



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 27 402 T2** 2005.11.03

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 018 979 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 27 402.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/09432**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 920 349.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/049969**

(86) PCT-Anmeldetag: **08.05.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **12.11.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.07.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **03.11.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **03.11.2005**

(51) Int Cl.7: **A61F 2/00**

**A61F 2/02, A61F 2/24, A61F 13/00,
A01N 1/02, A61L 27/24, A61L 27/36**

(30) Unionspriorität:

853372 08.05.1997 US

(73) Patentinhaber:

Organogenesis, Inc., Canton, Mass., US

(74) Vertreter:

Meissner, Bolte & Partner, 81679 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**ABRAHAM, A., Ginger, Braintree, US; CARR, M.,
Robert, West Roxbury, US; KEMP, D., Paul,
Romiley SK6 3JY, GB; MERCER, Ryan, Boston,
US; BAKER, Linda, Taunton, US**

(54) Bezeichnung: **CHEMISCHE REINIGUNG VON BIOLOGISCHEM MATERIAL**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft das Gebiet der Gewebetechnologie. Die Erfindung betrifft kollagene Gewebe, die zur Eliminierung nichtkollagener Komponenten wie Zellen, Zelltrümmer und andere extrazelluläre Matrixkomponenten wie in der Regel in nativen Geweben enthaltene Proteoglykane und Glykosaminoglykane behandelt wurden. Durch Behandlung des Gewebes mit Alkali, Chelatbildnern, Säuren und Salzen werden nichtkollagene Komponenten aus der kollagenen Gewebematrix eliminiert, dies bei gleichzeitiger Steuerung des Schwellungs- und des Zerfallsgrades, sodass die hierbei entstehende Kollagenmatrix ihre Struktur, Integrität und ihre Bioremodellierbarkeit bewahrt. Das Verfahren umgeht die Notwendigkeit der Verwendung von Detergenzien und Enzymen, die die Zellkompatibilität, Formfestigkeit und Bioremodellierbarkeit der Kollagenmatrix beeinträchtigen. Die Kollagenmatrix wird zur Implantation, Reparatur oder Verwendung in einem Säugetierwirt verwendet.

2. Kurze Beschreibung des allgemeinen Stands der Technik

[0002] Das Gebiet der Gewebetechnologie verbindet technologische Verfahren mit biowissenschaftlichen Gesetzen zum Verständnis der strukturellen und funktionalen Beziehungen in normalem und pathologischem Säugetiergewebe. Ziel der Gewebetechnologie ist die Entwicklung und Endanwendung biologischer Substitute zur Wiederherstellung, Erhaltung oder Verbesserung der Gewebefunktionen. (Skalak, R. und Fox, C. F., „Tissue Engineering“, Alan R. Liss Inc. N.Y. (1988)).

[0003] Kollagen ist mit einem Anteil von ca. einem Drittel des gesamten Körperproteins das Hauptstrukturprotein im Körper. Es ist im größten Teil der organischen Materie von Haut, Sehnen, Knochen und Zähnen sowie in Form von Fasereinschlüssen in den meisten anderen Körperstrukturen enthalten. Zu den Eigenschaften von Kollagen gehören seine hohe Zugfestigkeit; seine Ionenaustauschfähigkeit, dies teilweise aufgrund der Bindung von Elektrolyten, Metaboliten und Wirkstoffen; seine niedrige Antigenität, dies durch Maskierung potentieller Antigendeterminanten durch die Helixstruktur und seine geringe Extensibilität, Semipermeabilität und Löslichkeit. Kollagen ist überdies eine Zelladhäsions-Naturstoff. Diese und weitere Eigenschaften machen Kollagen zu einem geeigneten gewebetechnologischen Material zur Fertigung implantierbarer biologischer Substitute und bioremodellierbarer Prothesen.

[0004] Da Kollagen in diesen biologischen Substituten eine Hauptkomponente darstellt, ist ein Verfahren zur Gewinnung ausreichender Mengen Kollagen in der benötigten Qualität erforderlich. Bedarf besteht derzeit hinsichtlich einer verbesserten Methode zur Eliminierung nichtkollagener Komponenten wie Zellen, Zelltrümmer und andere extrazelluläre Matrixkomponenten, wie in der Regel in nativen Geweben enthaltene Proteoglykane und Glykosaminoglykane zur Herstellung einer weitgehend rein kollagenen Gewebematrix. Einige dieser nichtkollagenen Strukturen in nativen Geweben sind nach derzeitigem Kenntnisstand antigen und verursachen bei Implantation eine chronische Entzündungsreaktion im Wirt. Im Stand der Technik existieren allerdings verschiedene Verfahren zur Reinigung dieses Kollagengewebes, die Kollagenzusammensetzungen mit unterschiedlichen Eigenschaften hervorbringen. Das verwendete Verfahren sollte die für die gewebetechnologische Verwendung erforderlichen biologischen und physikalischen Eigenschaften des Kollagens und Kollagengewebes sicherstellen.

[0005] Auf dem Gebiet der Kollagenmatrixbehandlung zur Herstellung einer im Wesentlichen kollagenen Gewebematrix ist bei der Extraktion von Zellen und Lipiden aus dem Gewebe der Einsatz von Detergenzien und Tensiden gebräuchlich. Detergenzien wie Natriumdodecylsulfat (SDS) sind amphipatische Moleküle, wobei die hydrophobe Region an Protein bindet, und erhöhen nach derzeitigem Kenntnisstand die negative Ladung des Proteins. Bei Implantation führt der Ladungsanstieg sowohl zum Anschwellen des Gewebes infolge erhöhter Wasserbindung durch die hydrophile Region des Moleküls als auch infolge verringerter Thermostabilität des Kollagens durch Auflösung der Wasserstoffbindung. Die Schwellung verursacht sowohl eine Öffnung der Struktur des Kollagenmoleküls, wodurch dieses suszeptibel für Zellenzyme wie Kollagenase, wird als auch eine Destabilisierung der Kollagenmatrix, was zur Schwächung des Konstrukts führt. (Courtman et al., Journal of Biomedical Materials Research, 28: 655–666, 1994.) Es wird angenommen, dass die Bindung der SDS-Rückstände an das Kollagen bestehen bleibt, wodurch keine Zellen in das Implantat migrieren können. (Wilson, GJ et al., Ann Thorac Surg, 60: S353–8., 1995; Bodnar E, et al. „Damage of aortic valve tissue caused by the surfactant sodium dodecyl sulfate,“ Thorac Cardiovasc Surg, 34: 82–85, 1986.) Da in einem chemischen Reinigungsverfahren verwendete Detergenzien unerwünscht an das Kollagen binden und die Bioremodellierbarkeitseigenschaften des behandelten Gewebes verändern können, haben die Erfinder ein Verfahren entwickelt, das den Einsatz von Detergenzien unnötig macht.

[0006] Die chemische Gewebereinigung mittels Enzyme wie Trypsin, Pepsin und Kollagenase ist ein auf diesem Gebiet bekanntes Verfahren, aber deren Ein-

satz führt zu einer chemischen Modifikation der nativen Kollagenmoleküle und zu einer Beeinträchtigung der strukturellen Integrität des Konstrukts. Eine Enzymbehandlung von Kollagengewebe ist auf diesem Gebiet zur Eliminierung und/oder Modifikation von Extrazellulärmatrixproteinen bekannt. Proteasen wie Pepsin, Trypsin, Dispase oder Thermolysin werden zur Eliminierung von Kollagen-Telopeptiden bei der Herstellung von Atelopeptid-Kollagen eingesetzt. Kollagen-Telopeptide bilden den Non-Tripel-Helixabschnitt des Kollagenmoleküls, dem einige Forscher schwach antigene Eigenschaften zuschreiben, während andere Forscher ihn hingegen für die starken mechanischen Eigenschaften des Kollagens verantwortlich machen. Ein begrenzter Abbau von Kollagengewebe wird Telopeptide ohne Dissoziation der Kollagenmatrix des Gewebes eliminiert, wohingegen durch dauerhaften Abbau eine Dissoziation von Kollagenfibrillen in Atelopeptide-Kollagenmonomere stattfindet. Auf dem Gebiet ist auch ein Verfahren zur Modifikation und Eliminierung von Nukleinsäuren aus der Matrix durch den Einsatz von Enzymen bekannt, die endogene RNA und DNA durch den Einsatz von RNase resp. DNase abbauen. Da eine Enzymbehandlung die Strukturintegrität des Kollagens beeinträchtigen kann, sieht die vorliegende Erfindung ihren Einsatz nicht vor.

[0007] Es haben umfangreiche Untersuchungen an Verfahren zur Herstellung von Kollagengewebe und -gewebestrukturen aus explantiertem Säugetiergewebe sowie an Verfahren zur Herstellung von Prothesen aus dem Gewebe zur chirurgischen Reparatur oder zum Gewebe- bzw. Organaustausch stattgefunden. Das Gewebe wird gewöhnlich behandelt, um potentiell zytotoxischer und nichtkollagener Komponenten zu entfernen, um zu einer natürlichen Gewebematrix zu gelangen. Untersuchungen an weiteren Verfahren wie Quervernetzung, Desinfektion oder Formgebung liegen ebenfalls vor. Herkömmliche Verfahren zur Behandlung von Kollagengewebe zur Entfernung von Gewebekomponenten aus der organisierten Gewebematrix sehen den Einsatz von Detergenzien und Enzymen vor bzw. fördern eine unkontrollierte Schwellung der Matrix. WO 95/28183 (Jaffe et al.) offenbart Verfahren zur Minderung oder Verhinderung von Mineralienablagerungen in bioprosthetischen Herzklappen nach Implantation. Die offenbarten Verfahren stellen ein nach kontrollierter Autolyse azelluläres biologisches Material bereit. Autolyse wird unter Verwendung mindestens einer Pufferlösung bei einem zuvor festgelegten pH-Wert kontrolliert durchgeführt, wodurch im Gewebe enthaltene autolytische Enzyme die zellulären Strukturkomponenten abbauen können. Die US-Patentschrift Nr. 5,007,934 (Stone) und, ganz ähnlich, die US-Patentschrift Nr. 5,263,984 (Li et al.) offenbaren beide ein mehrschrittiges Verfahren der chemischen Reinigung von ligamentärem Gewebe. Das Verfahren sieht den Einsatz eines Detergens zur Eliminierung von Zell-

membran- bzw. Kollagengewebs-Lipiden vor. Die US-Patentschrift Nr. 5,523,291 (Janzen et al.) offenbart ein aus Ligamentum nuchae gewonnenes zerkleinertes injizierbares Implantationsmaterial zur Weichteil-Vermehrung. Das Ligament wird mit einer Imprägnierserie in stark alkalischer Natriumhydroxidlösung, anschließend in Chlorwasserstoffsäurelösung und schließlich Natriumhydrogencarbonat behandelt. Die US-Patentschrift Nr. 5,028,695 (Eckmayer et al.) offenbart ein Verfahren zur Fertigung von Kollagenmembranen, in denen das Kollagengewebe mehrfach mit starkem Alkali und anschließend mit starker Säure einige Male behandelt wird bei nachfolgender Behandlung mit anorganischer Kochsalzlösung zur Schrumpfung der Membranen und schließlich mit Lösungsmittel zu ihrer Trocknung.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0008] Es werden bioremodellierbare Kollagengewebematrizes und Verfahren zur chemischen Reinigung von nativem Gewebe zur Herstellung dieser Gewebematrizes offenbart.

