



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 33 381 T2** 2007.11.29

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 169 069 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 33 381.7**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/09848**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 925 950.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/061204**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.04.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **19.10.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **09.01.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **14.02.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.11.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61L 27/38** (2006.01)
A61L 27/50 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

128838 P	12.04.1999	US
411585	01.10.1999	US

(73) Patentinhaber:

Theregen, Inc., San Francisco, Calif., US

(74) Vertreter:

derzeit kein Vertreter bestellt

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**NAUGHTON, K., Gail, Del Mar, CA 92014, US;
MANSBRIDGE, N., Jonathan, La Jolla, CA 92037,
US; PINNEY, E., Robert, Poway, CA 92064, US;
ZELTINGER, Joan, San Diego, CA 92122, US**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON DREIDIMENSIONALEM STROMALEN GEWEBE ZUR BEHANDLUNG VON ISCHEMISCHEN GEWEBE**

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**1. EINLEITUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von einem dreidimensionalen stromalen Gewebe zur Förderung der Angiogenese in ischämischem Herzgewebe. Die vorliegende Erfindung betrifft auch die Verwendung von einem dreidimensionalen stromalen Gewebe zur Förderung der Vaskularisierung in ischämischen Geweben.

2. ALLGEMEINER STAND DER TECHNIK

[0002] Die koronare Herzerkrankung ist die einzige führende Todesursache heute in Amerika (American Heart Association's "1999 Heart and Stroke Statistical Update"). Diese Erkrankung, wie mit verschiedenen anderen kardiovaskulären Erkrankungen, ist gekennzeichnet durch das Verengen der Arterien und ungenügenden Blutfluss zu kritischen Geweben.

[0003] Die gegenwärtig verwendeten klinischen Verfahren zur Verbesserung des Blutflusses in einem erkrankten oder anders geschädigten Herz beinhalten invasive chirurgische Techniken wie koronare Bypass-Operation, Angioplastie und Endarteriektomie. Solche Behandlungsmethoden schließen natürlicherweise in hohem Maße innewohnende Risiken während und nach der Operation ein und stellen oft nur ein vorübergehendes Hilfsmittel für die Herzsichämie bereit.

[0004] In dem Bemühen, die Prognose von chirurgischen Verfahren an dem Herzen zu verbessern, haben Ärzte und Forscher versucht, Pumpen zur Unterstützung des Blutflusses während der Operation zu verwenden. Solche Pumpen agieren nur als vorübergehende Unterstützungsvorrichtung während der Operation, sie können jedoch nicht als eine Form der Behandlung für Herzkrankheiten verwendet werden.

[0005] Eine Alternative, oder zumindest eine Empfehlung, zu dem koronaren Bypass und anderen chirurgischen Verfahren zum Verbessern des Blutflusses im Herzen, ist die Induktion von Gewebe im Herzen, um neue Blutgefäße zu bilden. In dieser Hinsicht sind angiogene Verbindungen wie vaskulärer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor (VEGF)) in dem Bemühen, die Bildung von neuen Blutgefäßen zu fördern, verwendet worden. Ein Ansatz, VEGF zur Förderung der Blutgefäßbildung in Herzgewebe einzusetzen, ist gewesen, das Protein direkt in den Körper eines Patienten zu injizieren. Solche Annäherungen sind jedoch weitestgehend erfolglos geblieben.

[0006] Kürzlich wurde ein Gentherapie-Ansatz verwendet, um VEGF durch Injektion von retroviralen Vektoren zu liefern, die auf das Herzgewebe gerichtet waren und die Produktion von VEGF nach sich ziehen (Losordo et al., 1998, Circulation 98:2800-2804). Dieses *in situ*-Verfahren verbesserte den Blutfluss und die subjektiven Symptome in Patienten, was darauf schließen lässt, dass die lokale Zufuhr von einem Wachstumsfaktor wie VEGF, um die Angiogenese in dem Herzgewebe zu fördern, von therapeutischem Wert in der Behandlung bestimmter Herzkrankheiten sein kann. Solche Gentherapietechniken, die retrovirale Vektoren nutzen, stellen jedoch bestimmte innewohnende Risiken und Sicherheitsbedenken dar. Zusätzlich repräsentieren Vorgehensweisen des Gentherapie-Typs eine Anzahl von ungelösten problematischen technischen Hürden wie geringe Transfektionsniveaus der Empfängerzellen, Instabilität der Konstrukte und Langzeit-Expression des gewünschten Genproduktes von den transfizierten Zellen.

3. KURZDARSTELLUNG DER ERFINDUNG

[0007] Gemäß einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird hier die Verwendung von einem dreidimensionalen stromalen Gewebe für die Herstellung eines Medikaments zum Fördern von Angiogenese in ischämischem Herzgewebe bereitgestellt, wobei das ischämische Herzgewebe mit einem dreidimensionalen stromalen Gewebe, umfassend Stromazellen und Bindegewebsproteine, die in natürlicher Weise durch die Stromazellen sekretiert werden, in Kontakt zu bringen ist und wobei die Zellen mit einem Gerüst, bestehend aus einem biologisch verträglichen, nicht-lebenden Material, das zu einer dreidimensionalen Struktur mit Zwischenräumen geformt ist, überbrückt durch die Stromazellen, verbunden sind und es im Wesentlichen einhüllen.

[0008] Gemäß einem zweiten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird hier die Verwendung von einem dreidimensionalen stromalen Gewebe für die Herstellung von einem Medikament für die Förderung der Vaskularisierung in ischämischem Gewebe bereitgestellt, wobei das ischämische Herzgewebe mit dem dreidimensionalen

nenalstromalen Gewebe in Kontakt zu bringen ist, das dreidimensionale stromale Gewebe Stromazellen und Bindegewebsproteine umfasst, die in natürlicher Weise durch die Stromazellen sekretiert werden, und die Zellen mit einem Gerüst verbunden sind und es einhüllen, das aus einem biologisch verträglichen, nicht-lebenden Material besteht, das zu einer dreidimensionalen Struktur geformt ist, die Zwischenräume aufweist, die durch die Stromazellen überbrückt sind.

[0009] Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Implantation oder das Anbringen von einem dreidimensionalen stromalen Gewebe, um die Endothelialisierung und die Angiogenese im Herzen und ähnlichen Geweben zu fördern.

[0010] Die Erfindung weist eine Auswahl von Anwendungen auf, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, der Förderung der Reparatur und der Regeneration von geschädigtem Herzmuskel, der Förderung der Vaskularisierung und des Heilens während der Herzoperation (z. B. Bypass-Operation oder Herzklappenersatz), der Förderung der Blutgefäßbildung an Anastomose-Stellen und der Förderung der Vaskularisierung und der Reparatur von geschädigtem Skelettmuskel, glattem Muskel oder Bindegewebe.

[0011] Die Erfindung basiert zum Teil auf der Entdeckung, dass dreidimensionale stromale Gewebekonstruktionen, wenn sie in das Wundbett von Patienten mit diabetischen Fußgeschwüren implantiert werden, fähig sind, die schnelle Endothelialisierung und Vaskularisierung zu induzieren, was in der Bildung neuer Kapillaren und in der verminderten Entzündung in dem verwundeten Gewebe resultiert.

[0012] Die dreidimensionalen stromalen Gewebeimplantate sekretieren eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, die bekannt sind kritisch für die Geweberegeneration und Angiogenese zu sein, am bemerkenswertesten der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor oder VEGF (Tabelle II). Die Anwendung von diesen Produkten auf andere geschädigte Gewebe, wie geschädigter Herzmuskel, sollte eine neue lokale Blutversorgung zu dem Bereich induzieren und das schnelle Remodelling des Gewebes unterstützen.

[0013] Ein dreidimensionales stromales Gewebeimplantat kann auch verwendet werden, um die Bildung von einem "natürlichen" Halsschlagader-Bypass zu fördern, um dadurch die Karotisendarteriektomie-Operation (die oft in einem Infarkt resultieren kann, verursacht durch den abwärts gerichteten Fluss von Partikeln, die während der Behandlungsmethode entfernt werden) zu unterstützen oder die Notwendigkeit dafür zu vermeiden.

4. KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0014] [Fig. 1A–Fig. 1D](#) Mikroskopische Aufnahmen, die durch technisch erzeugtes, stromales Gewebe induzierte Angiogenese in einer Chorioallantoion-Membran (CAM) des Huhns zeigen. [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) zeigen eine makroskopische Sicht, während [Fig. 1C](#) und [Fig. 1D](#) die Histologie zeigen. [Fig. 1A](#) zeigt das Gerüst alleine, [Fig. 1C](#) zeigt die nicht-lebensfähige Membran und [Fig. 1B](#) und [Fig. 1D](#) zeigen die mit dreidimensionalem stromalen Gewebe behandelte Membran.

[0015] [Fig. 2](#) Säulendiagramm, das die Wirkung von technisch erzeugtem stromalen Gewebe auf die Bildung von Kapillarblutgefäßen in einer Chorioallantoion-Membran des Huhns darstellt. Die Säulen repräsentieren die 95%-Konfidenzintervalle.

[0016] [Fig. 3](#) Säulendiagramm, das die durch technisch erzeugtes stromales Gewebe induzierte Blutgefäßbildung in einem Ratten-Aortenring-Assay darstellt.

[0017] [Fig. 4](#) Säulendiagramm, das die in vitro Proliferation von menschlichen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) anschließend an die Stimulation durch mit technisch erzeugtem stromalen Gewebe konditioniertem Medium darstellt.

[0018] [Fig. 5](#) Säulendiagramm, das die Stimulation der Motilität von Endothelzellen durch technisch erzeugtes stromales Gewebe darstellt.

[0019] [Fig. 6](#) Grafische Darstellungen, die die Stimulation der Chemotaxis von Endothelzellen durch technisch erzeugtes stromales Gewebe darstellen (die linke Seite zeigt die Standardkurve unter Verwendung von gereinigtem VEGF bei den angegebenen Konzentrationen).

[0020] [Fig. 7](#) Ergebnis der Durchflusszytometrie, das die Induktion von der Integrin $\alpha_v\beta_3$ -Expression auf En-

endothelzellen durch technisch erzeugtes stromales Gewebe darstellt.

[0021] [Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#) Mikroskopische Aufnahmen, die die Inhibierung der Apoptose der Endothelzellen darstellen, die auf "MATRIGEL" in der Anwesenheit von technisch erzeugtem stromalem Gewebe kultiviert wurden. Die Zellen wurden mit Low-Density-Lipoprotein und mit Sytox angefärbt, das die Kerne von apoptotischen Zellen anfärbt.

[0022] [Fig. 9A–Fig. 9D](#) Mikroskopische Aufnahmen von einem menschlichen diabetischen Geschwür, das die durch technisch erzeugtes stromales Gewebe stimulierte Vaskularisation von dem Wundbett, das Remodelling des Gewebes und eine Reduktion in der Entzündung zeigt. [Fig. 9A](#) und [Fig. 9C](#) zeigen das Wundbett vor der Behandlung, während [Fig. 9B](#) und [Fig. 9D](#) das Wundbett nach der Behandlung zeigen.

[0023] [Fig. 10](#) Repräsentative Echokardiogramme von Schweineherzen, aufgenommen vor (A & C) und 30 Tage nach dem Verschluss (B & D) von der unteren aufsteigenden Koronararterie. Unbehandelte scheinoperierte Kontrollen ([Fig. 10A](#) & [Fig. 10B](#)); mit dreidimensionalem stromalem Gewebe behandelte Tiere ([Fig. 10C](#) & [Fig. 10D](#)).

5. DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0024] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von einem dreidimensionalen stromalen Gewebe zur Förderung der Blutgefäßbildung in Geweben und Organen von einem Patienten, besonders von einem menschlichen Patienten. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Implantation oder die Befestigung von einem technisch erzeugten dreidimensionalen stromalen Gewebe, um die Endothelialisierung und Angiogenese in dem Herzen und ähnlichen Geweben zu fördern.

[0025] Die Erfindung weist eine Vielzahl von Anwendungen auf, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, der Förderung der Reparatur und der Regeneration von geschädigtem Herzmuskel, die Förderung der Vaskularisierung und des Heilens während der Herzoperation (z. B. Bypass-Operation oder Herzklappenersatz), der Förderung der Blutgefäßbildung an Anastomose-Stellen und der Förderung der Vaskularisierung und der Reparatur von geschädigtem Skelettmuskel, Bindegewebe oder anderen Geweben.

[0026] Die Erfindung basiert zum Teil auf der Entdeckung, dass dreidimensionale stromale Gewebe, wenn sie in das Wundbett von Patienten mit diabetischen Fußgeschwüren implantiert werden, fähig sind, die Endothelialisierung und Vaskularisierung zu induzieren, was in der Bildung neuer Kapillaren und in der verminderten Entzündung in dem verwundeten Gewebe resultiert.

[0027] Das dreidimensionale stromale Gewebe umfasst stromale Zellen, die auf einem dreidimensionalen Substrat oder Gerüst gewachsen sind. Die stromalen Zellen umfassen bevorzugt Fibroblasten mit oder ohne zusätzlich Zellen und/oder Elemente, die hierin nachfolgend vollständiger beschrieben werden. Die zusätzlichen Zellen können insbesondere glatte Muskelzellen, Herzmuskelzellen oder Skelettmuskelzellen umfassen. Die Fibroblasten und/oder anderen Zellen können fötalen oder erwachsenen Ursprungs sein und können aus zweckdienlichen Quellen wie Haut, Herzmuskel, glatter Muskel, Skelettmuskel, Leber, Bauchspeicheldrüse usw. erhalten werden. Solche Gewebe und/oder Organe können durch entsprechende Biopsie oder nach Autopsie erhalten werden. In der Tat können Leichenorgane verwendet werden, um eine großzügige Versorgung von stromalen Zellen und Elementen bereitzustellen.

[0028] Es ist zu verstehen, dass ein Fachmann die angiogene Aktivität von einer stromalen Gewebekultur durch die Einbindung von Zellen, die unterschiedliche Spiegel angiogener Faktoren freisetzen, kontrollieren kann. Zum Beispiel sind vaskuläre glatte Muskelzellen, bevorzugt glatte Muskelzellen der Aorta, bekannt, grundsätzlich mehr VEGF zu produzieren als menschliche Hautfibroblasten. Demzufolge kann jemand durch die Nutzung von glatten Muskelzellen der Aorta, anstatt von oder zusätzlich zu Fibroblasten, dreidimensionale stromale Gewebe mit erhöhter angiogener Aktivität kultivieren.

[0029] In einer wahlweisen Ausführungsform der Erfindung kann ein dreidimensionales stromales Gewebeimplantat verwendet werden, das genetisch manipuliert ist, um verbesserte Eigenschaften für die Induktion der Angiogenese aufzuweisen, um dadurch die Bildung von neuen Blutgefäßen im Herzen oder anderen Geweben zu fördern.

5.1 PRÄPARATION EINES DREIDIMENSIONALEN STROMALEN GEWEBES

[0030] Für die Anwendung von der vorliegenden Erfindung werden stromale Zellen auf ein dreidimensionales Gerüst geimpft und wachsen lassen, um ein stromales Gewebe zu entwickeln. Das dreidimensionale Stützgerüst kann aus einem beliebigen Material und/oder einer Form sein, das/die: (a) es den Zellen ermöglicht, daran anzuhafte(n) (oder verändert werden kann, um Zellen zu ermöglichen, daran anzuhafte(n)); und (b) es den Zellen ermöglicht, in mehr als einer Schicht daran zu wachsen.

