



CH 684 783 A5



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT  
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

⑪ CH 684 783 A5

⑤① Int. Cl.<sup>5</sup>: A 61 L 15/32  
A 61 L 25/00

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑳① Gesuchsnummer: 2982/92

⑳③ Inhaber:  
University College London, London WC1E 6BT (GB)

⑳② Anmeldungsdatum: 17.01.1992

⑳② Erfinder:  
Brown, Robert, Stanmore/Middx (GB)  
Blunn, Gordon William, Stanmore/Middx (GB)

⑳③ Priorität(en): 18.01.1991 GB 9101183

⑳④ Vertreter:  
Patentanwälte Schaad, Balass & Partner, Zürich

⑳④ Patent erteilt: 30.12.1994

⑳⑥ Internationale Anmeldung: PCT/GB 92/00101 (En)

⑳⑤ Patentschrift  
veröffentlicht: 30.12.1994

⑳⑦ Internationale Veröffentlichung: WO 92/12739 (En)  
06.08.1992

⑳④ Depot-Formulierungen.

⑳⑦ Die Depot-Formulierung, enthaltend Fibronektin oder ein Fragment davon, ein daran gebundenes Wachstumsfaktor-Bindungsmittel und ein an das Bindungsmittel gebundener Wachstumsfaktor, wird zur Beschleunigung der Wundheilung eingesetzt.



CH 684 783 A5

## Beschreibung

Vorliegende Erfindung betrifft Zusammensetzungen, die zu langer Freisetzung von Wundheilungsbeschleunigern in Wunden bei Mensch und Tier führen.

Im natürlichen Heilungsprozess lassen sich gewöhnlich vier Stadien unterscheiden. Zuerst schliesst sich die Wunde, um den Blutverlust gering zu halten und Infektionen vorzubeugen. Danach wird durch Phagozytose geschädigtes Gewebe entfernt und Krankheitserreger zerstört. Danach folgt Granulierung, bei der dem umliegenden Gewebe entsprechende Zelltypen in die Wunde eindringen und es zu Narbenbildung kommt. Zum Schluss wird das Narbengewebe umgewandelt und es kommt zu Veränderungen der Zellpopulation, die zu einer reifen, geheilten Wunde führen. Im Einzelfall wird es jeweils durch Faktoren wie Wundlage und -art sowie Zustand des Patienten zu Abweichungen von diesem allgemeinen Muster kommen, und die Einzelheiten des Prozesses, insbesondere die letzten Stadien, sind bis jetzt noch nicht völlig geklärt.

Obwohl der natürliche Wundheilungsprozess in den meisten Fällen sehr wirkungsvoll ist, kann er gelegentlich versagen oder unzureichend sein, so dass ein medizinisches Eingreifen wünschenswert ist. Zu typischen Beispielen eines Versagens zählen schwere Verbrennungsfälle mit erheblichen Gewebeschädigungen, bei denen die Wunden sich oft nicht einmal völlig schliessen und Hauttransplantationen notwendig sind, um die Granulation sicherzustellen, Fälle von Beingeschwüren, bei denen selbst bei geheilten Wunden die verheilte Narbe physisch schwach ist und sehr leicht wieder aufbrechen kann, und Fälle, bei denen die bleibenden Narben unschön oder störend sind, auch wenn die Wunde auf natürliche Weise heilen würde. Weitere Wunden, bei denen ein Eingreifen oft notwendig ist, sind schwere Knochenbrüche und Wunden an Knorpel, Bändern und Sehnen, die, wenn überhaupt, nur langsam heilen oder bei denen die verheilte Wunde nicht kräftig genug wäre.

Trotz jahrelanger umfangreicher Arbeiten gab es noch keine völlig zufriedenstellende Behandlungen für viele dieser Probleme bei der Wundheilung.

Ein Weg zur Verbesserung der Wundheilung besteht in der Verabreichung von Wundheilungsbeschleunigern, wie Wachstumsfaktoren. Dies ist jedoch mit vielen Schwierigkeiten verbunden, insbesondere wenn sichergestellt werden soll, dass die Mittel in wirksamen Mengen an die Wundstelle abgegeben werden.

Die Erfinder vorliegender Erfindung haben eine Depot-Zusammensetzung zur Behandlung von Wunden entwickelt, in der die Wundheilungsbeschleuniger auf entsprechenden Bindungsmolekülen konzentriert sind und von diesen freigesetzt werden, die ihrerseits auf Fibronectin-Bindungsdomänen enthaltenden Materialien immobilisiert sind.

Vorliegende Erfindung stellt demgemäss eine Depot-Formulierung bereit die Fibronectin oder ein Fragment davon ein daran gebundenes Wachstumsfaktor-Bindungsmedium und einen an das Bindungsmedium gebundenen Wachstumsfaktor enthält.

