

Tabelle 1

Kriterien zur Punktbewertung histologischer Teile bzw. Schnitte

Punkt		Kriterien
1-3	Epithelialisierung	Keine bis sehr minimal
	Zellinhalt	Keiner bis sehr minimal (hauptsächlich Entzündungszellen)
	Granulationsgewebe	Keins bis spärliche Menge an Wundrändern
	Kollagenabscheidung	Keine
	Gefäßbildung	Keine
4-6	Epithelialisierung	Minimal (weniger als die Hälfte des Wunddurchmessers) bis mäßig (mehr als die Hälfte des Wunddurchmessers)
	Zellinhalt	Vorwiegend Entzündungszellen, wenige Fibroblasten
	Granulationsgewebe	Keins bis dünne Schicht am Wundzentrum, dicker an Wundrändern
	Kollagenabscheidung	Wenige Kollagenfasern
	Gefäßbildung	Wenige Kapillaren
7-9	Epithelialisierung	Vollständig epithelialisiert; dünne Schicht
	Zellinhalt	Mehr Fibroblasten, immer noch mit Entzündungszellen
	Granulationsgewebe	7, spärlich am Wundzentrum, hauptsächlich adipöses Gewebe unter dem Epithel 8, dünne Schicht am Wundzentrum; wenige Kollagenfasern 9, dickere Schicht; mehr Kollagen

(auf nächster Seite fortgesetzt)

Tabelle 1

Kriterien zur Punktbewertung histologischer Teile bzw. Schnitte

Punkt		Kriterien
10-12	Epithelialisierung	Dickere Epithelschicht
	Zellinhalt	Vorwiegend Fibroblasten
	Granulationsgewebe	Gleichmäßig dick
	Kollagenabscheidung	Mäßig bis beträchtlich Kollagen abgeschieden, aber weniger vollentwickelt im Vergleich zu Kollagen einer unverwundeten Hautgrenze
	Gefäßbildung	Mäßige bis beträchtliche Neugefäßbildung
13-15	Epithelialisierung	Dickes Epithel
	Zellinhalt	Geringere Anzahl an Fibroblasten in Dermis
	Granulationsgewebe	Gleichmäßig dick
		Dichte, organisierte aisgerichtete Kollagenfasern
		Wenige wohl-definierte Kapillarsysteme

Statistische Analyse

[0210] Die Werte der histologischen Punkte der Analytiker wurden gemittelt und wurden als der Durchschnitt ± Standardfehler des Durchschnitts ausgedrückt.

[0211] Der paarweise t Test wurde zum Vergleich von paarweisen Durchschnitten in den verschiedenen Behandlungsgruppen verwendet. Die Analysen wurden unter Verwendung des RS/1 Release 3.0 Statistical Software Package (BBN Software Products Corporation) durchgeführt.

[0212] Die Probendurchschnittsunterschiede wurden auf eine Varianzanalyse unter Verwendung des Statistical Analysis Software (SAS) System getestet.

Resultate

Die Wirkung vom FG auf den Wundverschluss (Gruppe I)

[0213] In Gruppe I wurden beide Wunden auf jeder Maus mit Opsite™ bedeckt. Unter diesen Bedingungen führte die topische Anwendung vom FG mit einer Proteinkonzentration von 60 mg/ml nur auf einer Seite des Tiers zu statistisch niedrigeren durchschnittlichen histologischen Punkten (3,06) für die FG-Seite im Vergleich zu den unbehandelten Wunden (5,26) ($P < 0,005$) (Tabelle 2).

Tabelle 2

Die Wirkung vom FG (60 mg/ml) auf den Wundverschluss (Gruppe I)

Behandlung	Histologischer Punkt	*N*
FG + Opsite™	3,06 ± 0,7	15
Opsite™ alleine	5,26 ± 2,21	15

Die Wirkungen von verdünntem FG auf den Wundverschluss (Gruppe II)

[0214] In dieser Gruppe führten beide paarweisen Wunden, die mit Opsite™ bedeckt waren, topische Anwendung von verdünntem FG (Proteinkonzentration von 1 mg/ml) zu einem durchschnittlichen histologischen Punkt (4,0), der statistisch nicht verschieden war von dem für unbehandelte Wunden (4,36) (P=0,17) (Tabelle 3).

Tabelle 3

Die Wirkung von verdünntem FG (1 mg/ml) auf den Wundverschluss (Gruppe II)

Behandlung	Histologischer Punkt	*N*
Verdünnter FG + Opsite™	4,00 ± 0,77	11
Opsite™ alleine	4,36 ± 0,67	11

Die Wirkungen von Opsite™ auf die mit FG behandelten Wunden (Gruppe III)

[0215] In dieser Gruppe paarweiser Wunden, die beide mit einem FG mit einer Proteinkonzentration von 60 mg/ml behandelt wurden, führte die Anwendung von Opsite™ auf einer Seite zu einem durchschnittlichen histologischen Punkt (4,2), der statistisch nicht verschieden war von dem für Wunden, die unbedeckt gelassen wurden (4,93) (P=0,11) (Tabelle 4).

Tabelle 4

Die Wirkung von Opsite™ auf paarweise Wunden, die mit einem FG behandelt wurden (Gruppe III)

Behandlung	Histologischer Punkt	*N*
Opsite™ + FG	4,20 ± 1,93	15
FG, aber kein Opsite™	4,93 ± 1,09	15

Die Wirkung von Ospite™ auf den Verschluss paarweiser unbehandelter Wunden (Gruppe IV)

[0216] In dieser Gruppe paarweiser Wunden, die keine topische Behandlung vom FG erhielten, führte die Anwendung von Opsite™ auf einer Seite zu einem beträchtlich geringeren durchschnittlichen histologischen Punkt (4,92) im Vergleich zu dem für Wunden, die unbedeckt gelassen wurden (6,31) (P=0,0005) (Tabelle 5).

[0217] ANOVA der Behandlungswirkungen auf Probendurchschnittsdifferenzen war bei <0,0001 beträchtlich.

Tabelle 5

Die Wirkung von Opsite™ auf den Verschluss paarweiser unbehandelter offener Wunden (Gruppe IV)

Behandlung	Histologischer Punkt	*N*
Opsite™ (kein FG)	4,92 ± 1,26	13
Kein Opsite™ (kein FG)	6,31 ± 1,25	13

Diskussion

[0218] Die Resultate dieser Untersuchung zeigten an, dass in Mäusen (1) ein FG, wenn auf offene Wunde angewendet, bei einer Konzentration, die zur Hämostase formuliert war (60 mg/ml), zu niedrigeren histologischen Punkten am Tag 9 führte, was niedrigere Wundheilungsgeschwindigkeiten im Vergleich zu der von unbehandelten Wunden anzeigte; (2) eine Verdünnung der FG-Proteinkonzentration auf 1 mg/ml zu einem höhe-

ren histologischen Punkt am Tag 9 führte, was eine schnellere Wundheilungsgeschwindigkeit anzeigte; und (3) eine Anwendung eines semipermeablen Verbands (Opsite™) eine Wundheilung in diesem Tiermodell durch sich per se beträchtlich verlangsamte.

[0219] Die Gesamtproteinkonzentration vom FG ist beim Vergleichen der Resultate der Untersuchungen unter Verwendung vom FG eine wichtige Variable. Vorteilhafte Wirkungen von Fibrin beim Fördern von Wundheilung und Gewebereparation wurden berichtet, aber es wurden in den vorliegenden Untersuchungen niedrigere Fibrinogen-Konzentrationen verwendet als sie gewöhnlich in kommerziellen Präparaten gefunden werden.

[0220] Ein FG bei einer Konzentration von 60 mg/ml verzögerte einen Wundverschluss (Gruppe I). Die Gesamtproteinkonzentration vom FG, der in Europa kommerziell erhältlich ist, ist nach Mischung der Fibrinogen- und Thrombinkomponenten, 37,5 bis 57,5 mg/ml. Diese Daten zeigen an, dass ein FG, wie gegenwärtig für Hämostase- und Haftindikationen formuliert, eine Heilung verlangsamt, wenn er auf offene Hautwunden angewendet wird. Diese Wirkung kann beruhen auf (1) mechanische Versperrung der Wanderung oder Proliferation von Zellelementen, bei dem Wundheilungsprozess aktiv teilnehmen, (2) mechanische Inhibierung der Wundkontraktion oder (3) einer chemischen Inhibitionswirkung einer oder mehrerer FG-Komponenten auf Wundheilung. Mechanische Versperrung und Inhibierung eines Wundverschlusses kann die wahrscheinlichste Erklärung sein, weil ein Fortbestand eine festen Gerinnsels auf Fibrinogenbasis am Tag 9 auf der Wundoberfläche vorliegt.

[0221] Um zu helfen, zu bestimmen, ob das der Grund war, wurde die FG-Gesamtproteinkonzentration auf 1 mg/ml verdünnt. Eine topische Anwendung dieses verdünnten FG führte zu einem histologischen Punkt, der nicht beträchtlich verschieden war von dem für unbehandelte Wunden (Gruppe II), was andeutet, dass eine niedrigere Gesamtproteinkonzentration den Wundheilungsprozess nicht beträchtlich inhibierte.

[0222] Es ist ebenfalls wert, zu bemerken, dass der durchschnittliche histologische Punkt für bedeckte Wunden, die mit der gleichen FG-Konzentration (60 mg/ml) behandelt wurden, aber zu verschiedenen Behandlungsgruppen gehörten (Gruppen I und III) beträchtlich verschiedene Werte aufwiesen (3,06 für Gruppe I gegenüber 4,2 für Gruppe III). Diese Daten demonstrierten, dass eine Variation von Tier zu Tier es schwierig macht, definitive Schlussfolgerungen von verschiedenen Tieren abzuleiten, die den gleichen Behandlungsvariablen unterworfen wurden, weil einige Tiere schneller oder langsamer als andere Versuchstiere heilen, obwohl sie die gleiche Behandlung erhalten. Dies spiegelt sich in dem Bereich von Standardfehlern für die durchschnittlichen Punkte wieder. Aus diesem Grund diente jedes Tier als seine eigene Kontrolle, z.B., wurden Wunden in dem gleichen Tier miteinander verglichen. Durch Aufweisens der Kontrollwunden in dem gleichen Tier wie die Testwunden, werden die Wirkungen intertierische Variabilität minimiert. Diese Daten zeigen ebenfalls, dass ein Haftverband, wie beispielsweise Opsite™, einen Wundverschluss beträchtlich verzögerte. Es sollte jedoch bemerkt werden, dass es erschien, dass die Gesamtproteinkonzentration des FG in Teilhautwunden in Schweinen nicht mit der Geschwindigkeit der Wundheilung zusammenhängt.

B. Wachstumsfaktor-supplementierter FG auf Wundheilung In Vivo *

[0223] Es wurde die Wirkung vom HBGF-1B Wachstumsfaktor-supplementiertem FG auf die Geschwindigkeit von Wundreparatur in zuckerkranken Mäusen bewertet. Die in diesem Experiment verwendeten Verfahren waren ähnlich zu denen, die gerade vorstehend beschrieben wurden. Zwei 6 mm Vollhautbiopsien auf dem Rückenteil von jeder von 6 Mäusen wurden mit FG gefüllt, zu dem 5µg HBGF-1β zugegeben worden war. Identische Biopsien wurden bei sechs Mäusen unbehandelt gelassen, und wurden in sechs Kontrollmäusen mit unsupplementiertem FG gefüllt. Nach 9 Tagen wurden alle Mäuse geopfert und wurden histologische Zubereitungen von 5 Mikron dicken Scheiben aus jeder der Wunden und der umgebenden Haut hergestellt und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt.

[0224] Das Ausmaß der Wundreparatur in jeder Probe, die nicht als zu der Behandlungsgruppe gehörig identifiziert wurde, von der sie kam, wurde „blind" durch jeden der drei ausgebildeten Analytikern bewertet, die Kollagenabscheidung, Reepithelialisierung, Dicke des Granulationsgewebes und die Dichte der Entzündungszellen, Fibroblasten und Kapillaren bewerteten. Jede Probe wurde von 1 bis 15 bewertet, im Bereich von keiner bis vollständiger Reparatur liegend. Den Proben der Wunden, die mit unsupplementiertem FG behandelt waren, wurden übereinstimmendend die wenigsten Punkte gegeben und jenen der unbehandelten Wunden oder Wunden, die mit Wachstumsfaktor-supplementiertem FG behandelt waren, wurden mit den höchsten Punkten bewertet.

Beispiel 11 *

FG als Liefer- bzw. Abgabe-Vehikel von osteoinduktiven Substanzen In Vivo

Materialien und Verfahren

Fibrin-Versiegelungsmittel

[0225] Konzentrierter Human-TFC (Baxter Hyland Division, San Pedro, CA) und Humanthrombin (Baxter Hyland Division, CA) wurden für das Amerikanische Rote Kreuz bzw. American Red Cross aus gescreentem, frischem, gefrorenem, gepoolten Humanplasma hergestellt. Beide Komponenten wurden unter Verwendung des Lösungsmittel-Detergens-Verfahrens (New York Blood Center) während ihrer Herstellung einer viralen Inaktivierung unterzogen und wurden in lyophilisierter Form geliefert. Nach Wiederherstellung bzw. Verdünnung auf die ursprüngliche Konzentration mit 3,3 ml sterilem Wasser waren die Proteineigenschaften der TFC-Lösung: Gesamtprotein = 120 mg/ml; Fibrinogen = 90 mg/ml; Fibronektin = 13,5 mg/ml; Faktor XIII = 17 E/ml; und Plasminogen = 2,2 µ/ml.

[0226] Humanthrombin (1000 E Vial) wurde mit 3,3 ml sterilem Wasser wieder hergestellt bzw. auf die ursprüngliche Konzentration verdünnt und wurde seriell in 40 mM Calciumchloridlösung (American Regent Laboratories, Shirley, NY) auf eine Konzentration von 15 E/ml verdünnt. Humanthrombin wurde zur Herstellung von implantierten Scheiben verwendet, die auf Schädeldachdefekten waren.

[0227] Topisches Rinderthrombin (5000E Vial, Armour Pharmaceutical Co., Kankakee, IL) wurde mit 5 ml sterilem Wasser wieder hergestellt bzw. auf seine ursprüngliche Konzentration verdünnt und wurde in 40 mM Calciumchloridlösung auf eine Konzentration von 15 E/ml seriell verdünnt. Rinderthrombin wurde zur Herstellung von Implantaten für einen intramuskulären Bioassay verwendet.

[0228] Beim praktischen Ausführen dieser Ausführungsform dieser Erfindung sollte das Fibrinogen bei einer Konzentration von 1 bis 120 mg/ml FG, bevorzugter 3 bis 60 mg/ml FG, am meisten bevorzugt 10 bis 30 mg/ml FG, vorhanden sein. DBM sollte bei einer ungefähren Konzentration von etwa 1 bis 1000 mg/ml FG, bevorzugter 50 bis 500 mg/ml FG, am meisten bevorzugt 300-500 mg/ml FG vorhanden sein. Die Partikelgröße demineralisierten Knochenpulvers sollte 0,01 bis 1000 Mikron, bevorzugt 20–500 Mikron und am meisten bevorzugt 70–250 Mikron sein. Der osteoinduktive Wachstumsfaktor (Wachstumsfaktoren) oder BMPs sollten bei einer Konzentrationen) von etwa 1 bis 100 µg/ml vorhanden sein, wobei die Konzentrationen) wirksam ist, um ihren gewünschten Zweck zu erfüllen. Wachstumsfaktoren, die in dieser Ausführungsform als osteoinduktive Substanzen verwendet werden können, umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt: Osteogenin (BMP3); BMP-2; op-1; HBGF-1; HBGF-2; BMP 2A, 2B und 7; FGF-1; FGF-4; und TGF-β. Arzneimittel, wie beispielsweise Antibiotika, können zudem verwendet werden, um das TS zur Verwendung bei einer Knochenreparatur zu supplementieren.

Implantatherstellung

[0229] Ratten-DBM wurde wie folgt hergestellt. Die Epiphysen der langen Knochen der Ratten wurden entfernt, wobei nur die Diaphysen dahinter gelassen wurden. Die Diaphysen wurden gegebenenfalls geteilt, und das Knochenmark wurde dann mit deionisiertem Wasser gründlich gespült (Milli-Q Water Purification System™, Millipore Corporation, Bedford, MA). Die Diaphysen wurden dann bei Raumtemperatur gewaschen. 1000 ml deionisiertes Wasser wurde dann bei 4 °C zu 100 g Knochen zugegeben. Das Gemisch wurde 30 Minuten lang gerührt, und das Wasser wurde dekantiert. Dieser Schritt wurde 2 Stunden lang wiederholt.

[0230] Ein Liter kaltes, absolutes Ethanol (Quantum Chemical Corporation, U.S.I. Division, Tuscola, IL) wurde bei 4 °C zu jeden 100 g Knochen zugegeben. Nach 15-minütigem Rühren wurde das Ethanol dekantiert. Dies wurde 4 Mal für eine Dauer von insgesamt 1 Stunde wiederholt.

[0231] Unter einer Abzugshaube wurden 500 ml Diethylether (Mallinckrodt Speciality Chemicals, Paris, KY) zu dem Knochen zugegeben, um ihn zu bedecken. Dies wurde 15 Minuten lang vorsichtig gerührt, und der Ether wurde dann dekantiert. Zusätzliche 500 ml Ether wurden zu dem Knochen gegeben, und das Gemisch wurde 15 Minuten lang gerührt. Der Ether wurde wieder dekantiert. Der Knochen wurde unter der Abzugshaube gelassen, damit die Abdampfung des Ethers stattfindet. Ein entfetteter Knochen kann in einem ultraniedrigen Tiefkühler (–135 °C) unbegrenzt gelagert werden.

[0232] Der Knochen wurde dann gemahlen, um Knochenpulver zu erzeugen. Das Pulver wurde gesiebt, und Partikel mit einer Größe von 74 bis 240 Mikron wurden gesammelt.

[0233] Zehn Gramm Aliquote des Knochenpulvers wurden in 250 ml Zentrifugenflaschen platziert. Acht ml 0,5 N HCl wurde zu jeder Flasche langsam zugegeben, um ein Schäumen zu vermeiden. Der Inhalt jeder Flasche wurde dann vorsichtig gerührt. Nach 15 Minuten wurden mehr zusätzliche 100 ml 0,5 N HCl zu jeder Flasche über den Raum von 10 Minuten zugegeben. Die Flaschen wurden dann vorsichtig zusätzliche 35 Minuten gerührt. Die Gesamtzeit, in der sich das Pulver in der HCl befand, überschritt nicht eine Stunde.

[0234] Jedes Gemisch wurde dann in einer Zentrifuge bei 3000 Upm bei 4 °C 15 Minuten lang zentrifugiert. Der pH des Überstands wurde dann überprüft. Wenn der pH größer als 2 war, wurde der Überstand in ein Chemieabgussbecken ohne Durcheinanderbringen der Pellet(s) gegossen. Wenn der pH des Überstands weniger als 2 war, wurde der Überstand in einen Gefahrgutabfallbehälter abgegossen. Wenn der Pellet(s) locker waren, wurde die Zentrifugierzeit auf 30 Minuten erhöht. Diese Stufen wurden wiederholt, bis der pH des Überstands gleich 0,5 N HCl war.

[0235] Die Pellets wurden dann mit 180 ml deionisiertem Wasser durch Rühren gewaschen, um eine gleichmäßige Suspension zu erzeugen. Die Suspension wurde dann zusätzliche 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dann wie vorher dekantiert. Das Waschen wurde wiederholt, bis der pH des Überstands gleich dem pH des deionisierten Wassers war.

[0236] Die Pellets wurden dann bei in einem Tiefkühler –180 °C gefroren. Sie wurden dann unter Verwendung von Standardprozeduren lyophilisiert.

[0237] Scheibenförmige Implantate, die 1 mm dick waren und einen Durchmesser von 8 mm aufwiesen, wurden unter Verwendung einer 4-Stück-Aluminiumform (Fig. 13) erzeugt. Fünfundzwanzig mg Ratten-DBM-Pulver wurde in die Formkammer gegeben. Dreißig µl TFC wurde dann auf die DBM pipettiert und gemischt, bis die DBM alle Lösung absorbiert hatte. Die TFC-Konzentrationen, die verwendet wurden, waren 10, 20, 40, 80 oder 120 mg/ml. Dreißig µl Thrombinlösung (15 E/ml in 40 mM Calciumchloridlösung) wurden dann zu dem DBM-TFC-Komplex zugegeben, wurden gemischt und wurden unter Verwendung eines kolbenförmigen Deckels in eine Scheidengestalt gepresst. Es wurde bestimmt, dass 25 mg DBM-Pulver ein Volumen von 20 µl aufwiesen. Nachdem das DBM zu dem FG zugegeben worden war, waren die Endproteinkonzentrationen wie folgt:

Tabelle 6

TFC (mg/ml)	Thrombin (µ/ml)	DBM (mg)	FG, Gesamtproteinkonz. (mg/ml)
120	15	25	45
80	15	25	30
40	15	25	15
20	15	25	8
10	15	25	4

[0238] Scheibenimplantate, die aus DBM alleine oder FG alleine (4, 8, 15 und 45 mg/ml Gesamtproteinkonzentrationen) bestanden, wurden ebenfalls unter Verwendung der gleichen Form hergestellt.

[0239] Fünfzig mg DBM wurden in eine Aluminiumform gegossen, wozu dann 60 µl TFC zu der DBM zugegeben und gemischt wurden, bis sie vollständig absorbiert waren. Sechzig µl Thrombin wurden dann dem DBM-TFC-Komplex zugegeben, gemischt und unter Verwendung eines kolbenförmigen Deckels in eine Scheibengestalt mit einem Durchmesser von 1 cm und einer Dicke von 2 mm gepresst. Die Scheibe wurde dann manuell in die gewünschte Gestalt (Dreieck, Quadrat oder Donut geschnitten.

[0240] Für das intramuskuläre Bioassay-Experiment wurden Implantate in einen sterilen Nylonsack platziert, der eine Maschengröße von 70 Mikron aufwies und 1 cm × 1 cm maß.

Tiere

[0241] Männliche Long-Evans Ratten wurden von Charles River Laboratories (Wilmington, MA) erhalten. Für den intramuskulären Bioassay wurden 28 bis 35 Tage alte Ratten verwendet. Drei Monate alte Ratten wurden für das Kraniotomieexperiment verwendet.

Chirurgie

[0242] Die Tiere wurden mit einem Gemisch, das aus 10 ml Ketaminhydrochlorid (Vetalar, 100 mg/ml, Parke-Davis, Morris Plains, NJ), 5 ml Xylazin (Rompun, 20 mg/ml, Mobay Corporation, Shawnee, KN), und 1 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) bestand, bei einer Dosis von 0,1 ml pro 100 gm Körpergewicht narkotisiert, die intramuskulär verabreicht wurde. Die Operationsstelle des Tiers wurde mit 70 % Alkohollösung präpariert, gefolgt von einer Polyvinylpyrrolidon-Iod-Lösung. Die chirurgische Prozedur wurde dann unter Verwendung einer aseptischen Technik durchgeführt.

Intramuskulärer Bioassay

[0243] Ein Mittellinienbauchschnitt wurde gemacht, und ein Raum wurde zwischen den Pektoralis major mit stumpfen Präparieren erzeugt. Ein Nylonumschlag, der das bestimmte experimentelle Material enthielt, wurde in den intramuskulären Raum eingeführt und mit einer 3–0 Dexonnaht gesichert (**Fig. 14**). Die gleiche Prozedur wurde dann bei der kontralateralen Seite wiederholt. Die Haut wurde dann mit Klammern verschlossen. Die Implantate wurden nach vier Wochen entnommen, wurden geröntgt und wurden zur Histologie präpariert.

[0244] Scheibenförmige Implantate wurden zufällig platziert und bestanden aus dem Folgenden: DBM alleine (n = 12); FG alleine bei verschiedenen Konzentrationen (4 mg(ml, n = 14; 8 mg/ml, n = 3; 15 mg/ml, n = 3; und 45 mg/ml, n = 12), und DBM-FG-Komplex (4 mg/ml, n = 12; 8 mg/ml, N = 12; 15 mg/ml, n = 12; und 45 mg/ml, n = 12). Es gab jeweils von den quadrat-, dreieck- und donutförmigen Implantaten vier.

Kraniotomieprozedur

[0245] Ein- linearer Schnitt wurde von dem Nasenbein zu der Mediansaggitalleiste gemacht. Weichteile wurden vorsichtig zurückgebogen, und das Periosteum wurden von der Kraniotomiestelle (Hinterhauptsbein, Stirnbein, Scheitelbein) zergliedert. Eine 8-mm Kraniotomie wurde mit Trephine in einer einem Drehhandstück mit langsamer Geschwindigkeit unter Verwendung von reichlich Salzlösungspülung, wenn benötigt, hergestellt. Die Schädeldachscheibe wurde frei zergliedert, während Duraperforationen und eine Intrusion vom Sinus saggitales superior vermieden werden. Der 8-mm Schädeldachdefekt wurde entweder als Kontrolle unbehandelt gelassen oder mit einer 1 × 8 mm DBM- oder DBM-FG-Scheibe (**Fig. 15**) gefüllt. Die Haut wurde dann mit Hautklammern verschlossen.

[0246] Im Anschluss an den chirurgischen Eingriff wurde jede Ratte durch Ohrenstempel identifiziert und in ihren Käfig zurückgesetzt, wo sie innerhalb von 2–3 Stunden ambulant waren.

[0247] Der erste Satz von Schädeldachimplantaten bestand aus DBM alleine (25 mg, n = 3) oder DBM in einer FG-Matrix (15 mg/ml, n = 2; 30 mg/ml, n = 3; und 45 mg/ml, n = 3) und wurden nach 28 Tagen zurückgewonnen. Der zweite Satz von Schädeldachimplantaten bestand aus DBM in einer 30 mg/ml FG-Matrix und wurden bei verschiedenen Zeiten nach der Operation zurückgewonnen (28 Tage, n = 10; 3 Monate, n = 9; und 4 Monate, n = 5).