[0031] Eine Anzahl von unterschiedlichen Materialien kann verwendet werden, um das Gerüst zu bilden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf Nylon (Polyamide), Dacron (Polyester), Polystyrol, Polypropylen, Polyacrylate, Polyvinyl-Verbindungen (z. B. Polyvinylchlorid; PVC), Polycarbonat, Polytetrafluorethylen (PTFE; TEFLON), Thermanox (TPX), Nitrocellulose, Baumwolle, Polyglycolsäure (PGA), Katgutfäden, Cellulose, Gelatine, Dextran usw. Jedes dieser Materialien kann zu einem Gitter verwoben werden, um das dreidimensionale Gerüst zu bilden. Bestimmte Materialien, wie Nylon, Polystyrol usw., sind schlechte Substrate für die zelluläre Anhaftung. Wenn diese Materialien für das dreidimensionale Stützgerüst verwendet werden, ist es empfehlenswert, das Gerüst vor der Beimpfung von stromalen Zellen vorzubehandeln, um die Anhaftung von den stromalen Zellen an das Gerüst zu erhöhen. Zum Beispiel können die Nylongitter mit 0,1 M Essigsäure behandelt werden und in Polylysin, fötalem Rinderserum und/oder Collagen inkubiert werden, um das Nylon zu beschichten. Polystyrol könnte auf die gleiche Weise unter Verwendung von Schwefelsäure behandelt werden.

[0032] Wenn das dreidimensionale stromale Gewebe direkt in vivo implantiert werden soll, kann es vorteilhaft sein, biologisch abbaubare Materialien wie PGA, Katgutfadenmaterial, Kollagen, Polymilchsäure oder Hyaluronsäure zu verwenden. Zum Beispiel können diese Materialien zu einem dreidimensionalen Gerüst wie ein Kollagenschwamm oder ein Kollagengel verwoben werden. Wo die Kulturen für längere Zeitspannen erhalten oder kryokonserviert werden sollen, mögen nicht-abbaubare Materialien wie Nylon, Dacron, Polystyrol, Polyacrylate, Polyvinyle, Teflone, Baumwolle usw. bevorzugt werden. Ein zweckdienliches Nylongitter, das in Übereinstimmung mit der Erfindung verwendet werden könnte, ist Nitex, ein Nylonfiltrationsgitter, das eine Durchschnittporengröße von 140 µm und einen mittleren Nylonfaserdurchmesser von 90 µm aufweist (#3 – 210/36, Tetko, Inc., N. Y.).

[0033] Die stromalen Zellen, umfassend Fibroblasten, mit oder ohne nachfolgend beschriebene andere Zellen und Elemente, werden auf das Gerüst geimpft. Diese stromalen Zellen können von Geweben oder Organen, wie Haut, Herz, Blutgefäßen, Skelettmuskel, Leber, Bauchspeicheldrüse usw. abstammen, die durch Biopsie (wo angebracht) oder nach Autopsie erhalten werden. In der Tat können Fibroblasten und andere stromale Zellen in größeren Mengen ziemlich bequem aus jedem zweckmäßigen Leichenorgan erhalten werden. Wie zuvor erklärt wurde, können fötale Fibroblasten verwendet werden, um ein „arttypisches“ dreidimensionales stromales Gewebe zu bilden, was das Wachstum von einer Vielzahl von unterschiedlichen Zellen und/oder Geweben unterstützen wird, die mit ihm in Kontakt kommen. Ein „spezifisches“ stromales Gewebe kann jedoch durch Beimpfen des dreidimensionalen Gerüsts mit stromalen Zellen hergestellt werden, die vom Herzen und/oder von einem bestimmten Einzelwesen abstammen, das später die Zellen und/oder die in Kultur gewachsenen Gewebe, in Übereinstimmung mit der dreidimensionalen Kultur der Erfindung, erhalten wird.

[0034] Die stromalen Zellen können leicht durch Zerteilen eines entsprechenden Organes oder Gewebes isoliert werden. Dies kann leicht unter Verwendung von Techniken, die den Fachleuten bekannt sind, bewerkstelligt werden. Zum Beispiel kann das Gewebe oder Organ mechanisch zerteilt werden und/oder mit Verdauungsenzymen und/oder mit Komplexbildnern behandelt werden, die die Verbindungen zwischen benachbarten Zellen schwächen und es so ermöglichen, das Gewebe ohne nennenswerte Zellschädigung in eine Suspension von einzelnen Zellen zu dispergieren. Die enzymatische Dissoziation kann bewerkstelligt werden durch Zerkleinern des Gewebes und Behandeln des zerkleinerten Gewebes mit irgendeiner Anzahl von Verdauungsenzymen, entweder alleine oder in Kombination. Diese beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, Trypsin, Chymotrypsin, Kollagenase, Elastase und/oder Hyaluronidase, DNase, Pronase, Dispace usw. Das mechanische Auseinanderreißen kann auch bewerkstelligt werden durch eine Anzahl von Methoden einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, der Verwendung von Mahlwerken, Mixern, Sieben, Homogenisatoren, Druckzellen oder von Ultraschallgeräten, um nur einige zu nennen. Für einen Übersichtsartikel der Gewebezerteilungs-Techniken siehe Freshney, Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique. 2. Auflage, A. R. Liss, Inc., New York, 1987, Kapitel 9, pp. 107–126.

[0035] Nachdem das Gewebe auf eine Suspension von einzelnen Zellen reduziert wurde, kann die Suspension in Unterpopulationen fraktioniert werden, von denen die Fibroblasten und/oder stromalen Zellen und/oder Elemente erhalten werden können. Dies kann auch unter Verwendung von Standardtechniken für die Zelltren-

nung bewerkstelligt werden, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, der Klonierung und Selektion von spezifischen Zelltypen, der selektiven Zerstörung von unerwünschten Zellen (negative Selektion), der Trennung basierend auf der unterschiedlichen Agglutinierbarkeit von Zellen in der gemischten Population, von Einfrier-Auftau-Verfahren, den unterschiedlichen Anhaftungseigenschaften der Zellen in der gemischten Population, der Filtration, der konventionellen und der zonalen Zentrifugation, der zentrifugalen Elutriation (Gegenstrom-Zentrifugation), der Trennung aufgrund der Schwerkraft, der Gegenstromverteilung, der Elektrophorese und der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung. Für einen Übersichtsartikel der Klonierungsauswahl- und Zelltrennungs-Techniken siehe Freshney, *Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Techniques*, 2. Auflage, A. R. Liss, Inc., New York, 1987, Kapitel 11 und 12, pp. 137–168.

[0036] Die Isolierung von stromalen Zellen kann, zum Beispiel, wie folgt ausgeführt werden: Frische Gewebeprobe werden sorgfältig in Hank's physiologischer Salzlösung (HBSS) gewaschen und zerkleinert, um das Serum zu entfernen. Das zerkleinerte Gewebe wird für 1–12 Stunden in einer frisch hergestellten Lösung eines dissoziierenden Enzyms wie Trypsin inkubiert. Nach einer derartigen Inkubation werden die dissoziierten Zellen suspendiert, durch Zentrifugation sedimentiert und auf Kulturschalen ausplattiert. Alle stromalen Zellen werden sich vor den anderen Zellen anheften, demzufolge können entsprechende stromale Zellen selektiv isoliert und wachsen gelassen werden. Die isolierten stromalen Zellen können dann bis zur Konfluenz wachsen gelassen werden, aus der konfluenten Kultur gelöst werden und damit das dreidimensionale Gerüst beimpft werden (U. S. Patentschrift Nr. 4,963,489; Naughton et al., 1987, *J. Med.* 18 (3 & 4): 219–250). Das Beimpfen des dreidimensionalen Gerüsts mit einer hohen Konzentration an stromalen Zellen, z. B. ungefähr 10^6 bis 5×10^7 Zellen/ml, wird in der Etablierung des dreidimensionalen Gewebes in kürzeren Zeitspannen resultieren.

[0037] Zusätzlich zu Fibroblasten können andere Zellen zur Bildung des dreidimensionalen stromalen Gewebes hinzugefügt werden, um das benötigte Langzeitwachstum in Kultur zu unterstützen. Zum Beispiel können andere Zellen, die in losem Bindegewebe gefunden werden, auf das dreidimensionale Gerüst zusammen mit, oder anstelle von, Fibroblasten geimpft werden. Solche Zellen beinhalten, aber sind nicht beschränkt auf Endothelzellen, Perizyten, Makrophagen, Monozyten, Adipozyten, glatte Muskelzellen, Herzmuskelzellen usw. Solche Zellen können in der Abwesenheit von Fibroblasten auf das dreidimensionale Gerüst geimpft werden. Diese stromalen Zellen können unter Verwendung von Methoden, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, wie solche vorhergehend diskutiert, leicht von den entsprechenden Geweben oder Organen wie Haut, Herz, Blutgefäßen usw. erlangt werden. In einer spezifischen Ausführungsform von der Erfindung werden Fibroblasten auf das Gerüst geimpft.

[0038] Es ist zu verstehen, dass ein Fachmann die angiogene Aktivität von einer stromalen Gewebekultur durch die Einbindung von Zellen, die unterschiedliche Spiegel angiogener Faktoren freisetzen, kontrollieren kann. Zum Beispiel sind vaskuläre glatte Muskelzellen, bevorzugt glatte Muskelzellen der Aorta, bekannt, grundsätzlich mehr VEGF zu produzieren als menschliche Hautfibroblasten. Demzufolge kann jemand durch die Nutzung von glatten Muskelzellen der Aorta, anstatt von oder zusätzlich zu Fibroblasten, dreidimensionale stromale Gewebe mit erhöhter angiogener Aktivität kultivieren.

[0039] Wo wiederum die kultivierten Zellen für die Transplantation oder in vivo Implantation verwendet werden sollen, ist es vorzuziehen, die stromalen Zellen von dem eigenen Gewebe des Patienten zu erhalten. Das Wachstum der Zellen in der Anwesenheit des dreidimensionalen Stützgerüsts kann weiterhin verbessert werden durch Hinzufügen zu oder durch Beschichten des Gerüsts mit Proteinen (z. B. Kollagene, Elastinfasern, Reticulinfasern), Glycoproteinen, Glycosaminoglycanen (z. B. Heparansulfat, Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Dermatan-sulfat, Keratan-sulfat usw.), einer zellulären Matrix und/oder anderen Materialien.

[0040] Nach dem Beimpfen durch die stromalen Zellen sollte das dreidimensionale Gerüst in einem entsprechenden Nährmedium inkubiert werden. Viele handelsübliche Medien wie RPMI 1640, Fisher's, Iscove's, McCoy's und dergleichen können für die Verwendung geeignet sein. Es ist wichtig, dass das dreidimensionale Gerüst in dem Medium während der Inkubationsperiode suspendiert werden kann, um die proliferative Aktivität zu maximieren. Zusätzlich sollte die Kultur periodisch „gefüttert“ werden, um die verbrauchten Medien zu entfernen, die freigesetzten Zellen auszuwaschen und frisches Medium hinzuzufügen. Während der Inkubationsperiode werden die stromalen Zellen linear entlang den Filamenten von dem dreidimensionalen Gerüst wachsen und sie dabei umhüllen, bevor sie beginnen, in die Öffnungen des Gerüsts hinein zu wachsen.

[0041] Die Öffnungen des Gerüsts sollten von einer entsprechenden Größe sein, um es den stromalen Zellen zu ermöglichen, sich über die Öffnungen zu erstrecken. Das Aufrechterhalten von aktiv wachsenden stromalen Zellen, die sich über das Gerüst erstrecken, verbessert die Produktion von Wachstumsfaktoren, die von den stromalen Zellen produziert werden und infolgedessen die Langzeitkulturen unterstützen. Zum Beispiel

können, wenn die Öffnungen zu klein sind, die stromalen Zellen schnell die Konfluenz erreichen, aber unfähig sein, sich leicht von dem Gitter zu entfernen; eingeschlossene Zellen können eine Kontaktinhibierung aufweisen und die Produktion von den entsprechenden Faktoren einstellen, die notwendig sind, um die Proliferation zu unterstützen und die Langzeitkulturen zu erhalten. Wenn die Öffnungen zu groß sind, können die stromalen Zellen unfähig sein, sich über die Öffnungen zu erstrecken; dies wird ebenfalls die Produktion von entsprechenden Faktoren der stromalen Zellen erniedrigen, die notwendig sind, um die Proliferation zu unterstützen und die Langzeitkulturen zu erhalten. Wenn ein Gittertyp des Gerüsts verwendet wird, wie hierin beispielhaft angeführt, ist gefunden worden, dass Öffnungen, die von etwa 140 µm bis etwa 220 µm reichen, befriedigend funktionieren werden. Andere Größen können jedoch, abhängig von der dreidimensionalen Struktur und der Komplexität des Gerüsts, ebenso gut funktionieren. In der Tat wird jede Form oder Struktur, die es den stromalen Zellen ermöglicht, sich auszudehnen und die Reproduktion fortzusetzen und für längere Zeitspannen zu wachsen, in Übereinstimmung mit der Erfindung funktionieren.

[0042] Die unterschiedlichen Anteile der verschiedenartigen Typen von Kollagen, die auf das Gerüst aufgetragen wurden, können das Wachstum der Zellen beeinflussen, die mit dem dreidimensionalen stromalen Gewebe in Kontakt kommen. Die Anteile der aufgetragenen Proteine der extrazellulären Matrix (ECM) können durch Auswählen von Fibroblasten, die den entsprechenden Kollagentyp produzieren, manipuliert oder verstärkt werden. Dies kann bewerkstelligt werden unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern eines entsprechenden Isotyps oder einer Subklasse, die fähig ist, Komplement zu aktivieren und die bestimmte Kollagentypen definieren. Diese Antikörper und das Komplement können verwendet werden, um die Fibroblasten negativ zu selektieren, die den gewünschten Kollagentyp exprimieren. Wahlweise kann das Stroma, das verwendet wurde, das Gerüst zu beimpfen, ein Gemisch von Zellen sein, die die entsprechenden gewünschten Kollagentypen synthetisieren. Die Verteilung und die Herkunft von den verschiedenartigen Kollagentypen ist in Tabelle I gezeigt.

TABELLE I: VERTEILUNGEN UND HERKUNFT VON VERSCHIEDENARTIGEN KOLLAGENTYPEN

Kollagen-Typ	Hauptsächliche Gewebeverteilung	Ursprungszellen
I	Lockeres und dichtes normales Bindegewebe; Kollagenfasern Faserknorpel	Fibroblasten und Retikularzellen; glatte Muskelzellen
	Knochen	Osteoblasten
	Dentin	Odontoblasten
II	Hyalin- und elastischer Knorpel	Chondrozyten
	Glaskörper des Auges	Retinazellen
III	Lockeres Bindegewebe; Retikularfasern	Fibroblasten und Retikularzellen
	Papillarschicht der Haut	
	Blutgefäße	Glatte Muskelzellen; Endothelzellen
IV	Basalmembranen	Epitheliale und endotheliale Zellen
	Linsenkapsel des Auges	Linsenfasern
	Fötale Membranen, Plazenta	
V	Basalmembranen	Fibroblasten
	Knochen	
	Glatte Muskel	Glatte Muskelzellen
VI	Bindegewebe	Fibroblasten
VII	Epitheliale Basalmembranen, Ankerfibrillen	Fibroblasten, Keratinocyten
VIII	Hornhaut	Hornhaut-Fibroblasten
IX	Knorpel	
X	Hypertropher Knorpel	
XI	Knorpel	
XII	Papillardermis	Fibroblasten
XIV, Undulin	Retikuläre Dermis	Fibroblasten
XVII	P170 bullöses Pemphigoid-Antigen	Keratinocyten

[0043] Demzufolge kann/können, da das hierin beschriebene dreidimensionale Kultursystem für das Wachsen von verschiedenen Zelltypen und Geweben geeignet ist und abhängig ist von dem zu kultivierenden Gewebe und dem gewünschten Kollagentyp, die entsprechende(n) stromale(n) Zelle(n) zum Beimpfen des dreidimensionalen Gerüsts ausgewählt werden.