Fibronectin ist ein wohlbekanntes, im Handel erhältliches Material. Das Fibronectinmolekül besteht aus einer Anzahl von Polypeptid-Domänen, insbesondere der Gelatinebindungsdomäne, der Heparinbindungsdomäne und der Zellbindungsdomäne. Erfindungsgemäss wird Fibronectin in der intakten Form oder in Form eines Fragments davon, vorzugsweise mit mindestens einer der obengenannten Domänen verwendet. Das Fibronectin oder sein Fragment wirkt als Zielmittel zur Unterstützung der Abgabe der Depot-Formulierung an das Wundgewebe, insbesondere bei Einschluss einer Zellbindungsdomäne.

Bei dem Wachstumsfaktor-Bindungsmedium handelt es sich um ein polysulfatiertes Polysaccharid wie Heparin oder Heparan-Sulfat, oder ein Polypeptid wie BP53, das spezifisch einen Wachstumsfaktor bindet.

Heparin und Heparan-Sulfat sind wohlbekannte Antikoagulantien und im Handel erhältlich. BP53 ist eine Polypeptid-Komponente von mit bekannten Techniken durch Säulenfraktionierung isoliertem Serum, wodurch anfänglich ein 150 kDa-Komplex, der bei niedrigem pH zu BP53 dissoziiert werden kann, erhalten wird. BP53 kann als solches oder in Form eines Komplexes, wie dem 150-kDa-Komplex, in den erfindungsgemässen Formulierungen verwendet werden.

Für vorliegende Erfindung nützliche Wachstumsfaktoren umfassen Wachstumsfaktoren wie Fibroblast-Wachstumsfaktor (FGF), epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), Endothel-Wachstumsfaktor (EDGF), insulinartiger Wachstumsfaktor I oder II (IGF-I oder IGF-II). BP53 wird zur Bindung von IGF verwendet; Heparin und Heparan-Sulfat binden eine Klasse von Wachstumsfaktoren, einschliesslich FGF, EGF und EDGF.

Erfindungsgemäss bevorzugte Depot-Formulierungen umfassen Fibronectin oder ein Fragment davon und das Wachstumsfaktor-Bindungsmedium, insbesondere Heparin, in einem Gewichtsverhältnis von 5:1 zu 100:1, vorzugsweise von 20:1 bis 50:1.

Ohne an diese Theorie gebunden sein zu wollen, sind die Erfinder der Ansicht, dass die Wachstumsfaktoren an die Bindungsmedium wie Heparin oder BP53 binden und vom Bindungsmedium den Zellen in der oder um die Wunde in wirksamen Mengen angeboten werden. Durch Immobilisierung des Bindungsmediums auf dem Fibronectin oder Fragmenten davon können die Wundheilungsbeschleunigungsmedium der Wundstelle zugeführt, dort gelagert und den Zielzellen über längere Zeit oder auf kontrollierte Weise oder beides zur Beeinflussung und Verbesserung verschiedener Aspekte der Wundheilung dargeboten und an sie freigesetzt werden. Darüber hinaus gestattet die Verwendung von Fibronectin-Zellbindungsdomänen es der Depot-Formulierung, an Gewebe an oder neben der Wundstelle zu binden und dort über den notwendigen Zeitraum festgehalten zu werden, während die Wundheilung stattfindet.

Zur Verknüpfung von Bindungsmedium wie Heparin und BP53 an Fibronectin oder Fragmenten davon stehen eine Vielzahl von Mitteln zur Verfügung. Im allgemeinen kann chemische Vernetzung unter

Verwendung unschädlicher Mittel und Bedingungen das Bindungsmittel an das Fibronectin binden. Eine nützliche Klasse chemischer Vernetzer umfasst die Carbodiimide, die zur Konjugation von Materialien wie diesen wohlbekannt sind.

Bei Verwendung von Fibronectin oder Fragmenten davon einschliesslich der Heparinbindungsdomänen kann Heparin oder Heparan-Sulfat über die nichtkovalente Interaktion mit dem Heparinrezeptor in der Heparinbindungsdomäne gebunden werden.

Alternativ kann das Bindungsmittel an das Fibronectin oder ein Fragment davon über ein Trägermaterial wie Polylysin gebunden sein. In diesem Fall sind sowohl das Fibronectin oder Fragmente davon wie auch das Bindungsmittel durch chemische Vernetzung an das Trägermaterial gebunden.

Kombinationen dieser Techniken können verwendet werden, beispielsweise, dass Heparin oder BP53 durch chemische Vernetzung an das Fibronectin und das Trägermaterial gebunden sind, das seinerseits mit dem Fibronectin vernetzt ist. Alternativ dazu oder zusätzlich können Fibronectin-Heparinbindungsdomänen zur nichtkovalenten Bindung von Heparin und Heparan-Sulfat verwendet werden.

Da die Heparin- und Heparan-Sulfat-Moleküle jeweils an mehr als eine Heparinbindungsdomäne von Fibronectin binden können, werden Materialien mit an Träger wie Polylysin gebundenem Fibronectin oder Heparinbindungsdomänen davon durch Heparin oder Heparan-Sulfat aggregiert und können zur Herstellung pastöser Formulierungen verwendet werden.

Bevorzugte Depot-Formulierungen umfassen Heparinbindungsdomänen und Heparin und liegen als Pasten vor. Weitere bevorzugte Depot-Formulierungen umfassen Fibronectin-Zellbindungsdomänen, die zu erhöhter Adhäsion zwischen den Depot-Formulierungen und den Zellen in der oder um die Wunde führen.

