

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. August 2007 (16.08.2007)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2007/090384 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
Nicht klassifiziert

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2007/000241

(22) Internationales Anmeldedatum:
9. Februar 2007 (09.02.2007)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2006 006 904.8 9. Februar 2006 (09.02.2006) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **ERNST-MORITZ-ARNDT-UNIVERSITÄT GREIFSWALD** [DE/DE]; Domstrasse 14, 17487 Greifswald (DE). **NEOPLAS GMBH** [DE/DE]; Friedrich-Ludwig Jahn-Strasse 19, 17489 Greifswald (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **JÜLICH, Wolf-Dieter** [DE/DE]; Wollweberstrasse 9, 17489 Greifswald (DE). **LINDEQUIST, Ulrike** [DE/DE]; Liese-Meitner-Strasse 6a, 17489 Greifswald (DE). **SCHAUER, Frieder** [DE/DE]; Seestrasse 2d, 17509 Lubmin (DE). **MIKO-LASCH, Anett** [DE/DE]; Clemens-Brentano-Strasse 8, 17489 Greifswald (DE). **MANDA, Kathrin** [DE/DE]; Güsteltitzer Strasse 26, 18581 Putbus (DE). **SCHRÖDER, Karsten** [DE/DE]; Johann-Stelling-Strasse 4, 17489 Greifswald (DE). **RÖWE, Tobias** [DE/DE]; Lange Strasse 69, 17489 Greifswald (DE).

(74) Anwälte: **WEBER-QUITZAU, Martin** usw.; Uexküll & Stolberg, Beselerstrasse 4, 22607 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: NOVEL ADHESIVES AND ADHESIVE METHODS

(54) Bezeichnung: NEUE KLEBSTOFFE UND KLEBEVERFAHREN

(57) Abstract: The invention relates to a combination of individual components formed from peptides, polyphenol oxidases and substituted polyhydroxyaromates, to the use thereof for modifying surfaces or for fixing reagents to surfaces and to adhesive methods for use in a moist environment.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Kombination von Einzelkomponenten aus Peptiden, Polyphenoloxidasen und substituierten Polyhydroxyaromaten, ihre Verwendung zum Modifizieren von Oberflächen oder zum Fixieren von Reagentien an Oberflächen und im wässrigen Umfeld einsetzbare Klebeverfahren.



WO 2007/090384 A2

Neue Klebstoffe und Klebverfahren

Die Erfindung betrifft Kombination von Einzelkomponenten aus Peptiden, Polyphenoloxidasen und substituierten Polyhydroxyaromaten, ihre Verwendung zum Modifizieren von Oberflächen oder zum Fixieren von Reagentien an Oberflächen und im wässrigen Umfeld einsetzbare Klebverfahren.

Stand der Technik

Die Entwicklung neuer Kombinationen, die für die Verklebung in wässrigen Milieu sowie zur Funktionalisierung von Oberflächen eingesetzt werden können, hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Ein Augenmerk liegt dabei vor allem auf der biologischen Abbaubarkeit der eingesetzten Materialien. So können Kleber auf Acrylat-Basis nur auf oberflächlichen Wunden eingesetzt werden, da die Acrylate biologisch nicht abgebaut

werden und bei einem Einsatz auf inneren Oberflächen eine toxische Gefährdung bedeuten können

Aus diesem Grund spielen für die Klebstoffherstellung beispielsweise Polymere pflanzlichen bzw. tierischen Ursprungs eine große Rolle. Muscheln sind z. B. in der Lage, unter Wasser besonders feste Verbindungen mit verschiedenen Trägersubstraten einzugehen. Grund dafür ist die Bildung/Ausscheidung von MAPs (mussel adhesive proteins). MAPs bestehen aus einer Vielzahl von Proteinen, die je nach Muschelart variieren kann.

Im Stand der Technik sind Kleber auf Basis von MAP bekannt, die in wässriger Umgebung eingesetzt werden können. MAP werden dabei, z.B. durch Catecholoxidase direkt miteinander verknüpft (US 5,015,677). Auch die Vernetzung von polyphenolischen MAP durch Polymere wie Poly(alkylenoxid) oder Polyethylenglykol (PEG) ist bekannt (WO 94/28937).

EP 0 947 142 offenbart die Erhöhung des Molekulargewichts von Proteinen durch ihre Vernetzung durch Multi-Kupfer-Enzyme, z.B. Laccasen. Die beschriebene Erhöhung des Molekulargewichts der Substratproteine trat nach 17 Stunden Inkubation auf. Die mit Hilfe des Verfahrens nach EP 0 947 142 vernetzten Proteine sind vor allem zur Verwendung in Nahrungsmitteln geeignet, z.B. zur Veränderung der Konsistenz von Wurst. Eine Kreuzvernetzung von Proteinen durch substituierte Dihydroxyaromaten wird in EP 0 947 142 jedoch nicht offenbart.

Demgegenüber stellt sich die Aufgabe, eine Kombination bereitzustellen, die sowohl für das Kleben im wässrigen Umfeld als auch für die Funktionalisierung von Oberflächen besonders geeignet ist. Schwierig ist auch heute noch die akute Versorgung stark blutender Wunden. Hier steht die Gefahr der Verblutung im Vordergrund. Wenn Wundkleber eingesetzt werden sollen, besteht die Gefahr, dass Klebekomponenten mit dem Blutstrom weggespült

werden und die Verklebung an einem unerwünschten Ort eintritt. Damit wird die Thrombose-Gefahr stark erhöht.

Damit bei einem Einsatz zum Verschließen offener Wunden die Kleberkomponenten nicht mit dem Blutstrom weggespült werden, ist eine Kombination mit einer blutstillenden mineralischen Komponente zweckmäßig.

Die bisher zur Blutstillung eingesetzten Syntheseprodukte sind Alkali- und Erdalkalialuminiumsilicate unterschiedlicher Zusammensetzung.

Auf der Basis von synthetisierten und bei über 400 °C vollständig dehydratisierten Erdalkalialuminiumsilicaten wurde von der Firma Z-Medica, U.S. für die Sofortbehandlung von Kriegsverletzungen und zur Notversorgung ein Syntheseprodukt einwickelt. Durch eine starke exotherme Reaktion wird dem Blut Wasser entzogen und es kommt so zur Blutstillung. Das Syntheseprodukt wird direkt in Granulatform auf die Wunde appliziert. Es wird unter der Bezeichnung "Quikclot" vertrieben. Nachteilig wurde bei diesem Produkt beschrieben, dass durch die exothermen Reaktion (Temperaturen bis 60 °C) Schädigungen des angrenzenden Gewebes auftreten. (Journal of Trauma 54 (2003) 6, 1077 - 1082).

Synthetische Lithiumalumosilikate (EP 1176991 A1, WO 00/69480) wurden speziell für die Wundversorgung entwickelt und werden unter dem Handelsnamen CERDAC vertrieben. Im Falle von CERDAC wird unter Aufwendung hoher Temperaturen (> 1000 °C) ein mikroporisiertes keramisches Produkt hergestellt, um eine optimale Wundversorgung zu erreichen. Abgesehen von der z.T. aufwändigen Herstellung ist die Kapillarkraftwirkung zu gering, um allen Anforderungen zu genügen.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass sowohl für eine schnelle Verschließung, die Versorgung von stark blutenden als

auch vor allem für die Versorgung chronischer Wunden bisher noch keine in jeder Hinsicht befriedigenden Lösungen erreicht wurden.

Erfindungsgemäß wurde diese Aufgabe durch verschiedene Kombinationen von Komponenten - gemäß den Merkmalen der Patentansprüche - gelöst. Dabei wurden Klebezeiten im Minutenbereich oder darunter und eine akzeptable Festigkeit der Verklebung erreicht, die z.B. einen Einsatz als Gewebekleber ermöglichen. Die erfindungsgemäßen Kombinationen sind ferner besonders geeignet zur Modifikation und/oder Beschichtung von Oberflächen.

Insbesondere stellt die Erfindung eine Kombination bereit, umfassend

- a) ein Polymer, das mindestens zwei Aminogruppen umfasst, und
- b) einen substituierten Polyhydroxyaromaten, der kein Peptidbestandteil ist, und
- c) eine Polyphenoloxidasen.

Es ist selbstverständlich, dass im Rahmen der Erfindung unabhängig voneinander ein oder mehrere verschiedene Peptide, Polyhydroxyaromaten oder Polyphenoloxidasen eingesetzt werden können. Einzahl und Mehrzahl wird daher in Bezug auf alle Komponenten synonym gebraucht.

Bevorzugt werden bei diesem Verfahren die Komponenten gleichzeitig mit einem Aminogruppen tragenden oder mit Aminogruppen funktionalisierten Substrat in Kontakt gebracht.

Die Aminogruppen können auf Oberflächen, z.B. Kunststoffoberflächen, Oberflächen von Zellkulturplatten oder Gefäßen für diagnostische Anwendungen oder Oberflächen von Implantaten, nach im Stand der Technik bekannten Verfahren, z.B. Plasmaverfahren, erzeugt werden (Schröder, et al., Improved low-

pressure microwave plasma assisted amino functionalization of polymers, Plasma processes and polymers, Weinheim, Deutschland, Weinheim: Wiley-VCH, 2005; Schröder et al., Plasma-Induced Surface Functionalization of Polymeric Biomaterials in Ammonia Plasma, Contrib. Plasma Phys. 41, 2001, 562-572; Meyer-Plath et al, Current trends in biomaterial surface functionalization - nitrogen-containing plasma assisted processes with enhanced selectivity, Vacuum 71, 2003, 391-406).

In den erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzte Substrate oder Oberflächen können z.B. eine Oberfläche mit einem Gehalt von mindestens etwa 2% freien Aminogruppen aufweisen. Der Begriff Oberfläche beschreibt dabei nicht nur flache Flächen, sondern Grenzsichten eines festen Substrats in jeder Form. Substrate können also z.B. auch Kügelchen (beads) oder komplex geformte Oberflächen sein.

Mit der erfindungsgemäßen Kombination können auf freie Aminogruppen tragenden oder mit freien Aminogruppen funktionalisierten Oberflächen Polyhydroxyaromaten aufgebracht werden.