Zurückgewinnung von Implantaten

[0248] Bei den angezeigten Zeiten wurden die Ratten in einer Kohlendioxidkammer euthanisiert. Ein Hautschnitt wurde um das experimentelle Empfängerbett (d.h., Pectoralis major oder Calvaria) gemacht und die Weichteile wurden von den Empfängerbetten zurückgenommen. In orthotopen Stellen wurden die Kraniotomien mit 3–4 mm benachbarten Knochen wurden vom frontookzipitalparietalen Komplex zurückgewonnen. In heterotopischen Stellen wurde scharfes und stumpfes Präparieren verwendet, um die implantierten Nylonumschläge zurückzugewinnen.

Radiographie

[0249] Die Implantate wurden unter Verwendung eines X-OMATL™-Hochkontrast-Röntgenfilms (Eastman

Kodak Company, Rochester, NY) in einem Minishot Benchtop Cabinet Röntgensystem (TFI Corporation, West Haven, CT) bei 30 kvp, 3Ma und 10 Sekunden geröntgt. Graupegeldichten von inramuskulären und Kraniotomiestellen-Radiogrammen wurden unter Verwendung eines Cambridge 920 Image Analysis System (Cambridge Instruments Limited, Cambridge, England) analysiert.

Histologische Analyse

[0250] Alle wiedergewonnenen Probenstücke (Weich- und Hartteile) wurden sofort in geeignet markierte Vials platziert, die eine Konservierungslösung enthielten, und wurden zu einem histologischen Labor zur Verarbeitung geschickt. Histologische Probenstücke waren 4,5 Mikrometer-dicke Teile durch den Schädelkranzdurchmesser. Für jede Empfängerstelle wurde ein Teil bzw. Schnitt mit Hämatoxylin- und Eosinfärbung (für Photomikrographie und detaillierten Zell- und Stromauntersuchung) hergestellt und das andere Teil bzw. der andere Schnitt wurde mit einer von Kossa-Färbung hergestellt.

Resultate

Radiographie von intramuskulären Einrichtungen

[0251] Alle DBM-Scheiben zeigten röntgendichte Bilder. Fünfundvierzig von 48 implantierten DBM-FG-Scheiben (93,75 %) waren röntgendicht. Alle DBM-FG-Scheiben induzierten ungeachtet der Proteinkonzentration (4–45 mg/ml) Strahlenundurchlässigkeit (**Fig. 16**). Strahlenundurchlässigkeitsmessungen einiger DBM-Scheiben (**Fig. 16**) waren höher als DBM-FG-Scheiben, aber die anderen Messungen lagen gut innerhalb des Bereichs von Messungen für DBM-FG-Scheiben. Dreißig von 32 Scheiben, die nicht mit DBM (93,75 %) supplementiert waren, entwickelten keine Strahlenundurchlässigkeit.

[0252] DBM-FG-Scheiben in der Form von Quadraten, Dreiecken oder Donuts waren ebenfalls merklich röntgendicht im Vergleich zu FG-Scheiben, die nicht mit DBM supplementiert waren. Die ursprünglichen Gestalten der Implantate wurden im allgemeinen beibehalten.

Histologie intramuskulärer Implantate

[0253] Der intramuskuläre Bioassay war für DBM und DBM-FG-Implantate positiv, wie durch Bildung von Knöchelchen mit einem zentralen Hohlraum, der mit Mark gefüllt war, und Resorption von früher implantierten DBM-Partikeln bewiesen.

Radiographie von Schädeldachimplantaten

[0254] Röntgenstrahlen zeigten, dass DBM-Implantate in einer FG-Matrix röntgendichter sind als DBM-Implantate alleine oder unbehandelte Kontrollen. Es gab keinen merklich wahrnehmbaren Unterschied zwischen verschiedenen FG-Konzentrationen, die verwendet werden, um DBM abzugeben. Die Radiogramme von unbehandelten Schädeldachdefekten mit einem Durchmesser von 8 mm zeigten eine vernachlässigbare Menge an Strahlenundurchlässigkeit.

[0255] Der zweite Satz von Schädeldachimplantaten unter Verwendung von DBM in einer 30 mg/ml FG-Matrix zeigte eine merklich erhöhte Strahlenundurchlässigkeit innerhalb der Kraniotomiewunden von 3 oder 4 Monaten alter Calvaria über 28 Tage Calvaria (**Fig. 17**).

Histologie von Schädeldachimplantaten

[0256] Unbehandelte 80 mm Kraniotomiewunden zeigten nur faserförmiges Bindegewebe, das sich über die Kraniotomiewunde entwickelte (**Fig. 18**). Eine Histologie von DBM-Implantaten zeigte DBM-Partikel, die über und unter die Ränder vom Wirtsknochen wanderten (**Fig. 19**). Die meisten DBM-Partikel waren jedoch innerhalb der Grenzen der Kraniotomiewunde und waren von losem Bindegewebe umgeben, das gut mit Gefäßen versorgt war. Es wurde eine aktive Resorption von DBM durch Osteoklasten bemerkt. Es wurde auch bemerkt, dass viele DBM-Partikel von Lebendzellen bevölkert waren. Neues Osteoid und Knochen, der durch Osteoblasten niedergelegt war, waren ganz offensichtlich.

[0257] Die Histologie von DBM-Implantaten in einer FG-Matrix zeigten DBM-Partikel, die innerhalb der Kraniotomiewunde lokalisiert waren, von dichteren und mehr Zellbindegewebe umgeben waren (**Fig. 20** und **Fig. 21**). Eine Osteoidmatrix und Knochentrabekelbildung waren ganz offensichtlich. Es wurde bemerkt, dass

sich mehr Knochenmark in Kraniotomiewunden gebildet hatte, die mit DBM-FG-Scheiben implantiert waren, als mit DBM-Implantaten alleine. Es gab ebenfalls eine größere Gefäßneubildung mit DBM-FG-Scheiben als mit DBM-Implantaten alleine oder unbehandelten Kontrollen. Eine Osteoregeneration war bei allen FG-Konzentrationen offensichtlich, die zu Abgabe von DBM verwendet wurden.

Diskussion

[0258] Die natürliche Biokompatibilität und biologische Abbaubarkeit vom FG sind Eigenschaften, die aus ihm, ein ideales Abgabe- bzw. Liefersystem für DBM und BMPs machen. Ein FG vereinfachte die Gestaltung von DBM in die gewünschte Form zum Füllen von Knochendefekten, erhielt eine DBM innerhalb des Defekts aufrecht und kann mit einer DBM synergistisch sein. Zudem trat ein Weichteilprolaps nicht auf und eine Knochenkontour wurde aufrecht erhalten. Ein DBM-supplementierter FG besaß eine geeignete Mikroarchitektur, ein geeignetes Profil biologischer Abbaubarkeit und Freisetzungskinetiken zur Unterstützung von Osteoblasten-Rekrutierung und Osteoregeneration.

[0259] Insgesamt zeigten die Daten, dass in einem FG abgegebenes bzw. geliefertes DBM bei irgendeiner der getesteten FG-Proteinkonzentrationen soviel Knochenbildung induzierte wie es die DBM alleine tat. Wenn eine DBM mit einem FG zu einer besonderen präoperativen Form konfiguriert war, behielt der induzierte Knochen die ursprüngliche Gestalt postoperativ genau bei.

[0260] Weil die Gestalt der DBM-FG-Matrix die Morphologie des neu gebildeten Knochens bestimmte, sollte die DBM-Matrix, wenn möglich, mit einer vorbestimmten Gestalt hergestellt sein. Die DBM-FG-Matrix in flüssiger Form kann jedoch in einen ungleichförmig geformten Defekt abgegeben bzw. geliefert oder injiziert werden, wo sie polymerisieren wird und eine Knochenbildung in der DBM-FG-gefüllten Fläche begünstigt.

Beispiel 12

Die Freisetzung von Antibiotika (AB) aus einem FG und erhöhte Langlebigkeit des AB-supplementierten FG

Verfahren

A. Herstellung des AB-FG

1. TET Freie Base

[0261] Dreieinhalb ml Wasser zur Injektion wurde in ein Vial aus lyophilisiertem menschlichem topischen Fibrinogen-Konzentrat (TFC) injiziert, das von dem Amerikanischen Roten Kreuz bzw. American Red Cross geliefert wurde. Die Proteinkonzentration der resultierenden Lösung war ungefähr 120 mg/ml.

[0262] Gefriergetrocknetes Thrombinkonzentrat, das von dem Amerikanischen Roten Kreuz/Baxter-Hyland, Inc., Glendale, CA geliefert wurde, wurde mit 3,5 ml einer 40 mM Lösung aus Calciumchlorid wieder hergestellt bzw. auf die ursprüngliche Konzentration verdünnt, die ungefähr 250 E/ml enthielt.

[0263] TET wurde durch Mischen des gewünschten Gewichts von TET mit 1 ml wiederhergestellter bzw. auf die ursprüngliche Konzentration verdünnter TFC-Lösung und mit 1 ml wiederhergestellter bzw. auf die ursprüngliche Konzentration verdünnter Thrombinlösung in der Gegenwart Calciumchlorid von Injektionsqualität (das von American Reagent, Shirley, NY erwoben wurde) formuliert. Das TET war in der freien Basenform und wurde von Sigma Chemical Company (St. Louis, MO) erworben. Der TET-FG wurde durch Mischen von TFC und Thrombin durch eine Duoflo™ Mischeinrichtung (Hamaedics, CA) auf einer Millipore-Membran in einer Millipore-Kulturplatte mit 12 mm Durchmesser (Millipore Corporation, Bedford, MA) gebildet. Dem Gemisch wurde erlaubt, sich 1 Stunde lang bei 22 °C zu setzten.

[0264] Scheiben mit einem Durchmesser von sechs mm, die den TET-FG und die Millipore-Membran enthielten; wurden unter Verwendung einer 6 mm Stanzbiopsie von der Letzteren geschnitten. Die TET-FG-haltigen Scheiben wurden für die TET-Freisetzung-Untersuchungen verwendet.

[0265] Die Freisetzung von TET aus dem TET-FG in Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) oder Speichel wurde unter Verwendung von Zellkulturenplatten mit 24 Vertiefungen (Corning Glass Works, Corning, NY) unter zwei verschiedenen Sätzen an Bedingungen gemessen. In einer Bedingung, dem statischen Modus, wurden 2 ml PBS oder 0,75 ml Speichel in den Zellkulturen mit 24 Vertiefungen täglich ersetzt. In der anderen Be-

dingung, dem kontinuierlichen Austauschmodus, wurde eine TET-Freisetzung aus dem TET-FG mit PBS gemessen, die bei einer Geschwindigkeit von ungefähr 3 ml pro Tag ausgetauscht wurde. Die Proben wurden bis zur Analyse bei –20 °C gelagert. Der Speichel war von 10 verschiedenen Leuten gesammelt worden, gepoolt worden, und durch Zentrifugation bei 5000g geklärt. Er wurde dann durch eine Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert und bei 4 °C für die täglichen Verwendung gelagert.

[0266] Um die Konzentration und biologische Aktivität des TET zu messen, das von den TET-Scheiben freigesetzt worden war, wurde das eluierte TET aufgetaut und spektrophotometrisch bei 320 nm und/oder biologisch durch die Inhibierung von E. coli Wachstum auf Agarplatten analysiert. Um diese Assays zu kalibrieren, wurden Standardkurven verwendet, die TET-Konzentrationen von 0 bis 50 bzw. 0 bis 500 µg/ml abdeckten.

2. Ciprofloxacin (HCl (CIP)-, Amoxicillin (AMO)- und Metronidazol (MET)-supplementierter FG

[0267] Ein FG, der CIP HCl, AMO oder MET enthielt, wurde wie vorher das TET hergestellt. Um die Freisetzung dieser AB aus dem entsprechenden AB-FG in die unmittelbare Umgebung zu überwachen, wurden AB-FG-Scheiben in einzelne Veriefüngen in einer Zellkulturenplatte mit 24 Vertiefungen platziert und mit 2 ml PBS bedeckt, die gesammelt , täglich ersetzt und bis zur Analyse wie vorher bei –20 °C gelagert wurde. Die Konzentrationen an CIP, AMO und MET in den Eluaten wurden bei 275, 274 bzw. 320 nm spektrophotometrisch gemessen und wurden mit Standardkurven verglichen, die 0 bis 50 µg/ml des entsprechenden AB enthielten.

B. Strukturelle Integrität vom AB-FG

[0268] Die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität des FG und der TET-FG-Scheiben wurde durch visuelle Beobachtung und physische Inspektion durch „Stochern" in den Scheiben mit einem feinen Spatel bewertet. Die poröse Membran, die während der Herstellung der Scheiben ausgeschnitten worden war, verbleib an dem TET-FG angehaftet und wurde verwendet, um die Positionierung der Scheiben während der Bewertung ihrer strukturellen Integrität zu unterstützen. Bilder von Drauf- und Seitenansichten der Scheiben wurden ebenfalls genommen und wurden in der Bewertung verwendet.

[0269] Die strukturelle Integrität vom FG und TET-FG wurden unter sowohl sterilen als auch nicht-sterilen Bedingungen gemessen. Für die nicht-sterilen Experimente wurden die PBS und der Speichel bis zur Analyse gefroren. Für die sterilen Experimente wurde die gleiche Prozedur verwendet, mit der Ausnahme, dass der gesamte Prozess unter sterilen Bedingungen lief. Die Sterilität des Systems wurde durch Inkubieren von 0,2 ml der Probe und 2 ml Nährlösung bei 37 °C getestet, und die Trübheit der Nährlösung wurde 48 Stunden lang beobachtet. Ein Trübheitsmangel zeigte eine Sterilität des Systems an. Die Stabilität des CIP-, AMO-, und MET-FG wurden wie vorstehend, aber nur unter nicht-sterilen Bedingungen untersucht.

C. In Vitro antimikrobielle Aktivität vom aus AB-FG freigesetzten AB

[0270] Die antimikrobielle Aktivität des aus dem AB-FG freigesetzten AB wurde durch Messen der Durchmesser der Inhibierungszonen bewertet, die durch das Eluat aus den Scheiben mit 6 mm Durchmesser von der täglich gesammelten PBS oder des Speichel erzeugt wurden, die den AB-FG umgaben. Die Eluate von unsupplementiertem FG dienten als Kontrolle. AB-Lösungen bekannter Konzentration wurden als Standards verwendet. E. coli, die auf Agar-Platten kultiviert waren, wurden verwendet, um die AB-Aktivität der freigesetzten TET, CIP und MET zu messen. Zur Herstellung der Kulturplatten wurden 100 µl der Bakterienzellsuspension, die ungefähr 10^8 Zellen/ml enthielt, mit 3 ml oberen Agar bei 50 °C gemischt und sofort in die Platte harten, unteren Agars geschüttet, um eine gleichmäßige Schicht aus Zellen herzustellen. Die Platten wurden 18 Stunden lang bei 37 °C inkubiert.

Resultate

A. TET

1. TET-Freisetzungsdaten

[0271] Die Freisetzung von TET aus TET-FG-Scheiben in die umgebende PBS in den „statischen" Experimenten wurde durch Bestimmen der TET-Konzentration spektrophotometrisch gemessen, die in den 2 ml PBS erreicht wurde, die täglich ersetzt wurde. Die TET-Konzentrationen, die für verschiedene Mengen TET erhalten wurden, die in den TET-FG eingefügt worden waren, sind in **Fig. 22** gezeigt. Bei TET-Konzentrationen in dem

TET-FG von weniger als 50 mg/ml, war die Freisetzung von TET in fünf Tagen oder weniger vollendet. Die Freisetzung von TET aus TET-FG-Scheiben, die TET-Konzentrationen von 100 bis 200 mg/ml enthielten, traten jedoch ungefähr zwei Wochen lang bzw. mehr als drei Wochen auf. Die strukturelle Integrität der TET-FG-Scheiben blieb drei bis fünf Wochen erhalten. Diese Resultate demonstrierten, dass die TET-Freisetzung von dem FG-Abbau unabhängig war und dass die Geschwindigkeit der TET-Freisetzung von der Menge an TET abhing, die in den TET-FG-Scheiben verblieb.

[0272] Die spektrophotometrischen Daten, die in dem kontinuierlichen Austauschexperiment gesammelt wurden, sind in Fig. 23 gezeigt. Diese Daten zeigen an, dass eine kontinuierliche TET-Freisetzung von einer TET-FG-Scheibe, die ursprünglich eine Konzentration von 100 mg/ml Fg enthielt, über eine Periode von 2 Wochen auftrat. Die FG-Scheibe behielt ihre strukturelle Integrität während dieser Periode von zwei Wochen bei, nachstehend. Die in dem Experiment mit kontinuierlichem Modus erhaltenen TET-Freisetzungsdaten zeigten ebenfalls an, dass die Geschwindigkeit einer TET-Freisetzungsgelegenheit von der TET-Konzentration abhängt, die in der TET-FG-Scheibe verbleib.

[0273] Während es nicht gewünscht ist, an eine Theorie gebunden zu werden, wird angenommen, dass die in diesen Experimenten beobachteten anfangs hohen TET-Konzentrationen möglicherweise eine Folge der Diffusion von TET aus oder nahe der Oberfläche der Scheibe waren. Das heißt, wenn das an diesen Orten „zurückgehalte" TET abgeführt war, verringerte sich die Geschwindigkeit der Solubilisierung und/oder Diffusion in einer Weise, die wahrscheinlich durch den TET-Konzentrationsgradienten und durch die Gestalt oder Konfiguration des FG bestimmt wurde.

[0274] Die Temperatur und FG-Proteinkonzentration spielten ebenfalls eine Rolle beim Bestimmen der TET-Diffusionsgeschwindigkeit aus den TET-FG-Scheiben (siehe Beispiel 13 und 14), aber diese zwei Parameter wurden in diesen Experimenten konstant gehalten.

[0275] Die Freisetzung von TET in Speichel aus einem TET-FG, der 50 und 100 mg/ml TET enthielt, wurde in statischen Experimenten durch Bestimmen der TET-Konzentration in 0,75 ml Speichel gemessen, der täglich ersetzt wurde. Diese Resultate (Fig. 24) sind ähnlich zu jenen, die in PBS erhalten werden, mit der Ausnahme, dass die TET-Konzentration höher war, wobei möglicherweise das kleinere Speichelvolumen wieder gespiegelt wird, das verwendet wurde, um das freigesetzte TET zu sammeln bzw. aufzufangen. Die Gegenwart von TET in der FG-Matrix verlängerte zudem wieder unerwartet die strukturelle Integrität der TET-FG-Matrizen um wenigstens 15 Tage im Vergleich zu der für die Kontroll-FG-Scheiben, die bei 9 Tagen begonnen hatten, zu zerfallen und nahezu vollständig bei 15 Tagen zerfallen waren (Fig. 25).

2. Antimikrobielle TET-Daten

[0276] Die antimikrobiellen Wirkungen auf E. coli Wachstum einiger TET-Konzentrationen in PBS sind in Fig. 26 gezeigt. Die niedrigste TET-Konzentration, die durch dieses Verfahren detektierbar war, war ungefähr 5 µg/ml. Diese Resultate zeigen klar an, dass das freigesetzte TET antimikrobielle Aktivität aufweist. Diese TET-Daten bestätigen jene, die durch Spektrophotometrie erhalten werden, und zeigen an, dass die TET-Menge, die in den FG beigefügt war, die TET-Konzentration in der Lösung bestimmt, die den TET-FG umgibt. Diese Daten demonstrieren ebenfalls, dass die TET-Menge in dem FG maßgeschneidert werden kann, um die gewünschte TET-Konzentration bei oder über der minimalen gewünschten TET-Konzentration in dem Medium aufrecht zu erhalten, das den TET-FG umgibt.

3. TET-FG-Matrix Langlebigkeit

[0277] Die Langlebigkeit von Kontroll-FG- und AB-FG-Scheiben wurde durch visuelle Bewertung der Scheiben bewertet. Die poröse Membran, die während der Herstellung der Scheiben geschnitten wurde, verblieb an dem FG angehaftet und half, die Scheiben während ihrer Integritätsbewertung zu positionieren. Draufsichten von Scheiben, die kein TET (Kontrollen), und 50 oder 100 mg TET pro ml FG enthielten, sind in Fig. 25 bei Tagen 0,9 und 15 gezeigt. Diese Figur zeigt typische Resultate, die FG-Kontroll-Scheiben wurden nämlich innerhalb von zwei Wochen abgebaut, während die TET-FG-Scheiben 15 Tage lang intakt oder nahezu intakt verblieben. In zusätzlichen Experimenten verblieben TET-FG-Scheiben wenigstens fünf Wochen lang intakt oder nahezu intakt (Daten sind nicht gezeigt). Zwischen sterilen und nicht-sterilen TET-Freisetzung-Experimenten wurde keine bedeutende Änderung in der FG-Langlebigkeit beobachtet.

B. CIP-,AMO- und MET-Daten

1. CIP-,AMO- und MET-Freisetzung-Daten

[0278] Das aus CIP-,AMO- und MET-FG freigesetzt Antibiotikum ist in Fig. 27 gezeigt. CIP wurde in einer offensichtlich konstanten Geschwindigkeit ungefähr 4 Wochen lang freigesetzt und dann nahm die Geschwindigkeit graduell ungefähr eine weitere Woche ab. Die Freisetzung von AMO und MET war innerhalb von 3 Tagen vollständig.

2. Antibakterielle CIP- und MET-Aktivität

[0279] Die antimikrobielle Aktivität von freigesetztem CIP und MET (Daten sind nicht gezeigt) läuft gleich zu den Profilen, die für identische AB-FG-Scheiben spektrophotometrisch bestimmt würden.

3. Langlebigkeit supplementierter FG Matrix

[0280] Die Resultate für einen CIP-FG waren ähnlich zu jenen für einen TET-FG. Die Resultate für einen AMO- und MET-FG waren ähnlich zu jenen, die für die FG-Kontrolle erhalten wurden. Zwischen sterilen und nicht-sterilen Experimenten wurde keine bedeutende Änderung in der FG-Langlebigkeit beobachtet.

Diskussion

[0281] Die Resultate demonstrierten, dass schlecht wasserlösliche Formen von CIP und TET eine Kombination von Faktoren bereit stellen, die die maximale AB-Last, Freisetzungsperiode und Langlebigkeit der FG-Matrix, in die sie gemischt werden, beträchtlich erhöht. Alternativ können die FG-Scheiben durch Eintauchen von ihnen in Lösungen von AB, wie beispielsweise TET oder CIP, stabilisiert werden.

[0282] Die Resultate zeigen ebenfalls klar, dass das aus einem AB-FG abgegebene AB seine antimikrobielle Aktivität erhielt, wie durch die Inhibierung von E. coli Wachstum demonstriert wird. Diese Resultate demonstrierten, dass eine TET- und CIP-Supplementation von FG und anderem TS den Abbau vom FG als ein einschränkender Faktor in der Arzneimittelabgabe davon überwinden kann. Das heißt, diese ABs stabilisierten den FG, sodass ihre Freisetzungsperioden und die freigesetzten AB-Konzentrationen unter Verwendung von AB-Konzentrationen in dem FG kontrolliert werden können. Unter Verwendung dieser Prozeduren können TET und CIP in einen FG gepackt werden und ihre Freisetzung kann für eine Periode von Tagen oder Wochen bei wirksamen antimikrobiellen Konzentrationen kontrolliert werden.

[0283] Die TET- und CIP-induzierte FG-Stabilisierung kann zum Kontrollieren der Gesamtfreisetzungszeit nicht nur für diese ABs, sondern auch für andere Arzneimittel oder „Supplemente" ausgenutzt werden, die zu einem FG zugegeben werden, dessen Freisetzungsgeschwindigkeit und/oder Gesamtfreisetzungsdauer von der Integrität der FG-Matrix abhängt.

[0284] Diese Resultate weisen klinische Anwendungen in periodontalen und anderen Bedingungen auf, wo ein FG als ein lokalisiertes Arzneimittelabgabesystem dienen kann. Die TET- oder CIP-induzierte FG-Stabilisierung kann zum Kontrollieren der Gesamtfreisetzungszeit von TET, CIP und anderen Arzneimitteln oder Supplementen ausgenutzt werden, die zu den TET-FG- oder CIP-FG-Matrizen zugegeben worden waren.

Beispiel 13

Wirkung der Temperatur auf die TET-Freisetzungsgeschwindigkeit aus TET-supplementiertem FG

[0285] Ein FG wurde mit 50 mg/ml TET freier Base supplementiert und wurde als 6 × 2,5 mm dicke Scheiben für diese Untersuchung geformt. Die FG-Proteinkonzentration wurde auf 60 mg/ml eingestellt. Die Scheiben wurden in 2 ml PBS, pH 7,3 platziert und ihnen wurde erlaubt, bei 4, 23 und 37 °C zu stehen. Zum Waschen der Scheiben wurde das PBS jede 10 Minuten 6 Mal mit 2 ml frischer PBS ersetzt. Danach wurde das PBS jede Stunde 4 Stunden lang ersetzt. Die TET-Konzentrationen in den gesammelten Proben wurden gegen eine Standardkurve wie vorher spektrophotometrisch bestimmt.

Resultate und Schlussfolgerungen

[0286] Die Resultate demonstrierten, dass die TET-Freisetzungsgeschwindigkeit proportional zu der Tempe-

ratur war (Fig. 28).

Beispiel 14

Wirkung der FG-Proteinkonzentration auf die TET-Freisetzungsgeschwindigkeit aus TET-supplementiertem FG

[0287] Ein FG wurde hergestellt, der mit 1 mg/ml TET HCl supplementiert war, und wurde als 6 × 2,5 mm Scheibe für diese Untersuchung geformt. Die FG-Proteinkonzentration wurde auf 60, 30 und 15 mg/ml eingestellt. Jede Scheibe wurde in 3 ml destilliertes Wasser platziert. Das Wasser wurde mit dem gleichen Wasservolumen jede 10 Minuten insgesamt eine Stunde lang ersetzt. Die TET-Konzentration in den gesammelten Proben wurde gegen eine Standardkurve wie vorher spektrophotometrisch bestimmt.