Materialien die in der oben beschriebenen Depot-Formulierungen verwendet werden, umfassen Fibronectin oder ein Fragment davon und ein Wachstumsfaktor-Bindungsmittel, vorzugsweise Fibronectin oder Bindungsdomänenfragmente davon und daran gebundenes Heparin, Heparan-Sulfat oder BP53.

Diese Materialien können zur Herstellung von Depot-Formulierungen durch Kontakt mit einem Wachstumsfaktor und Einfangen desselben verwendet werden. Dies ist beispielsweise durch Perfusion des Materials mit einer Lösung des Mittels erreichbar. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird das Material vor einer Operation oder einem chirurgischen Eingriff mit dem Blut oder Serum eines Patienten perfundiert, um das Material mit Wundheilungsbeschleunigungsmitteln aus dem Blutkreislauf des Patienten zu beladen (und somit die Risiken exogener Blutprodukte zu vermeiden). Das perfundierte Material absorbiert Wachstumsfaktoren und kann dann als Depot-Formulierung zur Unterstützung der Erholung desselben Patienten von der Operation oder dem chirurgischen Eingriff verwendet werden.

Dieser Mechanismus kann dadurch ausgenutzt werden, dass das Material auf die Wundstelle gelegt wird, wo es Wachstumsfaktoren aus dem Se-

rum des Patienten ansammeln und als Depot-Formulierung wirken wird, indem es die Mittel an Zellen in der Umgebung der Wunde abgibt und diesen darbietet. Darüber hinaus werden die zuvor beschriebenen Depot-Formulierungen aus dem Serum des Patienten Wachstumsfaktoren akkumulieren und freisetzen, während sie die anfänglichen in der Depot-Formulierung vor der Implantation enthaltenen Wachstumsfaktoren freisetzen und dies auch weiterhin tun, nachdem die anfänglichen Wachstumsfaktoren aufgebraucht sind.

Die Depot-Formulierungen, wie oben beschrieben, werden in chirurgischen oder therapeutischen Verfahren am menschlichen oder tierischen Körper verwendet. Die Erfindung schafft weiterhin die Anwendung eines Materials oder einer Depot-Formulierung, wie oben beschrieben, bei der Herstellung eines Medikaments, Verbands oder einer Vorrichtung zur Anwendung in chirurgischen oder therapeutischen Verfahren am menschlichen oder tierischen Körper. Insbesondere umfassen die chirurgischen oder therapeutischen Verfahren die Beschleunigung der Wundheilung oder die Verbesserung des Aussehens oder der Stärke einer verheilten Wunde oder jede beliebige Kombination daraus. Das chirurgische oder therapeutische Verfahren kann alternativ auch das durch die erfindungsgemässen Materialien oder Depot-Formulierungen geförderte Wachstum von Autotransplantat-Materialien wie Haut oder Bänder umfassen. Bei Verwendung poröser, makroskopische orientierter Materialien, wie nachstehend beschrieben, kann das Wachstum durch die orientierten Materialien geführt werden.

Bei der Behandlungsmethode für einen verwundeten Menschen oder ein verwundetes Tier, wird eine wirksame nichttoxische Menge Material oder Depot-Formulierung, wie oben beschrieben, auf die Wunde aufgebracht.

Bei einer weiteren Ausführungsform der Erfindung enthalten die Depot-Formulierungen oder darin zu verwendende Materialien ein poröses, makroskopisch orientiertes Zelladhäsionsprotein wie es in einer verwandten, am gleichen Tag eingereichten Anmeldung britische Patentanmeldung 9 101 191.6, beschrieben ist. Diese Anmeldung beschreibt makroskopisch orientierte Zelladhäsionsprotein-Materialien, bei denen überraschenderweise gefunden wurde, dass sie die Wundheilung beschleunigen, insbesondere durch Bildung eines Gerüsts, an dem die eindringenden Zellen anhaften können, wodurch dieses Stadium des Wundheilungsprozesses erleichtert wird. Durch Ausrichtung dieser Materialien auf die Merkmale der Wunde oder des umgebenden Gewebes kann die Zellinvasion darüber hinaus entlang erwünschter Orientierungen geführt werden, wodurch die anfängliche Reparatur verstärkt und die im Umwandlungsstadium erforderliche Umorientierung reduziert wird. Die Wundheilung kann so beschleunigt werden und die reife, ausgeheilte Wunde kann gekräftigt oder kosmetisch annehmbarer gemacht werden, oder beides.

In der vorliegenden Erfindung können diese orientierten Materialien als Träger oder Substrat für die oben beschriebenen Materialien oder Depot-Formu-

lierungen verwendet werden. Wenn die oben beschriebenen Materialien oder Depot-Formulierungen weiterhin Fibronectin enthalten, kann dieses Fibronectin selbst in Form von porösen, makroskopisch orientierten Wundbehandlungsmaterialien vorliegen.

