

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

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
16. März 2006 (16.03.2006)

PCT

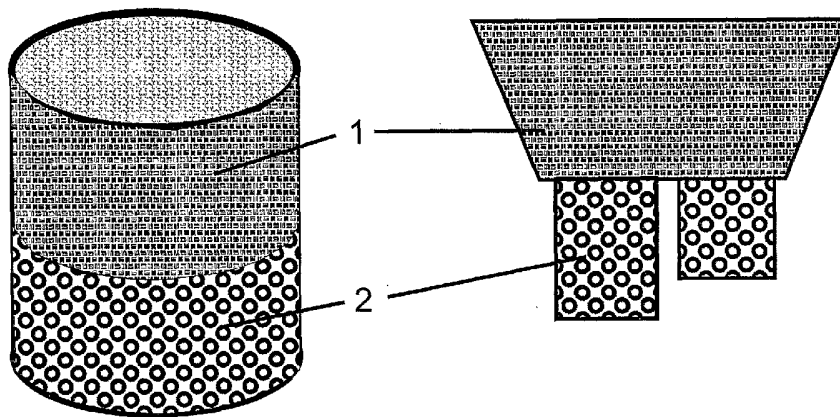
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/026981 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation : ⁷ A61F 2/30, A61L 27/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2005/001585
- (22) Internationales Anmeldedatum:
7. September 2005 (07.09.2005)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
10 2004 044 102.2
7. September 2004 (07.09.2004) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): TECHNISCHE UNIVERSITÄT DRESDEN [DE/DE]; Mommsenstrasse 11, 01062 Dresden (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GELINSKY, Michael [DE/DE]; Hoyerswerdaerstr. 27, 01099 Dresden (DE). ECKERT, Marlen [DE/DE]; Pulsnitzerstr. 2, 01099 Dresden (DE).
- (74) Anwalt: UHLEMANN, Henry; Kailuweit & Uhlemann, Bamberger Strasse 49, 01187 Dresden (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: IMPLANT FOR TREATING OSTEOCHONDRAL DEFECTS AND METHOD FOR PRODUCING THE SAME

(54) Bezeichnung: IMPLANTAT ZUR BEHANDLUNG VON OSTEOCHONDRALEN, SOWIE VERFAHREN ZU DESSEN HERSTELLUNG



(57) Abstract: The invention relates to an implant for treating osteochondral defects and to a method for producing the same. The implant for treating osteochondral defects comprises at least two superimposed layers, a bottom-most porous bone matrix (2) and a porous cartilage matrix (1), the layer materials being locally mixed at the interfaces of the contacting layers. The inventive method for producing the implant comprises the following steps: a) producing the individual layers or the respective layer material, at least one layer or a layer material being converted to a pasty or liquid state using a solvent that is apt to partially dissolve the surfaces of the other layers, b) layering or putting the layers or layer materials one on top of the other, and c) lyophilizing the composite.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Implantat zur Behandlung von osteochondralen Defekten, sowie ein Verfahren zu dessen Herstellung. Erfindungsgemäß besteht das Implantat zur Behandlung von osteochondralen Defekten aus wenigstens zwei übereinander liegenden Schichten, darunter eine poröse Knochenmatrix (2) und eine poröse Knorpelmatrix (1), wobei die Schichtmaterialien an den Grenzflächen der sich berührenden Schichten lokal vermischt sind. Hergestellt wird das Implantat mit den Schritten a) Herstellen der einzelnen Schichten bzw. des jeweiligen Schichtmaterials, wobei wenigstens eine Schicht bzw. ein Schichtmaterial mit einem Lösungsmittel, das wenigstens die Oberflächen der anderen Schichten auflösen kann, in einen pastösen oder flüssigen Zustand überführt wird, b) Übereinanderschichten oder -legen der Schichten bzw. Schichtmaterialien und c) Gefriertrocknen des Verbundes.



WO 2006/026981 A1



SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

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

Implantat zur Behandlung von osteochondralen Defekten, sowie Verfahren zu dessen Herstellung

Die Erfindung betrifft ein Implantat zur Behandlung von osteochondralen Defekten, sowie ein Verfahren zu dessen Herstellung.

Osteochondrale Defekte, also Defekte, die sowohl den Gelenkknorpel als auch den direkt darunter befindlichen Knochen umfassen, können auf zweierlei Art entstehen: zum einen durch fortgeschrittene entzündliche Prozesse wie Arthrosen, welche neben dem Knorpelgewebe auch schon den Knochen geschädigt haben, und zum anderen durch Verletzungen oder weit fortgeschrittenen Verschleiß.

Osteochondrale Defekte werden zum Teil aber auch aus therapeutischen Gründen vom Arzt bewusst erzeugt: da sich ein reines Knorpel-Implantat in der nur 2 mm bis 5 mm dicken Knorpelschicht der Gelenke schlecht verankern lässt, wird manchmal nicht nur das geschädigte Knorpelgewebe entfernt, sondern der Defekt absichtlich in Richtung des darunter liegenden Knochens vergrößert, um im Anschluss daran ein Implantat dann besser fixieren zu können.

Zur Behandlung der Defekte werden sowohl Implantate, die aus natürlichem Gewebe gewonnen werden, als auch Implantate mit Gewebeersatzmaterialien, die meist durch Tissue Engineering hergestellt werden, verwendet. Zur Herstellung von Implantaten durch Tissue Engineering wird im ersten Schritt eine die extrazelluläre Struktur imitierende Matrix mit vielen Hohlräumen aus vorzugsweise biologisch abbaubaren Materialien geschaffen, deren Hohlräume dann im nächsten Schritt mit vorwiegend körpereigenen Zellen besiedelt und durch Schaffung entsprechender Wachstumsbedingungen ausgefüllt werden. Es ist auch bekannt, Zellen in gelartigen Trägermaterialien zu immobilisieren. Matrixmaterial und Zellen werden spezifisch danach ausgewählt, ob ein knöchernes oder ein Knorpelgewebe implantiert werden soll.

Implantate, die an der Grenzfläche von zwei oder mehr unterschiedlichen Gewebetypen eingesetzt werden sollen, sind optimalerweise bi- oder mehrphasisch aufgebaut, um den Anforderungen aller jeweiligen Umgebungsgewebe gerecht zu werden, mit denen das Implantat in Kontakt kommt.

Bereits bekannte biphasische Implantatmaterialien für osteochondrale Defekte bestehen jeweils aus zwei gänzlich unterschiedlichen Material-Komponenten, die dann zu einem Werkstück zusammengesetzt werden. Für die Knochenmatrix werden z. B. poröse

Calciumphosphat-Keramiken (β -TCP) und für die Knorpelmatrix Gele verwendet. Das Problem dieser zusammengesetzten Implantate ist die Verbindung der unterschiedlichen Komponenten. Nach dem Stand der Technik erfolgt diese z. B. durch Verklebung mit Fibrinkleber, welche allerdings den im Gelenk auftretenden Scherbelastungen auf Dauer nicht gewachsen ist.

DE 197 21 661 beschreibt beispielsweise ein Knochen-Knorpel-Implantat, welches aus einer Vielzahl von regelmäßig in einem Gitter angeordneten Stäben besteht. Die Verbindung der Gitterstrukturen geschieht zum einen durch Kleben und zum anderen durch Verschmelzen bzw. Schweißen der Gittermaterialien. Letzteres schafft einen festeren Verbund, setzt aber entsprechende Materialien voraus.

In der WO 97/46665 nach Fig. 2 ist ein biphasisches Implantat beschrieben. Eine Kammer wird an einer Seite von einer porösen Knochenmatrix abgeschlossen. Die Kammer wird mit Knorpelzellen besiedelt. Die Knorpelzellen wachsen in die Knochenmatrix ein. Dadurch und durch die Produktion der Knorpelmatrix entsteht ein fester Verbund beider Schichten, ohne dass eine Klebeverbindung erforderlich wäre. Die Besiedelung mit den Knorpelzellen muss vor der Operation erfolgen.

Aufgabe der Erfindung ist es, ein Implantat zur Behandlung von osteochondralen Defekten anzugeben, bei dem Knochen- und Knorpelmatrix fest miteinander verbunden sind.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Implantat mit wenigstens zwei übereinanderliegenden Schichten, darunter einer porösen Knochenmatrix und einer porösen Knorpelmatrix, wobei die Schichtmaterialien an den Grenzflächen der sich berührenden Schichten lokal vermischt sind.

Die lokale Vermischung bewirkt ein Ineinandergreifen der Schichten an ihren Berührungsstellen bis hinunter zur molekularen Ebene. In einem schmalen Bereich durchdringen sich die Schichtmaterialien. Im Grenzflächenbereich liegen vergleichsweise ähnliche Verknüpfungen der Matrixmoleküle vor wie innerhalb der Schichten. Hierdurch werden die Schichten auch ohne Kleber stark miteinander verbunden. Die Verbindung ist auch auf Scherkräfte belastbar.

Ein solches Implantat mit wenigstens zwei Schichten, darunter eine poröse Knochen- und eine poröse Knorpelmatrix, wird erfindungsgemäß hergestellt mit den Schritten

a) Herstellen der einzelnen Schichten bzw. des jeweiligen Schichtmaterials, wobei wenigstens eine Schicht bzw. ein Schichtmaterial mit einem Lösungsmittel, das wenigstens die

Oberflächen der anderen Schichten anlösen kann, in einen pastösen oder flüssigen Zustand überführt wird,

- b) Übereinanderlegen oder -schichten der Schichten bzw. Schichtmaterialien und
- c) Gefriertrocknen des Verbundes.

Dadurch, dass die Schichten zumindest teilweise in fließfähiger oder pastöser Form vorliegen und ein Lösungsmittel enthalten, das auch die Oberfläche der benachbarten Schicht anlösen kann, vermischen sich die Schichten lokal an den sich berührenden Grenzflächen.