Polyhydroxyaromaten (Polyphenole) sind aromatische Verbindungen mit mehr als einer an dem aromatischen Ring oder den aromatischen Ringen gebundenen Hydroxylgruppe. Der Polyhydroxyaromat ist selbst kein Peptidbestandteil, sondern vorzugsweise ein kleines organisches Molekül. Der Polyhydroxyaromat kann ein monozyklischer Dihydroxyaromat, ein bizyklischer Dihydroxyaromat, ein polyzyklischer Dihydroxyaromat, ein bizyklischer Trihydroxyaromat oder ein polyzyklischer Trihydroxyaromat sein. Er weist bevorzugt ein Molekulargewicht von 110 - 1 100 g/mol auf. Bevorzugt ist der Polyhydroxyaromat ein substituierter monozyklischer Dihydroxyaromat. Durch die Verwendung eines organischen Brückenmoleküls geringer Größe zur Vernetzung der Peptide werden bei der

Polymerisation besonders günstige Eigenschaften der Kombination erreicht. Über verschiedene Substitutionen können besondere, der Anwendung angepasste Eigenschaften erreicht werden. Der substituierte Dihydroxyaromat dient als Substrat von Polyphenoloxidasen, insbesondere Laccasen.

Substituiert bedeutet im Rahmen dieser Erfindung, dass an ein Molekül Reste gebunden sind, in diesem Fall an dem Aromaten neben den beiden Hydroxylgruppen noch 1, 2, 3 oder 4 weitere Reste, wobei von diesen unabhängig voneinander ein oder mehrere Reste H, CH₃, COH, COCH₃, CONH₂, CON-Alkyl, CON-Alkyl-OH, COOH, COO-Alkyl, Alkyl oder ein substituierter Aromat sein können, nicht aber alle Reste H sind. Der Aromat kann auch Teil eines bicyklischen oder polyzyklischen aromatischen Ringsystems sein. Notwendig sind bei einem substituierten Dihydroxyaromaten 2 der Reste H als verfügbare Bindungsstellen.

Dieses Verfahren kann zur Modifizierung von Oberflächen eingesetzt werden, z.B. zur Modifizierung von Implantaten, chirurgischen Instrumenten, wie Endoskopiegeräten, oder von Gefäßen für Zellkultur oder Diagnostik.

Durch die durch Beladung mit Polyphenolen modifizierte Oberfläche kann die Ausbildung von Biofilmen verhindert werden. Damit wird ein großes Problem vor allem in der Endoskopie gelöst.

Ferner wird ein in vivo oder in vitro Verfahren zum Kleben bereitgestellt, bei dem man die Komponenten der erfindungsgemäßen Kombination oder des Medizinprodukts miteinander und mit mindestens zwei zu verbindenden Substraten, die Hydroxylgruppen, Merkaptogruppen und/oder Aminogruppen aufweisen, in Kontakt bringt.

Dabei ist in einer Ausführungsform mindestens eins der Substrate ein Gewebe, insbesondere ein Organ, Bindegewebe, Haut, Sehne, Blutgefäß und/oder Nerv (Weichgewebe) und/oder Zahn bzw. Zahnkompartiment (Schmelz, Dentin und/oder Zement) und/oder Knochen (Hartgewebe). Eine besonders vorteilhafte Anwendung ist die Fixierung von drug-delivery-Systemen im Gewebe. Dabei ist der erste Schritt die Erzeugung von Aminogruppen an der Systemoberfläche vorzugsweise mit plasmagestützten Verfahren. Beispielsweise wird Polydimethylsiloxan in einem Argon-Mikrowellenplasma mit einer Zumischung von 1 % Ethyldiamin bei einem Druck von 0,5 mbar bei einer Leistung von 500 W für eine Minute plasmabehandelt. Dabei bildet sich ein vernetzter Film aus Ethyldiamin, der die Oberfläche überzieht und Aminogruppen enthält. Im zweiten Schritt erfolgt erfindungsgemäß die Fixierung im Gewebe mittels Polyphenolen und Polyphenoloxidase. Die Substrate an der Systemoberfläche können also z.B. auch Kügelchen (beads) oder komplex geformte Oberflächen sein, die mit Aminogruppen funktionalisiert werden. Auf diese Weise können z.B. Zytostatika enthaltende drug delivery Systeme in der Umgebung eines Tumors fixiert werden, um die Nebenwirkung einer systemischen Tumorthherapie zu mindern..

Vorzugsweise sind die Substrate Wundränder, die verklebt werden sollen. Alternativ kann es sich jedoch auch z.B. um miteinander zu verklebende anorganische oder organische Substrate handeln, die keine Gewebe sind, etwa Kunststoff- oder Keramikoberflächen. Eine medizinische Anwendung ist z.B. bei der Klebung von Implantaten denkbar. Nicht-medizinische Anwendungen finden sich beim Kleben von Substraten unter Wasser oder in einem wässrigen Milieu.

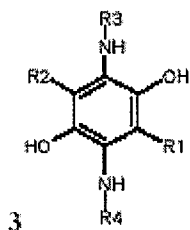
Es ist ebenfalls möglich, als Substrate nicht nur makroskopische Substrate einzusetzen, sondern auch andere Reagenzien, welche Aminogruppen (und/oder Hydroxylgruppen) enthalten, etwa Peptide, andere Wirkstoffe und/oder Zellen. Diese können untereinander,

aber auch mit festen Trägern verbunden werden. Damit wird die Verwendung der erfindungsgemäßen Kombination zur Bindung von Peptiden und/oder Reagenzien, welche Aminogruppen und/oder Hydroxylgruppen enthalten, und/oder Zellen an Oberflächen, welche Aminogruppen und/oder Hydroxylgruppen enthalten oder mit Aminogruppen und/oder Hydroxylgruppen funktionalisiert sind, ermöglicht.

Solche Reagenzien können etwa Diagnostika, medizinische Wirkstoffe (z.B. Antibiotika, Hormone, das Immunsystem beeinflussende Substanzen, Zytostatika), Antikörper, Antigene oder sonstige Proteine sein. Somit können z.B. Diagnostika mit einer kovalenten Verbindung zwischen einem Träger, z.B. einer ELISA-Platte, und einem diagnostisch verwendbaren Peptid hergestellt werden. Insbesondere bei sehr teuren Reagenzien führt dies zu einer wesentlichen Kostenreduktion. Die Empfindlichkeit von Nachweisreaktionen wird verbessert. Da intensivere Spülvorgänge eingesetzt werden können, wird die Spezifität der Nachweisreaktion erhöht. Genauso können reaktive Gruppen enthaltende Oberflächen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Kombination mit Wirkstoffen, z.B. antibiotischen Wirkstoffen oder das Immunsystem hemmenden oder fördernden Substanzen, beschichtet werden.

Die Verbindung der Substrate erfolgt dabei durch eine Vernetzung von Hydroxylgruppen und/oder Aminogruppen der Oligopeptide und der Substrate durch die Dihydroxyaromaten.

Ein Produkt des beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Diagnostika oder zum Immobilisieren von Peptiden ist in Formel 3 dargestellt.

Schema 4:

In Schema 4 bedeuten R1 und/oder R2 unabhängig voneinander H, CH₃, COH, COCH₃, CONH₂, CON-Alkyl, CON-Alkyl-OH, COOH, COO-Alkyl, Alkyl oder substituierter Aromat, insbesondere H, CH₃, Alkyl oder substituierter Aromat, nicht beide Reste H sind.

Die Komponenten R4-NH₂ (Peptid, und /oder Protein und/oder Aminogruppen enthaltendes Reagenz und/oder Zelle, insbesondere Aminosäure, biologischer Wirkstoff (Antibiotikum, Pharmaka, diagnostisches Reagenz) werden über das Brückenmolekül an eine mit Aminogruppen funktionalisierte Oberfläche/Matrix R3-NH₂ gebunden. Die Reaktion kann bei ca. 2-80°C ablaufen, bevorzugt ist jedoch eine Temperatur von ca. 10-60°C oder ca. 20-37°C oder 25-30°C. Damit können alle Verfahren bei Raum- oder Körpertemperatur durchgeführt werden. Die besonders schonenden Reaktionsbedingungen ermöglicht die Fixierung auch sehr empfindlicher biologischer Wirkstoffe.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein in einem wässrigen Milieu durchgeführtes Klebeverfahren unter Verwendung der oben beschriebenen erfindungsgemäßen Kombination, z.B. ein Verfahren zum Kleben unter Wasser.

Die erfindungsgemäßen Verfahren werden bevorzugt mit einem oder mehreren wässrigen Lösungsmittel durchgeführt, die Konsistenz der eingesetzten Komponenten der Kombination muss jedoch nicht flüssig sein, sondern eine pastöse Konsistenz ist ebenfalls geeignet. Der pH ist bevorzugt 2-10, insbesondere 4-8 oder 7.

Gegenstand der Erfindung sind auch Produkte, die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich sind. In diesem Produkt können zwei Substrate durch den erfindungsgemäßen Kleber vernetzt sein. Insbesondere handelt es sich um ein medizinisches oder diagnostisches Produkt, in dem Peptide und/oder Proteine und/oder Aminogruppen enthaltende Reagenzien und/oder Zellen an eine Oberfläche gebunden sind, z.B. sind Diagnostika (z.B. Antikörper oder Antigene) medizinische Wirkstoffe (z.B. Antibiotika, Zytostatika, Hormone, das Immunsystem beeinflussende Substanzen) und/oder sonstige Proteine an eine Oberfläche gebunden, z.B. Kunststoffoberflächen, Oberflächen von Zellkulturplatten, ELISA-Platten oder anderen Gefäßen für diagnostische Anwendungen oder Oberflächen von Implantaten. Bei Produkten mit modifizierten Oberflächen ist die Oberfläche durch Brückenmoleküle der erfindungsgemäßen Kombination modifiziert, d.h., die Oberfläche ist mit den polymerisierten Bestandteilen der erfindungsgemäßen Kombination und gegebenenfalls anderen Reagentien, kovalent verbunden.

Für das Verschließen von Wunden umfasst die erfindungsgemäße Kombination die Einzelkomponenten

- a) Oligopeptide, die mindestens eine Diaminosäure, vorzugsweise mindestens zwei Diaminosäuren, enthalten und
- b) substituierte Dihydroxyaromaten oder Substrate von Polyphenoloxidasen (vorzugsweise von Laccasen) und
- c) Polyphenoloxidasen (vorzugsweise Laccasen).