Die Orientierung des Fibronectins oder anderer Zelladhäsionsprotein-Moleküle im makroskopischen Massstab ist kritisch für den Erfolg der orientierten Materialien bei der Führung des Wundheilungsprozesses.

Das erfindungsgemässe makroskopisch orientierte Zelladhäsionsprotein enthält grosse Anhäufungen von Zelladhäsionsproteinen, die sich unter günstigen Bedingungen selbst als Fibrillen zusammenbauen, wobei die Moleküle in jeder einzelnen Fibrille im wesentlichen parallel zueinander liegen, jeder einzelne Fibrille über eine Strecke von mindestens 100  $\mu\text{m}$  orientiert ist und die Fibrillen im wesentlichen parallel zueinander über makroskopische Strecken, beispielsweise mindestens 0,1 mm, vorzugsweise 0,5 und besonders bevorzugt mindestens 1 mm, orientiert sind. Einzelne Fibrillen können eine Orientierung über eine beträchtliche Strecke, beispielsweise bis zu 0,5 mm, möglicherweise bis zu 1 mm oder sogar 5 mm oder mehr, beispielsweise 1, 2, 3 oder 5 cm, aufweisen. Die Fibrillenanhäufung kann über 5 mm oder 1 cm oder mehr, beispielsweise 2, 3 oder 5 cm orientiert sein und bei Bildung als ununterbrochene Bahn zur nachfolgenden Aufteilung in einzelne Verbände kann die Anhäufung über Strecken von vielen Zentimetern oder sogar vielen Metern orientiert sein.

In einer einfachen Ausführungsform der Erfindung sind die Fibrillen in einer einzigen Richtung orientiert und bilden eine Bahn oder eine Matte, möglicherweise auf einem Substrat zur Abstützung, das auf eine Wunde aufgelegt werden kann. In komplizierteren Ausführungen können solche Bahnen oder Matten in nicht parallelen Richtungen kaschiert sein, bei denen beispielsweise die Fibrillen einer Schicht mit 90° gegenüber den Fibrillen in einer zweiten Schicht orientiert sind. Die Fibrillen können zu Fasern angeordnet oder auf einem Substrat gebildet oder von Fasern eines Substrats orientiert werden, und aus solchen Fasern können Gewebe oder Vliesbahnen mit mindestens einer und oftmals zwei oder mehr Orientierungsrichtungen geformt werden. Wenn die orientierten Materialien durch Überzug auf einem Substrat gebildet werden, handelt es sich bei dem Substrat vorzugsweise um ein biologisch abbaubares oder resorbierbares Material, so dass es in der Wunde verbleiben kann und schliesslich bei oder nach Heilung der Wunde zerstört wird, oder es kann sich bei dem Substrat um eine physikalische Stütze handeln, die nach Bildung des orientierten Materials entfernt wird.

Zu Zelladhäsionsproteinen, die für diese orientierten Materialien nützlich sind, zählen Fibronectin, Vitronectin und von-Willebrand-Protein (auch von Willebrand-Faktor genannt), die in der Literatur wohlbekannt sind. Fibronectin wird als Zelladhäsionsprotein bevorzugt, und vorzugsweise wird im wesentlichen reines Fibronectin verwendet. Die Zelladhäsionsproteine liegen gewöhnlich in steriler, pyrogenfreier Form vor.

Im Gebrauch können die orientierten Materialien zur Führung und Förderung der Zellinvasion und damit zur Verbesserung der Stärke, kosmetischen Annehmbarkeit, Heilungsdauer oder anderer erwünschter Merkmale der verheilten Wunde auf die Wunden aufgebracht werden. Beispielsweise kann eine einfache unidirektional orientierte Matte verwendet werden, deren Orientierungsrichtung über die Breite einer linearen Wunde verläuft, um den Wundverschluss zu fördern und die Widerstandskraft gegen ein erneutes Öffnen der Wunde zu erhöhen. In einem anderen Beispiel können kompliziertere Bahnen mit einer Vielzahl von Orientierungsrichtungen verwendet werden, um ein Nachwachsen von geschädigten Sehnen, Bandscheiben und Hornhäuten zu fördern und gleichzeitig die eindringenden Zellen dazu zu bringen, Orientierungen anzunehmen, die zu denen des umliegenden ungeschädigten Gewebes passen oder die Orientierungen des ursprünglichen geschädigten Gewebes wiederherzustellen. Die Anwendung der orientierten Materialien umfasst also häufig die Ausrichtung einer oder mehrerer Orientierungsrichtungen des Materials bezüglich Merkmalen der Wunde oder des umliegenden Gewebes.