Das Lösungsmittel der Schichten ist dabei so ausgewählt, dass es während des Gefriertrocknens, d. h. durch das Anlegen eines Vakuums an das eingefrorene Material, direkt aus dem gefrorenen Zustand in den gasförmigen Zustand übergeht. Neben Wasser sind Essigsäure und Cyclohexan weitere bevorzugte Lösungsmittel.

Die Porengröße der Matrixschichten wird dabei vorzugsweise durch Einfrieren eingestellt. Durch Gefriertrocknen bleiben an den Stellen, an denen im gefrorenen Zustand Lösungsmittelkristalle enthalten waren, Poren zurück. Es wird ein schwammartiger, schaumstoffähnlicher Werkstoff gebildet, der eine Vielzahl statistisch verteilter Poren enthält, die in einem nach außen offenen Porensystem angeordnet sind. (s. a. M. Gelinsky, U. König, A. Sewing, W. Pompe: Poröse Scaffolds aus mineralisiertem Kollagen – ein biomimetisches Knochenersatzmaterial. Materialwiss. Werkstofftech. 2004, 35, 229-233).

Das Implantat kann vorteilhaft beliebig geformt sein und damit in seiner äußeren Geometrie an die Größe und Struktur des zu ersetzenden Knochen- und Knorpel-Gewebes angepasst werden.

Das erfindungsgemäße Implantat ist im feuchten Zustand elastisch und passt sich damit der Defektgeometrie an, was einen guten Kontakt zwischen den Geweben und dem Implantatmaterial garantiert. Außerdem erlaubt die Elastizität eine Vorkultivierung mit Zellen unter zyklischer mechanischer Stimulation. Seine Druckfestigkeit ist höher als bei konventionell hergestellten, unvernetzten Kollagenschwämmchen vergleichbarer Porosität, deren Poren zumeist bereits beim Anfeuchten kollabieren; es wird daher bevorzugt für die Therapie kleinerer bis mittlerer Defekte verwendet. In zyklischen Druckexperimenten weist ein Implantat mit Zylindergeometrie bei einer 30%igen uniaxialen Kompression in Richtung der Zylinderachse bevorzugt einen E-Modus von 10-40 kPa, besonders bevorzugt 15 bis 25 kPa auf.

Das Implantat ist porös, mit nach außen offenen und interkonnektierenden Poren, vorzugsweise komplett resorbierbar und kann entweder zellfrei, oder aber *in vitro*

vorbesiedelt mit einem oder mehreren Zelltypen implantiert werden. Die durchschnittliche Porengröße beträgt bevorzugt mindestens 80 µm, besonders bevorzugt 100 bis 200 µm, ein Durchmesser, der optimal für die Besiedlung mit Zellen ist. Knochenanteil und Knorpelanteil weisen bevorzugt eine vergleichbare Porosität auf (gleiche durchschnittliche Porengröße, Verteilung der Poren). Unter resorbierbarem Material ist hier und im folgenden Text zu verstehen, dass das Material nach der Implantation im Körper langsam durch biologische oder chemische Prozesse abgebaut wird bzw. sich langsam auflöst. Eine partielle Resorption des Materials kann auch während der Zellkultivierung *in vitro* einsetzen.

Das Implantat wird binnen 3 bis 24 Wochen, bevorzugt zwischen 4 und 8 Wochen, im Körper vollständig resorbiert und zu lebendem Gewebe umgebaut.

Zur Behandlung eines osteochondralen Defektes wird der nicht-mineralisierte Knorpelersatzanteil vorzugsweise mit autologen Knorpelzellen (Chondrozyten) besiedelt. Der Knochenanteil wird in einer besonderen Ausführungsform mit autologen Knochenzellen (Osteoblasten) oder auch autologen mesenchymalen Stammzellen des Patienten vorbesiedelt.

Die Knochenmatrix besteht im wesentlichen aus fibrillärem Kollagen Typ I, welches vorzugsweise mit Calciumphosphat, besonders bevorzugt mit Hydroxylapatit (HAP), mineralisiert ist – und imitiert damit die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix des Knochengewebes.

Das mineralisierte Kollagen wird bevorzugt nach dem bereits aus EP0945146 oder EP0945147 bekannten Verfahren hergestellt.

Die Knorpelmatrix besteht bevorzugt aus fibrillärem, nicht-mineralisiertem Kollagen Typ I und/oder Kollagen Typ II oder Hyaluronsäure bzw. Hyaluronsäure-Derivaten oder aus einem Komposit aus Kollagen und Hyaluronsäure oder Hyaluronsäure-Derivaten und gegebenenfalls weiteren Bestandteilen der extrazellulären Knorpelmatrix, wie Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat und/oder Heparansulfat.

Bevorzugt wird der Komposit aus fibrillärem Kollagen und Hyaluronsäure dadurch gebildet, dass die Hyaluronsäure während der Fibrillogenese des Kollagens anwesend ist und damit zumindest teilweise in die sich während der Fibrillogenese bildenden Kollagenfibrillen eingebaut wird. Dadurch entsteht ein Kompositmaterial, in dem beide Komponenten homogen verteilt und miteinander verbunden sind.

Das Kollagen für die Knochenmatrix ist bevorzugt vom Typ I, welches als humanes Kollagen rekombinant hergestellt oder aus Rindersehnen oder anderen tierischen Quellen isoliert wurde

und zur klinischen Anwendung zugelassen ist. Bevorzugt wird ein säurelösliches Kollagen gewählt, wie z. B. säurelösliches bovines Kollagen I des Herstellers Syntacoll (Saal/Donau, Deutschland).

Das Kollagen für die Knorpelmatrix ist bevorzugt vom Typ I oder II oder eine Mischung beider Typen. Es wird als humanes Kollagen ebenfalls bevorzugt rekombinant hergestellt oder aus Kalbshaut bzw. anderen tierischen Quellen isoliert und sollte zur klinischen Anwendung zugelassen sein, wie beispielsweise das Produkt Collaplex 1.0 des Herstellers GfN (Waldmichelbach, Deutschland).

Die Hyaluronsäure für die Knorpelmatrix ist bevorzugt eine durch Mikroorganismen (z. B. *Streptococcus equi*) hergestellte. Der Begriff Hyaluronsäure schließt dabei auch ihre Salze mit ein, wie z. B. das von Fa. Fluka angebotene Produkt Hyaluronsäure Natriumsalz mit einer Löslichkeit in Wasser von 5 mg/ml. Bevorzugte Hyaluronsäure-Derivate sind Hyaluronsäure-Ester (z. B. Benzylester).

In einer besonderen Ausführungsform des Implantats liegt zwischen den Schichten für den Knochenersatz und für den Knorpelersatz eine filmartige, aus resorbierbaren Biopolymeren bestehende porenlose bzw. -arme Zwischenschicht.

Die Zwischenschicht besteht dabei bevorzugt aus einem Biopolymer, das wenigstens an der Oberfläche vom Lösungsmittel der Schichten für den Knochenersatz und den Knorpelersatz anlösbar ist. Dadurch sind die Materialien der sich berührenden Schichten an den jeweiligen Grenzflächen ebenfalls lokal vermischt.

Bevorzugt besteht die Zwischenschicht aus einer Folie aus Hyaluronsäure oder Hyaluronsäure-Derivaten oder einer Folie aus einem anderen Glycosaminoglycan, wie z. B. Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat und Heparansulfat. Die Zwischenschicht wird bevorzugt an Luft getrocknet. Sie ist dabei im Vergleich zur Knochen- bzw. Knorpelmatrix weitgehend porenlos und dadurch für Chondrozyten und/oder Osteoblasten bzw. mesenchymale Stammzellen undurchlässig. Sie erfüllt damit eine Doppelfunktion. Hinsichtlich der Festigkeit des Implantats verbindet sie und in Bezug auf das Einwachsen der Zellen wirkt sie als Trennschicht.

In einer vorzugsweisen Ausführung enthält das Implantat eine Stützstruktur mit Öffnungen. Die Stützstruktur versteift das Implantat. Durch die Öffnungen können sich die Schichtmaterialien direkt berühren und ebenfalls lokal vermischen.

Bevorzugt wird als Stützstruktur ein zwei- oder dreidimensionale Gestick aus resorbierbaren und biokompatiblen Polymerfasern (bevorzugt aus Poly-L-lactid, Poly-DL-lactid, Polyglykolid, Polyhydroxybutyrat oder Copolymeren aus diesen) eingesetzt.

In einer weiteren Ausführungsform besteht die Stützstruktur aus einem mit Fasern beflockten Trägermaterial gemäß DE 103 12 144.7, wobei der Abstand zwischen den Flockfasern so dimensioniert sein muss, dass die flüssigen Matrixmaterialien die Zwischenräume vollständig ausfüllen können. Der bevorzugter Abstand der Fasern liegt hierbei bei ca. 200-1000 µm.

Durch die parallele Anordnung der Flockfasern wird eine mechanische Stabilisierung in Richtung der Fasern erreicht.

Als Materialien des Basismaterials, der Fasern und des Klebstoffs kommen grundsätzliche alle in DE 103 12 144.7 genannten resorbierbaren Materialien in Betracht.

Bevorzugte Materialien für die Fasern sind Polyhydroxybutyrate oder Polylactide und als Klebstoff findet bevorzugt Gelatine Verwendung.