[0288] Die Daten (Fig. 29) zeigen, dass die TET-Freisetzungsgeschwindigkeit von dem FG mit der niedrigsten Gesamtproteinkonzentration am höchsten war und umgekehrt. Das heißt, die TET-Freisetzungsgeschwindigkeit war zu der FG-Proteinkonzentration umgekehrt proportional.

Beispiel 15

In Vivo antimikrobielle Aktivität eines von einem AB-supplementiertem FG freigesetzten AB

[0289] Um die antimikrobielle Aktivität von TET und CIP zu testen, die vom TET- und CIP-FG freigesetzt wurden, wurde das Leistungsvermögen dieser AB-supplementierten FGs bewertet, Mäuse vor induzierter Peritonitis zu schützen. Experimentell wurde am Tag 1, jedem einzelnen von 5 Tieren pro Gruppe intraperitoneal 0,5 ml PBS (Gruppe-I), FG (Gruppe-II), TET-FG (Gruppe-III) oder CIP-FG (Gruppe IV) injiziert. FG und AB-FG wurden unter Verwendung eines Hamaedics-Verteilers verabreicht, der 0,25 ml TFC bei 120 mg/ml und 0,25 ml Humanthrombin bei 250 E/ml enthielt. In dem Fall von TET- und CIP-FG enthielt die Thrombinlösung 50 mg des jeweiligen AB. Am Tag 2 wurden allen Tieren 2×10^8 (Experiment 1) oder 4×10^8 (Experiment 2) Kolonie-bildende Einheiten (cfu) von S. aureus 202A intraperitoneal injiziert. Resultate: (Experiment 1, Experiment 2. Tiere, die 48 Stunden nach Infektion überleben): Gruppe I, 0 und 1 Überlebende; Gruppe II, 3 und 1; Gruppe III, 3 und 5; und Gruppe IV, 5 und 4 Überlebende. Die meisten Überlebenden lebten in der Dauer des Experiments (2 Wochen), aber einige starben oder wurden vorsätzlich getötet, weil sie krank waren.

[0290] Diese Daten demonstrierten, dass TET-FG und CIP-FG Mäuse vor dem Tod, der von S. aureus 202A verursacht wird, wenigstens 48 Stünden nach der Verabreichung des AB-supplementierten FG beschützten.

Beispiel 16

Stellen gerichtete Langzeit Abgabe von cytotoxischen/antiproliferativen Arzneimitteln vom FG

[0291] Das Fibrinogen wurde mit sterilem Wasser oder für eine Gruppe mit Wasser aufgeschlossen, das mit 5-FU bei einer Konzentration von 17 mg/ml gesättigt war. Thrombinlösungen wurden mit sterilem Wasser hergestellt und wurden dann in 40 mM $CaCl_2$ auf eine Konzentration von 15 E/ml verdünnt, oder Thrombin wurde in 40 mM $CaCl_2$ gelöst, das mit 5-FU in einer Konzentration von 17 mg/ml gesättigt war.

[0292] Kontroll-FG-Gerinnsel enthielten nicht 5-FU und wurden durch Mischen von 200 µl TFC-Lösung (bei 60 mg/ml) mit 200 µl Thrombinlösung (bei 15 E/ml) und Erlauben erzeugt, 20 Minuten lang zu polymerisieren. Diese Gerinnsel wurden in 12 mal 75 mm Testrohren hergestellt und dann in 10 ml 0,05 M Histidin, 0,15 M NaCl, pH 7,3 (Puffer) platziert.

[0293] FG-Gerinnsel, die gesättigte Pegel an flüssigem 5-FU enthielten wurden durch Mischen von 200 µl TFC (60 mg/ml + 17 mg/ml 5-FU) mit 200 µl Thrombinlösung (15 E/ml + 17 mg/ml 5-FU) und Erlauben erzeugt, dass die Gerinnsel 20 Minuten lang vollständig polymerisieren. Die Zugabe gesättigter Pegel von 5-FU in sowohl den TFC- als auch Thrombinlösungen änderte die Gerinnselbildung etwas, wobei ein Gerinnsel erzeugt wurde, das im Vergleich zu den Kontroll-FG-Gerinnseln, die vollständig opak waren, transluzent war.

[0294] Die Gerinnsel, die gebildet wurden, waren physisch die gleichen wie jene, die mit FG alleine hergestellt wurden, mit Ausnahme der Farbe. Gerinnsel wurden in 12 mal 75 mm Testrohren gebildet und dann in 10 ml Puffer platziert.

[0295] Eine zweite Gruppe von FG-Gerinnseln wurden hergestellt, die eine Menge festes, wasserfreies 5-FU enthielten, die gleich war zu der Menge, die in Gerinnseln enthalten waren, die mit gesättigten Lösungen aus 5-FU gebildet wurden. Diese Gerinnsel wurden durch die Zugabe von 7 mg festem, wasserfreiem 5-FU zu 200 µl TFC (60 mg/ml) und 200 µl Thrombin (15 E/ml) gebildet. Sieben mg 5-FU wurden in ein 12 mal 75 mm Testrohr platziert. Zweihundert µl TFC wurden dann zugegeben, gefolgt von 200 µl Thrombin. Die 3 Komponenten wurden dann durch Rück- und Vorpipettieren gemischt, bis ein homogenes Gemisch beobachtet wurde und ein weiteres Mischen wurde aufgrund der Gerinnselreaktion inhibiert. Gerinnsel wurden dann in 10 ml Histidinpuffer platziert.

[0296] Die Endgruppe enthielt 50 mg festes, wasserfreies 5-FU pro Gerinnsel. Aufgrund der ansteigenden Masse von 5-FU (50 mg anstelle von 7 mg) funktionierte das vorher verwendete Verfahren nicht. Anstelle der Herstellung eines homogenen Gerinnsels, wurde ein Gerinnsel mit der Mehrheit des 5-FU gebildet, das sich an dem Boden des Testrohrs abschied. Um dieses Problem zu vermeiden, wurde der Boden des Testrohrs zuerst mit 100 µl TFC (60 mg/ml) und 100 µl Thrombin (15 E/ml) beschichtet. Dies bildete ein Gerinnsel, das den konkaven Boden des Testrohrs bedeckte. Dann wurden 50 mg festes, wasserfreies 5-FU zu der Oberfläche des 200 µl Gerinnsels zugegeben. Im Anschluss an dieses wurden 100 µl TFC zusammen mit 100 µl Thrombin zugegeben. Die zwei Lösungen wurden unter Verwendung eines automatischen Pipettierers gemischt, bis das Protein begann, auszuflocken. Wenn dies stattfand, wurde das Pipettieren beendet, und dem Gerinnsel wurde 20 Minuten lang erlaubt, zu polymerisieren. Das Endprodukt war ein Gerinnsel, das einen dichten Kern von ungefähr 50 mg 5-FU enthielt. Bezüglich der anderen Gerinnsel, diese wurden dann in 10 ml Puffer platziert. Die Endproteinkonzentration des FG in allen Gruppen war 30 mg/ml.

[0297] Jede Gruppe umfasste 10 Wiederholungsversuche. Jedes Dublikat wurde bei 37 °C in 10 ml Puffer inkubiert. Der Puffer wurde bei 5, 10, 22, 33, 52, 75 und 114 Stunden mit 10 ml frischer Lösung ausgetauscht. Aliquote dieses Eluatpuffers wurden dann in einem Spektrophotometer bei einer Wellenlängenfestsetzung von 260 nm untersucht. Vorherige Experimente hatten demonstriert, dass 5-FU bei dieser Wellenlänge stark absorbierte, während Eluate von Kontroll-FG-Gerinnseln dies nicht taten.

[0298] Die Resultate sind in **Fig. 30** gezeigt. Kontrollgerinnsel, die kein 5-FU enthielten, ergaben keine bedeutenden Anzeigen. Gerinnsel, die mit 7 mg 5-FU entweder in der Form gesättigter Lösungen aus 5-FU oder einer äquivalenten Menge an festem, wasserfreiem 5-FU hergestellt waren, vervollständigten ihre Abgabe von 5-FU zwischen 5 bis 10 Stunden, während die Gerinnsel, die 50 mg festes, wasserfreies 5-FU enthielten, wenigstens 75 Stunden lang fortfuhren, 5-FU abzugeben. Peakpegel traten in allen Fällen zu dem Zeitpunkt von 5 Stunden auf.

[0299] Während es nicht gewünscht ist, an eine Theorie gebunden zu sein, wird angenommen, dass die Dauer der 5-FU-Abgabe eine Funktion der in das Gel gepackte Masse von 5-FU zu sein scheint. Als eine Folge war die Menge an 5-FU, die aus den Gerinnseln abgebbar war, die 5-FU in Lösung enthielten, durch die Löslichkeit des Arzneimittels beschränkt. Der Einschluss von Mengen fester, wasserfreier Form, die gleich sind zu den Mengen, die in den Gerinnseln vorhanden sind, die aus einer mit 5-FU gesättigten Flüssigkeit gebildet wurden, führten folglich zu fast identischen Abgabekinetiken, während der Einschluss größerer Mengen an 5-FU in der festen Form, als es unter Verwendung der flüssigen Form möglich war, zu einer Verdreifachung der Gesamtabgabedauer und typischerweise einem 10-fachen Anstieg in der Abgabedauer einer gegebenen Konzentration des Arzneimittels führten. Es wird erwartet, dass der Einschluss noch größere Mengen des festen, wasserfreien 5-FU ebenfalls zu sogar größeren Abgabezeiten führen wird. In anderen Experimenten haben wir festgestellt, dass die Menge an 5-FU, die in den Gerinnseln enthalten war, wenigstens 5-fach und möglicherweise höher erhöht werden kann, und dass das 5-FU-FG-Gemisch ebenfalls in einer injizierbaren Form formuliert werden kann (Daten sind nicht gezeigt). Es wird weiterhin erwartet, dass die Verwendung einer analogen oder anderen Form von 5-FU, die in dem umgebenden wässerigen Medium weniger löslich war als die wasserfreie Form und/oder eine langsamere Lösungsgeschwindigkeit hatte, zu einem weiteren Anstieg der Abgabezeiten führen wird.

[0300] Das Resultat dieses Prozesses ist eine ausbaufähige Abgabe des antiproliferativen/zytotoxischen Arzneimittels 5-FU aus Fibringerinnseln, die wenigstens 10 Mal länger ist als es unter Verwendung des Arzneimittels in der wässerigen Form möglich ist. Diese Technologie (d.h., die Verwendung einer festen Form des Arzneimittels, bevorzugt eines mit einer niedrigen Löslichkeits- und/oder Lösungsgeschwindigkeit) sollte im allgemeinen ungeachtet der Matrix, in der die Arzneimittelpartikel suspendiert sind, oder des Arzneimittels selbst, anwendbar sein.

Beispiel 17 *

Fibroblasten-Chemotaxis als Antwort auf Fibroblastenwachstumsfaktor-supplementiertem FG und Fibronektin

Materialien & Verfahren

Materialien

[0301] DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) wurde von Sigma Chemical Co., St Louis, MO erworben. Eine antibiotische-antimykotische Lösung wurde von GIBCO (Grand Island, N.Y.) erworben. Rekombinanter Fibroblastenwachstumsfaktor-1 (FGF-1) und –4 (FGF-4) waren eine entgegenkommende Gabe von Reginald Kidd, Plasma Derivatives Laboratory, American Red Cross, Rockville, MD bzw. Genetics Institute (Cambridge, MA). Rekombinanter Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2, das auch als basischer FGF oder bFGF bekannt ist) wurde von Upstate Biotechnology, Inc. (Lake Placid, NY) erworben. Alle Kunststoffsachen, die zu sterilen Propagation von Kulturen sowie die Chemotaxisassays benötigt werden, wurden von Fisher Scientific (Newark, DE) erworben. Millicell-PCF (12,0 µm) Einsätze wurden von Millipore, Inc. (Bedford, MA) erworben. Heparin wurde von der UpJohn Company (Kalamazoo, MI) erhalten.

Zellkultur

[0302] NIH/3T3 Fibroblasten bei Passage 126 wurden von der American Type Culture Collection, Rockville, MD erworben. Kulturen von Passagen 129–133 wurden in den Chemotaxisassays verwendet. Kulturen wurden in DMEM propagiert, das mit 10 % Kalbserum und ungefähr 1 % antibiotischer, antimykotischer Lösung supplementiert war. HDFs (Human dermal fibroblasts) wurden von Clonetics, Inc. (San Diego, CA) bei Passage 2 erworben. Kulturen von Passagen 3–5 wurden in den Chemotaxisassays verwendet. Kulturen wurden in DMEM kultiviert, das mit 20 FBS (Hyclone Laboratories; Inc., Logan, UT) und ungefähr 1 % antibiotischer, antimykotischer Lösung (Gibco, Grand Island, N.Y.) supplementiert war.

Zellchemotaxisassays

[0303] Die Prozedur, die verwendet wird, um Zellchemotaxis zu bestimmen, war eine Kombination zweier bekannter Technologien. Eine Modifizierung von Boyden's Kammer wurde wie folgt verwendet: Millicell-PCF (Millipore, Inc., Bedford, MA) (12,0 µm) Einsätze mit einem Durchmesser von 12,0 mm wurde in einzelne Vertiefungen von Platten mit 24 Vertiefungen platziert, um die oberen und unteren Chemotaxiskammern zu erzeugen. Chemotaxisresultate wurden durch Ausführen einer Schachbrettanalyse für jede Kombination von Zellen und Wachstumsfaktoren erreicht. Konzentrationen, die im Bereich von ,1, 1, 10, 100 ng/ml mit/ohne zugesetztem Heparin (10 E/ml) lagen, wurden für FGF-1, FGF-2 (kein Heparin) und FGF-4 mit allen Zelltypen verwendet, die in dem Materialschnitt genannt sind. Kurz gesagt, die Kulturen wurden trypsinisiert und in DMEM + 0,1 BSA (Bovine Serum Albumine) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ungefähr eine Stunde lang bei 37 °C in einer 5 % CO_2 befeuchteten Kammer platziert. Zwei bis 2,5 × 10^5 Zellen in 50 µl wurden pro. Einsatz zu der oberen Kammer des Ausbaus der Platten mit 24 Vertiefungen zugegeben. Behandlungen wurden wie vorstehend erwähnt zugegeben. Der Assay wurde bei 37 °C in einer 5 % CO_2 befeuchteten Kammer 4 Stunden lang gehalten. Alle getesteten Kombinationen wurden dreifach ausgeführt. An dem Ende von 4 Stunden wurden die Platten aus dem Inkubator entfernt, und die Filter wurden dem Protokoll zum Färben folgend gefärbt, das mit den Millicell-PCF-Einsätzen enthalten war. Kurz gesagt, das Fluid, das das Innere und Äußere der Millicell-PCF-Einsätze umgab, wurde entfernt. Drei Prozent Glutaraldehyd (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) wurde zu dem Inneren und Äußeren der Einsätze ungefähr 20 Minuten lang zugegeben. Im Anschluss an die Entfernung der 3,0 % Glutaraldehyd, wurden 0,5 % Triton X-100 (E.M. Science, Cherry Hill, N.J.) 5–7 Minuten lang zugegeben. Auf die Entfernung der 0,5 % Triton X-100 wurde Fisher's Hematoxylin Solution Gill's Formulation (Fisher Scientific, Newark, DE) etwa 10 Minuten lang zugegeben. Diese Lösung wurde durch Laufen von destilliertem Wasser für etwa 5 Minuten lang ausgewaschen. Unter Verwendung eines Baumwolltupfers wurde die obere Seite des Filters abgetupft, um Zellen zu entfernen, die nicht gewandert waren. Filter wurden mit der unteren Seite blickend auf Objektträger in Crystal Mount™ (Biomeda Inc., Foster City, CA) Lösung montiert, und 10 zufällige Felder wurden pro Objektträger sowohl visuell bei 400 x und bei 200 x unter Verwendung eines Image Analyzing System gezählt, um die Zählung der Zellen auf der Unterseite der Filter zu automatisieren.

Schachbrettanalyse

[0304] Gegebenenfalls wurde eine Schachbrettanalyse durchgeführt, um eine zufällige Wanderung, und positive und negative Chemotaxis zu bestimmen. Wachstumsfaktoren wurden zu den oberen und/oder unteren

Kammern zugegeben, um zu beobachten, ob Zellen in Richtung zu dem WF alleine (Chemotaxis) wanderten, oder ob eine Wanderung zufällig war, ungeachtet dessen, ob der Wachstumsfaktor zu der oberen oder unteren Vertiefung (Chemokinese) zugegeben wurde oder ob eine Zellwanderung gegen den chemotaktischen Gradienten war (negative Chemotaxis).

Zellwanderungassay für vom FG freigesetzten FGF

[0305] Chemotaxiskammern und Zellen wurden wie vorstehend verwendet. Fünfzig µl 8 mg/ml TFC (Topical Fibrinogen Complex, American Red Cross, Rockville, MD) wurden zu dem Boden einer Platte mit 24 Vertiefungen zugegeben. Fünfzig µl Testwachstumsfaktor +/– Heparin bei einer Endkonzentration von 10 E/ml (FGF-1, FGF-4 mit Heparin, FGF-2 alleine) wurden zu dem TFC zugegeben und gründlich gemischt. Zehn µl Rinderthrombin (Armour Pharmaceutical Company, Kankakee, IL) wurde zugegeben und gründlich gemischt. Zehn Komponenten wurden erlaubt, ungefähr 30 Minuten lang bei Raumtemperatur auszuflocken. Das Gesamtvolumen in den unteren und oberen Kammern wurde auf jeweils 0,5 ml mit DMEM + 0,1 % BSA gebracht. Die Konzentration des FGF's, der zu dem TFC zugegeben wurde, wurde eingestellt, um die gewünschte Gesamtkonzentration zu erzeugen, wie bestimmt durch:
Gesamt-FGF-Konzentration = mg von zu dem TFC zugesetztem FGF Flüssigkeitsvolumen in der oberen Kammer + Volumen vom FG & Flüssigkeit in der unteren Kammer

[0306] Der Assay wurde ungefähr 24 Stunden lang bei 37 °C in einer 5 % CO_2 befeuchteten Kammer ausgeführt. An dem Ende der 24 Stunden wurden die Filter entfernt, fixiert und angefärbt, und die Anzahl von Zellen auf der Unterseite des Filters wurden wie vorstehend beschreiben gezählt.

Resultate

Leistungsvermögen zur Wanderung von Fibroblasten

[0307] Die Fähigkeit von NIH 3T3 Fibroblasten, in Richtung zu verschiedenen wohl bekannten chemotaktischen Mitteln zu wandern, wurde bestimmt, zu sicherzustellen, dass die in diesem Assay verwendeten Zellen ihr Leistungsvermögen beibehielten. Fibronektin war das am meisten wirksame chemotaktische Mittel, das sowohl für NIH 3T3 als auch HDF's mit maximalen Antworten getestet wurde, die bei 20 µg/ml auftraten (**Fig. 31**, Tabelle 7). Danach wurde Fibronektin bei 20 µg/ml als die positive Kontrolle zur Wanderung verwendet.

Chemotaxis von NIH 3T3 Fibroblasten in Richtung zu FGF-1

[0308] Eine maximale Stimulierung der Wanderung von NIH 3T3 Fibroblasten durch FGF-1 wurde bei 10 ng/ml in der Gegenwart von 10 E/ml Heparin beobachtet (**Fig. 32**). Eine Schachbrettanalyse offenbarte, dass FGF-1 für NIH 3T3 Zellen chemotaktisch war (Tabelle 8).

Chemotaxis von NIH 3T3 Fibroblasten in Richtung zu FGF-2

[0309] Eine maximale Stimulierung der Wanderung von NIH 3T3 Fibroblasten durch FGF-2 wurde bei 1 ng/ml FGF-2 beobachtet (**Fig. 33**). Eine Schachbrettanalyse zeigte, dass FGF-2 für NIH 3T3 Zellen chemotaktisch war (Daten sind nicht gezeigt).

Chemotaxis von NIH3T3 Fibroblasten in Richtung zu FGF-4

[0310] Eine maximale Stimulierung der Wanderung von NIH 3T3 Fibroblasten durch FGF-4 wurde bei 10 ng/ml beobachtet (**Fig. 34**). Eine Schachbrettanalyse offenbarte, dass FGF-4 für NIH 3T3 Zellen chemotaktisch war.

Chemotaxis von HDFs in Richtung zu FGF-1

[0311] Eine maximale Stimulierung der Wanderung von HDFs durch FGF-1 wurde bei 1 bis 10 ng/ml beobachtet (**Fig. 35**). Eine Schachbrettanalyse zeigte, dass FGF-1 für HDFs chemotaktisch war (Tabelle 9).

Chemotaxis von HDFs in Richtung zu FGF-2

[0312] Eine maximale Stimulierung der Wanderung von HDFs durch FGF-2 wurde bei 10 ng/ml beobachtet (**Fig. 36**). Eine Schachbrettanalyse offenbarte, dass FGF-1 für HDFs chemotaktisch war (Daten sind nicht ge-

zeigt).

Chemotaxis von HDFs in Richtung zu FGF-4

[0313] Eine maximale Stimulierung der Wanderung von HDFs durch FGF-4 wurde bei 10 ng/ml beobachtet (Fig. 37). Eine Schachbrettanalyse zeigte, dass FGF-1 für HDFs chemotaktisch war (Daten sind nicht gezeigt).

Humandermalfibroblastenwanderung zu im FG beigefügten FGF-1, -2 und -4

[0314] Eine maximale Wanderungsantwort zu vom FG freigesetzten FGF wurde bei einer beigefügten und gesamten Konzentration von FGF-4 im FG von 1 ng/ml hervorgebracht (Fig. 38). Ähnliche Resultate wurden ebenfalls festgestellt, wenn FGF-1 und FGF-2 in dem FG beigefügt waren (Daten sind nicht gezeigt) mit der Ausnahme, dass die Konzentration von FGF-2, die die chemotaktische Peakantwort hervorbrachte, 0,01 mg/ml war.

Tabelle 7

Konzentration von Fibronektin in dem unteren Fach	Konzentration von Fibronektin in dem oberen Fach			
	0 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	50 µg/ml
0 µg/ml	48,53 +/- 4,695	62,3 +/- 3,269	69,9 +/- 12,25	62,0 +/- 2,616
10 µg/ml	68,03 +/- 10,793	47,53 +/- 5,605	64,86 +/- 7,961	74,66 +/- 3,946
20 µg/ml	90,53 +/- 5,203	88,73 +/- 4,152	56,9 +/- 3,289	76,23 +/- 1,8190
50 µg/ml	72,43 +/- 8,276	91,3 +/- 1,003	63,26 +/- 3,835	57,46 +/- 2,287

Tabelle 8				
Konzentration von FGF-1 in dem unteren Fach	Konzentration von FGF-1 in dem oberen Fach			
	0 ng/ml	1 ng/ml	5 ng/ml	10 ng/ml
0 ng/ml	32,1 +/- 6,328	53,93 +/- 4,152	27,27 +/- 3,873	25,96 +/- 4,151
1 ng/ml	59,46 +/- 6,89	36,9 +/- 5,728	22,1 +/- 9,232	35,86 +/- 2,074
5 ng/ml	64,867 +/- 1,75	41,44 +/- 1,866	24,84 +/- 4,337	41,6 +/- 6,717
10 ng/ml	70,83 +/- 2,752	39,73 +/- 2,428	39,73 +/- 2,428	41,83 +/- 6,879

Tabelle 9					
Konzentration von FGF-1 in dem unteren Fach	Konzentration von FGF-1 in dem oberen Fach				
	0 ng/ml	0,1 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml
0 ng/ml	1,96 +/- ,602	48, +/- 1,965	1,3 +/- 0,351	4,6 +/- 2,424	2,4 +/- 2,59
0,1 ng/ml	66,46 +/- 3,304	3,5+/- 1,550	22,0 +/- 6,621	9,7 +/- 7,758	11,6 +/- 8,609
1 ng/ml	90,0 +/- 5,776	27,7 +/- 8,10	52,6 +/- 2,775	9,7 +/- 3,553	1,83 +/- 2,2
10 ng/ml	92,4 +/- 29,307	55,1 +/- 7,151	44,2 +/- 11,844	16,2 +/- 4,781	21,2 +/- 6,42
100 ng/ml	65,4 +/- 22,055	53,7 +/- 7,3118	54,9 +/- 18,599	49,166 +/- 9,152	4,66 +/- 3,3

Diskussion

[0315] Die FGFs erzeugten eine tiefe chemotaktische Antwort in HDFs. Für jeden chemotaktischen Assay, der mit HDFs ausgeführt wurde, wurde ein guter Unterschied zwischen der negativen Kontrolle und der FGF-Konzentration erhalten, die eine maximale Wanderungsantwort hervorbrachte: 18-, 12- bzw. 10-fach als Antwort auf FGF-1, -2 bzw. –4.

[0316] Diese Stimulierung der Chemotaxis durch Wachstumsfaktoren war nicht so hoch für NIH 3T3 Zellen wie sie für HDFs war, möglicherweise aufgrund der hohen Passagennummer der verfügbaren Ansatzkulturen der NIH 3T3 Zellen im Vergleich zu den HDFs.

[0317] Es wurde festgestellt, dass FGF-1, FGF-2 und FGF-4 potente Stimulatoren von Fibroblastenchemotaxis sind. Gerichtete Wanderung von Fibroblasten durch einen oder einer Kombination der vorstehenden Wachstumsfaktoren kann zur Fibroblastengegenwart in der Verletzungsstelle führen, dadurch zu Fibroplasie und dem Niederliegen von Kollagen und einer extrazellulären Matrix führend. Neben seinen gut bekannten angiogenetischen Eigenschaften, können FGFs deshalb eine Rolle bei der Wundheilung haben, wobei sie entweder alleine oder in einer Kombination mit PDGF, IGF-I, TGF-β und/oder anderen Faktoren wirken.