[0009] Die vorliegende Erfindung löst die bei der Herstellung weitgehend kollagener bioremodellierbarer Gewebematrizes bestehenden Probleme. Die Erfindung stellt Gewebematrizes bereit, die zur Herstellung von Prothesen oder als Material für die Reparatur, Vermehrung bzw. für den Ersatz beschädigter und abgestorbener Gewebe und Organe geeignet sind.

[0010] Das chemische Reinigungsverfahren der vorliegenden Erfindung liefert biologisches Material wie weitgehend azelluläre und weitgehend von nichtkollagenen Komponenten freie native Gewebe und Gewebestrukturen bei gleichzeitiger Wahrung der strukturellen Integrität der Kollagengewebematrix. Da Detergenzien im chemischen Reinigungsprozess nicht verwendet werden, bleiben nicht wie sonst in der Regel an die Gewebematrix gebundene Rückstände von Detergenzien zurück. Da keine Enzyme verwendet werden, verbleiben die Kollagen-Telopeptide an den Kollagenmolekülen. Das Verfahren umfasst den Kontakt eines in der Regel zellulär nativen Gewebes mit einem Chelatbildner bei basischem pH-Wert, den Kontakt des Gewebes mit Salzlösung bei saurem pH-Wert und einer abschließenden Spülung der behandelten chemisch gereinigten Gewebematrix.

[0011] Die Erfindung betrifft eine aus nativen, in der Regel zellulären Geweben gewonnene chemisch gereinigte Gewebematrix. Die gereinigte Gewebematrix ist im Wesentlichen kollagen, intakt belassen und weitgehend frei von Glykoproteinen, Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen, Lipiden, nichtkollagenen Proteinen und Nukleinsäuren wie DNA und RNA. Hervorzuheben ist, dass die Bioremodellierbarkeit

der Gewebematrix erhalten bleibt, da diese frei von gebundenen Rückständen von Detergenzien ist, die die Bioremodellierbarkeit des Kollagens beeinträchtigen würden. Überdies ist das Kollagen ein Telopeptid-Kollagen, da die Telopeptid-Regionen der Kollagenmoleküle intakt bleiben, da es bei der Reinigung keiner Behandlung bzw. Modifikation durch Enzyme unterzogen wurde.

[0012] Das kollagene Material bewahrt im Wesentlichen die Gesamtform des Gewebes, aus dem es gewonnen wurde, kann jedoch zur Herstellung mehrlagiger Schichten, Röhren oder komplex geformter Prothesen geschichtet und verbunden werden. Die verbundenen Kollagenschichten der Erfindung sind strukturstabil, flexibel, semipermeabel und nährbar. Bei Implantation der Matrixmaterials in den Säugetierwirt wird dieses bei gleichzeitigem adäquatem Ersatz durch Lebendzellen oder Neogewebe solange biologisch abgebaut, bis das implantierte Originalmaterial schließlich durch Wirtsgewebe und -zellen remodelliert und ersetzt wurde.

[0013] Es ist somit die Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zur Reinigung nativen Gewebes bereitzustellen, das ein Gewebe liefert, welches frei von vielen jener Mängel ist, die durch die Anwendung vieler bislang entwickelter Verfahren entstehen. Das Verfahren eliminiert effektiv nichtkollagene Komponenten aus nativem Gewebe ohne die Verwendung von Detergenzien oder Enzymen zur Herstellung einer vorwiegend kollagenen Gewebematrix.

[0014] Eine weitere Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines bioremodellierbaren Gewebematrixmaterials, das ein Gewebeweinwachsen und/oder eine Organregeneration am Implantationsort ermöglicht und unterstützt. Eingepflanzt in einen Transplantatempfänger bzw. Patienten, werden aus diesem Material präparierte Prothesen konkomitierend kontrolliert bioremodelliert und adäquat durch Lebendzellen dergestalt ersetzt, dass die implantierte Originalprothese durch die Lebendzellen des Patienten in Form eines regenerierten Organs bzw. Gewebes remodelliert werden.

[0015] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung eines Verfahrens zur Verwendung eines neuen universellen bioremodellierbaren Matrixmaterials bei Autotransplantations-, Allotransplantations- und Heterotransplantationsindikation.

[0016] Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht in der Bereitstellung eines neuen Gewebematrixmaterials, das mit konventionellen Operationstechniken implantiert werden kann.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0017] Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren der Verarbeitung nativer Kollagengewebe zur Transplantation bereit. Das Verarbeitungsverfahren dient der Herstellung eines implantierbaren, transplantierbaren kollagenen biologischen Gewebematerials, einer extrazellulären kollagenhaltigen Matrix, die als Gerüst dient, das durch einen Wirt in vivo oder durch lebende Zellen in Kultur in vitro bioremodelliert werden kann.

[0018] Die Erfindung betrifft weiters gewebe-technologisch hergestellte, aus verarbeitetem nativem Kollagengewebe geformte Prothesen, die bei Implantation in einen Säugetierwirt als funktionsfähiger Reparatur-, Vermehrungs- oder Austausch-Körperteil oder funktionsfähige Gewebestruktur dienen können und unter gleichzeitiger Remodellierung durch die Wirtszellen eine kontrollierte Biodegradation durchlaufen. Die Gewebematrix kann als Prothesematerial für Autotransplantations-, Allotransplantations- und Heterotransplantationsindikationen verwendet werden. Die Prothese dieser Erfindung weist in ihren verschiedenen Ausführungsformen somit duale Eigenschaften auf: Zum einen fungiert sie als ein Ersatzkörperteil und zum anderen fungiert sie, immer noch in ihrer Funktion als Ersatzkörperteil, als Remodellierungsschablone für das Einwachsen von Wirtszellen. Obwohl die Prothesen über den Aufbau verschiedener Materialien und Konstrukte erläutert werden, ist die Erfindung nicht darauf beschränkt. Man wird verstehen, dass Material, Form und Dicke des Materialaufbaus in Abhängigkeit von der endgültigen Indikation für das Konstrukt zu wählen sind.

[0019] Das chemische Reinigungsverfahren der vorliegenden Erfindung liefert biologisches Material wie native Gewebe und Gewebestrukturen, das weitgehend azellulär und weitgehend frei von nichtkollagenen Komponenten bei gleichzeitiger Erhaltung der strukturellen Integrität der kollagenen Gewebematrix ist. Native Gewebe können geringe Mengen von Elastin enthalten, die durch das chemische Reinigungsverfahren nicht entfernt werden. Das Vorhandensein von Elastin kann für bestimmte Anwendungen erwünscht sein. In der vorliegenden Beschreibung bedeutet der Begriff „weitgehend azellulär“ einen um mindestens 95% geringeren Gehalt an nativen Zellen und Zellstrukturen als bei unbehandeltem biologischem Material. „Zellen und Zellstrukturen“ bezieht sich auf Zellen, lebend oder nicht lebend, Zellrückstände, Zellmembranen und Membranstrukturen. Der Begriff „weitgehend frei von nichtkollagenen Komponenten“ bedeutet, dass Glykoproteine, Glykosaminoglykane, Proteoglykane, Lipide, nicht-kollagene Proteine und Nukleinsäuren wie DNA und RNA in der fertig gestellten Gewebematrix zu einem Anteil von weniger als 5% Trockengewicht enthalten

sind. Da das chemische Reinigungsverfahren keinen Einsatz von Detergenzien vorsieht, verbleiben keine anderenfalls in der Regel an die Gewebematrix gebundenen Rückstände von Detergenzien im Gewebe. Da keine Enzyme verwendet werden, bleiben die kollagenen Telopeptide der Kollagenmoleküle erhalten. Darüber hinaus liefert das chemische Reinigungsverfahren beim Einsatz steriler Vorrichtungen, Lösungen und Techniken sowohl steriles als auch endotoxinfreies Material.

[0020] Der Begriff „Strukturintegrität“ bezieht sich auf die Fähigkeit der chemisch gereinigten Kollagen-gewebematrix, Kräften wie Zug-, Druck- und Stützlasten zu widerstehen. Die Strukturintegrität des biologischen Materials wird erhalten, da während der chemischen Behandlung Schwellungsvorgänge minimiert werden, auch wenn Schwellungsreaktionen während der Behandlung nicht vollständig ausgeschlossen werden können. Unkontrollierte wie auch übermäßige Schwellung führt zu einer Öffnung der Kollagenmolekülstruktur, wodurch dieses für Zellenzyme wie Kollagenase anfällig macht, und zu einer das Kollagen destabilisiert, was zu einer Schwächung des Konstrukts führt. Indem Schwellung die intramolekulare Struktur des Kollagenmoleküls beeinträchtigt, beeinträchtigt sie durch Zerstörung der nativen Vernetzung der Kollagenmoleküle auch die gesamte intermolekulare Struktur des Materials. Die Strukturintegrität des Kollagenmoleküls und die Integrität der Vernetzung der Kollagenmoleküle sichern zusammen die Strukturintegrität des Materials.