Das Trägermaterial gemäß DE 103 12 144.7 besteht dabei bevorzugt aus einer Schicht eines Basismaterial, welches auf einer Seite mit Fasern beflockt ist. Bevorzugt besteht das Basismaterial selbst aus einem Tape aus mineralisiertem Kollagen und bildet die unterste Schicht des Knochenersatzanteils. Der poröse Knochenersatzmaterialanteil liegt dabei bevorzugt auf dem Tape aus mineralisiertem Kollagen auf und umgibt die Fasern, bevorzugt jedoch nur den unteren Teil oder die unteren Enden (d. h. die Enden der Fasern, die mit dem Basismaterial verbunden sind). Die Knorpelersatzanteilschicht schließt sich dabei bevorzugt so an die Knochenersatzmaterialanteilschicht an, dass ein Teil der Fasern oder die Spitzen der Fasern noch in die Knorpelmatrix hineinragen.

In einer besonderen Variante des erfindungsgemäßen Implantats enthält der Knochenersatzanteil und/oder der Knorpelersatzanteil Wirkstoffe, wie z. B. pharmazeutische Stoffe, Aminosäuren oder Aminosäurederivate, Peptide, Proteine, Wachstumsfaktoren, Cytokine, Antikörper, Oligonukleotide, cDNA, DNA-Fragmente, Nukleinsäuren oder Nukleinsäurederivate.

Vorteilhaft lassen sich mit dem Verfahren leicht Implantate in beliebiger Form und Größe und somit – für die Herstellung von Implantaten für osteochondrale Defekte – auch mit einem individuellen Dicke-Verhältnis von Knochenersatzanteil und Knorpelersatzanteil erzeugen.

Das Übereinanderschichten geschieht bevorzugt durch Übereinandergießen in einem dreidimensionalen Behälter. Zum Zeitpunkt des Übereinanderschichtens liegen dazu die Matrixmaterialien bevorzugt in pastöser oder flüssiger Form vor.

Geometrie und Größe des Implantats werden durch die Geometrie und Größe des zum Übereinanderschichten der Schichten verwendeten Behälters bestimmt, der vorteilhaft beliebig geformt sein kann. Außerdem kann sowohl der eingefrorene Körper (vor der Gefriertrocknung) als auch das gefriergetrocknete Implantat durch Schneiden, Fräsen, Bohren oder dergl. bearbeitet werden und damit die Größe und Form des Implantats vorteilhaft weiter angepasst werden.

Die Mikrostruktur der Poren, insbesondere die Porengröße, des Implantats ist abhängig von der Größe der während des Einfrierens gebildeten Lösungsmittelkristalle. Diese kann vorteilhaft durch Geschwindigkeit und Temperatur des Einfrierens eingestellt werden. Poren mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 100 bis 250 μm , der optimal für das Einwachsen von Zellen ist, werden vorteilhaft durch langsames Einfrieren bei -5°C bis -50°C , vorzugsweise -15°C bis -35°C gebildet. Das langsame Einfrieren wird beispielsweise dadurch erreicht, dass der übereinandergeschichtete Knochersatzanteil und der Knorpelersatzanteil, bzw. der Behälter, der diese enthält, in einen auf die entsprechende Temperatur vortemperierten Gefrierschrank gestellt wird.

Die Mikrostruktur der Poren wird auch durch den Lösungsmittelgehalt der Schichten für den Knochersatzanteil und den Knorpelersatzanteil beeinflusst. Um die gewünschte, hohe Porosität zu erhalten, enthalten beide Schichten vor dem Einfrieren bevorzugt 75 bis 98%, besonders bevorzugt 80 bis 90% Lösungsmittel

In einer besonderen Variante des Verfahrens wird zunächst die eine Schicht in einen Behälter gegossen und eingefroren. Vor oder bei dem Übereinanderschichten mit der zweiten Schicht wird dann die erste (gefrorene) Schicht an der Oberfläche angetaut. Die zweite Schicht vermischt sich dann lokal mit der angetauten Oberfläche. Die zweite Schicht wird dazu entweder auf die angetaute Oberfläche gegossen, oder selbst etwas erwärmt, so dass die Oberfläche der ersten Schicht durch das Übereinanderschichten selbst angetaut wird. Bevorzugt wird hier die gefrorene Schicht vor dem Übereinandergießen durch Schneiden, Fräsen, Bohren oder dergl. an die gewünschte Form angepasst. Diese Variante hat damit den Vorteil, dass die Verbundfläche zwischen Knochenersatzanteil und Knorpelersatzanteil beliebig dreidimensional gestaltet und damit an die natürliche Form des Gelenks angepasst

werden kann. Darüberhinaus kann durch eine dreidimensionale Verbundfläche die Festigkeit des Implantats gegenüber einer zweidimensionalen Verbundfläche erhöht werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird das nach der Gefriertrocknung erhaltene Implantat chemisch quervernetzt, um die Schichten durch die Einführung chemischer Bindungen in sich zu stabilisieren und fest miteinander zu verknüpfen. Die Einführung chemischer Bindung geschieht bevorzugt mit einem chemischen Crosslinker, wie z. B. Glutaraldehyd oder einem Carbodiimid-Derivat, besonders bevorzugt mit EDC (N-Dimethylaminopropyl-N'-ethyl-carbodiimid Hydrochlorid). Durch EDC als chemischen Crosslinker werden beispielsweise Aminogruppen des Kollagens kovalent mit Carboxylgruppen zu Amidbindungen verknüpft sowie Carboxylgruppen des Kollagens bzw. der Hyaluronsäure kovalent mit Hydroxylgruppen der Hyaluronsäure zu Esterbindungen verknüpft.

Zur mechanischen Verstärkung kann eine Stützstruktur, bevorzugt aus resorbierbaren und biokompatiblen Polymerfasern (bevorzugt aus Poly-L-lactid, Poly-DL-lactid, Polyglykolid, Polyhydroxybutyrat oder Copolymeren aus diesen), in das Implantat eingebracht werden. Hierzu wird eine zwei-, oder dreidimensionale Faserstruktur, bevorzugt erzeugt durch Sticken, vor dem Einfüllen der ersten Phase in die Form gelegt. Die gießfähige Lösung oder Suspension der ersten Phase wird nun so darübergelassen, dass die Zwischenräume zwischen den Fasern ausgefüllt werden. Hierzu kann auch ein leichter Unterdruck angelegt oder aber kurz zentrifugiert werden. Anschließend wird wie beschrieben die zweite Phase darübergeschichtet, das Konstrukt eingefroren und gefriergetrocknet. Die Faserstruktur kann sich entweder im gesamten Implantat befinden oder aber nur in einer der beiden Phasen.

Zur Herstellung eines Implantates, welches ein mittels Flocktechnik hergestelltes Trägermaterial gemäß DE 103 12 144.7 enthält, wird entsprechend verfahren: das Trägermaterial wird, mit dem Basismaterial nach unten, in die Form gelegt, in welcher das Implantat hergestellt werden soll. Dann werden, wie beschrieben, die beiden Lösungen oder Suspensionen nacheinander übereinandergelassen. Zum besseren Eindringen der Lösungen oder Suspensionen in die Faserzwischenräume kann ein leichter Unterdruck angelegt oder aber kurz zentrifugiert werden. Die Flockfasern können entweder das Implantat in seiner gesamten Höhe durchdringen, oder aber nur einen Teil derselben. In direktem Kontakt mit dem Basismaterial kann sich entweder der Knochenersatzanteil, oder aber der Knorpelersatzanteil befinden.

Zur Herstellung von Implantaten, welche mit Wirkstoffen funktionalisiert worden sind, können verschiedene Verfahren angewendet werden. Die Wirkstoffe können entweder einer oder beiden Phasen vor dem Übereinanderschichten zugegeben werden, oder aber nach dem ersten Gefriertrocknen (und damit noch vor der chemischen Quervernetzung). Die Wirkstoffe können in fester Form in den Lösungen oder Suspensionen suspendiert werden – oder aber als Lösung auf das gefriergetrocknete Implantat aufgebracht werden. Empfindliche Wirkstoffe, insbesondere Wachstumsfaktoren, welche durch die Prozessschritte in ihrer biologischen Wirksamkeit beeinträchtigt werden könnten, werden bevorzugt erst nach der chemischen Quervernetzung und der zweiten Gefriertrocknung aufgebracht. Eine weitere Variante stellt die Funktionalisierung des Implantats mit Wirkstoffen direkt vor der Operation dar: in diesem Fall wird der Wirkstoff oder werden die Wirkstoffe in steriler Form auf das gleichfalls sterile Implantat aufgebracht, bevorzugt als Lösung aufgetropft. Der Knochenersatzanteil und der Knorpelersatzanteil kann in allen Fällen entweder mit den selben Wirkstoffen funktionalisiert werden, oder aber mit verschiedenen – oder aber es wird nur der Knochen- oder der Knorpelersatzanteil mit einem oder mehreren Wirkstoffen funktionalisiert.

Anhand der nachfolgend beschriebenen Figuren und Ausführungsbeispiele wird die Erfindung näher erläutert. Im einzelnen sind dies:

Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung eines osteochondralen Defektes **A**, bei dem sowohl der Gelenkknorpel **B** als auch der darunterliegende (subchondrale) Knochen **C** betroffen ist.

Fig. 2 zeigt links schematisch den Aufbau eines biphasischen Implantates für osteochondrale Defekte mit Zylinder-Geometrie, welches aus einer Knorpelmatrix **1** und einer Knochenmatrix **2** aufgebaut ist. Die Knorpelmatrix **1** besteht aus einem Kollagen-Hyaluronsäure-Komposit, die Knochenmatrix **2** aus mineralisiertem Kollagen. Rechts ist in Form eines Längsschnittes schematisch der Aufbau eines individuell geformten, biphasisches Implantates dargestellt, bei welchem die Knochenmatrix **2** nur mit Teilbereichen des Knorpelmatrix **1** verbunden ist.