Für diese Anwendung ist das Polymer bevorzugt ein Peptid. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird als Peptid sowohl ein Oligopeptid (2 bis ca. 100 Aminosäuren Länge, bevorzugt ca. 4 bis ca. 20 Aminosäuren Länge oder ca. 6 bis ca. 10 Aminosäuren Länge) als auch ein Protein (Eiweiß, etwa 100 bis etwa 5000

Aminosäuren Länge, bevorzugt 100-1000 oder 100-200 Aminosäuren Länge) bezeichnet. Bevorzugt weist das Peptid eine Länge von 10-1000 Aminosäuren auf. Das Peptid kann ein Molekulargewicht von etwa 1 bis etwa 100 oder bis etwa 200 kDa, insbesondere etwa 2 bis etwa 50 kDa oder etwa 5 bis etwa 20 kDa aufweisen. Es kann modifiziert bzw. substituiert sein, z.B. glykosyliert. Neben den üblichen proteinogenen Aminosäuren können auch modifizierte bzw. untypische Aminosäuren wie Hydroxylysin in dem Oligopeptid enthalten sein. Der Einsatz von D-Aminosäuren anstelle von L-Aminosäuren oder zusätzlich dazu ist möglich und verlangsamt den Abbau des Peptids.

Die Aminogruppen können primäre oder sekundäre Aminogruppen sein. Besonders reaktiv sind jedoch primäre Aminogruppen. Mindestens eine der reaktiven Gruppen des Peptids ist bevorzugt Bestandteil einer Diaminosäure, z.B. von Lysin. Bevorzugt umfasst das Peptid daher mindestens eine Diaminosäure, bevorzugt mindestens 2, 3, 4, 5 oder mehr Diaminosäuren. Bevorzugt werden Lysin-haltige Peptide (bzw. Oligopeptide oder Eiweiße) eingesetzt.

Auch andere Aminosäuren, wie Arginin, Asparagin, Glutamin oder Histidin, tragen reaktive Aminogruppen, die mit dem Dihydroxyaromaten reagieren können.

Die reaktiven Aminogruppen, insbesondere die durch die Diaminosäure bereitgestellten Aminogruppen, sind für die Vernetzungsreaktion zwischen Peptid und Oligolacton besonders geeignet. Auch Hydroxylgruppen oder Merkaptogruppen in dem Peptid können jedoch zu der Vernetzungsreaktion beitragen. Bevorzugt umfasst das Peptid daher mindestens eine Aminosäure mit einer Hydroxylgruppe, also insbesondere Serin, Threonin oder Tyrosin oder einer Merkaptogruppe, z.B. Cystein. Auch Hydroxylysin oder polyphenolische Aminosäurebausteine, wie sie in den MAPs vorliegen, können in den erfindungsgemäß eingesetzten Peptiden vorkommen. Ein Vorteil der vorliegenden

Erfindung ist jedoch, dass die Anwesenheit dieser spezifischen Aminosäurebausteine und damit die Verwendung von MAPs nicht notwendig ist. Die verwendeten Peptide können daher z.B. ohne weiteres rekombinant hergestellt werden.

Die durch Reaktion der Brückenmoleküle mit dem Peptid entstehende Vernetzung hängt wesentlich davon ab, wie hoch der Anteil der zur Verfügung stehenden reaktiven Gruppen in dem Peptid ist. Gute Klebeeigenschaften können ab einem Anteil an Aminosäuren des Peptids, die eine reaktive Aminogruppe (z.B. Diaminosäuren wie Lysin) tragen, von mindestens 10 % erreicht werden. Ist das Polymer kein Peptid, so beträgt der Anteil an Polymerstrukturelementen, die eine Aminogruppe tragen, mindestens etwa 10%. Bevorzugt liegt der Anteil dieser Aminosäuren oder Strukturelemente jedoch höher, bei mindestens 20%, mindestens 30%, mindestens 40 oder mindestens 50% oder sogar bei mindestens 80 bis 100%. Natürlich vorkommende Peptide und Proteine, z.B. Albumin oder Casein, können verwendet werden, besonders geeignet sind z.B. MAPs.

Es können jedoch auch besonders geeignete kürzere, leicht künstlich herstellbare Peptide eingesetzt werden. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind etwa 50% der Aminosäuren des Peptids Lysin. Zusätzlich können etwa 50% der Aminosäuren des Peptids Tyrosin sein. Lysin und Tyrosin können z.B. als sich wiederholende Dipeptid-Einheit angeordnet sein. Auch eine andere Abfolge oder die Aufnahme weiterer Aminosäuren, insbesondere von Arginin, Asparagin, Glutamin oder Histidin (anstelle von Lysin oder zusätzlich), Serin oder Threonin (anstelle von Tyrosin oder zusätzlich), von Cystein oder anderen Aminosäuren ist jedoch möglich. Eine Länge des Peptids von ca. 10-20 Aminosäuren ist besonders bevorzugt. Hervorragende Ergebnisse konnten etwa mit Peptiden von 10-20 Aminosäuren Länge, die aus sich wiederholenden Dipeptideinheiten

von Lysin und Tyrosin bestanden ($[\text{Lys-Tyr}]_n$ oder $[\text{Tyr-Lys}]_n$, $n=5$ oder $n=10$), erzielt werden.

Der substituierte Polyhydroxyaromat dient als organisches Brückenmolekül zum Vernetzen des Peptids. Im EP 0 947 142 werden als Substrate der Enzyme Proteine eingesetzt. Im vorliegenden Fall sollen/können dagegen Brückenmoleküle eingesetzt werden, die nicht proteinogener Herkunft sind. Überraschenderweise wurde festgestellt, dass substituierte Polyhydroxyaromaten gegenüber unsubstituierten Polyhydroxyaromaten besonders günstige Polymerisationseigenschaften aufweisen, insbesondere wird eine schnelle Polymerisation und eine gute Festigkeit der Verklebung erreicht. Eine geeignete Substitution der Aromaten kann sogar dazu führen, dass nunmehr als Brückenmolekül auch Monohydroxyaromaten zur Vernetzung geeignet sind.

Substituiert bedeutet im Rahmen dieser Erfindung, dass an ein Molekül Reste gebunden sind, in diesem Fall an dem Aromaten neben den beiden Hydroxylgruppen noch 1, 2, 3 oder 4 weitere Reste, wobei von diesen unabhängig voneinander ein oder mehrere Reste H, CH_3 , COH, COCH_3 , CONH_2 , CON-Alkyl, CON-Alkyl-OH, COOH, COO-Alkyl, Alkyl oder ein substituierter Aromat sein können, nicht aber alle Reste H sind. Der Aromat kann auch Teil eines bicyklischen oder polyzyklischen aromatischen Ringsystems sein. Bevorzugt sind bei einem substituierten Dihydroxyaromaten 2 oder 3 der Reste H.

Als substituierte Dihydroxyaromaten kommen z.B. 2,5-Dihydroxybenzamide, vorzugsweise 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid, in Betracht. Es wurde gefunden, dass substituierte Dihydroxyaromaten für die erfindungsgemäße Kombination wesentlich besser geeignet sind als unsubstituierte.

Alkyl bedeutet verzweigte oder unverzweigte aliphatische Kohlenwasserstoffketten, bevorzugt mit 1-20, mehr bevorzugt 1-6

Kohlenstoffen, z.B. Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl, Isobutyl, n-Pentyl, n-Hexyl.

Der substituierte Polyhydroxyaromat ist ein Substrat einer Polyphenoloxidase. Die Polyphenoloxidase dient als Katalysator für die Reaktion zwischen Peptid und Polyhydroxyaromat. Bevorzugt ist die Polyphenoloxidase eine lignolytische Polyphenoloxidase, insbesondere Laccase (EC 1.10.3.2). Lignolytische Polyphenoloxidasen wie Laccase weisen – im Gegensatz etwa zu Tyrosinasen oder Catecholoxidasen, ein besonders breites Substratspektrum auf.

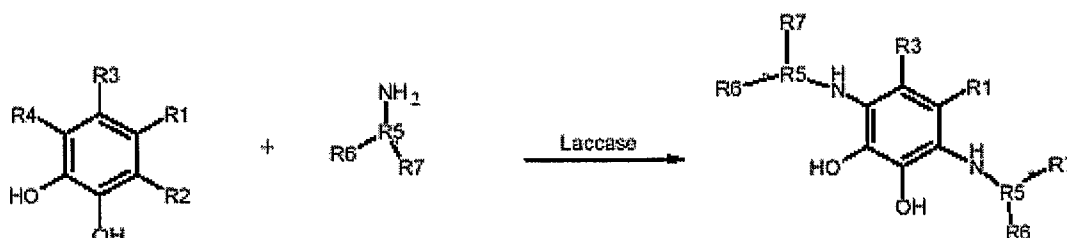
Laccasen sind im Stand der Technik bekannt. Sie können aus Pflanzen oder Fungi stammen oder von natürlichen Enzymen abgeleitet sein. Die im Rahmen der Erfindung verwendeten Laccasen können rekombinant hergestellt oder aufgereinigt sein. Dabei ist eine besondere Reinheit der Laccase im allgemeinen nicht erforderlich. Es können auch Überstände lignolytischer Pilze eingesetzt werden. Für medizinische Anwendungen ist jedoch eine wesentliche Abtrennung von mikrobiologischen Substanzen wie Lipopolysacchariden wünschenswert. Beispiele sind Laccase aus den Arten *Aspergillus*, *Neurospore*, *Podospora*, *Botrytis*, *Collybia*, *Fomes*, *Lentinus*, *Pleurotus*, *Pycnoporus*, *Pyricularia*, *Trametes*, *Rhizoctonia*, *Coprinus*, *Psatyrella*, *Mycelophtera*, *Schtalidium*, *Polyporus*, *Phlebia* oder *Coriolus*. Die Herstellung von Laccasen ist z.B. in EP 0 947 142 offenbart.

In der bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Kombination ist das Peptid ein Oligopeptid mit einer Länge von etwa 10-20 Aminosäuren, bevorzugt mit einem Anteil von etwa 50% Diaminosäuren wie Lysin, das Brückenmolekül ist 2,5-Dihydroxybenzamid, vorzugsweise 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid, und der Katalysator ist Laccase.