[0021] Gewebematrixmaterial, dessen native Strukturintegrität zu einem Großteil erhalten ist, ist beispielsweise dann nützlich, wenn es als prothetisches Material oder als Material zur Herstellung mehrschichtiger oder komplexer Materialien verwendet werden soll. Die Integrität des Materials ist dann von Bedeutung, wenn es wie im Fall einer Körperwandabstützung, als vaskuläres oder prothetisches Material eine Stützfunktion übernehmen soll. Eng verflochten mit dem Begriff der strukturellen Integrität ist der Begriff „nähbar“, der beinhaltet, dass die mechanischen Eigenschaften des Materials eine Reißfestigkeit beim Vernähen mit einschließen, sodass Nadeln und Nahtmaterial eingesetzt werden können, die das prothetische Material beim Vernähen der Prothese mit dem nativen Gewebe durchdringen können, ein Vorgang, der als Anastomose bezeichnet wird. Solche Prothesen dürfen beim Vernähen unter den an ihnen durch die Naht angreifenden Zugkräften nicht reißen, noch dürfen sie beim Verknoten der Naht reißen. Die Nähbarkeit des prothetischen Materials, d. h. die Fähigkeit der Prothese, beim Vernähen nicht zu reißen, ist eng verflochten mit der mechanischen Eigenstabilität des prothetischen Materials, der Dicke des verpflanzten Gewebes, der an der Naht ansetzenden Zugkraft und der Kraft, die beim Verknoten der Naht entsteht.

[0022] Das biologische Material im Sinne dieser Erfindung umfasst u. a. entnommene Säugetiergewebe und deren Strukturen humanen, bovinen, porcinen, caninen, ovinen, caprinen oder equinen Ursprungs. Die Reinigungsverfahren der vorliegenden Erfindung zur Herstellung einer weitgehend azellulären und von nichtkollagenen Komponenten weitgehend freien Gewebematrix konzentrieren sich auf Gewebestrukturen wie Dermis, Arterie, Vene, Perikard, Herzklappe, Dura mater, Ligamentum, Intestinum und Fascia.

[0023] Als Lieferant für Säugetiergewebe wird vorzugsweise die Tunica submucosa des Dünndarms vorzugsweise porcinen Ursprungs verwendet. In einem nativen Dünndarm stellt die Tunica submucosa die Bindegewebeschicht des Organs und enthält sowohl Lymph- als auch Blutgefäßzellen. Verfahren zur Gewinnung von Tunica submucosa sind in WO 96/31157 offenbart. Zur Gewinnung porciner Tunica submucosa, hier „Submucosa“, wird der Dünndarm eines Schweins entnommen und mechanisch abgezogen, dies vorzugsweise durch Verwendung einer Darmreinigungsmaschine (Bitterling, Nottingham, UK). Die Darmreinigungsmaschine trägt mittels mechanischer Einwirkung und Wasserspülung Fett-, Muskel- und Schleimhautgewebe von der Tunica submucosa ab. Die mechanische Arbeit wird durch eine Reihe von Walzen verrichtet, die durch Kompression und Abziehen Schicht für Schicht von der Tunica submucosa des zwischen ihnen hindurch laufenden intakten Darms abtragen. Da die Tunica submucosa des Dünndarms vergleichsweise härter und steifer als das angrenzende Gewebe ist, werden von der Tunica submucosa die weicheren Gewebebestandteile abgetragen. Im Ergebnis der maschinellen Reinigung werden die Mesenterialgewebe, die Tunica serosa und die Tunica muscularis vom Ablumen der Tunica submucosa sowie den Schichten der Tunica submucosa vom Lumen der Tunica submucosa von der Tunica submucosa beseitigt, sodass allein die Tunica-submucosa-Schicht des Darms zurückbleibt. Die chemisch gereinigte Gewebematrix der Tunica submucosa wird auch als „Intestinal Collagen Layer“ bzw. „ICL“ bezeichnet. Der Dünndarm bestimmter tierischer Quellen wie Karnivore und Omnivore enthält bekanntlich ein Stratum compactum, das durch diesen mechanischen Reinigungsschritt weitgehend entfernt wird.

[0024] Andere auf dem Fachgebiet bekannte Verfahren zum mechanischen Abziehen von Dünndarmschichten werden in der US-Patentschrift 4,902,508 (Badylak) beschrieben. Das durch dieses Patent offenbarte Verfahren sieht zur Entfernung der abluminalen Schichten einschließlich der Tunica serosa und der Tunica muscularis und der Innenschicht aus mindestens des luminalen Abschnitts der Tunica mucosa eine sanfte Abrasion des Darmgewebes vor. Als Schichten verbleiben die Tunica submucosa mit der dazugehörigen Basillarschicht aus Lamina muscula-

ris mucosa und, sofern im entnommenen Säugetiergewebe vor der Verarbeitung vorhanden, Stratum compactum. Mittels eines der Verfahren gewonnenes Darmmaterial kann implantiert oder zunächst durch verschiedene Verfahren wie Nähen, Klammern, Adhäsionsverbindungen, chemische Verbindung und thermische Verbindung in das Körperwand- oder Vaskulärmittel geformt werden.

[0025] Auf bestimmte Arbeitsparameter bezogene Begriffe sind für die gesamte Beschreibung und die Beispiele für Mengen, Zeiten und Temperaturen definiert, die innerhalb des durch die Erfindung vorgegebenen Geistes und Umfangs variieren können. In der vorliegenden Beschreibung bedeutet „wirksame Menge“ das zur Erlangung der erwünschten Wirksamkeit erforderliche Volumen und die zur Erlangung der erwünschten Wirksamkeit erforderliche Konzentration der Zusammensetzung. Als wirksame Menge bei der chemischen Reinigung von Gewebe wird vorzugsweise ein Verhältnis von 100 : 1 Vol/Vol von Lösung zu Gewebe verwendet, die Volumina können jedoch vom Fachmann in Abhängigkeit von der Form, Menge, Dicke, Dichte und Zellularität des zu reinigenden Gewebes variiert werden. Die zur Erlangung der Wirksamkeit der chemischen Schritte erforderliche Zeit kann vom Fachmann unter Berücksichtigung von Zellularität, Matrixdichte und Dicke des zu reinigenden Materials bestimmt werden. Die Lösungen benötigen bei größeren, dickeren oder dichteren Materialien mehr Zeit, ehe sie das Gewebe penetrieren und dort äquilibrieren können. Die Umgebungstemperatur und die Temperatur der verwendeten Lösungen ist in der vorliegenden Erfindung vorzugsweise Raumtemperatur, etwa 25°C, kann sich jedoch im gesamten Bereich über der Gefriertemperatur der verwendeten Lösungen und unter der Denaturationstemperatur des behandelten Gewebematerials befinden. Die Reinigungsbehandlung kann ihre Wirksamkeit bei Temperaturen zwischen etwa 4°C und etwa 45°C entfalten. Unter Agitation wird das mechanische Schütteln bzw. Mischen zur verbesserten Penetration der chemischen Verbindungen in das Gewebe sowie zur Verminderung der bis zum Eintreten der Wirksamkeit erforderlichen Zeit der chemischen Behandlung verstanden. Der Begriff „gepufferte Lösung“ bezeichnet eine wässrige Lösung mit mindestens einem Wirkstoff, der die Wasserstoffionkonzentration oder den pH-Wert der Lösung aufrecht erhält.

[0026] Im bevorzugten Verfahren kann das entnommene Gewebe manuell gereinigt werden müssen, etwa durch Grobschnitt, und/oder von überflüssigen Geweben wie Fett und Gefäßen befreit werden. Eine manuelle Reinigung kann bei einigen Geweben zu einer besseren Handhabbarkeit während der Verarbeitung oder zur Erreichung einer maximalen Wirksamkeit der chemischen Behandlung erforderlich sein.

[0027] Zunächst wird das Gewebe durch Gewebe-

kontakt mit einer wirksamen Menge eines Chelatbildners, zur kontrollierten Begrenzung der Schwellung der Gewebematrix vorzugshalber mit Basencharakter, behandelt. Chelatbildner verbessern durch Reduzierung der Konzentration zweiwertiger Kationen die Eliminierung von Zellen, Zellbruchstücken und Basalmembranstrukturen aus der Matrix. Basenbehandlung dissoziiert Glykoproteine und Glykosaminoglykane vom Kollagengewebe und saponifiziert Lipide. Im Fachgebiet bekannte Chelatbildner sind u. a. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und EGTA (Ethylenbis(oxyethylenitrilo)tetraessigsäure) (EGTA). EDTA wird als Chelatbildner bevorzugt und kann durch Zugabe von Natriumhydroxid (NaOH), Calciumhydroxid Ca(OH)_2 , Natriumkarbonat oder Natriumperoxid in seinem Basengehalt erhöht werden. Die Konzentration von EDTA bzw. EGTA liegt vorzugsweise zwischen 1 und 200 mM; besser zwischen 50 und 150 mM; am besten etwa 100 mM. Die Konzentration von NaOH liegt vorzugsweise zwischen 0,001 und 1 M; besser zwischen 0,001 und 0,1 M; am besten 0,01 M. Der Fachmann kann zur Herstellung eines wirksamen pH-Wertes in der Chelatlösung andere alkalische bzw. basische Wirkstoffe bestimmen. Der endgültige pH-Wert der basischen Chelatlösung liegt vorzugsweise zwischen 8 und 12; besser jedoch zwischen 11.1 und 11.8. In der besten Ausführungsform wird das Gewebe mit einer Lösung 100 mM EDTA/10 mM NaOH in Wasser in Kontakt gebracht. Der Gewebekontakt wird vorzugsweise durch Immersion in den alkalischen Chelatbildner hergestellt, wobei die Wirksamkeit der Behandlung durch Agitation von Gewebe und Lösung gemeinsam über einen für die Wirksamkeit erforderlichen Zeitraum erhöht werden kann.