[0044] Während der Inkubation von dem dreidimensionalen stromalen Träger können Zellen von dem Stützgerüst freigesetzt werden. Diese freigesetzten Zellen können sich an die Wände des Kulturgefäßes anheften, wo sie mit der Proliferation fortfahren können und eine konfluente Monoschicht bilden. Dies sollte verhindert oder auf ein Mindestmaß herabgesetzt werden, zum Beispiel durch Entfernen von den freigesetzten Zellen

während des Mediumwechsels oder durch Überführen des dreidimensionalen stromalen Gewebes in ein neues Kulturgefäß. Die Anwesenheit von einer konfluenten Monoschicht in dem Gefäß kann das Wachstum von Zellen in der dreidimensionalen Kultur „ausschalten“. Durch das Entfernen der konfluenten Monoschicht oder die Überführung von dem stromalen Gewebe in frisches Medium in einem neuen Gefäß wird die Proliferationsaktivität des dreidimensionalen Kultursystems wieder hergestellt. Ein solches Entfernen oder die Überführungen sollten in jeder Kultur durchgeführt werden, die eine stromale Monoschicht aufweist, die eine Konfluenz von 25 % überschreitet. Wahlweise könnte das Kultursystem bewegt werden, um das Anhaften der freigesetzten Zellen zu verhindern oder anstatt die Kulturen periodisch zu füttern, könnte das Kultursystem derart aufgebaut sein, dass frisches Medium kontinuierlich durch das System strömt. Die Durchflussgeschwindigkeit könnte angepasst werden, um sowohl die Proliferation innerhalb der dreidimensionalen Kultur zu maximieren, als auch das Auswaschen und Entfernen der aus der Kultur freigesetzten Zellen, sodass sie nicht an den Wänden von dem Gefäß anhaften und bis zur Konfluenz wachsen. Auf jeden Fall können die freigesetzten stromalen Zellen gesammelt und für eine zukünftige Verwendung kryokonserviert werden.

5.2 PRÄPARATION VON EINEM GENETISCH MANIPULIERTEN DREIDIMENSIONALEN STROMALEN GEWEBE

[0045] Genetisch manipuliertes dreidimensionales stromales Gewebe kann, wie in U. S. Patentschrift Nr. 5,785,964 beschrieben, hergestellt werden. Ein genetisch manipuliertes stromales Gewebe kann als ein Liefervehikel für eine anhaltende Freisetzung von angiogenen Faktoren in vivo dienen.

[0046] Die stromalen Zellen können manipuliert werden, um ein exogenes Genprodukt zu exprimieren. Die stromalen Zellen, die genetisch manipuliert werden können, beinhalten, sind aber nicht darauf beschränkt, Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Herzmuskelzellen, mesenchymale Stammzellen und andere Zellen, die in lockerem Bindegewebe gefunden wurden, wie Endothelzellen, Makrophagen, Monozyten, Adipozyten, Perizyten, in Knochenmark vorkommende Retikularzellen usw.

[0047] Die Zellen und die Gewebe können manipuliert werden, um ein Zielgenprodukt zu exprimieren, das eine große Vielfalt an Funktionen vermitteln kann, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, einer verstärkten Funktion von den genetisch manipulierten Zellen und Geweben zur Förderung der Angiogenese, wenn sie in vivo implantiert sind. Das Zielgenprodukt kann ein Peptid oder Protein sein, zum Beispiel ein Enzym, Hormon, Cytokin, ein regulatorisches Protein wie ein Transkriptionsfaktor oder DNA-bindendes Protein, ein Strukturprotein wie ein Zelloberflächenprotein oder das Zielgenprodukt kann eine Nukleinsäure sein wie ein Ribosom oder Antisensmolekül.

[0048] In einer bevorzugten Ausführungsform schließen die Zielgenprodukte, die verbesserte Eigenschaften für die genetisch manipulierten Zellen bereitstellen, Genprodukte ein, sind aber nicht darauf beschränkt, die das Zellwachstum verstärken, z. B. vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF), Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF), Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), Blutplättchen-abgeleiteter Wachstumsfaktor (PDGF), Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) und Transformierender Wachstumsfaktor (TGF). In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die Zellen und Gewebe genetisch manipuliert, um Zielgenprodukte zu exprimieren, die in der Immortalisation von Zellen resultieren, z. B. Onkogene oder Telomerase. In noch einer weiteren Ausführungsform können die Zellen manipuliert sein, um ein Suizidgen-Produkt nach Signalstoff, z. B. Thymidin-Kinase, zu exprimieren.

[0049] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die Zellen und Gewebe genetisch manipuliert, um Genprodukte zu exprimieren, die in vitro schützende Funktionen bereitstellen, wie Kryokonservierung und Anti-Austrocknungs-Eigenschaften, z. B. Trehalose (U. S. Patentschriften Nr. 4,891,319; 5,290,765; 5,693,788). Die Zellen und Gewebe der vorliegenden Erfindung können auch manipuliert werden, um Genprodukte zu exprimieren, die eine schützende Funktion in vivo bereitstellen, wie solche, welche die Zellen vor einer entzündlichen Reaktion schützen würden und die gegenüber der Abstoßung durch das Immunsystem des Wirtes schützen, wie HLA-Epitope, Haupthistokompatibilitäts-Epitope, Immunglobulin- und Rezeptor-Epitope, Epitope von zellulären Adhäsionsmolekülen, Cytokinen und Chemokinen.

[0050] Es gibt eine Anzahl von Wegen, auf denen die Zielgenprodukte manipuliert werden können, um durch die Zellen und Gewebe der vorliegenden Erfindung exprimiert zu werden. Die Zielgenprodukte können manipuliert sein, um konstitutiv exprimiert zu werden oder in einer gewebespezifischen oder stimulusspezifischen Art und Weise. In Übereinstimmung mit diesem Aspekt der Erfindung können die Nukleotidsequenzen, die die Zielgenprodukte kodieren, funktionsmäßig mit Promotor-Elementen verbunden sein, die konstitutiv aktiv sind, gewebespezifisch sind oder auf die Anwesenheit von einem spezifischen Stimulus hin induziert werden.

[0051] In einer spezifischen Ausführungsform sind die Nukleotidsequenzen, die die Zielgenprodukte exprimieren, funktionsmäßig mit regulatorischen Promotor-Elementen verbunden, die für die Scher- oder Radialbeanspruchung verantwortlich sind. In diesem besonderen Fall würde das Promotorelement angeschaltet werden durch vorbeiströmendes Blut (Scher-) sowie die radiale Beanspruchung, die induziert wird als ein Ergebnis des pulsierenden Blutflusses durch das Herz oder das Blutgefäß.

[0052] Beispiele von anderen regulatorischen Promotorelementen schließen Tetracyclin-responsive Elemente, Nikotin-responsive Elemente, Insulin-responsives Element, Glukose-responsive Elemente, Interferon-responsive Elemente, Glucocorticoid-responsive Elemente, Estrogen/Progesteron-responsive Elemente, Retinolsäure-responsive Elemente, virale Transaktivatoren, frühe oder späte Promotoren des SV40-Adenovirus, das lac-System, das trp-System, das TAC-System, das TRC-System, den Promotor für 3-Phosphoglycerat und die Promotoren der sauren Phosphatase ein. Zusätzlich könnten künstliche Responselemente konstruiert werden, zusammengesetzt aus Multimeren von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen und Hormon-responsiven Elementen, ähnlich zu der molekularen Architektur der natürlich vorkommenden Promotoren und Enhancer (z. B. siehe Herr, W & Clarke, J Cell (1986) 45 (3): 461–70). Solche künstlich zusammengesetzten regulatorischen Bereiche könnten vorgesehen sein, um auf jedes gewünschte Signal zu antworten und in besonderen Zelltypen exprimiert sein, abhängig von den ausgewählten Promotor/Enhancer-Bindungsstellen.

5.3 VERWENDUNGEN VON EINEM DREIDIMENSIONALEN STROMALEN GEWEBE ZUR FÖRDERUNG DER ANGIOGENESE

[0053] Das dreidimensionale stromale Gewebe der vorliegenden Erfindung kann in einer Vielzahl von Anwendungen verwendet werden, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, Förderung von der Reparatur und der Regeneration von geschädigtem Herzmuskel, Förderung der Vaskularisierung und des Heilens während der Herzoperation (z. B. Bypass-Operation oder Herzklappenersatz), Förderung der Blutgefäßbildung an Anastomose-Stellen und die Förderung der Vaskularisierung und der Reparatur von geschädigtem Skelettmuskel, glattem Muskel oder Bindegewebe. In diesem Zusammenhang kann das stromale Gewebe als ein frisch kultiviertes Gewebe, als ein kryokonserviertes Gewebe oder sogar als ein abgetötetes Gewebe verwendet werden.

[0054] Das dreidimensionale stromale Gewebe der vorliegenden Erfindung kann mit verschiedenartigen Stellen des Herzens verbunden werden, einschließlich dem Epikard, Myokard und Endokard, um die Angiogenese in dem Bereich der Verbindung zu fördern. Die Mittel zum Verbinden schließen ein, aber sind nicht darauf beschränkt, direktes Festhalten zwischen dem stromalen Gewebe und dem Herzgewebe, einen biologischen Klebstoff, einen synthetischen Klebstoff, Laserfarbstoffe oder Hydrogel. Eine Anzahl von handelsüblichen hämostatischen Wirkstoffen und Dichtungsmitteln schließen ein „SURGICAL“ (oxidierte Cellulose), „ACTIFOAM“ (Kollagen), „FIBRX“ (lichtaktiviertes Fibrin-Dichtungsmittel), „BOHEAL“ (Fibrin-Dichtungsmittel), „FIBROCAPS“ (Trockenpulver-Dichtungsmittel), Polysaccharid-Polymere p-GlcNAc („SYVEC“-Lappen, Marine Polymer Technologies), Polymer 27CK (Protein Polymer Tech.). Medizinische Vorrichtungen und Apparate zur Präparation von autologen Fibrin-Dichtungsmitteln aus 120 ml Patientenblut in dem Operationsraum in eineinhalb Stunden sind auch bekannt (z. B. Vivostat-System).

[0055] In einer Ausführungsform der Erfindung, die das direkte Anhaften verwendet, wird das dreidimensionale stromale Gewebe direkt auf das Herz oder ein angrenzendes Blutgefäß gelegt und das Produkt verbindet sich über eine natürliche zelluläre Verbindung. Dieses Verfahren ist in Studien der Wundheilung in Patienten mit diabetischen Fußgeschwüren demonstriert worden.

[0056] In einer bevorzugten Ausführungsform ist das dreidimensionale stromale Gewebe mit dem Herz oder einem angrenzenden Blutgefäß verbunden unter Verwendung eines chirurgischen Klebstoffes, vorzugsweise ein biologischer Klebstoff wie Fibrinklebstoff. Die Verwendung von Fibrinklebstoff als ein chirurgisches Adhäsionsmittel ist gut bekannt. Die Fibrinklebstoff-Zusammensetzungen sind bekannt (z. B. siehe U. S. Patentschriften Nr. 4,414,971; 4,627,879 und 5,290,552) und das erlangte Fibrin kann autolog sein (z. B. siehe U. S. Patentschrift Nr. 5,643,192). Die Klebstoffzusammensetzungen können auch zusätzliche Komponenten beinhalten, wie Liposomen, die einen oder mehr Wirkstoffe oder Arzneimittel enthalten (z. B. siehe U. S. Patentschriften Nr. 4,359,049 und 5,605,541) und über Injektion (z. B. siehe U. S. Patentschrift Nr. 4,874,368) oder durch Zerstäuben (z. B. siehe U. S. Patentschriften Nr. 5,368,563 und 5,759,171) aufgenommen werden. Ausstattung für die Anwendung der Zusammensetzungen des Fibrinklebstoffes sind auch erhältlich (z. B. siehe U. S. Patentschrift Nr. 5,318,524).

[0057] In einer weiteren Ausführungsform wird ein Laserfarbstoff auf die Herz- und/oder Blutgefäßwände, das dreidimensionale stromale Gewebe oder beide aufgetragen und unter Verwendung eines Lasers mit der ent-

sprechenden Wellenlänge aktiviert, um an die Gewebe zu haften. In bevorzugten Ausführungsformen weist der Laserfarbstoff eine Aktivierungsfrequenz in einem Bereich auf, die nicht die Gewebefunktion oder -Integrität verändert. Zum Beispiel geht 800-nm Licht durch Gewebe und rote Blutzellen hindurch. Unter Verwendung von Indocyan-Grün (ICG) als Laserfarbstoff können Laserwellenlängen verwendet werden, die durch das Gewebe hindurchgehen. Eine Lösung von 5 mg/ml ICG wird auf die Oberfläche von dem dreidimensionalen stromalen Gewebe (oder Zielstelle) gestrichen und das ICG bindet an das Kollagen von dem Gewebe. Ein 5-ms Puls von einem Laser-emittierten Licht mit einer Spitzenintensität nahe 800 nm wird verwendet, um den Laserfarbstoff zu aktivieren, was in der Denaturierung des Kollagens resultiert, wodurch das Elastin von dem angrenzenden Gewebe an die veränderte Oberfläche fixiert wird.

[0058] In einer weiteren Ausführungsform wird das dreidimensionale stromale Gewebe unter Verwendung eines Hydrogels mit dem Herzen oder den Blutgefäßen verbunden. Eine Anzahl von natürlichen und synthetischen polymeren Materialien sind ausreichend zur Bildung geeigneter Hydrogel-Zusammensetzungen. Zum Beispiel können Polysaccharide, z. B. Alginat, mit zweiwertigen Kationen vernetzt werden, Polyphosphazene und Polyacrylate werden ionisch oder durch Ultraviolett-Polymerisation vernetzt (U. S. Patentschrift Nr. 5,709,854). Wahlweise kann ein synthetischer chirurgischer Klebstoff wie 2-Octylcyanoacrylat ("DERMA-BOND", Ethicon, Inc., Somerville, NJ) verwendet werden, um das dreidimensionale stromale Gewebe zu verbinden.

[0059] In einer alternativen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird das dreidimensionale stromale Gewebe an dem Herzen oder einem Blutgefäß/Blutgefäßen unter Verwendung von einer oder mehr Nähten, einschließlich, aber nicht darauf beschränkt, 5-O, 6-O und 7-O Prolinnahmaterial (Ethicon Katalog Nr. 8713H, 8714H und 8701H) oder andere geeignete nicht biologisch abbaubare oder biologisch abbaubare Nahtmaterialien wie Polyglycapron, Polydioxanon oder Polyglactin. Wenn Nähte gelegt werden, werden normalerweise, obwohl nicht erforderlich, zweiarmige Nadeln verwendet.

[0060] In einer weiteren Ausführungsform wird das dreidimensionale stromale Gewebe in einem Bioreaktorsystem wachsen lassen (z. B. U. S. Patentschriften Nr. 5,763,267 und 5,843,766), in denen das Gerüst geringfügig größer ist als das fertige technisch erzeugte Gewebeprodukt. Das Endprodukt enthält einen Rand, eine Ecke, Lasche oder Zipfel von dem Stützgewebematerial, der/die als die Stelle zum Auftragen von dem biologischen/synthetischen Klebstoff, Laserfarbstoff oder Hydrogel verwendet wird. In alternativen Ausführungsformen kann die Stützgewebefixierung als eine Verbindung für das Einnähen oder mikrochirurgische Einnähen verwendet werden.

[0061] Das dreidimensionale stromale Gewebe kann implantiert werden, um die Vaskularisierung, die Reparatur oder die Regeneration von geschädigtem Herzmuskel zu fördern. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das dreidimensionale stromale Gewebe auf ein Blutgefäß aufgetragen, um neue Blutgefäße zum Umgehen von verstopften oder blockierten Arterien sich entwickeln zu lassen und den Blutstrom zum Herzen wieder herzustellen. In einer weiteren Ausführungsform wird das dreidimensionale stromale Gewebe unter Verwendung einer minimal-invasiven Behandlungsmethode direkt auf das Herz aufgetragen. Das Gewebe kann verwendet werden zur Förderung der Vaskularisierung und des Blutflusses, um die Nekrose von Herzgewebe nach einem Myokardinfarkt zu minimieren. Wenn ein dreidimensionales stromales Gewebe mit dem Epikard oder Myokard des Herzens verbunden wird, wird es notwendig sein, das Perikard (d. h. den Herzbeutel) vor der Anwendung zu öffnen. Das Verbinden eines dreidimensionalen stromalen Gewebestückes mit dem Endokard kann jedoch bewerkstelligt werden durch das Einsetzen eines Katheters oder einer ähnlichen Vorrichtung in eine Herzkammer und Verkleben oder Verbinden des stromalen Lappens mit der Wand der Herzkammer. Es ist zu bevorzugen, dass die Verbindungsstelle einen einigermaßen guten Blutfluss aufweisen sollte, um die Angiogenese zu unterstützen.