Die erfindungsgemässen Materialien finden besondere Anwendung bei der Stimulierung neuen Kapillarwachstums, einem häufig angestrebten Ziel bei vielen Formen der Wundreparatur. Auf dem klassischen Weg wurde versucht, unter Verwendung eines Diffusionsfaktors die Gefässbildung allgemein zu stimulieren. Ein Teil des Gefässbildungsprozesses ist jedoch die Adhäsion von Endothelzellen an der und deren Wanderung über die Substratmatrix. Eine Weiterentwicklung vorliegender Erfindung besteht in der Förderung von Anheftung/Migration von Kapillarzellen an/zu diskreten Fasern oder Strängen. Diese Stränge wären in der Richtung des erforderlichen Kapillarwachstums orientiert. Stränge können die Form von (i) erfindungsgemässen Materialien mit Fibronectin in makroskopischer Faserform; (ii) erfindungsgemässen Materialien mit in herkömmliche Wundimplantatmaterialien (z.B. Gelatine oder modifizierte Celluloseschwämme) eingelegten Fn-Strängen; oder (iii) erfindungsgemässen Material mit auf geflochtene resorbierbare Nähte aufgebrachtem Fibronectin haben. Ob aus orientiertem Fn gebildet oder mit Fibronectin überzogen, sollten die Einzelstränge schmaler als 200  $\mu\text{m}$  sein (idealerweise zwischen 1 und 100  $\mu\text{m}$ ). Diese Strukturen bilden ausgezeichnete Stütz- und Adhäsionssubstrate für Reparaturzellen.

In einer weiteren Modifikation (insbesondere der mit Fn überzogenen Flechtnaht) ist es möglich, einen chemotaktischen Reiz durch Befestigung eines festen, einen Wachstumsfaktor enthaltenden Gels an einem Ende der Naht einzubauen. Ein natürliches Beispiel eines solchen «Gels» wäre ein Blut- oder Plasmagerinnsel (idealerweise aus dem eigenen Blut des Patienten hergestellt). Künstliche Substrate auf Basis von Gelatine (oder einem anderen gellierenden Material) mit dem erforderlichen Gefässbildungsfaktor könnten ebenfalls verwendet werden. Diese Naht würde so durch oder über das geschädigte Gewebe gezogen werden, dass neue

Gefässe auf das das Gel oder Gerinnsel tragende Ende zu wachsen würden. Diese Nahtform kann bei der Reparatur von gefässlosen oder schlecht durchbluteten Geweben, wie gerissenen Menisken, Bändern oder Sehnen als «Gefässbildungsbahn» nutzbringend angewendet werden.

Erfindungsgemäss anwendbare orientierte oder nichtorientierte Materialien können noch weitere therapeutische Mittel enthalten, beispielsweise Mittel zur Beschleunigung der Wundheilung, wie Wachstumsfaktoren und Wachstumshormone, Gerinnungsfaktoren, Thrombozytenadhäsionsbeschleuniger, wie Thrombin, Mittel zur Förderung der Kalzifikation, Kollagen, Fibrinogen, antimikrobielle Mittel und Heparin.

Die Fibrile und Materialien können in der durch Vernetzung mit chemischen Reagenzien wie Glutaraldehyd oder Enzyme, wie Faktor XIIIa, wobei es sich um eine Transglutaminase handelt, gebildeten oder stabilisierten Form verwendet werden. Vernetzung mit anderen Komponenten wie Kollagen und Fibrinogen, beispielsweise unter Verwendung einer Transglutaminase, ist ebenfalls möglich. Wenn die erfindungsgemässen Materialien Kollagen und/oder Fibrinogen einschliessen, ist es bevorzugt, wenn diese auch im wesentlichen parallel zu den Fibrillen des orientierten Zelladhäsionsproteins orientiert sind.

Die Materialien werden vorzugsweise als Wundverband oder als ein Bestandteil davon verwendet, oder sie werden getrennt von einem herkömmlichen Verband auf offene Wunden aufgebracht. Um die Stärke und/oder die kosmetische Annehmbarkeit der reifen Wunde zu erhöhen, werden die Materialien vorzugsweise orientiert und mit der oder einer auf die Merkmale des umliegenden Gewebes ausgerichteten Orientierungsrichtung auf die Wunde aufgebracht, um eine Invasion entlang der Orientierungsrichtung zu stimulieren. Beispielsweise können die Fasern mit Muskelfasern in der Wunde oder dem darunterliegenden Gewebe, über eine lineare Wunde oder parallel oder rechtwinklig zu Richtungen, in denen ein Gewebe nach Heilung gestreckt wird, ausgerichtet werden.

Makroskopisch orientierte Materialien werden durch Bildung und Orientierung der Fibronektin-Fibrillen aus Lösung und Entfernung des Lösungsmittels hergestellt.

Bei den für das vorliegende Verfahren nützlichen Lösungsmitteln handelt es sich um allgemein wässrige Lösungsmittel, wie gepuffertes Wasser, destilliertes Wasser, entmineralisiertes Wasser und pyrogenfreies Wasser. Das Lösungsmittel kann weitere gelöste Stoffe und/oder Schwebeteilchen zum Einschluss in oder zur Abscheidung auf den Fibronektinmaterialien enthalten.

Das Lösungsmittel kann durch Verdunstung, Eindüngung durch Filtration oder durch Aggregation oder Abscheidung des Fibronektins beispielsweise unter Verwendung entsprechender Salzkonzentrationen oder durch Einstellung des pH-Werts der Lösung auf saure oder basische Werte und Sammlung und Trocknung des Aggregats oder der Ausfällung, entfernt werden. Die orientierten Materialien werden vorzugsweise gewaschen und getrocknet

und gegebenenfalls stabilisiert, beispielsweise durch chemische Vernetzung mit Reagenzien wie Glutaraldehyd oder auf enzymatischen Weg mit Faktor XIIIa.