[0028] Das Gewebe wird anschließend mit einer wirksamen Menge einer vorzugsweise salzhaltigen Säurelösung in Kontakt gebracht. Säurebehandlung spielt auch bei der Eliminierung von Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen sowie bei der Eliminierung nichtkollagener Proteine und Nukleinsäuren wie DNA und RNA eine Rolle. Salzbehandlung dient der Kontrolle der Schwellung der kollagenen Gewebematrix während der Säurebehandlung und wird zur Eliminierung verschiedener Glykoproteine und Proteoglykane aus der Kollagenmatrix eingesetzt. Im Fachgebiet bekannte Säurelösungen können eingesetzt werden und umfassen u. a. Chlorwasserstoffsäure (HCl), Essigsäure (CH_3COOH) und Schwefelsäure (H_2SO_4). Als Säure wird vorzugsweise Chlorwasserstoffsäure (HCl) bei einer Konzentration vorzugsweise zwischen 0,5 und 2 M, besser zwischen 0,75 und 1,25 M; am besten etwa 1 M eingesetzt. Der endgültige pH-Wert der Säure-Salz-Lösung liegt vorzugsweise zwischen 0 und 1, besser zwischen 0 und 0,75 und am besten zwischen 0,1 und 0,5.

[0029] Chlorwasserstoffsäure und andere starke Säuren weisen die größte Wirksamkeit bei der Auf-

spaltung von Nukleinsäuremolekülen auf schwächere Säuren weisen eine geringere Wirksamkeit auf. Als Salze können vorzugsweise anorganische Salze verwendet werden, und schließen Chloridsalze wie Natriumchlorid (NaCl), Calciumchlorid (CaCl₂) und Kaliumchlorid (KCl) ohne darauf beschränkt zu sein ein, wobei der Fachmann andere wirksame Salze bestimmen kann. Vorzugsweise werden Chloridsalze bei einer Konzentration vorzugsweise zwischen 0,1 und 2 M, besser zwischen 0,75 und 1,25 M; am besten etwa 1 M verwendet. Als Chloridsalz sieht das vorliegende Verfahren vorzugsweise die Verwendung von Natriumchlorid (NaCl) vor. In der besten Ausführungsform wird das Gewebe mit 1 M HCl/1 M NaCl in Wasser in Kontakt gebracht. Der Gewebekontakt wird vorzugsweise durch Immersion in die Säure-Salz-Lösung hergestellt, wobei die Wirksamkeit der Behandlung durch Agitation von Gewebe und Lösung gemeinsam über einen für die Wirksamkeit erforderlichen Zeitraum erhöht werden kann.

[0030] Das Gewebe wird anschließend mit einer wirksamen Menge einer vorzugsweise auf etwa physiologischen pH-Wert gepufferten Salzlösung in Kontakt gebracht. Die gepufferte Salzlösung neutralisiert das Material und wirkt gleichzeitig abschwellend. Als Salze können vorzugsweise anorganische Salze verwendet werden, und schließen Chloridsalze wie Natriumchlorid (NaCl), Calciumchlorid (CaCl₂) und Kaliumchlorid (KCl); sowie Stickstoffsalze wie Ammoniumsulfat (NH₃SO₄), ohne darauf beschränkt zu sein, ein, wobei der Fachmann andere wirksame Salze bestimmen kann. Vorzugsweise werden Chloridsalze bei einer Konzentration vorzugsweise zwischen 0,1 und 2 M, besser zwischen 0,75 und 1,25 M; am besten 1 M verwendet. Als Chloridsalz sieht das vorliegende Verfahren vorzugsweise die Verwendung von Natriumchlorid (NaCl) vor. Im Fachgebiet sind Puffer-substanzen, darunter u. a. Phosphate- und Boratlösungen, bekannt, wobei der Fachmann für den Einsatz im Verfahren andere bestimmen kann. Ein bevorzugtes Verfahren zum Puffern der Salzlösung besteht in der Zugabe einer phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS), wobei das Phosphat vorzugsweise eine Konzentration zwischen 0,001 und 0,02 M und eine Salzkonzentration zwischen 0,07 und 0,3 M zur Salzlösung hat. Die Lösung sollte vorzugsweise einen pH-Wert zwischen 5 und 9, besser zwischen 7 und 8, am besten zwischen 7,4 und 7,6 aufweisen. In der am meisten bevorzugten Ausführungsform wird das Gewebe mit 1 M Natriumchlorid (NaCl)/10 mM phosphatgepuffertes Salzlösung (PBS) bei einem pH zwischen 7,0 bis 7,6 in Kontakt gebracht. Der Gewebekontakt wird vorzugsweise durch Immersion in die gepufferte Salzlösung hergestellt, wobei die Wirksamkeit der Behandlung durch Agitation von Gewebe und Lösung gemeinsam über einen für die Wirksamkeit erforderlichen Zeitraum erhöht werden kann.

[0031] Nach der chemischen Reinigungsbehand-

lung wird das Gewebe vorzugsweise ohne Verwendung chemischer Reinigungsmittel durch Kontakt mit einer wirksamen Menge Spülmittel gespült. Materialien wie Wasser, isotonische Salzlösungen und physiologische pH-gepufferte Lösungen können verwendet und mit dem Gewebe über den zur Entfernung der Reinigungsmittel erforderlichen Zeitraum in Kontakt gebracht werden. Als Spüllösung wird vorzugsweise physiologische pH-gepufferte Kochsalzlösung wie phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) verwendet. Andere Verfahren zum Ausspülen der chemischen Reinigungsmittel aus dem Gewebe können vom Fachmann festgelegt werden. Die Reinigungsschritte des Gewebekontakts mit alkalischem Chelatbildner und Gewebekontakt mit einer salzhaltigen Säurelösung können bei weitgehend identischem Ergebnis in beliebiger Reihenfolge durchlaufen werden. Allerdings dürfen die Lösungen nicht kombiniert und als ein Einzelschritt ausgeführt werden.

[0032] Eine bevorzugte erfindungsgemäße Zusammensetzung ist eine aus nativem, in der Regel zellulären Geweben gewonnene chemische gereinigte Gewebematrix. Die gereinigte Gewebematrix ist im Wesentlichen azelluläres Telozeptid-Kollagen, hat etwa 93% des Trockengewichtes, wobei Glykoproteine, Glykosaminoglykane, Proteoglykane, Lipide, nichtkollagene Peptide und Nukleinsäuren wie DNA und RNA mit weniger als etwa 5% des Trockengewichtes vorhanden sind. Wichtig ist, dass die Bioremodellierbarkeit der Gewebematrix erhalten wird, da diese frei von gebundenen Detergenzienrückständen ist, die die Bioremodellierbarkeit des Kollagens beeinträchtigen würden. Darüber hinaus bleiben die Telozeptid-Regionen die Kollagenmoleküle erhalten, da während des Reinigungsverfahrens das Gewebe einer Enzymbehandlung nicht unterworfen wird.

[0033] Gewebematrizes werden aus Dermis, Arterie, Vene, Perikard, Herzklappen, Dura mater, Ligamenten, Intestinum und Fascia gewonnen. Die am meisten bevorzugte Zusammensetzung ist eine aus dem Dünndarm gewonnene chemisch gereinigte Darmkollagenschicht. Geeignete Quellen zur Entnahme eines Dünndarms sind Säugetierorganismen wie Mensch, Rind, Schwein, Schaf, Hund, Ziege oder Pferd, wobei der Dünndarm des Schweins als Quelle bevorzugt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Kollagenschicht die aus porcinem Dünndarm gewonnene Tunica submucosa. In einer anderen Ausführungsform umfasst die Kollagenschicht die Tunica submucosa und die Basilar-schichten des Dünndarms. Die Basilar-schichten bestehen aus Lamina muscularis mucosa und, sofern im nativen Gewebe vorhanden, Stratum compactum.

[0034] Die am meisten bevorzugte erfindungsgemäße Zusammensetzung ist die durch das chemische Reinigungsverfahren der Erfindung gereinigte Darmkollagenschicht, es ist im Wesentlichen Kolla-

gen, vorwiegend Kollagen Typ I, mit weniger als etwa 5% Trockengewicht Glykoproteinen, Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen, Lipiden, nichtkollagenen Proteinen und Nukleinsäuren wie DNA und RNA. Die Kollagenschicht ist frei von gebundenen Detergenzienrückständen, die die Bioremodellierbarkeit des Kollagens beeinträchtigen würden. Die Kollagenschicht ist weitgehend frei von Zellen und Zellbruchstücken einschließlich endogener Nukleinsäuren wie DNA und RNA und Lipide. Darüber hinaus ist die Darmkollagenschicht beim Einsatz steriler Vorrichtungen, Lösungen und Techniken sowohl steril als auch endotoxinfrei.

[0035] Nachdem die Kollagengewebematrix weitgehend von azellulären Komponenten und von weitgehend nichtkollagenen extrazellulären Matrixkomponenten befreit wurde, können aus ihr Prothesen zur Implantation bzw. Transplantation hergestellt werden. Die Kollagenschichten können mittels sämtlicher im Fachgebiet bekannter Techniken vernäht bzw. miteinander verbunden werden. In Verfahren zur Verbindung der Schichten können Haftmittel wie Thrombin, Fibrin oder synthetische Materialien wie Cyanomethacrylat oder chemische Vernetzungsmittel zum Einsatz kommen. Bei anderen Verfahren kann laser-, licht- oder mikrowellengenerierte Wärme zum Einsatz kommen. Konvektionsöfen und warmen Flüssigkeitsbäder können ebenfalls zum Einsatz kommen.

