(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 103 50 654 A1** 2005.06.02

(12) # Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **103 50 654.3**
(22) Anmeldetag: **29.10.2003**
(43) Offenlegungstag: **02.06.2005**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 47/30**
A61P 17/00

(71) Anmelder:
Dr. Suwelack Skin & Health Care AG, 48727 Billerbeck, DE

(74) Vertreter:
Gille Hrabal Struck Neidlein Prop Roos, 40593 Düsseldorf

(72) Erfinder:
Klee, Doris, Dr., 52074 Aachen, DE; Paz, Rui Miguel, Dr., 47906 Kempen, DE; Malessa, Ralf, Dr., 45134 Essen, DE; Schenck, Peter, Dr., 48301 Nottuln, DE

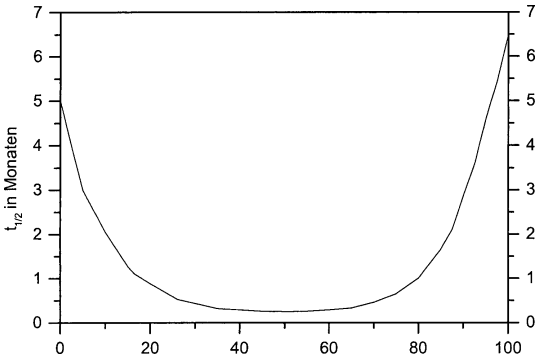
(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht zu ziehende Druckschriften:
EP 10 53 753 A1
EP 05 68 334 A1
EP 05 67 234 A1
EP 05 62 864 A1
EP 06 48 480 B1
EP 06 36 378 B1
EP 04 03 650 B1
MEDA,M.,et.al.: Microstructure and release characteristics of the minipellet, a collagen-based drug delivery system for controlled release of protein drugs. In: Journal of Controlled Release 62, 1999,S.314-324;;
KIM,Sung Eun,et.al.:Porous chitosan scaffold containing microspheres loades with transforming growth factor-?1: Implications for cartilage tissue engineering. In: Journal of Controlled Release 91,2003,S.365-374;;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Rechercheantrag gemäß § 43 Abs. 1 Satz 1 PatG ist gestellt.

(54) Bezeichnung: **Collagen-Träger-Wirkstoff-Zusammensetzung**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft eine Zusammensetzung, die ein Collagen-enthaltendes Trägermaterial aufweist, das Partikel aus mindestens einem polymeren Material (Polymerpartikel) enthält, die mindestens einen Wirkstoff enthalten, Verfahren zur Herstellung der Zusammensetzung sowie die Verwendung der Zusammensetzung als Arzneimittel, insbesondere zur topischen Anwendung sowie als Implantat bei Menschen oder Tieren. Die Zusammensetzung eignet sich besonders zur Unterstützung der Wundheilung.



Beschreibung

EINLEITUNG UND STAND DER TECHNIK

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Zusammensetzung, die ein Collagen-enthaltendes Trägermaterial aufweist, das Partikel aus mindestens einem polymeren Material (Polymerpartikel) enthält, die mindestens einen Wirkstoff enthalten, Verfahren zur Herstellung der Zusammensetzung sowie die Verwendung der Zusammensetzung als Arzneimittel, insbesondere zur topischen Anwendung sowie als Implantat bei Menschen oder Tieren. Die Zusammensetzung eignet sich besonders zur Unterstützung der Wundheilung.

[0002] Im Bereich der Biomaterialien nimmt das Bereitstellen von Wirkstoffen an Bedeutung zu. Die Kombination beispielsweise von „scaffolds" (Gerüsten) des „tissue engineerings" mit Wirkstoffen ist eine Strategie, die sich in zahlreichen Publikationen widerspiegelt. Wirkstoffe, welche adsorptiv bzw. kovalent am „scaffold" gebunden oder kontinuierlich aus einen Depot freigesetzt ihre biologische Aktivität über einen größeren Zeitraum entfalten, gehören zum Stand der Technik. Die kontinuierliche Freisetzung aus einem entsprechenden Wirkstoffdepot eröffnet insbesondere bei Wirkstoffen, die eine kurze biologische Halbwertzeit besitzen, gezielte Eingriffe in die Wundheilung. So werden viele kritische Phänomene z.B. das Zellmuster, die Zellproliferation und -aggregation, sowie die Genexpression durch Signalproteine beeinflusst. Die Verfügbarkeit und Differenzierung, die Regeneration oder der Ersatz einzelner Zellen, die Zellteilung und Regulierung stellen Hauptforschungsziele dar (Rui Miguel Paz, Dissertation RWTH Aachen, noch unveröffentlicht). Das Ausrüsten von Biomaterialien mit biologisch aktiven Substanzen zur Verbesserung der Funktionalität veranschaulicht die Entwicklung des rein passiven Implantatmaterials zum aktiven Implantat, das mit dem umliegenden Gewebe oder der Gewebeflüssigkeit in gezielte Wechselwirkung tritt. Die Kombinationen von biologisch aktiven Substanzen mit Biomaterialien sind in der Medizin weit verbreitet und spielen zunehmend z.B. bei der Verhinderung implantatbedingter Infektionen eine Rolle. So spielt im Bereich der Wundauflagen ein verbessertes Wundmilieu, eine Reduzierung von Infektionen sowie die Anregung des Zellwachstums durch Zusetzen von Wirkstoffen eine zunehmend wichtigere Rolle.

[0003] Die Beladung von Collagenmatrices mit Protein-Wirkstoffen, wie Wachstumsfaktoren ist seit langem bekannt. So beschreibt die WO 85/04413 das Beladen von Collagenmatrices mit Wirkstoffen, wie Wachstumsfaktoren, wie dem epidermalen Wachstumsfaktor, dem Thrombozyten-Wachstumsfaktor etc. Das Beladen erfolgt dabei durch Zugeben der Wirkstoffe während der Herstellung der Collagenmatrices. Auf diese Weise wird jedoch eine unzureichende Immobilisierung der Wirkstoffe in der Matrix erreicht, so dass eine verlängerte Wirkstofffreisetzung praktisch nicht möglich ist.

[0004] Auch aus der US 521 9576 (EP 0428541 B1) sind Wachstumsfaktoren-enthaltende Collagen-Wundheilungssysteme bekannt.

[0005] Die EP 0562864 A1 beschreibt heteromorphe Schwammmaterialien, die aktive Bestandteile enthalten. Sie bestehen aus einer Matrixstruktur, einer Substruktur und aktiven Bestandteilen. Als Substrukturen werden Mikrosphären zwar erwähnt, die Herstellung von Wirkstoff-enthaltenden Mikrosphären und deren Einbringen in eine Collagen-Matrix wird jedoch nicht beschrieben.

[0006] Die EP 0648480 B1 beschreibt ein Wundimplantat, umfassend eine Vielzahl von bioabsorbierbaren Mikrokügelchen, die zusammen durch eine feste bioabsorbierbare Matrix verbunden sind, worin die Mikrokügelchen wenigstens 40% des Volumens des Materials umfassen. Bei dem dort beschriebenen Material handelt es sich im wesentlichen um Mikrosphären, die durch ein Matrixmaterial miteinander verbunden sind. Dementsprechend erfolgt die Steuerung der Porosität durch die Größe der Mikrosphären und ihren Volumenanteil. Es wird erwartet, dass ein solches Material, dass Eindringen von Körperflüssigkeiten und Zellen erschwert.

[0007] Aus der EP 1053753 A1 sind lokale pharmazeutische Wirkstoffträger auf Collagenbasis oder auf Basis anderer resorbierbarer, biokompatibler Stoffe bekannt, worin der Wirkstoff in Mikrokapseln eingelagert ist, welche in dem Wirkstoffträger inkorporiert sind, Der Druckschrift sind jedoch keinerlei Details zur Art des verwendeten Collagens, zur Mikrokapselherstellung, zur Art der verwendeten Wachstumsfaktoren sowie zur Herstellung des beladenen Wirkstoffträgers zu entnehmen.

AUFGABENSTELLUNG

[0008] Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand insbesondere darin, eine Zusammensetzung bereitzustellen, die im weitesten Sinne in der Wundheilung, wie als Implantat oder als Wundauflage verwendet wer-

den kann und dort die Wundheilung durch die Erleichterung des Einwachsens neuer Zellen sowie durch die Unterstützung der Wundheilung insbesondere durch die Unterdrückung entzündlicher Prozesse etc. durch die Freisetzung von Wirkstoffen über einen längeren Zeitraum fördert. Die Erfinder fanden, dass ein spezifisches, Collagenenthaltendes, vorzugsweise poröses Trägermaterial, das Polymerpartikel enthält, in die bestimmte Wirkstoffe eingebracht sind, eine ausgezeichnete Wirkung in der Wundheilung erzielt, in dem das vorzugsweise poröse Collagen-enthaltende Trägermaterial das Einwachsen von Zellen fördert und gleichzeitig die in den Polymerpartikeln enthaltenden Wirkstoffe, die verzögert lokal in der Wundumgebung freigesetzt werden, die Wundheilung in gewünschter Weise über einen verlängerten Zeitraum unterstützen. Das Einbringen von Wirkstoffen in die Polymerpartikel erlaubt es weiterhin die Wirkstoffe während der Herstellung des Produktes insbesondere während der Herstellung des Trägermaterials zu stabilisieren. Dadurch ist überraschend auch die Verwendung von Wirkstoffen möglich, deren Einbringen in eine Matrix aufgrund der Herstellungsbedingungen der Matrix bislang nicht möglich war.

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0009] Die obige Aufgabenstellung wird gelöst durch die Bereitstellung einer Zusammensetzung, enthaltend ein Collagen-enthaltendes Trägermaterial, das Partikel aus mindestens einem polymeren Material (Polymerpartikel) enthält, die mindestens einen Wirkstoff enthalten.

[0010] Die Zusammensetzung gemäß der Erfindung stellt insbesondere ein resorbierbares Material dar. D.h., das Material löst sich beispielsweise nach subkutaner bzw, intramuskulärer Anwendung unter den im Organismus herrschenden Bedingungen hydrolytisch und/oder enzymatisch auf. Das Material kann also nach dem Inkontaktbringen mit der Wunde auf bzw. in dieser verbleiben und dort die Wundheilung fördern. Ein Entfernen des Materials entfällt vorteilhaft.

[0011] Als resorbierbares Trägermaterial wird erfindungsgemäß ein Collagen-enthaltendes, vorzugsweise poröses Trägermaterial verwendet. Das erfindungsgemäß zur Herstellung des Trägermaterials verwendete Collagen ist insbesondere bovinen, porcinen, equinen, humanen Ursprungs oder es handelt sich um gentechnisch hergestelltes Collagen. Besonders bevorzugt handelte es sich um Collagen bovinen Ursprungs. Die Herstellung eines besonders bevorzugten Collagens ist in der DE 4048622 A1 der Anmelderin beschrieben. Das dort beschriebene Verfahren zur Herstellung von Collagenschwämmen beinhaltet:

- das Unterwerfen eines Collagenrohmaterials einer Alkalibehandlung, wobei bevorzugt 3 bis 6 Gew.-% des Collagens zu makromolekularen Peptiden abgebaut werden,
- das Unterwerfen des resultierenden Collagens einer Säurebehandlung,
- das Waschen des resultierenden Collagenmaterials, und
- das Zerkleinern des resultierenden Collagenmaterials, insbesondere mit einer Kolloidmühle,

wobei jeder der genannten Schritte ggf, mehrfach wiederholt werden kann. Dabei wird eine wässrige Collagensuspension erhalten, die nach Zusatz der Polymerpartikel und gegebenenfalls weiterer Wirkstoffe, Strukturbildner und Hilfsstoffe zu dem erfindungsgemäßen Produkt verarbeitet werden kann. Bei dem so erhaltenen Collagen handelt es sich um sogenanntes säureunlösliches Collagen.

[0012] Die Verwendung eines säurelöslichen Collagens, wie vielfach im Stand der Technik beschrieben (s.u.a. WO 85/04413) ist demgegenüber nachteilig, da der Träger auf Collagenbasis zu rasch resorbiert wird, insbesondere bevor es zu einem Wundverschluss gekommen ist. Auch führt eine zu schnelle Auflösung der Collagenmatrix dazu, dass die Polymerpartikel zu schnell in die Wunde abgegeben werden und bei stark exsudierenden Wunden aus der Wunde herausgespült werden, womit ein unerwünschter Wirkstoffverlust einhergeht. Auf der anderen Seite ist jedoch eine zu geringe Degradationsgeschwindigkeit der Matrix ebenfalls unerwünscht, da es zu einer verstärkten Narbenbildung kommen kann. Es ist daher erfindungsgemäß von besonderer Bedeutung die Degradationsgeschwindigkeit für eine optimale Wundheilung einzustellen. Die Degradationsgeschwindigkeit des Collagenmaterials wird dabei sowohl durch die Beschaffenheit des, wie vorstehend beschrieben, erhaltenen Materials als auch durch die darauf angewendeten Trocknungs- bzw. Vernetzungsbedingungen bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung beeinflusst. Erfindungsgemäß werden mit dem, wie vorstehend beschrieben hergestellten, Collagenmaterial insbesondere in Kombination mit den weiter unten beschriebenen bevorzugten Herstellungsbedingungen der Collagenmatrix besonders günstige Degradationsgeschwindigkeiten erreicht. Die erfindungsgemäß verwendete Collagenmatrix weist bevorzugt in physiologischen Medien eine geringere Degradationsgeschwindigkeit auf als das polymere Material, aus dem die Wirkstoff-haltigen Polymerpartikel gebildet sind.

[0013] Bevorzugt weist das Collagen-enthaltende Trägermaterial in der erfindungsgemäßen Zusammenset-

zung eine Degradationsgeschwindigkeit definiert als

Degradationsgeschwindigkeit (%) = 100 × (Ursprungsgewicht – Gewicht nach Abbau)/Ursprungsgewicht

bestimmt durch Behandlung des Collagen-enthaltenden Trägermaterials mit Collagenase aus Clostridium histolyticum (Typ 1) in PBS (Phosphate Buffered Saline)-Puffer bei 37°C für 2 Stunden von höchstens etwa 60 %, bevorzugter höchstens etwas 50 %, noch bevorzugter höchstens etwa 40 % auf, und bevorzugt beträgt die Degradationsgeschwindigkeit mindestens etwa 2 %, bevorzugter mindestens etwa 4 %, noch bevorzugter mindestens etwa 8 %, noch bevorzugter mindestens etwa 10 %.

[0014] Weiterhin besitzen die aus säurelöslichem Collagen hergestellten Materialien im feuchtem Zustand eine unzureichende mechanische Festigkeit.

[0015] Zur Vorbehandlung des tierischen, bevorzugt des bovinen Collagenmaterials kann beispielsweise auf die erwähnte DE 4028622 verwiesen werden. Das vorbehandelte tierische, insbesondere bovine Collagenmaterial wird erfindungsgemäß anschließend in einem wässrigen alkalischen Medium bei pH > 7, bevorzugt > 8,5 behandelt und unmittelbar darauf in einem sauren wässrigen Medium (pH < 7, bevorzugt pH < 5,5) behandelt. Dieser Schritt ist grundsätzlich im Stand der Technik bekannt und führt zu einer Reinigung des Rohstoffes von allen nichtcollagenen Begleitstoffen. Ein Maß für den chemischen Abbau des bovinen Collagens in der alkalischen Behandlung ist die Bestimmung des Amid-Stickstoffes, welcher gegenüber dem Ausgangswert um etwa 5 bis 30 mmol/100g gesenkt werden sollte. Im vorliegenden Fall sollte der Amid-Stickstoff nach Abschluss der chemischen Behandlung etwa 10 bis 35 mmol/100g betragen. Der Reinigungs- und Quellungsgrad des Collagens wird wie im Stand der Technik beschrieben (vgl. beispielsweise DE 32 03 957) bestimmt. Das erfindungsgemäß bevorzugt verwendete Collagenmaterial wird besonders bevorzugt einer intensiven alkalischen Behandlung unterworfen. Die Alkalibehandlung wird über einen Zeitraum von 1 bis 5, vorzugsweise 1 bis 4 Wochen durchgeführt, und die Konzentration des eingesetzten Natriumhydroxids beträgt 1 bis 3 Gew.%.