[0318] Frühere Untersuchungen in der Verwendung von FGFs zur Beschleunigung von Wundheilung, haben keine bedeutenden Resultate ergeben (Carter et al., 1988). Dies kann an einem Erfordernis für das verlängerte Aussetzen von Zellen zu den Faktoren in vivo für eine maximale Antwort liegen (Presta et al., Cell Regul. 2:719–726 (1991) und Rusnati et al., J. Cell. Physiol. 154: 152-161 (1993)). Leider ist es schwierig, Wachs-

tumsfaktoren auf Wunden für derartig lange Zeitperioden unter Bedingungen abzugeben, die nicht mit den Heilungsprozess interferieren werden.

[0319] Die Erfindung der Anmelderin, FGFs in einen FG beizufügen, erlaubt ein verlängertes Aussetzen von Zellen der FGFs und kann auf eine Wunde angewendet werden. Die resultierende Fibrinbeschichtung ahmt die natürliche Antwort auf eine Gewebeverletzung nach, während der Wachstumsfaktor direkt auf die Wundstelle abgegeben wird. In einer früheren Untersuchung von der Anmelderin wurde ein FG, der FGF-1 enthielt, verwendet, um künstliche Gefäßtransplantate zu auszukleiden (Beispiels 8, hierin). Wenn die Transplantate in die Gefäße von Kaninchen platziert wurden, wurde der FGF-1 für eine Periode von bis zu 28 Tagen freigesetzt. In weiteren Untersuchungen, einschließlich Hundetransplantate, war die Wirkung der Beifügung von FGF-1 in die Transplantatwände die gesamte Endothelialisierung der künstlichen Transplantate innerhalb der gleichen Periode (Greisler et al., Surgery 112: 244–255 (1992)). Diese Anwendungsform kann folglich eine tiefe biologische Wirkung in vivo hervorbringen. In dieser Untersuchung haben die Anmelder demonstriert, dass Fibroblasten in Richtung zu FGFs angezogen werden können, die vom FG freigesetzt wurden. Diese Eigenschaft wird beim Behandeln von Wunden mit GF-supplementiertem TS nützlich sein.

Beispiel 18 *

Stellen gerichtete Angiogenese unter Verwendung vom TS-Versiegelungsmittel zur Abgabe von angiogenetischen Substanzen

[0320] Diese Ausführungsform erlaubt die gerichtete Erzeugung neuer Blutgefäße in einer kontrollierten Weise innerhalb des Körpers. In dieser Ausführungsform enthält und liefert das TS angiogenetsiche Substanzen, wie beispielsweise Fibroblastenwachstumsfaktor-1 (FGF-1) in einer Menge derart, dass seine Konzentration, die von dem supplementierten TS freigesetzt wird, wirksam ist, um Angiogenese zu induzieren.

[0321] Diese Ausführungsform wird in einer kontrollierten Weise verwendet, um Gefäße auf Körperflächen neu zu bilden, denen eine geeignete Blutzufuhr entzogen wurde, wie beispielsweise Herz-, Hirn- und Muskelgewebe und die Retina. Diese Ausführungsform wird verwendet, um einen Kreislauf für implantierte Organe oder wiederangefügte Glieder wiederherzustellen oder zu verbessern. Diese Ausführungsform kann verwendet werden, um ein Gefäßnetzwerk oder „Gefäßbett" zu erzeugen für: die Erzeugung künstlicher Organe oder Organoide, die Abgabe und/oder Lokalisierung von und/oder Ernährung von Zellen, die in der Gentherapie oder als ein Ziel der Gentherapie verwendet werden, für die Ernährung und/oder Lokalisierung von Zellen zur Gewebeerhöhung. Diese Ausführungsform schließt auch die Notwendigkeit der Implantation einer Vorrichtung oder Substanz aus, die einen Fremdkörper oder eine andere übermäßige Entzündungsreaktion induzieren kann, die die Blutgefäßbildung oder die Funktion des unterliegenden Organs (Organe) schädigen kann.

[0322] Die Erfindung besteht aus einer Fibrinogen-Formulierung (die geeignet ist zur Fibrinbildung) mit oder ohne Fibronektin und/oder Kollagen, in die eine geeignete Konzentration einer angiogenetischen Substanz, wie beispielsweise FGF-1, platziert ist. Das Fibrinogen kann ebenfalls zum Schutz gegen die proteolytische Aktivität von Thrombin Stabilisierungsmittel enthalten. In dem Fall von FGF-1 kann Heparinsulfat (1–1000 E/ml) als das Stabilisierungsmittel in dem Konzentrationsbereich von 1 ng/ml bis 1 mg/ml verwendet werden. Alternativ ist die angiogenetische Substanz in einer geeigneten Konzentration in den Thrombin-, Calcium- oder Wasserkomponenten enthalten. Diese Formulierung wird dann mit Thrombin gemischt und schnell innerhalb des Körpers in einer Linie, die die gewünschten Stellen verbindet, oder auf eine einzelne Stelle angewendet. Die Fibrinogen-Thrombin-Mischung polymerisiert dann, um einen FG zu bilden. Der FGF-1 oder eine andere angiogenetische Substanz bleibt, in der FG-Matrix entweder als freie Form oder an das Stabilisierungsmittel oder eine andere Komponente des Gemischs gebunden zurück. In einer Ausführungsform sollte die Konzentration des FGF-1 in dem TS 0,1 ng/ml bis 1 mg/ml, bevorzugter 1 ng/ml bis 100 µg/ml, am meisten bevorzugt 100 ng/ml bis 10 µg/ml sein. Der FGF-1 oder eine andere angiogenetische Substanz wird Blutgefäßbildung innerhalb des Körpers des abgeschiedenen FG induzieren. Der FG wird unter Zurücklassung des intakten Blutgefäßes (Blutgefäße) natürlich abgebaut werden.

Beispiel 19 *

Stellen gerichtete Knorpelinduktion

[0323] Diese Ausführungsform erlaubt die kontrollierte Erzeugung neuer Knorpel sowie die geleitete Regeneration beschädigter Knorpel innerhalb des Körpers. In dieser Ausführungsform enthält und liefert das TS einen knorpelfördernden Faktor (Faktoren), wie beispielsweise Knorpelinduzierende Faktoren-A und/oder -B (CIF-A

bzw. CIF-B, die ebenfalls als TGF-B_1 bzw. TGF-B_2) und anderen Faktor (Faktoren), wie beispielsweise Osteoid-Induzierenden Faktor (OIF), in einer Menge derart, dass die Konzentration des induzierenden Faktors(en), der von dem supplementierten TS freigesetzt wird, wirksam ist, um Knorpelbildung zu induzieren. In einer anderen Ausführungsform sollte die Konzentration der induzierenden Faktoren 0,1 ng/ml bis 1 mg/ml, bevorzugter 1 ng/ml bis 500 ng/ml, am meisten bevorzugt 100 bis 250 ng/ml sein. Diese Ausführungsform kann ebenfalls Arzneimittel, wie beispielsweise Antibiotika, und andere Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise EGF, PDGF und bFGF in dem TS enthalten. Die knorpelinduzierende Substanz ist in einer geeigneten Konzentration in den Fibrinogen- oder Thrombin- oder Calcium- oder Wasserkomponenten enthalten, die verwendet werden, um das TS herzustellen.

[0324] Das supplementierte TS kann entweder auf die gewünschte Endknorpelform vor Implantation vor-geformt sein oder es kann in den Körper des Empfängers in flüssiger Form implantiert werden, wenn das TS gemischt wird und polymerisiert. Die resultierende Form kann dann wie gewünscht modelliert werden, um die erforderliche Gestalt des benötigten Knorpels zu erzeugen. Das knorpelinduzierende TS (CI-TS) Gemisch kann ebenfalls verwendet werden, um ein herkömmliches Implantat vorzubeschichten, mit dem Resultat, dass es ein herkömmliches Implantat mit einer Beschichtung aus Lebendknorpel ist.

[0325] Unter Verwendung irgendwelcher der vorstehend beschriebenen Techniken wird das CI-TS dann in den Körper des Empfängers implantiert. Diese Implantation kann heterotop oder orthotop sein. Nach einem geeigneten Intervall wird das CI-TS durch Lebendknorpel mit der Form des ursprünglichen CI-TS-Implantats ersetzt.

[0326] Derartige Implantate können verwendet werden, um beschädigten oder verlorenen Knorpel zu ersetzen oder die Gewebeintegration und/oder Funktion eines künstlichen Implantats zu verbessern. Beispiele derartiger Verwendungen umfassen den Ersatz oder die Rekonstruktion von Nasen- oder Ohrengewebe, die Erzeugung einer funktionellen Gelenkoberfläche auf einem in vivo gewachsenen Knochenimplantat oder die Erzeugung einer ähnlichen Oberfläche eines künstlichen Implantats. Die Reparatur von durch Krankheit, wie beispielsweise rheumatoide Arthritis, beschädigtem Knorpel kann ebenfalls unter Verwendung des CI-TS durchgeführt werden, um eine neue und glatte Knorpeloberfläche des Arthus zu erzeugen. Implantate, die für raumfüllende Anwendungen in der Kuns/rekonstruktiven Chirurgie bestimmt sind, können ebenfalls entweder aus CI-TS gebildet sein oder mit CI-TS beschichtet sein, um eine Gewebeintegration zu verbessern und Fremdkörperreaktionen zu reduzieren.

[0327] Weil gegenwärtige Technologie nicht die geleitete Knorpelregeneration erlaubt, ist diese Erfindung ein Fortschritt, weil sie die Erzeugung von Knorpelgewebe erlaubt, das erforderlich ist, um den natürlichen Aufbau des Körpers vollständig nachzuahmen. Dies führt zu verbesserter Gelenkreparatur, künstlichen Gelenken und anderen Implantaten, sowohl für orthopädische als auch andere Anwendungen.

[0328] Diese Ausführungsform kann zum Beispiel verwendet werden: um verbesserte orthopädische Implantate oder verbesserte plastische/rekonstruktive Implantate zu erzeugen: für eine Gelenkreparatur für einen traumatischen, kongenitalen oder pathologisch beschädigten oder dysfunktionalen Knorpel; um Beschichtungen von Schrittmacherimplantaten und Drähten zu erzeugen, um ihre Gewebeintegration zu erhöhen und Fremdkörperreaktionen zu reduzieren. Ähnliche Beschichtungen können ebenfalls auf irgendeine implantierbare Vorrichtung für ähnliche Zwecke angewendet werden.

Beispiel 20

In sich geschlossener TS-Wundverband

[0329] Diese Ausführungsform ist ein in sich geschlossener TS-Wundverband oder Binde, der bzw. die sowohl die Thrombin- als auch die Fibrinogenkomponenten des FG enthält. Das Calcium ist entweder in der Thrombin- und/oder Fibrinogenkomponente(n) enthalten. Entweder eine oder beide der Thrombin- oder Fibrinogenkomponenten kann, aber muss nicht, mit einem Wachstumsfaktor(en), wie beispielsweise FGF oder bFGF, oder einem anderen Arzneimittel(n), wie beispielsweise einen Analgetikum, Antibiotikum oder anderen Arneimittel(n), supplementiert sein, die eine Infektion inhibieren, eine Wundheilung fördern und/oder Narbenbildung inhibieren können. Das Supplement (Supplemente) ist bei einer Konzentration in dem TS derart, dass es für seinen bestimmten Zweck wirksam ist, z. B., wird ein Antibiotikum das Wachstum von Mikroben inhibieren, wird ein Analgetikum Schmerzen lindern.

[0330] Das Thrombin und Fibrinogen sind durch eine impermeable Membran voneinander getrennt und das Paar wird mit einer anderen derartigen Membran bedeckt. Das Thrombin und Fibrinogen sind in einem schnell verdampfenden Gel (z. B., Methylcellulose/Alkohol/Wasser) enthalten. Die Binde kann auf der Oberfläche beschichtet sein, die mit dem Gel in Kontakt ist, um zu sichern, dass das Gelpolster während der Verwendung am Platz verbleibt (siehe **Fig. 39**).

[0331] In Betrieb wird die Membran entfernt, die die zwei Komponenten trennt, wobei den zwei Komponenten erlaubt wird, sich zu mischen. Die Außenmembran wird dann entfernt, und die Binde wird auf die Wundstelle angewendet. Die Wirkung des Thrombins und anderen Komponenten des Fibrinogenpräparats verursacht die Umwandlung des Fibrinogens zu Fibrin, so wie sie es mit irgendeiner vom FS tun. Dies führt zu einer natürlichen Inhibierung von Blut- und Fluidverlust aus der Wunde, und die Errichtung einer natürlichen Barriere zu einer Infektion.

[0332] In einer ähnlichen Ausführungsform können die Thrombinkomponente und die Kunststofffolie weg gelassen werden, die das Thrombingel und das Fibrinogengel trennt. Das Calcium, das früher in dem Thrombingel war, kann oder kann nicht in dem Fibrinogengel enthalten sein, wie gewünscht. In Betrieb wird die äußere undurchlässige Kunststofffolie entfernt, und die Binde direkt auf die Wundstelle angewendet, wie vorher beschrieben. Das Thrombin und Calcium, die an der Wundstelle natürlich vorhanden sind, induzieren dann die Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin und inhibieren wie vorstehend Blut- und Fluidverlust aus der Wunde. Diese Ausführungsform weist den Vorteil auf, einfacher, billiger und leichter herzustellen zu sein. Es kann jedoch Umstände geben, in denen Wunden eines Patienten unausreichend Thrombin aufweisen. In diesen Fällen sollte die frühere Ausführungsform der Erfindung verwendet werden.

[0333] Diese Ausführungsform ist ein Fortschritt über die gegenwärtige Technologie, weil sie die schnelle TS-Anwendung auf eine Wunde ohne die Zeitverzögerung erlaubt, die mit Solubilisierung und Mischen der Komponenten verbunden ist. Sie erfordert auch kein technisches Wissen oder Fachwissen, um zu arbeiten. Diese Charakteristiken machen sie zur Verwendung in Feldanwendungen, wie beispielsweise Traumapackungen für Soldaten, Rettungsarbeiter, Ambulanz/Sanitätsteams, Feuerwehrleute, bei Erste Hilfe Kits für die Allgemeinheit und für das Notfallstationpersonal in Krankenhäusern ideal. Eine kleine Version kann ebenfalls zur Verwendung von der Allgemeinheit nützlich sein.

Beispiel 21 *

Supplementiertes TS als eine Oberflächenbeschichtung für Biomaterialien

[0334] Diese Ausführungsform verwendet supplementiertes TS als eine Beschichtung für die Oberflächen orthopädischer Vorrichtungen und anderer Biomaterialien, die in ein Körper eines Tiers implantiert werden müssen. Beispiele diese Vorrichtungen sind Urinkathether, intravaskuläre Katheter, Nähte, Gefäßtransplantate, intraokulare Linsen, Kontaktlinsen, Herzklappen, Schulter-/Ellbogen-/Hüft-/Knie-Ersatzvorrichtungen, ganze Kunstherzen, usw. Leider können diese Biomaterialien Stellen für Bakterienadhäsion und -Kolonisierung werden, was eventuell zu einer klinischen Infektion führen kann, die das Leben des Tiers gefährdet. Um dieses Problem zu minimieren, ist das Biomaterial mit einem supplementierten TS beschichtet.

[0335] In dieser Ausführungsform kann das TS supplementiert sein mit: einem Wachstumsfaktor(en); einem Arzneimittel(n), wie beispielsweise ein Antibiotikum; BMP; und/oder anderen Kulturzellen usw. Beispiele von Antibiotika, die in den TS eingefügt werden könne, umfassen, sind aber nicht darauf beschränkt: die Penicilline, Cephalosporine; Tetracycline; Chloramphenocole; Metronidazole; und Aminoglycoside. Beispiele von Wachstumsfaktoren, die in den TS eingefügt werden können, umfassen FGF, PDGF, TGF-β, sind aber nicht darauf beschränkt. Beispiele von BMPs, die in den TS eingefügt werden können, umfassen BMP 1 bis BMP 8, sind aber nicht darauf beschränkt. DBM kann ebenfalls zu dem TS zugegeben werden. Beispiele von Kulturzellen, die in den TS eingefügt werden können umfassen Endothelzellen, Osteoblasten, Fibroblasten usw., sind aber nicht darauf beschränkt.

[0336] Das Supplement (Supplemente) können entweder in der Throbin-, Fibrinogen-, Calcium- oder Wasserkomponente (-komponenten) enthalten sein. Die Konzentration des Supplements in dem TS ist derart geeignet, dass sie für ihren bestimmten Zweck wirksam ist, z.B., wird ein Antibiotikum das Wachstum von Mikroben auf dem Biomaterial inhibieren, wird ein Wachstumsfaktor das Wachstum des gewünschten Zelltyps (Zelltypen) in dem TS und/oder auf der Oberfläche des Biomaterials induzieren.

[0337] Diese Erfindung ist eine Verbesserung für vorhandene Biomaterialprodukte, die Titan- und Titanlegie-

rungsvorrichtungen (wie beispielsweise Fixierungsplatten, Schulter-/Ellbogen-/Hüft/Knierersatzvorrichtungen, knochenintegrierte Dentalimplantate usw.), feste Silikonprodukte (wie beispielsweise Silikongumminasenimplantate, flüssige und/oder Gelsiliziumprodukte (wie beispielsweise Brustimplantate und Hodenimplantate) und natürliche oder synthetische Polymere enthalten, die als herkömmliche Materialien beim Heilen einer Wundstelle verwendet werden, die verschiedene Formen, wie beispielsweise Monofilamente, faserförmige Systeme (wie beispielsweise Baumwolle, Papier, Faservliese), Folien, Schwämme, Säcke usw., aufweisen können.

[0338] Ein FG wird aus 3 Komponenten hergestellt: Fibrinogen (zum Beispiel als TFC); und Thrombin, wobei beide in der lyophilisierten Form sein können; sowie Calcium. Das lyophilisierte Fibrinogen wird mit sterilem Wasser wieder hergestellt bzw. auf seine ursprüngliche Konzentration verdünnt, während die Thrombinkomponente mit Calciumchloridlösung wieder hergestellt bzw. auf seine ursprüngliche Konzentration verdünnt wird. Ein Supplement kann zu irgendeiner der drei Komponenten vor dem Mischen zugegeben. Geeignete Volumen des Fibrinogens und Thrombins, das Calcium enthält, werden gemischt, um den FG zu erzeugen. Der FG wird dann auf die Oberfläche des Biomaterials als eine Beschichtung davon angewendet, wie zum Beispiel durch Sprühen, Anstreichen usw. alternativ wird das Implantat in den FG getaucht, während er noch flüssig ist. Ein Supplement kann ebenfalls zu dem FG zugegeben werden, bevor er auf eine Biomaterialoberfläche geschichtet wurde oder danach. Ein mit einem FG beschichtetes Implantat wird zum Beispiel in einer Antibiotikumlösung für eine bestimmte Zeitperiode getränkt, sodass das Antibiotikum in das TS diffundieren wird. Ein anderen Beispiel ist eine Beschichtung einer Vorrichtung mit TS, nachdem Kulturzellen auf die Fibrinbeschichtung angesetzt werden. Ein Beschichten der Oberfläche von Biomaterialien, die in ein Tier implantiert werden, mit supplementiertem TS wird verschiedenen Zwecken dienen, einschließlich: die Inhibierung vom Wachstum von Bakterien, die an dem Biomaterial anhaften; lokale Immunstimulation und/oder -normalisierung; die Förderung von Wundheilung; und die Förderung der Transplantation des Biomaterials in das umgebende Gewebe.

Patentansprüche

1. Supplementierte Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe, die eine lokale Abgabe von wenigstens einem Arzneimittel fördert, enthaltend:
i) ein Fibrin-Kleber enthaltendes Versiegelungsmittel für Gewebe, und
ii) wenigstens ein Arzneimittel in fester Form;
wobei das Arzneimittel ein Analgetikum, ein antiproliferatives/zytotoxisches Arzneimittel, ein entzündungshemmendes Mittel, ein Antikoagulans, eine osteoinduktive Verbindung, ein Oligonucleotid, ein Antibiotikum, ein antivirales Mittel, ein Antimykotikum, ein antiparasitisches Mittel, ein Anästhetikum, ein kardiovaskuläres Arzneimittel, ein gentherapeutisches Reagens, ein Vitamin oder eine andere Nahrungsmittelergänzung ist; wobei die Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe keinen Wachstumsfaktor enthält.

2. Supplementierte Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe nach Anspruch 1, wobei das Arzneimittel zur lang andauernden Freisetzung geeignet ist.

3. Supplementierte Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe nach Anspruch 1, wobei das Arzneimittel an einen unlöslichen Träger gebunden ist, um seine Abgabe von dem Versiegelungsmittel für Gewebe zu verlängern.

4. Supplementierte Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Versiegelungsmittel für Gewebe ein Fibrin-Kleber ist, und die Anwesenheit des Arzneimittels das Versiegelungsmittel stabilisiert.

5. Supplementierte Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zusammensetzung eine Vielzahl der Arzneimittel enthält.

6. Supplementierte Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe nach Anspruch 1, wobei der Fibrin-Kleber einen topischen Fibrinogenkomplex, ein Humanthrombin und Calciumchlorid enthält.

7. Supplementierte Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe nach Anspruch 1, die mindestens ein Antibiotikum enthält, das fähig ist, ein durch den Fibrin-Kleber gebildetes Gerinnsel zu stabilisieren.

8. Supplementierte Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe nach Anspruch 7, wobei das stabilisierende Antibiotikum Tetracyclin oder Ciprofloxacin ist.

9. Biomaterial, das mit einer supplementierten Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe nach irgendeinem der vorhergehenden Ansprüche behandelt worden ist.

10. Biomaterial nach Anspruch 9, wobei das Biomaterial eine Gefäßprothese oder eine implantierbare medizinische Vorrichtung ist.

11. Verwendung einer supplementierten Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 8 zur Herstellung eines Mittels zu der Behandlung und/oder Vorbeugung einer Infektion, der Behandlung von Neoplasie, der Beschleunigung von Wundheilung, oder der Behandlung und/oder Vorbeugung einer kardiovaskulären Erkrankung.

12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei die supplementierte Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe ein zytotoxisches Arzneimittel enthält, und das Mittel zur Behandlung von Neoplasie bestimmt ist.

13. Verwendung einer supplementierten Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Arzneimittel eine osteoinduktive Verbindung zur Herstellung einer Matrix zur Bereitstellung einer temporären Gerüststruktur an dem Ort eines Knochendefekts ist, um die Form und den Ort von neugebildetem Knochen zu bestimmen, wobei dadurch Knochenbildung in der Stelle des Defekts erlaubt wird.

14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei das Biomaterial zur Vorbeugung eines Kollabierens bzw. Zusammenbrechens von Weichteilen in die Stelle des Knochendefekts bestimmt ist.

15. Ex vivo-Verfahren zur Herstellung eines behandelten Biomaterials, wobei das Verfahren die Anwendung einer supplementierten Versiegelungsmittel-Zusammensetzung für Gewebe nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 8 an einem Biomaterial umfasst.

16. Verfahren nach Anspruch 15, das das Ansetzen einer Kultur von kultivierten Zellen auf dem Versiegelungsmittel für Gewebe umfasst.