[0062] Die angiogene Aktivität von dem dreidimensionalen stromalen Gewebe kann auch für die Behandlung von Anastomosen verwendet werden. Eine Anastomose ist definiert als eine funktionsfähige Verbindung zwischen zwei hohlen oder tubulären Strukturen oder einer Öffnung, hervorgerufen durch Chirurgie, Verletzung oder Krankheit, zwischen zwei oder mehr getrennten Räumen oder Organen (siehe z. B. Stedman's Medical Dictionary, 26. Ausgabe, Williams & Wilkins, Baltimore, MD). Zum Beispiel entstehen anastomotische Lokalisationen aus der Einführung von einem vaskulären Transplantat während einer aortokoronaren Bypass-(CABG)Operation, während einer Darmresektion oder einer Organtransplantation. In CABG-Operationen wird das dreidimensionale stromale Gewebe an der Lokalisation der stromabwärts-gerichteten Verbindung des Bypass-Transplantates platziert, um die Angiogenese nach der Wiederherstellung des Blutflusses zu dieser Stelle zu fördern, d. h., um zusätzliche Arterien zu bilden, die aus den Verbindungsstellen hervorgehen, zusätzlich zu der Förderung der Heilung dieser Stelle. Beispiele auf dem vaskulären Gebiet beinhalten, sind aber nicht

darauf beschränkt, präkapillare (zwischen Arteriolen), Riolan's (Randarterie des Darmes, die die mittlere und linke Darmarterie verbindet), portal-systemische (superiore-mittlere/inferiore Rektalvenen; Portalvene – Vena cava inferior), termino-terminale (Arterie zu Vene) und cavopulmonale (Behandeln cyanotischer Herzerkrankung durch Legen einer Anastomose zwischen der rechten Lungenarterie und der Vena cava superior) Anastomosen.

[0063] In einer Ausführungsform wird das dreidimensionale stromale Gewebe um die anastomotische Lokalisation gewickelt, um das Heilen dieser Lokalisation zu fördern (d. h. Endothelialisierung). In einer weiteren Ausführungsform werden die Zellen von dem dreidimensionalen stromalen Gewebe abgetötet (z. B. durch Einfrieren und Auftauen) und das sich daraus ergebende Produkt auf die Lokalisation aufgetragen (d. h. „TRANSCYTE“).

6. BEISPIEL: DURCH DREIDIMENSIONALES STROMALES GEWEBE GEFÖRDERTE ANGIOGENESE

[0064] Dieser Abschnitt demonstriert, dass ein auf Fibroblasten basierendes dreidimensionales stromales Gewebe („stromales Gewebe“) in der Lage war, die Endothelialisierung und die Vaskularisierung zu induzieren. Es ist beobachtet worden, dass das Bereitstellen von solch einem biologischen Material die Bildung neuer Kapillaren induziert und die Entzündung in dem Wundbett von Patienten mit diabetischen Fußgeschwüren vermindert.

[0065] Die angiogenen Eigenschaften von dreidimensionalen stromalen Geweben sind nachfolgend unter Verwendung eines großen Bereiches an Techniken beschrieben, einschließlich des Hühner-Chorioallantois-membran-Assays, des Ratten-Aortenring-Assays, der Stimulation der Proliferation von Endothelzellen, der Chemokinese, der Chemotaxis, der Inhibierung der Apoptose und der in vivo Induktion der Angiogenese in ischämischem Herzgewebe. Zusammen überdecken diese Assays einen großen Bereich von den einzelnen Ereignissen in der Angiogenese sowie den gesamten Prozess.

[0066] Auch für das in der extrazellulären Matrix vorhandene Fibronektin ist gezeigt worden, dass es die Proliferation von Endothelzellen stimuliert, während für denaturiertes Kollagen nachgewiesen worden ist, dass es ein vielversprechendes Substrat für das Verbinden menschlicher Endothelzellen ist. In der Matrix gebundene Wachstumsfaktoren beinhalten TGF β und HGF, die bedeutend sind in der Stimulation der Bildung neuer Kapillaren und der Endothelialisierung. Die Matrix enthält auch Laminin-1, was zum Inhibieren der anfänglichen Hyperplasie über die YIGSR-Peptide dienen kann. Die Kombination von diesen Matrixproteinen zusammen mit natürlich freigesetzten Wachstumsfaktoren bietet eine physiologische Lösung für die Induktion der Angiogenese in vivo an.

6.1 MATERIAL UND METHODEN

6.1.1. EXPRESSION DER WACHSTUMSFAKTOREN DURCH DREIDIMENSIONALES STROMALES GEWEBE

[0067] Die Experimente wurden durchgeführt, um die Expression von angiogenen Faktoren durch die stromalen Gewebe zu untersuchen. Die Expression von Wachstumsfaktoren wurde untersucht sowohl durch die Abschätzung von mRNA durch Polymerasekettenreaktions-(PCR-)Methoden als auch der Abschätzung von dem freien Protein durch Enzym-gekoppelten Immunosorptions-Assay (ELISA).

[0068] Die spezifischen Boten-RNAs wurden mittels quantitativer RT-PCR abgeschätzt, unter Verwendung der ABI-TaqMan-Methode (Perkin-Elmer, Foster City, CA). Die RNA wurde aus den Zellen unter Verwendung eines RNA-Schnellreinigungskits (Amresco, Solon, OH) extrahiert. Die RNA wurde revers transkribiert unter Verwendung von Superscript II (Life Technologies, Grand Island, NY) mit hexameren Zufalls-Primern (Sigma, St. Louis, MO). Die Amplifikation der Proben der cDNA, die 200 ng Gesamt-RNA enthielten, wurde in Echtzeit nachgewiesen und mit der Amplifikation von aus Plasmiden erhaltenen Standards für spezifische mRNA-Sequenzen unter Verwendung einer Kopienanzahl über einen Bereich von 5 Größenordnungen mit 40–4.000.000/Reaktion verglichen. Für die Überprüfung der Reinigung und der Wirksamkeit der reversen Transkription wurden mRNA-Sequenzen für die PDGF B-Kette, VEGF oder TGF β 1 zu den RNA-Isolierungen hinzugefügt und ihre Ausbeute durch das TagMan-Verfahren gemessen. Die Kontrollsequenzen der mRNA wurden durch T7-RNA-Polymerase Transkription von Plasmiden erhalten, die die korrespondierende Sequenz enthalten. Die Werte wurden unter Verwendung von Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase als Kontrolle normalisiert.

6.12. HÜHNER-CHORIOALLANTOINMEMBRAN-ASSAY

[0069] Zehn Tage alte Hühnerembryonen wurden von McIntyre Farms (Lake, CA) erhalten und bei 37 °C inkubiert. Die Eier wurden mit einer Kerze ausgeleuchtet, um ein Zielgebiet, das frei von großen Blutgefäßen war, zu lokalisieren und zu markieren. Zwei kleine Löcher wurden mit einer Nadel in die Schale gemacht, direkt über dem Luftsack und über dem Zielgebiet. Eine Saugwirkung wurde an dem ersten Loch angelegt, was die CAM veranlasste, von dem markierten Bereich wegzugehen. Unter Verwendung eines „DREMEL MOTOR-WERKZEUGS“ wurde die Eierschale von dem Zielgebiet entfernt, um ein „Fenster“ zu bilden. Eine kreisförmige Probe mit 4-mm Durchmesser (dreidimensionales stromales Gewebe oder Kontrolle) wurde dann auf die Membran nahe von, aber nicht oben auf, einem großen Blutgefäß platziert. Das Loch wurde mit einem Stück klaren Klebestreifen bedeckt und die Eier wurden für 72 Stunden bei 37 °C inkubiert, um das Wachsen von Blutgefäßen zu ermöglichen. Die behandelte Sektion von der Membran wurde dann entfernt, fotografiert und in Methanol fixiert. Die Anzahl der Verzweigungspunkte von feinen Blutgefäßen in dem Bereich von der Probe wurde gezählt. Die Biopsie-Proben wurden in Methanol fixiert und Schnitte mit Massons's Trichrom angefärbt.

6.1.3. AORTENRING-ASSAY

[0070] In dem Aortenring-Assay wurde die Fähigkeit von der endothelialen Blutgefäßauskleidung, Mikrogefäße zu bilden, verwendet, um Angiogenese zu demonstrieren. Brusttaorten, die von 1 bis 2 Monate alten männlichen Sprague Dawley Ratten entfernt wurden, wurden in serum-freies MCDB131-Medium überführt. Das peri-aortische Faserfettgewebe wurde sorgfältig entfernt, die Aorten 8- bis 10-mal gewaschen und in 1 mm lange Stücke geschnitten. Es wurden Vertiefungen in ein 1,5 % Agarosegel gestanzt und mit gerinnender Fibrinogenlösung gefüllt (20 µL 50 NIH Einheiten/mL Rinderthrombin in 1 mL Fibrinogen). Die Aortenringe wurden in die Zentren von den Vertiefungen platziert. Nach der Gerinnung wurden die Schalen mit serum-freiem MCDB131 überschwemmt. Die Kulturen wurden bei 37 °C mit 5 % CO₂ inkubiert, mit Mediumwechseln alle 3 Tage. Die neu gebildeten Mikrogefäße wurden an den Tagen 3, 7 und 14 gezählt.

6.1.4. ENDOTHELZELL-PROLIFERATIONS-ASSAY

[0071] Die Proliferation der Endothelzellen ist eine kritische Komponente der Angiogenese. Die Fähigkeit von dem stromalen Gewebe, diese Aktivität zu stimulieren, wurde durch den Einbau von [³H]-Thymidin bestimmt. Verschiedenartige Wachstumsfaktoren und konzentrierte Mediumproben wurden auf ihren Einfluss auf die Proliferation von HUVEC untersucht. Die konfluenten Kulturen wurden abgelöst und in HUVEC-Wachstumsmedium auf eine Endkonzentration von $2,5 \times 10^4$ Zellen/ml resuspendiert. 24-Well-Platten wurden mit Attachment-Factor-Solution (Cell Applications, Inc.) vorbehandelt und die Zellen wurden als 1-ml Zellsuspension pro Vertiefung hinzugefügt. Es wurde den Zellen ermöglicht, sich abzusetzen und anzuhafte und dann wurde auf endotheliales serum-freies Medium (Cell Applications, Inc.), angereichert mit Fibroblastenkulturmedium oder Medium, konditioniert durch Monoschichten oder dreidimensionalen Fibroblastenkulturen, umgewechselt. An Tag zwei erhielten die Zellen frisches serumfreies Medium, entsprechend angereichert mit 1 µCurie/ml [³H]-Thymidin. An Tag drei wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und 250 µl 2,3 % Natrium-Dodecylsulfat (SDS) wurden hinzugefügt, um die Zellen zu solubilisieren. Nach 30 Minuten wurden der SDS-Extrakt und ein Milliliter von einem PBS-Waschschritt in ein Szintillationsgefäß überführt. Fünf Milliliter „SCINTIVERSE“ (Fair Lawn, NJ) wurden zu den Gefäßen hinzugefügt und die Radioaktivität unter Verwendung eines Beckman LS6500 Szintillationszählers (Fullerton, CA) bestimmt.

6.1.5. ENDOTHELZELL-CHEMOKINESE-ASSAY

[0072] Die Fähigkeit von unserem dreidimensionalen stromalen Gewebe, die Migration von Endothelzellen zu stimulieren, wurde auf zwei Arten getestet. Die erste war ein Chemokinese-Assay, der die Stimulation der Zellbewegung ohne irgendeine Richtungsdefinition bestimmte. Die zweite maß die Zellmigration in Richtung auf eine Stimulationsquelle.

[0073] Die Endothelzellen wurden auf Cytodex-2 Kügelchen wachsen lassen. Der Assay beurteilte die Dissoziation der Zellen von den Kügelchen und die Reassoziierung mit einer Kulturschale. Die Zellen auf der Schale wurden angefärbt und gezählt.

6.1.6. ENDOTHELZELL-CHEMOTAXIS-ASSAY

[0074] Die Zellmigration wurde mit einem Endothelzell-Chemotaxis-Assay unter Verwendung einer Neuro-Probe 48-Well Chemotaxis-Boydenkammer (Neuro-Probe, Inc.) untersucht. Die Polycarbonat-Membranfil-

ter (Poretics Corporation, 25 × 80 mm) wurden in 0,5 M Essigsäure über Nacht eingeweicht, dreimal für 1 Stunde mit Wasser gewaschen, in einer Lösung von 0,01 % Kalbshautgelatine Typ III (Sigma, St. Louis; MO) für 12–16 Stunden inkubiert und an der Luft getrocknet. Die HUVECs wurden abgelöst und in HUVEC-Wachstumsmedium bei einer Endkonzentration von $1,0 \times 10^5$ Zellen/ml resuspendiert. Die Boydenkammer wurde wie folgt zusammengebaut: 30 µl der Probe oder des Standards wurden in den unteren Vertiefungen hinzugefügt, die Gelatine-beschichtete Membran wurde darüber platziert und 50 µl Zellsuspension in die oberen Vertiefungen hinzugegeben. Die Kammer wurde bei 37 °C für 3 Stunden inkubiert. Die Membranen wurden dann sorgfältig von der Kammer entfernt und die Zellseite in PBS gespült und über ein Wischerblatt gezogen, um die nicht gewanderten Zellen zu entfernen. Die Membranen wurden mit Wright's Giemsa-Farbe angefärbt und entweder die Anzahl der Zellen gezählt oder die Dichte der Färbung gegen eine Standardkurve gemessen, die mit 20, 10, 5,0 und 0 ng/ml gereinigtem VEGF erstellt wurde.

6.1.7. INDUKTION VON INTEGRIN

[0075] Für das $\alpha v \beta 3$ -Integrin ist gezeigt worden, dass es eine wichtige Rolle in der Angiogenese spielt und neutralisierende Antikörper, die gegen das Integrin gerichtet sind, sind in der Lage, die Bildung von Kapillarblutgefäßen zu blockieren. Es ist durch VEGF induziert und es wird angenommen, dass es eine kritische Rolle in der Migration der Endothelzellen spielt.

[0076] Die Anwesenheit von Integrinen und Zelloberflächenrezeptoren wurde mittels Durchflusszytometrie an einem FACStar von Cytometry Research Services, San Diego, CA, bestimmt. Die Zellen wurden für die Analyse wie folgt vorbereitet: HUVECs wurden mit Trypsin abgelöst und die Zellen bei 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert. 250 µL bis 500 µL von den Zellsuspensionen wurden dreimal mit Hank's physiologischer Salzlösung (HBSS, GibcoBRL, Grand Island, New York) gewaschen und schließlich in 10 % FBS in Hank's physiologischer Salzlösung (HBSS) resuspendiert. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit primären Antikörpern, verdünnt auf 1 µg/ml in 10 % FBS in HBSS, inkubiert, dreimal mit HBSS gewaschen, für 30 Minuten mit Sekundärantikörper, verdünnt auf 1 µg/ml in 10 % FBS in HBSS, induziert, dreimal mit HBSS gewaschen und in 200 µL 10 % Formalin (Baxter, Deerfield, IL) bei einer Dichte von 10^6 Zellen/mL fixiert.

6.1.8. INHIBIERUNG DER ENDOTHELZELL-APOPTOSE

[0077] Es ist kürzlich berichtet worden, dass Endothelzellen, die als eine Monoschicht auf „MATRIGEL“, einem Basis-Membranwachstums-Substrat (Collaborative Research), zu Röhren verschmolzen und Apoptose erlitten. Die Zuführung von einem angiogenen Faktor, z. B. VEGF, zu dem „MATRIGEL“ hielt jedoch die Proliferation und die Morphologie der Endothelzellen aufrecht, was vermuten lässt, dass die angiogene Aktivität von VEGF die Apoptose inhibierte (z. B. siehe Goto et al., 1993, Lab Invest. 69: 508–517.; und Haralopoulos et al., 1994, Lab Invest. 71: 575–582).