Zur Herstellung dieser Implantate gemäß Fig. 2 wird für den Aufbau der Knochenmatrix **2** zunächst eine Suspension aus mineralisierten Kollagen-Fibrillen und für die Knorpelmatrix **1** eine Suspension aus Kollagen-Hyaluronsäure hergestellt.

a.) Herstellung der Suspension aus mit Hydroxylapatit mineralisierten Kollagen-Fibrillen:

In einem 2 l Erlenmeyerkolben wird dazu 1 g säurelösliches Kollagen (Kollagen Typ I isoliert aus Rindersehnen der Fa. Innocoll in Saal/Donau, Deutschland) in 1 l 10 mmol/l HCl

(hergestellt aus 100 ml 0,1 mol/l HCl und 900 ml deionisiertem Wasser) unter kräftigem Rühren (großer Rührfisch/Magnetrührer) gelöst. Unter kräftigem Rühren wird nun der Reihe nach zugegeben:

- 1) 180 ml 0,1 mol/l CaCl₂-Lösung
- 2) 120 ml 2 mol/l NaCl-Lösung
- 3) 168 ml 0,5 mol/l TRIS-Pufferlösung (pH = 7,5)
- 4) 500 ml deionisiertes Wasser
- 5) 22,6 ml Phosphatpuffer nach Sørensen (0,5 mol/l; pH = 7,4)

Bei der Zugabe des Phosphatpuffers tritt eine milchige, farblose Trübung der Lösung auf (ausfallende Calciumphosphate). Zum Schluß wird mit deionisiertem Wasser auf 2,0 l aufgefüllt. Nachdem noch für etwa 1 min. kräftig gerührt wurde, verschließt man den Kolben mit Parafilm oder Alu-Folie und stellt ihn für 12-24 h in ein auf 35°C temperiertes Wärmebad.

Das mineralisierte Kollagen wird durch Zentrifugation abgetrennt. Hierzu wird der gallertartige Niederschlag kräftig aufgerührt und dann in geeignete Zentrifugenröhrchen (z. B. Metall-Becher für 200 ml oder Glasröhrchen für 50 ml) gefüllt. Es wird für 15 min bei 2500 U/min in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert (um eine Erwärmung des Produktes zu verhindern) und dann vom Überstand abgegossen; hierbei werden 120 ml des Überstandes für die spätere Verwendung aufbewahrt. Nun wird von der Kollagen-Suspension nachgefüllt und die Zentrifugation so oft wiederholt, bis alle 2 l entsprechend behandelt worden sind. Nach dem letztmaligen Abgießen des Überstandes werden die Pellets mit einem Löffel spatel aus den Röhrchen geholt und in einem 125 ml Becherglas gesammelt. Unter Rühren mit einem schweren Rührfisch wird nun gerade soviel Mutterlauge tropfenweise zugegeben, bis eine gießfähige Suspension entsteht.

Dieses Verfahren zur Herstellung von mineralisiertem Kollagen entspricht im wesentlichen EP0945146 (J.-H. Bradt, K. Weis, W. Pompe). Alternativ wird das mineralisierte Kollagen ausgehend von rekombinatem Kollagen nach dem in EP0945147 beschriebenen Verfahren hergestellt.

b.) Herstellung der Suspension aus Kollagen und Hyaluronsäure:

Für den Aufbau des Knorpelersatzanteils 1 wird zunächst eine Suspension aus Kollagen und Hyaluronsäure mit 20 Gew.-% Hyaluronsäure hergestellt. Dazu werden 200 mg Hyaluronsäure (Hyaluronsäure Natriumsalz aus *Streptococcus equi*, Fa. Fluka

(Sigma/Aldrich, Taufkirchen) in 40 ml deionisiertem Wasser gelöst und für 1 h gerührt, bis eine farblose, transparente Suspension hoher Viskosität entstanden ist.

In der Zwischenzeit wird 1 g säurelösliches Kollagen (z. B. Collaplex 1.0, aus Kalbshäuten isoliertes Kollagen Typ I des Herstellers GfN, Waldmichelbach) zu 1 l 10 mM HCl in einen Erlenmeyerkolben gegeben und unter Rühren gelöst (Magnetrührer). Danach werden 80 ml Phosphatpuffer nach Sörensen (0,5 M; pH = 7,4) und 130 ml 2 M NaCl zugegeben, die Lösung wird mit 750 ml deionisiertem Wasser aufgefüllt und nochmals verrührt. Unter kräftigem Rühren wird die Hyaluronsäure-Lösung zugegeben. Der Kolben wird anschließend für etwa 14 h in ein auf 37°C temperiertes Wärmebad gestellt. Der hierbei entstehende Komposit aus fibrillärem Kollagen und Hyaluronsäure fällt als unlöslicher Niederschlag aus. Die Suspension wird aufgerührt, in geeignete Zentrifugen-Gläser abgefüllt und für 15 min bei 2500 U/min zentrifugiert. Vom anfallenden Überstand werden etwa 100 ml aufbewahrt. Die durch die Zentrifugation erzeugten Pellets aus dem Kollagen-Hyaluronsäure-Komposit werden in einem Becherglas mit gerade soviel Überstand gründlich verrührt (Magnetrührer), bis eine homogene und pipettierfähige Suspension entsteht.

c.) Herstellung des biphasischen, porösen Implantats:

Zur Herstellung des biphasischen, porösen Implantates wird nun zunächst ca. 1 ml der gemäß a) hergestellten Suspension aus mineralisierten Kollagen-Fibrillen mit einer Pipette in die Vertiefung einer 24er Wellplatte gegeben. Darauf wird nun vorsichtig und so, dass sich die beiden Phasen nicht vermischen, 1 ml der unter b) beschriebenen Kollagen/Hyaluronsäure-Suspension pipettiert. Die Wellplatte wird nun bei ca. -25°C eingefroren und anschließend im Ölpumpenvakuum (ca. 0,1 mbar) gefriergetrocknet. Der hierbei entstandene poröse, schwammartige Scaffold wird aus der Wellplatte entnommen und für eine Stunde in einer 1%-igen Lösung von N-Dimethylaminopropyl-N'-ethyl-carbodiimid Hydrochlorid (EDC) in 80 Vol-% Ethanol chemisch quervernetzt. Im Anschluß an die Quervernetzung wird der Scaffold erst gründlich mit dest. Wasser, dann mit einer 1%igen, wässrigen Glycin-Lösung und zuletzt nochmals mit dest. Wasser gewaschen. Zuletzt wird das Implantat wieder eingefroren und gefriergetrocknet.

Fig. 3 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme eines Dünnschnittes in Längsrichtung durch ein – wie zu **Fig. 2** beschrieben hergestelltes – Implantat (Vergrößerung 10×). Die mineralisierte Knochenmatrix **2** (oben) ist dunkel gefärbt – die nicht-mineralisierte Knorpelmatrix **1** (unten) ist deutlich heller. Gut erkennbar ist, dass die Matrixmaterialien direkt miteinander verbunden sind und sich an der Grenzfläche **3** gegenseitig durchdringen.

Beide Phasen weisen mit einem Porendurchmesser von ca. 50-200 μm eine vergleichbare Porosität auf.

Fig. 4 zeigt eine Raster-Elektronenmikroskopieaufnahme (REM) eines Längsschnittes durch ein wie zu **Fig. 2** beschrieben hergestelltes Implantat (Vergrößerung 15 \times). Die mineralisierte (hier heller erscheinende) Knochenmatrix **2** Teil befindet sich links im Bild, die Knorpelmatrix **1** rechts. Gut erkennbar ist wieder, dass die Matrixmaterialien direkt miteinander verbunden sind und sich an der Grenzfläche **3** gegenseitig durchdringen, wobei beide Schichten eine vergleichbare Porosität aufweisen.

Fig. 5 zeigt REM Element-Mapping-Aufnahmen der Grenzfläche zwischen der mineralisierten Knochenmatrix **2** (links) und der nicht-mineralisierten Knorpelmatrix **1** (rechts) des wie zu **Fig. 2** beschrieben hergestellten Implantates. Die Abbildungen stellen jeweils einen Ausschnitt von **Fig. 4** dar (Vergrößerung: jeweils 50 \times). Die mineralisierte (hier heller erscheinende) Knochenmatrix **2** befindet sich jeweils links im Bild, die Knorpelmatrix **1** rechts.

Oben links in **Fig. 5** ist ein normales REM-Bild gezeigt (**Fig. 5A**). Oben rechts ist eine BSE-Aufnahme (**Fig. 5B** – Detektion der rückgestreuten Elektronen = backscattered electrons) abgebildet. Die im linken Bereich der **Fig. 5B** zu sehende Hellfärbung weist die Anwesenheit von Atomen höherer Ordnungszahl nach. Diese Hellfärbung ist auf die in der Knochenmatrix enthaltenen Calcium- und Phosphoratome des Calciumphosphats zurückzuführen.

Die unteren Bilder in **Fig. 5** zeigen den Nachweis von Calcium (unten links, **Fig. 5C**) und unten rechts den Nachweis von Phosphor (**Fig. 5D**) einzeln. Die Hellfärbung weist jeweils auf Calcium (**Fig. 5C**) bzw. Phosphor (**Fig. 5D**) hin.

Fig. 5 verdeutlicht die nur partielle Mineralisierung des Implantats: die Bestandteile des Calciumphosphates (Calcium und Phosphor) können nur in der mineralisierten Knochenmatrix **2** (in den Abbildungen jeweils links) nachgewiesen werden. Die Grenzfläche **3** ist nur in den **Figuren 5B-D** gut zu erkennen.