Es folgen 31 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

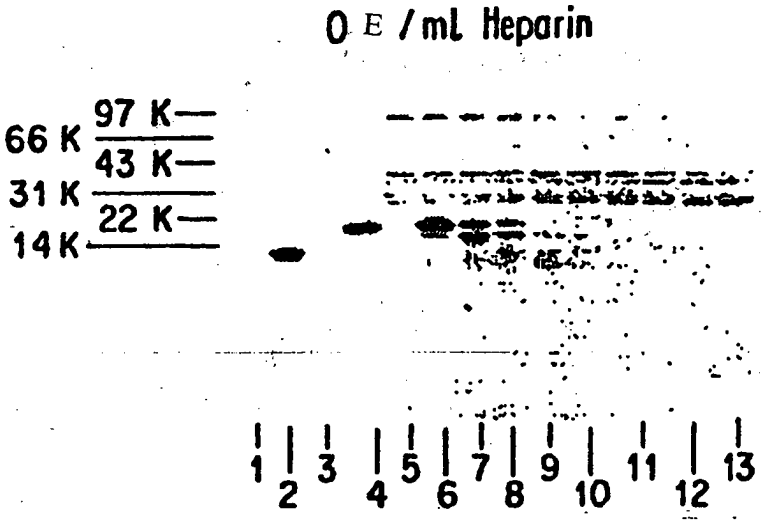


FIG. 1A

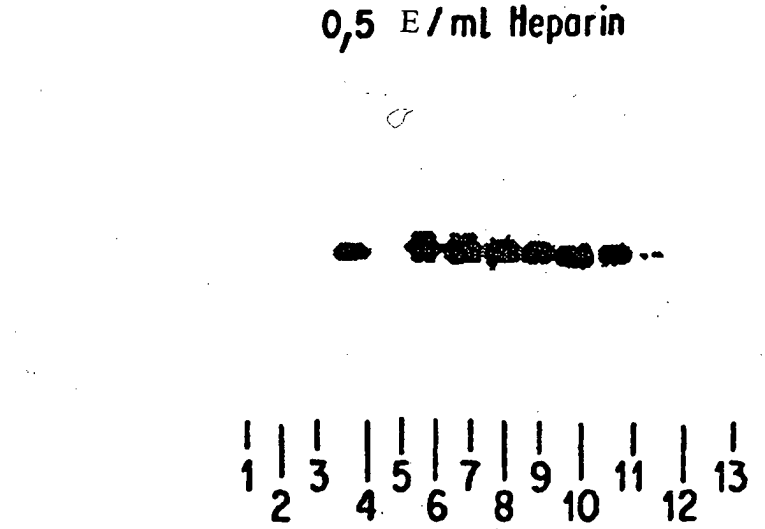


FIG. 1B

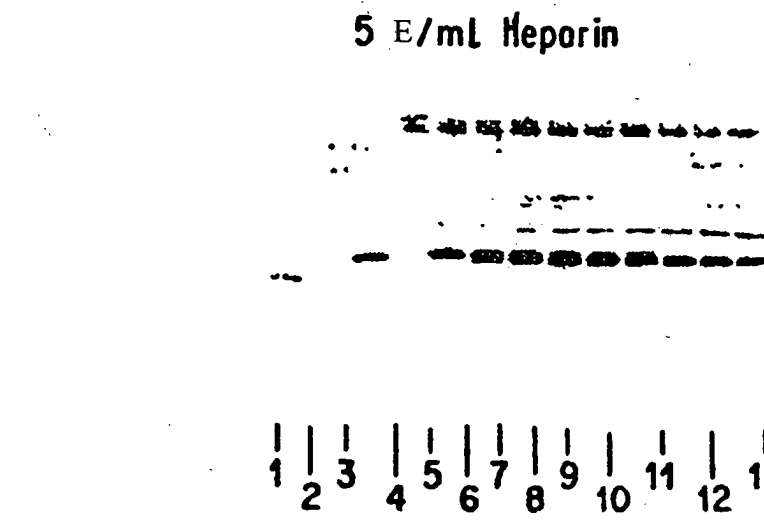
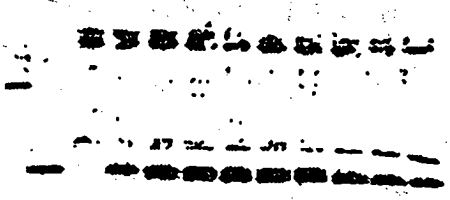


FIG. 1C

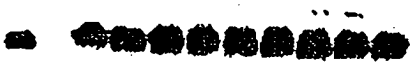
10 E/ml Heparin



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

FIG. 1D

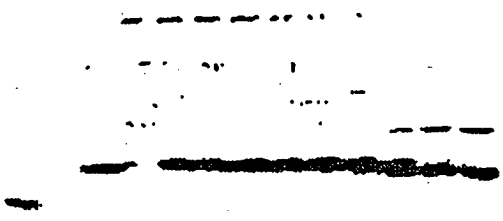
20 E/ml Heparin



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

FIG. 1E

50 E/ml Heparin



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

FIG. 1F

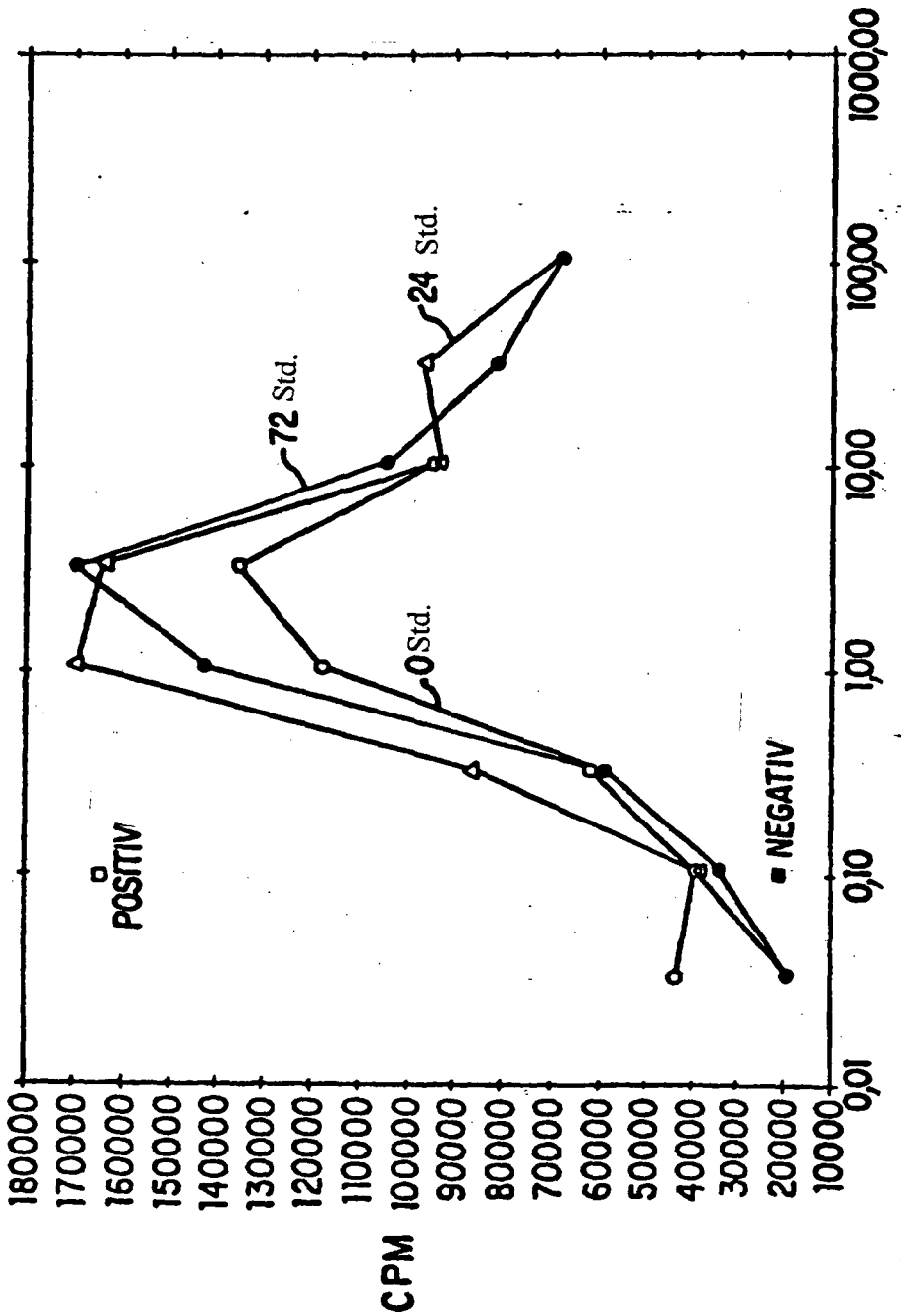

CPM
180000
170000
160000
150000
140000
130000
120000
110000
100000
90000
80000
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0,01
0,10
1,00
10,00
100,00
1000,00
KONZ. In ng/ml ECGF
POSITIV
NEGATIV
72 Std.
24 Std.
0 Std.

FIG. 2



FIG. 3



FIG. 4



FIG. 5



FIG. 6

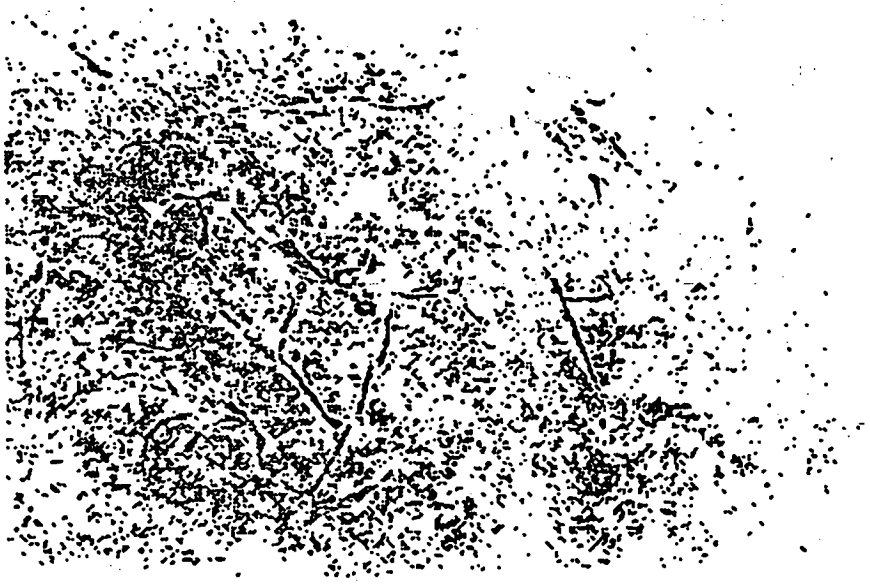


FIG. 7



FIG. 8



FIG. 9

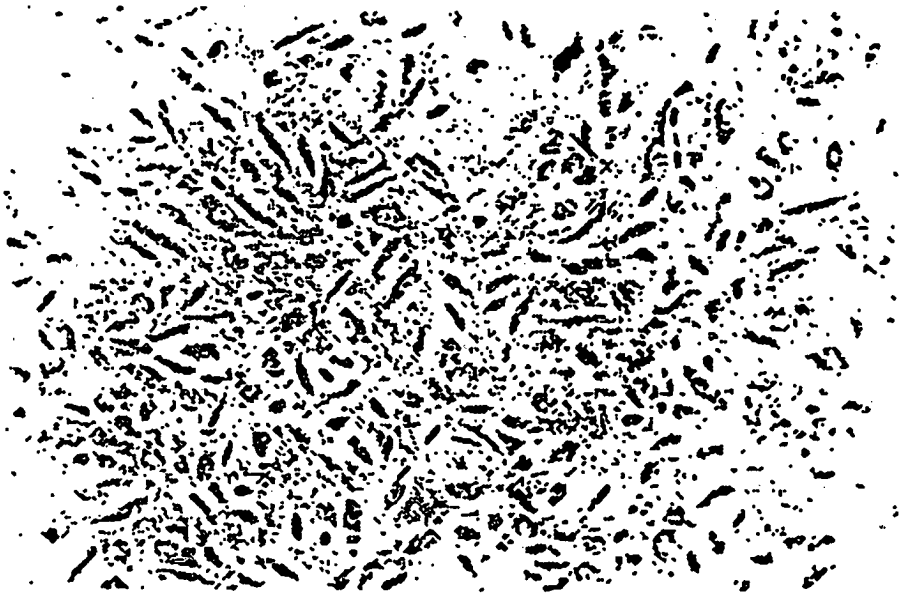


FIG. 10

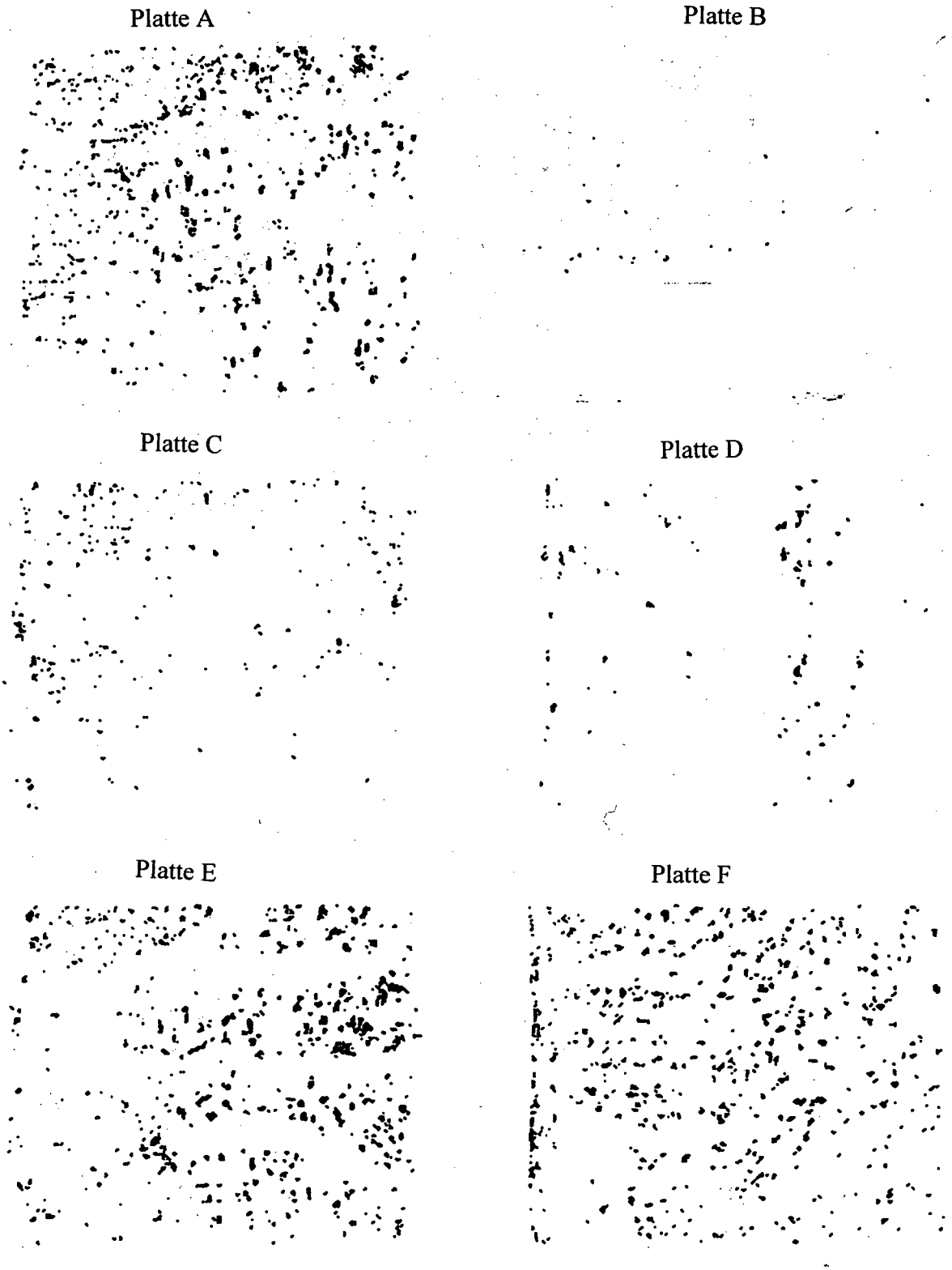


FIG. 11

Platte G



Platte H



Platte I



FIG. 12

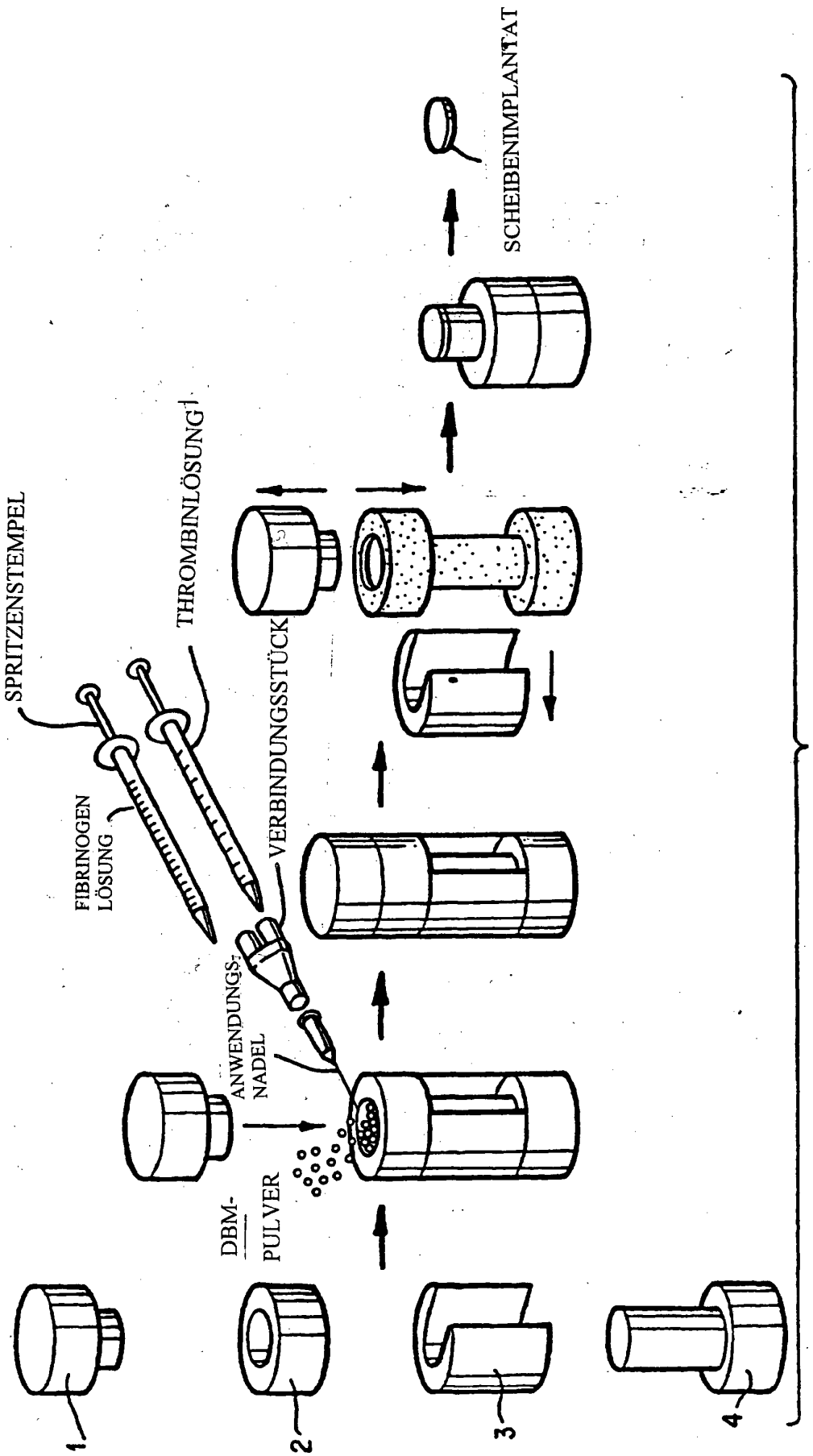

SCHEIBENIMPLANTAT
SPRITZENSTEMPEL
THROMBINLÖSUNG
FIBRINOGEN LÖSUNG
VERBINDUNGSSTÜCK
ANWENDUNGS-NADEL
DBM-PULVER
1
2
3
4

FIG. 13

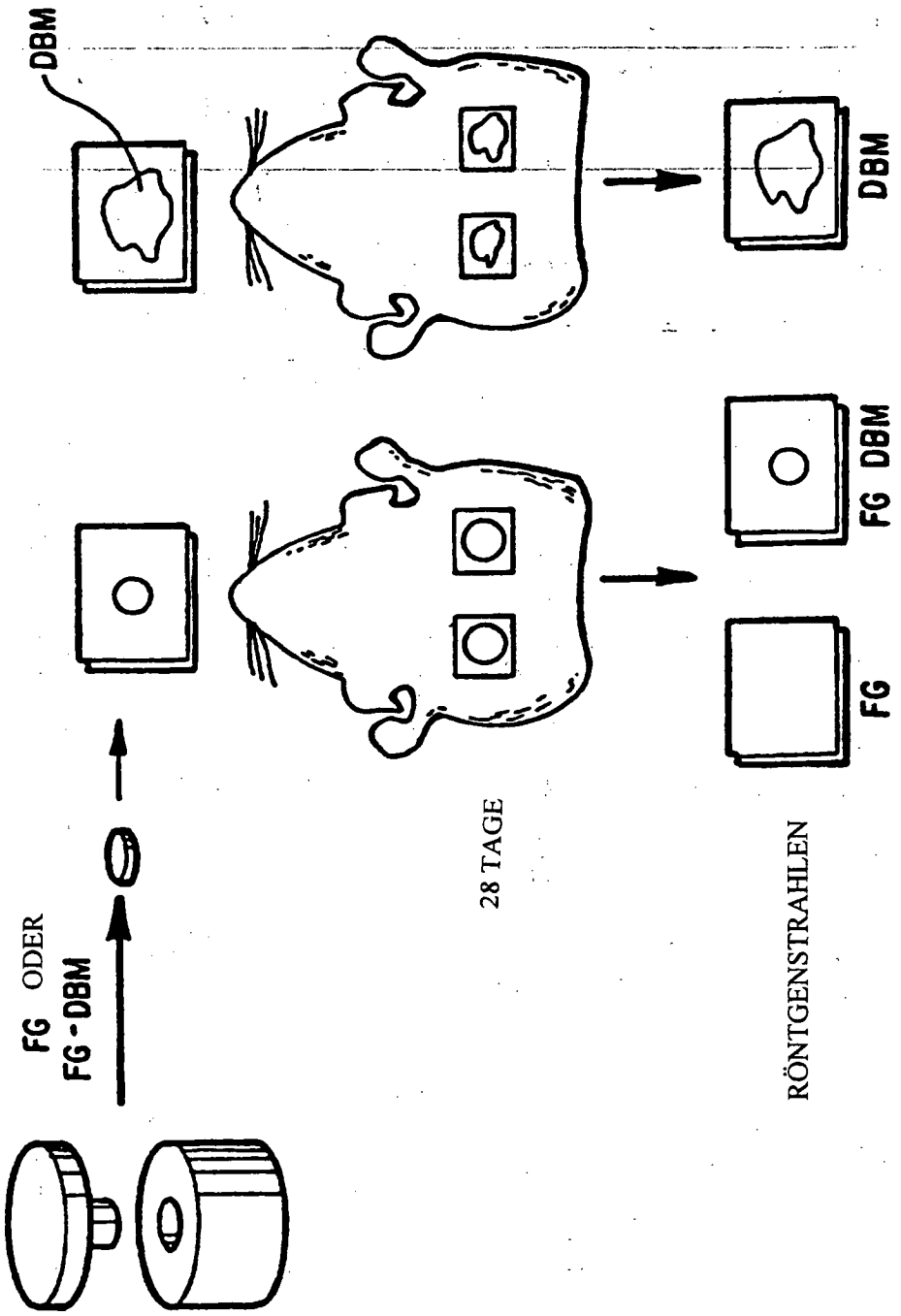


FIG.14

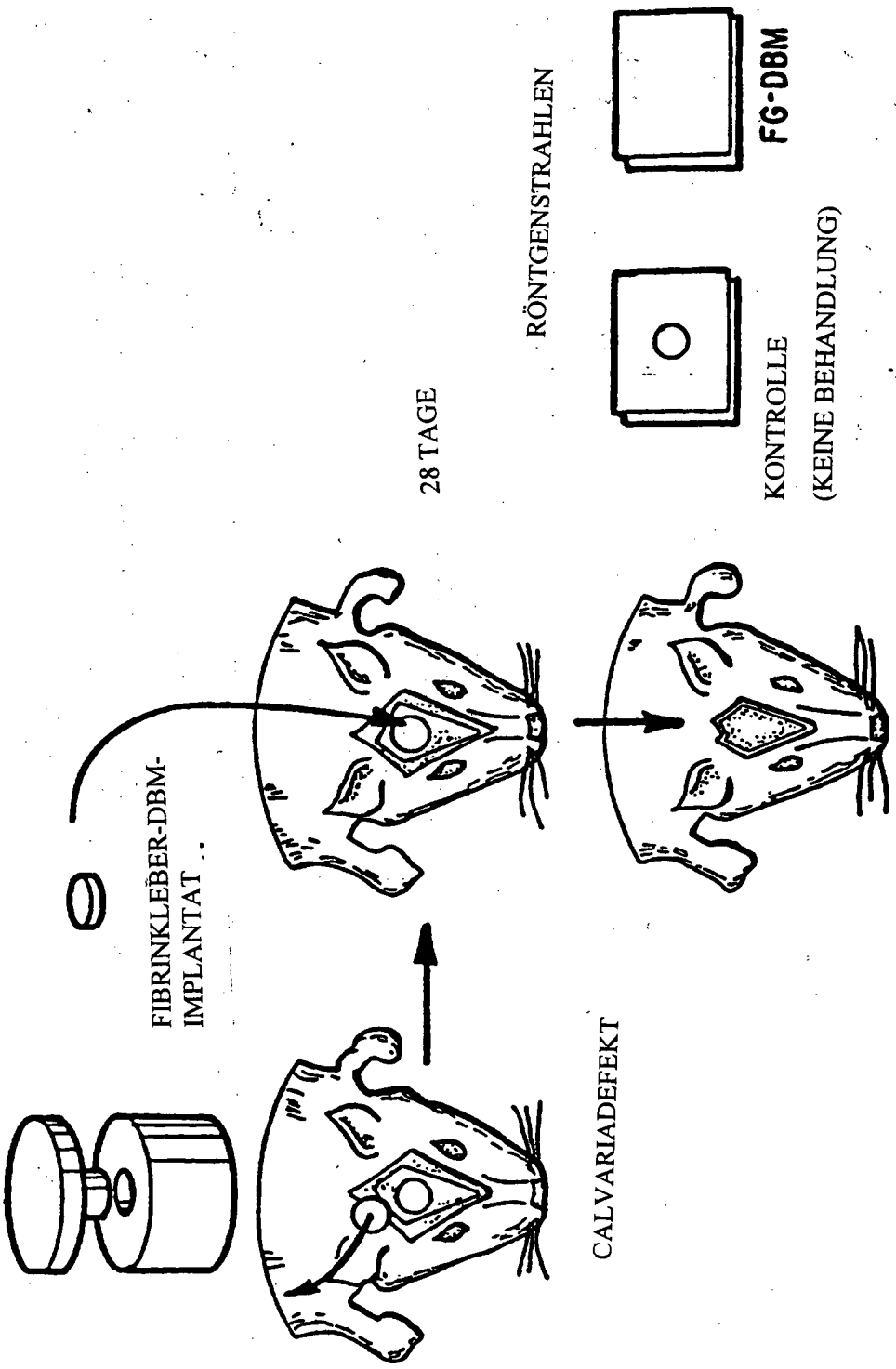

FIBRINKLEBER-DBM-IMPLANTAT
CALVARIADEFEKT
28 TAGE
RÖNTGENSTRAHLEN
KONTROLLE
(KEINE BEHANDLUNG)
FG-DBM

FIG. 15

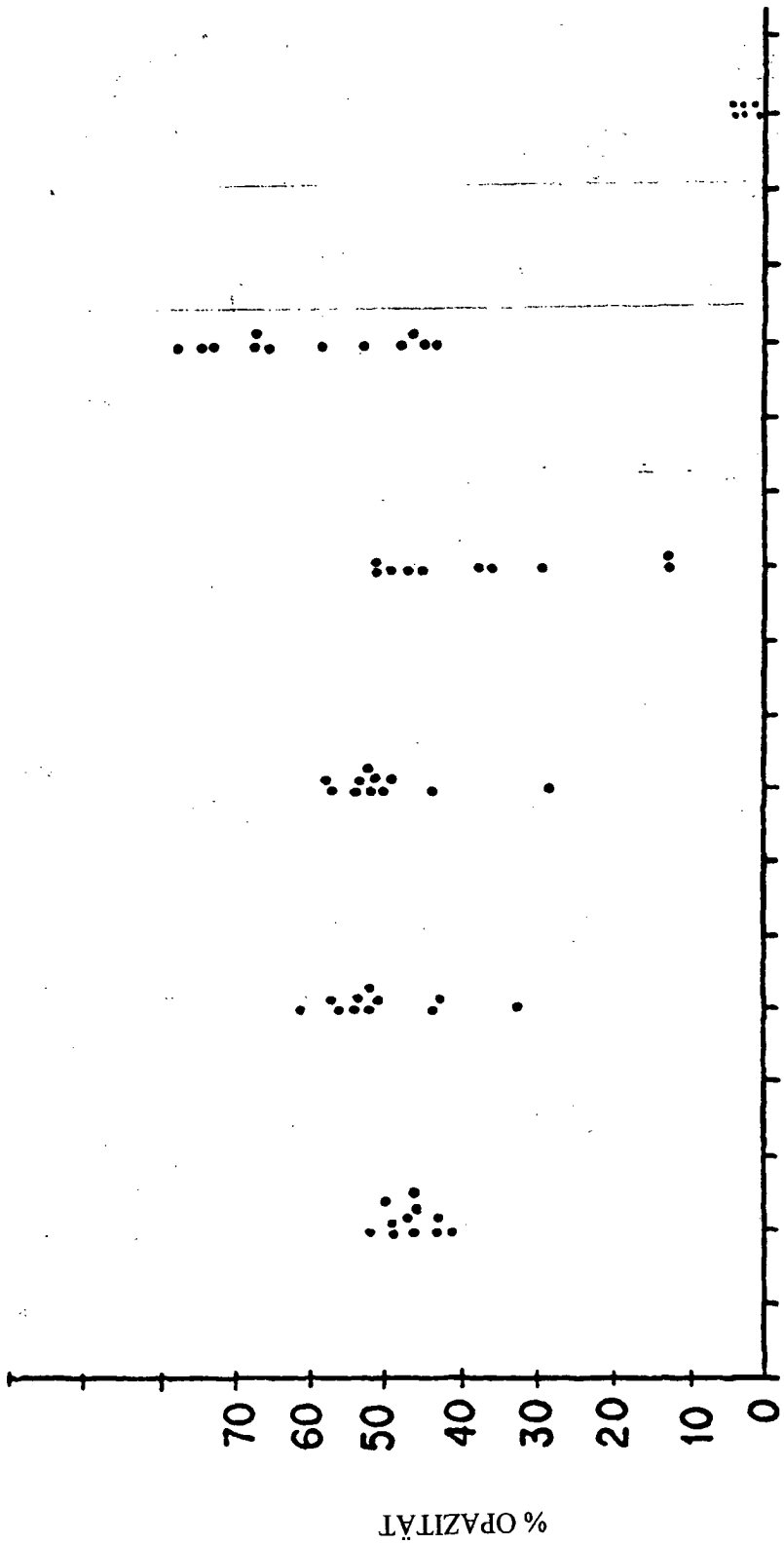

% OPAZITÄT
0
10
20
30
40
50
60
70
DBM-FG 4 mg/ml
DBM-FG 8mg/ml
DBM-FG 15 mg/ml
DBM-FG 45mg/ml
DBM
FG
INTRAMUSKULÄRE IMPLANTATE