[0036] Zur Verbindung der Kollagenschichten sieht die Erfindung als bevorzugtes Verfahren thermische Verschweißung der Kollagenschichten vor. Verfahren der thermischen Verschweißung von Kollagen sind in WO 95/22301, WO 96/31157 und US-Patentschrift 5,571,216 beschrieben. Die ICL wird zunächst längs aufgeschnitten und auf einer festen ebenen Tafel ausgebreitet. Anschließend werden eine oder mehrere Folgeschichten jeweils über der vorherigen ausgebreitet, vorzugsweise in alternierender rechtwinkliger Ausrichtung. Es wird obenauf eine zweite Tafel platziert, und die beiden Tafeln werden fest gegeneinander gespannt. Die gesamte Vorrichtung, die gegeneinander gespannten Tafeln und Kollagenschichten werden anschließend über einen bestimmten Zeitraum hinweg unter Bedingungen erwärmt, die zur Verbindung der Kollagenschichten ausreichend sind. Die angewendete Wärme sollte ausreichend groß dafür sein, dass das Kollagen verbunden wird, jedoch nicht so groß, dass das Kollagen irreversibel denaturiert wird. Die Erwärmungs- und Bindungszeit hängt von der Art der verwendeten Kollagenmaterialschicht, dem Feuchtigkeitsgehalt und der Materialdicke des Materials und der angewendeten Wärme ab. Der Wärmebereich liegt typischer Weise zwischen etwa 50°C und etwa 75°C, typischer zwischen 60°C und 65°C und am typischsten bei 62°C. Die typische Zeitspanne beträgt zwischen 7 Minuten und etwa 24 Stunden, typischer Weise etwa eine Stunde. Die ein-

gesetzte Temperatur und die Expositionszeit können ohne Weiteres mittels standardmäßiger Experimente durch Variieren der Wärme- und Zeitparameter ermittelt werden. Der Verbindungsschritt kann in einem konventionellen Ofen erfolgen, obwohl auch andere Vorrichtungen bzw. Wärmeanwendungen wie etwa Wasserbad, Laserenergie oder elektrische Wärmeleitung eingesetzt werden können. Unmittelbar nach der Erwärmung und Verbindung werden die Kollagenschichten in der Luft oder im Wasserbad bei Raumtemperatur zwischen 20°C und 1°C gekühlt. Damit die Verbindung zwischen den Kollagenlagen wirksam werden kann, ist bei Beendigung der Wärmezufuhr eine schnelle Abkühlung, Abschreckung, genannt, erforderlich. Bei diesem Schritt können die Kollagenschichten typischerweise im Wasserbad bei einer Temperatur vorzugsweise zwischen etwa 1°C und etwa 10°C, am besten bei etwa 4°C gekühlt werden. Obwohl u. U. Kühlttemperaturen unter 1°C verwendet werden können, ist darauf zu achten, dass die Kollagenschichten nicht gefroren werden, da dadurch Strukturschäden entstehen können. Darüber hinaus können zum Abschrecken u. U. Temperaturen über 10°C verwendet werden, wenn jedoch die Abschrecktemperatur zu hoch ist, genügt die Kühlungsrate für die Herstellung einer Verbindung zwischen den einzelnen Kollagenschichten u. U. nicht.

[0037] In der bevorzugten Ausführungsform wird das Kollagenmaterial vernetzt. Durch die Vernetzung erhält das geformte prothetische Konstrukt eine erhöhte Formfestigkeit und Strukturintegrität, während der Bioremodellierungsprozess des Kollagens durch Zellen bei der Implantierung des Konstrukts in einen Patienten reguliert wird. Vernetzungsmittel umfassen u. a. Glutaraldehyd, Formaldehyd, Carbodiimide, Hexamethylendiisocyanat, Bisimidate, Glyoxal, Adipylchlorid, Dialdehydstärke sowie bestimmte Polyepoxidverbindungen wie Glykol-Diglycidylether, Polyol-Polyglycidylether und Dicarbonsäure-Diglycidylester. Dehydrothermale Verfahren, Ultraviolettbestrahlungsverfahren und/oder kohlenhydratvermittelte Verfahren können ebenfalls zum Einsatz kommen. Kollagen vernetzt sich ebenfalls auf natürlichem Wege im Alterungsprozess bei Raumtemperatur. Die verwendeten Vernetzungsmittel sind jedoch auf diese Beispiele zu beschränken, da andere dem Fachmann bekannte Vernetzungsmittel und -verfahren benutzt werden können. Es sind solche Vernetzungsmittel zu verwenden, mit denen sich ein biokompatibles Material herstellen lässt, das durch Wirtszellen remodelliert werden kann. Ein bevorzugtes Vernetzungsmittel ist 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-hydrochlorid (EDC). Die EDC- und wasserhaltige Vernetzungslösung kann auch Aceton enthalten. Vernetzung mithilfe von EDC wurde in den Internationalen PCT-Veröffentlichungen Nr. WO 95/22301 und WO 96/31157 beschrieben.

[0038] In manchen Ausführungsformen können zu-

sätzliche Kollagenschichten vor oder nach der Ver- netzung auf die Innen- oder Außenflächen der ge- bundenen Kollagenschichten aufgetragen werden. In tubulären Konstrukten, wie einem Vaskularkonstrukt, kann zur Schaffung einer glatten Oberfläche für seine Endanwendung, wie in der Internationalen PCT-Ver- öffentlichung Nr. WO 95/22301 beschrieben, dichtes fibrilläres Kollagen auf die luminale Fläche aufgetra- gen werden. Diese glatte Kollagenschicht fördert au- ßerdem die Bindung an die Wirtszelle wie bei der Ausbildung von Neointima, wodurch das Einwachsen und die Bioremodellierung des Konstrukts erleichtert wird. Wie in der Internationalen PCT-Veröffentlichung Nr. WO 95/22301 beschrieben, kann diese glatte Kol- lagenschicht aus säureextrahiertem fibrillärem oder nichtfibrillärem Kollagen hergestellt werden, das vor- wiegend Kollagen Typ I ist, jedoch auch andere Kol- lagentypen umfassen kann. Das verwendete Kolla- gen kann aus einer beliebigen Anzahl Säugetierquel- len gewonnen werden, typischerweise sind dies bovine, porcine oder ovine Haut oder Sehnen. Das Kolla- gen wird vorzugsweise mittels Säureextraktion verar- beitet, damit die resultierende Fibrillendispersion bzw. das resultierende Gel von hoher Reinheit ist. Kollagen kann aus der Kollagenquelle mittels einer schwachen Säure wie Essigsäure, Zitronensäure oder Ameisensäure säureextrahiert werden. Nach Extraktion in eine Lösung kann das Kollagen unter Verwendung von Standardtechniken wie Zentrifugie- ren oder Filtration mittels NaCl ausgefällt und rückge- wonnen werden. Genauere Angaben über aus bovine Sehne säureextrahiertes Kollagen sind beispiels- weise in der US-Patentschrift 5,106,949 beschrie- ben.

[0039] Heparin kann durch verschiedene bekannte Techniken auf die Prothese aufgetragen werden. So kann Heparin wie in den folgenden drei Beispielen exemplarisch dargestellt auf die Prothese aufgetra- gen werden. Eine Möglichkeit besteht darin, Benzal- koniumheparin (BA-Hep) Lösung auf die Prothese durch Eintauchen der Prothese in die Lösung mit an- schließender Lufttrocknung aufzutragen. Bei diesem Verfahren wird das Kollagen mit einem ionisch ge- bundenen BA-Hep-Komplex behandelt. Eine zweite Möglichkeit besteht darin, das Heparin mit EDC zu aktivieren und anschließend das Heparin kovalent an die Kollagenfaser zu binden. Ein dritte Möglichkeit besteht darin, das Kollagen mit EDC zu aktivieren, anschließend Protamin an das Kollagen kovalent zu binden und abschließend Heparin ionisch an das Protamin zu binden. Im Fachgebiet sind viele weitere Verfahren zum Beschichten, Verbinden und Auftra- gen bekannt, die ebenfalls verwendet werden kön- nen.

[0040] Die Behandlung des Gewebematrixmaterials kann zusätzlich zu oder anstatt Heparin auch mit Wirkstoffen wie Wachstumsfaktoren oder Pharma- zeutika erfolgen. Als Wirkstoffe sind beispielsweise

Wachstumsfaktoren zur Förderung von Vaskularisie- rung und Epithelialisierung wie von Makrophagen ab- geleitetem Wachstumsfaktor [Macrophage Derived Growth Factor] (MDGF), von Plättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor [Platelet Derived Growth Factor] (PDGF), von vaskulären Endothelzellen abgeleiteter Wachstumsfaktor [Vascular Endothelial Cell Derived Growth Factor] (VEGF); Antibiotika zur Vorbeugung gegen mögliche Infektionen des chirurgischen Imp- lantats; oder in die innere Kollagenschicht eingebun- dene Nervenwachstumsfaktoren möglich, wenn die Prothese als Leitung zur nervalen Regeneration ver- wendet wird. Zusätzlich zu bzw. anstatt von Wirkstof- fen können Matrixkomponenten wie Proteoglykane oder Glykoproteine oder Glykosaminoglykane dem Konstrukt zugesetzt werden.

[0041] Die auf diese Weise hergestellte Kollagen- prothese kann ebenfalls in einer verdünnten Peres- sigsäurelösung mit neutralem pH-Wert sterilisiert werden. Verfahren zur Sterilisation von Kollagen wer- den in der US-Patentschrift 5,460,962 beschrieben. Im bevorzugten Verfahren wird das Kollagen mit ei- ner verdünnten Peressigsäurelösung mit neutralem pH-Wert desinfiziert. Die Konzentration der verdünnt- en Peressigsäurelösung liegt vorzugsweise zwis- chen etwa 0,01 und 0,3% Vol/Vol in Wasser bei ei- nem neutralisierten pH-Wert zwischen etwa pH 6 und pH 8. Alternativ kann die Sterilisation des Kollagens mittels Gammabestrahlung typischerweise bei 2,5 Mrad, oder mit Gasplasma erfolgen. Es können auch andere im Fachgebiet bekannte Verfahren zur Sterili- sation von Kollagen verwendet werden.