Fig. 6 zeigt eine Detailaufnahme der Grenzfläche zwischen der nicht-mineralisierten Knorpelmatrix **1** (oben) und der mineralisierten Knochenmatrix **2** (unten). Die Figur stellt einen Ausschnitt von **Fig. 4** dar (Vergrößerung: 500 \times). Deutlich sichtbar sind die hell erscheinenden Calciumphosphat-Kristallite im unteren Teil des Bildes, welche die mineralisierte Phase charakterisieren und deren Oberfläche rauher erscheinen lassen. Die oben zu sehende Knorpelmatrix **1**, bestehend aus einem Komposit aus Kollagen I und Hyaluronsäure, besitzt dagegen eine glatte Oberfläche.

Fig. 7 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt des direkten Kontaktbereichs zwischen der Knorpelmatrix **1** (oben) und der mineralisierten Knochenmatrix **2** (unten) (Vergrößerung: 1000×). Die innige Verbindung beider Phasen im Bereich der Verbundfläche **3** ist gut zu erkennen.

d.) Besiedlung des Implantats mit Chondrozyten

Zur *in vitro*-Besiedlung des Knorpelersatzanteiles mit primären humanen Chondrozyten wird ein steriles zylindrisches biphasisches Implantat mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Höhe von 6 mm (3 mm Knorpelersatz- und 3 mm Knochenersatzphase) für 24 Stunden in 5 ml modifiziertem DMEM-Zellkulturmedium (Gibco Life Technologies GmbH, Karlsruhe) eingelegt und gequollen, wobei das Medium 4 Mal gewechselt wird. Zur Zellbesiedelung wird das Implantat aus dem Medium herausgenommen und auf ein steriles Filterpapier gesetzt, so dass das Medium weitgehend aus der porösen Struktur herausgesaugt wird. Nun werden auf die oben befindliche Knorpelersatzphase 5×10^5 primäre humane Chondrozyten, suspendiert in 200 µl Zellkulturmedium, pipettiert. Nach 2 Stunden Lagerung im Brutschrank werden die besiedelten Implantate in eine 24er Wellplatte mit frischem Zellkulturmedium überführt und nach Standardbedingungen bis zur Implantation kultiviert.

e.) Herstellen eines Implantats mit einer Zwischenschicht aus einer Hyaluronsäurefolie

Zur Herstellung eines Implantats mit einer Zwischenschicht aus einer Hyaluronsäurefolie werden wie unter a.) und b.) beschrieben Suspensionen aus mineralisiertem Kollagen bzw. einem Kollagen-Hyaluronsäure-Komposit hergestellt. Eine Hyaluronsäure-Folie wird durch Eintrocknen einer gesättigten wäßrigen Lösung von Hyaluronsäure Natriumsalz aus *Streptococcus equi* (Fa. Fluka; Sigma/Aldrich, Taufkirchen) an Luft erzeugt. Hierzu wird eine Hyaluronsäure-Lösung günstigerweise in eine Petrischale gegossen. Wie unter c.) beschrieben, wird 1 ml der mineralisierten Kollagen-Suspension in die Vertiefung einer 24er Wellplatte pipettiert. Auf die Suspension wird nun ein passend zugeschnittenes Stück der Hyaluronsäurefolie gelegt, worauf wiederum die Suspension des Kollagen-Hyaluronsäure-Komposites pipettiert wird. Wie unter c.) beschrieben, wird das entstandene biphasische Konstrukt eingefroren, gefriergetrocknet, chemisch quervernetzt, gewaschen und zuletzt erneut gefriergetrocknet.

Fig. 8 zeigt schematisch den Querschnitt durch ein solches Implantat, wobei mit **1** die Knorpelmatrix (oben), mit **2** die mineralisierte Knochenmatrix (unten) und mit **4** die Hyaluronsäurefolie als Trennschicht bezeichnet sind.

f.) Herstellen eines Implantats mit einem dreidimensionalen Gestick als Stützstruktur

Wie unter a.)-c.) beschrieben wird ein biphasisches Implantat durch Übereinanderschichten zweier Suspensionen hergestellt, mit dem Unterschied, dass vor dem Einfüllen der ersten Phase in die dafür vorgesehene Form in letztere ein Gestick aus Polyhydroxybutyrat-Fäden eingelegt wird. Zum besseren Eindringen der Suspension in die Zwischenräume des Gestickes wird nach dem Aufpipettieren der beiden Suspensionen jeweils für 5 Min. für 1000 U/min zentrifugiert.

Fig. 9 demonstriert den schematischen Aufbau eines solchen Implantates in Form eines Querschnittes durch eine zylindrische Probe. Mit **1** ist die Knorpelmatrix (oben), mit **2** die mineralisierte Knochenmatrix (unten) und mit **5** das Gestick aus Polyhydroxybutyrat-Fäden bezeichnet, welches beide Phasen durchdringt.

g.) Herstellen eines Implantats mit über Flocktechnik hergestellter Stützstruktur

Analog wie unter f.) beschrieben verfährt man, wenn man ein gemäß DE 103 12 144.7 vermittels Flocktechnik hergestelltes Trägermaterial als Stützstruktur in das Implantat integrieren will. Das Trägermaterial – bestehend aus einem Basismaterial aus einer mineralisierten Kollagen-Membran, einer Klebeschicht aus Gelatine und Flockfasern aus Polyhydroxybutyrat – wird, mit dem Basismaterial nach unten, in die Vertiefung einer 24er Wellplatte gelegt, in welcher das Implantat hergestellt werden soll. Dann werden, wie unter a.)-c.) beschrieben, jeweils 1 ml der beiden Suspensionen nacheinander übereinandergossen. Zum besseren Eindringen der Suspensionen in die Faserzwischenräume wird, wie unter f.) beschrieben, kurz zentrifugiert. Weiter verfährt man wie unter c.) und f.) beschrieben.

Fig. 10 zeigt das Ergebnis als schematischen Längsschnitt, wobei mit **1** die Knorpelmatrix (oben), mit **2** die mineralisierte Knochenmatrix (unten), mit **6** das Basismaterial (Membran aus mineralisiertem Kollagen), mit **7** die Klebeschicht (Gelatine) und mit **8** die Flockfasern (Polyhydroxybutyrat) des Trägermaterials bezeichnet sind.

Patentansprüche

- 1) Implantat zur Behandlung von osteochondralen Defekten mit wenigstens zwei übereinander liegenden Schichten, darunter eine poröse Knochenmatrix (2) und eine poröse Knorpelmatrix (1), wobei die Schichtmaterialien an den Grenzflächen (3) der sich berührenden Schichten lokal vermischt sind.
- 2) Implantat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen der Knochen- und der Knorpelmatrix (2 bzw. 1) eine filmartige, aus resorbierbaren Biopolymeren bestehende, porenlose bzw. -arme Zwischenschicht (4) liegt.
- 3) Implantat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Implantat zusätzlich eine Stützstruktur mit Öffnungen enthält und die Schichtmaterialien an der Grenzfläche (3) der Schichten durch die Öffnungen der Stützstruktur miteinander vermischt sind.
- 4) Implantat nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Stützstruktur aus einem zwei- oder dreidimensionalen Gestick (5) aus resorbierbaren Polymerfasern besteht.
- 5) Implantat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Stützstruktur aus einem mit Fasern beflockten Trägermaterial (6 – 8) besteht.
- 6) Implantat nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Materialien der Schichten quervernetzt sind.
- 7) Implantat nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Knorpelmatrix (1) mit Chondrozyten und/oder die Knochenmatrix (2) mit Osteoblasten oder mesenchymalen Stammzellen besiedelt ist.
- 8) Implantat nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens eine der Schichten Wirkstoffe enthält.
- 9) Verfahren zur Herstellung eines Implantats zur Behandlung von osteochondralen Defekten mit wenigstens zwei Schichten, darunter eine poröse Knochen- und eine poröse Knorpelmatrix (2 bzw. 1), mit den Schritten
 - a) Herstellen der einzelnen Schichten bzw. des jeweiligen Schichtmaterials, wobei wenigstens eine Schicht bzw. ein Schichtmaterial mit einem Lösungsmittel, das wenigstens die Oberflächen der anderen Schichten anlösen kann, in einen pastösen oder flüssigen Zustand überführt wird,
 - b) Übereinanderschichten oder -legen der Schichten bzw. Schichtmaterialien und
 - c) Gefriertrocknen des Verbundes.

- 10) Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Knochen- und die Korpelmatrix (2 bzw. 1) direkt übereinander geschichtet werden.
- 11) Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass zwischen die Knochen- und die Knorpelmatrix (2 bzw. 1) eine Zwischenschicht (4) eingelegt wird.
- 12) Verfahren nach den Ansprüchen 9 - 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Knochenmatrix (2) im wesentlichen aus mineralisiertem Kollagen hergestellt wird.
- 13) Verfahren nach den Ansprüchen 9 - 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Knorpelmatrix (1) im wesentlichen aus nichtmineralisiertem Kollagen und/oder Hyaluronsäure bzw. -derivaten hergestellt wird.
- 14) Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Porengröße der Matrixmaterialien durch Einfrieren eingestellt wird.
- 15) Verfahren nach den Ansprüchen 9 und 11, gekennzeichnet dadurch, dass die Zwischenschicht (4) im wesentlichen aus Glycosaminoglycan hergestellt und porenlos bzw. -arm getrocknet wird.
- 16) Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Zwischenschicht (4) aus Hyaluronsäurefolie hergestellt wird.
- 17) Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Materialien quervernetzt werden.
- 18) Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass vor oder beim Übereinanderschichten oder -legen der Schichten eine Stützstruktur mit Öffnungen eingelegt wird.
- 19) Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Stützstruktur aus einem zwei- oder dreidimensionalen Gestick (5) aus resorbierbaren Polymerfasern besteht.
- 20) Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Stützstruktur aus einem mit Fasern beflockten Trägermaterial (6 - 8) besteht.
- 21) Verfahren nach einem der Ansprüche 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Knorpelmatrix (1) mit Chondrozyten und/oder die Knochenmatrix (2) mit Osteoblasten oder mesenchymalen Stammzellen besiedelt wird.

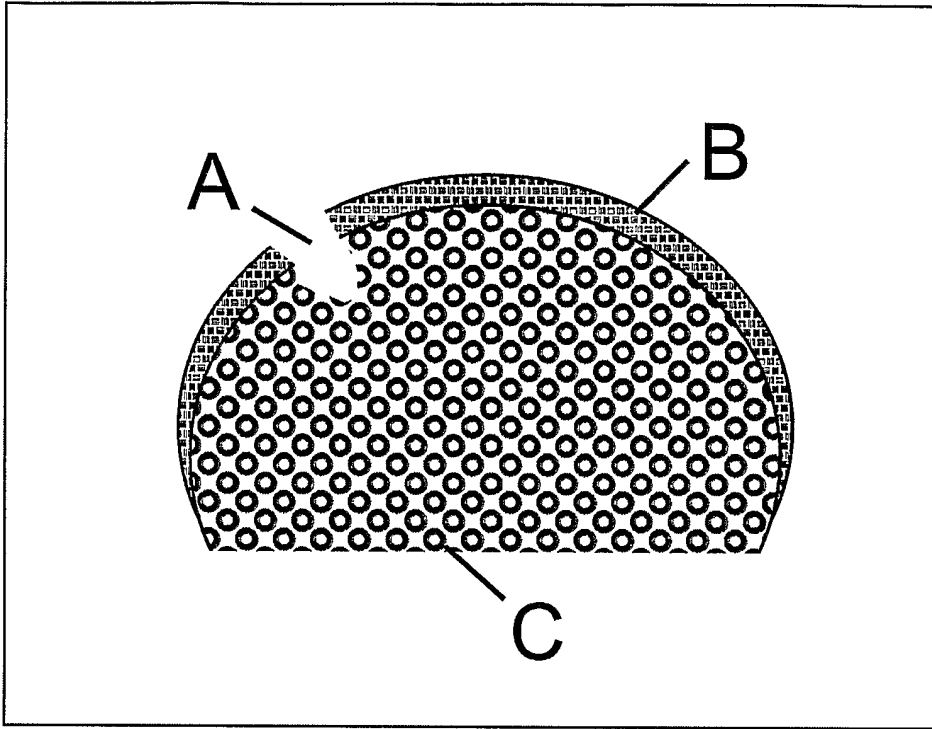


Fig. 1

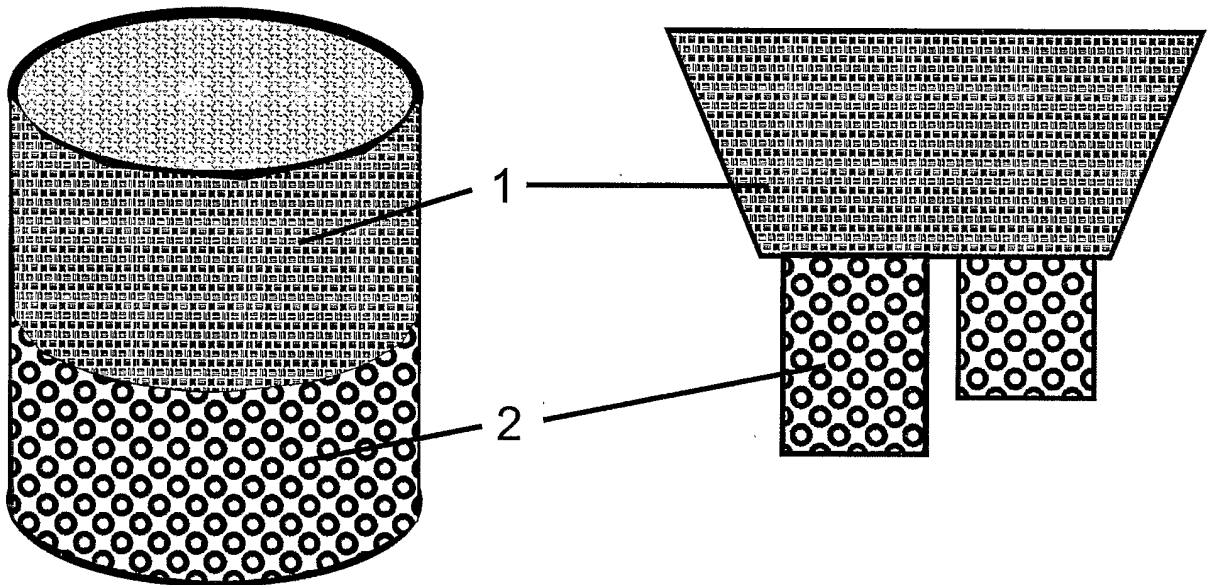


Fig. 2

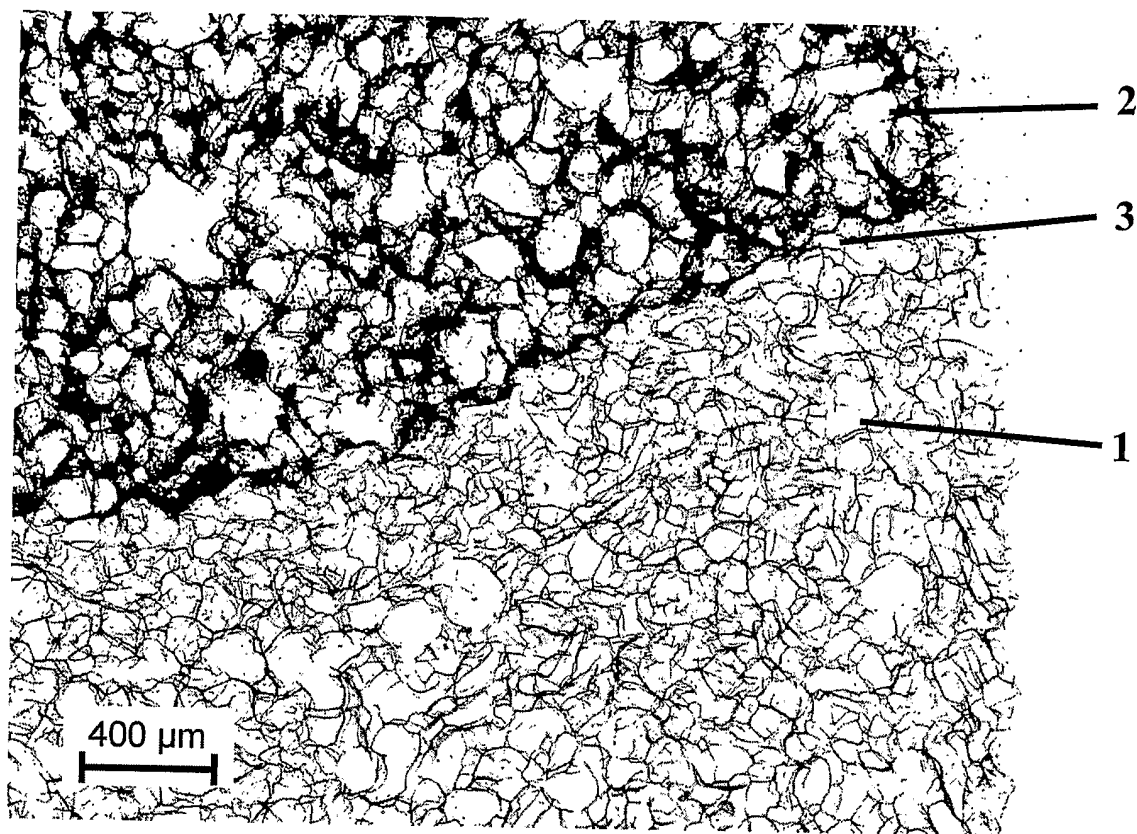


Fig. 3

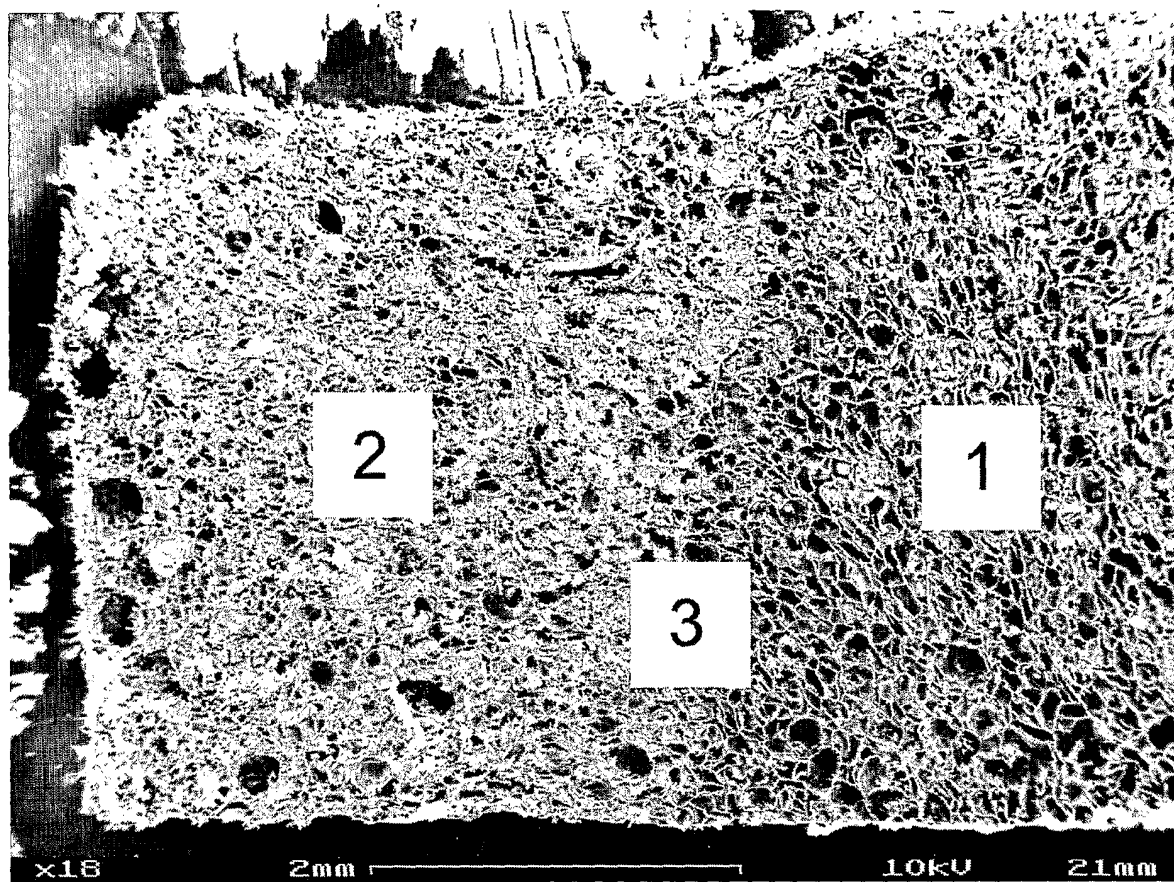


Fig. 4

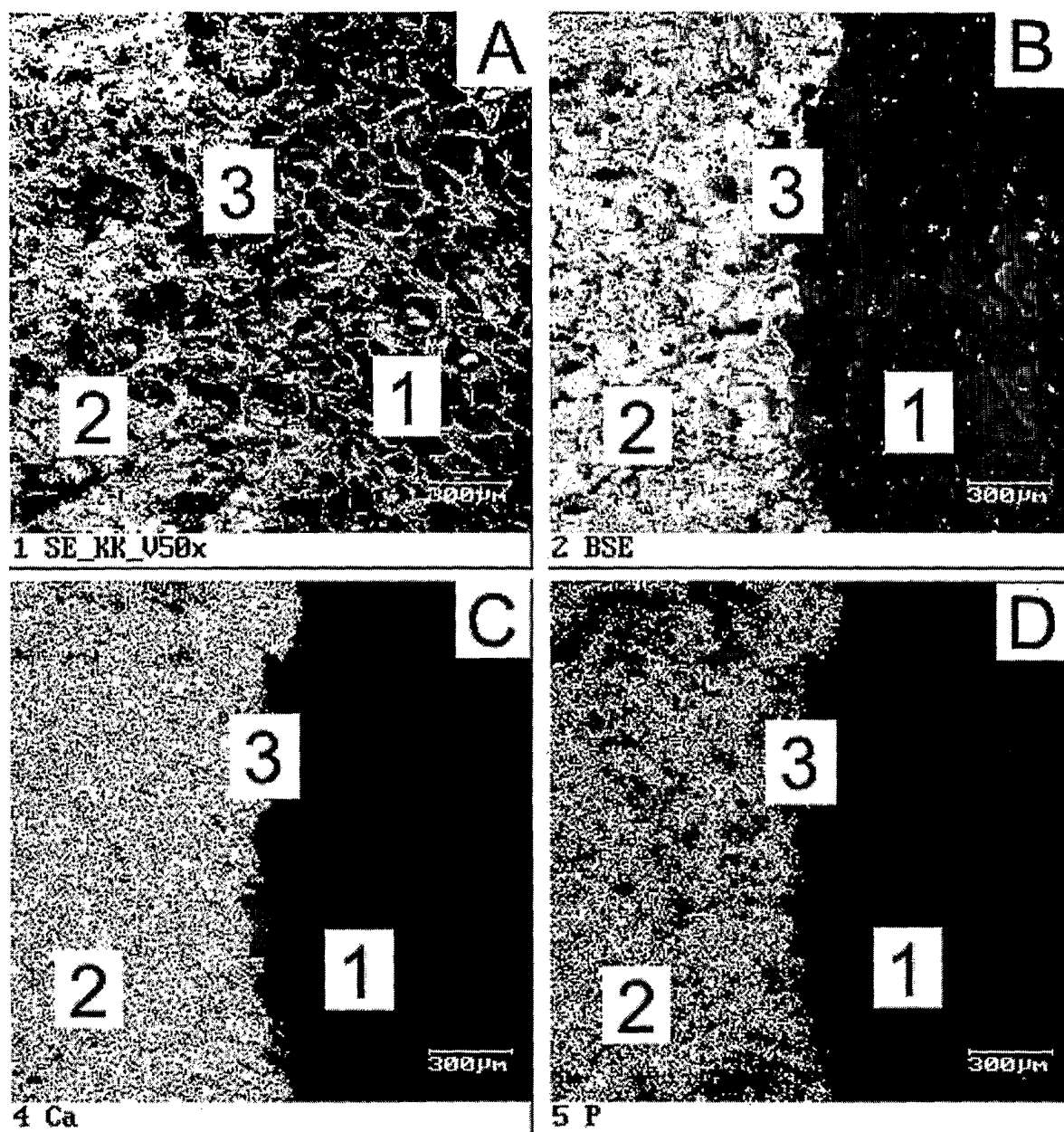


Fig. 5

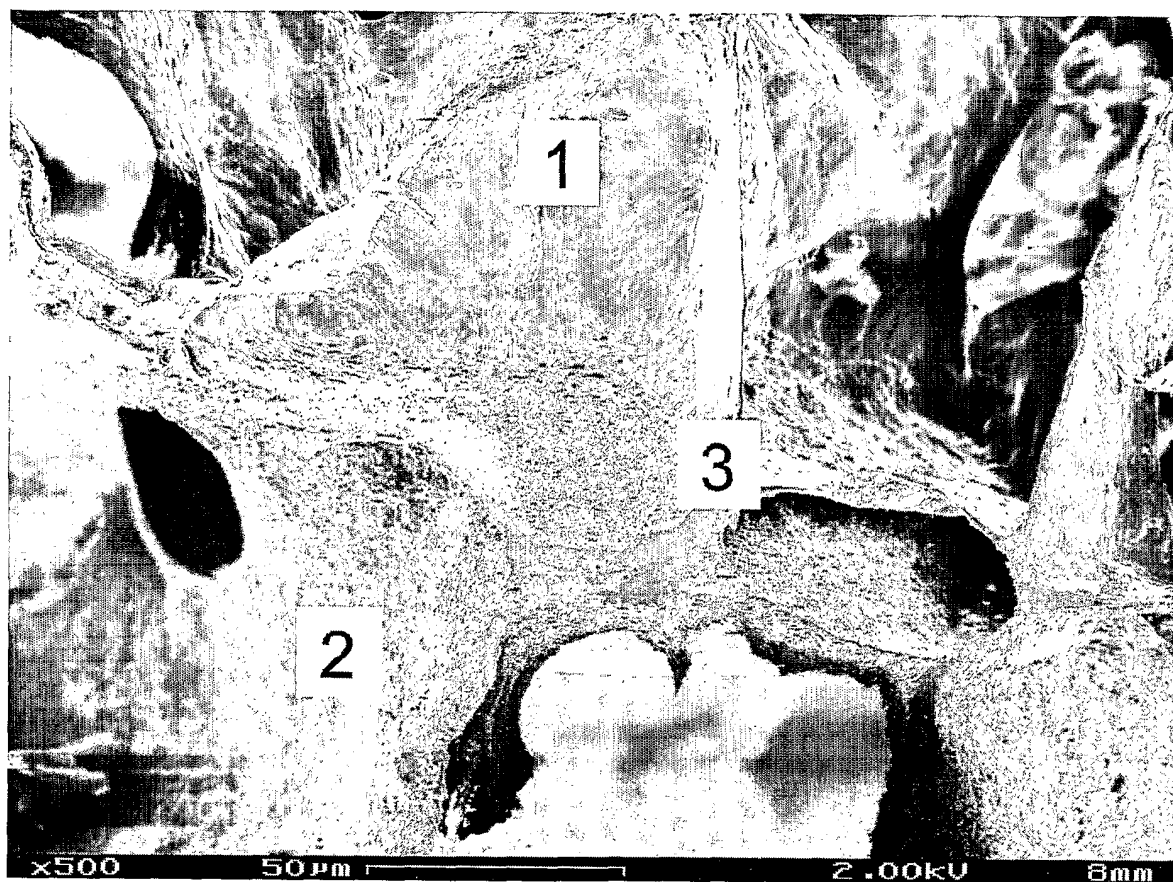


Fig. 6

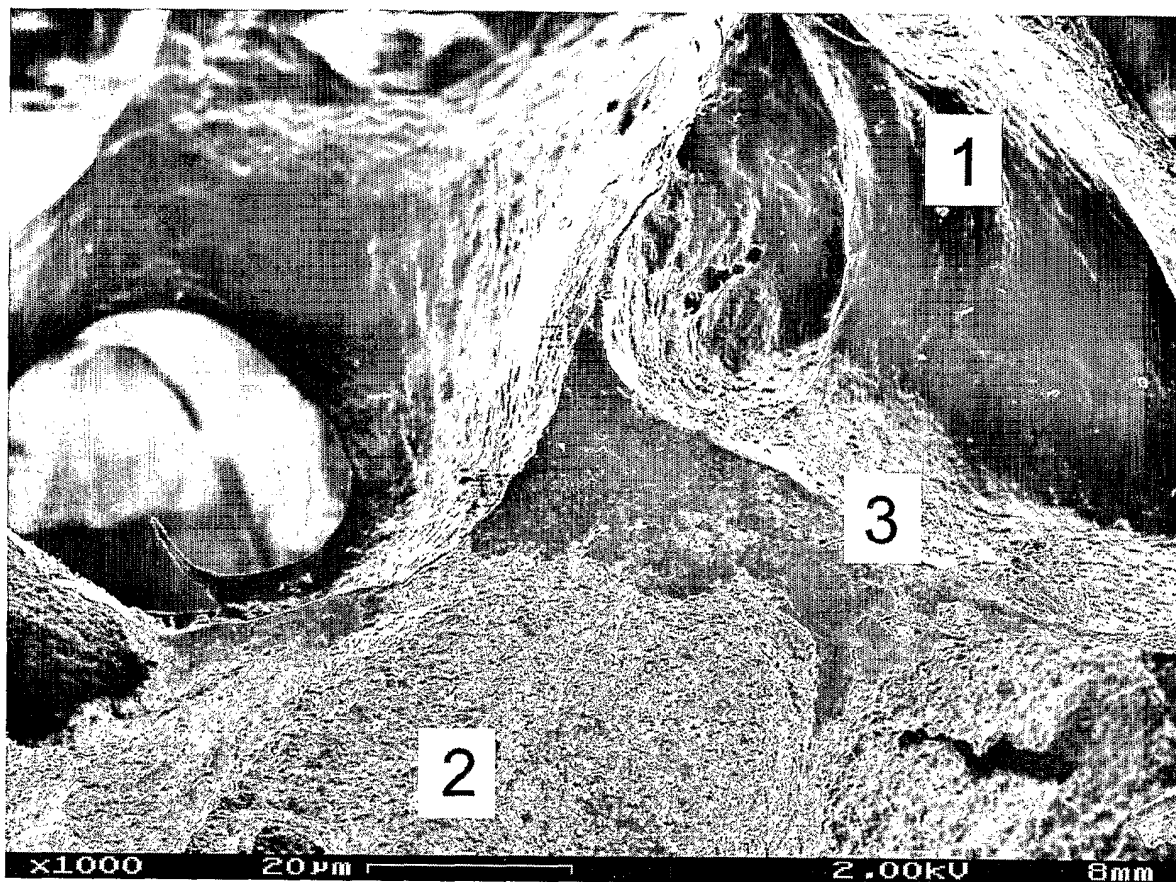


Fig. 7

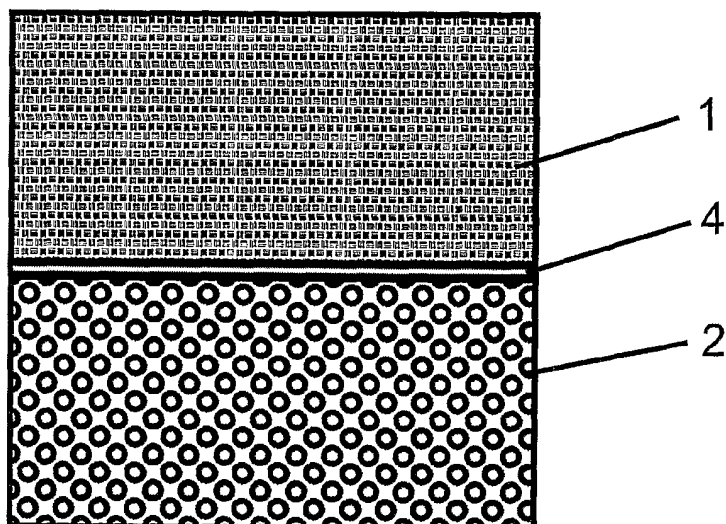


Fig. 8

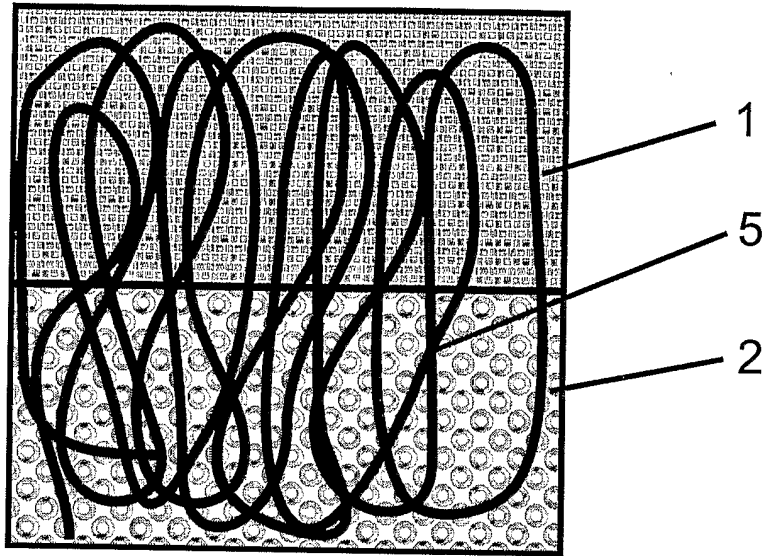


Fig. 9

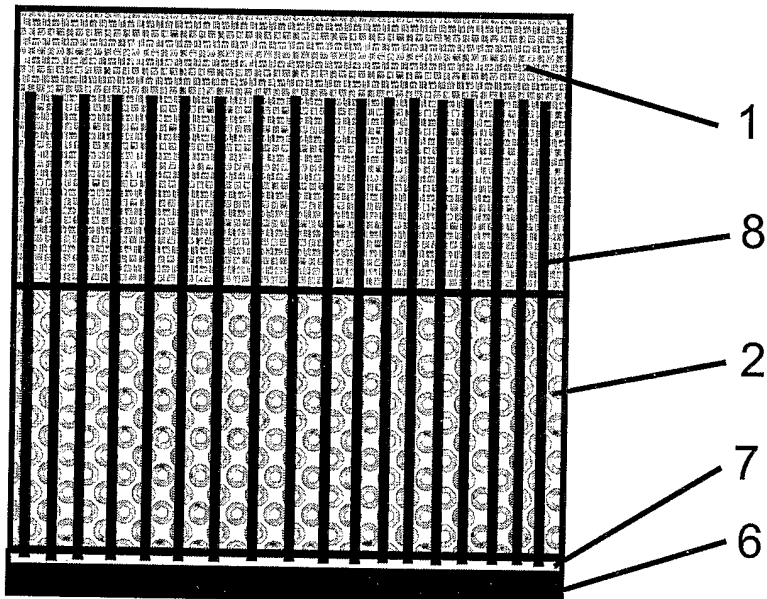


Fig. 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE2005/001585

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61F2/30 A61L27/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61F A61L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 277 450 A (ETHICON, INC) 22 January 2003 (2003-01-22) paragraph '0019! - paragraph '0037! paragraph '0053! - paragraph '0063! -----	1, 3-8
X	EP 0 505 634 A (KYOCERA CORPORATION; KABUSHIKI KAISHA BIOMATERIAL UNIVERSE) 30 September 1992 (1992-09-30) page 4, line 11 - page 5, line 39 -----	1
A	DE 199 26 083 A1 (UNIVERSITAETSKLINIKUM FREIBURG) 14 December 2000 (2000-12-14) page 2, line 31 - page 4, line 23 -----	1-21
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
° Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search <p style="text-align: center;">1 December 2005</p>	Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center;">09/12/2005</p>	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer <p style="text-align: center;">Buchmann, G</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No PCT/DE2005/001585

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1277450	A	22-01-2003	AT 290835 T 15-04-2005
			AU 4894202 A 02-01-2003
			CA 2391697 A1 28-12-2002
			DE 60203219 D1 21-04-2005
			JP 2003102755 A 08-04-2003
			US 2003004578 A1 02-01-2003
EP 0505634	A	30-09-1992	DE 69127354 D1 25-09-1997
			DE 69127354 T2 22-01-1998
			JP 3007903 B2 14-02-2000
			JP 4303444 A 27-10-1992
			US 5314478 A 24-05-1994
DE 19926083	A1	14-12-2000	AT 258072 T 15-02-2004
			AU 5679100 A 28-12-2000
			WO 0074741 A2 14-12-2000
			EP 1242129 A2 25-09-2002
			JP 2003510108 T 18-03-2003

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/001585

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 A61F2/30 A61L27/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 A61F A61L

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 1 277 450 A (ETHICON, INC) 22. Januar 2003 (2003-01-22) Absatz '0019! - Absatz '0037! Absatz '0053! - Absatz '0063! -----	1, 3-8
X	EP 0 505 634 A (KYOCERA CORPORATION; KABUSHIKI KAISHA BIOMATERIAL UNIVERSE) 30. September 1992 (1992-09-30) Seite 4, Zeile 11 - Seite 5, Zeile 39 -----	1
A	DE 199 26 083 A1 (UNIVERSITAETSKLINIKUM FREIBURG) 14. Dezember 2000 (2000-12-14) Seite 2, Zeile 31 - Seite 4, Zeile 23 -----	1-21

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Dezember 2005

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

09/12/2005

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Buchmann, G

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE2005/001585

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 1277450	A	22-01-2003	AT 290835 T	15-04-2005
			AU 4894202 A	02-01-2003
			CA 2391697 A1	28-12-2002
			DE 60203219 D1	21-04-2005
			JP 2003102755 A	08-04-2003
			US 2003004578 A1	02-01-2003
EP 0505634	A	30-09-1992	DE 69127354 D1	25-09-1997
			DE 69127354 T2	22-01-1998
			JP 3007903 B2	14-02-2000
			JP 4303444 A	27-10-1992
			US 5314478 A	24-05-1994
DE 19926083	A1	14-12-2000	AT 258072 T	15-02-2004
			AU 5679100 A	28-12-2000
			WO 0074741 A2	14-12-2000
			EP 1242129 A2	25-09-2002
			JP 2003510108 T	18-03-2003