5 Das Zelladhäsionsprotein kann durch Eigenbildung aus Lösung, vorzugsweise einer hochkonzentrierten Lösung mit 0,7 mg/ml oder mehr, beispielsweise mehr als 1 mg/ml, wie mindestens 1,5 mg/ml, beispielsweise 2 mg/ml oder mehr oder sogar 10 bis zu 3 mg/ml oder mehr, bei etwa neutralem pH zur Bildung von Fibrillen auf festen Oberflächen orientiert werden, wobei diese Fibrillen bei der Handhabung, Gewinnung und Trocknung ausreichend stabil sind. Die Verwendung einer Lösung mit etwa 15 1,5 mg/ml ist besonders bevorzugt. Ein pH von etwa 7,6, beispielsweise unter Verwendung von tris-HCl-Puffer hat sich als vorteilhaft herausgestellt. Die Lösung enthält vorzugsweise lösliche ionische Komponenten zur Erhöhung ihrer Ionenstärke, insbesondere im Bereich bis zu 0,5 M Ionenstärke. 20 Die Lösung enthält vorzugsweise auch Harnstoff, vorzugsweise zu 1 bis 3 M. Eine Kombination von Fibronektin, Harnstoff zu 2 M und 0,1 bis 0,5 M Natriumchlorid wird bevorzugt. Fibronektin kann also 25 beispielsweise durch ununterbrochenes unidirektionales Bewegen, wie Rühren, einer gesättigten Lösung und Entfernen des Lösungsmittels zur Ausfällung des orientierten Fibronektins, beispielsweise auf dem Rührer, orientiert werden. Dies kann zur 30 Bildung von Matten, die in parallelen oder nichtparallelen Richtungen zur Bildung eines Gitters kaschiert sein können, wiedergewonnen und aufgesaugt werden. Alternativ können hochkonzentrierte Lösungen zu Fasern gezogen und das Lösungsmittel unter Zurücklassung von Fibronektinfasern mit 35 orientierten Fibrillen entfernt werden. In einer bevorzugten Technik zum Aufziehen der Fasern wird ein Applikator auf die Oberfläche der Lösung gedippt und wieder angehoben; unter Ausnutzung der 40 Oberflächenspannung entstehen eine oder mehrere Fasern. Ein bevorzugtes Applikatormaterial ist mineralischer Glimmer. Bei einer weiteren Alternative wird eine konzentrierte Lösung von Fibronektin auf ein faseriges Substrat aufgebracht und das Lösungsmittel entfernt.

45 Heparin kann in die Fibronektinlösung eingearbeitet werden (vorzugsweise im Gewichtsverhältnis von 1:5 zu 1:100 Heparin:Fn) ohne Behinderung der Fähigkeit zur Bildung von Strängen. Nach dem 50 Trocknen waren Stränge mit höheren Heparinverhältnissen (z.B. 1:5, Heparin:Fn) jedoch flach mit sehr wenig Masse durch den hohen Hydratationsgrad der neu geformten Stränge aufgrund des Heparinhalts.

55 Makroskopisch orientiertes Fibronektin kann mit Heparin und/oder BP53 Trägermaterialien vernetzt sein und Wundheilungsbeschleunigungsmittel wie oben beschrieben für andere Fibronektinformen und Fragmente davon gebunden enthalten.

60 Die Erfindung wird nun anhand nachfolgender Beispiele, die den Schutzzumfang in keiner Weise einengen sollen, erläutert.

65

Beispiel 1

Eine Lösung von Humanplasma-Fibronectin, die durch Gelatine-Affinitätschromatographie (ca. 1,0 (z.B. 0,5 bis 1,5) mg/ml) in neutralem pH-Puffer (10 mM Phosphat oder 20 mM Tris-HCl pH 7,5) mit 0,15 M Natriumchlorid gereinigt wurde, wird in ein unter Druck stehendes «Rührzell»-Konzentrationsgerät mit Ultrafiltrationsmembran (Molekulargewicht-Cutoff ca. 10 bis 20000 Dalton; z.B. Amicon PM 10 Membran) gegeben. Eine solche Rührzelle (z.B. mit 100 ml Kapazität) wird bei einem bevorzugten Druck von 25 psi (Bereich ca. 10 bis 75 psi) unter Stickstoff oder unter Luft bei einer Rührgeschwindigkeit von ca. 300 Upm (Bereich 50 bis 600 Upm) bei 4°C betrieben. Das Volumen wird unter diesen Bedingungen langsam auf weniger als die Hälfte des Anfangsvolumens verringert, was eine Fibronectinkonzentration innerhalb der Zelle von ca. 3 mg/ml (Bereich 2,0 bis 10 mg/ml) ergibt. Die Bedingungen für eine Selbstaggregation ändern sich je nach Reinheit und Integrität des Fibronectin-Ausgangsmaterials, aber innerhalb dieser Bereiche wird ein grosses Gerinnsel oder eine grosse Matte aus festem Fibronectin auf dem Rührstab der Zelle gebildet. Diese(r) kann entfernt und Fibronectinlösung erneut zugegeben werden, um die Bildung von mehr Fibronectinmatten zu ermöglichen.