[0078] Um weiterhin die angiogene Aktivität der dreidimensionalen stromalen Gewebe der vorliegenden Erfindung zu beweisen, wurde Wachstumsmedium, konditioniert durch ein dreidimensionales stromales Gewebe, zu Endothelzellen, die auf „MATRIGEL“ kultiviert wurden, hinzugefügt, um die Inhibierung von der Apoptose zu demonstrieren. Das „MATRIGEL“ wurde geschmolzen und in „TRANSWELL“ (Costar, Boston, MA) 6-Well Gewebekulturschalen gemäß den Anweisungen der Hersteller verfestigt. Dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (DMEC) wurden auf dem verfestigten „MATRIGEL“ bei $2,5 \times 10^5$ Zellen/Vertiefung ausgesät, in der Anwesenheit von Wachstumsmedium, das durch eine Monoschicht-Kultur von Fibroblasten oder durch eine dreidimensionale Fibroblastenkultur konditioniert war, und sie wurden bei 37 °C in einer 5 % CO₂ Atmosphäre wie kürzlich beschrieben inkubiert (z. B. siehe Kuzuya et al., 1994, J. Cell Physiol. 161: 267–276). Die DMEC-Zellen von jeder Kultur wurden durch Inkubieren der Kultur in einer Lösung aus 10 µg/ml Di-1-acetyl-Low-Density-Lipoprotein für 2–4 Stunden (z. B. siehe Voyta et al., 1984, J. Cell Biol. 99: 2034–2040) und einer Lösung von „SYTOX“, das die Zellkerne anfärbte (Molecular Probes, Eugene, OR), angefärbt.

6.1.9. BLUTFLUSSÄNDERUNGEN IN MENSCHLICHEN DIABETISCHEN FUSSGESCHWÜREN

[0079] Das kultivierte dreidimensionale stromale Gewebe stellt viele Komponenten der gesunden Haut bereit, die unentbehrlich für die Wundheilung sind, einschließlich wichtiger Mediatoren der Angiogenese wie VEGF und Transformierender Wachstumsfaktor- β (TGF β). Die Laser-Doppler-Bildgebung wurde verwendet, um die mikrovaskuläre Perfusion an der Basis von Fußgeschwüren zu studieren, die mit dreidimensionalem stromalem Gewebe behandelt wurden, um zu untersuchen, ob die Heilung dieser Verletzungen mit einer Zunahme im Blutfluss assoziiert war, was wiederum Angiogenese widerspiegeln könnte.

[0080] Sieben „full-thickness“-Geschwüre wurden an fünf Patienten mit Typ-2 Diabetes mellitus untersucht. Alle Verletzungen sind für mindestens drei Monate vorhanden gewesen, mit keinem klinischen Befund einer Infektion oder einer Änderung in der Größe über die letzten zwei Wochen, trotz konventioneller Behandlung. Das dreidimensionale stromale Gewebe wurde wöchentlich auf die Basis von jeder Wunde für insgesamt acht Wochen aufgetragen, wonach eine konventionelle Behandlung wieder aufgenommen wurde. Die mikrovaskuläre Durchblutung wurde unter Verwendung der Laser-Doppler-Bildgebung (Moore Instruments, Axminster, UK) unmittelbar vor und 2, 5 und 8 Wochen nach der Behandlung bewertet.

6.1.10. STIMULATION DER VASKULARISIERUNG IN EINEM EPIKARDIALEN IMPLANTATMODELL DER MAUS

6.1.10.1. TIERE

[0081] Die durch dreidimensionales stromales Gewebe stimulierte Vaskularisierung wurde in vivo unter Verwendung eines epikardialen Implantat-Modells der Severe-Combined-Immunodeficiency-(SCID-)Maus untersucht. Die Mäuse wurden in drei Gruppen unterteilt: lebensfähiges/kryokonserviertes dreidimensionales stromales Gewebeimplantat („lebensfähiger Stromallappen“), nicht-lebensfähiges dreidimensionales stromales Gewebeimplantat („nicht-lebensfähiger Stromallappen“) und Kontrolle/Scheinoperation. Jede Gruppe wies mindestens sechs Tiere pro Gruppe bei zwei getrennten Zeitpunkten (14 Tage und 30 Tage) auf. Die Tierstudie wurde in Übereinstimmung mit den anwendbaren Regeln der Bundesbehörde zur Überwachung von Nahrungs- und Arzneimitteln der Vereinigten Staaten von Amerika durchgeführt.

6.1.10.2. TIERHALTUNG

[0082] Von den SCID-Mäusen (University of Arizona, Tucson, AZ) wurden jeweils 2 pro Käfig in Mikro-Isolator-Käfigen auf Holzwohle gehalten und erhielten "TECH-LAD 4 % MOUSE/RAT DIET" und Leitungswasser nach Belieben. Die Mäuse wurden unter kontrollierten Temperaturen von 74 °F + 10 °F und einer Luftfeuchtigkeit von 50 % ± 20 % in Übereinstimmung mit dem NIH-Leitfaden „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" gehalten.

6.1.10.3. CHIRURGISCHE BEHANDLUNGSMETHODEN

[0083] Eine Vollnarkose wurde eingeleitet und durch eine intraperitoneale Injektion von 2,5 % Avertin aufrecht gehalten. Die Sterilität wurde aufrecht gehalten und eine wärmende Unterlage wurde während der ganzen Behandlungsmethode verwendet. Die Mäuse wurden gewogen und die Brustwand rasiert und vorbereitet. In der Rückenlage wurde ein Luftröhrenschnitt durchgeführt und die Mäuse unter Verwendung eines kleinen Beatmungsgerätes (Atemvolumen = 0,5 ml; Geschwindigkeit = 120–130 Atemzüge/Min.) beatmet. Eine ordnungsgemäße Intubation wurde durch die Beobachtung des Hebens und Senkens der Brust während der Atemzüge der Beatmung bestätigt.

[0084] Alle chirurgischen Behandlungsmethoden wurden unter Verwendung eines Operationsmikroskopes durchgeführt. Eine linksseitige Thorakotomie wurde durchgeführt und die Pectoralis-Muskelgruppe transversal abgetrennt, wodurch der Brustkorb bloßgelegt wurde. Der vierte Zwischenrippenraum wurde unter Verwendung von Scheren und stumpfer Präparierung eröffnet. Zwei 6-0 Seidenfäden (Ethicon) wurden um die oberen und unteren Rippen zum Zwückziehen platziert. Der Thymus wurde aufwärts zwückgezogen und die linke Lunge kollabierte unter Verwendung eines sterilen Ohrenstäbchens. Es wurde dann ein Druck an der rechten Brust angelegt, um das Herz in einer nach links gerichteten Richtung zu verschieben.

[0085] Um eine epikardiale/myokardiale ischämische Schädigung zu induzieren, wurde ein Koronarverschluss von der linken Koronararterie gerade unterhalb des linken Vorhofs durch einen thermischen Verschluss unter Verwendung von Standardmethoden, die den Fachleuten bekannt sind, durchgeführt. Der Verschluss resultiert in einem Bereich von nicht-lebensfähigem, ischämischen Gewebe, das hauptsächlich in der linken Herzkammer nahe der Herzspitze lokalisiert ist. Ein 4-mm lebensfähiger Stromallappen oder nicht-lebensfähiger Stromallappen wurde auf die Oberfläche von dem ischämischen epikardialen/myokardialen Gewebe von überlebenden Mäusen unter Verwendung einer einzelnen Naht aufgenäht. Für Kontrollmäuse wurde nur eine Naht an der Lokalisation der ischämischen Schädigung eingeführt. Auf die Implantation folgend wurden die Lungen unter Verwendung eines positiven Druckes bei Endausatmung wieder expandiert. Der Brustraum wurde in Schichten unter Verwendung von 6-0 Seide (Ethicon, Inc.) verschlossen und das Tier wurde schrittweise von dem Respirator entwöhnt. Sobald die spontane Atmung wieder hergestellt war, wurde der tracheale Tubus entfernt und der Hals verschlossen. Die Tiere verblieben in einer überwachten Einstellung, bis

sie vollständig bei Bewusstsein waren und der postoperative allgemeine Gesundheitszustand von jedem Tier wurde täglich bestimmt.

[0086] Vor der Explantation wurde ein Echokardiogramm durchgeführt, um die ventrikuläre Wandstärke zu messen und zu der vor dem Verschluss zu vergleichen. Nach 14 Tagen oder 30 Tagen wurden die Mäuse wiederum anästhetisiert und die dreidimensionalen stromalen Gewebelappen mit dem umgebenden Gewebe und Kontrollherzgewebe geerntet. Die Mäuse wurden nach der Ernte des Materials unter Verwendung einer Überdosis (150 mg/kg) Pentobarbital IP euthanasiert.

6.1.10.4 ANALYSEN

[0087] Die in vivo Bildung von neuen Blutgefäßen in mit Stromallappen behandelten Tieren und Kontrolltieren wurde unter Verwendung von drei getrennten Analysen untersucht: Gesamtmorphologie, Histologie und Histochemie.

[0088] Die Gesamtmorphologie von einem repräsentativen Herzen von jeder Gruppe wurde untersucht, um die Gewebelebensfähigkeit in dem ischämischen Bereich festzustellen. Die Gesamtmorphologie von dem Herzen wurde durch Injektion eines Herzens aus jeder Gruppe mit dem Farbstoff Tetrazolium-Rot (2,3,5-Triphe-nyltetrazolium-chlorid) (Sigma/Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) untersucht. Tetrazolium-Rot reagiert mit lebensfähigem Herzgewebe unter Erzeugung einer leuchtend roten Farbe. Im Gegensatz dazu reagiert nicht-lebensfähiges Gewebe nicht mit Tetrazolium-Rot und lässt nichtlebensfähiges Gewebe mit einer blassen weißen Farbe zurück. Die explantierten Herzen der Kontrollmäuse für 14 Tage und 30 Tage und von den mit Stromallappen behandelten Mäusen wiesen einen Bereich von nicht-lebensfähigem ischämischen Herzgewebe auf, der in erster Linie in der linken Herzkammer lokalisiert war, was aus dem induzierten Koronarverschluss/Myokardinfarkt resultierte. Die Bilder, die bei niedriger und hoher Auflösung gemacht wurden, ließen ein großes Gebiet von nicht-lebensfähigem Herzgewebe erkennen, wie durch die blasser weiße Farbe bewiesen wurde. In den Kontrolltieren war das ischämische Gebiet frei von sichtbaren Blutgefäßen.

[0089] Die von dem dreidimensionalen stromalen Gewebe abhängige Bildung von neuen Blutgefäßen wurde durch die histologische Analyse von Schnitten des behandelten und des Kontrollherzgewebes bestätigt. Für die histologische Analyse wurden die Stromallappen-Implantate und benachbartes Gewebe herausgeschnitten und in „HISTOCHOICE“ Fixativ (Amresco Inc., Solon, OH) platziert und für die Lichtmikroskopie prozessiert. Die stromalen Gewebelappen und das umgebende Gewebe wurden geschnitten, auf Objektträgern platziert und unter Verwendung von Hämatoxylin und Eosin (H & E) angefärbt. Die histologische Anfärbung unter Verwendung von H & E ist den Fachleuten gut bekannt (z. B. In Histology: A Text and Atlas. 3. Ausgabe (Ross et al., Editoren), pp. 1–7; Williams and Wilkins, Baltimore, MD) und Kits und Reagenzien sind leicht von gewerblichen Lieferanten (z. B. Sigma/Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO) erhältlich.

[0090] Zusätzlich wurde die von dem dreidimensionalen stromalen Gewebe abhängige Bildung von neuen Blutgefäßen unter Verwendung der Histochemie nachgewiesen, um spezifisch die Anwesenheit und Lokalisation von vaskulären Endothelzellen, die in den histologischen Schnitten vorhanden sind, zu identifizieren. Die Stromallappen-Implantate und umgebendes Gewebe wurden geschnitten, auf Objektträgern aufgezogen und histochemisch unter Verwendung von GS-1 angefärbt. GS-1 ist ein kommerziell erhältliches Lektin, das in erster Linie an die Oberfläche von Endothelzellen bindet (Sigma/Aldrich Chemical Co.).

6.1.11. STIMULATION DER VASKULARISIERUNG IN EINEM EPIKARDIALEN IMPLANTATMODELL DES SCHWEINES

[0091] Die in vitro Bildung von neuen Blutgefäßen und das Feststellen der ventrikulären Funktion in mit Stromallappen behandelten Schweinen und Kontrolltieren wurden mittels der Gesamtmorphologie-, der Histologie- und der Echokardiogramm-Analysen untersucht.

[0092] Die Koronarverschlüsse wurden in erwachsenen Zuchtschweinen durch Ligation des vierten bis fünften Verzweigungspunktes der linken aufsteigenden Koronararterie erzeugt (siehe z. B. Staubli et al., J. Cardiovasc. Pharmacol 6: 829–832 (1984); Galinanes et al., Eur. Surg. Res. 19: 246–253 (1987)). Unmittelbar nach dem Verschließen erhielten die behandelten Schweine ein einzelnes 2 cm × 2 cm großes Stück des dreidimensionalen stromalen Gewebeimplantats, das direkt auf den ischämischen Bereich von dem Epikard genäht wurde. Das dreidimensionale stromale Gewebe haftete leicht an dem Epikard des Schweineherzens an. Die unbehandelten Kontrollschweine (Scheinoperations-Behandlung) erhielten einen Koronarverschluss, aber erhielten nicht ein dreidimensionales stromales Gewebeimplantat.

[0093] Die Induktion des Myokardinfarktes wurde durch Elektrokardiografie bestätigt. Elektrokardiogramm-(EKG-)Aufzeichnungen von behandelten und unbehandelten Kontrolltieren wurden vor und nach dem Verschluss von der unteren aufsteigenden Koronararterie sowie 30 Tage nach dem Verschließen aufgenommen. Die Apparate und Verfahren für die Erzeugung von Elektrokardiogramm-Aufzeichnungen sind den Fachleuten gut bekannt.

[0094] Die ventrikuläre Funktion wurde über Echokardiografie festgestellt. Die Echokardiogramme wurden vor dem Verschließen und 30 Tage nach der Induktion des Myokard-Infarktes unter Verwendung von Standardmethoden aufgenommen (z. B. siehe Braunwald's Heart Disease: a textbook of cardiovascular medicine, 5. Ausgabe Vol. 1, Kapitel 3, pp. 53–107). Die Aufnahmen wurden erhalten unter Verwendung eines Acuson 128XP computergesteuerten Sonografie-Systems, das eine 7-MHz Sonde enthielt.

[0095] Nach 30 Tagen wurden die Schweine getötet und auf die Entwicklung neuer Blutgefäße durch klinische Visualisierung und histologische Anfärbung beurteilt.

6.2. ERGEBNISSE

6.2.1. DURCH DREIDIMENSIONALES STROMALES GEWEBE EXPRIMIERTER ANGIOGENE WACHSTUMSFAKTOREN

[0096] Das technisch erzeugte dreidimensionale stromale Gewebe sekretierte eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, von denen einige bekannt sind, eine wichtige Rolle in der Geweberegeneration und Angiogenese zu spielen. Die angiogenen Wachstumsfaktoren, die durch das Fibroblasten-basierte dreidimensionale stromale Gewebe exprimiert werden, sind in Tabelle II gezeigt. Die zellulären Konzentrationen der mRNA wurden nach einer 24-stündigen Erholung nach dem Auftauen bestimmt.