[0042] Die im Folgenden genannten Beispiele die- nen einer verbesserten Erklärung der Einsatzes der vorliegenden Erfindung und sind nicht als Beschrän- kung des Umfangs der vorliegenden Erfindung zu verstehen. Der Fachmann wird verstehen, dass die hier beschriebenen Verfahren in verschiedener Wei- se modifiziert werden können, ohne dass damit vom Geist und Umfang der vorliegenden Erfindung abge- wichen wird.

BEISPIELE

Beispiel 1: Chemische Reinigung mechanisch abge- zogenen porcinen Dünndarms

[0043] Es wurde der Dünndarm eines Schweins mit- tels einer Darmreinigungsmaschine Typ Bitterling (Nottingham, Großbritannien) entnommen und me- chanisch abgezogen, die in kombiniertem Einsatz von mechanischer Bearbeitung und Wasserspülung die Fett-, Muskel- und Mukosaschichten von der Tu- nica submucosa abträgt. Die mechanische Arbeit wird durch eine Reihe von Walzen verrichtet, die durch Kompression und Abziehen Schicht für Schicht von der Tunica submucosa des zwischen ihnen hin- durch laufenden intakten Darms abtragen. Die Tuni-

ca submucosa des Dünndarms ist vergleichsweise härter und steifer als das angrenzende Gewebe, und die Rollen pressen die weicheren Gewebestandteile von der Tunica submucosa ab. Im Ergebnis der maschinellen Reinigung verblieb allein die Submukosasschicht des Darms zurück. Die restlichen Verfahrensschritte wurden unter sterilen Bedingungen sowie bei Raumtemperatur durchgeführt. Sämtliche chemischen Lösungen wurden bei Raumtemperatur eingesetzt. Anschließend wurde der Darm der Länge nach entlang dem Lumen aufgeschnitten und dann in Abschnitte von jeweils 15 cm geschnitten. Das Material wurde abgewogen und bei einem Verhältnis von etwa 100 : 1 Vol/Vol Lösung/Darmmaterial in Behälter gegeben.

A. In jeden Behälter mit Darmmaterial wurde ca. 1 l Lösung aus 100 mM 0,22 mm (Mikron) filtersterilisiertem ethylendiaminotetraessigsäurem Tetranatriumsalz (EDTA)/10 mM Natriumhydroxid-Lösung (NaOH) gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 18 Stunden bei etwa 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die EDTA/NaOH-Lösung aus sämtlichen Flaschen entfernt.

B. In die Behälter wurde anschließend je ca. 1 l Lösung aus 1 mM 0,22-mm-filtersterilisierter Chlorwasserstoffsäure (HCl)/1 M Natriumchlorid-Lösung (NaCl) gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 6 bis 8 Stunden bei etwa 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die HCl/NaCl-Lösung aus sämtlichen Behältern entfernt.

C. Anschließend wurde in die Behälter je ca. 1 l Lösung aus 1 M 0,22-mm-filtersterilisiertem Natriumchlorid (NaCl)/10 mM phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 18 Stunden bei 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die NaCl/PBS-Lösung aus sämtlichen Behältern entfernt.

D. Anschließend wurde in die Behälter je ca. 1 l Lösung aus 10 mM 0,22-mm-filtersterilisierter PBS gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 2 Stunden bei 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die phosphatgepufferter Kochsalzlösung aus sämtlichen Behältern entfernt.

E. Abschließend wurde in sämtliche Behälter jeweils ca. 1 l 0,22-mm-filtersterilisiertes Wasser gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 1 Stunde bei 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde das Wasser aus sämtlichen Behältern entfernt.

[0044] Die behandelten Proben wurden geschnitten und für histologische Analysen fixiert. Sowohl an den Querschnitt- als auch Längsschnittproben sowohl der Kontrollgewebe als auch der behandelten Gewebe wurde eine Hämotoxylin-Eosin-(H & E) und Masson-Trichrome-Färbung durchgeführt. Die behandel-

ten Gewebeproben waren frei von Zellen und Zelltrümmern, wohingegen die Kontrollproben regulär und erwartungsgemäß hochgradig zellulär waren.

Beispiel 2: Chemische Reinigung einer porcinen Herzklappe

[0045] Aus einem Jungschwein mit einem Gewicht von 1 Pfund wurde ein porcines Herz gewonnen und in Kochsalzlösung mit physiologischem pH-Wert auf Eis geliefert. Die Herzklappen wurden binnen 4 Stunden aus dem Herzkörper mittels Skalpell und Pinzette entnommen. Es folgten einige weitere Grobschnitte zur Entfernung überflüssigen Grenzgewebes von den Klappen. Eine Klappe wurde als in Probestücke geschnittenes und für verschiedene histologische Analysen fixiertes Kontrollgewebe zurückgelegt, während die andere Klappe dem chemischen Reinigungsprozess unterzogen wurde. Die restlichen Verfahrensschritte wurden unter sterilen Bedingungen und bei Raumtemperatur durchgeführt. Sämtliche chemischen Lösungen wurden bei Raumtemperatur eingesetzt.

[0046] Die Klappe wurde bei gleichzeitiger Agitation mittels eines Schüttlers 18 Stunden in 1 l Lösung aus 100 mM EDTA/10 mM NaOH gegeben. Anschließend wurde die Klappe in 1 l 1 M HCl/1 M NaCl gegeben und 8 Stunden geschüttelt. Anschließend wurde die Klappe in 1 l Lösung aus 1 M HCl/10 mM phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gegeben und etwa 18 Stunden geschüttelt. Anschließend wurde die Klappe etwa zwischen 2 und 4 Stunden in PBS gespült und schließlich 1 Stunde bei gleichzeitiger Agitation in sterilem Wasser gespült. Die behandelten Probestücke wurden anschließend geschnitten und für verschiedene histologische Analysen fixiert.

[0047] Sowohl an den Querschnitt- als auch Längsschnittproben sowohl der Kontrollgewebe als auch der behandelten Gewebe wurde eine Hämotoxylin-Eosin-(H & E) und Masson-Trichrome-Färbung durchgeführt. Die behandelten Gewebeproben waren frei von Zellen und Zelltrümmern, wohingegen die Kontrollproben regulär und erwartungsgemäß hochgradig zellulär waren.

Beispiel 3: Chemische Reinigung porciner Arterie, porcinen Perikards und porciner Fascia

[0048] Aus einem Mutterschwein mit einem Gewicht von 450 Pfund wurde eine Femoralarterie, das gesamte Perikard und die Fascia entnommen. Die Gewebe wurden in Kochsalzlösung mit physiologischem pH-Wert transportiert. Die Gewebe wurden zur Entfernung überflüssigen Gewebes weiter aufgeschnitten. Proben aus jedem der Gewebe wurden als Kontrollproben ohne Reinigung entnommen und für verschiedene histologische Analysen fixiert, während die verbleibenden Gewebe dem chemischen Reini-

gungsprozess unterzogen wurden. Die restlichen Verfahrensschritte wurden unter sterilen Bedingungen und bei Raumtemperatur durchgeführt. Sämtliche chemischen Lösungen wurden bei Raumtemperatur eingesetzt.

[0049] Die Gewebe wurden separat in 1 l Lösung aus 100 mM EDTA/10 mM gegeben und mittels eines Schüttlers etwa 18 Stunden geschüttelt. Anschließend wurden die Gewebe jeweils separat in 1 l Lösung aus 1 M HCl/1 M NaCl und 8 Stunden geschüttelt. Anschließend wurden die Gewebe separat in 1 l Lösung aus 1 M HCl/10 mM phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) geben und danach etwa 18 Stunden geschüttelt. Die Gewebe wurden dann separat in PBS etwa zwischen 2 und 4 Stunden gespült und schließlich in sterilem Wasser etwa 1 Stunde bei gleichzeitiger Agitation gespült. Die behandelten Probestücke wurden anschließend geschnitten und für verschiedene histologische Analysen fixiert.

[0050] Sowohl an den Querschnitt- als auch Längsschnittproben sowohl der Kontrollgewebe als auch der behandelten Gewebe wurde eine Hämotoxylin-Eosin-(H & E) und Masson-Trichrome-Färbung durchgeführt. Die behandelten Gewebeproben waren frei von Zellen und Zelltrümmern, wohingegen die Kontrollproben regulär und erwartungsgemäß hochgradig zellulär waren.

Beispiel 4: Chemische Reinigung mit abweichender Reihenfolge

[0051] Dieses Verfahren wurde unter sterilen Bedingungen sowie bei Raumtemperatur durchgeführt, sämtliche chemischen Lösungen wurden bei Raumtemperatur eingesetzt.

[0052] Wie in Beispiel 1 beschrieben, wurde mechanisch abgezogener porciner Darm in fünf Abschnitte von je 15 cm geschnitten.

[0053] In die Behälter wurden anschließend je ca. 1 l Lösung aus 1 M 0,22-mm-filtersterilisierter Chlorwasserstoffsäure (HCl)/1 M Natriumchlorid (NaCl) gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler zwischen etwa 6 und 8 Stunden bei etwa 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die HCl/NaCl-Lösung aus sämtlichen Behältern entfernt.

[0054] In jeden Behälter mit Darmmaterial wurde ca. 1 l Lösung aus 100 mM 0,22 mm (Mikron) filtersterilisiertem Ethylendiaminetetraessigsäure/10 mM Natriumhydroxid-Lösung (NaOH) gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 18 Stunden bei etwa 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die EDTA/NaOH-Lösung aus sämtlichen Flaschen entfernt.

[0055] In die Behälter wurde anschließend je ca. 1 l Lösung aus 1 M 0,22-mm-filtersterilisierter Natriumchlorid-Lösung (NaCl)/10 mM phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 18 Stunden bei 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die NaCl/PBS-Lösung aus sämtlichen Behältern entfernt.

[0056] In die Behälter wurde anschließend je ca. 1 l Lösung aus 10 mM 0,22-mm-filtersterilisierter PBS gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 1 Stunde bei 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die phosphatgepufferte Kochsalzlösung aus sämtlichen Behältern entfernt.

[0057] Abschließend wurde in jeden Behälter ca. 1 l 0,22-mm-filtersterilisiertes Wasser gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 1 Stunde bei 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde das Wasser aus sämtlichen Behältern entfernt.