Beispiel 2

Es wird eine Ausgangslösung wie in Beispiel 1 beschrieben hergestellt; sie enthält jedoch über 1 mg/ml Fibronectin (Fn) mit einem pH-Wert um Neutralität und weist eine Natriumchloridkonzentration von bis zu 0,2 M auf. Ein geeigneter «Applikator» mit flachem Rand (beispielsweise ein 2 cm grosser Glasabdeckstreifen) wird mindestens 3 mm tief in die Lösung getaucht. Mit demselben benetzten Rand wird nun eine hydrophile Oberfläche (z.B. eine flache Kunststoff-Kulturschale) unter Bildung eines kleinen Tropfens der Fn-Lösung, die sowohl am «Applikator» als auch an der Oberfläche haftet, berührt. Wird der Applikator langsam von der zu überziehenden Oberfläche abgehoben, bildet sich ein einzelner Proteinstrang zwischen dem «Applikator» und der «Oberfläche» unter der Wirkung der Oberflächenspannung. Dieser (sich zwischen Oberfläche und Applikator erstreckende) Proteinstrang kann 2 bis 5 mm weit über die Oberfläche gezogen und durch erneutes Berühren des Applikators und der Oberfläche wieder auf der Oberfläche befestigt werden. Der erhaltene Proteinstrang haftet fest auf der Oberfläche durch eine Vielzahl von unterteilten Fibrillen an jedem Ende. Sie weisen gewöhnlich einen Durchmesser von 2 bis 5 µm und eine Länge von bis zu 5 mm auf. Sie sind mit oder ohne chemische Vernetzung (z.B. mit Glutaraldehyd) stabil und können ohne Verschiebung gewaschen und getrocknet werden. Ihre Orientierung auf der «Oberfläche» lässt sich präzise kontrollieren.

In Zellkulturversuchen förderten Stränge aus reinem Fibronectin eine directionale Orientierung und Anheftung der Fibroblasten trotz der Anwesenheit von löslichem Fibronectin. Fibronectinstränge waren

in solchen Kulturen auch noch nach einer 24-stündigen Exposition mit Fibroblasten zu sehen.

Beispiel 3

Anwendungsbeispiele für depot-bildende Konjugate zur Erzielung einer regulierten Abgabe lokal wirkender Wachstumsfaktoren. Anmerkung: die Mittel zur Abgabe des Depots müssen nicht für diese Anmeldung spezifisch sein, so dass völlig andere Techniken anwendbar wären.

Die Depotform in diesen Beispielen reicht mit Erhöhung des Anteils des verwendeten Fibronectinmoleküls von löslich über pastös bis zu Matten.

1. Die Gelatinebindungsdomäne von Fibronectin (Fn GBP) wird (chemisch) an Heparin oder BP53 oder beide gebunden. Dieser lösliche Komplex bindet den die erforderlichen Wachstumsfaktor/en und richtet die Materialien auf Stätten mit Bindegewebsschäden (d.h. Wunden). Das Verhältnis zwischen Wachstumsfaktor und Fn GBP sollte grösser als 2:1 sein (Molekularbasis) und idealerweise grösser als 10:1. Diese Verhältnisse sind mit einem Träger-Polylysin zu erzielen.

2. Die Heparinbindungsdomäne von Fibronectin (Fn HBD) wird alleine verwendet, d.h. ohne andere Aktivität oder als grosse Fragmente, die Heparinbindungsdomäne und auch Zell- oder Gelatinebindungsdomänen oder beide einschliessen. Fn HBD wird mit handelsüblichem Polylysin (hohes Molekulargewicht) vernetzt und mit Heparin vermischt, mit dem es unter Bildung grosser ausfallender Aggregate in Wechselwirkung tritt. Die resultierende Ausfällung wird zur Bildung einer Depot-Formulierung zur Aufbringung auf Wundstellen verwendet, was die Zellanheftung begünstigt.

3. Die anderswo beschriebenen makroskopisch orientierten Fibronectinmaterialien bilden die Basis, oder den Träger, für die depot-bildenden Konjugate in diesem Beispiel. In diesem Fall werden Heparin oder BP53 oder beide entweder direkt oder (vorzugsweise) über Abstandshalter, beispielsweise Polylysin, vernetzt. Die Oberfläche der Fibronectin-Fibrillenmatten trägt somit Konjugate aus Heparin und/oder BP53, die wiederum reversibel mit Wachstumsfaktoren auf die oben beschriebene Weise beladen sein können.