[0016] Anschließend wird das Material gründlich mit Wasser gewaschen, um die Alkalireste möglichst vollständig zu entfernen.

[0017] Die darauf folgende Säurebehandlung erfolgt, wie im Stand der Technik beschrieben (vgl. DE 32 03 957) etwa 10 bis 20 Stunden lang mit etwa 2 bis 4%-iger Salzsäure. Der pH-Wert des Mediums sollte bevorzugt 0,5 bis 1,5 und vorzugsweise 1 betragen.

[0018] Die erfindungsgemäß bevorzugt durchgeführte Alkalibehandlung des Collagenmaterials führt zur Denaturierung eines Teils des Collagens, wobei dieser Teil etwa 3 bis 6 Gew.-%, bezogen auf die Gesamtcollagenmenge, betragen sollte. Die Kontrolle des Denaturierungsgrades erfolgt über eine Bestimmung des Hexosamin- und Aminosäuremusters, sowie über eine Bestimmung des "nativen" Collagengehaltes wie in der DE 4028622 beschrieben.

[0019] Die so behandelte Masse wird anschließend mit fließendem Wasser solange ausgewaschen, bis der pH-Wert des Materials etwa 2,5 bis 3,5, vorzugsweise 2,7 bis 3,3 beträgt.

[0020] Bei dem auf diese Weise hergestellten Collagenmaterial handelt es sich im wesentlichen um Collagen des Typs I, III und V, hauptsächlich I. Bei Verwendung des erfindungemäßen Produktes als Knorpelimplantat ist Collagen des Typs II, bei Knochenimplantaten ist Collagen des Typs I bevorzugt.

[0021] Im Anschluss an die partielle Denaturierung und das Waschen bis zu einem pH-Wert von 2 bis 4, vorzugsweise 2,7 bis 3,3, wird das Material nach bekannten Verfahren, wie beispielsweise in der DE 32 03 957 angegeben, vorzerkleinert, homogenisiert und zerfasert und eine wässrige Dispersion hergestellt. Die wässrige Dispersion dient als Ausgangsmaterial für die Herstellung des erfindungsgemäß verwendeten, bevorzugt porösen Collagen-Trägermaterials.

[0022] Das Trockengewicht der Dispersion sollte etwa 1,5 bis 3 Gew.-%, vorzugsweise 2 Gew.% betragen und der pH-Wert mit verdünnter Salzsäure auf etwa 2,5 bis 3,5, vorzugsweise 3 eingestellt werden.

[0023] Das Einführen der wirkstoff-tragenden Polymerpartikel sowie wahlweise vorhandener sonstiger Trägerkomponenten, wie nicht Polymerpartikel-gebundener Wirkstoffe, Strukturbildner, Vernetzungsmittel und Hilfsstoffe wie unten beschrieben, in die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann an dieser Stelle durch Zugeben davon zur wässrigen Collagensuspension erfolgen. Aus der so erhaltenen wässrigen Collagensus-

pension kann anschließend durch Trocknung, insbesondere Gefriertrocknung die Zusammensetzung gemäß der Erfindung hergestellt werden.

[0024] Wahlweise kann das Einbringen der Polymerpartikel jedoch auch nach der Herstellung des Collagenträgermaterials erfolgen, beispielsweise durch eine gegebenenfalls vakuumunterstützte Tränk- bzw. Aufsaugbehandlung, gegebenenfalls mit nachfolgendem chemischen oder physikalischen Immobilisierungsschritt und anschließender Trocknung. Bevorzugtes ist jedoch das vorstehend beschriebene Verfahren des Zusetzens zur wässrigen Collagenausgangssuspension.

[0025] Der wässrigen Collagensuspension können an dieser Stelle auch chemische Vernetzungsmittel zugesetzt werden, solange sie mit den wirkstoffhaltigen Polymerpartikeln und den sonstigen Wirk- oder Hilfsstoffen kompatibel sind. Dabei handelt es sich bevorzugt um mindestens ein polyfunktionelles Vernetzungsmittel. Dieses wird beispielsweise aus Carbodiimiden, wie EDC (Ethylcarbodiimid), das gegebenenfalls in Anwesenheit von N-Hydroxysuccinimid (NHS) umgesetzt wird, Diepoxiden, wie 1,4-Butandioldiglycidylether und Glutaraldehyd ausgewählt.

[0026] Die Verwendung derartiger chemischer Vernetzungsmittel führt zu einer größeren mechanischen Festigkeit und einer verringerten Degradationsgeschwindigkeit des Collagenmaterials. Überraschend hat sich dabei gezeigt, dass die Vernetzung mit EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid) zu einer Verbesserung der angiogenetischen Eigenschaften des erfindungsgemäßen Produktes führt, wobei die Ursachen hierfür noch unklar sind.

[0027] Die chemische Vernetzungsbehandlung kann wahlweise auch nach Herstellung der die Wirkstoff-Polymerpartikel enthaltenden Collagen-Matrix erfolgen. Insbesondere kann die Vernetzungsbehandlung vor oder nach der Gefriertrocknung erfolgen. EDC wird zweckmäßig nach der Gefriertrocknung verwendet. Andere Vernetzer, die auch im sauren reagieren, können auch vor der Gefriertrocknung zur Collagensuspension gegeben werden.

[0028] In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird zur Herstellung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung die vorstehend beschriebene Collagendispersion, die insbesondere die wirkstoffenthaltenden Polymerpartikel sowie gegebenenfalls weitere Wirkstoffe, Strukturbildner und Hilfsstoffe enthalten kann, anschließend über einen Zeitraum von 0,5 bis 4 Stunden, vorzugsweise 1 bis 3 Stunden bei einer Temperatur von –10 bis –60 °C in Form von Platten eingefroren. Die Dicke der resultierenden Platten kann 1 bis 3 cm, vorzugsweise 1,5 bis 2,0 cm betragen. Die Porengröße der erfindungsgemäßen Zusammensetzung wird dabei im wesentlichen über die Einfriergeschwindigkeit gesteuert, sie kann jedoch zusätzlich durch Hinzufügen oberflächenaktiver Substanzen beeinflusst werden. Die Anwendung solcher Substanzen ist jedoch weniger bevorzugt.

[0029] Die erhaltenen Platten können gegebenenfalls bei –3°C bis –35 °C zwischengelagert werden. Bei der Lagerung tritt ein Konditionierungseffekt ein, der sich vorteilhaft auf das Endprodukt auswirkt. Es erfolgt dabei ein leichter Viskositätsabfall, der die Reproduzierbarkeit des Produktes verbessert. Vorzugsweise werden die eingefrorenen Platten mindestens 24 Stunden lang gelagert.

[0030] Nach dem Einfrieren und gegebenenfalls Zwischenlagern gelangen die Platten zur Gefriertrocknung.

[0031] Erfindungsgemäß ist es besonders bevorzugt die Gefriertrocknung der eingefrorenen Collagensuspension bei relativ hohen Temperaturen von mindestens etwa 50°C bis etwa 180° C, bevorzugter bei etwa 80°C bis 150°C, noch bevorzugter zwischen 110 und 140 °C über einen längeren Zeitraum durchzuführen. Unter diesen Bedingungen findet eine Vernetzung der Collagenmoleküle statt, welche das Collagen modifiziert und seine Stabilität im nassen Zustand insbesondere unter physiologischen Bedingungen entscheidend vergrößert. Diese Vernetzung verläuft sehr langsam und wird durch das Einwirken erhöhter Temperatur auf das im wesentlichen bereits trockene Material unter Vakuum erreicht. So lässt man zweckmäßig mindestens etwa 12 Stunden lang Umgebungstemperaturen von 110 bis 150 °C bei einem Vakuum von etwa 0,5 bis 3,0 mbar auf das im wesentlichen bereits trockene Material einwirken, wobei der Endpunkt der eigentlichen Gefriertrocknung in bekannter Weise anhand der Druckanstiegsmethode bestimmt und damit der Beginn der Temperatur-Nachbehandlung festgelegt wird. Eine solche Behandlung des Collagenträgermaterials bei erhöhten Temperaturen (höher als Raumtemperatur (25°C), bevorzugt mehr als 50 ° C, noch bevorzugter mehr als 80 °C, noch bevorzugter mehr als 110 ° C bis maximal etwa 200°C, bevorzugter bis etwa 180°C, bevorzugter bis etwa 140°) bei Normaldruck, bevorzugt unterhalb Normaldruck, bevorzugt bei etwa 0,1 bis 50 mbar, bevorzugter bei etwa 0,5 bis 3,0 mbar, bezeichnet man auch als Dehydrothermalvernetzung. Die Anwendung einer solchen Be-

handlung auf die Collagenträgermatrix der erfindungsgemäßen Zusammensetzung ist erfindungsgemäß besonders bevorzugt, da durch sie eine optimale Degradationsgeschwindigkeit der die Wirkstoff-Polymerpartikel enthaltenden Zusammensetzung für die Zwecke der Wundbehandlung erreicht wird.

[0032] Es war dabei völlig überraschend, dass es möglich ist, die an sich thermolabilen Wirkstoffe, wie proteinogene Wirkstoffe den Bedingungen der Dehydrothermalvernetzung zur Herstellung der Collagenträgermatrix ohne substantiellen Aktivitätsverlust auszusetzen.

[0033] Erfindungsgemäß wird daher die Collagenträgermatrix besonders bevorzugt einer Dehydrothermalvernetzung, insbesondere in einer Umgebung mit einer Temperatur von 50 bis 200°C und einem Druck von 0,1 bis 50 mbar unterworfen.

[0034] Der Vernetzungseffekt und die damit einhergehende Verringerung der Degradationsgeschwindigkeit der Collagenmatrix kann mit üblichen Bestimmungsmethoden nachgewiesen werden. So ist beispielsweise die Resistenz einer Collagenstruktur gegenüber Collagenase ein Maß für die Vernetzung, wobei nicht vernetztes Material erheblich schneller abgebaut wird, als dies bei vernetztem Material der Fall ist.

[0035] Die so durch Gefriertrocknung erhaltene erfindungsgemäße Zusammensetzung ist ein Poren aufweisendes Produkt. Ein solches poröses Produkt ist erfindungsgemäß bevorzugt. Es kann in eine gewünschte Form geschnitten und steril abgepackt werden.

[0036] Das erfindungsgemäße Produkt kann aber auch ein nicht-poröses Material, wie ein Folienmaterial sein, dass nach üblichen Verfahren wie durch Giessen und anschließendem Trocknen hergestellt wird.

[0037] Die erfindungsgemäße poröse Zusammensetzung weist bevorzugt die Form eines schichtartigen Materials auf, dass eine Dicke (Dimension, die die geringste Längenausdehnung besitzt) bevorzugt etwa 0,1 bis 20 mm aufweist. Die nicht-porösen folienartigen Materialen sind im allgemeinen dünner und sind weniger als 1, bevorzugt weniger als 0,1 mm dick.

[0038] Die erfindungsgemäße Zusammensetzung kann neben Collagen und den Wirkstoff-enthaltenden Polymerpartikeln wahlweise mindestens einen weiteren Bestandteil enthalten, der aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus Wirkstoffen, Strukturbildnern und Hilfsstoffen besteht. Die zusätzlichen, nicht polymerpartikelgebundenen Wirkstoffe können grundsätzlich die gleichen sein, wie die in den Polymerpartikeln enthaltenen unten beschriebenen Wirkstoffe, wodurch sich naturgemäß unterschiedliche Freisetzungsgeschwindigkeiten dieser Wirkstoffe ergeben. Bevorzugt werden diese, in der Collagenmatrix nicht polymerpartikel-gebunden enthaltenen Wirkstoffe und Strukturbildner jedoch aus extrazellulären Matrixbestandteilen ausgewählt. Diese sogenannten extrazellulären Matrixbestandteile werden bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt, die aus Elastin, Elastin-hydrolysaten, Glykosaminoglykanen, wie Heparan Sulfat, Chondroitin Sulfat, Dermatan Sulfat, Keratan Sulfat, Heparin und Hyaluronsäure, Proteoglykanen, wie Aggrecan, Fibromodulin, Decorin, Biglycan, Versican, Perlecan, Basalmembran-Proteoglykan hoher Dichte, Syndecan und Serglycin, Fibrin, Fibronectin, Glucanen, wie Paramylon besteht. Bevorzugte derartige Bestandteile sind Elastin und -hydrolysate, Hyaluronsäure und/oder Paramylon.

[0039] Derartige Strukturbildner und nicht polymerpartikel-gebundene Wirkstoffe können beispielsweise der porösen Collagenträgermatrix in Anteilen von 0,1 bis 20 Gew.-%, bevorzugt 0,1 bis 10 Gew.-% bezogen auf das Collagenmaterial zugesetzt werden.

[0040] Weitere in der Collagenmatrix dispergierte zusätzliche Wirkstoffe können beispielsweise einschließen: die Wundheilung fördernde Mittel, entzündungshemmende Mittel, die die Wundheilung insbesondere in einem Stadium unterstützen, in dem sie noch nicht sehr weit fortgeschritten ist und die Gefahr von Infektionen besonders hoch ist, wie Antiinfektiva, wie Antibiotika.

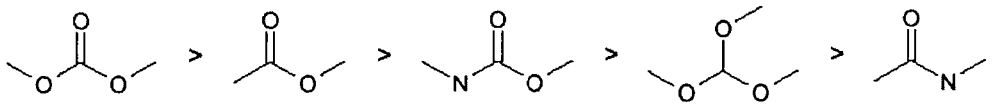
[0041] Die Zusammensetzung gemäß der Erfindung enthält in der vorstehend beschriebenen Collagenmatrix dispergiert Polymerpartikel, in die mindestens ein, bevorzugt die Wundheilung unterstützender Wirkstoff eingebracht ist.

[0042] Bei dem polymeren Material, dass die Partikel neben den inkorporierten Wirkstoffen im wesentlichen bildet, handelt es sich insbesondere um natürliche biologisch abbaubare Polymere (Biopolymeren) oder synthetische biologisch abbaubare Polymere, die insbesondere bevorzugt unter physiologischen Bedingungen resorbierbare Polymere sind, die für die Wirkstofffreisetzung geeignet sind. Unter resorbierbaren Polymeren für

Wirkstofffreisetzungssysteme versteht man biokompatible Polymere die sich z.B. nach subkutaner bzw. intramuskulärer Applikation unter den im Organismus vorherrschenden Bedingungen hydrolytisch und/oder enzymatisch abbauen und deren Abbauprodukte ausgeschieden oder in den Stoffwechsel einbezogen werden. Innerhalb der resorbierbaren Polymere kann zusätzlich zwischen der Oberflächen- und der Bulkdegradation unterschieden werden. Hierbei handelt es sich um zwei Extreme des physikalischen Phänomens der Erosion. Im allgemeinen liegen beide Arten nebeneinander vor. Faktoren, die eine Übersicht struktureller, chemischer und verarbeitender Eigenschaften und das Abbauverhalten der Polymere beeinflussen sind:

- die chemische Struktur und Zusammensetzung
- die Verteilung der Wiederholungseinheiten in einem Copolymer
- die Anwesenheit ionischer Gruppen
- die Anwesenheit unerwarteter Einheiten oder Kettendefekte
- die Strukturkonfiguration
- die Molekulargewicht und Gewichtsverteilung
- die Morphologie (amorphe/semikristalline, mikrostrukturelle, Restspannungen
- die Anwesenheit von niedermolekularen Zusätzen
- die Prozessbedingungen, das Tempern, die Sterilisation
- die Lagerung
- die Form
- der Anwendungsort
- die absorbierten und absorbierten Substanzen (Wasser, Lipide, Ionen, etc.).
- die physiko-chemischen Faktoren (Ionenaustausch, Ionenstärke, pH).
- der Mechanismus der Hydrolyse (enzymatisch, nicht-enzymatisch).

[0043] Eine Anzahl verschiedener unter physiologischen Bedingungen labiler Bindungen kann für die Synthese resorbierbarer Polymere herangezogen werden. Auf der Grundlage bekannter Hydrolysedaten niedermolekularer Analoge, kann folgende Einteilung der Resorptionsgeschwindigkeiten unter neutralen Bedingungen gemacht werden.