TABELLE II: DURCH DREIDIMENSIONALES STROMALES GEWEBE EXPRIMIERTE ANGIOGENE WACHSTUMSFAKTOREN

Wachstumsfaktor	Exprimiert, durch Q-RT-PCR	Sekretiert, durch ELISA	Potenzielle Bedeutung in der Wundheilung
VEGF	8 x 10 ⁶ Kopien/µg RNA	700 pg/10 ⁶ Zellen/Tag	Hauptsächlich 121 Aminosäure-Form
PDGF A-Kette	6 x 10 ⁵ Kopien/µg RNA	-	Autokrin, Umgebungssensor
PDGF B-Kette	0	0	Nicht gemacht
IGF-1	5 x 10 ⁵ Kopien/µg RNA		Co-Stimulator der Proliferation
EGF	3 x 10 ³ Kopien/µg RNA		Vernachlässigbar
HBEGF	2 x 10 ⁴ Kopien/µg RNA		
KGF	7 x 10 ⁴ Kopien/µg RNA		Benötigt möglicherweise Induktion durch IL-1
TGFβ ₁	6 x 10 ⁶ Kopien/µg RNA	300 pg/10 ⁶ Zellen/Tag	Hauptprodukt
TGFβ ₃	1 x 10 ⁴ Kopien/µg RNA		Nebenprodukt
HGF	2 x 10 ⁴ Kopien/µg RNA	1 ng/10 ⁶ Zellen/Tag	
IL-1α	1 x 10 ⁴ Kopien/µg RNA	Unterhalb Nachweis	Sehr geringe Produktion
IL-1β	0		Nicht produziert
TNFα	1 x 10 ⁷ Kopien/µg RNA		Substanzielle Expression
TNFβ	0		Nicht exprimiert
IL-6	7 x 10 ⁶ Kopien/µg RNA	500 pg/10 ⁶ Zellen/Tag	Potenziell bedeutend
IL-8	1 x 10 ⁷ Kopien/µg RNA	25 ng/10 ⁶ Zellen/Tag	Hauptprodukt
IL-12	0		Nicht exprimiert
IL-15	0		Nicht exprimiert
NGF	0		Nicht exprimiert
G-CSF	1 x 10 ⁴ Kopien/µg RNA	300 pg/10 ⁶ Zellen/Tag	Potenziell bedeutend
Angiopoietin-1	1 x 10 ⁴ Kopien/µg RNA		Möglicherweise vernachlässigbar

6.2.2. DURCH DREIDIMENSIONALES STROMALES GEWEBE STIMULIERTE ANGIOGENESE IN DER HÜHNER-CHORIOALLANTOINMEMBRAN UND RATTEN-AORTEN

[0097] Das dreidimensionale FBET induzierte in den CAM eine Blutgefäßentwicklung mit einem größeren Ausmaß als verglichen mit den Kontrollen ([Fig. 1A–D](#)), einschließlich sowohl der Entwicklung von feinen Kapillargefäßen als auch dem Beweis für eine verbesserte Permeabilität. Die Entwicklung von Kapillarblutgefäßen in den mit FBET behandelten CAM war auch deutlich durch die Histologie ersichtlich. Dieser Typ der Kapillargefäßentwicklung ist gekennzeichnet durch die VEGF-induzierte Angiogenese. Sie unterschied sich von dem, was mit der grundlegenden FGF-Stimulation zu sehen war, wo die Blutgefäße einen größeren Durchmesser mit einer geringen oder keiner Zunahme in der Permeabilität zeigten. Wenn die Anzahl der Blutgefäße pro

Probe in den CAM gezählt wurde, war dort ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Wirkungen des Gerüsts alleine und dem dreidimensionalen FBET ([Fig. 2](#)) vorhanden. Die angiogene Aktivität von dem dreidimensionalen stromalen Gewebe wurde mehr als 90 % durch die Vorinkubation mit einem neutralisierenden Anti-VEGF Antikörper vor der Platzierung auf dem CAM vermindert, darauf hinweisend, dass die VEGF-Produktion durch das FBET für sein angiogenen Aktivitäten wichtig war. Wenn Aortenringe von Brustorten der Ratte zusammen mit FBET kultiviert wurden, ergab sich eine signifikante Zunahme in der Anzahl der gebildeten Mikrobloodgefäße ([Fig. 3](#)). Es wird geglaubt, dass das FBET eine Kombination von angiogenen Faktoren in natürlich sekretierten Verhältnissen produziert, was eine synergistische Wirkung aufweisen kann.

6.2.3. DURCH DREIDIMENSIONALES STROMALES GEWEBE STIMULIERTE PROLIFERATION VON ENDOTHELZELLEN

[0098] Das durch dreidimensionales stromales Gewebe konditionierte Medium stimulierte die Proliferation menschlicher Endothelzellen, wie durch den in dem vorangehenden Abschnitt 6.1.4 beschriebenen [³H]-Thymidineinbau gemessen ([Fig. 4](#)). Die stimulatorischen Aktivitäten von dem Medium waren dosisabhängig.

6.2.4. DURCH DREIDIMENSIONALES STROMALES GEWEBE STIMULIERTE CHEMOKINESE VON ENDOTHELZELLEN

[0099] Wie in [Fig. 5](#) gezeigt, induzierte die Kultur von Endothelzellen zusammen mit dreidimensionalem stromalem Gewebe eine deutliche Zunahme in der Verlagerung der Zellen von den Kügelchen zu den Platten ($p = 0,0003$), was als ein Hinweis auf Chemokinese verwendet wurde. Diese stimulierende Aktivität von dem dreidimensionalen stromalen Gewebe wurde etwa zu 60 % durch einen neutralisierenden Anti-Hepatocyten-Wachstumsfaktor-(HGF-)Antikörper gehemmt, was darauf hinweist, dass HGF auch beteiligt war.

6.2.5. DURCH DREIDIMENSIONALES STROMALES GEWEBE STIMULIERTE CHEMOTAXIS VON ENDOTHELZELLEN

[0100] Das mit dem dreidimensionalen stromalen Gewebe konditionierte Medium stimulierte auch die Zellmigration in einer dosisabhängigen Weise ([Fig. 6](#)). In der Tat stimulierte das stromale Gewebe eine größere Chemotaxis verglichen mit VEGF, sogar bei 50 ng/L. Ein Anti-VEGF-Antikörper hemmte die Zellmigration, die durch das mit dem stromalen Gewebe konditionierte Medium induziert wurde, um 50 %.

6.2.6. DURCH DREIDIMENSIONALES STROMALES GEWEBE INDUZIERTES $\alpha_v\beta_3$ -INTEGRIN EXPRESSION

[0101] Die Anwesenheit von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin auf der Oberfläche von Endothelzellen wurde mittels Durchflusszytometrie nach der Behandlung mit durch dreidimensionales stromales Gewebe konditioniertem Medium analysiert. Die kultivierten HUVECs offenbarten eine beträchtliche Oberflächenexpression von $\alpha_v\beta_3$ -Integrin unter normalen Kulturbedingungen. Jedoch stimulierte das Medium, das durch stromales Gewebe konditioniert war, eine signifikante Zunahme in der Expression von diesem Integrin ([Fig. 7](#)).

6.2.7. DURCH DREIDIMENSIONALES STROMALES GEWEBE GEHEMMTE APOPTOSE VON MENSCHLICHEN MIKROVASKULÄREN HAUTZELLEN

[0102] Die menschlichen mikrovaskulären Hautzellen bilden Tubuli, wenn sie unter spezifischen Bedingungen wie in einem Kollagengel-Overlay oder auf „MATRIGEL“ untergebracht werden. Die Tubuli sind jedoch instabil und degenerieren durch Apoptose von den Zellen innerhalb von etwa 3 Tagen. Wenn sie jedoch zusammen mit dreidimensionalem stromalem Gewebe kultiviert wurden, setzten mikrovaskuläre Endothelzellen auf „MATRIGEL“ die Proliferation fort und die Apoptose wurde gehemmt ([Fig. 8A](#) und [Fig. 8B](#)).

[0103] Das konditionierte Medium, das von Monoschicht-Kulturen dermalen Fibroblasten erhalten wurde, zeigte keine Hemmung der Apoptose, wobei die Zellen Tubuli bildeten und Apoptose durchmachten ([Fig. 8A](#)). Im Gegensatz dazu hielt das konditionierte Medium, das von den dreidimensionalen Fibroblastenkulturen erhalten wurde, die zelluläre Proliferation und Morphologie aufrecht, ähnlich zu dem, was für die angiogenen Faktoren wie bFGF und VEGF beobachtet wurde ([Fig. 8B](#)). Die Ergebnisse demonstrieren zwei Merkmale: 1) das konditionierte Medium der dreidimensionalen Kulturen war in der Lage, die zelluläre Apoptose in dem „MATRIGEL“-Assay zu hemmen, ähnlich wie die Zugabe von angiogenen Faktoren; das dreidimensionale stromale Gewebe produzierte und sekretierte VEGF und HGF; und demzufolge wird vermutet, dass die Hemmung der Apoptose das Ergebnis der in das Medium sekretierten angiogenen Faktoren ist; und 2) dieselben Fibroblasten, die in Monoschichten gewachsen waren, erzeugten nicht solch einen Effekt, was demonstriert, dass

die dreidimensionalen Kulturbedingungen für die Aktivität verantwortlich waren (d. h. die Expression/Sekretion von angiogenen Faktoren war in einer Monoschicht aus Fibroblasten nicht vorhanden oder stark vermindert).

6.2.7. DURCH DREIDIMENSIONALES STROMALES GEWEBE STIMULIERTE VASKULARISIERUNG UND VERSTÄRKTER BLUTFLUSS IN MENSCHLICHEN DIABETISCHEN FUSSGESCHWÜREN

[0104] Der Blutfluss an der Basis von diabetischen Fußgeschwüren, die mit dreidimensionalem stromalem Gewebe behandelt waren, nahm signifikant über die acht Wochen der Behandlung zu, von 325 ± 184 (Mittelwert + Standardabweichung) auf einen Spitzenwert von 560 ± 344 willkürlichen Perfusionseinheiten ($P < 0,001$; ANOVA mit Wiederholungsmessungen). Fünf der Verletzungen waren während der zwölf Wochen geheilt und die anderen zwei waren merklich in ihrem Umfang verkleinert. Diese Änderungen im Blutfluss weisen auf Angiogenese in dem neu gebildeten Granulationsgewebe hin, die durch eine anhaltende und zweckmäßige Versorgung mit angiogenen Wachstumsfaktoren, die durch das dreidimensionale stromale Gewebe bereitgestellt werden, verstärkt wird.

[0105] Ähnlich zeigten mikroskopische Aufnahmen, die vor und nach der Behandlung mit stromalem Gewebe aufgenommen wurden, eine schnelle Vaskularisierung von dem Wundbett, ein Remodelling des verwundeten Gewebes und eine Verminderung der Entzündung, die auf die Behandlung folgen ([Fig. 9A–Fig. 9D](#)).

6.2.8. DURCH DREIDIMENSIONALES STROMALES GEWEBE STIMULIERTE VASKULARISIERUNG IN ISCHÄMISCHEM MÄUSEHERZ-GEWEBE

[0106] Die in vivo Bildung von neuen Blutgefäßen in mit Stromallappen behandelten Mäusen und Kontrolltieren wurde unter Verwendung von drei Typen der Analyse (Gesamtmorphologie, Histologie und Histochemie), wie in dem vorangehenden Abschnitt 6.1.10 beschrieben, untersucht.

6.2.8.1 GESAMTMORPHOLOGIE UND PATHOLOGISCHE ERGEBNISSE

[0107] Unter Bezug auf die implantierten Tiere demonstrieren die Daten, die von für 14 und 30 Tage mit Stromallappen implantierten Herzen erhalten wurden, dass lebensfähige und nicht-lebensfähige Stromallappen-Implantate gut in das native Herzgewebe an der Lokalisation der Implantation eingebaut wurden. Außerdem resultierte die Anwendung von einem lebensfähigen Stromallappen an der ischämischen Lokalisation in der visuell wahrnehmbaren Bildung einer Anzahl neuer Blutgefäße in dem ischämischen Gebiet, die nicht in unbehandelten Kontrolltieren beobachtet wurde. Zum Beispiel demonstrieren Aufnahmen, die unter Vergrößerung gemacht wurden, die Anwesenheit von zahlreichen Blutgefäßen in dem Gebiet der Implantation unter Verwendung eines lebensfähigen Stromallappen-Implantates. Die Bildung von neuen Blutgefäßen in dem Gebiet der Implantation wurde auch in den Herzen mit nichtlebensfähigen Stromallappen beobachtet. Die Anzahl der neu gebildeten Blutgefäße erschien jedoch nennenswert größer zu sein in den mit lebensfähigen Stromallappen behandelten Mäusen als in den mit nicht-lebensfähigen Stromallappen behandelten Tieren.

[0108] Die Beobachtungen der Gesamtmorphologie demonstrieren, dass ein dreidimensionales stromales Gewebe der augenblicklichen Erfindung in der Lage ist, die Angiogenese in Herzgewebe zu fördern.

6.2.8.2 HISTOLOGIE-ERGEBNISSE

[0109] Die lichtmikroskopischen Aufnahmen von Schnitten, die von normalen, unbehandelten SCID-Mäuseherzen erhalten wurden, veranschaulichen die Organisation von dem Myokard und dem äußersten Teil der Herzoberfläche, dem Epikard. Die Myokardschicht enthält Arteriolen, Kapillaren und kleine Venen. Verglichen mit normalen SCID-Mäusen resultierte die Induktion eines myokardialen Infarktes durch Koronarverschluss in einer dramatischen Abnahme in der Anzahl der nachweisbaren kleinen Venen, die in der epikardialen Schicht vorhanden sind.

[0110] Im Gegensatz dazu zeigten lichtmikroskopische Aufnahmen der Schnitte, die von mit Stromallappen behandelten Herzen erhalten wurden, zahlreiche neue Blutgefäße, die in der epikardialen Schicht gebildet wurden, und die Anwesenheit von Arteriolen, die im Myokard in der Nähe der epikardialen/myokardialen Übergangsstelle lokalisiert sind. Ähnlich zeigten Tiere, die mit nichtlebensfähigen Stromallappen behandelt wurden, das Vorhandensein von neuer Blutgefäßbildung in der epikardialen Schicht, aber zu einem weit geringeren Grad als die Herzen, die mit lebensfähigen Stromallappen behandelt wurden. Die histologischen Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen der Gesamtmorphologie, dass die dreidimensionalen stromalen Gewebe von der augenblicklichen Erfindung die Bildung von neuen Blutgefäßen fördern.

[0111] Die lichtmikroskopischen Aufnahmen von Herzschnitten, die mit Stromallappen behandelt wurden, offenbaren die Anwesenheit von vaskulären Endothelzellen, die Gefäße im Epikard, sowie kleine Venen und Arteriolen im Myokard auskleiden. Eine verminderte Anzahl an Mikrovaskularisierungen wurde in Herzen nachgewiesen, die mit nicht-lebensfähigen Stromallappen behandelt waren. Im Gegensatz dazu wurde eine geringe Anfärbung von mit Endothel ausgekleideten Gefäßen in dem Epikard von Kontrollherzen beobachtet. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass dreidimensionale stromale Gewebe der augenblicklichen Erfindung die Angiogenese in vivo stimulieren.

[0112] Die vorliegende Erfindung ist nicht in ihrem Umfang durch die beispielhaft angeführten Ausführungsformen zu beschränken, die als bildliche Darstellungen von einzelnen Aspekten der Erfindung beabsichtigt sind. In der Tat werden verschiedenartige Veränderungen der Erfindung zusätzlich zu solchen, die hierin gezeigt und beschrieben wurden, den Fachleuten aus der vorhergehenden Beschreibung und den begleitenden Zeichnungen offensichtlich werden. Für solche Veränderungen ist beabsichtigt, dass sie innerhalb des Bereiches der beigefügten Ansprüche fallen.

[0113] Alle hierin angeführten Veröffentlichungen sind durch Verweis in ihrer Gesamtheit eingeschlossen.

62.9 DURCH DREIDIMENSIONALES STROMALES GEWEBE STIMULIERTE VASKULARISIERUNG IN ISCHÄMISCHEM SCHWEINEHERZ-GEWEBE

[0114] Die in vivo Bildung von neuen Blutgefäßen und das Feststellen der ventrikulären Funktion in mit Stromallappen behandelten Schweinen und Kontrolltieren wurden durch die Gesamtmorphologie-, die Histologie- und die Echokardiogramm-Analysen, wie vorhergehend in Abschnitt 6.1.11 beschrieben, untersucht.