FIG. 16

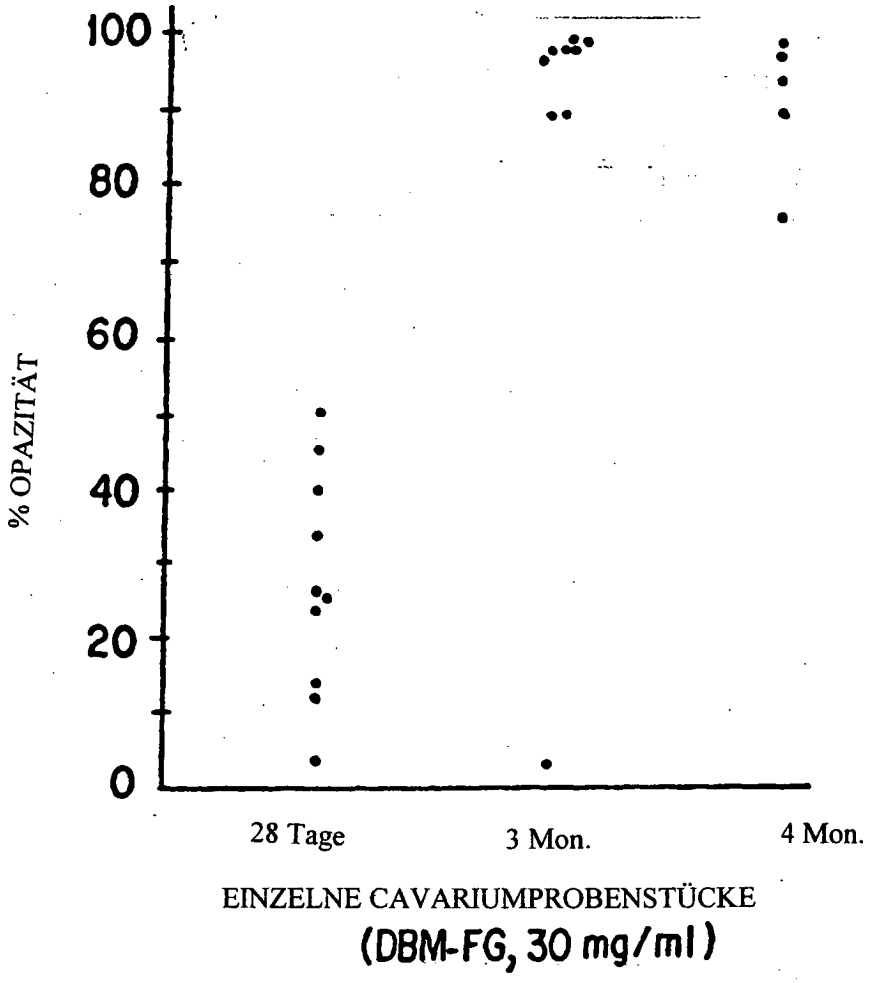

100
80
60
40
20
0
% OPAZITÄT
28 Tage
3 Mon.
4 Mon.
EINZELNE CAVARIUMPROBENSTÜCKE
(DBM-FG, 30 mg/ml)

FIG.17



FIG. 18A

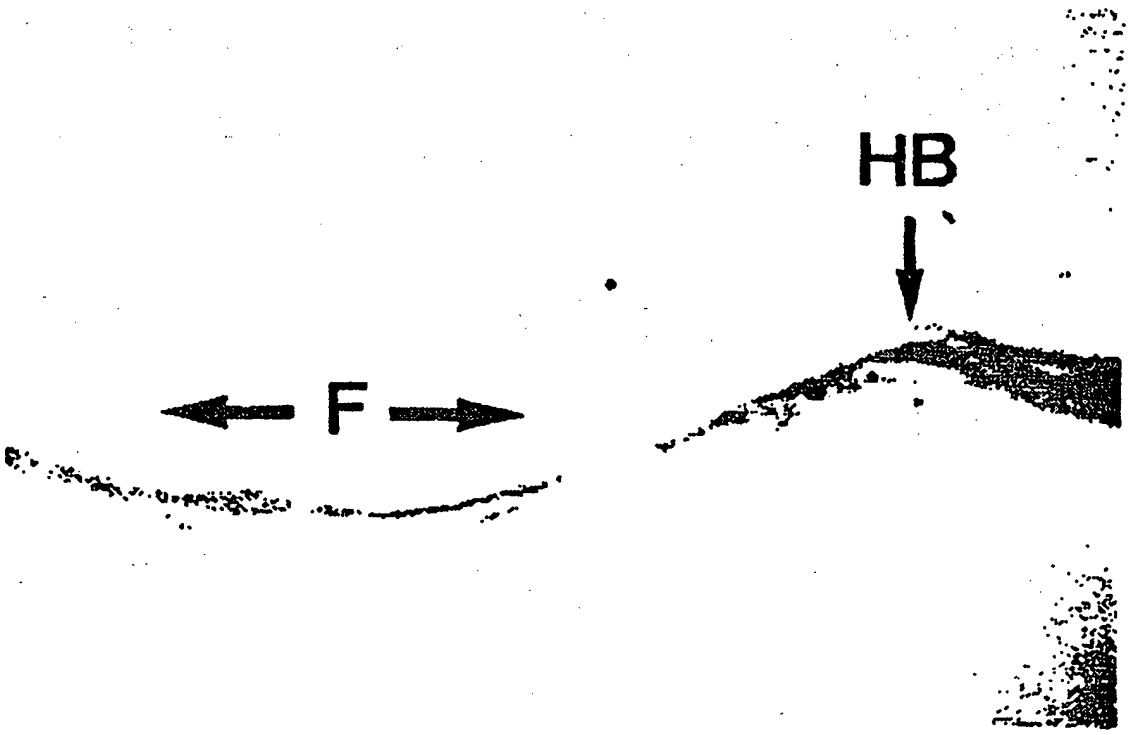


FIG. 18B

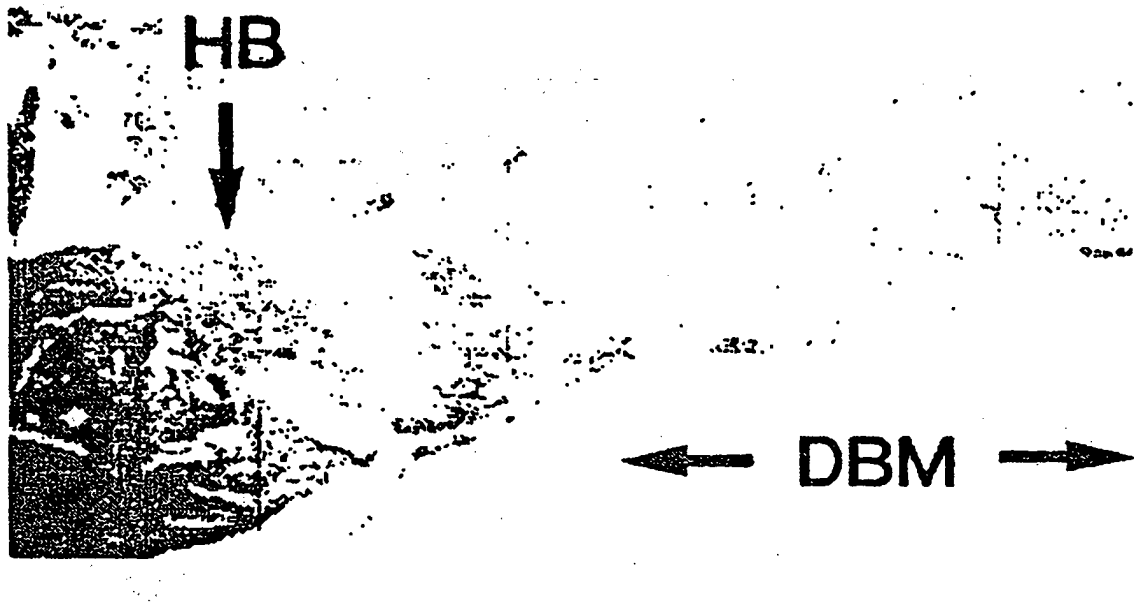


FIG. 19

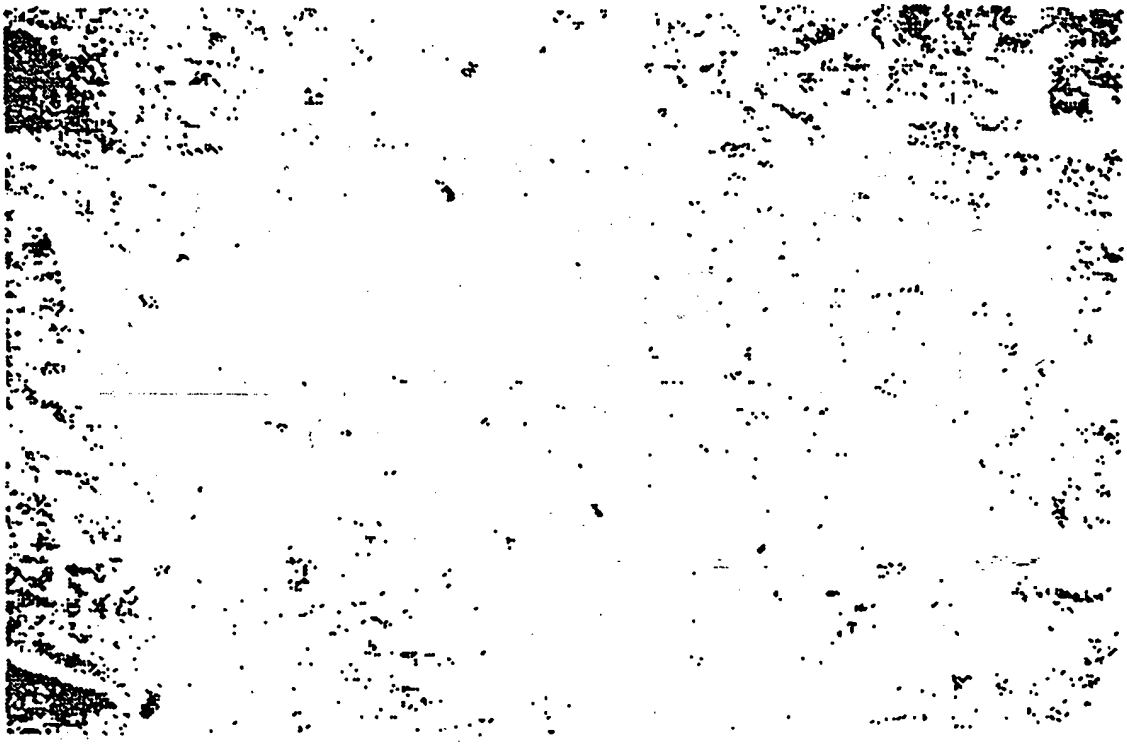


FIG. 20

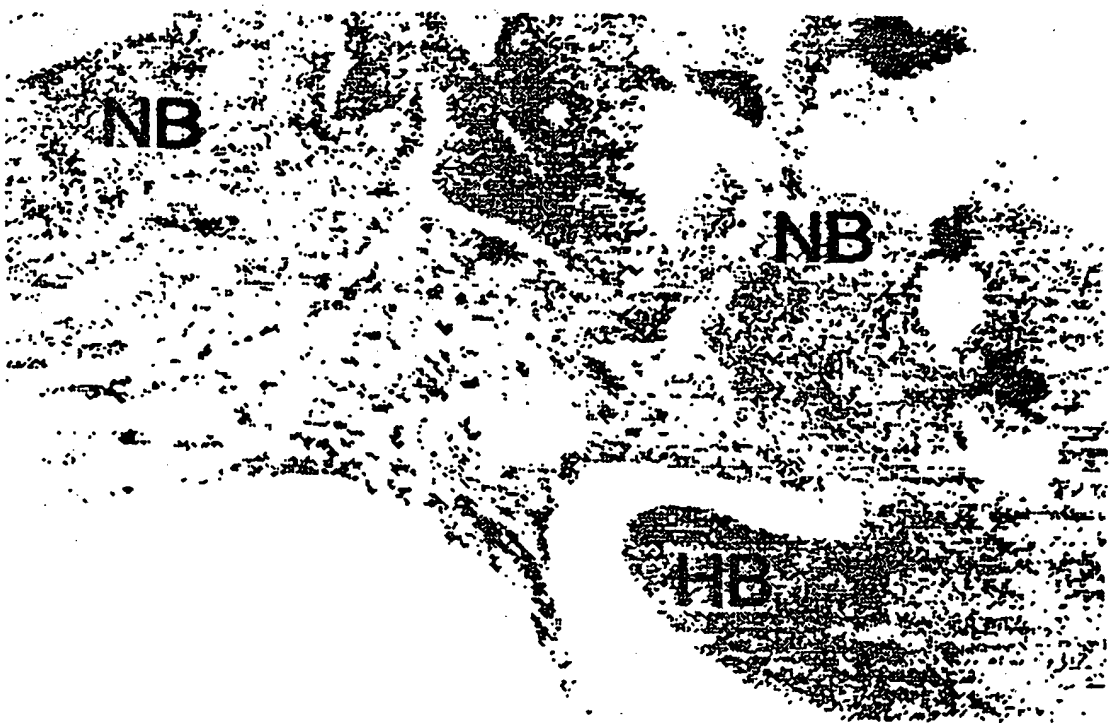


FIG. 21

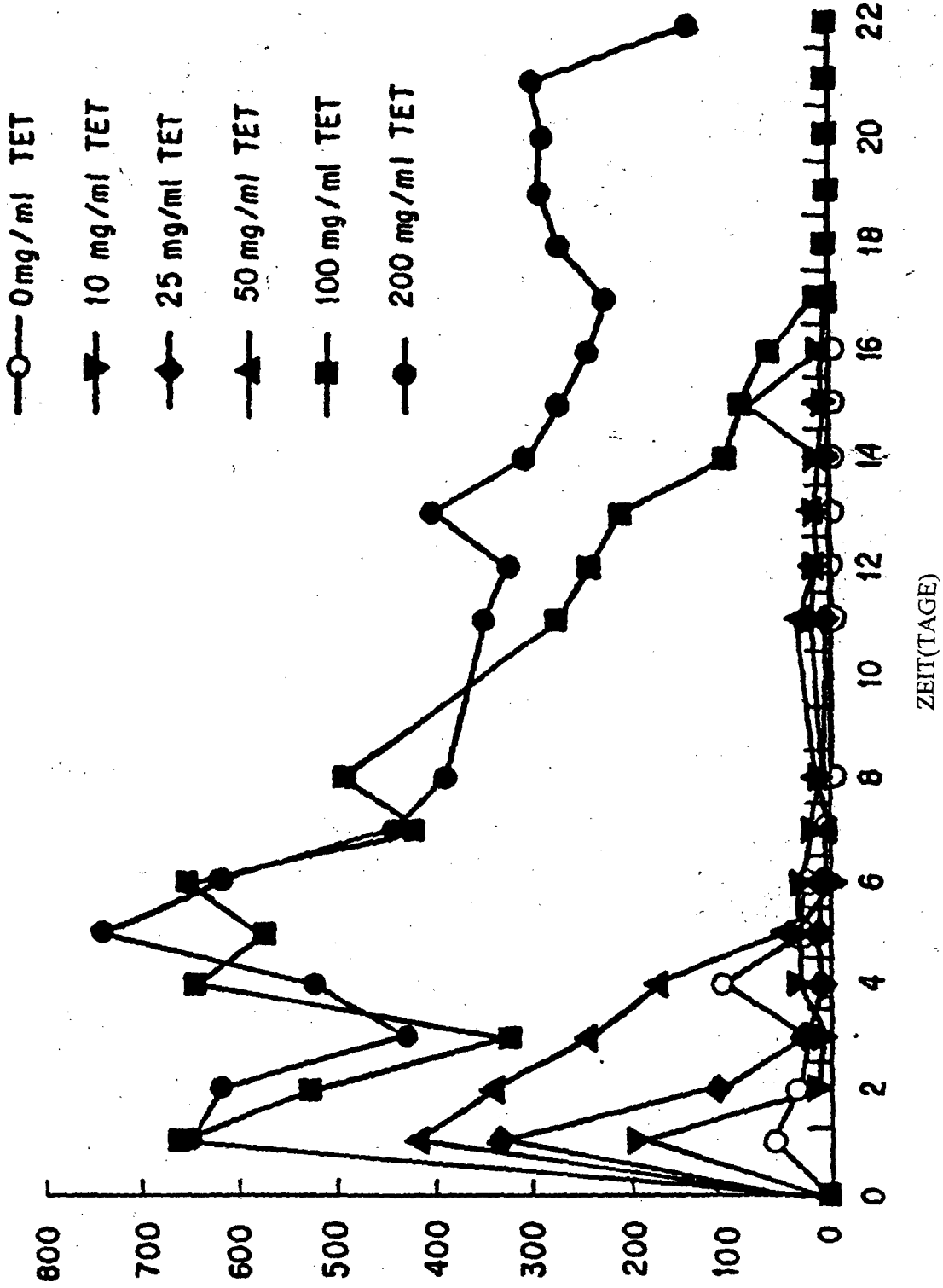

0 mg/ml TET
10 mg/ml TET
25 mg/ml TET
50 mg/ml TET
100 mg/ml TET
200 mg/ml TET
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
ZEIT(TAGE)

FIG. 22

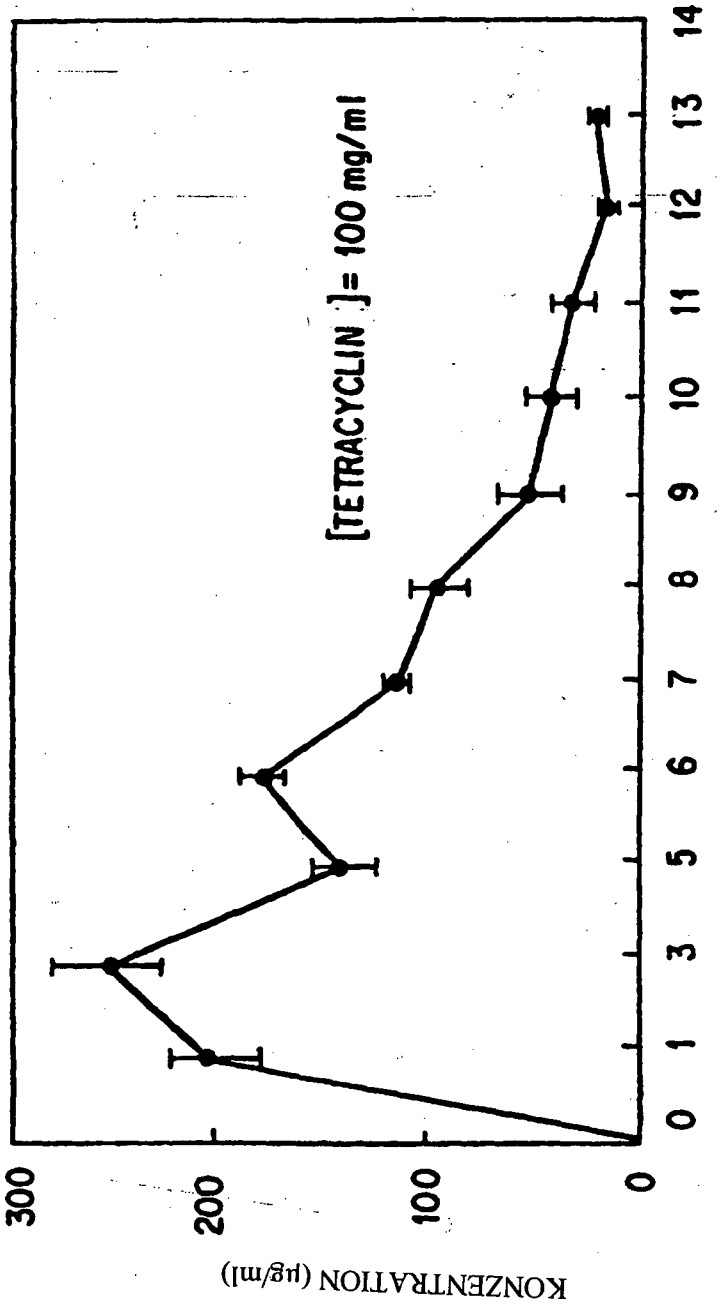

[TETRACYCLIN]= 100 mg/ml
KONZENTRATION (µg/ml)
300
200
100
0
0 1 3 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
ZEIT (Tage)

FIG.23

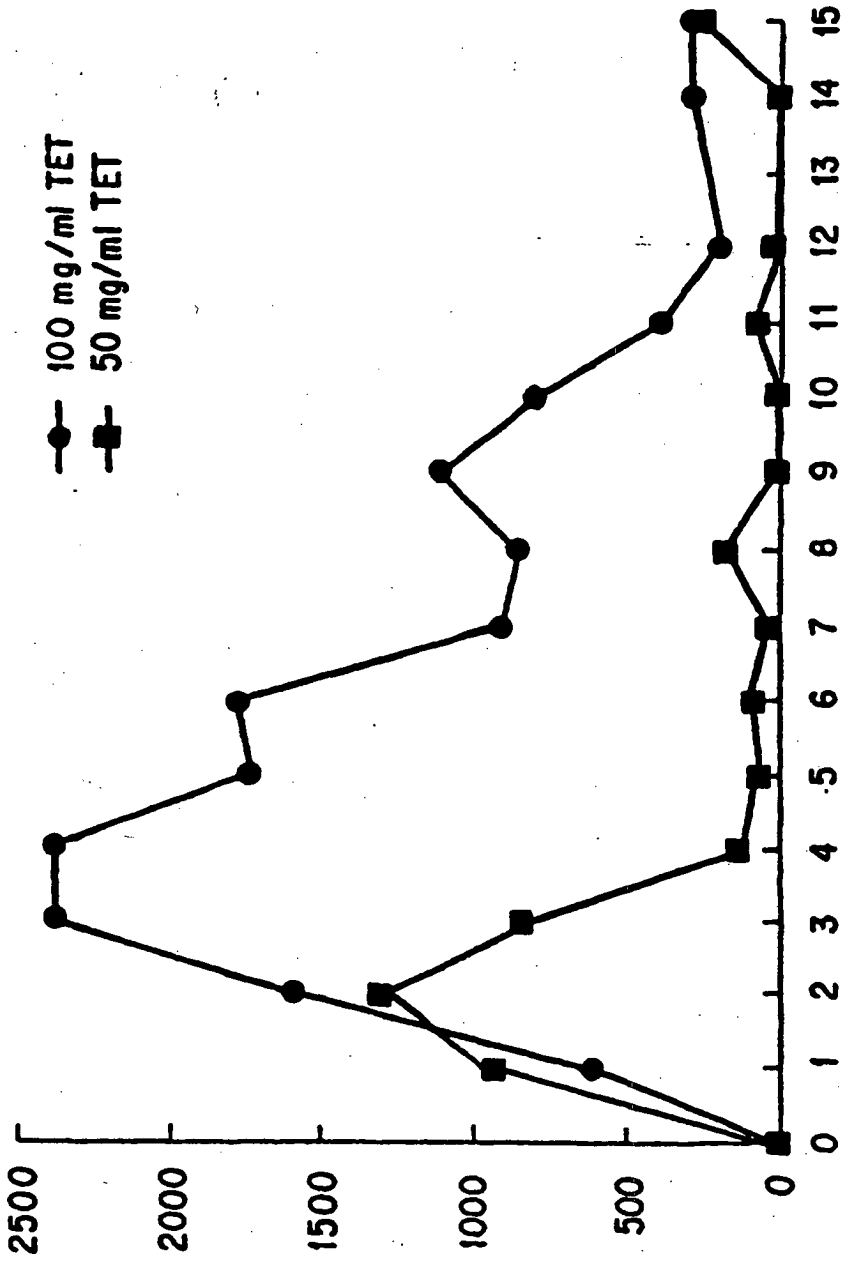

100 mg/ml TET
50 mg/ml TET
2500
2000
1500
1000
500
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
ZEIT(Tage)