[0058] Die behandelten Proben wurden anschließend geschnitten und für histologische Analysen fixiert. Sowohl an den Querschnitt- als auch Längsschnittproben sowohl der Kontrollgewebe als auch der behandelten Gewebe wurde eine Hämotoxylin-Eosin-(H & E) und Masson-Trichrome-Färbung durchgeführt. Die behandelten Gewebeproben waren frei von Zellen und Zelltrümmern, wohingegen die Kontrollproben regulär und erwartungsgemäß hochgradig zellulär waren.

Beispiel 5: Verschiedene alkalische Wirkstoffe und Chelatbildner

[0059] Die Reinigung von mechanisch abgezogener porciner Intestinalsubmukosa erfolgte wie in Beispiel 1. Dieses Verfahren wurde unter sterilen Bedingungen sowie bei Raumtemperatur durchgeführt, sämtliche chemischen Lösungen wurden bei Raumtemperatur eingesetzt. Das chemische Reinigungsverfahren wurde gemäß Beispiel 1 durchgeführt, jedoch traten an Stelle des alkalischen Chelatbildners von Schritt A andere ähnliche Chelatbildner:

A. In jeden Behälter mit Darmmaterial wurde ca. 1 l Lösung aus 100 mM 0,22 mm (Mikron) filtersterilisierter Ethylenbis(oxyethylenitrilo)tetraessigsäure (EGTA)/10 mM NaOH; 100 mM EDTA/10 mM Ca(OH₂) (Calciumhydroxid); oder 100 mM EDTA/10 mM K₂CO₃ (Kaliumkarbonat) gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 18 Stunden bei etwa 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die alkalische Chelatbildnerlösung aus sämtlichen Flaschen entfernt.

B. In die Behälter wurde anschließend je ca. 1 l Lösung aus 1 M 0,22-mm-filtersterilisierter Chlorwasserstoffsäure (HCl)/1 M Natriumchlorid-Lö-

sung (NaCl) gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 6 bis 8 Stunden bei etwa 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die HCl/NaCl-Lösung aus sämtlichen Behältern entfernt.

C. Anschließend wurde in die Behälter je ca. 1 l Lösung aus 1 M 0,22-mm-filtersterilisiertem Natriumchlorid (NaCl)/10 mM phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 18 Stunden bei 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die NaCl/PBS-Lösung aus sämtlichen Behältern entfernt.

D. Anschließend wurde in die Behälter je ca. 1 l Lösung aus 10 mM 0,22-mm-filtersterilisierter PBS gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 1 Stunde bei 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die phosphatgepufferte Kochsalzlösung aus sämtlichen Behältern entfernt.

E. Abschließend wurde in sämtliche Behälter jeweils ca. 1 l 0,22-mm-filtersterilisiertes Wasser gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 1 Stunde bei 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde das Wasser aus sämtlichen Behältern entfernt.

H₂SO₄ (Schwefelsäure)/1 M NaCl Lösung gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 6 bis 8 Stunden bei etwa 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die Lösung aus sämtlichen Behältern entfernt.

C. Anschließend wurde in die Behälter je ca. 1 l Lösung aus 1 M 0,22-mm-filtersterilisiertem Natriumchlorid (NaCl)/10 mM phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 18 Stunden bei 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die NaCl/PBS-Lösung aus sämtlichen Behältern entfernt.

D. Anschließend wurde in die Behälter je ca. 1 l Lösung aus 10 mM 0,22-mm-filtersterilisierter PBS gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 1 Stunde bei 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die phosphatgepufferte Kochsalzlösung aus sämtlichen Behältern entfernt.

E. Abschließend wurde in sämtliche Behälter jeweils ca. 1 l 0,22-mm-filtersterilisiertes Wasser gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 1 Stunde bei 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde das Wasser aus sämtlichen Behältern entfernt.

[0060] Die behandelten Proben wurden für histologische Analysen fixiert. Sowohl an den Querschnitt als auch Längsschnittproben sowohl der Kontrollgewebe als auch der behandelten Gewebe wurde eine Hämotoxylin-Eosin-(H & E) und Masson-Trichrome-Färbung durchgeführt. Die behandelten Gewebeproben waren frei von Zellen und Zelltrümmern, wohingegen die Kontrollproben regulär und erwartungsgemäß hochgradig zellulär waren.

Beispiel 6: Verschiedene Wirkstoffe auf Säure- oder Salzbasis

[0061] Die mechanisch abgezogene porcine Intestinalsubmukosa von Beispiel 1 wurde in Schritt B durch Einsatz eines substituierten Wirkstoffs auf Säurebasis oder eines substituierten Wirkstoffs auf Salzbasis chemisch gereinigt. Dieses Verfahren wurde unter sterilen Bedingungen sowie bei Raumtemperatur durchgeführt, sämtliche chemischen Lösungen wurden bei Raumtemperatur eingesetzt.

A. In jeden Behälter mit Darmmaterial wurde ca. 1 l Lösung aus 100 mM 0,22 mm (Mikron) filtersterilisiertem ethylendiaminotetraessigsäurem Tetranatriumsalz (EDTA)/10 mM Natriumhydroxid NaOH gegeben. Die Behälter wurden anschließend in einem Schüttler ca. 18 Stunden bei 200 U/min geschüttelt. Nach dem Schütteln wurde die EDTA/NaOH-Lösung aus sämtlichen Flaschen entfernt.

B. In die Behälter wurde anschließend je ca. 1 l Lösung aus 1 M 0,22-mm-filtersterilisierter CH₃COOH (Essigsäure)/1 M NaCl oder 1 M

[0062] Die behandelten Proben wurden anschließend für histologische Analysen geschnitten und fixiert. Sowohl an den Querschnitt- als auch Längsschnittproben sowohl der Kontrollgewebe als auch der behandelten Gewebe wurde eine Hämotoxylin-Eosin-(H & E) und Masson-Trichrome-Färbung durchgeführt. Die behandelten Gewebeproben waren frei von Zellen und Zelltrümmern, wohingegen die Kontrollproben regulär und erwartungsgemäß hochgradig zellulär waren.

Beispiel 7: Glykosaminoglykan (GAG)-Gehalt einer ICL, bestimmt durch Celluloseacetat-Gel-Elektrophorese und Alzianblauassay

[0063] Zur Bestimmung des GAG-Gehalts einer ICL wurde an Auszügen einer chemisch gereinigten ICL eine Celluloseacetat-Gel-Elektrophorese mit anschließender Alzianblaufärbung durchgeführt.

[0064] Es wurden ICL-Proben dem in Beispiel 1 beschriebenen chemischen Reinigungsverfahren unterzogen, in Stücke mit einer Größe von je 0,125 cm² geschnitten und in Eppendorf-Röhrchen gegeben. Zum Digerieren der Proben wurden in sämtliche Röhrchen je 100 µl Papain (0,1 mg/ml Papain in 0,1 M Natriumphosphat, 0,1 M Natriumchlorid, 0,005 M EDTA, 0,9 mg/ml Cystein, pH-Wert 5,8) gegeben und 18 Stunden bei 60°C inkubiert. Es wurden Standards mit bekannten GAG (Heparin)-Mengen parallel präpariert. Anschließend wurden DOWEX (0,4 g HCl Form) und 3 ml Wasser zugegeben. Nach Zentrifugieren zur Entfernung des DOWEX-Harzes wurde 1

ml entnommen und lyophilisiert. Die Proben wurden anschließend in 100 µl gereinigtem Wasser rehydriert und ca. 5 Minuten zentrifugiert.

[0065] Die Proben wurden gemäß Newton et al. (1974) auf Celluloseacetat-Folien separiert. Die Celluloseacetat-Folien wurden in 0,1 M Lithiumchlorid/EDTA-Puffer (pH-Wert 5,8) getränkt und vorsichtig geblottet. Die Proben (je 5 µl) wurden am Kathodenende auf die Folien aufgetragen und 30 Minuten der Elektrophorese bei 5 mA unterworfen.

[0066] Nach der Elektrophorese wurden die Folien sofort in Alzianblaulösung (0,2% Alzianblau 8GX, 0,05 M Magnesiumchlorid, 0,025 M Natriumacetatpuffer (pH-Wert 5,8) in 50% Ethylenalkohol) getaucht und in einem Schüttler ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Folien wurden anschließend in mindestens drei Waschgängen mit Entfärbelösung (0,05 M Magnesiumchlorid, 0,025 M Natriumacetatpuffer (pH-Wert 5,8) in 50% Ethylenalkohol) insgesamt 30 Minuten in einem Schüttler entfärbt. Es wurde keine nachweisbare GAG-Färbung in einer papain digerierten ICL festgestellt, wobei lediglich 0,005 Mikrogramm Heparin-Standard nachgewiesen wurde.

[0067] Diese Ergebnisse zeigten, dass die in der chemisch gereinigten ICL verbleibende GAG-Gesamtmenge weniger als 1% (Trockengewicht) beträgt.

Beispiel 8: Lipidgehalt von ICL, bestimmt durch Methylenchloridextraktion

[0068] Es wurde ICL auf Kunststofftafeln ausgebreitet und zwei Stunden getrocknet. Nach der Trocknung wurde die ICL in kleinere Stücke mit einer Größe von etwa 1 cm² geschnitten, von denen 1.100 g in eine Soxhlet-Hülse gegeben wurde.

[0069] Es wurden 90 ml Methylenchlorid in einen 24/40 Rundkolben der Marke Kontes gegeben. Die Soxhlet-Hülse wurde im Dampfraum montiert, wobei sich der Boden des Kolbens in einem Warmwasserbad befand und eisgekühltes Wasser durch den Destillationsapparat geleitet wurde.

[0070] Der Extraktionsvorgang wurde vier Stunden aufrecht erhalten, wonach die Soxhlet-Hülse demontiert wurde. Der Rundkolben mit dem Lösungsmittel und dem extrahierten Material wurde in dem Warmwasserbad belassen, bis so viel Methylenchlorid entwichen war, dass 5 ml zurückblieben. Anschließend wurde das Methylenchlorid in ein 11 × 13 Glas-Kulturröhrchen gegeben und das verbleibende Lösungsmittel ausgekocht. In das Röhrchen wurden 2 ml Methylenchlorid gegeben, das Röhrchen wurde sofort verschlossen und in einen Gefrierapparat mit -20°C gegeben.