Die Vernetzungsreaktion verläuft bei der erfindungsgemäßen Kombination entsprechend dem in Reaktionsschema 1 beispielhaft

dargestellten Schema. Formel 1 oder 2 stellt ein erhaltenes Produkt schematisch dar, bei dem Peptide/Polymere durch den substituierten Dihydroxyaromaten verbunden sind.

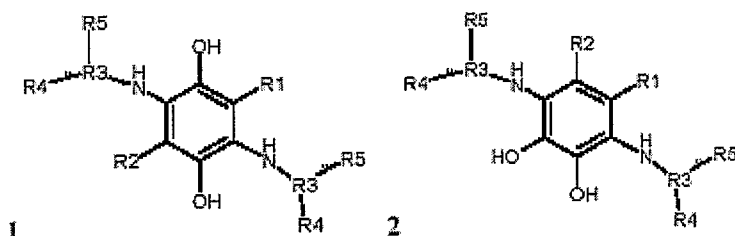
Schema 1:



In Reaktionsschema 1 ist R1, R2, R3 und/oder R4 unabhängig voneinander H, OH, CH₃, COH, COCH₃, CONH₂, CON-Alkyl, CON-Alkyl-OH, COOH, COO-Alkyl, Alkyl oder substituierter Aromat, insbesondere H, CH₃, Alkyl, oder substituierter Aromat. Mindestens einer dieser Reste ist nicht H. Bevorzugt sind drei dieser Reste H und der vierte Rest ist CON-Alkyl-OH, insbesondere CON-C₂H₄-OH.

R6-R5(-NH₂)-R7 stellt das Aminogruppen tragende Peptid oder Polymer dar, wobei R6 oder R7 H sein kann oder beide Reste Aminosäureeinheiten oder Polymereinheiten darstellen. R5(-NH₂/NH-) ist eine Diaminosäure oder eine endständige Aminosäure des Peptids/Aminogruppe des Polymers mit einer freien Aminogruppe oder deren Reaktionsprodukt.

Schema 2: Formel 1 und 2:



In Formel 1 und 2 (Schema 2) ist R1 und/oder R2 unabhängig voneinander H, OH, CH₃, COH, COCH₃, CONH₂, CON-Alkyl, CON-Alkyl-OH, COOH, COO-Alkyl, Alkyl, substituierter Aromat, insbesondere H, CH₃, Alkyl, oder substituierter Aromat, wobei nicht beide Reste H sind. R4-R3-R5 stellt das Aminogruppen tragende Peptid/Polymer dar, wobei R4 oder R5 H sein kann oder beide Reste Aminosäureeinheiten/Polymereinheiten darstellen. R3(-NH-) ist das Reaktionsprodukt einer Diaminosäure oder einer endständigen Aminosäure des Peptids/Aminogruppe des Polymers mit einer freien Aminogruppe.

Im Allgemeinen liegen die einzelnen Komponenten der Kombination vor der Verwendung getrennt voneinander vor, insbesondere liegen die Komponenten a und b getrennt voneinander vor. Es kann jedoch auch eine Vormischung von Komponenten erfolgen, die die Verwendung vorbereitet, beispielsweise können Peptid/Polymer und Katalysator bereits gemischt sein. Vorteilhafterweise werden Brückenmolekül und Peptid/Polymer erst dann gemischt, wenn die Reaktion zwischen beiden erwünscht ist. Wenn jedoch der Katalysator erst direkt vor der Anwendung hinzugefügt wird, kann auch eine Mischung, die sowohl Peptid/Polymer als auch Brückenmolekül umfasst, noch in einem gewissen Rahmen lagerfähig sein.

In der Kombination können eine oder mehrere Komponenten - gemeinsam oder getrennt - in einem oder mehreren Lösungsmittel aufgenommen sein. Für medizinische Anwendungen ist das Lösungsmittel nicht toxisch und biologisch verträglich. Bevorzugt ist das Lösungsmittel ein Phosphatpuffer wie Calciumphosphat oder Natriumphosphatpuffer oder PBS, es kann aber auch ein organisches Lösungsmittel wie DMSO oder eine Mischung aus einem wässrigen und einem organischen Lösungsmittel sein. Alternativ kann die Kombination oder ihre Bestandteile erst vor der Verwendung in dem Lösungsmittel aufgenommen werden.

In einer Ausführungsform ist die Kombination bereits in einer Zweikomponentenspritze, bevorzugt bereits mit angesetztem Mischextruder, zur Anwendung vorbereitet, wobei die eine Komponente das Peptid und gegebenenfalls den Katalysator umfasst und die andere Komponente das Brückenmolekül. Dies erlaubt eine besonders exakte Dosierung und einfache Handhabung. Bevorzugt ist eine Doppelkammerspritze etwa vom Typ Mixpac (Mixpac Systems AG, Rotkreuz, Schweiz).

Bevorzugt liegen die Bestandteile der Kombination schon in einem Mengenverhältnis vor, das für ihre Verwendung angemessen ist und ein umständliches Dosieren der Zutaten erspart. Der Anteil der Peptide an der Kombination kann z.B. etwa 20-99% (die Prozentangaben beziehen sich auf Gew.-%, bezogen auf die Gesamtmasse ohne Lösungsmittel), bevorzugt etwa 40-90%, betragen. Der Anteil der Brückenmoleküle kann z.B. etwa 1-80%, bevorzugt etwa 5-70%, betragen. Der Anteil an Polyphenoloxidase beträgt etwa 0,001-5%, bevorzugt etwa 0,01-1% oder etwa 0,05-0,5%.

Besonders bevorzugt ist folgende Zusammensetzung des Klebers: [Tyr-Lys]_n, $n=4-35$, 8,5 mM; 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid 12,5 mM; Enzym: 0,32 U ($156 \text{ nmol ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$). Variationen sind sowohl beim Peptid als auch beim Brückenmolekül etwa von 1-50 mM möglich.

Die Mengenverhältnisse können in Bezug auf die gewünschte Anwendung angepasst werden. Eine anteilig größere Menge an Brückenmolekül führt dabei zu einem höheren Vernetzungsgrad. Ferner werden reaktive Amino-, Merkapto und/oder Hydroxylgruppen von zu verklebenden Substraten verstärkt in die Vernetzung einbezogen, wenn ein geringerer Anteil an Peptid vorliegt. Die Menge an Enzym beeinflusst die Geschwindigkeit der Reaktion, wobei, je nach Anwendung, ein schnelles Erreichen des Gelpunkts oder vollständiges Aushärten oder eine längere Verarbeitbarkeit

der Kombination erwünscht sein kann. Eine Optimierung ist durch Versuche möglich.

Die Kombination kann weitere Zusatz- und Hilfsstoffe enthalten, z.B. Füllmittel wie Collagen, Albumin, Hyaluronsäure oder ähnliches. Bevorzugt beträgt der Gesamtanteil von Peptid und Brückenmolekül etwa 25-100%, insbesondere etwa 50-90%. Auch die Wundheilung fördernde Substanzen, z.B. Wachstumsfaktoren, oder antibiotisch wirksame Substanzen können enthalten sein. Werden z.B. aminosäurehaltige antimikrobielle Wirkstoffe durch Einwirkung der erfindungsgemäßen Komponenten modifiziert und an Oberflächen fixiert, ergibt sich eine antimikrobielle Ausrüstung. Derartige Modifikationen sind z.B. zur Versorgung infizierter Wunden von Interesse.

Die erfindungsgemäße Kombination ist insbesondere ein Kleber, d.h., sie ist geeignet zum Kleben von Substraten, z.B. von Gewebe. Bevorzugt liegt die erfindungsgemäße Kombination als Medizinprodukt vor. Das Medizinprodukt ist zum Kleben von Gewebe geeignet, kann aber auch zum Kleben anderer Substrate, z.B. Implantate verwendet werden. Eine Klassifizierung als pharmazeutisches Präparat ist, abhängig von nationalem Recht, ebenfalls möglich. Diese Begriffe sind für die Zwecke der Beschreibung der Erfindung austauschbar. In einem Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine Verwendung der Kombination zur Herstellung eines Medizinprodukts zum Kleben von Gewebe bereit.

Eine Sterilisierung des Medizinprodukts bzw. seiner einzelnen Komponenten kann vorteilhafterweise ohne Strukturveränderung erreicht werden. Möglich ist z.B. eine Sterilfiltrierung von Lösungen. Bevorzugt ist jedoch eine Sterilisierung über Gamma-Strahlung, da diese bereits verpackt erfolgen kann und somit keine aseptische Abfüllung nötig ist. Der Aktivitätsverlust der Laccase bei der Gammasterilisation, der bis zu 50 % betragen

kann, kann durch eine entsprechend höhere Ausgangskonzentration leicht ausgeglichen werden.

Das Medizinprodukt kann zum Kleben von Hart- oder Weichgewebe verwendet werden. Zum Beispiel kann Bindegewebe, Haut, Sehne, Organ, Blutgefäß und/oder Nerv (Weichgewebe) und/oder Zahn und/oder Knochen (Hartgewebe) geklebt werden. Selbstverständlich können auch verschiedene Gewebe miteinander verklebt werden, z.B. Sehnen und Knochen. Eine besonders bevorzugte Anwendung findet sich beim Verkleben von Wundrändern oder beim Kleben von Rupturen verschiedener Organe, wie Leber, Niere oder Milz. Auch die Versorgung von chirurgisch gesetzten Wunden, z.B. nach der Entfernung von Tumoren, ist mit dem erfindungsgemäßen Medizinprodukt möglich.

Die Vorteile der erfindungsgemäßen Kombination ermöglichen die Anwendung in besonders schwierigen Fällen, insbesondere auch bei der Versorgung von chronischen Wunden. Bei solchen Wunden entsteht nach der notwendigen chirurgischen Versorgung eine starke Zugspannung, die die Wundheilung erschwert. Die hohe Festigkeit des erfindungsgemäßen Wundverschlusses ermöglicht auch in diesen Fällen eine feste Abdichtung und verhindert Wundinfektionen. Nach Abschluss der Vernetzungsreaktion können auf den so verschlossenen Wunden Kompressiv-Bandagen angewandt werden, um die Ödembildung zu verhindern.

Die Kombiantion kann zur Fixierung von Implantaten, z.B. Gefäßprothesen, bioabbaubaren Implantaten, Kathetern, Stents und anderer Materialien genutzt werden. Bei einer vorteilhaften Ausführungsform werden in das zur Fixierung von Implantaten vorgesehene Klebersystem pharmazeutische Wirkstoffe eingelagert, um so Infektionen zu verhindern, unerwünschtes Zellwachstum zu unterbinden und Heilung zu beschleunigen. Mit Hilfe der eingelagerten pharmazeutischen Wirkstoffe können Resorption und Heilung aufeinander abgestimmt werden.

Eine vorteilhafte Anwendung dieser Kombination ist die flexible, über einen gewissen Zeitraum resorbierbare Abdichtung von Anastomosen und Patchen an Gefäßen bzw. auf Hohlorganen. Die Kombination ist auch für die Fixierung von Drug-Delivery Devices und von porösen Trägerstrukturen bzw. Membranen für den potentiellen Einsatz in der regenerativen Medizin (Tissue Engineering) geeignet.

Weitere erfindungsgemäße Verwendungen sind:

- als Mittel zur Ersten Hilfe nach Unfällen
- zur Wundsanierung bei infizierten Wunden
- in der plastischen, rekonstruktiven und/oder kosmetischen Chirurgie, insbesondere zur Verhinderung der Narbenbildung, die beim Nähen von Wunden induziert wird
- Verschluss und Abdichtung von Flüssigkeit- und Luftleckagen z. B. Abdichtung von Stichkanalblutungen in der Gefäßchirurgie, bei arteriellen Bypassoperationen oder zur Abdichtung von Lungenleckagen in der Thoraxchirurgie.

Überraschend wurde gefunden, dass die entwickelten Medizinprodukte auch hervorragend zum Kleben von Hartgewebe, z.B. zur Knochenklebung verwendet werden können. Für das Kleben von Knochen sowie für die schnelle Integration von Implantaten, insbesondere im Bereich der Knochen, ist die Akzeptanz des implantierten Materials durch die Knochenzellen von fundamentaler Bedeutung. Dies trifft natürlich auch auf die verwendeten Kleber zu. Durch die schnelle Besiedlung mit Osteoblasten und deren anschließender Ausreifung wird die Knochenneubildung gefördert und der Heilungsprozess verkürzt. Implantate werden daher bevorzugt mit mikrostrukturierten Oberflächen gefertigt. Der erfindungsgemäße Gewebekleber erhält diese Struktur und unterstützt die Knochenneubildung. Für die Produktion von Kollagen, das für die Knochenheilung unentbehrlich ist, sind die Aminosäuren Lysin und Prolin notwendig. Lysin ist an der Klebestelle in großem Umfang enthalten. Daraus

resultiert eine positive Beeinflussung der Knochenbildung. Die gebildete extrazelluläre Matrix wird über Integrine, wie z.B. $\alpha 1\beta 1$ oder $\alpha 3\beta 1$, anhand der RGD-Sequenz (Arg-Gly-Asp) erkannt. Dadurch wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die in der Zelle Veränderungen am Zytoskelett auslöst und zwischen Proliferationsstadium und Differenzierungsstadium umschaltet. Die gebildete Proteinmatrix dient außerdem der Einlagerung von Calciumsalzen.

Das ermöglicht die Anwendung bei komplizierten Brüchen und die Einfügung von Knochensplittern. Gerade bei der Operation komplizierter Brüche sind die Vorteile der erfindungsgemäßen hohen Klebekraft von großer Bedeutung. Das erfindungsgemäße Medizinprodukt dient daher bevorzugt zum Fixieren von Trümmerfrakturen z.B. im Gesichtsschädelbereich oder der Extremitäten.

Ferner ist die erfindungsgemäße Kombination aufgrund der hohen Zugfestigkeit auch besonders zur Herstellung von Medizinprodukten zur Fixierung von Muskeln, Bändern und Sehnen an Knochen geeignet.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit findet sich im Bereich der Zahnmedizin, z.B. bei der Klebung von Inlays und Kronen oder bei Aufbaufüllungen.

Die Viskosität und Fließfähigkeit der verwendeten Kombination kann, abhängig z.B. von der Länge der zu fixierenden Wunde und der Wundspalttiefe bzw. den zu verklebenden Substraten angepasst werden. Neben der Länge der verwendeten Peptide/Polymere hat auch die Menge an Lösungsmittel einen Einfluss auf diese Parameter. Auch Zusatzstoffe wie Thixotropiemittel können zur Anpassung von Viskosität und Fließfähigkeit verwendet werden. Typischerweise wird zum Kleben von Hartgewebe ein Medizinprodukt mit höherer Viskosität verwendet als zum Kleben von Weichgewebe.

Ein Vorteil der erfindungsgemäßen Kombination ist, dass die durch Reaktion der Komponenten entstandene Verbindung biologisch abbaubar ist, insbesondere beim Einsatz von Peptid als Polymer. Durch die Verknüpfung von Peptidsequenzen, die die für eine Klebewirkung relevanten Aminosäuren enthalten, entsteht eine sehr feste Verklebung, die aber im Verlauf des Heilungsprozesses resorbiert werden kann. Die anfängliche Härtungsphase, verbunden mit hohen Klebeigenschaften, und die zeitabhängig langsame Resorption im Körper bei fortgeschrittenen Heilungsprozessen sind von besonderem Vorteil.

Bevorzugt wird die vernetzte Kombination im Körper innerhalb von etwa einem Jahr resorbiert (biologisch abgebaut), bevorzugt in einem Zeitraum von etwa 28 Tagen bis zu etwa 6 Monaten. Der Mechanismus der Resorption kann z.B. hydrolytisch oder enzymatisch sein. Insbesondere können die Peptide gespalten und einzelne Fragmente abtransportiert und ausgeschieden werden. Alternativ können Fragmente oder Aminosäuren auch in das sich regenerierende Gewebe eingebaut werden.

Durch die Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung verbundener Polymere bereitgestellt, bei dem man die Komponenten der erfindungsgemäßen Kombination miteinander in Kontakt bringt. Die entstehenden Produkte sind hochmolekular vernetzt und können z.B., abhängig von den Ausgangskomponenten, in diesem Fall bevorzugt Peptide/Proteine, die zum Verzehr geeignet sind, zur Herstellung von Nahrungsmitteln eingesetzt werden.

In einer Ausführungsform wird die erfindungsgemäße Kombination, die zum Kleben von Gewebe geeignet ist, zur Herstellung eines Medizinprodukts zur Versorgung blutender Wunden verwendet, das in Kombination mit einem blutstillenden Mittel eingesetzt wird. Somit wird eine vorteilhafte Kombination des Gewebeklebers mit einem blutstillenden Mittel zur Verfügung gestellt, die bei blutenden Wunden gemeinsam eingesetzt werden kann. Es hat sich

herausgestellt, dass ein neuartiges blutstillendes Mittel in diesem Zusammenhang besonders geeignet ist.

Die vorliegende Erfindung stellt daher eine Kombination zur Versorgung blutender Wunden bereit, umfassend

- i) ein blutstillendes Mittel, umfassend ein Zeolithfein-
granulat mit einem Zeolithanteil von mindestens 70% und
einer mittleren Porengröße von 0,3 bis 0,5 nm, erhältlich
durch Dehydratation bei Temperaturen < 200 °C
- ii) eine Kombination zum Kleben von Gewebe, umfassend
 - a) ein Polymer, insbesondere ein Peptid, das mindestens zwei
Aminogruppen umfasst, und
 - b) einen substituierten Polyhydroxyaromaten, insbesondere
Dihydroxyaromaten, der kein Peptidbestandteil ist, und
 - c) eine Polyphenoloxidase, insbesondere eine Laccase.

Die Kombination kann die erfindungsgemäße Kombination in allen im Detail oben beschriebenen Ausführungsformen sein.

Das Zeolithfeingranulat ist bevorzugt ein Naturzeolithfeingranulat, das Klinoptilolith, Chabasit und/oder Mordenit enthält.

Der Zeolith wird nach Trocknung und Vorzerkleinerung fraktioniert. Die Blutstillung wird durch Naturzeolithfeingranulate mit einem Mikroporenraum mit einer mittleren Porengröße von 0,3 bis 0,5 nm erreicht. Es wurde gefunden, dass im Mikroporenraum dieser Mineralien bestimmte an der Blutgerinnung beteiligte Faktoren selektiv angereichert werden. Das führt zu einer Aktivierung der physiologischen Blutgerinnung, die zu einer den herkömmlichen Hämostyptika deutlich überlegenen Blutstillung führt. Von besonderem Vorteil ist dabei, dass keinerlei toxische Stoffe an die Wunde abgegeben werden. Ausgewählte Naturzeolithe können erfindungsgemäß so aufbereitet werden, dass sie nunmehr kostengünstig auf direktem Weg als blutstillende Mittel und Mittel zur Wundversorgung bereitgestellt werden können.

Verwendet wird die Fraktion mit Kornband 0,8 - 0,2 mm. Bezüglich Reinheit sind die Anforderungen nach US Pharmacop. bzw. Europ. Pharmacop. zu erfüllen. Eine schonende Dehydration erfolgt bevorzugt bei Temperaturen unter 200 °C durch Behandlung in Temperaturintervallen.

Die Dehydratation erfolgt bevorzugt nur teilweise, so dass bei der Aufnahme von Flüssigkeit, z.B. Blut, keine starke, das Gewebe schädigende exotherme Reaktion auftritt.

Bevorzugt ist das Zeolithfeingranulat also durch Vermahlen, insbesondere von Naturzeolith mit einem Anteil an Klinoptilolith, Chabasit und/oder Mordenit und Fraktionierung sowie schonende Teildehydratisierung bei Temperaturen < 200 °C vorbehandelt. Es wird ein Mineralfeingranulat mit starken elektrostatischen Feldern im Kristallgitter erhalten, das bevorzugt selbst schwere Blutungen innerhalb 1 min stoppen kann. Überraschenderweise hat sich herausgestellt, dass das erfindungsgemäße Produkt den am Markt befindlichen Produkten auf Basis mikroporosierter synthetischer Lithiumsilikate (EP 1176991 A1, WO 00/69480, US 6833486 B1), z. B. CERDAC, durch eine 5-10-fach höhere Kapillarkraftwirkung überlegen ist. In Folge der partiellen Dehydratisierung tritt keine exotherme Reaktion auf, die Gewebeschäden durch Verbrennung verursachen kann.