FIG.24

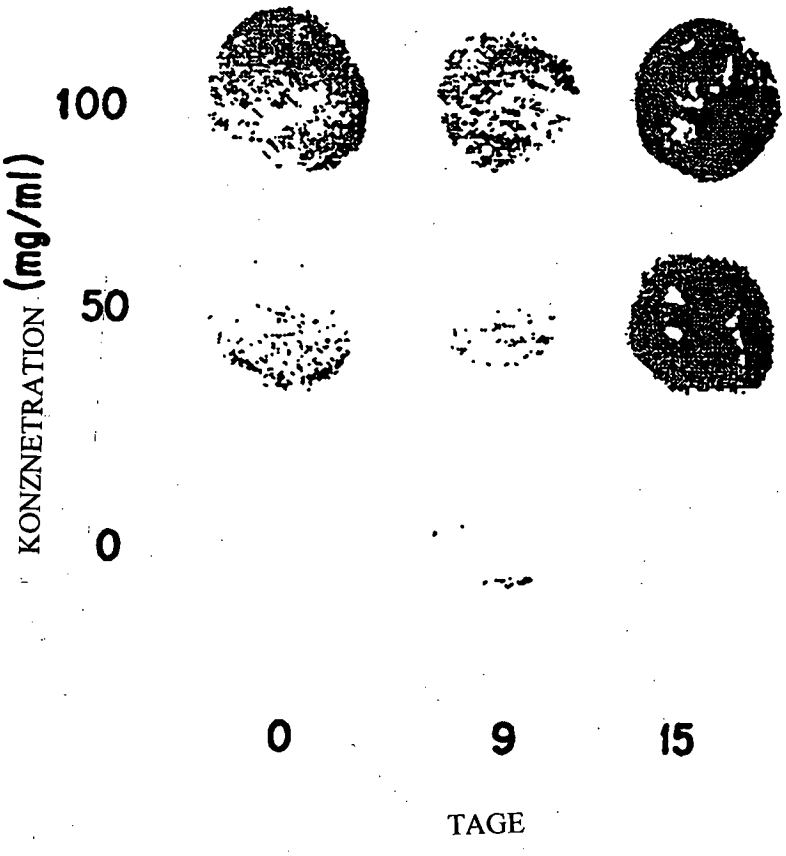


FIG. 25

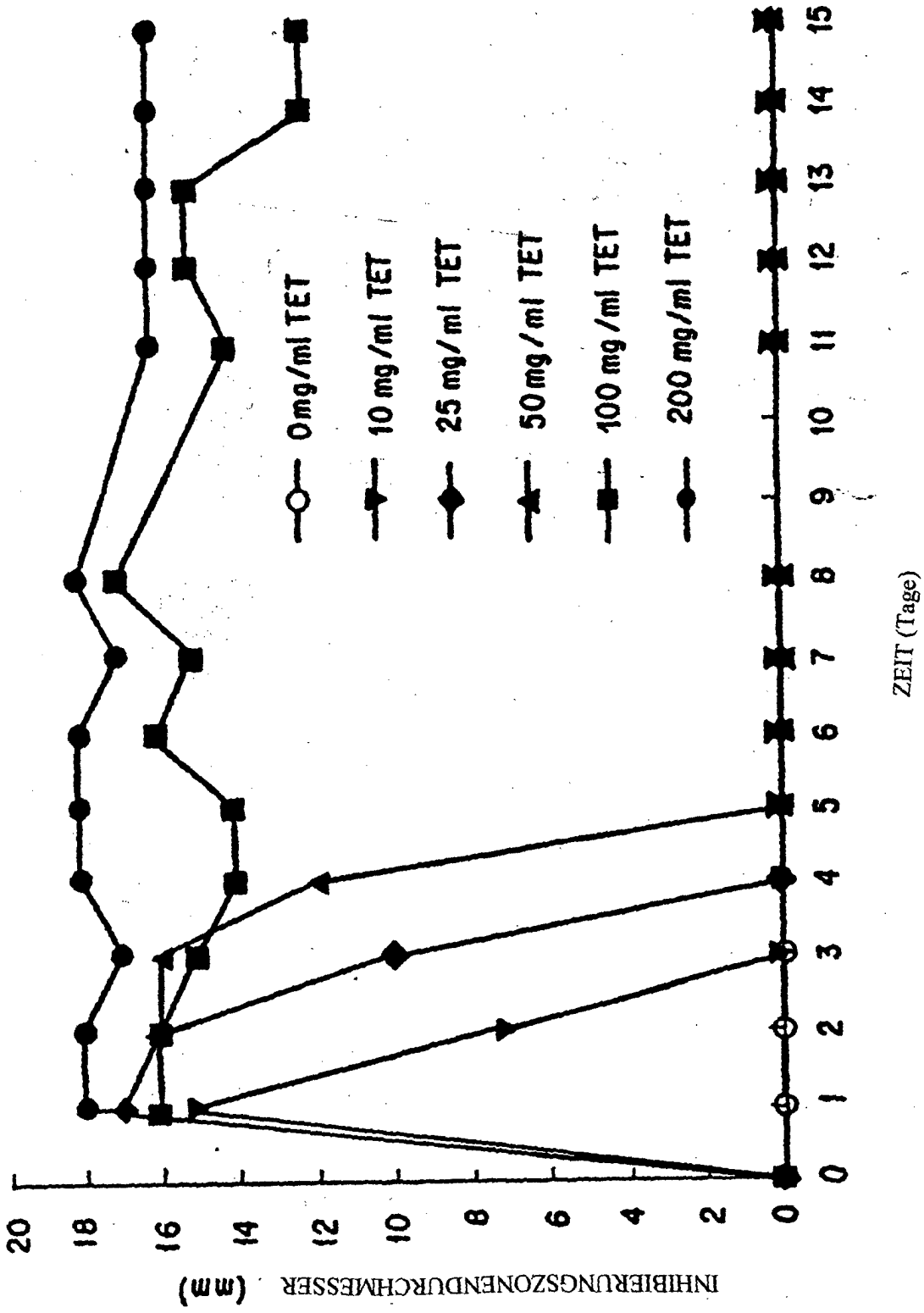

INHIBIERUNGSZONENDURCHMESSER (mm)
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
ZEIT (Tage)
0mg/ml TET
10 mg/ml TET
25 mg/ml TET
50 mg/ml TET
100 mg/ml TET
200 mg/ml TET

FIG.26

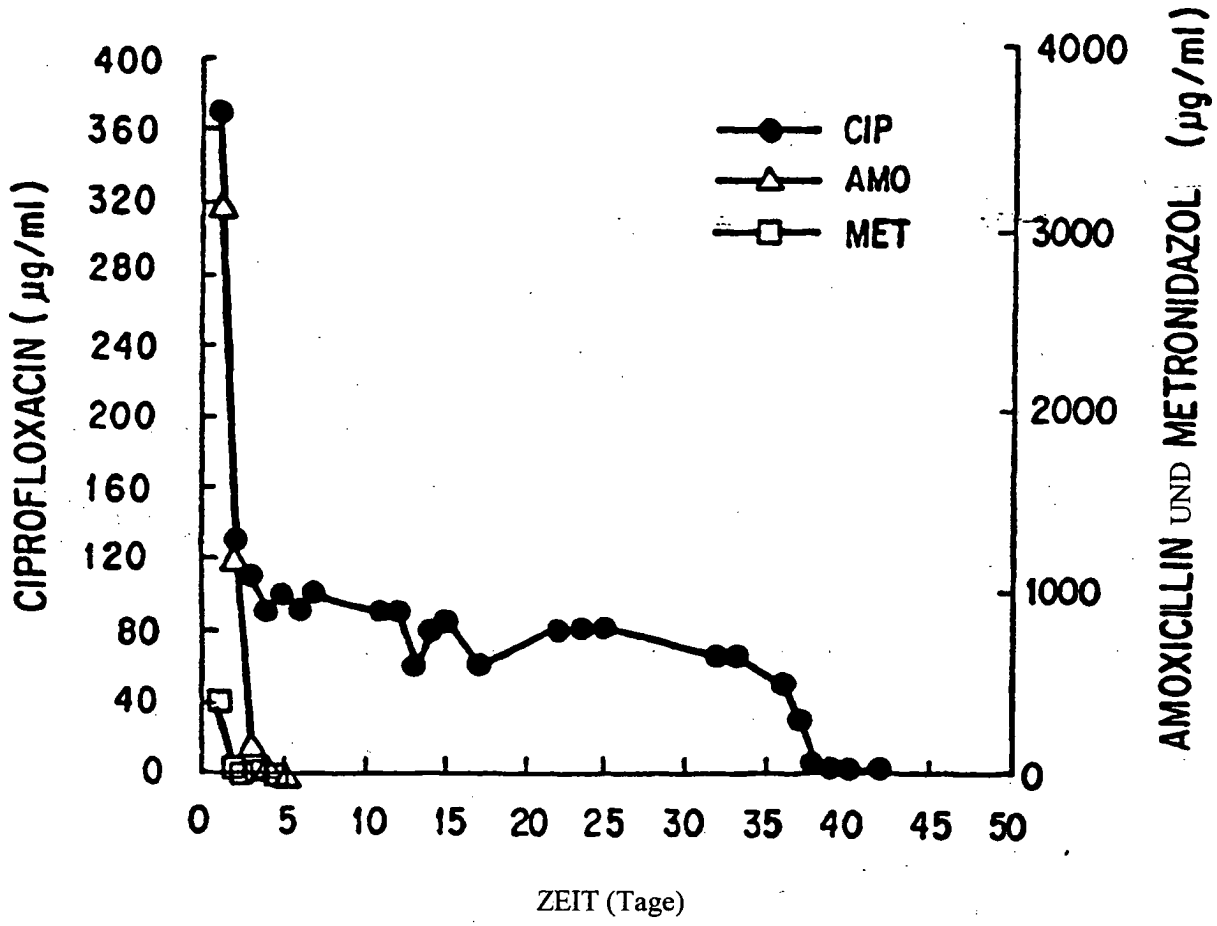

CIPROFLOXACIN (µg/ml)
AMOXICILLIN UND METRONIDAZOL (µg/ml)
CIP
AMO
MET
400
360
320
280
240
200
160
120
80
40
0
4000
3000
2000
1000
0
0 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50
ZEIT (Tage)

FIG.27

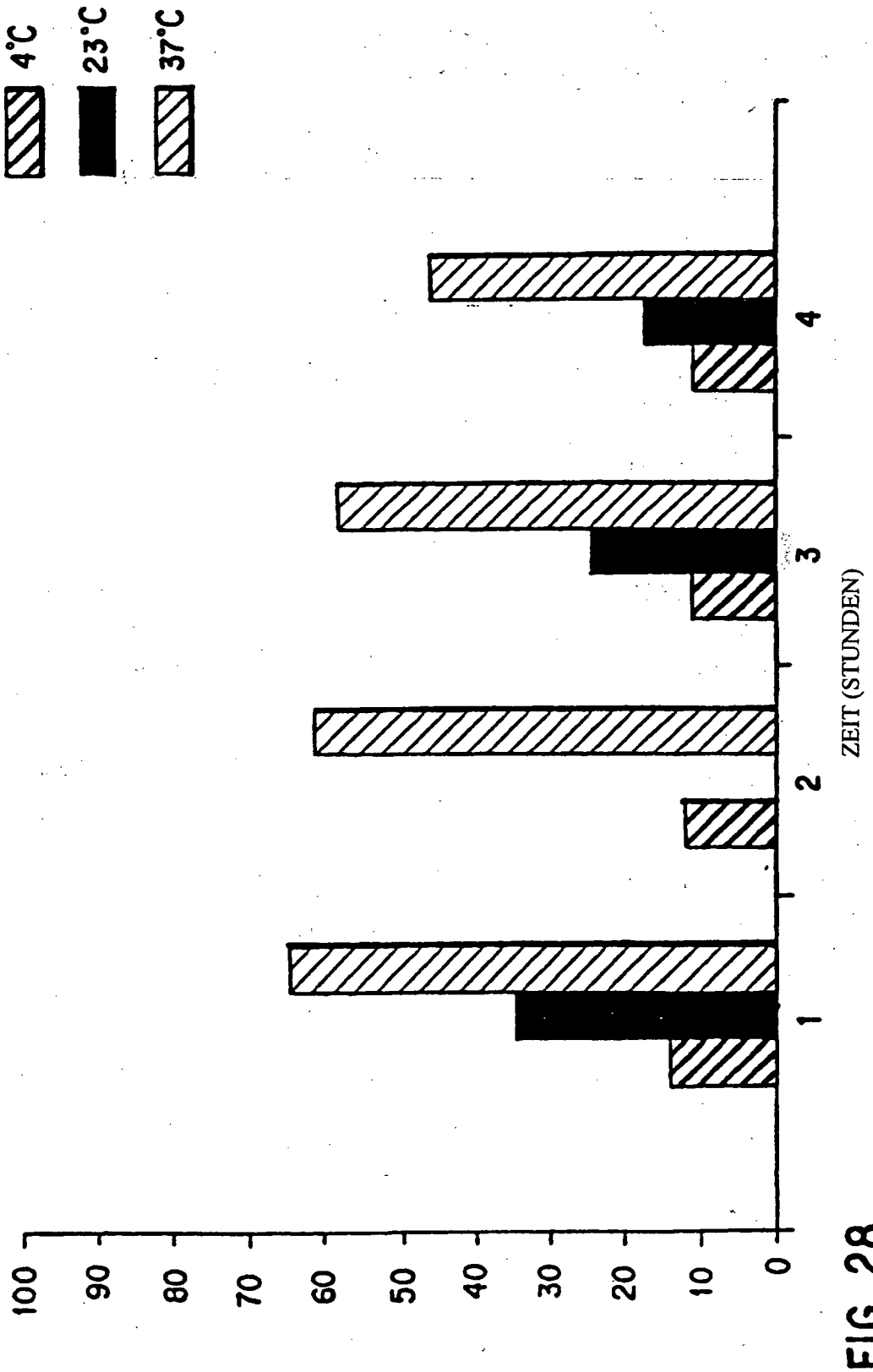


FIG. 28

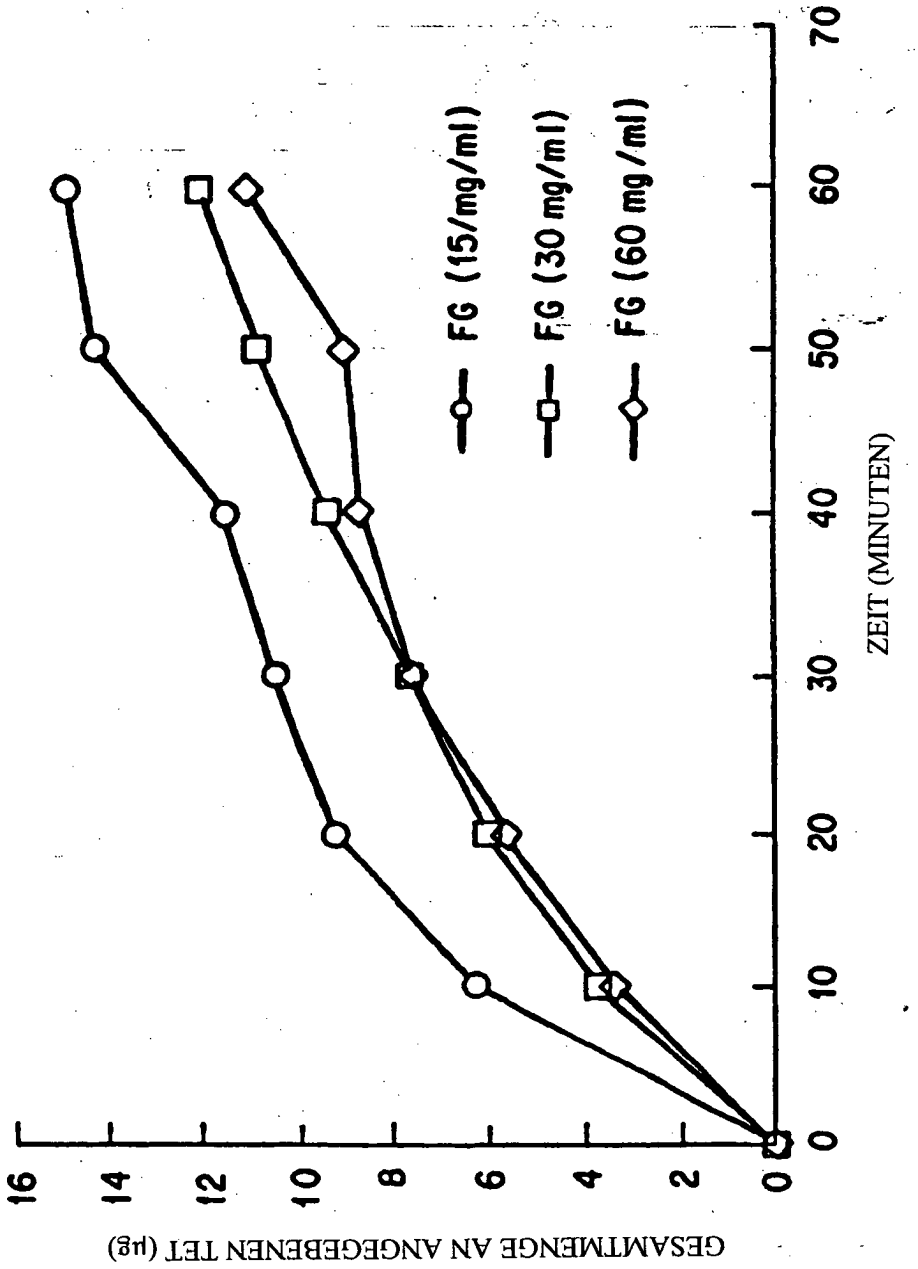

FG (15/mg/ml)
FG (30 mg/ml)
FG (60 mg/ml)
ZEIT (MINUTEN)
GESAMTMENGE AN ANGEGEBENEN TET (µg)
0
10
20
30
40
50
60
70
0
2
4
6
8
10
12
14
16

FIG.29

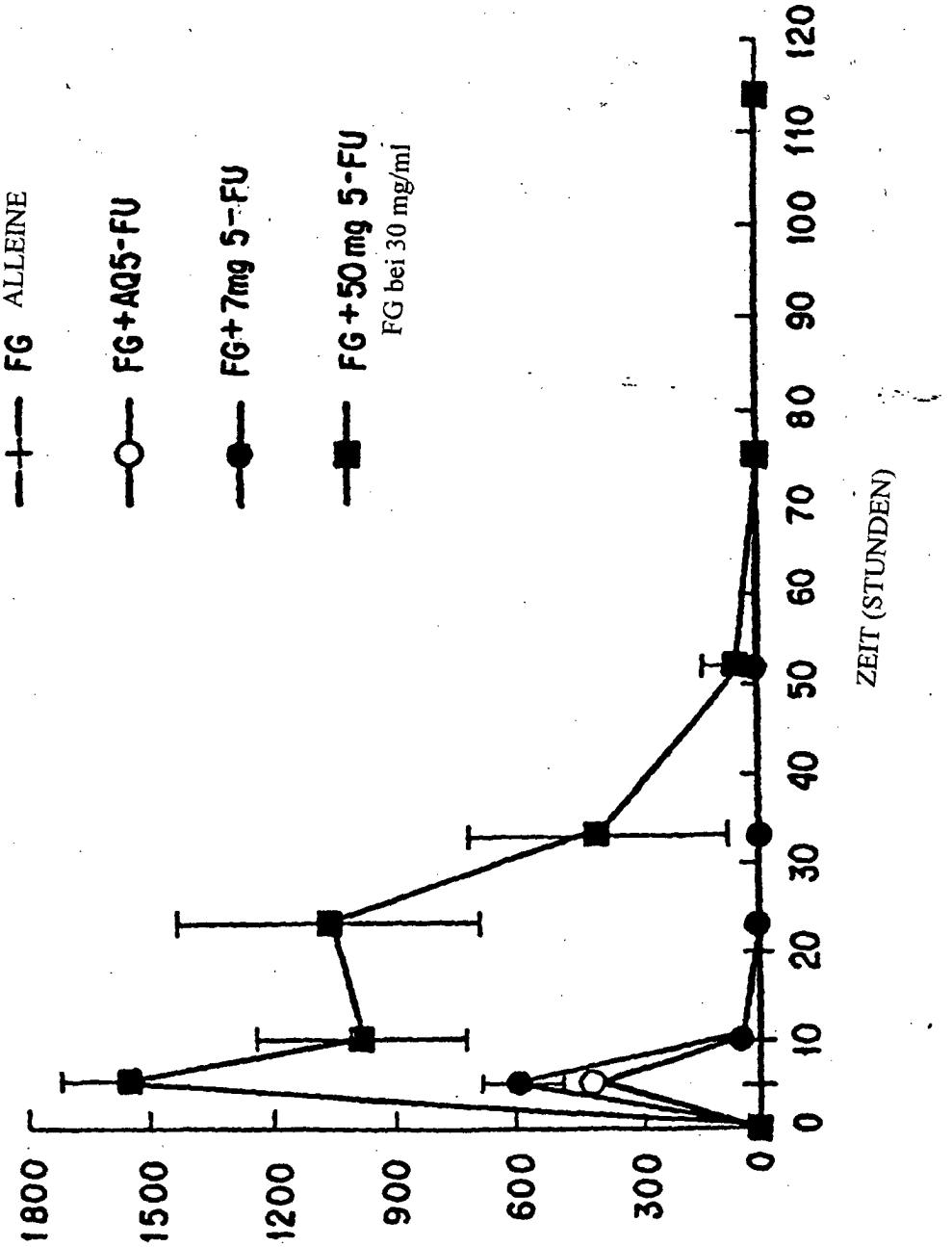

FG ALLEINE
FG+AQ5-FU
FG+7mg 5-FU
FG+50mg 5-FU
FG bei 30 mg/ml
1800
1500
1200
900
600
300
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
ZEIT (STUNDEN)

FIG. 30

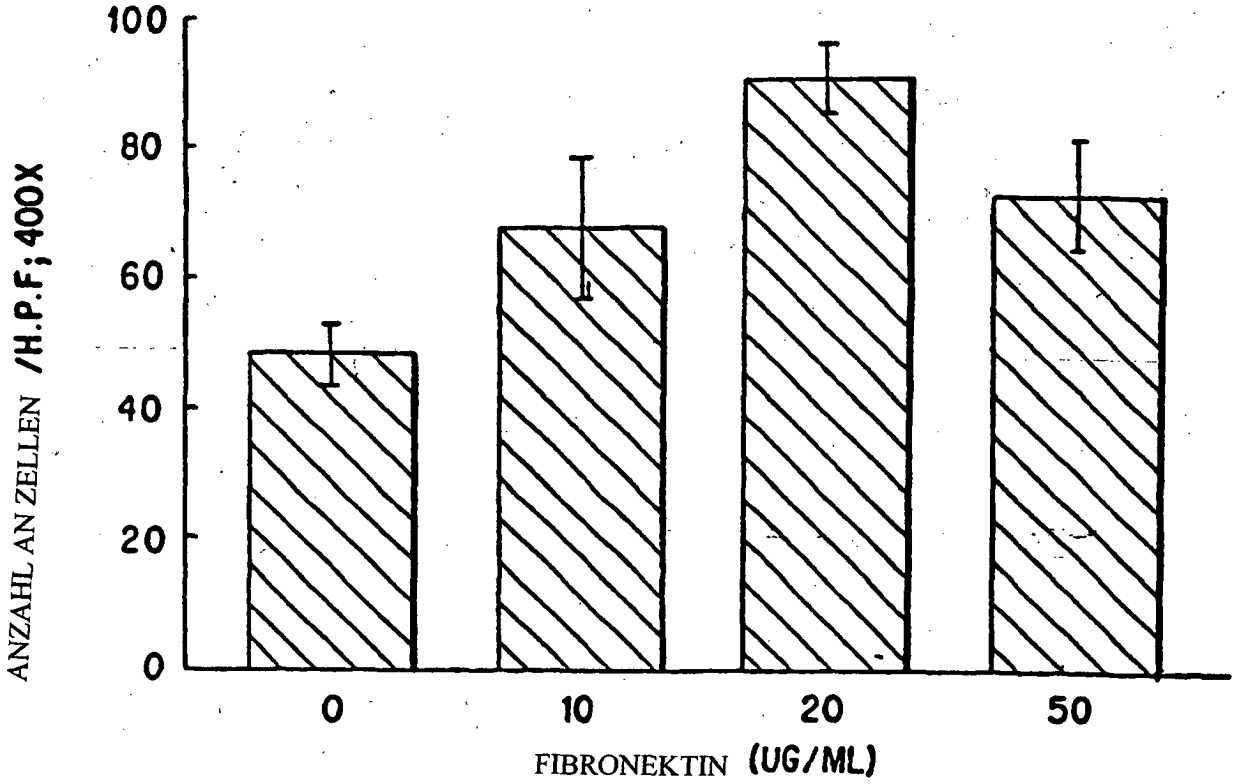

100
80
60
40
20
0
ANZAHL AN ZELLEN /H.P.F; 400X
0
10
20
50
FIBRONEKTIN (UG/ML)