Beispiel 4

Matten wurden wie in Beispiel 1 beschrieben unter Verwendung einer Rührzelle unter einer Reihe von Bedingungen zur Prüfung der bevorzugten Zusammensetzung der Fibronectin-Ausgangslösung hergestellt. Die Mattenbildung wurde aufgrund des Trockengewichts der gewonnenen Matte und der UV-Absorption (bei 280 nm) der Fibronectinlösung am Anfang und am Ende des Mattenbildungsverfahrens beurteilt. Es wurde gefunden, dass mit Harnstoff auf 2M eingestellte Fibronectinlösungen vorzuziehen sind, da sie zu einer prozentual grösseren Mattenbildung mit derselben Ionenstärke führen.

Die Ionenstärke der Fn-Lösung wurde stufenweise erhöht, wobei höhere Natriumchloridkonzentrationen von Null bis 1,0 M verwendet wurden, und als

Matte wiedergewonnenes Fn (als % des gesamten Fn in Lösung) wurde gemessen. Aus Daten über die Beziehung der Natriumchloridkonzentration zum Fn-Einbau, in %, in der Matte wird deutlich, dass die Mattenbildung zwischen 0,1 M und 0,5 M Natriumchlorid ausreichend ist, bei einer bevorzugten Konzentration von 0,1 M Natriumchlorid.

#### Beispiel 5

Der Einfluss von Heparin in der Fn-Ausgangslösung auf die Menge und Qualität der gebildeten Matten wurde in der «Rührzelle» (siehe Beispiel 1) geprüft. Wie in Beispiel 4 wurde die Effizienz der Mattenbildung als % in das Aggregat eingebauten Fn gemessen. Heparin wurde zu bekannten Konzentrationen der Fn-Lösung in Verhältnissen (Gewicht:Gewicht) von 1:15 bis 1:200 (Heparin:Fn) hinzugefügt. Das Heparin stammte von Sigma Chemical Co., Poole, Dorset, GB. Jede Matte wurde unter ansonsten identischen Bedingungen aus Fn-Lösungen mit 0,1 M Natriumchlorid, 2M Harnstoff, 50 mM tris-HCl pH 7,6 hergestellt. Bei Verhältnissen unterhalb von 1:15 (Heparin:Fn) war die Mattenbildung grösstenteils oder vollständig unterdrückt. Über ein Verhältnis von 1:40 hinaus gab es nur wenig Änderung. Das bevorzugte Verhältnis beträgt 1:20 bis 1:40. Der Heparineinbau in die Matte (mit dem «Methylenblau»-Test für Glycosaminoglykane gemessen) wurde zu ca. 20 µg/mg Fn bestimmt, unter Verwendung einer Ausgangslösung mit einem Heparin:Fn-Verhältnis von 1:15. Dies stellt eine Einbaurate von 30% dar. Im allgemeinen hatten Heparin enthaltende Matten eine schlechtere Orientierung als ohne Heparin hergestellte Matten. Alle diese Materialien konnten nach Trocknung bequem in Wunden in einer Vielzahl von Geweben gelegt werden, wobei sie unter Bildung fester proteinhaltiger Niederschläge in Lösungen bei physiologischen Ionenstärken und pH-Werten rehydrierten.

#### **Patentansprüche**

1. Depot-Formulierung, die Fibronectin oder ein Fragment davon, ein daran gebundenes Wachstumsfaktor-Bindungsmittel und einen an das Bindungsmittel gebundenen Wachstumsfaktor enthält. 45
2. Formulierung nach Anspruch 1, enthaltend Fibronectin oder ein Fragment davon mit einer Gelatinebindungsdomäne, Heparinbindungsdomäne oder Zellbindungsdomäne von Fibronectin. 50
3. Formulierung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, worin das Wachstumsfaktorbindungsmittel ein polysulfatiertes Polysaccharid oder ein Polypeptid ist, das spezifisch einen Wachstumsfaktor bindet. 55
4. Formulierung nach Anspruch 3, worin das polysulfatierte Polysaccharid Heparin oder Heparan-Sulfat ist.
5. Formulierung nach Anspruch 3, worin das Polypeptid-Wachstumsfaktorbindungsmittel BP53 ist. 60
6. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, worin der Wachstumsfaktor Fibroblast-Wachstumsfaktor, Epidermal-Wachstumsfaktor, Endothel-Wachstumsfaktor oder insulinartiger Wachstumsfaktor I oder II ist. 65

7. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, umfassend poröses, makroskopisch orientiertes Zelladhäsionsprotein.

8. Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 als Mittel zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung am menschlichen oder tierischen Körper.

9. Verwendung einer Formulierung nach einem der Ansprüche 1 bis 7 bei der Herstellung von Medikamenten, Verbänden oder Vorrichtungen zur Anwendung in chirurgischen oder therapeutischen Verfahren am menschlichen oder tierischen Körper.

10. Verwendung nach Anspruch 9, bei der das chirurgische oder therapeutische Verfahren die Beschleunigung der Wundheilung oder die Verbesserung des Aussehens oder der Stärke einer verheilten Wunde umfasst oder bei der das Wachstum von Autotransplantat-Material durch die Formulierung gefördert oder geführt wird.

11. Material zur Verwendung bei der Herstellung von Depot-Formulierungen nach einem der Ansprüche 1 bis 8 umfassend Fibronectin oder ein Fragment davon und ein daran gebundenes Wachstumsfaktorbindungsmittel.