Da Gerinnungsfaktoren auf Grund der hohen Kapillarkraft wirkungsvoll konzentriert werden, ist Anwendung zur Blutstillung möglich. Die hohe Kapillarkraft ist auch für den Einsatz zur Wundversorgung, insbesondere zur Versorgung von schwer heilenden und bereits chronifizierten Wunden von besonderer Bedeutung. Besonders angezeigt ist der Einsatz bei Wunden mit einer Exsudation, d.h. einem Austritt von Blutbestandteilen an einer entzündeten Wunde. Oft ist eine Exsudation ein Anzeichen für eine Infektion an einer Verletzung. Die erfindungsgemäße erhaltene Mikroporenstruktur ermöglicht die Aufnahme von Wundexsudat,

dass bei „nässenden“ Wunden im Überschuss abgegeben wird. Gleichzeitig sorgt die Aufnahme des überschüssigen Exsudats für eine feuchte Atmosphäre über der Wunde, was für die Wundheilung von Bedeutung ist.

Bei der Anwendung auf der blutenden Wunde entsteht durch die Aktivierung des Fibrinsystems eine feste schorfähnliche Abdeckung, die die Wunde zuverlässig vor bakterieller Infektion schützt. Diese Abdeckung wird im Laufe der Wundheilung abgestoßen.

Das blutstillende Mittel kann ferner Biomasse aus aquatischen Organismen, z.B. Algen, enthalten. Völlig überraschend wurde gefunden, dass die Mineralstoffe mit der Porenweite 0,3 bis 0,5 nm im Verhältnis 1 : 10 bis 10 : 1 vorteilhafterweise mit der Biomasse aus aquatischen Organismen gemischt werden können. Insbesondere wählt man Mikroalgen mit antibakterieller Aktivität aus, lyophilisiert und mahlt deren Biomassen und mischt sie mit den Mineralstoffen (Zeolithen), so dass eine Keimbesiedlung behandelter Wunden verhindert wird. Vorzugsweise werden Mikroalgen mit einem Lipidanteil > 20 % und vielen ungesättigten Fettsäuren ausgewählt, da diese eine hohe antibakterielle Aktivität aufweisen und/oder Poly-N-Acetyl-Glucosamine enthalten. Weitere natürliche Inhaltsstoffe der Mikroalgen fördern die Zellproliferation und wirken entzündungshemmend und immunstimulierend. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden gefriergetrocknete Biomassen der Grünalge Chlamydomonas und/oder der Mikroalgen Spirulina und/oder Anabaena eingesetzt. In einer geeigneten Anwendungsform können die Feingranulate aus Naturzeolithen und Mikroalgenbiomasse auch zur Herstellung von Medizinprodukten eingesetzt werden, um stark infektiöse, nässende Wunden zu therapieren, die danach gegebenenfalls mit Gewebekleber verschlossen werden können.

Die in der erfindungsgemäßen Kombination enthaltenen blutstillenden Mittel können zusätzlich Collagen umfassen, auf einer

Collagenmatrix aufgebracht werden oder zur Fixierung von Collagen dienen.

Die Komponenten der Erfindung sowie weitere Zusatzstoffe können in unterschiedlichen Schichten auf eine Collagenmatrix aufgebracht werden. Die Biomasse der verwendeten aquatischen Organismen enthält Lipide, welche die Phagozytose unterstützten und so einer vollständige Resorption des Collagens parallel zur Wundheilung führen. Die Biomasse kann z.B. in Collagenhydrolysaten gelöst und/oder suspendiert werden und durch Lyophilisieren auf eine Collagenmatrix aufgebracht werden.

Es ist in einer weiteren Ausführungsform der Erfindung auch möglich, den Mineralstoff zur Blutstillung in einer Umhüllung z.B. auf Zellulosebasis oder auf textiler Basis oder auf Basis eines Collagenvlieses anzuwenden. Nach der Blutstillung kann der Mineralstoff in diesem Fall vollständig entfernt werden. Durch die Aktivierung des Fibrinsystems sind die Wundränder miteinander verklebt. Die Reißfestigkeit des Wundverschlusses ist aber geringer als bei herkömmlichen Fibrinklebern.

Um die Reißfestigkeit des Wundverschlusses zu erhöhen, wird in Kombination mit dem blutstillenden Mittel der oben beschriebene erfindungsgemäße Gewebekleber bereitgestellt, mit dem in einem zweiten erfindungsgemäßen Schritt die Wunde verklebt werden kann. Die erfinderischen Produkte ergeben in ihrer Gesamtwirkung einen besonderen Vorteil, der darin liegt, dass nunmehr Hämostyptika und Gewebekleber bereitgestellt werden können, die sich bei verschiedenen Anwendungen vorteilhaft ergänzen.

In einem Aspekt lehrt die vorliegende Erfindung die damit Verwendung der beschriebenen Kombination zur Herstellung eines Medizinprodukts. Das Medizinprodukt ist zur Versorgung blutender oder nässender Wunden geeignet. Diese Versorgung erfolgt durch

insbesondere durch Blutstillung und nachfolgendes Verkleben der Wundränder.

Durch die Mineralstoffkomponenten wird dabei ein blutfreies Operationsfeld geschaffen. Bei der Applikation des Wundklebers ist deshalb die Wunde gut einsehbar. Das ermöglicht die exakte lokale Zuordnung der Wundränder. Durch die Aktivierung des Fibrinsystems sind die Wundränder miteinander verklebt. Die Gefahr, dass die für den Klebevorgang benötigten Komponenten des Klebers, etwa die Polyphenoloxidasen, durch die Blutung verdünnt oder weggeschwemmt werden, besteht nicht. Ebenso ist ausgeschlossen, dass durch einen starken Blutstrom Komponenten des Klebesystems weggespült werden und in anderen Geweberegionen zu Klebereaktionen führen. Die Thrombose-Gefahr, die beim herkömmlichen Fibrinkleber gegeben ist, wird drastisch vermindert. Die erfindungsgemäßen Kleber sind darüber hinaus weitaus leichter handhabbar. Besondere Anforderungen an die Lagerung wie bei tiefgekühlten Fibrinklebern bestehen nicht. Die Laccase kann z.B. in gelöster Form eingesetzt werden, dann ist eine Lagerung bei Kühlschranktemperatur ausreichend. Es ist auch möglich, die Laccase in Pulverform zu liefern und vor einer absehbaren Anwendung zu lösen. Die erfindungsgemäßen Kleber sind eine Alternative sowohl zur Elektrokoagulation als auch zum Wundverschluss mit Nadel und Faden.

Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

Beispiele

Beispiel 1: Herstellung der Naturzeolithfeingranulate

Selektiv abgebaute Mineralien mit $\geq 70\%$ Zeolithanteilen, vorzugsweise Klinoptilolith, Chabasit und Mordenit werden nach Trocknung und Vorzerkleinerung durch Fraktionierung mit Kornband 0,8 - 0,2 mm gewonnen. Bezüglich Reinheit sind die Anforderungen nach US Pharmacop. bzw. Europ. Pharmacop. zu erfüllen. Durch schonende thermische Behandlung in ausgewählten Temperaturintervallen bei Temperaturen $< 200\text{ }^{\circ}\text{C}$ erfolgt eine Teildehydratisierung unter Erhalt der Kristallgitterstruktur.

Beispiel 2: Prüfung des Mikroporenvolumens und der Korngrößenverteilung

Die nach Beispiel 1 hergestellten Produkte verfügen über 25 - 50% Mikroporenraum (bezogen auf das Gesamtvolumen) und durchschnittliche Nanoporendurchmesser im Bereich 0,3 - 0,5 nm.

Nanoporengröße und Feingranulataufbau ermöglichen eine maximale Blutadsorption und schnelle Durchdringung des Adsorberfeingranulates.

Die Kapillarkraftwirkung ist 5 bis 10fach höher als bei dem vergleichsweise untersuchten Handelspräparat CERDAC

Beispiel 3: Prüfung der Feingranulate auf Eignung zur Blutstillung

Methodik:

Es wurden 2 Feingranulate, hergestellt nach Beispiel 1, geprüft.

Die Untersuchungen erfolgten an der Rattenleber als einem Prototyp für ein stark durchblutetes Organ. Zu diesem Zweck wurden Ratten narkotisiert. Nach Öffnung des Bauchraums wurde mit dem

Skalpell ein etwa 1 cm langer Schnitt gemacht. Die Blutung wurde gefilmt. Die Zeit bis zur Blutstillung wurde gemessen.

Ergebnis:

Bei Anwendung der erfindungsgemäßen Granulate wird eine Blutstillung innerhalb von 1 min erreicht (Kontrolle ohne Behandlung bis zu 8 min). Es bildet sich eine schorfähnliche Verkrustung, die die Wunde schützt.

Beispiel 4: In vitro-Prüfung der Feingranulate auf Eignung zur Blutstillung

Bei Untersuchungen an verschiedenen Blutplasmen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

a) Normalplasma (mit Vorinkubation von 2 min)

	Normalplasma	Granulat 1	Granulat 2
Rekalzifizierungszeit	115 s	60 s	60 s
PTT nach 3 min Inkubation	-	15 s	sofort clot

Clot= Gerinnung

b) Mangelplasma

	Granulat 1	Granulat 2
F - VII MPI	Clot nach 5 min	Clot nach 210 s

Ohne Granulat erfolgte keine Gerinnung.

c) Heparinplasma (mit 2 und 3 min Vorinkubation)

	ohne Granulat	Granulat 1		Granulat 2	
		2 min	3 min	2 min	3 min

1.	68 s	46 s	43 s	65 s	28 s
2.	45 s	38 s	17 s	37 s	10 s

Die Ergebnisse belegen, dass das endogene Gerinnungssystem aktiviert wird, wobei der Mangelfaktor F - VII und Gewebefaktor zu verstärkter Trombin- und Fibrinbildung führen. Es erfolgt eine relative Fibrinkonzentrationserhöhung durch die mineralische Wundauflage nach Beispiel 1.

Beispiel 5: Prüfung von Extrakten aus Mikroalgen auf antibakterielle Wirksamkeit

Methodik:

Verschiedene Staphylokokken-Stämme wurden mittels Whitley Automatic Spiral-Plater im linearen Modus gleichmäßig auf der Agarplatte (Müller-Hinton-II-Agar Fertigplatten von Becton Dickinson) verteilt.

Acetatgewebe, wie es für die Herstellung von Wundauflagen verwendet wird, wird mit 2 mg Extrakt entsprechenden Menge Extraktlösung betropft und trocknen gelassen.