[0115] Das Verschließen von der linken aufsteigenden Koronararterie resultierte in einem Bereich mit ischämischem Herzgewebe, wie durch Elektrokardiografie demonstriert. In einem Elektrokardiogramm wird ein gemittelter Herzschlag analysiert, ob er einen oder mehr Parameter ausbildet. Die ST-Vektor-Magnitude (ST-VM) misst die Verschiebung von dem ST-Segment und ist gewöhnlich als ein Maß für die Ischämie im Myokard anerkannt. Die Änderung von der ST-Magnitude, verglichen mit dem anfänglichen Referenz-Herzschlag (wenn die Überwachung gestartet wurde) (STC-VM), wird auch kalkuliert. Die QRS-Vektordifferenz (QRS-VD) misst Änderungen in dem QRS-Komplex, verglichen mit dem anfänglichen EKG, und gibt die Änderung in der Morphologie von dem QRS-Komplex wieder, verglichen mit dem, wann die Überwachung gestartet wurde. Der QRS-VD Parameter ist mit dem Verlauf des myokardialen Infarktes in verschiedenen Studien verknüpft worden.

[0116] Die Elektrokardiogramm-Aufzeichnungen, die unmittelbar nach der Ligation der Arterie gemacht wurden, demonstrieren erhöhte ST-Segmente, die auf Bildung von einem myokardialen Infarkt hinweisen. Die EKG-Aufzeichnungen, die nach 30 Tagen an unbehandelten Kontrolltieren gemacht wurden, wiesen auch ein ähnliches ST-Segment auf, wohingegen das ST-Segment von behandelten Tieren nur leicht erhöht war.

[0117] Die Echokardiogramme, die von unbehandelten Kontrollschweinen erhalten wurden, wiesen nach 30 Tagen eine abgeschwächte ventrikuläre Funktion auf ([Fig. 10A](#) und [Fig. 10B](#)). Im Gegensatz dazu wiesen Echokardiogramme, die von Schweinen erhalten wurden, die mit einem dreidimensionalen stromalen Gewebe behandelt waren, eine ventrikuläre Funktion auf, die mehr den Echokardiogrammen ähnelte, die vor dem Koronarverschluss erhalten wurden (vergleiche [Fig. 10D](#) mit [Fig. 10A](#) und [Fig. 10C](#)). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass Schweineherzen, die mit einem dreidimensionalen stromalen Gewebe behandelt waren, eine bessere ventrikuläre Funktion nach 30 Tagen bewahrten, als unbehandelte Herzen.

[0118] Die Analyse der Gesamtmorphologie der herausgeschnittenen Herzen offenbarte, dass die behandelten Herzen weniger Verwachsungen an der Lokalisation der Implantate aufwiesen als unbehandelte scheinoperierte Kontrollen. Darüber hinaus lässt die Analyse von dicken Schnitten der herausgeschnittenen Herzen eine größere Anzahl an neuen Blutgefäßen in den behandelten Tieren erkennen als in den scheinoperierten Gruppen, was demonstriert, dass die Implantation von dem dreidimensionalen stromalen Gewebe auf das Epikard die Angiogenese in dem ischämischen Herzgewebe stimulierte.

Patentansprüche

1. Verwendung eines dreidimensionalen stromalen Gewebes für die Herstellung eines Medikaments zum

Fördern von Angiogenese in ischämischem Herzgewebe, wobei das ischämische Herzgewebe mit einem dreidimensionalen stromalen Gewebe, umfassend Stromazellen und Bindegewebsproteine, in natürlicher Weise sekretiert durch die Stromazellen, in Kontakt zu bringen ist, wobei die Zellen mit einem Gerüst, bestehend aus einem biologisch verträglichen, nichtlebenden Material, geformt zu einer dreidimensionalen Struktur mit Zwischenräumen, überbrückt durch die Stromazellen, verbunden sind und es im wesentlichen einhüllen.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Stromazellen Fibroblasten sind.
3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Stromazellen glatte Muskelzellen sind.
4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei die glatten Muskelzellen vaskuläre glatte Muskelzellen sind.
5. Verwendung nach Anspruch 4, wobei die vaskulären glatten Muskelzellen glatte Aortamuskelzellen sind.
6. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Stromazellen Herzmuskelzellen sind.
7. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Stromazellen eine Kombination von Fibroblasten und glatten Muskelzellen, Herzmuskelzellen, Endothelzellen, Perizyten, Makrophagen, Monozyten, Leukozyten, Plasmazellen, Mastzellen oder Adipozyten sind.
8. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Gerüst aus einem biologisch abbaubaren Material besteht.
9. Verwendung nach Anspruch 8, wobei das biologisch abbaubare Material Baumwolle, Polyglycolsäure, Katgutfäden, Cellulose, Gelatine, Kollagengeldextran ist.
10. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das Gerüst aus einem nicht biologisch abbaubaren Material besteht.
11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei das nicht biologisch abbaubare Material ein Polyamid, ein Polyester, ein Polystyrol, ein Polypropylen, ein Polyacrylat, ein Polyvinyl, ein Polycarbonat, ein Polytetrafluorethylen, eine Nitrocelluloseverbindung oder Baumwolle ist.
12. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei das Gerüst ein Gitter ist.
13. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das stromale Gewebe direkt aus einer frischen Kultur erhalten wird.
14. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das stromale Gewebe kryokonserviert worden ist.
15. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das stromale Gewebe am Herzen durch natürliche zelluläre Verbindung festzuhalten ist.
16. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das stromale Gewebe mit dem ischämischen Herzgewebe mittels eines biologisch abbaubaren oder nicht biologisch abbaubaren Fadens, eines biologischen Klebstoffes, eines synthetischen Klebstoffes, eines Laserfarbstoffes oder eines Hydrogels zu verbinden ist.
17. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das ischämische Gewebe aus dem Epicardium des Herzens ist.
18. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das ischämische Gewebe aus dem Myocardium des Herzens ist.
19. Verwendung nach Anspruch 1, wobei das ischämische Gewebe aus dem Endocardium des Herzens ist.
20. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Stromazellen mesenchymale Stammzellen sind.
21. Verwendung eines dreidimensionalen stromalen Gewebes für die Herstellung eines Medikaments für die Förderung der Vaskularisation in ischämischem Gewebe, wobei das ischämische Gewebe mit dem dreidimensionalen stromalen Gewebe in Kontakt zu bringen ist, wobei das stromale Gewebe Stromazellen und Bindegewebsproteine, in natürlicher Weise sekretiert durch die Stromazellen, umfasst, wobei die Zellen mit einem Gerüst, bestehend aus einem biologisch verträglichen, nichtlebenden Material, geformt zu einer dreidimensi-

onalen Struktur mit Zwischenräumen, überbrückt durch die Stromazellen, verbunden sind und es einhüllen.

22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei das ischämische Gewebe mindestens eines von Skelettmuskel, glattem Muskel, Bindegewebe oder Haut ist.

23. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die Stromazellen Fibroblasten sind.

24. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die Stromazellen glatte Muskelzellen sind.

25. Verwendung nach Anspruch 24, wobei die glatten Muskelzellen vaskuläre glatte Muskelzellen sind.

26. Verwendung nach Anspruch 25, wobei die vaskulären glatten Muskelzellen glatte Aortamuskelzellen sind.

27. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die Stromazellen Herzmuskelzellen sind.

28. Verwendung nach Anspruch 21, wobei die Stromazellen eine Kombination von Fibroblasten und glatten Muskelzellen, Herzmuskelzellen, Endothelzellen, Perizyten, Makrophagen, Monozyten, Leukozyten, Stromazellen, Mastzellen oder Adipozyten sind.

29. Verwendung nach Anspruch 21, wobei das stromale Gewebe mit dem ischämischen Herzgewebe mittels biologisch abbaubaren oder nicht biologisch abbaubaren Fadens, eines biologischen Klebstoffes, eines synthetischen Klebstoffes, Laserfarbstoffes oder eines Hydrogels zu verbinden ist.

30. Verwendung nach einem der Ansprüche 21 oder 22, wobei die Stromazellen mesenchymale Stammzellen sind.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



FIG.1A



FIG.1B

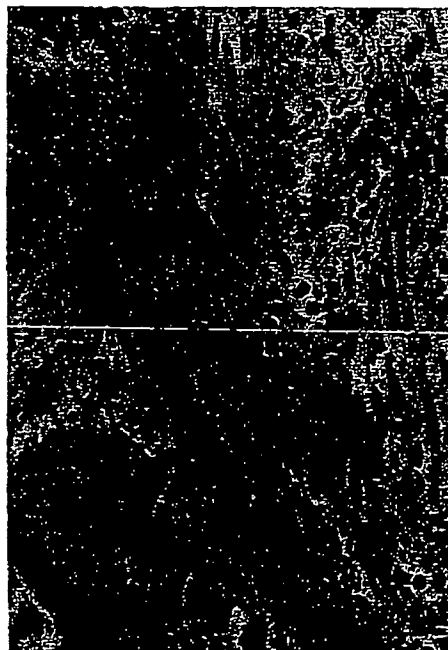


FIG.1C



FIG.1D

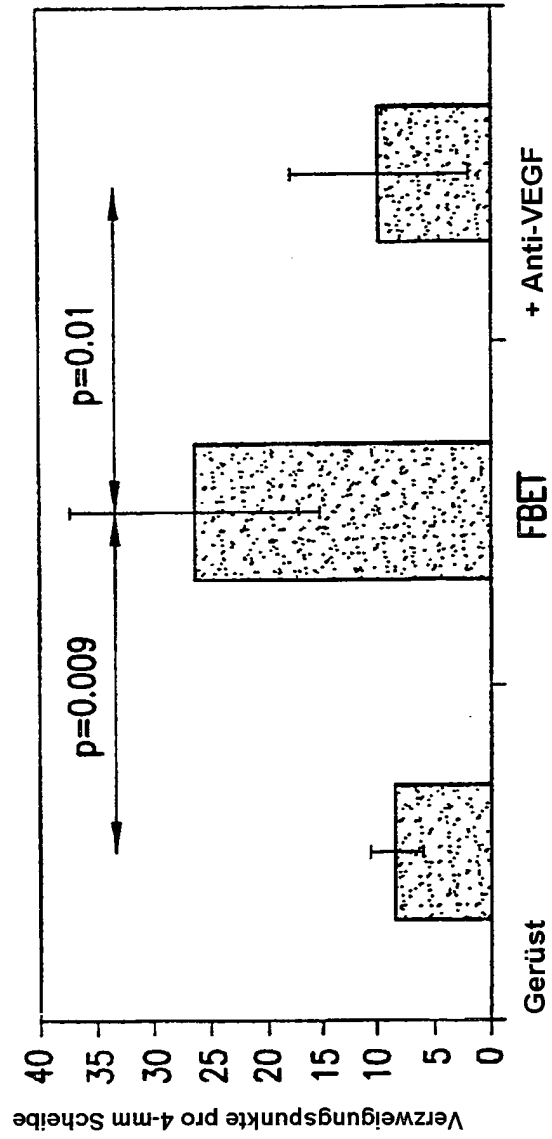


FIG.2

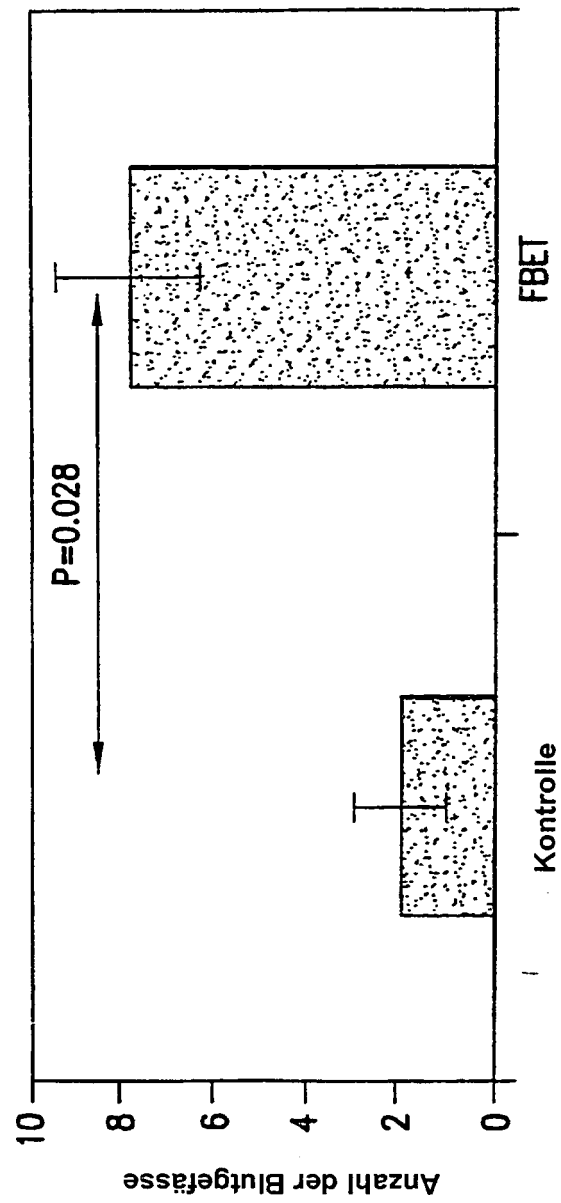


FIG.3

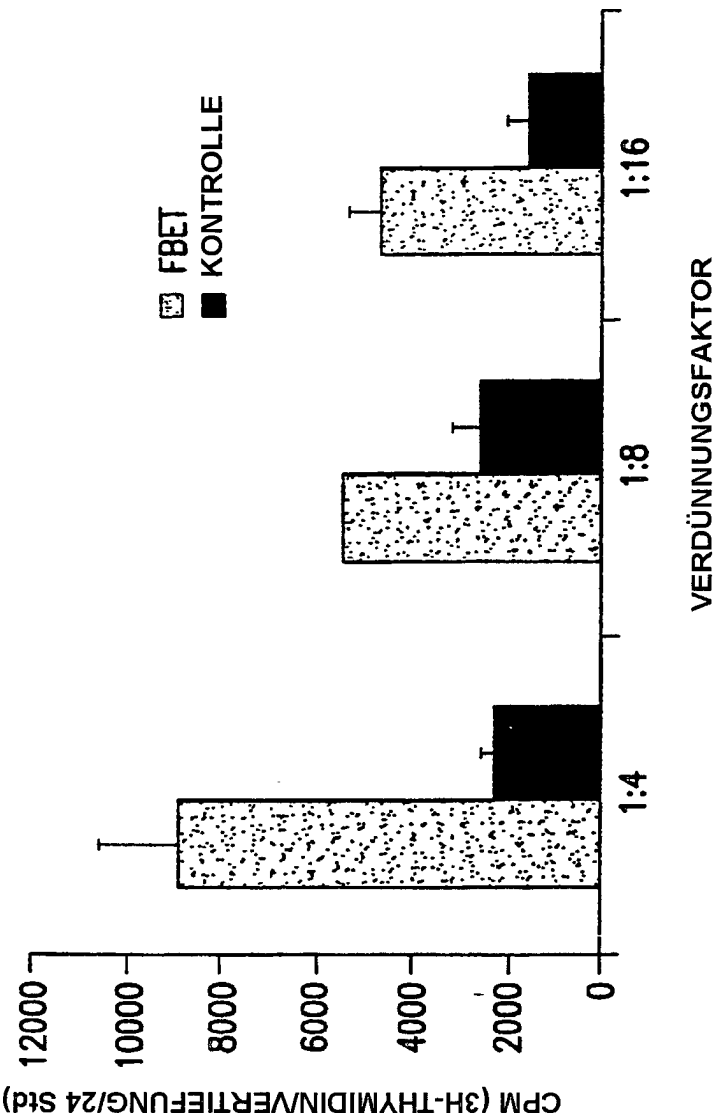


FIG.4

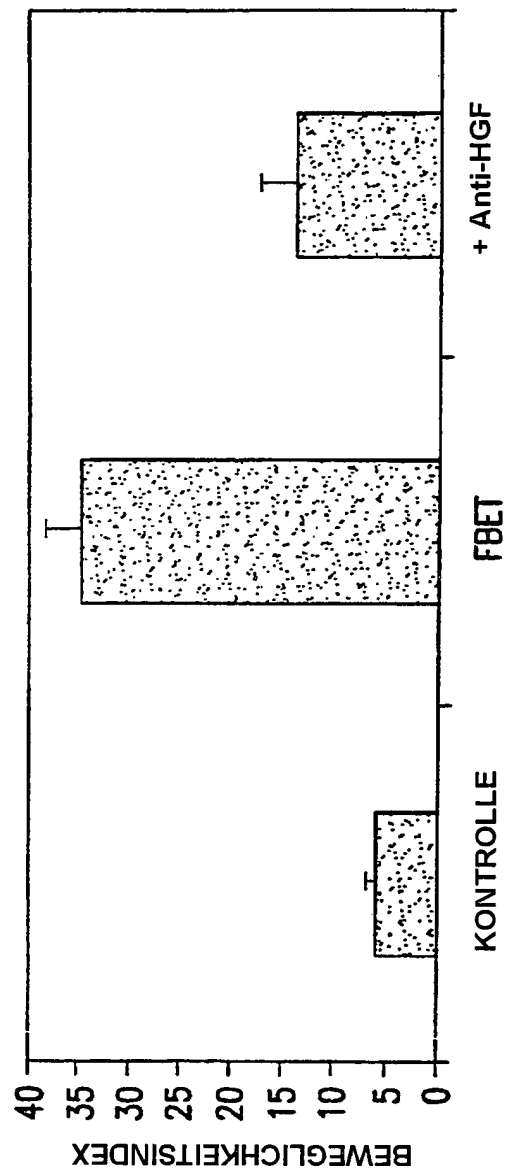


FIG. 5

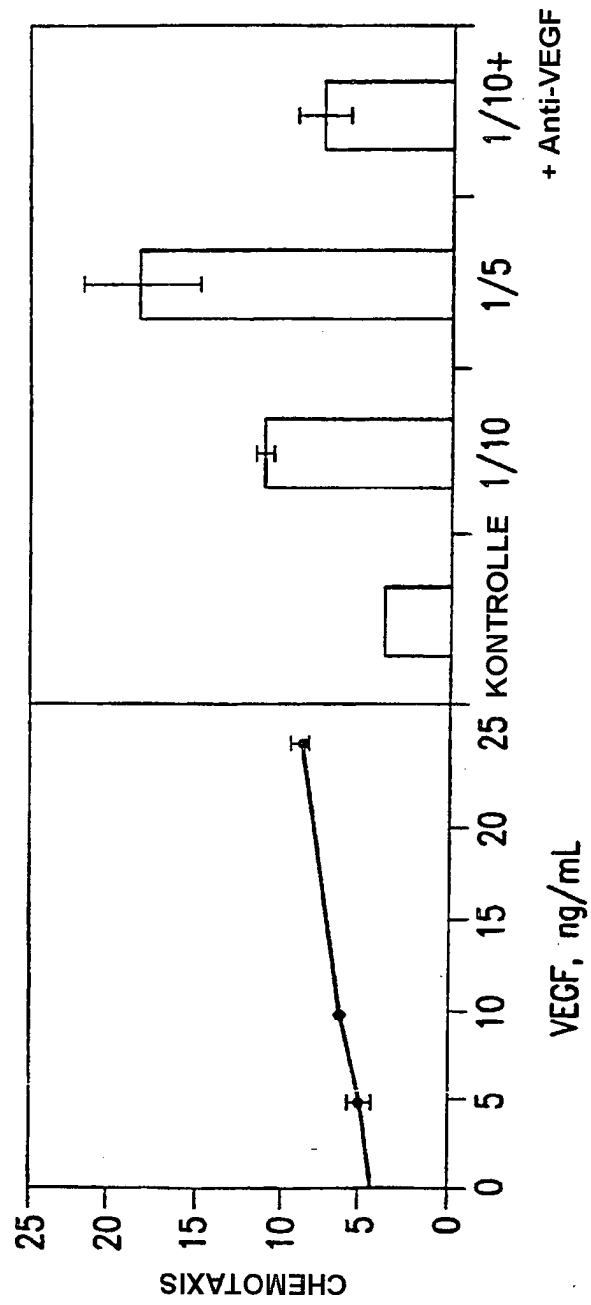


FIG.6

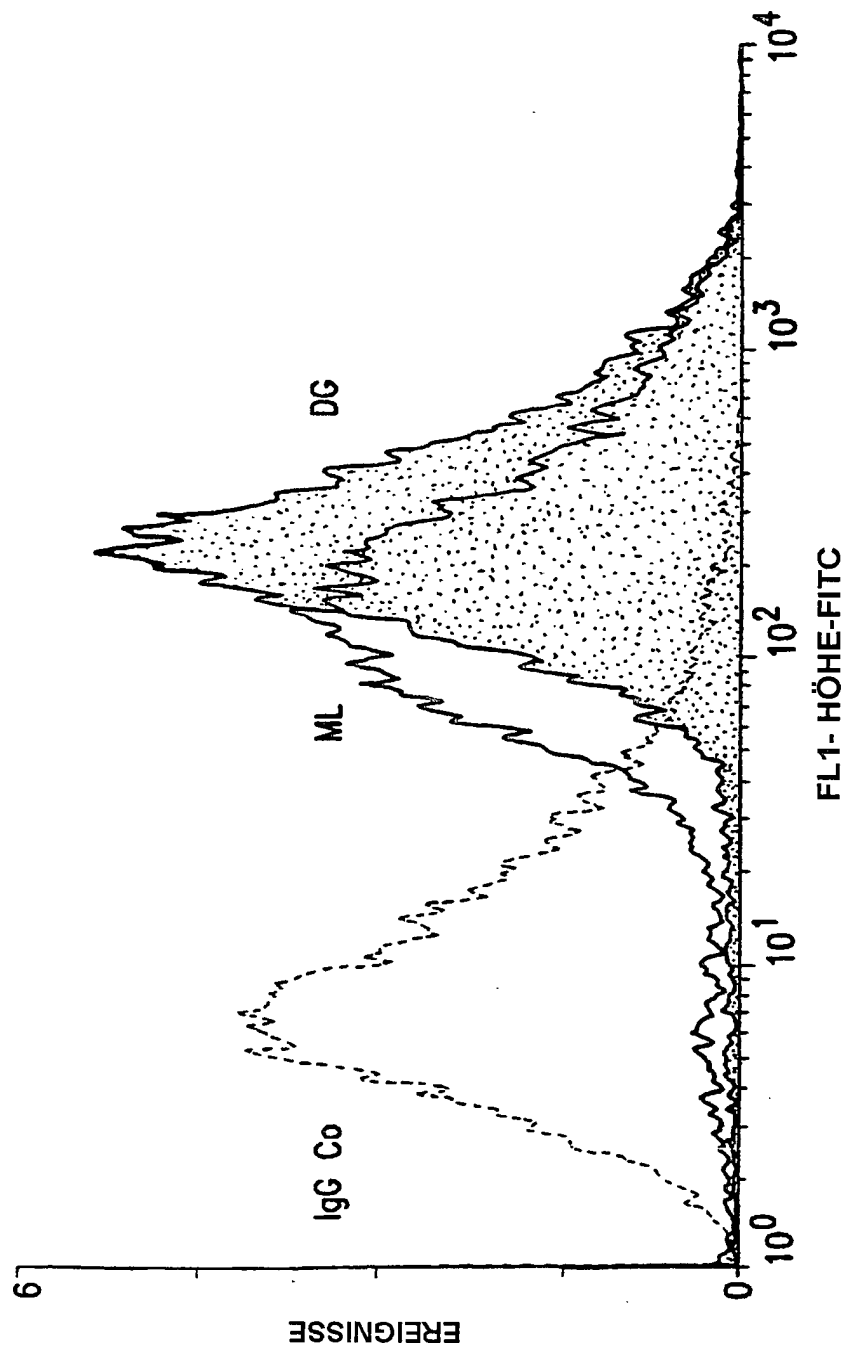


FIG.7

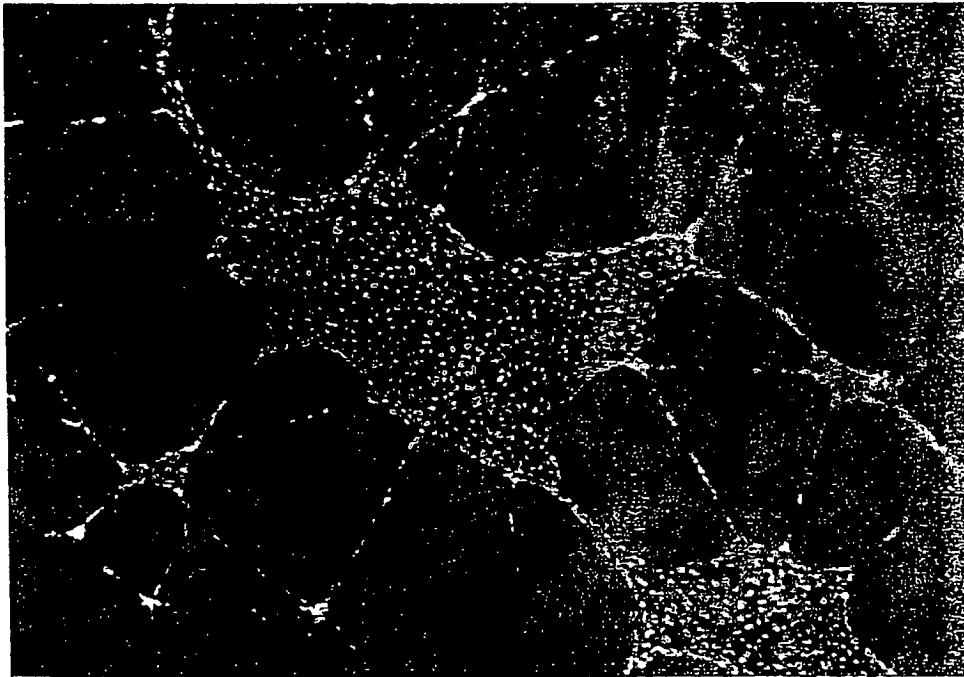


FIG.8A

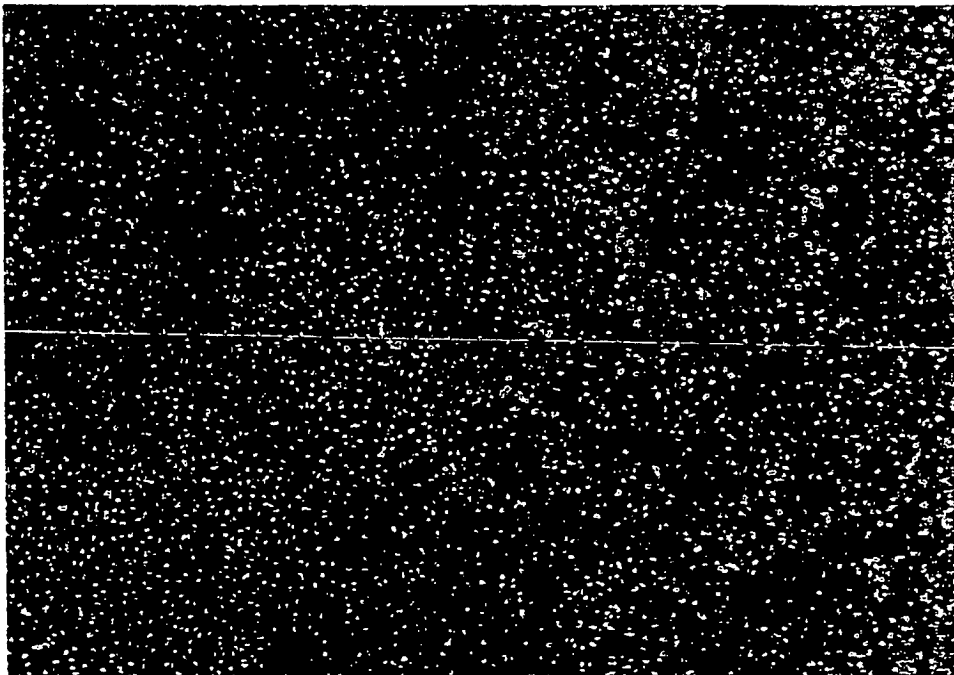


FIG.8B



FIG.9A

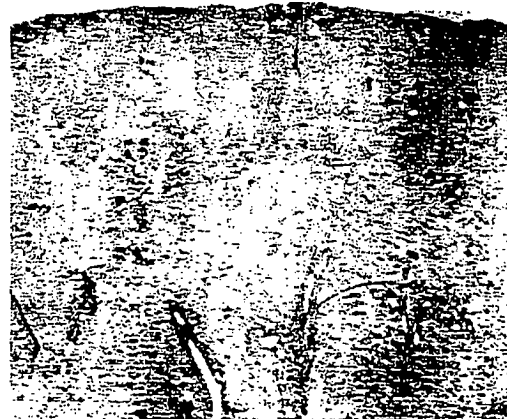


FIG.9B

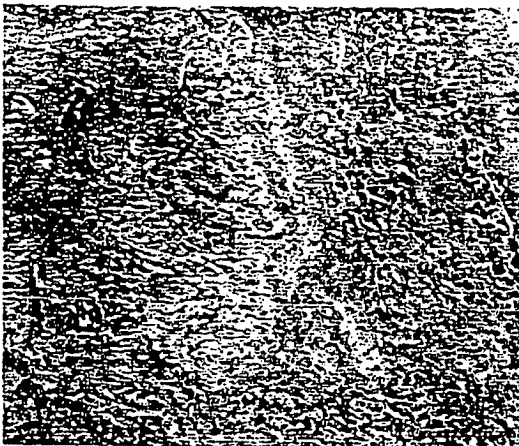


FIG.9C

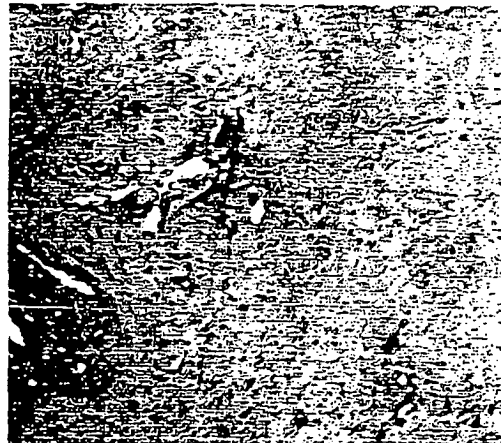


FIG.9D



FIG. 10A



FIG. 10B

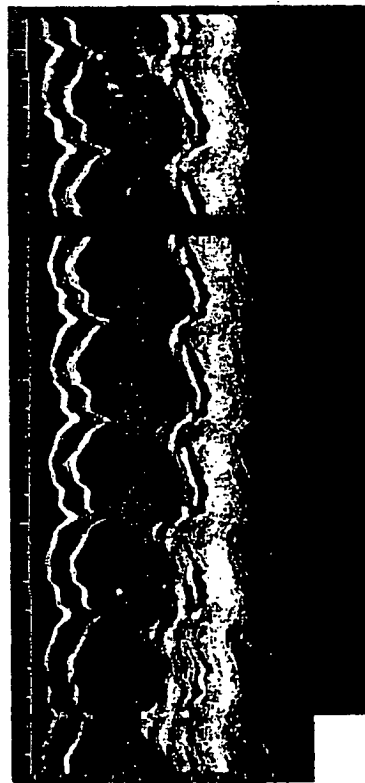


FIG. 10C

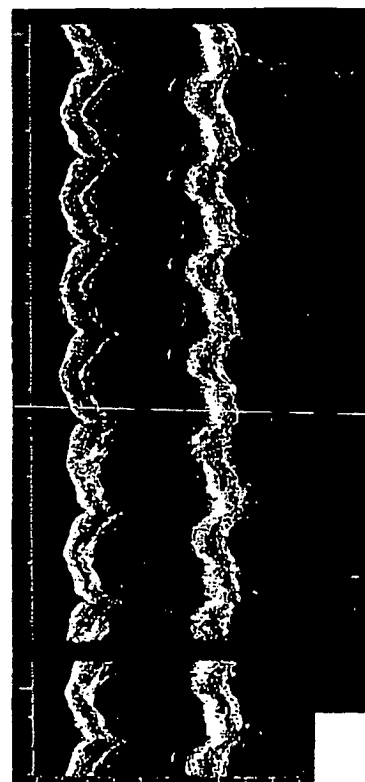


FIG. 10D