[0044] Diese Einteilung ist jedoch abhängig von der Morphologie und den Substituenten des Polymers und kann die Hydrolysegeschwindigkeit deutlich beeinflussen.

[0045] Die erfindungsgemäß für die Herstellung der Partikel verwendeten Polymere werden bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt, die aus Polypeptiden, wie Collagen, Gelatine, und Hydrolysaten davon, Polysacchariden und Derivaten davon, Polyvinylalkohol (PVA), Polyvinylpyrrolidon (PVP), Poly(meth)acrylaten, wie Polymethylmethacrylat (PMMA) und Polymethylacrylat (PMA), Polyalkylcyanoacrylaten (PACA), Acrylcopolymeren, Polyethylen-vinylacetat-Copolymeren, Polyhydroxyalkanoaten, wie Polyhydroxybutyrat (PHB), Hydrokolloiden, wie Cellulosederivaten, wie Hydroxypropylcellulose, Polyanhydriden, wie Polysebacinsäureanhydrid, Polyorthoestern, Poly-ε-caprolacton (PCL), Copolymeren aus Poly-ε-caprolacton und Polylactiden, Polyaminosäuren, Polyurethanen, Polyethylenglykolen, Polymilchsäure (PLA), Polylactiden, Polycarbonaten, wie Polytrimethylencarbonat (Poly(TMC)), Copolymeren aus Polylactiden, Polyglycoliden und Polycarbonaten, Copolyestern aus Milchsäure und Glykolsäure (PLG), Poly-L-lysin und deren Homologen und Cokondensaten, und Polycarbonaten besteht.

[0046] Erfindungsgemäß besonders bevorzugt sind Polymilchsäure bzw. Polylactide (PLA), Polyglycolide und Copolymere davon. Dabei handelt es sich um Homo- und Copolymere der Milch- bzw. der Glykolsäure, Polylactide (PLA) und -glycolide (PGA) sind aliphatische Polyester und gehören zu denPoly-(α-)Hydroxysäuren. Polylactide sind im Vergleich zu Polyglycoliden, dem einfachsten aliphatischen Polyester, hydrophober. Milchsäure besitzt im Gegensatz zur Glykolsäure am α-C-Atom eine Methylgruppe und liegt in zwei enantiomeren Formen als D-Lactid und L-Lactid vor. Während enantiomerenreines Poly(D-lactid) bzw. Poly(L-actid) kristalline Bereiche aufweist, ist das racemische Poly(D,L-lactid) amorph und hierdurch zugänglicher für den hydrolytischen Abbau. Erfindungsgemäß ist die Anwendung der racemischen Form bevorzugter.

[0047] Ihre Herstellung erfolgt in der Regel durch eine katalysierte Ringöffnungspolymerisation in der Schmelze bei Temperaturen von 140 bis 180°C. Durch Variation der Lactid- und Glykolidanteile können PGA/PLA-Co-

polymere mit unterschiedlichen physikalischen und mechanischen Eigenschaften hergestellt werden. Abbauversuche unter zeigen, daß die Abbauzeit vom Copolymerverhältnis abhängt. Copolymere mit einem 24 bis 67 mol% Glykolsäure Anteil sind amorph.
Siehe **Abb. 1**.

[0048] Derartige Polymere sind im Stand der Technik bekannt und sind kommerziell erhältlich.

[0049] Ein weiteres bevorzugtes Polymer zum Aufbau der erfindungsgemäß verwendeten Polymerpartikel stellt Gelatine dar. Die Gelatine kann durch Reaktion vor allem der Amino-Gruppen mit mono- oder polyfunktionellen Reagenzien, unter anderem mit Acylierungsmitteln, Aldehyden, Epoxiden, Halogen-Verbindungen, Cyanamid oder aktivierten ungesättigten Verbindungen chemisch modifiziert und in ihren Eigenschaften breit variiert werden. Somit können erfindungsgemäß diffusionskontrollierte Freisetzungssysteme auf Gelatinebasis durch chemische Vernetzung der Gelatine hergestellt werden. Die Freisetzungsgeschwindigkeit der Wirkstoffe kann über den Vernetzungsgrad beeinflusst werden. Erfindungsgemäß anwendbare Vernetzungsreaktionen reichen von kovalenter chemischer Vernetzung mit kleinen bifunktionellen Verbindungen (Glutaraldehyd, Formaldehyd, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid) über radikalische Polymerisation mit radikalbildenden Polymerendgruppen oder bifunktionellen Verbindungen (Oligo(PEG fumarate), Methacrylierte Dextrane) bis zu inter- und intra-molekularer Kondensationspolymerisation durch hohe Temperaturen, reduzierten Druck und Dehydrierung.

[0050] Die erfindungsgemäß verwendeten Polymerpartikel stellen bevorzugt sogenannte Nano- und Mikrosphären dar. Mit ihnen kann unter anderem eine verlängerte bzw. anhaltende Wirkdauer der erfindungsgemäß verwendeten Wirkstoffe erreicht werden.

[0051] Als Nano- bzw. Mikrosphären werden in der vorliegenden Erfindung kolloidale Partikel mit einem Durchmesser von zweckmäßig 10 – 1000 nm (Nanosphären) bzw. 1 – 2000 µm (Mikrosphären), die im Gegensatz zu Vesikeln, aus einer soliden Matrix bestehen, bezeichnet. In der Literatur werden Sphären und Partikel häufig synonym verwendet.

[0052] Erfindungsgemäß sind Polymerpartikel mit einem mittleren Teilchendurchmesser von etwa 0,01 µm bis etwa 1500 µm bevorzugt, wobei die Bestimmung des mittleren Teilchendurchmessers in an sich bekannter Weise durch Laserlichtbeugung erfolgt. Erfindungsgemäß weisen die Polymerpartikel bevorzugt eine im wesentlichen kugelförmige, d.h. sphärische Gestalt auf.

[0053] Die Herstellung dieser mit Wirkstoffen beladenen Sphären kann erfindungsgemäß in an sich bekannter Weise erfolgen. Zahlreiche Verfahren wurden zur Herstellung von Wirkstoff enthaltenden Sphären auf Polymerbasis entwickelt.

[0054] Im allgemeinen können diese in
- das Lösemittel-Emulsions-Evaporations-Verfahren
- das Lösemittel-Emulsions-Extraktions-Verfahren,
- das Sprühtrocknungs-Verfahren oder
- das Schmelz-Emulsions-Verfahren

eingeteilt werden.

[0055] Erfindungsgemäß bevorzugt sind das Emulsions-Evaporations-Verfahren und das Lösemittel-Emulsions-Extraktions-Verfahren, zur Herstellung der sogenannten Nano- und Mikrosphären.

[0056] Das Emulsions-Evaporations-Verfahren basiert auf der Dispersion einer Polymerlösung in einer geeigneten kontinuierlichen Phase und der anschließenden Evaporation des Polymerlösemittels. Es sind verschiedene Verfahren bekannt, die auf einer einfachen (o/w)-, (w/o)-, (o/o)-Emulsion bzw. komplexen ((w/o)/w)- oder ((o/o)/w)-Emulsion basieren. Erfindungsgemäß bevorzugt ist das auf einer ((w/o)/w)-Emulsion basierende Verfahren für hydrophile Wirkstoffe, wie die proteinogenen Wirkstoffe, wie insbesondere Wachstumsfaktoren und Insulin.

[0057] Das anzuwendende Verfahren ist von den hydrophilen bzw. lipophilen Eigenschaften des Polymers und des Wirkstoffs abhängig.

[0058] Das Schema der einfachen Emulsions Evaporations Methode am Beispiel der (o/w)-Emulsions-Eva-

porations-Methode ist in der folgenden Abbildung dargestellt, Das Verfahren der (o/w)-Emulsions-Evaporations-Methode ist bei lipophilen Wirkstoffen anwendbar.

[0059] Bei diesem Verfahren wird das Polymer bevorzugt in einem flüchtigen, organischen Lösungsmittel, wie Methylenchlorid oder Chloroform, gelöst. Der einzuschließende Wirkstoff wird dann in derselben Lösung entweder gelöst oder suspendiert. Die organische Phase wird in einer wässrigen Phase, die einen Emulgator enthält und das Polymer nicht löst, emulgiert. Sobald sich die (o/w)-Emulsion gebildet hat, wird der Druck verringert beziehungsweise die Temperatur erhöht, um das Verdampfen des leichtflüchtigen Lösemittels aus den Mikrotröpfchen herbeizuführen. Durch das Austreten des Lösemittels aus den Mikrotröpfchen, entstehen feste Wirkstoff enthaltende Mikrosphären. Die festen Mikrosphären werden durch Zentrifugieren, Filtrieren oder Dekantieren aus der wässrigen Phase isoliert und anschießend gewaschen und gefriergetrocknet.
Siehe **Abb. 2**.

[0060] Das verwendete Polymer bestimmt zusammen mit dem Wirkstoff das anzuwendende Verfahren ((o/w)-, (w/o)-Emulsion etc.) und entscheidet über den Freisetzungsmechanismus (diffusions-kontrolliert, degradationskontrolliert, etc.)

[0061] Für hydrophile Wirkstoffe, die erfindungsgemäß bevorzugt sind, sind das w/o-, w/o/w- und das w/o/o-Emulsions-Evaporations oder das Extraktionsverfahren geeignet.

[0062] Probleme oder Nachteile, die bei diesem Herstellungsverfahren auftreten können, sind die Agglomeration der Mikrosphären sowie der Verlust von einzuschließender Substanz an die wässrige Phase. Letzteres ist ein großes Problem, wenn hydrophile Substanzen in den Mikrosphären eingeschlossen werden sollen.

[0063] Versuche die Effizienz der einzuschließenden Substanz zu erhöhen beinhalten beispielsweise:
– die Sättigung der wässrigen Phase mit der einzuschließenden Substanz (geeignet für preiswerte Substanzen)
– das Herabsetzen der Löslichkeit der einzuschließenden Substanz in der wässrigen Phase durch verändern des pH-Wertes der wässrigen Phase (saure oder basische organische Arzneistoffe können durch Wahl des pH-Wertes in die nichtionisierte Form überführt und in ihrer Wasserlöslichkeit herabgesetzt werden)
– die Zugabe von Hilfsstoffen, die das Lösevermögen der wässrigen Phase reduzieren (Herabsetzen der Hydrophilie der kontinuierlichen Phase durch Zugabe eines zweiten Lösemittels oder Zugabe von Salzen, welche die Löslichkeit der Substanz in der wässrigen Phase herabsetzen).

[0064] Neben den angeführten Methoden zur Verbesserung der Effizienz kann auch auf andere Verfahren zurückgegriffen werden.

[0065] Das (w/o)-Emulsionsverfahren stellt dabei eine Alternative dar. Hierbei werden wasserlösliche Polymere z.B. Polyvinylalkohole (PVAl) oder Gelatine verwendet, die in einer organischen kontinuierlichen Phase emulgiert werden. Im Gegensatz zur (o/w)-Emulsion, bei dem leichtflüchtige organischen Lösemittel verwendet werden, wird in der Regel die dispergierte wässrige Phase durch Extraktion entfernt.

[0066] Steht jedoch kein geeignetes (w/o)- Emulsionssystem zur Verfügung, können hydrophile Substanzen mit Hilfe der komplexen ((w/o)/w)-Emulsions-Evaporations-Methode in Sphären eingeschlossen werden.
Siehe **Abb. 3**.

[0067] Dieses Verfahren ist bei der Verwendung proteinogener Wirkstoffe zusammen mit hydrophoben Matrices bzw. Polymeren besonders bevorzugt.

[0068] Beim Herstellungsverfahren der Polymerpartikel sind verschiedene Faktoren zu berücksichtigen.

[0069] Das organische Lösungsmittel oder das Lösungsmittelgemisch, das verwendet wird:
Die Löslichkeit des organischen Lösungsmittels in der wässrigen Phase beeinflusst entscheidend den Prozeß der Mikrosphärenhärtung. Das Lösungsmittel darf sich nur geringfügig in der wässrigen Phase lösen, und es darf nicht zu schnell verdampfen, da sonst unregelmäßig geformte Mikrosphären entstehen,
– die Eigenschaften des verwendeten Polymers, vor allem sein Molekulargewicht:
Es beeinflusst die Viskosität der organischen Phase und die Größe und Porosität der Mikrosphären,
– die Prozeßparameter, wie Rührgeschwindigkeit, Temperatur, Druck und das Volumen der organischen Phase,

– die Eigenschaften der einzuschließenden Substanz, ihre Löslichkeit in der organischen und der wässrigen Phase sowie ihre Stabilität in den verwendeten Lösungsmitteln.

[0070] Diese Herstellungsverfahren sind erfindungsgemäß bevorzugt, da sie eine schnelle reproduzierbare Methode zur Gewinnung sphärischer Partikel verschiedener Größen (Nano- bzw. Mikro-Maßstab) und enger Größenverteilung darstellen. Dabei lassen sich die Eigenschaften der Mikrosphären und die damit verbundenen Freisetzungseigenschaften durch Veränderung der Herstellungsbedingungen leicht beeinflussen.

[0071] Eine Übersicht verschiedener Parameter und den damit verbundenen Einflüssen auf die Sphärenmorphologie und das Freisetzungsverhalten ist in der folgenden Tabelle gegeben.

Parameter	Einfluss
Polymer	
- resorbierbar, nicht-resorbierbar	das Polymer bestimmt zusammen mit dem Wirkstoff das anzuwendende Verfahren und entscheidet über den Freisetzungsmechanismus (diffusionskontrolliert, degradationskontrolliert, etc.)
- Hydrophilie, Hydrophobie	hydrophile bzw. hydrophobe Wechselwirkungen des Polymers mit dem Wirkstoff sowie das Quellvermögen des Polymers im Freisetzungsmedium beeinflussen den Diffusions-koeffizienten des Wirkstoffes und die damit verbundene Freisetzung des Wirkstoffes, bei resorbierbaren Polymeren nimmt bei zunehmendem hydrophobem Charakter die Hydrolysegeschwindigkeit ab
- Molekulargewicht	die Abhängigkeit der Viskosität der Polymerlösung wirkt sich auf die Sphärengrößenverteilung, den Wirkstoffgehalt und das Abbauverhalten resorbierbarer Systeme aus die Verminderung der Löslichkeit des Polymers mit Zunahme des Molekulargewichts in der dispergierten Phase, kann zu einer porösen Oberfläche durch ein beschleunigtes Ausfällen führen
- Konzentration	eine Zunahme der Polymerkonzentration in der dispergierten Phase ist mit einer Vergrößerung der Sphärengrößeverteilung verbunden und einer verbesserten Effizienz in Bezug auf den Wirkstoffgehalt

Parameter	Einfluss
Wirkstoff - Einwaage	der Wirkstoffgehalt und das Freisetzungsverhalten der Sphären ist abhängig von der eingesetzten Wirkstoffmenge
Wirkstoff - Hydrophilie, Hydrophobie	durch zunehmende Wechselwirkung mit der Polymermatrix kann die Freisetzungsgeschwindigkeit deutlich abnehmen der hydrophile/hydrophobe Charakter des Wirkstoffes kann Einfluß auf die Stabilität der (w1/o)-Primäremulsion der komplexen ((w1/o)/w2)-Emulsions-Verfahren haben ein geringe Löslichkeit des Wirkstoffes in der äußeren kontinuierlichen Phase erhöht die Effizienz des Wirkstoffgehalts in Bezug auf die eingesetzte Wirkstoffmenge
Phasen w1-Phase	die Eigenschaften der dispergierten inneren w1-Phase wirken sich auf die Stabilität der (w1/o)-Primäremulsion des komplexen ((w1/o)/w2)-Emulsions-Verfahrens und den Wirkstoffgehalt der Mikrosphären aus

Parameter	Einfluss
o-Phase	die Auswahl der dispergierten Phase hat Einfluss auf den Wirkstoffgehalt, die Aushärtgeschwindigkeit, die Sphärengrößenverteilung, sowie die Emulsionsstabilität der dispergierten inneren w1-Phase des komplexen ((w1/o)/w2)-Emulsions-Verfahren bei proteinischen Wirkstoffen kann die hydrophobe Grenzfläche zur Denaturierung oder Agglomeration des Wirkstoffes und dem damit verbunden Aktivitätsverlust führen
Phasen w2-Phase	die Viskosität und Dichte haben Einfluss auf die Sphärengrößenverteilung das Lösungsvermögen der w2-Phase wirkt sich auf den Wirkstoffgehalt der Sphären aus
w1:o - Phasenverhältnis	die Stabilität der Emulsion und der Emulsionstyp wird durch das Phasenverhältnis der (w1/o)-Primäremulsion des komplexen ((w1/o)/w2)-Emulsions-Verfahrens entscheidend bestimmt und wirkt sich auf den Wirkstoffgehalt aus die innere Struktur der Mikrosphärenmatrix des ((w1/o)/w2)-Emulsions-Verfahrens ist abhängig vom Phasenverhältnis und erhöht bei zunehmender Porosität der Mikrosphärenmatrix die Freisetzungsgeschwindigkeit

Parameter	Einfluss
o:w2 - Phasenverhältnis	die Aushärtgeschwindigkeit nimmt mit zunehmender partieller Mischbarkeit der o-Phase in der äußeren Phase zu und kann dann zu ungleichmäßigen und porösen Mikrosphären führen, die sich auf den Wirkstoffgehalt auswirken
Tenside, Emulgatoren - Typ - Konzentration	der HLB-Wert (hydrophilic-lipophilic-balance) der Tenside bzw. Emulgatoren nimmt Einfluss auf den Emulsionstyp und die Stabilität der einzelnen Emulsionstypen die Konzentration und der Typ der Tenside bzw. Emulgatoren bestimmt die Sphärengrößenverteilung die Löslichkeit des Wirkstoffes in der w-Phase kann durch Tenside bzw. Emulgatoren ermöglicht werden und führt zu einer Abnahme des Wirkstoffgehaltes der Mikrosphären
Scherkraft	die Sphärengrößenverteilung wird durch die verwendeten Scherkräfte maßgeblich bestimmt Einwirkungen hoher Scherkräfte auf labile Wirkstoffe können zum Verlust der biologischer Aktivität führen z.B. bei Proteinen zur Agglomeration oder Denaturierung

Parameter	Einfluss
Temperatur	die Prozesstemperatur nimmt direkten Einfluss auf die Stabilität der Emulsion, darüber hinaus kann eine Blasenbildung innerhalb der o-Phase durch Sieden des Polymerlösemittels zu Rissen und Löchern in den Sphärenwänden führen. die Wirkstofflöslichkeit in der w-Phase kann mit der Temperatur variieren und nimmt Einfluss auf den Wirkstoffgehalt der Sphären
Druck	der Prozessdruck hat Einfluss auf die Aushärtgeschwindigkeit und die Porosität der Mikrosphären
pH-Wert	Wirkstofflöslichkeit in der kontinuierlichen w-Phase
Hilfsstoffe	Porenbildner Erhöhung des Osmotischen Drucks

Tabelle 1: Übersicht verschiedener Prozessparameter der Emulsions-Evaporations-Methode zur Herstellung Wirkstoff enthaltender Mikrosphären auf das Freisetzungsverhalten

[0072] Die vorstehend beschriebenen Polymerpartikel enthalten mindestens einen Wirkstoff, der bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus proteinogenen Wirkstoffen, Wirkstoffen pflanzlicher Herkunft, Wirkstoffen tierischer Herkunft und sonstigen pharmazeutischen oder kosmetischen Wirkstoffen besteht.

[0073] Die hier genannten Wirkstoffe können darüber hinaus wie vorstehend bereits erwähnt auch in der Collagenträgermatrix enthalten sein, ohne in den Polymerpartikeln enthalten zu sein.

[0074] Besonders bevorzugt handelt es sich um einen Wirkstoff, der die Wundheilung fördert.

[0075] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Wirkstoff um Insulin.

[0076] Erfindungsgemäß wird der proteinogene Wirkstoff bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt, die aus Wachstumsfaktoren, proteinogenen Hormonen, Enzymen, Coenzymen, Glykoproteinen, Blutkoagulationsfaktoren, anderen Cytokinen und rekombinant hergestellten Varianten der vorstehend genannten Wirkstoffen besteht.

[0077] Erfindungsgemäß einsetzbare Wachstumsfaktoren werden bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt, die aus VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), FGF-1 (saurer Fibroblast Growth Factor), TGF-β, TGF-α (Transforming Growth Factor β bzw. α), EGF (Endothelial Growth Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor), TNF-α (Tumor Necrosis Factor α), IGF I bzw. II (Insulin-like Growth Factor/Insulin Binding Growth Factor I bzw. II), Heparin Binding Growth Factor I bzw. II, PDGF (Platelet Derived Growth Factor), PD-ECGF (Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor), BMP (Bone Morphogenetic Growth Factor), GHRP (Growth Hormone Release Factor), Cartilage Inducing Factor A bzw. B, Bone Growth

Factors, Interleukin 8, Angiopoietin, Angiogenin, Aprotinin, und vWF (von Willebrand Factor) besteht.

[0078] Glykoproteine als Wirkstoffe schließen beispielsweise Immunglobuline und Antikörper ein.

[0079] Blutkoagulationsfaktoren als Wirkstoffe schließen beispielsweise Fibrinogen ein.

[0080] Andere Cytokine als Wirkstoffe schließen beispielsweise Interleukine und Interferon ein.

[0081] Wirkstoffe pflanzlicher Herkunft als Wirkstoffe schließen beispielsweise Fruchtextrakte mit wundheilender Wirkung, wie Traubenkernextrakt, Blütenpollen, Polysaccharide und Derivate davon, wie D-Glucane, wie β-Glucan (wie Paramylon) und Phytosterole ein.

[0082] Wirkstoffe tierischer Herkunft als Wirkstoffe schließen beispielsweise Honig und Honigextrakte und Propolis ein.

[0083] Sonstige Wirkstoffe schließen beispielsweise Vitamine, Antiseptika, wie Povidon-Jod, Entzündungshemmende Mittel, wie insbesondere Dexpanthenol, Glycolipide (Ceramide), Enzyminhibitoren, Immunstimulantien (wie Echinacea, Pelargonium reniforme/sidoides), Immunsuppressiva, Lokalanästhetika, Antiinfektiva, wie antibakterielle Mittel, antivirale Mittel, Antioxidantien, Steroidhormone und Mineralstoffe, wie Salze von Alkali- und Erdalkalimetallen ein.

[0084] Diese Wirkstoffe sind allein oder in Kombination mehrerer Wirkstoffe in den Polymerpartikeln bevorzugt in einer Menge von zweckmäßig bis zu 80 Gew.-%, bevorzugt bis zu 60 Gew.-%, bevorzugter bis zu 40 Gew.-% bezogen auf die Gesamtmasse der Polymerpartikel vorhanden.

[0085] Im Falle der proteinogenen Wirkstoffe, wie insbesondere auch Insulin können diese bevorzugt in einer Menge von bis zu 10 Gew.-% bezogen auf die Gesamtmasse der Polymerpartikel vorliegen.

[0086] In der erfindungsgemäßen Zusammensetzung können die Polymerpartikel aber auch die Collagenträgermatrix wahlweise mindestens einen Hilfsstoff umfassen. Derartige Hilfsstoffe werden bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt, die aus Wirkstoffstabilisatoren und die Freisetzung des Wirkstoffs steuernden Mitteln besteht.

[0087] Die Wirkstoffstabilisatoren werden bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt, die aus Kryoprotektoren, Lagerstabilisatoren, pH-Stabilisatoren, thermische Stabilisatoren und Feuchtigkeitsstabilisatoren besteht. Derartige Wirkstoffstabilisatoren schließen beispielsweise Zucker, wie Mannit, Mannose, Glucose, Polyole, wie Glycerin, Salze, wie Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Serumalbumine, wie HSA (Human Serum Albumine) und BSA (Bovine Serum Albumine), Gelatine und Kollagen ein.

[0088] Die erfindungsgemäße Zusammensetzung weist bevorzugt einen Volumenanteil der Polymerpartikel von weniger als 30 Vol.-%, bevorzugt weniger als 25 Vol.-% bezogen auf das Gesamtvolumen der Zusammensetzung auf.

[0089] Die erfindungsgemäße Zusammensetzung weist bevorzugt einen Gewichtsanteil der wirkstoffbeladenen Polymerpartikel, bezogen auf die Gesamtmasse der Zusammensetzung von bis zu 80 Gew.-%, bevorzugter bis zu 70 Gew.-%, noch bevorzugter bis zu 60 Gew.-% und noch bevorzugter von bis zu 40 Gew.-% auf.

[0090] Erfindungsgemäß besonders bevorzugte Wirkstoffe sind die Wundheilung fördernde Wirkstoffe, wie insbesondere Wachstumsfaktoren, also Proteine etc. Die Wirkstoffklasse der Peptide, Proteine und Enzyme hat infolge rekombinanter DNA Technologie vermehrt an Bedeutung als therapeutischer Wirkstoff in der Medizin gewonnen. Rekombinante Impfstoffe, Hormone und Wachstumsfaktoren können hierfür als Beispiele genannt werden. Ihre biologische Aktivität ist jedoch von der entsprechenden Bioverfügbarkeit abhängig. Die kontrollierte Freisetzung auch großer hochmolekularer Proteine bzw. Enzyme aus biokompatiblen Polymeren eröffnet dieser Wirkstoffklasse neue Möglichkeiten. Im Gegensatz zu niedermolekularen Wirkstoffen besitzen Proteine und Enzyme große globuläre Strukturen mit einer komplexen internen Architektur, welche ihre einzigartige biologische Aktivität bestimmt und zahlreiche chemisch reaktive Bereiche als auch chemisch labile Bindungen. Hierdurch begründet stellt die Proteinstabilität eine der entscheidenden Hürden bei der Formulierung von kontrollierten Freisetzungssystemen zum Beispiel von Mikrosphären dar. Chemische als auch physikalische Prozesse haben Einfluss auf die Proteinstabilität und können Auswirkungen auf die biologische Aktivität haben. Neben chemischen Modifizierungen, die zur Verminderung oder gar zum Verlust der Aktivität führen,

können physikalische Prozesse Einfluss auf die tertiär Struktur haben und zur Agglomeration, Denaturierung bzw. Ausfällung des Proteins führen. Eine Übersicht verschiedener Faktoren, welche die biologische Aktivität von Proteinen und Enzymen beeinflussen ist in der folgenden Abbildung dargestellt und muss bei der Herstellung Protein und Enzym enthaltender Mikrosphären berücksichtigt werden.
Siehe **Abb. 4**.

[0091] Der Einfluss von organischen Lösemitteln, in der Regel werden hydrophobe aprotische Polymerlösemittel verwendet, auf die Nativität der Proteine ist stark von ihrer Vorgeschichte abhängig. So haben der pH-Wert und Stabilisatoren bei der Gefriertrocknung, sowie der Restwassergehalt des Proteins direkten Einfluss auf die Nativität, wenn diese organischen Lösemitteln ausgesetzt werden. Der Einfluss beruht auf einer Restmobilität der Proteine im organischen Lösemittel, welche zur Denaturierung bzw. Aggregation der Proteine, sowie der Fähigkeit des organischen Lösemittels dem Protein Wasser zu entziehen und seine katalytischen Zentren zu zerstören. Werden wässrige Proteinlösungen organischen Lösemitteln zugefügt, so kann die Diffusion des organischen Lösemittels in die wässrige Phase zu einer Veränderung der Ionenstärke führen oder Bindungen mit dem Protein eingehen und schließlich mit der Denaturierung und Agglomeration des Proteins abschließen. Die Herstellung von Protein enthaltenden Mikrosphären besteht aus verschiedenen Arbeitsschritten die zu einer extremen Vergrößerung der Oberfläche führen. Typische Methoden zur Erzeugung von Emulsionen sind einfaches Mischen (Vortex), Homogenisieren (Ultraturrax) und Ultraschallbehandlung. Die dabei gebildeten hydrophilen/hydrophoben Grenzflächen sowie die angewendeten Scherkräfte können die Nativität der Proteine stark beeinträchtigen und zum Verlust der biologischen Aktivität führen. Bei der Herstellung Protein enthaltender Mikrosphären müssen die Parameter, welche Einfluss auf die Nativität von Proteinen und Enzymen haben, bei der Auswahl der entsprechenden Methode in Hinblick auf einen größt möglichen Erhalt der biologischen Aktivität berücksichtigt werden.

[0092] Um die erfindungsgemäßen Bedingungen der Einführung von Proteinwirkstoffen in die Polymerpartikel zu optimieren wird Meerretichperoxidase als Modellsubstanz verwendet. Der optimale pH-Wertbereich für die katalytische Aktivität der Meerrettichperoxidase liegt bei pH 6 – 7. Das Protein ist als Enzym in der Lage, substratvermittelt mit verschiedenen Chromogenen unterschiedliche Farbreaktionen zu katalysieren. Dadurch eignet sich dieses Protein gut als freizusetzendes Modellprotein, das bequem nachgewiesen werden kann.

[0093] Ein erfindungsgemäß besonders bevorzugter Wirkstoff stellt das Insulin dar.

[0094] Erfindungsgemäß wird besonders bevorzugt rekombinant hergestelltes Humaninsulin verwendet. Verschiedene Arbeiten zeigen am Beispiel von immobilisiertem Insulin auf unterschiedlichen Polymeroberflächen, den positiven Einfluss auf die Proliferation von Fibroblasten. Es übt daher auch günstige Einflüsse bei der Wundheilung aus.

[0095] Die oben bereits beschriebene ((w/o)/w)-Emulsions-Evaporations-Methode kann bevorzugt zur Herstellung eines Freisetzungssystems für Signalmoleküle z.B. Wachstumsfaktoren zur Unterstützung des Tissue Engineerings herangezogen werden. Im Rahmen der Erfindung wurde porcines Insulin, das wachstumsfördernde Eigenschaften besitzt und mit Hilfe des Bradford-Test quantitativ bestimmt werden kann, verwendet.

Herstellung von Insulin enthaltenden Poly (D,L-lactid-co-glycolid) 50:50 – Mikrosphären

[0096] Die Herstellung Insulin enthaltender Poly(D,L-lactid-co-glycolid) 50:50 Mikrosphären erfolgt nach der komplexen Emulsions-Evaporations-Methode. Hierbei wird Insulin in einem alkalischen Bicarbonat Puffer (pH 9,4) oder verdünnter (10%-iger) Essigsäure gelöst/suspendiert und in einer Poly(D,L-lactid-co-glycolid) 50:50/Methylenchlorid-Lösung mit Hilfe eines Ultraturrax (IKA) bei 1 6000 U/min emulgiert. Diese primäre w1/o-Emulsion wird in einer auf 15°C temperierten wässrigen Polyvinylalkohol-Lösung durch Rühren unter Ausbildung einer komplexen w1/o/w2-Emulsion (w1 = innere wässrige Phase; w2 = äußere wässrige Phase) emulgiert. Durch Reduzieren des Druckes auf 400 mbar wird die leichtflüchtige Methylenchlorid-Phase vollständig entfernt und die Insulin enthaltenden Mikrosphären nach mehrfachem Waschen isoliert und lyophilisiert. Die Herstellungsparameter Insulineinwaage und das Phasenverhältnis w1:o der primär Emulsion werden in Hinblick auf Effizienz in Bezug auf die eingesetzte Insulinmenge untersucht. Studien zum Freisetzungsverhalten Insulin enthaltender Poly(D,L-lactid-co-glycolid) 50:50 Mikrosphären werden in Abhängigkeit von den Herstellungsparametern

- w1/o-Phaseverhältnis
- Polymerkonzentration in Abhängigkeit der Polymereinwaage
- Polymerkonzentration in Abhängigkeit des Volumens der dispergierten o-Phase
- Insulineinwaage

in PBS-Puffer bei 37°C durchgeführt.

[0097] Einfluss verschiedener Herstellungsparameter auf den Insulingehalt Insulin enthaltender Poly (D,L-lactid-co-glycolid) 50:50-Mikrosphären

[0098] Die Vereinigung der dispergierten inneren wirkstoffenthaltenden Phase (w1) mit der äußeren kontinuierlichen wässrigen Phase (w2) führt zum irreversiblen Verlust an Wirkstoff und ist von verschiedenen Herstellungsparametern der w/o/w-Emulsions-Evaporations-Methode abhängig. Die Effizienz der Herstellung in Bezug auf den eingesetzten Wirkstoff ist ein entscheidender Parameter für das Freisetzungssystem. So spielen die einzelnen Phasenverhältnisse w1/o sowie o/w2, die Wirkstoff- und Polymerkonzentration und die Stabilität der Primäremulsion (w1/o), Temperatur und Druck eine entscheidende Rolle.

[0099] Einfluss des w1:o-Phasenverhältnisses auf die Effizienz der Verkapselung am Beispiel von Insulin enthaltenden PLGA 50:50-Mikrosphären.

[0100] Die Effizienz der Insulinverkapselung nimmt bei identischer Insulineinwaage mit steigendem w1-Volumen von 52% auf 69% zu (s. folgende Abbildung).
Siehe **Abb. 5**.

[0101] Der Verlauf der Verkapselungseffizienz wird durch die Wirkstoffkonzentrationsverhältnisse der w1-Phase durch Zunahme des w1-Volumens entscheidend beeinflusst. Bei gleicher Tröpfchengröße der dispergierten Phase w1, durch identische Scherkräfte, hat der Verlust der w1-Phase mit höheren Wirkstoffkonzentrationen größere Wirkung auf die Verkapselungseffizienz als bei niedrigen Wirkstoffkonzentrationen. Dieser Effekt wird durch nachfolgende Abbildung untermauert. Die konzentrationsabhängige Effizienz der Verkapselung nimmt bei zunehmender Konzentration und gleichem w1:o-Phasenverhältnis von 69% auf 49% ab.
Siehe **Abb. 6**.

[0102] Der Einfluss der w1/o-Phasenverhältnisse zeigt im untersuchten Bereich zwischen 0,1-0,6 keinen signifikanten Einfluss auf die Oberflächenmorphologie (siehe nachfolgende **Abb. 7**, A-D). Die Mikrosphären weisen eine geschlossene Oberfläche auf, die eine sphärische himbeerförmige Struktur besitzt.

Freisetzungsstudien von Insulin aus entsprechenden Mikrosphären

[0103] Die folgenden Freisetzungsprofile von Insulin aus resorbierbaren PLGA 50:50 Mikrosphären in Abhängigkeit von:

– der Insulineinwaage
– der Polymerkonzentration in der dispergierten Methylenchlorid-Phase (o-Phase) durch verschiedene Polymereinwaagen
– der Polymerkonzentration der dispergierten Methylenchlorid-Phase (o-Phase) durch Variation des Methylenchloridvolumens bei gleicher Polymereinwaage
– des w1/o-Phaseverhältnisses

wurden über einen Zeitraum von 6 Wochen in PBS-Puffer bei 37°C untersucht. Die freigesetzte Insulinmenge ist über die Zeit kumulativ aufgetragen. Bei der vorliegenden untersuchten Freisetzung handelt es sich um eine Kombination des diffusions-, quellungs- und degradationskontrollierten Freisetzungsmechanismus.
Siehe **Abb. 8**.
Siehe **Abb. 9**.

[0104] Das Freisetzungsprofil von Insulin aus RESOMER RG 504-Mikrosphären in Abhängigkeit des w1:o-Phasenverhältnisses (vorstehende Abbildung) zeigt, dass bei zunehmendem w1:o-Phasenverhältnis im gleichen Zeitraum eine Zunahme der Insulinfreisetzung stattfindet. Alle Freisetzungsprofile weisen innerhalb der ersten 12 h einen für Mikrosphären typischen „burst"-Effekt auf. Für die Phasenverhältnisse 0,75:20 und 1,5:20 ist eine weitere Freisetzung von Insulin über einen Zeitraum von 14 d zu beobachten. Für das Phasenverhältnis 0,25:20 wird nach der anfänglichen Freisetzung keine signifikante Freisetzung von Insulin innerhalb des Inkubationszeitraums festgestellt. Die Erniedrigung des Phasenverhältnisses führt zu einer deutlich dichteren Mikrosphärenmatrix mit isolierten insulinhaltigen Kavitäten, die Insulin erst nach weiterem Abbau des Polymers freisetzt.

[0105] Die Änderung der eingesetzten Polymerkonzentration der o-Phase (Siehe **Abb. 10**) zeigt, dass bei ab-

nehmender Polymereinwaage die Freisetzung von Insulin im gleichen Zeitraum zunimmt. Zu beobachten ist ein „burst"-Effekt zu Beginn der Freisetzung, dem allen Freisetzungsprofilen gemein eine Feisetzung von Insulin über mindestens 7-14 d nachfolgt.
Siehe **Abb. 11**.

[0106] Analog kann die (w/o)-Emulsions-Extraktions-Methode zur Herstellung Wirkstoff enthaltender Gelatine-Mikrosphären verwendet werden.

[0107] Als Modellsubstanz für das Einbringen niedermolekularer lipophiler Wirkstoffe können Versuche mit Acetylsalicylsäure (ASS) dienen.

[0108] Die (o/w)-Emulsions-Evaporations-Methode wurde zur Herstellung Poly(D,L-lactid)-Mikrosphären-Freisetzungsungssysteme (PDLLA) mit Acetylsalicylsäure als Wirkstoff hergestellt.
Siehe **Abb. 12**.

[0109] Einbringen von Mikrosphären in Collagen-Matrices.

[0110] Die **Abb. 13** zeigt schematisch ein bevorzugtes Verfahren zum Einbringen der Polymerpartikel in die erfindungsgemäße Collagen-Trägermatrix.

[0111] Erfindungsgemäß schließt sich bevorzugt die vorstehend beschriebene Dehydrothermalvernetzung der Collagenträgermatrix an.

[0112] Die folgende Abbildung zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Querschnitten Mikrosphären dotierter Collagenmatrices. Die Mikrosphären sind in der Collagenmatrix fixiert. Der Querschnitt zeigt die innere poröse schwammartige Struktur der Mikrosphären, die ein Abbild der inneren w/o-Emulsion wiedergibt, das abhängig von den verwendeten Prozessparametern ist (z. B, w:o- bzw, o:w-Phasenverhältnis, Polymerkonzentration, Temperatur, Druck). Die großen Poren im Zentrum der Mikrosphären entstehen durch das Brechen der vorliegenden instabilen w/o-Emulsion, das zur Vereinigung der inneren wässrigen Phase führt. Infolge des fortlaufenden Entfernens des Polymerlösemittels kommt es zu einem Aushärten der Sphären von außen nach innen, so dass im Zentrum der „unreifen" Mikrosphären das Brechen der Emulsion weiter fortschreiten kann und zu größeren Poren führt.
Siehe **Abb. 14**.

[0113] Die enthaltene Wirkstoffdosis kann sowohl durch das Collagen-Mikrosphären-Verhältnis als auch durch Mikrosphären mit höherem Wirkstoff- insbesondere Proteingehalt variiert werden.

[0114] Das Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung, wie es vorstehend gezeigt und erläutert wurde umfasst zweckmäßig die Schritte:

a) Herstellen der mit mindestens einem Wirkstoff beladenen Polymerpartikel,
b) Herstellen einer wässrigen Suspension aus Collagen, und den im Schritt a) hergestellten Polymerpartikel,
c) gegebenenfalls Hinzufügen weiterer Wirkstoffe, Vernetzungsmittel, und Hilfsstoffe,
d) Gefriertrocknung der Suspension,
e) Überführen der erhaltenen porösen Materialien in die gewünschte Form.

[0115] Bevorzugt wird Schritt a) wie oben beschrieben nach einem Verfahren durchgeführt, das aus der Gruppe ausgewählt wird, die besteht aus:

– (w/o)/w)-Emulsions-Evaporations-Methode,
– (w/o)-Emulsions-Extraktions-Methode,
– Grenzflächenpolymerisations-Methode, wie Grenzflächenpolykondensation.

[0116] Die Schritte b) bis e) werden ebenfalls wie oben beschrieben durchgeführt.

[0117] In der erfindungsgemäßen Zusammensetzung erfolgt die in-vivo-Freisetzung von mindestens einem Wirkstoff über einen Zeitraum von mindestens 12 Stunden, bevorzugt mindestens 24 Stunden.

[0118] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin die erfindungsgemäße Zusammensetzung zur Verwendung als pharmazeutisches Produkt, insbesondere zur topischen Anwendung oder zur Implantation bei Menschen oder Tieren.

[0119] Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Zusammensetzung zur Herstellung eines pharmazeutischen Produktes, insbesondere zur Verwendung in mindestens einer Indikation bzw. Anwendung, die aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus: Verbesserung der Wundheilung, Unterfütterung tiefer Hautdefekte, Unterstützung der Geweberegeneration, Regeneration der Dermis, Behandlung von Brandwunden, Verwendung in der plastischen Chirurgie, Verwendung nach Narbenexcision, Kombinationstherapie mit autologen Spalthauttransplantaten, Unterstützung der Bildung von Granulationsgewebe, Unterstützung der Angiogenese, Gewährleistung einer besseren Narbenqualität, Behandlung chronischer Wunden, wie Ulcus Cruris, Dekubitus und diabetischer Fuß, Behandlung offener Wunden, Behandlung von Wundheilungsstörungen, Behandlung von Erkrankungen mit tiefen Hautdefekten, Herstellung eines Kieferimplantats, Herstellung eines Knochenimplantats, Herstellung eines Knorpelimplantats, Herstellung eines Gewebeimplantats, Herstellung eines Hautimplantats, Herstellung einer medizinischen Auflage, Herstellung einer transdermalen Auflage, Herstellung eines Wundpflasters, Herstellung eines Wundverbandmaterials, Herstellung einer Wundauflage und Herstellung einer Zellzuchtmatrix.

Beispiele

Ausgangsmaterial und Methoden

Polymere

[0120] Die verwendeten resorbierbaren Polyester-Typen wurden als Pulver von der Firma Boehringer-Ingelheim KG (Ingelheim, Deutschland) bezogen und ohne weitere Aufreinigung verwendet.

– Poly(D,L-lactid-co-glycolid) 50:50
Resomer RG 504, batch no. 3401 7, inhärente Viskosität 0,49 dl/g
– Poly(D,L-lactid)
Resomer RG 208, batch no. 260316, inhärente Viskosität 3,6 dl/g

Porcines Insulin: Dr. J. Salber
Meerretichperoxidase. Roche

[0121] Als chromogenes Substrat für Meerretichperoxidase wurde Tetramethylbenzidin der Firmengruppe Sigma-Aldrich verwendet.

Partikelgrößenbestimmung

[0122] Die Bestimmung der Größenverteilung der hergestellten Mikrosphären bzw. Polymerpartikel erfolgte mit einem Partikelsizer Mastersizer 2000 mit Dispergiereinheit Hydro 2000 MS der Firma Malvern (Worcestershire, England).

Bestimmung der Degradationsgeschwindigkeit der Collagenmatrix:

[0123] Die Degradationsgeschwindigkeit der Collagenmatrix wird erhalten durch Bestimmung des Gewichtes einer Probe (ohne Polymerpartikel) vor und nach enzymatischem Abbau durch Collagenase aus Clostridium histolyticum (Typ I, Worthington Biochemicals). Collagen-Matrices (Würfel mit 5 mm Kantenlänge) wurden in eine Lösung eingetaucht, die 40 Einheiten Collagenase in 1 ml PBS (pH 7,2) enthielt und unter gelindem Schütteln bei 37°C für 2 Stunden inkubiert. Der Abbau wird durch Zugabe von 0,2 ml einer 0,25 M EDTA-Lösung gestoppt, und es wird für 10 Minuten auf Eis gekühlt. Nachfolgend wird die Probe mit 5 ml PBS-Puffer (pH 7,2) dreimal für 15 Minuten, mit 5 ml entmineralisiertem Wasser dreimal für 15 Minuten gewaschen, bei –80°C über Nacht eingefroren und anschließend gefriergetrocknet. Nach der Gefriertrocknung wird das Gewicht der partiell abgebauten Collagenträgerprobe bestimmt und die Degradationsgeschwindigkeit wie folgt bestimmt:

Degradationsgeschindigkeit (%) = 100 × (Ursprungsgewicht – Gewicht nach Abbau)/Ursprungsgewicht

Herstellungsbeispiele Mikrosphären

Herstellung Acetylsalicylsäure enthaltender Poly(D,L-lactid)-Mikrosphären mit Hilfe der (o/w)-Emulsions-Evaporations-Methode

[0124] Die Herstellung Acetylsalicylsäure enthaltender Poly(D,L-lactid)-Mikrosphären beruht auf dem Verfah-

ren der einfachen o/w-Emulsions-Evaporations-Methode. Als Polymer wurde das resorbierbare Poly(D,L-lactid) RESOMER® R 208 und Poly(D,L-lactid-co-glycolid) 50:50 RESOMER® RG 504 der Firma Boehringer Ingelheim, Deutschland verwendet. Der Wirkstoff Acetylsalicylsäure wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

[0125] Acetylsalicylsäure in DMSO wurde zu einer Lösung von Poly(D,L-lactid) bzw. Poly(D,L-lactid-co-glycolid) 50:50 in Methylenchlorid gegeben. Diese organische Phase wird in einer vortemperierten wässrigen Polyvinylalkohol-Lösung durch Rühren emulgiert. Nach einer Minute wird ein Druck von 400 +/– 40 mbar erzeugt und das flüchtige Methylenchlorid vollständig entfernt. Die gebildete wässrige Mikrosphären Suspension wird zentrifugiert und das Mikrosphärensediment dreimal mit 50 ml reinst Wasser gewaschen und anschließend lyophilisiert.

W1/O/W2-Emulsions-Evaporations-Methode

Herstellungsbeispiel 1

(Als Versuchssubstanz wurde Meerrettich-Peroxidase verwendet.)

Einsatzmaterialien:

18g	Polyvinylalkohol	w1-Phase
900ml	Reinstwasser	
7,5g	RESOMER RG 504	o-Phase
60ml	Methylenchlorid	
30,1mg	Peroxidase	w2-Phase
300,4mg	BSA	
6ml	Wasser	

W2/O-Emulsion

[0126] Die Lösung des Polymers Resomer RG 504 in Methylenchlorid wird in einem 250 ml Kolben bei Raumtemperatur vorgelegt. Mit Hilfe eines Ultraturax (IKA) wird bei einer Drehzahl von 16000 U/min. für 30 Sekunden gerührt, während die W2-Phase hinzugegeben wird. Zu der auf 15°C temperierten 2 %igen PVA-Lösung (W1-Phase) wird die W/O-Emulsion unter Rühren mit einem IKA-Rührer (400 U/min.) zugegeben und ein Druck von 400 ± 40 mbar angelegt.

[0127] Nach 8 Stunden und 10 Minuten wird der Reaktor belüftet und die entstandenen Mikrosphären werden in ein 1 L Becherglas überführt und dekantiert. Der Überstand wird abgegossen und das Sediment in konischen 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit jeweils 20 g Reinstwasser aufgefüllt und gewaschen.

[0128] Die Mikrosphären werden in einen 50 ml Kolben überführt und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. An-

schließend werden die Mikrosphären der Gefriertrocknung unterworfen.

[0129] Es werden 6,93 g Mikrosphären erhalten (88,51 % der Theorie), deren Größenverteilung wie folgt war:
d (0,5) Vol.-% 201,3 µm
d (0,5) n-% 160,4 µm
n-%/(Vol.-%) 0,80.

Herstellungsbeispiel 2

Herstellung Insulin-haltiger Polymerpartikel

Einsatzmaterialien:

18g	Polyvinylalkohol	w1-Phase
900ml	Reinstwasser	
7,5g	RESOMER RG 504	o-Phase
60ml	Methylenchlorid	
300,14mg	Insulin	w2-Phase
6ml	BupH-Puffer	

BupH-Puffer = Carbonat/Bicarbonat-Puffer

W2/O-Emulsion

[0130] Die Lösung des Polymers Resomer RG 504 in Methylenchlorid wird in einem 250 ml Kolben bei Raumtemperatur vorgelegt. Mit Hilfe eines Ultraturax (IKA) wird bei einer Drehzahl von 16000 U/min. für 30 Sekunden gerührt, während die W2-Phase hinzugegeben wird. Zu der auf 15°C temperierten 2 %igen PVA-Lösung (W1-Phase) wird die W/O-Emulsion unter Rühren mit einem IKA-Rührer (400 U/min.) zugegeben und ein Druck von 400 ± 40 mbar angelegt.

[0131] Nach 8 Stunden wird der Reaktor belüftet und die entstandenen Mikrosphären werden in ein 1 L Becherglas überführt und dekantiert. Der Überstand wird abgegossen und das Sediment in konischen 50 ml Zentrifugenröhrchen (Greiner) zentrifugiert, der Überstand verworfen und mit jeweils 20 g Reinstwasser aufgefüllt und gewaschen.

[0132] Die Mikrosphären werden in einen 50 ml Kolben überführt und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend werden die Mikrosphären der Gefriertrocknung unterworfen.

[0133] Die Größenverteilung war wie folgt:
d (0,5) Vol.-% 248,128 µm
d (0,5) n-% 164,699 µm
n-%/(Vol.-%) 0,66.

Herstellungsbeispiel 3

Einführung der Mikropartikel in die Collagenträgermatrix

[0134] 6 g der wie oben beschrieben hergestellten Polymerpartikel wurden in 3 kg einer 1,8%-igen (säureunlöslichen) Collagen-Suspension, hergestellt nach dem oben beschriebenen Verfahren gegeben und vermischt. Die erhaltene Suspension wurde entgast, in flache Behälter gegossen, eingefroren und anschließend der Gefriertrocknung unterworfen. Dabei wurden Platten der erfindungsgemäßen Zusammensetzung erhalten. Nach dem Trocknen wurde die Collagenmatrix der Dehydrothermalvernetzung unterworfen. Die erhaltenen Schichten wurden durch Schneiden konfektioniert. Die erhaltenen Schichten waren im feuchten Zustand reißfest.

Erläuterungen der Abbildungen:

[0135] Abb. 1: Halbwertzeit von Polylactid-co-glycolid in Monaten in Abhängigkeit des Copolymerverhältnisses.

[0136] Abb. 2: Schematische Darstellung der (o/w)-Emulsions-Evaporations-Methode

[0137] Abb. 3; Schematische Darstellung der ((w/o)/w)-Emulsions-Evaporations-Methode

[0138] Abb. 4: Übersicht unterschiedlicher Faktoren, die Einfluss auf die Nativität von Proteinen und Enzymen haben.

[0139] Abb. 5; Effizienz der Verkapselung von Insulin in Abhängigkeit der w1:o-Phasenverhältnisse.

[0140] Abb. 6: Effizienz der Verkapselung von Insulin in Abhängigkeit der Insulinkonzentration der dispergierten wässrigen Phase (w1).

[0141] Abb. 7; Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen insulinhaltiger PGLA 50:50 – Mikrosphären; w1/o-Phasenverhältnis (A) = 0,1; (B) = 0,2; (C) = 0,3; (D) = 0,6; Insulinkonzentration (E) = 20 mg/ml; (F) = 40 mg/ml.

[0142] Abb. 8: Dargestellt ist die Freisetzung von Insulin aus PLGA 50:50 (RESOMER RG 504) Mikrosphären in Abhängigkeit der eingesetzten Insulineinwaage von 10, 20, 30, 40 mg Insulin/ml Carbonatpuffer bei gleichen Prozessparametern

[0143] Abb. 9: Dargestellt ist die Freisetzung von Insulin aus RESOMER RG 504 Mikrosphären in Abhängigkeit des w1:o-Phasenverhältnisses,

[0144] Abb. 10: Dargestellt ist die Freisetzung von Insulin aus RESOMER RG 504 Mikrosphären in Abhängigkeit der eingesetzten Polymerkonzentration von 0,125 g/ml, 0,1 g/ml, 0,0875 g/ml, 0,075 g/ml und 0,0625 g/ml sowie gleichen Prozessparametern.

[0145] Abb. 11: Dargestellt ist die Freisetzung von Insulin aus RESOMER RG 504 Mikrosphären in Abhängigkeit des eingesetzten Methylenchloridvolumens (o-Phase) von 20, 30, 40 ml bei gleicher Polymereinwaage sowie gleichen Prozessparametern.

[0146] Abb. 12: ASS-Freisetzungsprofile aus PDLLA-Mikrosphären. Dargestellt ist die prozentuale Freisetzung von ASS in Abhängigkeit vom ASS-Gehalt der Mikrosphären.

[0147] Abb. 13: Schema des Verfahrens des Einbringens der Polymerpartikel in die Collagenträgervliesmatrix.

[0148] Abb. 14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Mikrosphären dotierten Collagenmatrix

Patentansprüche

1. Zusammensetzung, enthaltend ein Collagen-enthaltendes Trägermaterial, das Partikel aus mindestens einem polymeren Material (Polymerpartikel) enthält, die mindestens einen Wirkstoff enthalten.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, worin das polymere Material aus natürlichen biologisch abbaubaren Polymeren (Biopolymeren) oder synthetischen biologisch abbaubaren Polymeren ausgewählt ist.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, worin das polymere Material aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus Polypeptiden, Polysacchariden und Derivate davon, Polyvinylalkohol (PVA), Polyvinylpyrrolidon (PVP), Poly(meth)acrylaten, Polyalkylcyanoacrylaten (PACA), Acrylcopolymeren, Polyethylen-vinylacetat-Copolymeren, Polyhydroxyalkanoaten, Hydrokolloiden, Polyanhydriden, Polyorthoestern, Poly-ε-caprolacton (PCL), Copolymeren aus Poly-ε-caprolacton und Polylactiden, Polyaminosäuren, Polyurethanen, Polyethylenglykolen, Polymilchsäure bzw, Polylactiden (PLA), Polycarbonaten, Copolymeren aus Polylactiden, Polyglycoliden und Polycarbonaten, Copolyestern aus Milchsäure und Glykolsäure (PLG), Poly-L-lysin und deren Homologen und Cokondensaten, und Polycarbonaten besteht,

4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, worin das Collagen-enthaltende Trägermaterial aus bovinem, porcinem, equinem, humanem oder gentechnisch hergestelltem Collagen hergestellt ist.

5. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, worin das Collagen-enthaltende Trägermaterial mindestens einen weiteren Bestandteil enthält, der aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus Wirkstoffen, Strukturbildnern und Hilfsstoffen besteht,

6. Zusammensetzung nach Anspruch 5, worin die Wirkstoffe und Strukturbildner aus extrazellulären Matrixbestandteilen ausgewählt werden.

7. Zusammensetzung nach Anspruch 6, worin der extrazelluläre Matrixbestandteil aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Elastin, Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen, Glucanen, Hydrolysaten und chemisch modifizierten Derivaten davon besteht.

8. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, worin das verwendete Collagen-enthaltende Trägermaterial aus säureunlöslichem Collagen hergestellt ist.

9. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, worin das verwendete Collagen-enthaltende Trägermaterial ein poröses Material ist.

10. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, worin das verwendete Collagen-enthaltende Trägermaterial ein thermisch oder chemisch oder thermisch und chemisch vernetztes Collagenmaterial ist.

11. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, worin das verwendete Collagen-enthaltende Trägermaterial ein chemisch vernetztes Collagenmaterial ist und die Vernetzung mit mindestens einem polyfunktionellen Vernetzungsmittel durchgeführt ist.

12. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, worin die thermische Vernetzung des verwendeten Collagen-enthaltenden Trägermaterial bei erhöhten Temperaturen unter vermindertem Druck oder bei Normaldruck durchgeführt ist.

13. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, worin das Collagen-enthaltende Trägermaterial eine Degradationsgeschindigkeit definiert als

Degradationsgeschindigkeit (%) = 100 × (Ursprungsgewicht – Gewicht nach Abbau)/Ursprungsgewicht

bestimmt durch Behandlung des Collagen-enthaltenden Trägermaterials mit Collagenase aus Clostridium histolyticum (Typ 1) in PBS (Phosphate Buffered Saline)-Puffer bei 37°C für 2 Stunden von 2 % bis 60 % aufweist.

14. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 13, worin der in den Polymerpartikeln enthaltene Wirkstoff aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus proteinogenen Wirkstoffen, Wirkstoffen pflanzlicher Herkunft, Wirkstoffen tierischer Herkunft und sonstigen pharmazeutischen oder kosmetischen Wirkstoffen besteht.

15. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, worin der Wirkstoff die Wundheilung fördert.

16. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, worin der Wirkstoff Insulin ist.

17. Zusammensetzung nach Anspruch 14, worin der proteinogene Wirkstoff aus der Gruppe ausgewählt

wird, die aus Wachstumsfaktoren, proteinogenen Hormonen, Enzymen, Coenzymen, Glykoproteinen, Blutkoagulationsfaktoren, anderen Cytokinen und rekombinant hergestellten Varianten der vorstehend genannten Wirkstoffe besteht.

18. Zusammensetzung nach Anspruch 17, worin die Wachstumsfaktoren aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), FGF-1 (saurer Fibroblast Growth Factor), TGF-β, TGF-α (Transforming Growth Factor β bzw, α), EGF (Endothelial Growth Factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor), TNF-α (Tumor Necrosis Factor α), IGF I bzw, II (Insulin-like Growth Factor/Insulin Binding Growth Factor I bzw, II), Heparin Binding Growth Factor I bzw, II, PDGF (Platelet Derived Growth Factor), PD-ECGF (Platelet Derived Endothelial Cell Growth Factor), BMP (Bone Morphogenetic Growth Factor), GHRP (Growth Hormone Release Factor), Cartilage Inducing Factor A bzw. B, Bone Growth Factors, Interleukin 8, Angiopoietin, Angiogenin, Aprotinin, vWF (von Willebrand Factor) besteht.

19. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 18, worin der in den Polymerpartikeln enthaltene Wirkstoff in einer Menge von bis zu 80 Gew.-% bezogen auf die Gesamtmasse der Polymerpartikel vorliegt.

20. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 19, worin der in den Polymerpartikeln enthaltene proteinogene Wirkstoff in einer Menge von bis zu 10 Gew.-% bezogen auf die Gesamtmasse der Polymerpartikel vorliegt.

21. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 20, worin die Polymerpartikel mindestens einen Hilfsstoff enthalten.

22. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 21, worin der Hilfsstoff aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus Wirkstoffstabilisatoren und die Freisetzung des Wirkstoffs steuernden Mitteln besteht.

23. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 22, worin die Wirkstoffstabilisatoren aus der Gruppe ausgewählt werden, die aus Kryoprotektoren, Lagerstabilisatoren, pH-Stabilisatoren, thermischen Stabilisatoren und Feuchtigkeitsstabilisatoren besteht.

24. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 23, worin der Volumenanteil der Polymerpartikel weniger als 30 Vol.-% bezogen auf das Gesamtvolumen des Zusammensetzung beträgt.

25. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 24, worin der Gewichtsanteil der wirkstoffbeladenen Polymerpartikel, bezogen auf die Gesamtmasse der Zusammensetzung bis zu 80 Gew.-% beträgt,

26. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 25 worin die Polymerpartikel im wesentlichen eine sphärische Gestalt aufweisen.

27. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 26 worin der mittlere Teilchendurchmesser der Polymerpartikel, bestimmt durch Laserlichtbeugung von 0,01 bis 1500 μm beträgt.

28. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 27, worin die in-vivo-Freisetzung mindestens eines Wirkstoffes über einen Zeitraum von mindestens 12 Stunden erfolgt.

29. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 28 in der Form eines schichtartigen Materials mit einer Dicke von 0,1 bis 20 mm.

30. Verfahren zur Herstellung der Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 29, dass die Schritte umfasst:
a) Herstellen von mit mindestens einem Wirkstoff beladenen Polymerpartikeln,
b) Herstellen einer wässrigen Suspension aus Collagen, und den im Schritt a) hergestellten Polymerpartikeln,
c) gegebenenfalls Hinzufügen weiterer Strukturbildner, Wirkstoffe, Vernetzungsmittel und Hilfsstoffe,
d) Trocknung oder Gefriertrocknung der Suspension,
e) Überführen der erhaltenen Materialien in die gewünschte Form.

31. Verfahren nach Anspruch 30 worin Schritt a) nach einem Verfahren durchgeführt wird, das aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus der Emulsions-Evaporations-Methode, der Emulsions-Extraktions-Methode, der Grenzflächenpolymerisations-Methode, der Sprühtrocknung und dem Schmelzemulsions-Verfahren besteht.

32. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 29 zur Verwendung als pharmazeutisches Produkt.

33. Zusammensetzung nach Anspruch 32 zur topischen Anwendung oder zur Implantation bei Menschen oder Tieren.

34. Verwendung der Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 29 zur Herstellung eines pharmazeutischen Produktes.

35. Verwendung nach Anspruch 34 zur Herstellung eines pharmazeutischen Produktes zur Verwendung in mindestens einer Indikation bzw. Anwendung, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die besteht aus: Verbesserung der Wundheilung, Unterfütterung tiefer Hautdefekte, Unterstützung der Geweberegeneration, Regeneration der Dermis, Behandlung von Brandwunden, Verwendung in der plastischen Chirurgie, Verwendung nach Narbenexcision, Kombinationstherapie mit autologen Spalthauttransplantaten, Unterstützung der Bildung von Granulationsgewebe, Unterstützung der Angiogenese, Gewährleistung einer besseren Narbenqualität, Behandlung chronischer Wunden, Behandlung offener Wunden, Behandlung von Wundheilungsstörungen, Behandlung von Erkrankungen mit tiefen Hautdefekten, Herstellung eines Kieferimplantats, Herstellung eines Knochenimplantats, Herstellung eines Knorpelimplantats, Herstellung eines Gewebeimplantats, Herstellung eines Hautimplantats, Herstellung einer medizinischen Auflage, Herstellung einer transdermalen Auflage, Herstellung eines Wundpflasters, Herstellung eines Wundverbandmaterials, Herstellung einer Wundauflage und Herstellung einer Zellzuchtmatrix.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Abb. 1/14

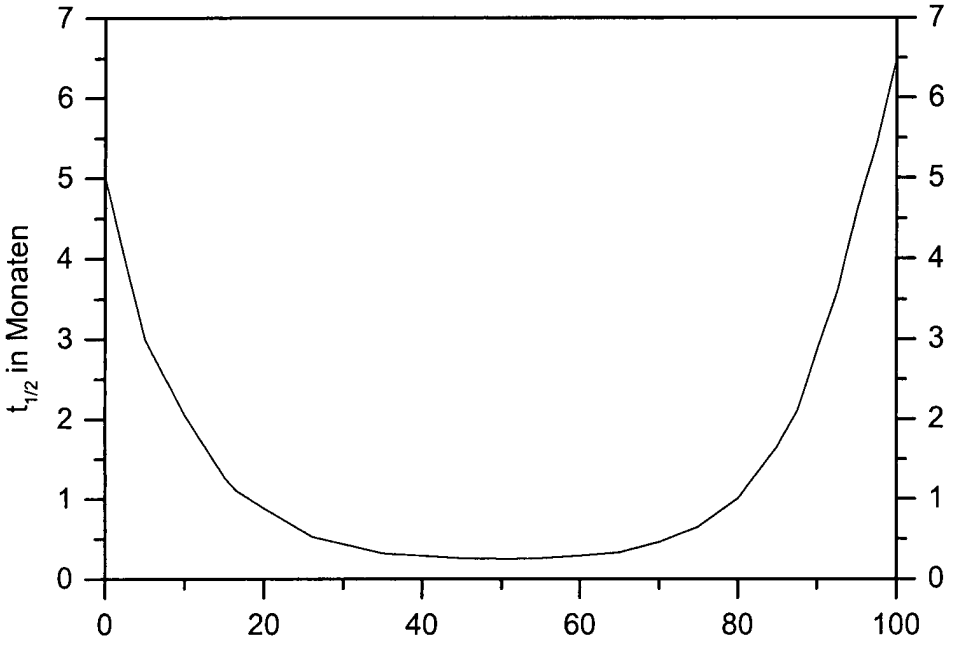


Abb. 2/14

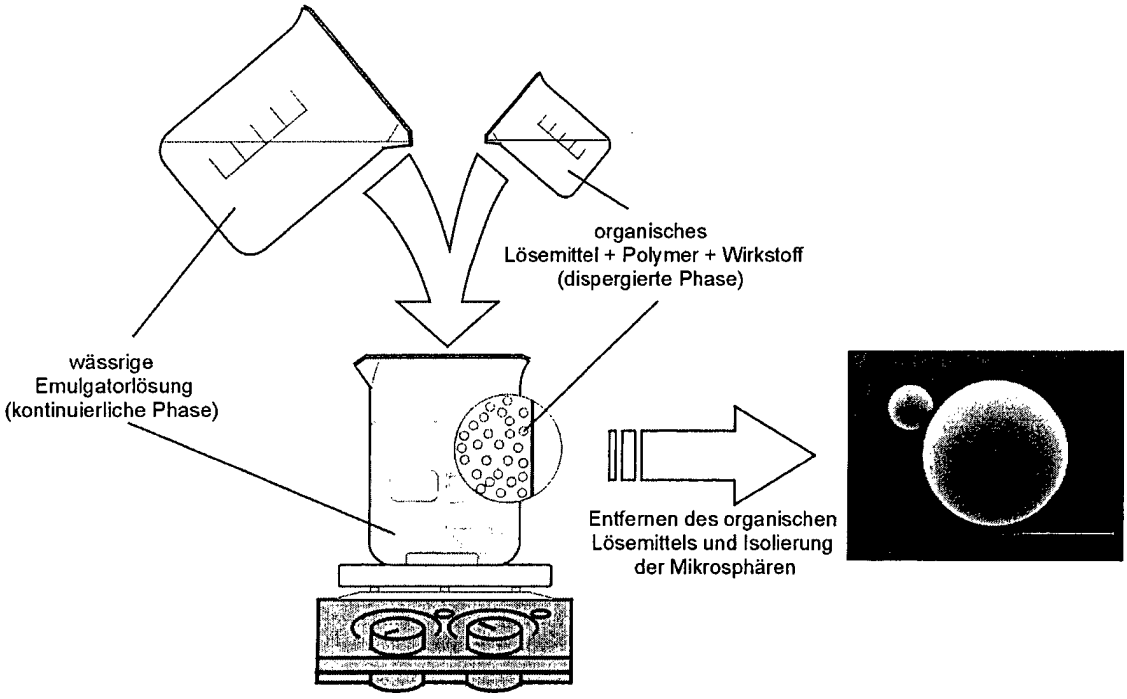


Abb. 3/14

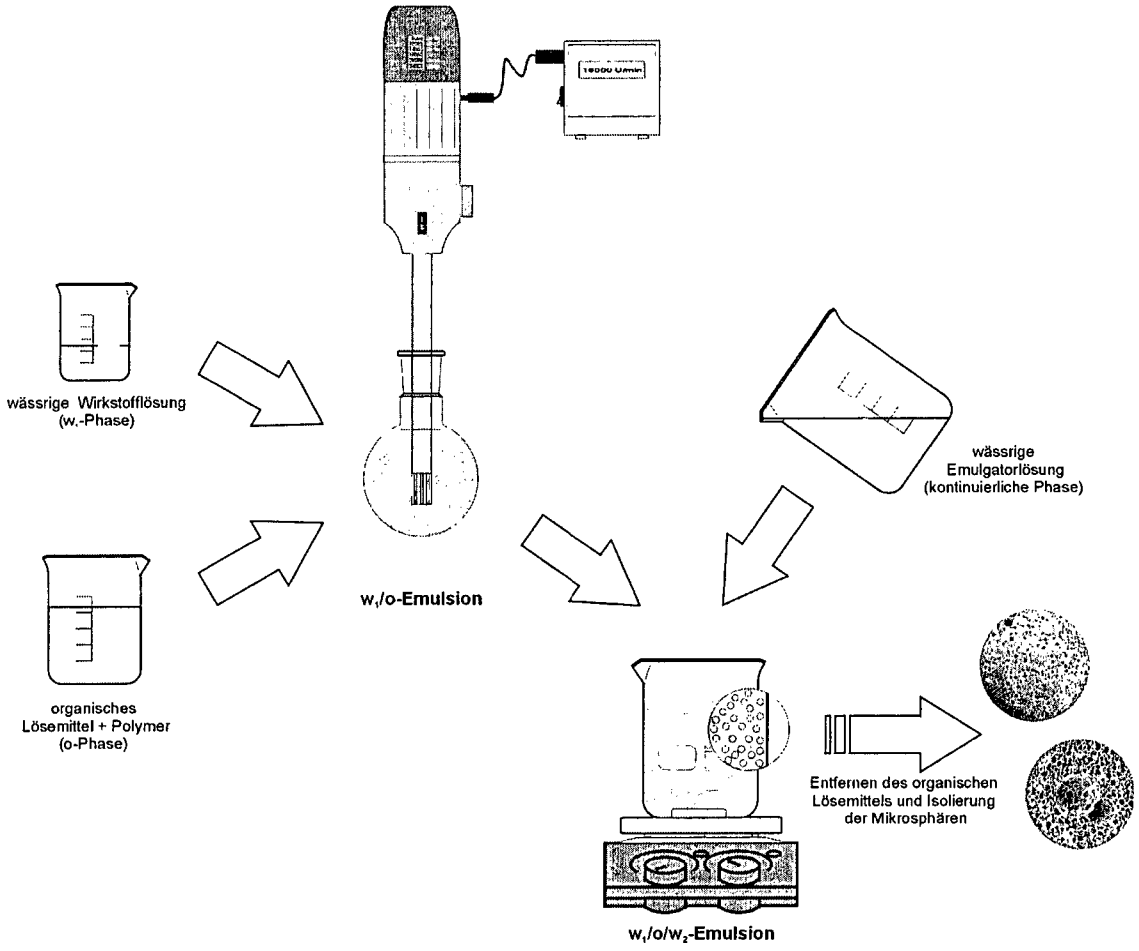

wässrige Wirkstofflösung
(w,-Phase)
organisches
Lösemittel + Polymer
(o-Phase)
w1/o-Emulsion
wässrige
Emulgatorlösung
(kontinuierliche Phase)
Entfernen des organischen
Lösemittels und Isolierung
der Mikrosphären
w1/o/w2-Emulsion

Abb. 4/14

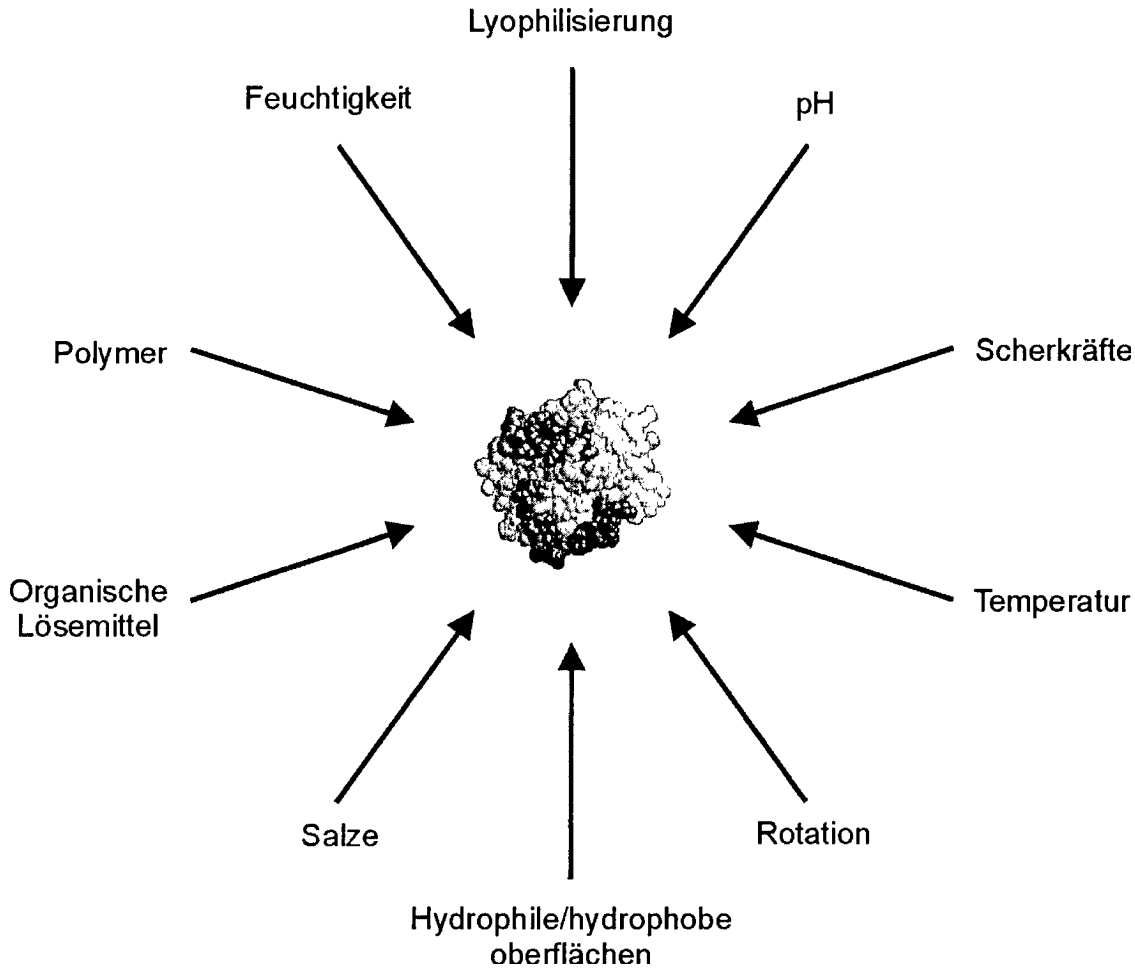

Lyophilisierung
Feuchtigkeit
pH
Polymer
Scherkräfte
Organische Lösemittel
Temperatur
Salze
Rotation
Hydrophile/hydrophobe oberflächen

Abb. 5/14

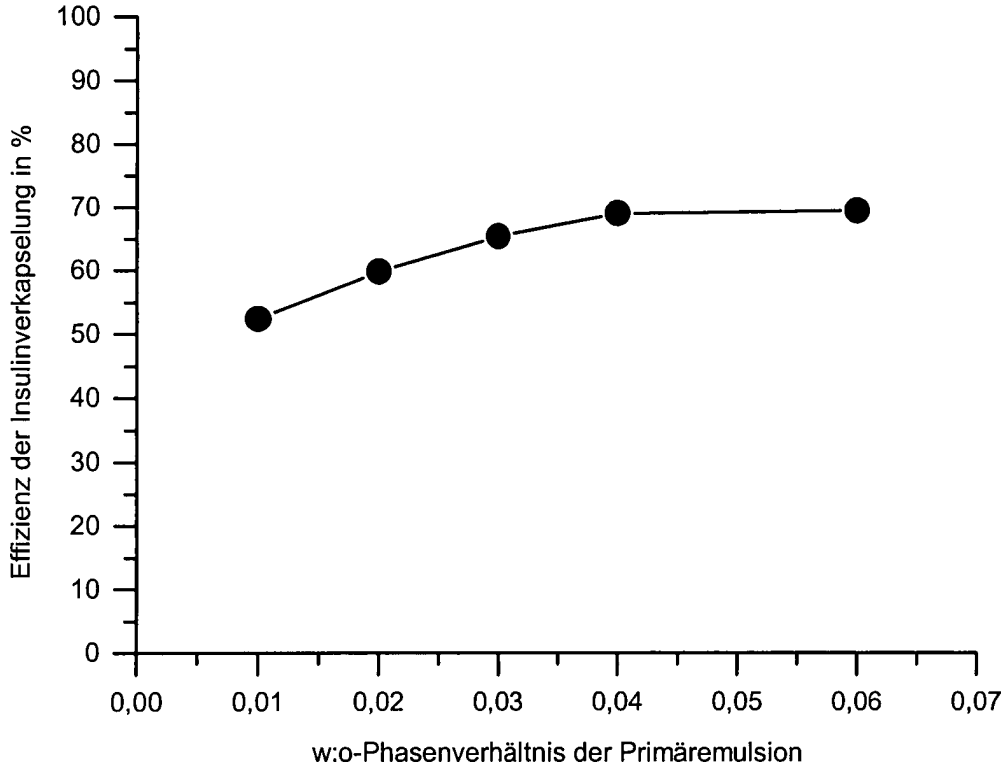

Effizienz der Insulinverkapselung in %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0,00
0,01
0,02
0,03
0,04
0,05
0,06
0,07
w:o-Phasenverhältnis der Primäremulsion

Abb. 6/14

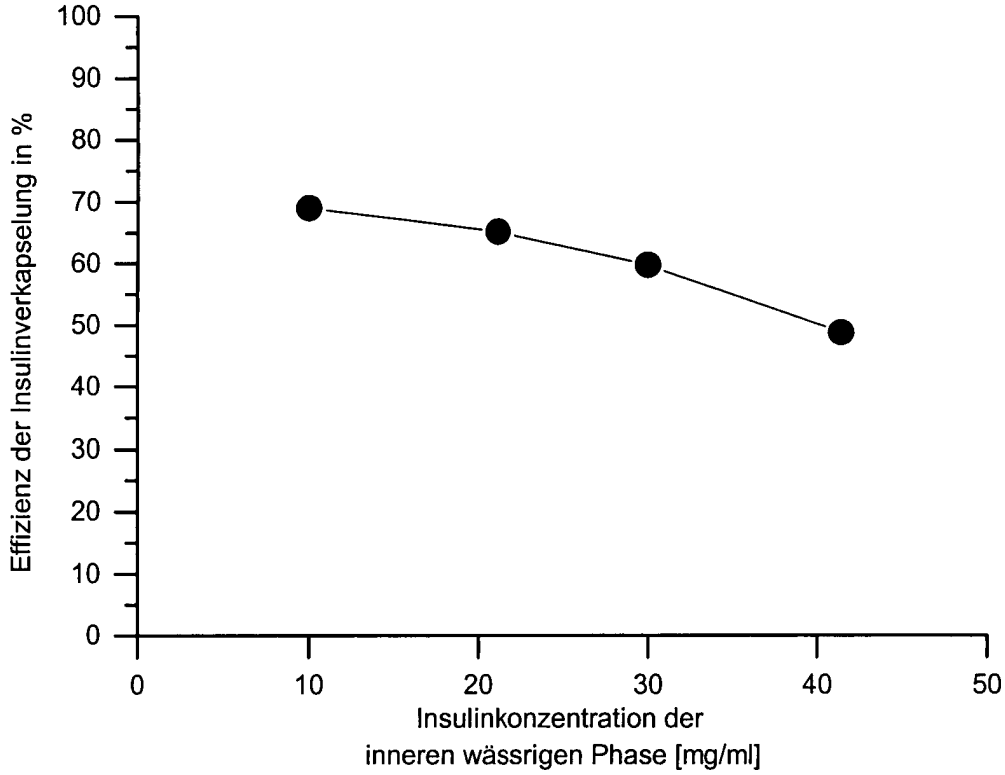

Effizienz der Insulinverkapselung in %
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
Insulinkonzentration der
inneren wässrigen Phase [mg/ml]