Zur Herstellung der Extrakte wurden gefriergetrocknete Biomassen der Grünalge Chlamydomonas, der Mikroalgen Spirulina (Blue Biotech Büsum) und Anabaena (Stammsammlung des Instituts für Pharmazie der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald) verwendet. Zur Extraktion mit n-Hexan wurde der Extraktor DIONEX ASE 200 genutzt. Die Extraktlösung wurde mittels Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel befreit.

Ergebnis:

Bei der Kontrolle werden 70- 120 Keime/cm² gezählt. Unter den beschichteten Wundauflagen lassen sich keine als Erreger von

Wundinfektionen gefürchteten Methicillin resistenten Staphylokokkus-ausreus-Stämme (MRSA) nachweisen. Bei anderen Staphylokokken war das Keimwachstum auf 10 bis 20 % der Ausgangskeimzahl reduziert.

Beispiel 6: Herstellung von Feingranulaten aus Naturzeolithen und der Biomasse von Mikroalgen

Den nach Beispiel 1 hergestellten Mineralfeingranulaten können Mikroalgenbiomassen mit einem Lipidanteil > 20 % im Verhältnis 1:10 bis 10:1 zugemischt werden. Hierdurch wird die Keimbesiedlung der Wunden verhindert.

Beispiel 7: Prüfung der Feingranulate auf Eignung zur Blutstillung und zum Wundverschluss

a) Methodik:

Es wurden 2 Feingranulate, hergestellt nach Beispiel 1, , geprüft.

Die Untersuchungen erfolgten an der Rattenleber als einem Prototyp für ein stark durchblutetes Organ. Zu diesem Zweck wurden Ratten narkotisiert. Nach Öffnung des Bauchraums wurde mit dem Skalpell ein etwa 1 cm langer Schnitt gemacht. Die Blutung wurde gefilmt. Die Zeit bis zur Blutstillung wurde gemessen. Der Wundverschluss wurde visuell beurteilt.

Ergebnis:

Bei Anwendung der erfindungsgemäßen Granulate wird eine Blutstillung innerhalb von 1 min erreicht (Kontrolle bis zu 8 min). Es bildet sich eine schorffähnliche Verkrustung, die die Wunde schützt.

b) In weiteren Versuchen, wurde die Verkrustung nach 1 min mit dem Skalpell entfernt.

Ergebnis:

Es wird eine nicht mehr blutende, oberflächlich geschlossene Wunde mit visuell gutem Wundverschluss erhalten. Der Wundverschluss ist bei Feingranulaten auf Mineralstoff/Algenbiomasse-Basis besser als bei der Verwendung der ausschließlich auf mineralischer Basis hergestellter Präparate.

c) In weiteren Versuchen wurden die Feingranulate durch ein Zellulosetuch von der Wunde getrennt.

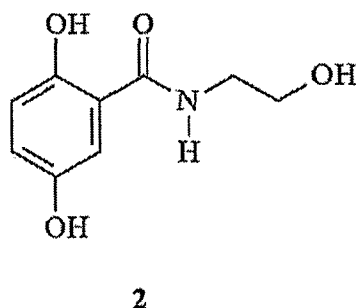
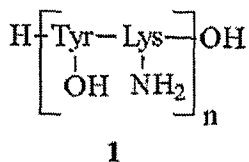
Ergebnis:

Auch unter diesen Bedingungen wird eine Blutstillung in weniger als einer Minute erreicht. Es entsteht ein sehr übersichtliches Operationsgebiet, so dass eine feste Verklebung der Wunde mit dem erfindungsgemäßen Gewebekleber problemlos erfolgen kann.

Beispiel 8. Herstellung der Kleberpräpolymere und Durchführung der Klebereaktion für die Weichgewebe- und Hartgewebeklebung

Der entwickelte Kleber resultiert aus einer Mischung der einzelnen Komponenten Oligopeptid **1** (Aminosäuresequenz aus sich wiederholenden Dipeptideinheiten von Tyrosin und Lysin mit $n = 5$ oder $n = 10$), Brückenmolekül **2** (2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid) und dem Enzym Laccase (Schema 5). Die Untersuchungen wurden in Phosphatpuffer durchgeführt.

Schema 5:



Die Klebewirkung erfolgt durch die enzymatische Reaktion der Laccase mit dem Brückenmolekül, das mit dem Oligopeptid verknüpft wird.

Es wurden folgende Mischungsverhältnisse eingesetzt:

[Tyr-Lys]_n, _{n=4-35}, 8,5 mM; 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid 12,5 mM; Enzym: 0,32 U (156 nmol ml⁻¹ min⁻¹). Der Lösungsmittelanteil an Methanol betrug 10% (v/v).

Beispiel 9: Prüfung der Festigkeit der Klebefuge

Zur Prüfung der Festigkeit der Klebefuge im Zugversuch mussten die zu untersuchenden Gewebeteile vorher fixiert werden. Porcines Weichgewebe wurde mit Cyanacrylatkleber an Probenhaltern aus Polymethylmethacrylat (PMMA) fixiert bzw. Knochenplatten aus Knochen bovinen Ursprungs wurden in mechanischen Klemmen eingespannt. Anschließend wurde die zu untersuchende Klebermischung (s. Bsp. 6) auf das Gewebe aufgetragen. Bei der Weichgewebeklebung wurde nach 10 Minuten die Festigkeit der Klebefuge unter Zugbeanspruchung an der Prüfmaschine Zwick BZ2.5/TN1S (Prüfgeschwindigkeit: 10 mm/min) ermittelt. Die mechanische Testung der Klebefuge nach Hartgewebeklebung erfolgte bei Zug-Scherbeanspruchung mit einer Prüfgeschwindigkeit von 5 mm/min.

Ergebnis: Es wird ein doppelt so starke Festigkeit erreicht wie bei den vergleichend untersuchten kommerziellen Fibrinklebern.

Beispiel 10: Diffusionshemmtest mit dem erfindungsgemäß dotierten Collagenvlies im Vergleich zu einem mit einem konventionellen Antibiotikum dotiertem Vlies.

Methodik:

Es wurde der Agardiffusionstest nach Burkhardt (Burkhardt, F. (Hrsg.) Mikrobiologische Diagnostik. Georg-Thieme Verlag Stuttgart, New York 1992, S 724) durchgeführt. Für 15 die Testung wurden Mueller-Hinton II-Agar in Stacker-Petrischalen (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, USA) eingesetzt. Als Teststamm wurden S. aureus Stamm ATCC 6538 ausgewählt. Die Einsaat dieses Teststamms wurde so gewählt, daß sich nach 1620 h Bebrütung dicht stehende, jedoch nicht konfluierende Einzelkolonien entwickeln. Nach dem Trocknen der beimpften Nährböden werden die dotierten Collagenvliese auf die Agaroberfläche aufgelegt. Nach 18 + 2 h Bebrütung bei 36 0 C werden die Hemmhöfe gemessen

Ergebnisse:

Dotierung	Hemmhof gegen S. aureus ATCC 6538	
	Gentamycin	Erfindungsgemäß dotiertes Vlies
15 %		30
20 %	24	36
30 %		38
40 %	38	

Das erfindungsgemäße Vlies weist folgende Vorteile auf:

- verbesserte antimikrobielle Wirksamkeit, auch bei multiresistenten Keimen

- sehr gute hämostyptische Wirkung
- gute Haftung auf der Wunde bei einfacher Applikation.

Beispiel 11: Prüfung von erfindungsgemäß mit Polyphenolen dotierten Oberflächen auf antibakterielle Wirksamkeit

Methodik:

Verschiedene Staphylokokken-Stämme wurden mittels Whitley Automatic Spiral-Plater im linearen Modus gleichmäßig auf der Agarplatte (Müller-Hinton-II-Agar Fertigplatten von Becton Dickinson) verteilt.

Polymere Biomaterialien (jeweils 1 cm²) werden nach Contrib. Plasma Phys. 41, 2001, 562-572 im Ammonik-Plasma funktionalisiert. Danach erfolgte die Umsetzung mit 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid (12,5 mM) unter dem Einfluss der Laccase (0,32 U (156 nmol ml⁻¹ min⁻¹). Der Lösungsmittelanteil an Methanol betrug 10% (v/v).

Nach dem Trocknen werden die Platten auf den Agar gelegt

Ergebnis:

Bei der Kontrolle werden 120 Keime/cm² gezählt. Unter den beschichteten Oberflächen lassen sich keine Keime nachweisen.

Beispiel 12: Verwendung der erfindungsgemäßen Kombination zur Versorgung blutender Wunden.

Methodik:

Ratten werden wie in Beispiel 7 narkotisiert, der Bauchraum geöffnet und eine Schnitt in der Leber gesetzt. Die Blutung wird wie in Beispiel 7 c gestillt. Die sich bildende Kruste wird entfernt. Anschließend wird der Schnitt mit Wundkleber geklebt.

Dafür werden die in Beispiel 6 beschriebenen Oligopeptide in PBS (Phosphate Buffered Saline, 2,7 M NaCl, 54 mM KCl, 87 mM Na₂HPO₄, 30 mM KH₂PO₄, pH 7.4) aufgenommen und Laccase zugegeben (Komponente 1). 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid wird in PBS gelöst (Komponente 2). Es werden verschiedene Verhältnisse von Oligopeptid/2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid/Laccase getestet, z.B. 1/1/0,1; 1/2/0,5; 1/10/1) Die Menge an Lösungsmittel wird minimal gewählt, um eine möglichst konzentrierte Lösung der Komponenten zu erreichen. Die Komponenten werden in eine Zweikomponentenspritze mit Mischextruder vom Typ Mixpac (Mixpac Systems, Rotkreuz, Schweiz) gegeben und in den Wundspalt eingebracht.

Ergebnis: Bereits durch das Hämostyptikum erfolgt ein guter Wundverschluss. Der Kleber kann direkt in den resultierenden engen Spalt gegeben werden. Es resultiert eine sehr feste Verklebung der Wundränder.

Beispiel 13 Verklebung von Collagen

Methodik:

Collagenfolie (DOT GmbH) wurde auf einer ebenen Unterlage fixiert. Die Collagenfolie wurde in 8 Segmente (je 4 in zwei Reihen) unterteilt und der Kleber direkt auf der Folie (unter Ausnutzung der Oberflächenspannung) zusammengemischt. Der Kleber war in Phosphat-Citrat-Puffer gelöst. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen Brückenmoleküls (Laccase-Substrat) getestet. Das Kleberprotein hatte ein MW von ca. 4000D). Anschließend wurden kleine Collagenfolienstücke aufgebracht, leicht angedrückt und trocknen gelassen.

Ergebnis:

Es wurde beim Verkleben von Collagen eine feste Bindung erreicht. Die Verklebung erfolgt auch ohne Zugabe von Kleberproteinen. Durch die Kleberproteine wird jedoch die Bindungskraft verstärkt.

Beispiel 14 Mischung einer Collagenlösung mit dem Kleber

Mikroskopisch ist nach dem Vermischen der Collagenlösung mit dem Kleber eine starke Strukturierung zu erkennen. Die gelösten und zufällig angeordneten Collagenmoleküle werden parallelisiert - unter Ausbildung von Fasern.

Beispiel 15 Verkleben von Collagen und Polystyren

Methodik:

Ein Tropfen (20µl) Citrat-Phosphat-Puffer (Kontrolle) bzw. Kleberlösung (Puffer, Laccase, Laccase-Substrat) wurde auf die Oberfläche einer 60mm TCPS-Zellkulturschale aufgebracht und je ein kleines Stück Collagenfolie (8x4mm) aufgesetzt und leicht angedrückt und dann trocknen gelassen.

Ergebnis:

Trotz der absolut glatten und inerten Oberfläche wurde eine Verklebung erreicht. Das Collagen wurde dauerhaft mit dem Untergrund verbunden.

Beispiel 16

Zelladhäsion an den mit Collagen beladenen Oberflächen

Methodik:

Die Zelladhäsion wurde mit einer Fibroblasten-Zelllinie (FL-Zellen) untersucht.

Die Zelladhäsion erfolgte an 60 mm TCPS-Zellkulturschale, die nach Beispiel 15 mit Collagen beschichtet war. Nach Anfärbung der Zellen mit Kristallviolett erfolgte die Auswertung mit dem CellExplorer.

Ergebnis:

Die FL-Zellen werden stärker gebunden.

Beispiel 16: Beschichtung für kurzliegende percutane Katheter

Ein für kurzzeitig liegende Katheter vorgesehener Katheterschlauch aus Polyurethan, beispielsweise Polyetherurethan, wird in einem Mikrowellenplasma bei einem Druck von 0,1 mbar in Ammoniak bei einer Leistung von 500 W für 10 Sekunden plasmabehandelt. Die im Ergebnis entstandenen

2 % Aminogruppen an der Oberfläche werden mit 10 mmol 2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid unter dem Einfluss der Laccase (0,32 U ($156 \text{ nmol ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$)). umgesetzt. Der so behandelte Katheterschlauch wird als percutaner Abschnitt in Kathetersysteme eingebaut. Er bewirkt eine Verminderung der Infektionsgefahr.

Beispiel 17: Beschichtung für langliegende Implantate

Eine für ein langliegendes fest fixiertes Drug-delivery-System (beispielsweise zur lokalen Behandlung von Tumoren) vorgesehene dünne flexible Kanüle aus Polydimethylsiloxan wird in einem Argon-Mikrowellenplasma mit einer Zumischung von 1 % Ethyldiamin bei einem Druck von 0,5 mbar bei einer Leistung von 500 W für eine Minute plasmabehandelt. Dabei bildet sich ein vernetzter Film aus Ethyldiamin, der die Oberfläche überzieht und Aminogruppen enthält. Die Fixierung im Zielgewebe erfolgt durch Zugabe von einem Oligopeptid (Aminosäuresequenz aus sich wiederholenden Dipeptideinheiten von Tyrosin und Lysin mit $n = 5$ oder $n = 10$), einem Brückenmolekül (2,5-Dihydroxy-N-(2-hydroxyethyl)-benzamid) und dem Enzym Laccase 0,32 U

Das so eingefügte Drug-delivery-System ist langfristig präzise am Zielort fixiert.

Beispiel 18: Bindungsfähige Titerplattenbeschichtung

Titerplatten aus optisch-transparenten, inerten Kunststoffen, beispielsweise aus Polystyrol, Polycarbonat, zyklischen Olefin-Copolymer oder Polypropylen werden in einem Mikrowellenplasma bei einem Druck von 0,1 mbar in Ammoniak bei einer Leistung von 500 W für 10 Sekunden plasmabehandelt. Dabei erfolgt ein bindungsschemischer Aufbau auf Aminogruppen. Danach erfolgt die Zugabe der Polyphenole und der Lacase sowie der Funktionsmoleküle. Die so entstandene die Stereochemie wenig beeinflussende Oberfläche wird zur Anbindung von Funktionsmolekülen benutzt.

Patentansprüche

1. Kombination, umfassend
 - a) ein Polymer, das mindestens zwei Aminogruppen umfasst, und
 - b) einen substituierten Polyhydroxyaromaten, der kein Peptidbestandteil ist, und
 - c) eine Polyphenoloxidase.
2. Kombination nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Polymer ein Peptid ist.
3. Kombination nach den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Anteil an Polymerstrukturelementen oder Aminosäuren des Peptids, die eine Aminogruppe tragen, mindestens etwa 10% beträgt.
4. Kombination nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Aminogruppe Bestandteil einer Diaminosäure sind.
5. Kombination nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass Diaminosäure Lysin ist.
6. Kombination nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass das Peptid eine Länge von 10-1000 Aminosäuren aufweist.
7. Kombination nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Polyhydroxyaromat ausgewählt ist aus einer Gruppe umfassend einen monozyklischen Dihydroxyaromaten, einen bizyklischen Dihydroxyaromaten, einen polyzyklischen Dihydroxyaromaten, einen bizyklischen Trihydroxyaromaten oder einen polyzyklischen Trihydroxyaromaten.
8. Kombination nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass der substituierte Polyhydroxyaromat ein

Molekulargewicht von 110 - 1 100 g/mol aufweist.

9. Kombination nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der Polyhydroxyaromat 2,5-Dihydroxybenzamid ist.
10. Kombination nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Polyphenoloxidase Laccase ist.
11. Kombination nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere Komponenten der Kombination in einem oder mehreren Lösungsmitteln gelöst ist/sind.
12. Kombination nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Komponenten a und b getrennt voneinander vorliegen.
13. Medizinprodukt, umfassend die Kombination nach den Ansprüchen 1 bis 12.
14. Verfahren, dadurch gekennzeichnet, dass die Kunststoffoberfläche vor der Umsetzung mit der Kombination nach den Ansprüchen 1 bis 12 durch ein Plasmaverfahren mit Aminogruppen funktionalisiert wird.
15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Plasmaverfahren nicht schichtbildende Prozeßgase wie Ammoniak oder Mischungen aus Ammoniak und Wasserstoff verwendet.
16. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Plasmaverfahren Aminogruppen enthaltende, dampfförmige Substanzen zur Deposition bringt.
17. Produkte mit funktionalisierter Oberfläche, die durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 14 bis 16 erhalten wurden.
18. Verfahren zur Herstellung verbundener Polymere, dadurch gekennzeichnet, dass man die Komponenten der Kombination nach

den Ansprüchen 1 bis 12 oder des Medizinprodukts nach Anspruch 13 miteinander und/oder Produkte nach Anspruch 16 in Kontakt bringt.

19. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 14 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass man die Komponenten mit mindestens einem Aminogruppen tragenden oder mit Aminogruppen funktionalisierten Substrat in Kontakt bringt.
20. Verfahren zur Modifizierung von Oberflächen, dadurch gekennzeichnet, dass man das Verfahren nach Anspruch 18 durchführt und das Substrat eine Aminogruppen tragende oder mit Aminogruppen funktionalisierte Oberfläche ist.
21. Verfahren zur Herstellung von Diagnostika und/oder zur Immobilisierung von Proteinen, dadurch gekennzeichnet, dass man die Komponenten der Kombination nach den Ansprüchen 1 bis 12 oder des Medizinprodukts nach Anspruch 13 miteinander und mit mindestens zwei zu verbindenden Substraten in Kontakt bringt, wobei ein oder mehrere Substrate ausgewählt sind aus einer Gruppe, umfassend Peptide und/oder Proteine und/oder Aminogruppen enthaltende Reagenzien und/oder Zellen, und das andere Substrat eine Aminogruppen tragende oder mit Aminogruppen entsprechend wenigstem einem der Ansprüche 14 bis 17 funktionalisierte Oberfläche ist.
22. Verfahren nach wenigstem einem der Ansprüche 14 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Substrat ein Kunststoff mit einer Oberfläche mit einem Gehalt von mindestens etwa 2% freien Aminogruppen ist.
23. Verfahren zur Verhinderung von Biofilmen, dadurch gekennzeichnet, dass eine mit Polyphenolen modifizierte Oberfläche nach wenigstem einem der Ansprüche 14 bis 22 erzeugt wird

24. Verfahren zur Fixierung von drug delivery Systemen, dadurch gekennzeichnet, dass das eine mit Aminogruppen funktionalisierte Systemoberfläche nach wenigstem einem der Ansprüche 14 bis 22 erzeugt wird, die mittels der Kombination nach Anspruch 1 im Gewebe fixiert wird.
25. Verfahren nach den Ansprüchen 14 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass man es in einem wässrigen Milieu durchführt.
26. Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 14 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Substrate durch eine Vernetzung von Aminogruppen und/oder Hydroxylgruppen und/oder Mercaptogruppen der Peptide und der Substrate durch die Dihydroxyaromaten erfolgt.
27. Produkt, erhältlich durch das Verfahren nach wenigstens einem der Ansprüche 15 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens zwei Substrate durch Brückenmoleküle der Kombination nach den Ansprüchen 1-12 vernetzt sind.
28. Produkt mit einer modifizierten Oberfläche, erhältlich durch ein Verfahren nach den Ansprüchen 15-26, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche durch Brückenmoleküle der Kombination nach den Ansprüchen 1-12 modifiziert ist.
29. Produkt nach wenigstem einem der Ansprüche 17, 27 oder 28, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein medizinisches oder diagnostisches Produkt handelt, in dem Peptide und/oder Proteine und/oder Aminogruppen enthaltende Reagenzien und/oder Zellen an eine Oberfläche gebunden sind.

Fig. 1

1/1

Zelladhäsion