FIG.31

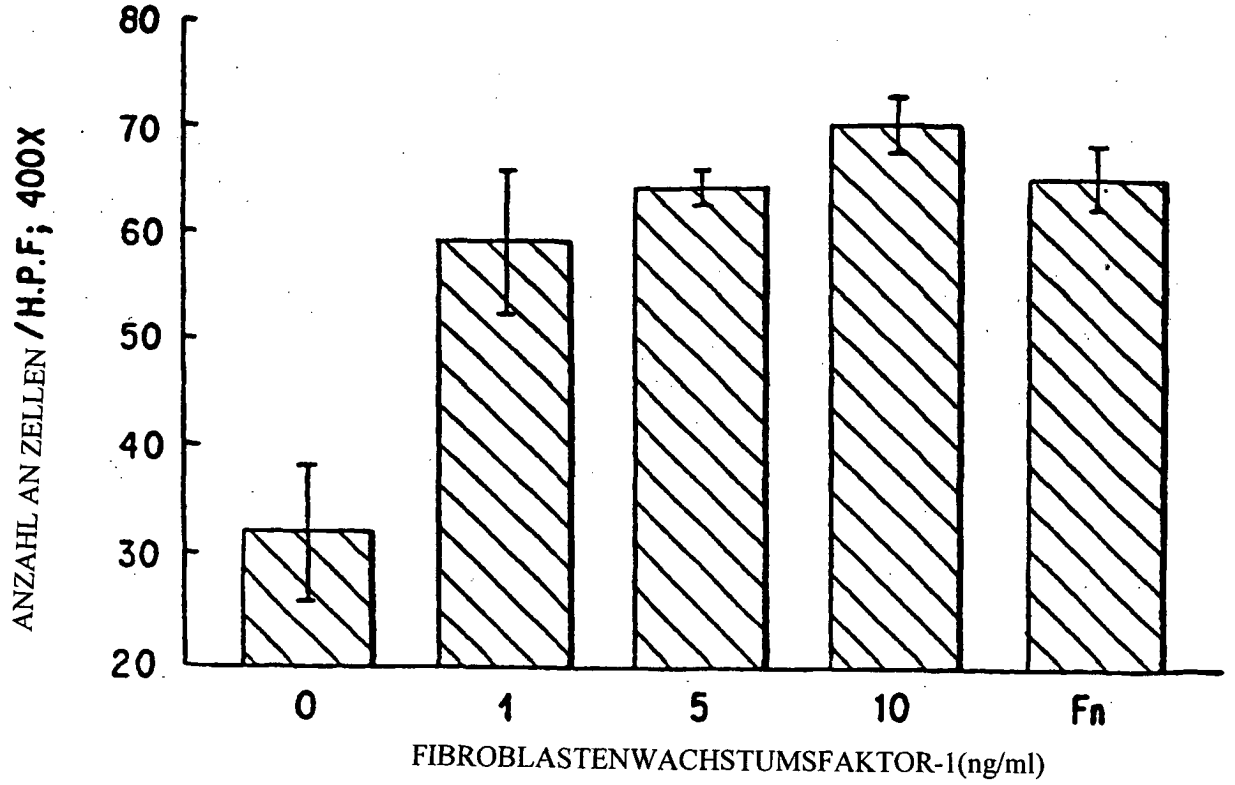

80
70
60
50
40
30
20
ANZAHL AN ZELLEN /H.P.F; 400X
0
1
5
10
Fn
FIBROBLASTENWACHSTUMSFAKTOR-1(ng/ml)

FIG. 32

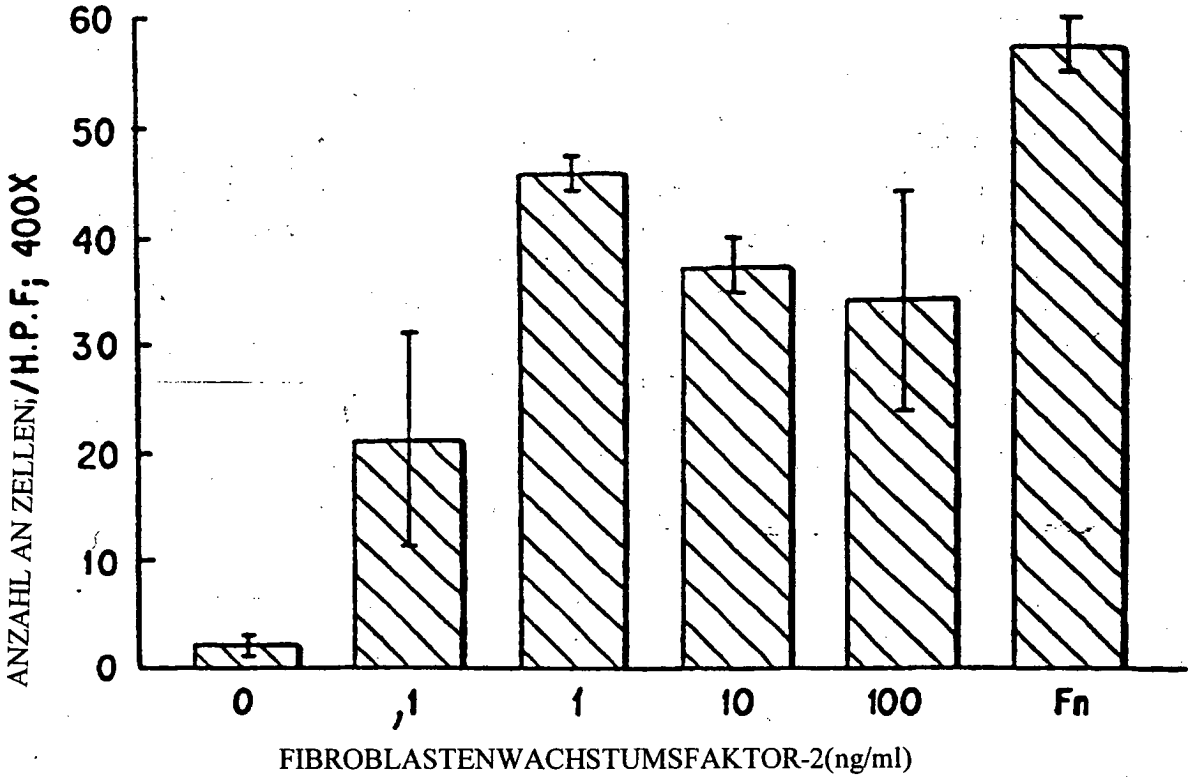

60
50
40
30
20
10
0
ANZAHL AN ZELLEN/H.P.F; 400X
0
,1
1
10
100
Fn
FIBROBLASTENWACHSTUMSFAKTOR-2(ng/ml)

FIG. 33

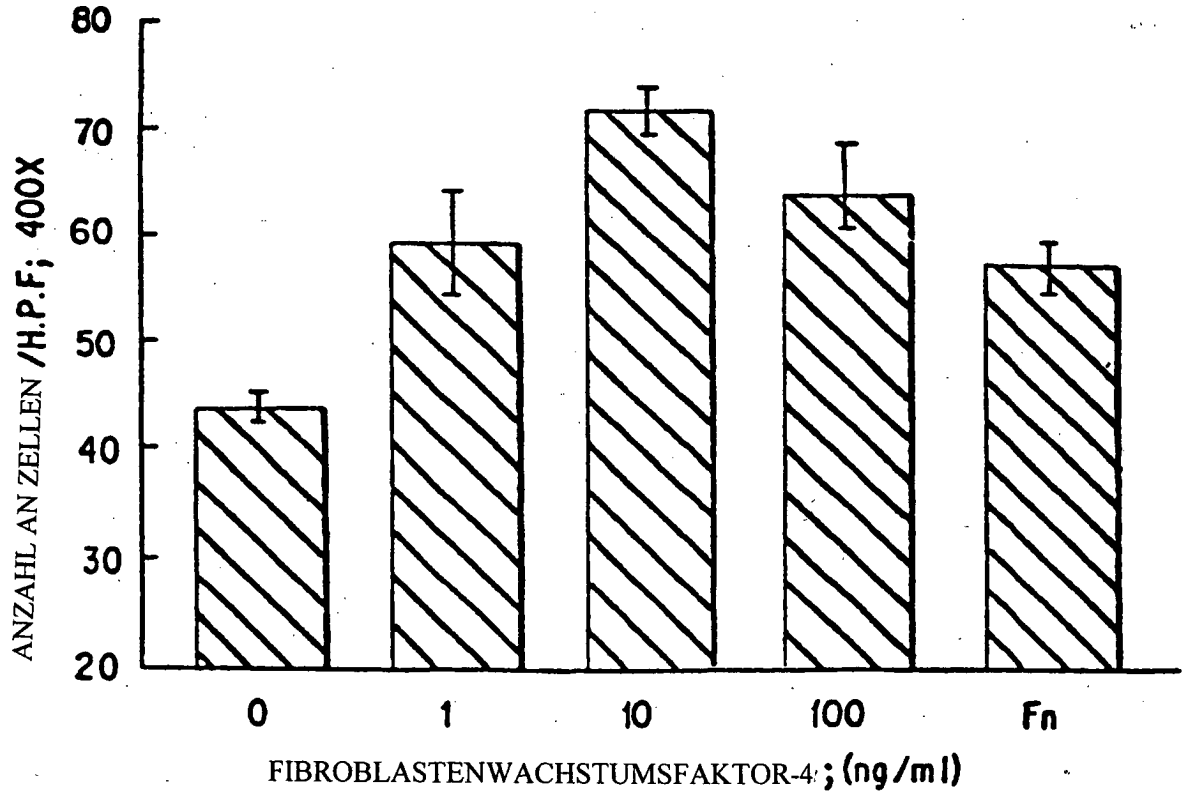

80
70
60
50
40
30
20
ANZAHL AN ZELLEN /H.P.F; 400X
0
1
10
100
Fn
FIBROBLASTENWACHSTUMSFAKTOR-4; (ng/ml)

FIG. 34

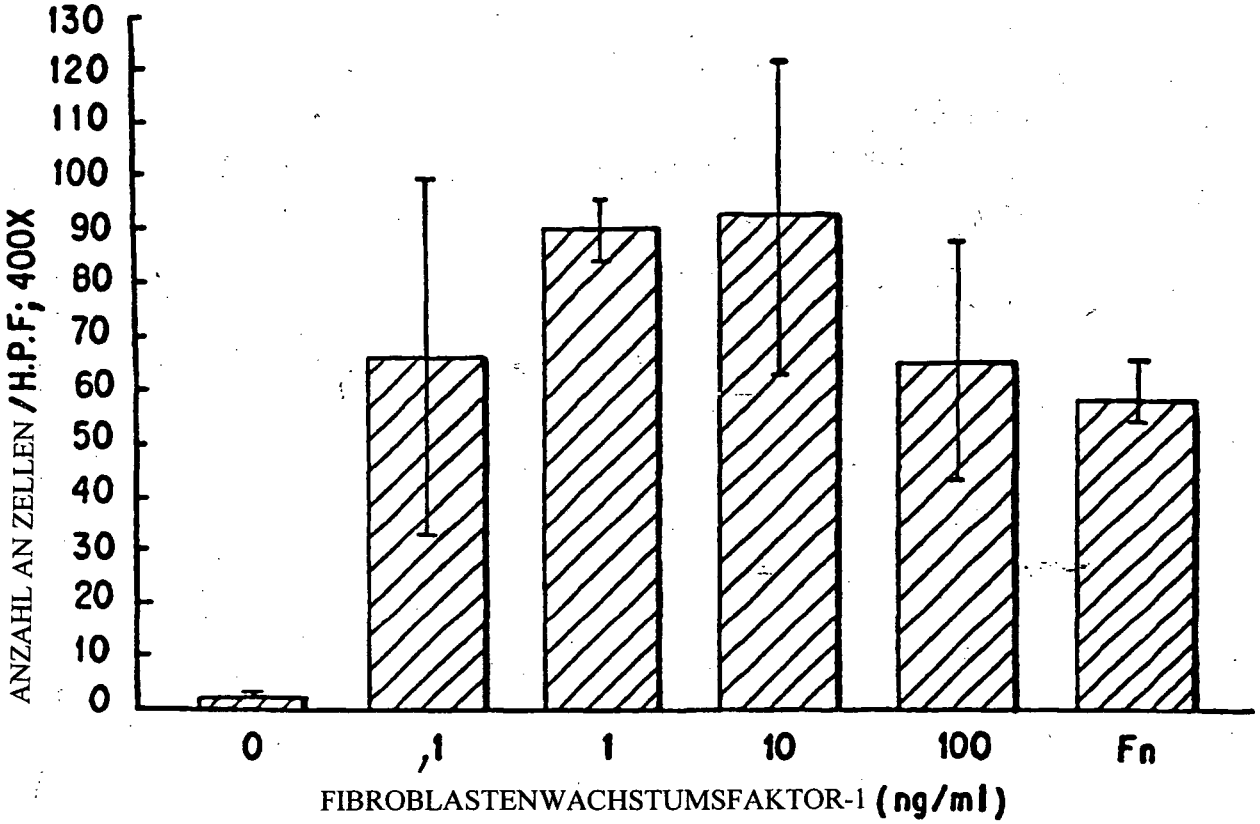

130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ANZAHL AN ZELLEN /H.P.F; 400X
0
,1
1
10
100
Fn
FIBROBLASTENWACHSTUMSFAKTOR-1 (ng/ml)

FIG.35

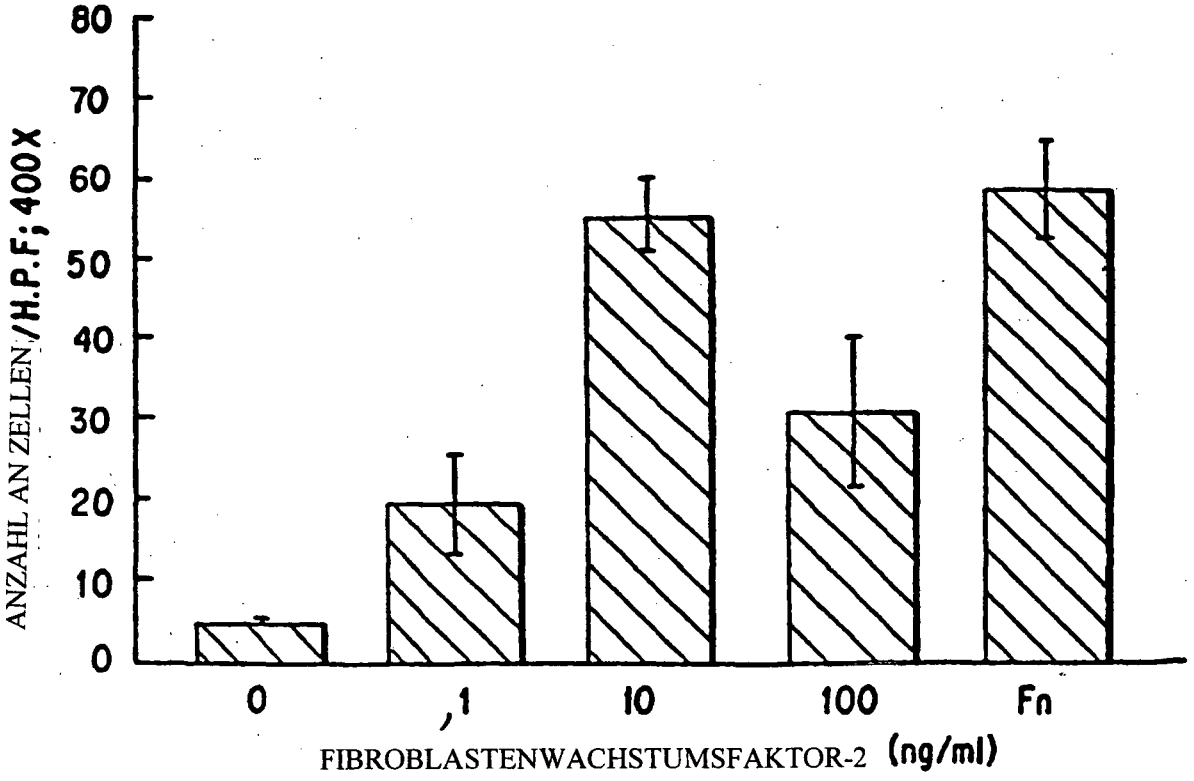

80
70
60
50
40
30
20
10
0
ANZAHL AN ZELLEN /H.P.F; 400X
0
,1
10
100
Fn
FIBROBLASTENWACHSTUMSFAKTOR-2 (ng/ml)

FIG.36

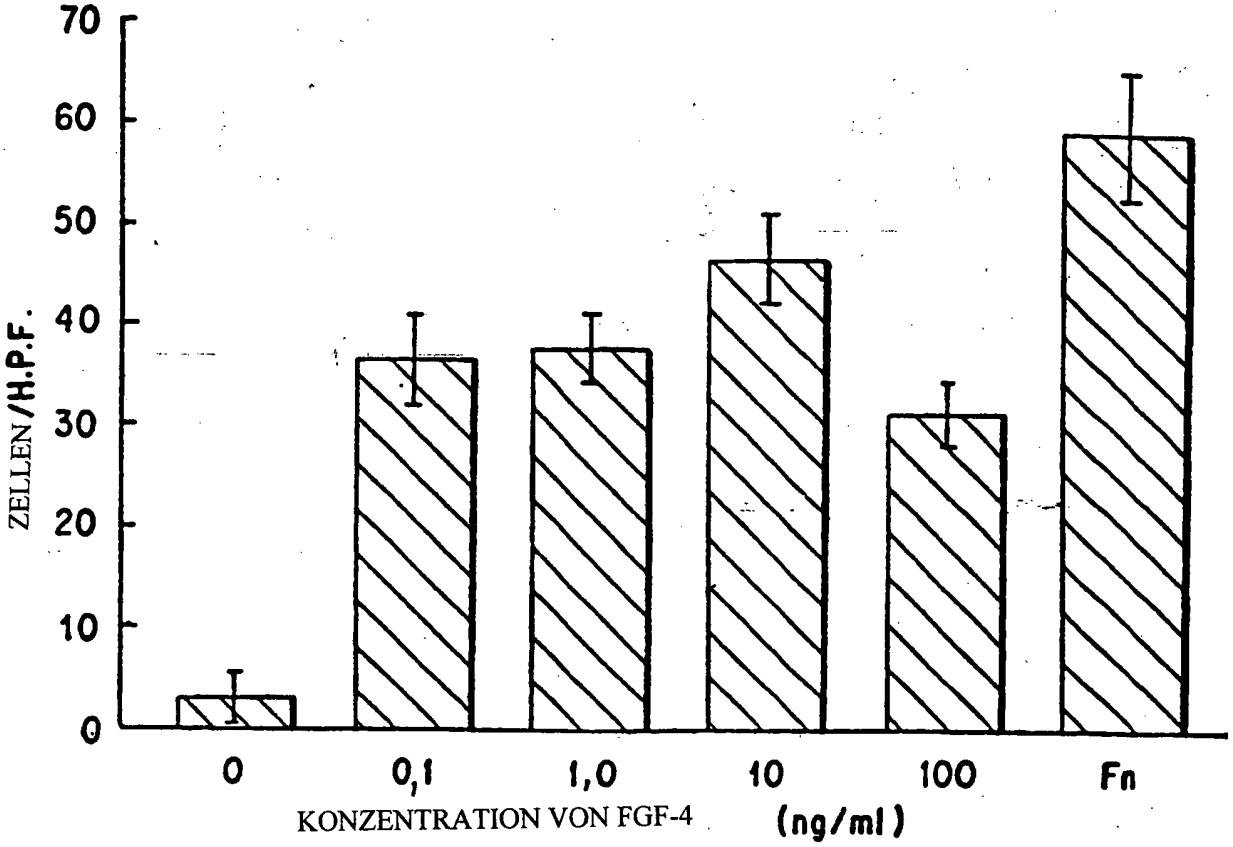

70
60
50
40
30
20
10
0
ZELLEN/H.P.F.
0
0,1
1,0
10
100
Fn
KONZENTRATION VON FGF-4 (ng/ml)

FIG. 37

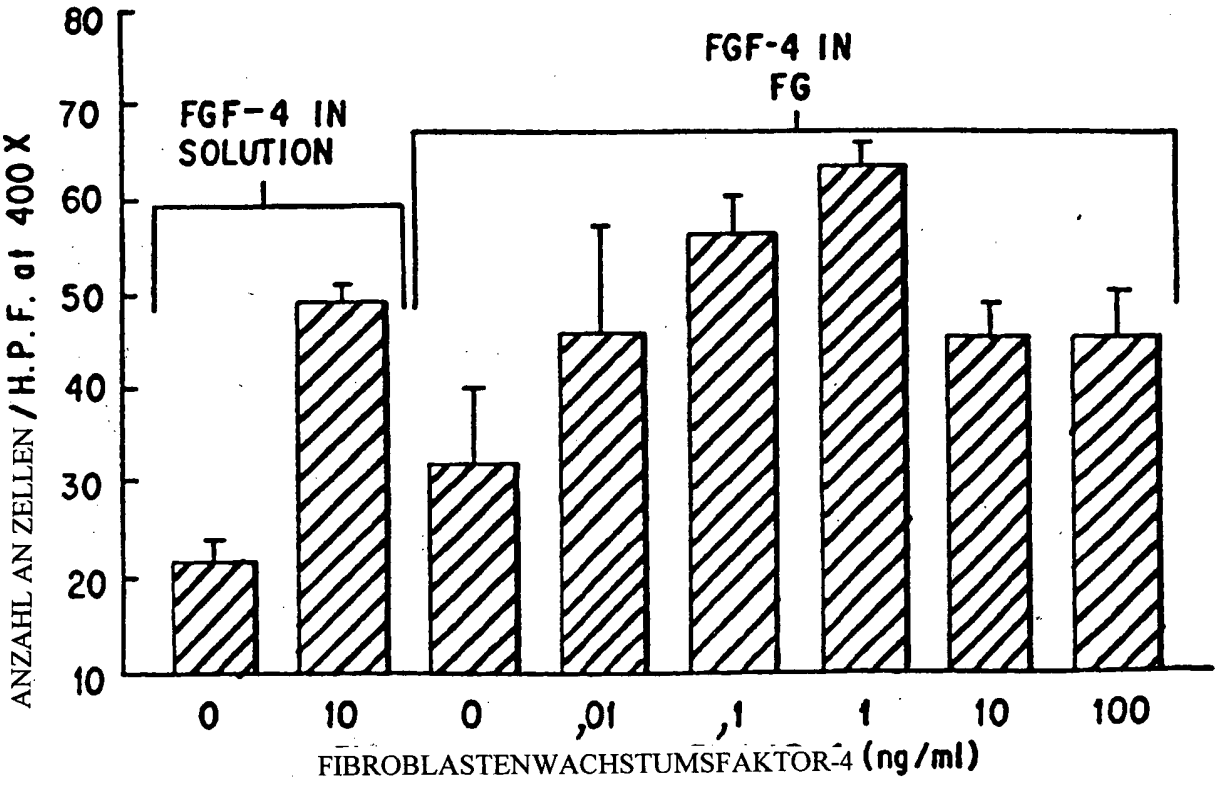

80
70
60
50
40
30
20
10
ANZAHL AN ZELLEN / H.P.F. at 400 X
FGF-4 IN SOLUTION
FGF-4 IN FG
0
10
0
,01
,1
1
10
100
FIBROBLASTENWACHSTUMSFAKTOR-4 (ng/ml)

FIG. 38

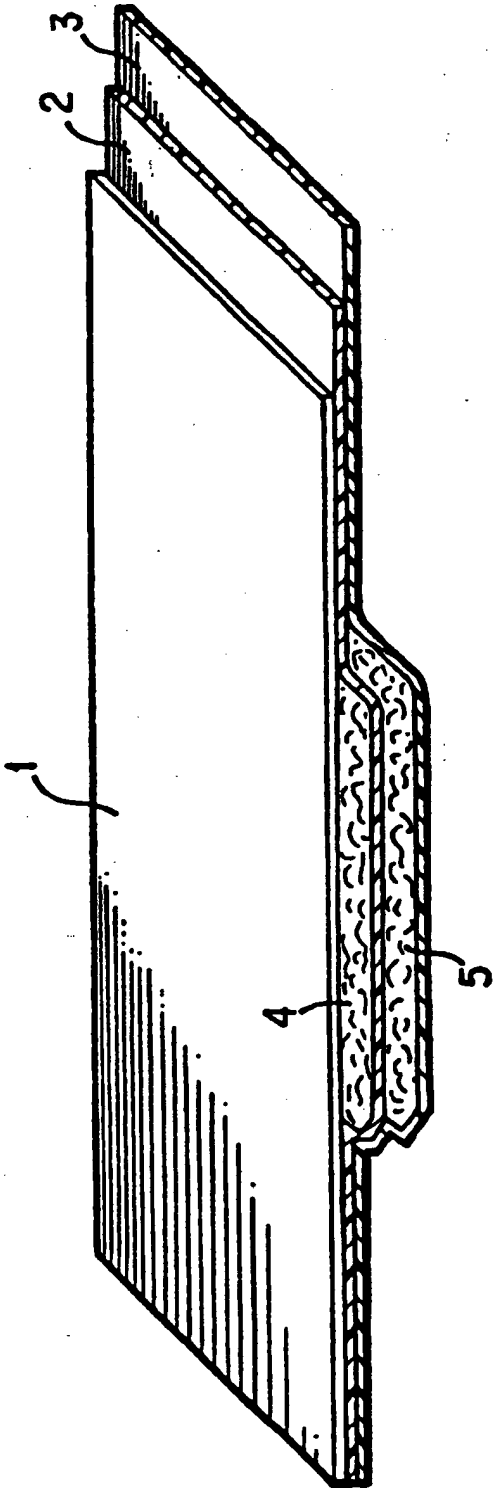


FIG. 39