Abb. 7/14

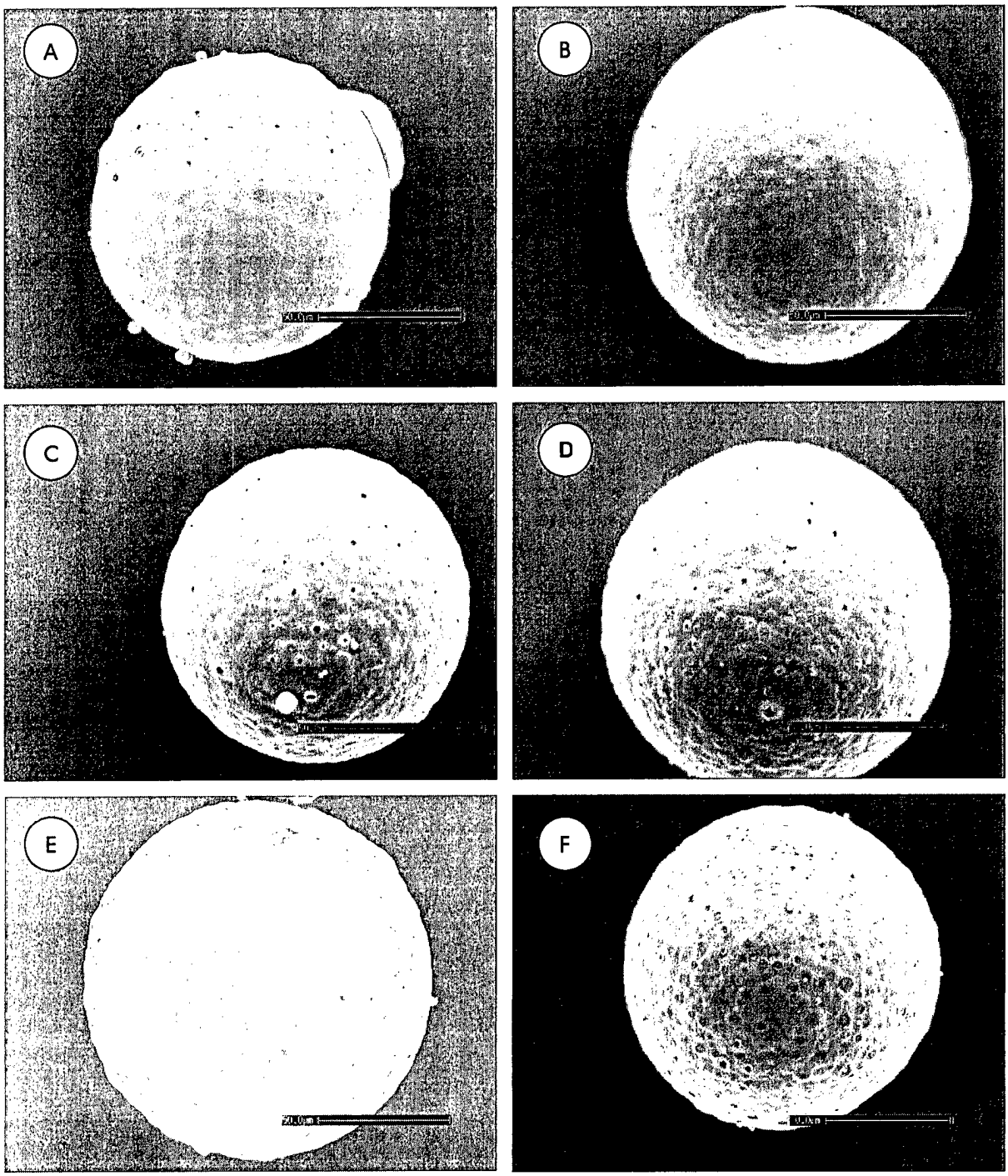


Abb. 8/14

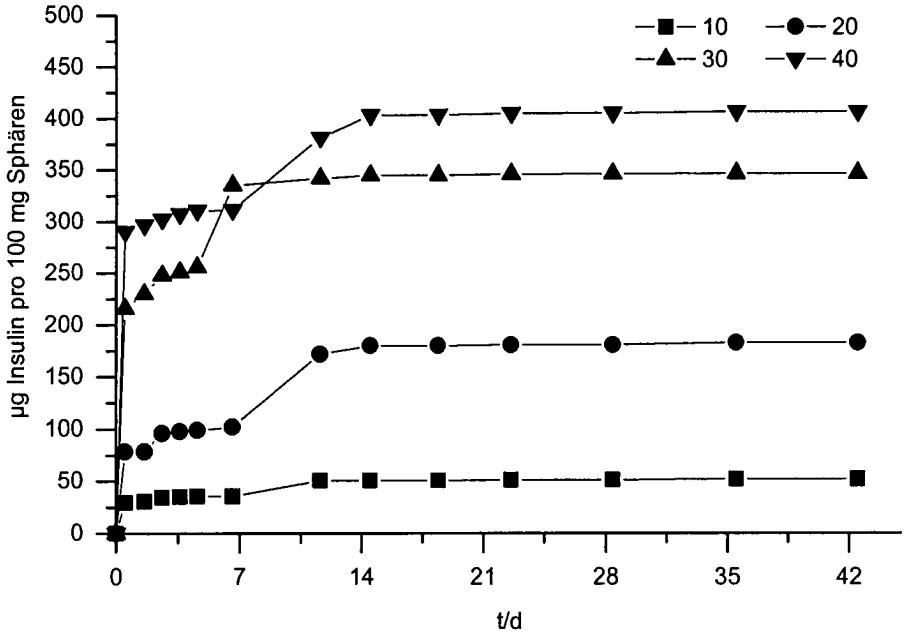


Abb. 9/14

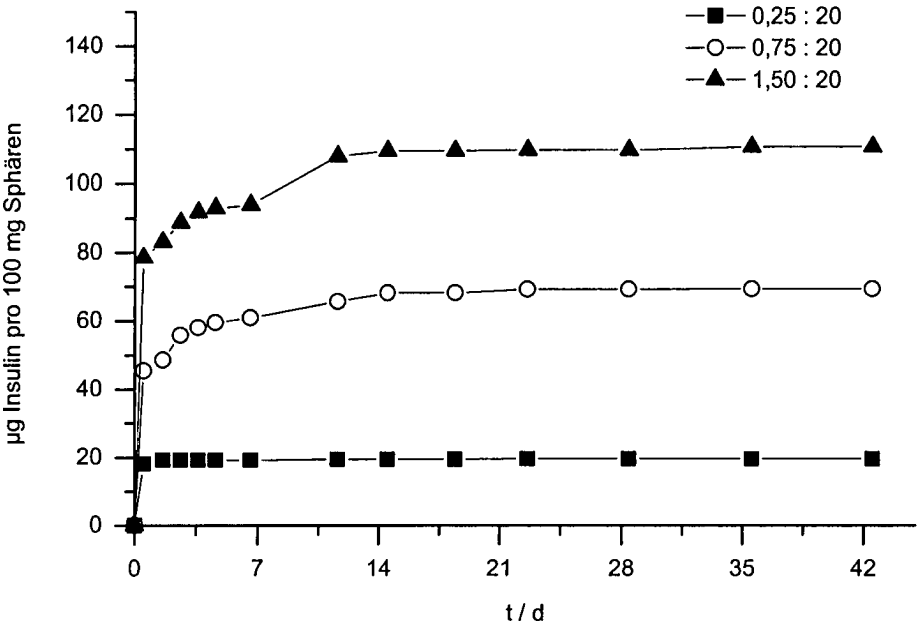


Abb. 10/14

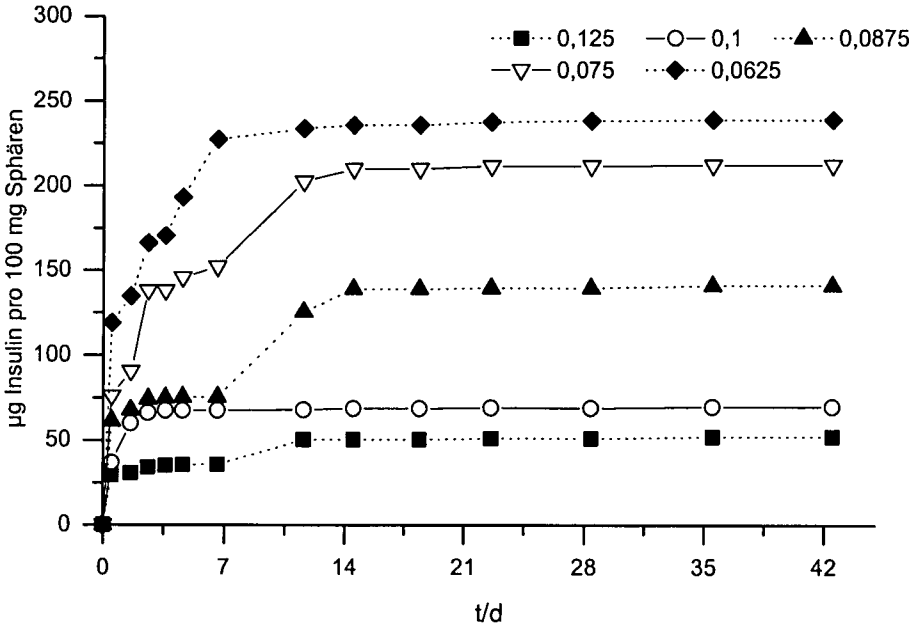


Abb. 11/14

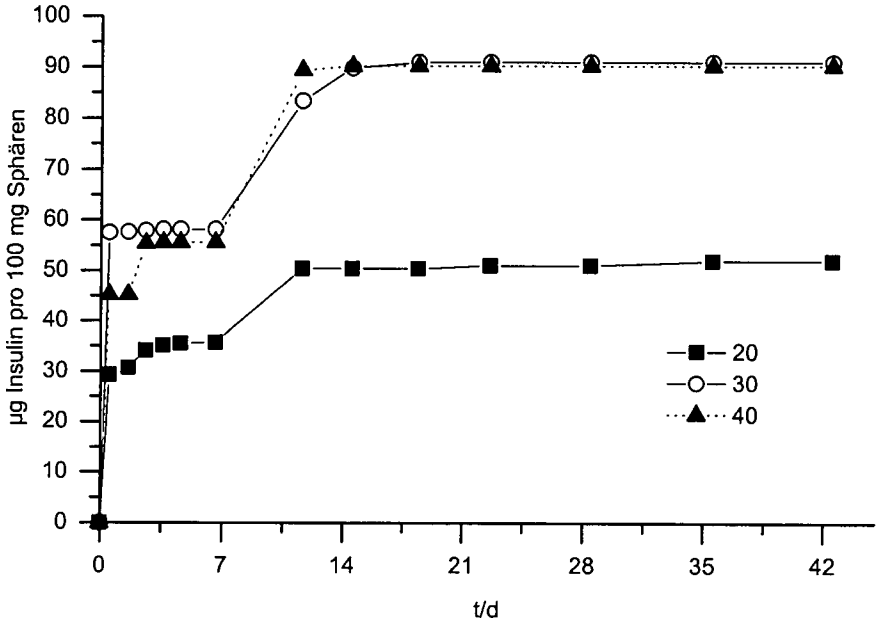


Abb. 12/14

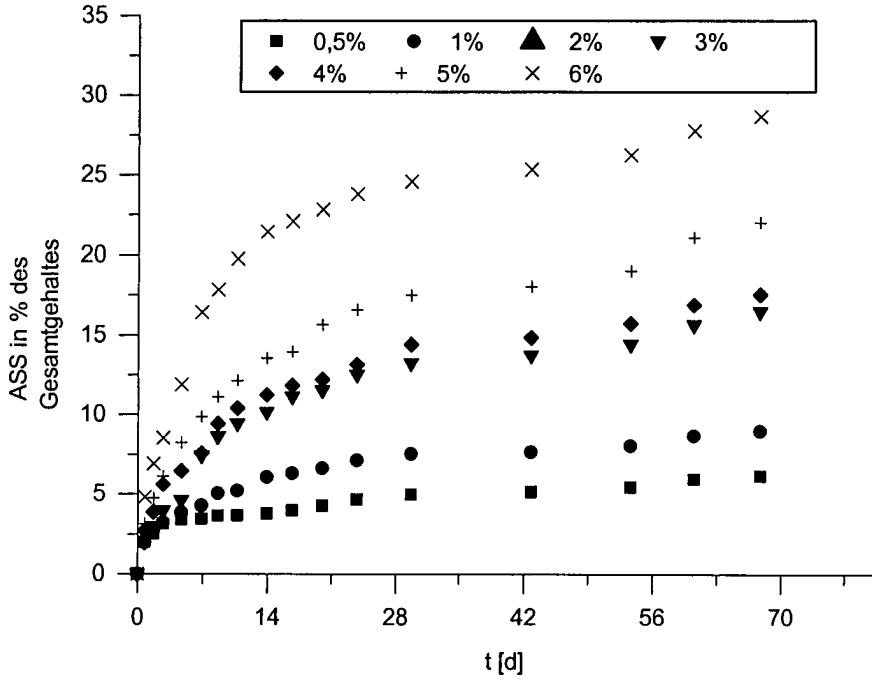

0,5%
1%
2%
3%
4%
5%
6%
ASS in % des Gesamtgehaltes
t [d]
0
5
10
15
20
25
30
35
0
14
28
42
56
70

Abb. 13/14

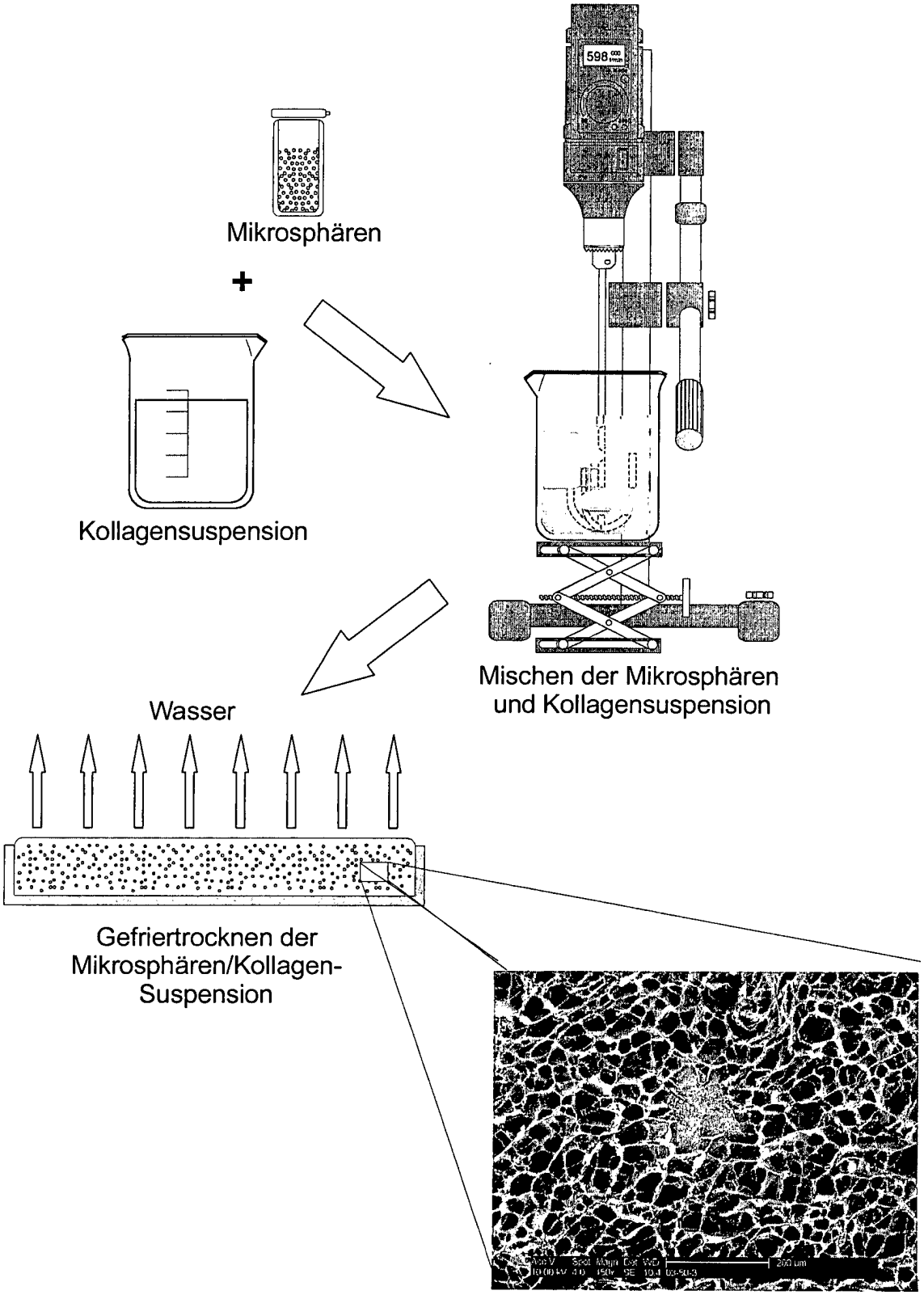

Mikrosphären
+
Kollagensuspension
Mischen der Mikrosphären
und Kollagensuspension
Wasser
Gefriertrocknen der
Mikrosphären/Kollagen-
Suspension

Abb. 14/14