[0071] Anschließend wurde das Gewicht des extrahierten Materials bestimmt. Das Glasröhrchen wurde in ein Eisbad gegeben. Es wurde das Gewicht eines 1,12 ml-Ludiag-Aluminiumwägeschiffchens auf einer Feinwaage (Spectrum Supermicro) austariert. Es wurden 10 µl einer resuspendierten Extraktion in das Wägeschiffchen gegeben und das Lösungsmittel im Wägeschiffchen auf einer Heizplatte für 45 Sekunden ausgekocht. Das Wägeschiffchen wurde von der Heizplatte genommen und nach etwa 190 Sekunden auf eine Feinwaage gestellt. Der Vorgang wurde anschließend für die Extraktionsvolumina 20 µl und 30 µl wiederholt.

[0072] Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass der Lipidanteil weniger als ca. 0,7% des Gewichts in trockener chemisch gereinigter ICL beträgt. Nichtchemisch gereinigte ICL hingegen enthält größere Lipidfraktionen; mindestens ca. 1,5% des Gewichts in trockener, nicht gemäß der vorliegenden Erfindung gereinigter ICL.

Beispiel 9: Aminosäureanalyse von ICL

[0073] Kollagene sind Proteine und enthalten die für sie typischen Tripelhelixregionen mit einem Repetiertriplett aus Aminosäuren Glycin-X-Y, wobei X häufig Prolin und Y häufig Hydroxyprolin ist. Hydroxyprolin wird als Aminosäure häufig zur Identifikation und Quantifikation von Kollagen eingesetzt. (Udenfriend, Science, 152: 1335–1340, 1966).

[0074] Zur Bestimmung einer vollständigen Aminosäureanalyse von ICL wurde PICO-TAG HPLC an mechanisch gereinigter (nicht chemisch gereinigter) porciner ICL und chemisch gereinigter ICL durchgeführt. In beiden Materialien wurde der Hydroxyprolingehalt bestimmt.

[0075] Weiters wurden ICL-Probestücke jeder Kondition mit einem Gewicht zwischen ca. 0,31 und ca. 0,36 g in einem CEM AVC 80 – Ofen (CEM Corp.; Matthews, NC) getrocknet. Aus diesen getrockneten ICL-Stücken wurden kleinere Proben mit einem Gewicht zwischen ca. 9,5 und ca. 13,1 mg herausgeschnitten. Die Proben wurden in Kulturröhrchen mit Schraubverschlüssen gegeben, anschließend wurden die Proben in 1% Phenol in 6 M HCl bei 110°C ca. 16 Stunden hydrolysiert (n = 3 für jede der Konditionen). Die ICL-Hydrolysate wurden anschließend zur Normalisierung der Materialkonzentrationen auf 1 mg/ml in 0,1 M HCl aufgelöst. Zu gekennzeichneten Glasröhrchen (6 × 55), 20 ml Hydrolysat und 8 ml 1,25 mmol/ml L-Norleucin als interner Standard. Die Proben wurden anschließend eingefroren und lyophilisiert. Die Proben wurden anschließend wieder durch Zugabe von 20 ml 1 : 2 : 1 Ethanol : Wasser : Triethylamin in die Röhrchen, Einfrieren und Lyophilisierung wieder getrocknet. Die Proben wurden anschließend 20 Minuten bei Raumtemperatur durch

Zugabe von 20 ml eines Reagens (7 : 1 : 1 : 1 Ethanol : Wasser : Triethylamin : PITC) derivatisiert, sodann eingefroren und lyophilisiert. Die Proben wurden abschließend in 200 ml PICO-TAG Probenverdünner suspendiert und in HPLC-Phiole aliquotiert.

[0076] Es wurden Aminosäure-Standards wie folgt präpariert: 0,1 ml Aminosäure-Standard (Produkt-Nr.: A-9531, Sigma) wurde in 1,9 ml 0,1 M HCl gegeben. Es wurden fünf serielle Verdünnungen mittels 0,1 M HCl 1 : 1 gefertigt. Volumina von 100 ml für jede der seriellen Verdünnungen und 8 ml 1,25 mmol/ml L-Norleucin wurden zusammen in Glasröhrchen (6 × 55) gegeben und anschließend auf dieselbe Art und Weise wie die ICL-Proben präpariert.

[0077] Die Proben und Standards wurden in einer 3,9 × 150 mm PICO-TAG Aminosäure-Säule (Teilenr. 88131; Waters Corp.; Milford, MA) behandelt. Es wurden 10 ml Injektionen der Proben und 20 ml Injektionen der Leitproben jeweils dreifach analysiert.

[0078] Den Ergebnissen mit Hinblick auf chemisch gereinigte ICL ist zu entnehmen, dass der Gehalt wichtiger kollagener Aminosäuren im Material jenem gereinigter Kollagenpräparate nahe kommt. Bei Verwendung des Hydroxyprolins als Maß für den Kollagengehalt ist der gewichtsmäßige Kollagenanteil in ICL rechnerisch mindestens ca. 93% Kollagen Trockengewicht. Nichtchemisch gereinigte ICL enthält hingegen eine große Fraktion nichtkollagener Aminosäuren; zwischen ca. 11 und 25% Trockengewicht ICL sind nichtkollagenes Material.

Patentansprüche

1. Detergenzfreies und enzymfreies Verfahren zur Eliminierung nichtkollagener Komponenten aus nativer Säugetiergewebekultur, mit:

- (a) Gewebekontakt mit 1 bis 200 mM Chelatbildner in alkalischer Lösung;
- (b) Gewebekontakt mit 0,5 bis 2 M saurer Salzlösung
- (c) Gewebekontakt mit 0,1 bis 2 M einer auf einen pH-Wert zwischen 5 und 9 gepufferten Salzlösung; und
- (d) Spülung des Gewebes.

2. Verfahren von Anspruch 1, wobei der Chelatbildner von Schritt (a) aus einer Gruppe aus Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA) und Ethylenbis(oxyethyl-nitrilo)tetraessigsäure (EGTA) ausgewählt ist.

3. Verfahren von Anspruch 2, wobei die Konzentration des Chelatbildners zwischen 50 und 150 mM beträgt.

4. Verfahren von Anspruch 1, wobei der alkalische Wirkstoff von Schritt (a) aus einer Gruppe aus Natriumhydroxid, Calciumhydroxid, Natriumkarbonat oder Natriumperoxid ausgewählt ist.

5. Verfahren von Anspruch 4, wobei die Konzentration des alkalischen Wirkstoffs zwischen 0,001 und 1 M beträgt.

6. Verfahren von Anspruch 1, wobei die saure Lösung von Schritt (b) aus einer Gruppe aus Chlorwasserstoffsäure (HCl), Essigsäure (CH₃COOH) und Schwefelsäure (H₂SO₄) ausgewählt ist.

7. Verfahren von Anspruch 6, wobei die Konzentration der sauren Lösung zwischen 0,95 und 1,25 M beträgt.

8. Verfahren von Anspruch 6, wobei die Konzentration der sauren Lösung etwa 1 M beträgt.

9. Verfahren von Anspruch 1, wobei der pH-Wert der sauren Salzlösung zwischen 0 und 1 beträgt.

10. Verfahren von Anspruch 1, wobei der pH-Wert der sauren Salzlösung zwischen 0 und 0,75 beträgt.

11. Verfahren von Anspruch 1, wobei der pH-Wert der sauren Salzlösung zwischen 0,1 und 0,5 beträgt.

12. Verfahren von Anspruch 1, wobei das Salz der Schritte (b) oder (c) ein anorganisches Salz ist.

13. Verfahren von Anspruch 1, wobei das Salz aus einer Gruppe aus Natriumchlorid (NaCl), Calciumchlorid (CaCl₂), Kaliumchlorid (KCl) und Ammoniumsulfat (NH₃SO₄) ausgewählt ist.

14. Verfahren von Anspruch 1, wobei das Salz von Schritt (b) eine Konzentration zwischen 0,1 und 2 M aufweist.

15. Verfahren von Anspruch 1, wobei das Salz der Schritte (b) oder (c) eine Konzentration zwischen 0,75 und 1,25 M aufweist.

16. Verfahren von Anspruch 1, wobei das Salz der Schritte (b) oder (c) eine Konzentration von etwa 1 M aufweist.

17. Verfahren von Anspruch 1, wobei das Gewebe aus der Gruppe aus Dermis, Arterie, Vene, Pericardium, Herzklappe, Dura mater, Ligament, Knochen, Knorpel, Fascia und Intestinum ausgewählt ist.

18. Verfahren von Anspruch 17, wobei das Intestinalgewebe die Tunica submucosa des Dünndarms umfasst.

19. Verfahren von Anspruch 17, wobei das Gewebe humanen, bovinen, porcinen, ovinen, caninen, caprinen oder equinen Ursprungs ist.

20. Verfahren von Anspruch 1, wobei das Spülmittel aus der Gruppe aus Wasser oder gepufferter physiologischer Kochsalzlösung ausgewählt ist.

21. Verfahren von Anspruch 1, wobei Schritt (b) vor Schritt (a) erfolgt.

22. Detergenzfreies und enzymfreies Verfahren zur Eliminierung nichtkollagener Komponenten aus nativer Säugetiergewebekultur zur Herstellung einer weitgehend kollagenen Gewebematrix gemäß Anspruch 1 mit:

(a) Gewebekontakt mit Ethylendiamintetraessigsäure-Basislösung mit einem pH-Wert zwischen 8 und 12;

(b) Gewebekontakt mit Natriumchloridllösung mit einem pH-Wert zwischen 5 und 9; und

(d) Spülung des Gewebes.

23. Bioremodellierbare kollagene Gewebematrix, herstellbar durch jeden der Ansprüche 1 bis 22.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen