(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 30 129 T2** 2004.04.08

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 845 963 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 30 129.6**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US96/11272**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 923 640.5**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/004720**
(86) PCT-Anmeldetag: **03.07.1996**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **13.02.1997**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **10.06.1998**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **24.09.2003**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **08.04.2004**

(51) Int Cl.[7]: **A61F 2/02**
A61F 2/08, A61M 31/00, A61L 27/38, C12N 5/06

(30) Unionspriorität:
508773 **28.07.1995** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Isolagen International S.A., Neuchatel, CH

(72) Erfinder:
BOSS, K., William, Cedar Grove, US

(74) Vertreter:
Grünecker, Kinkeldey, Stockmair & Schwanhäusser, 80538 München

(54) Bezeichnung: **GEBRAUCH VON AUTOLOGEN, DERMALEN FIBROBLASTEN ZUR REPERATUR VON HAUT- ODER WEICHGEWEBESCHÄDEN**

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

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

Beschreibung

1. GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Reparatur von Haut und Weichgewebedefekten, in menschlichen Subjekten einschließlich Falten. Insbesondere betrifft sie ein neues Material zur Verwendung in nicht chirurgischen Techniken, die das Volumen der Dermis oder subkutanen Gewebes vergrößern. Durch Injektion einer Suspension autologer Zellen stellt die Ertindung eine langfristige Verstärkung des angrenzenden unterliegenden Gewebes ohne die Nachteile, die mit der Verwendung derzeitig vertügbarer Materialien einher gehen, zur Verfügung.

2. HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die Injektion eines Materials (eines "Injektionsmittels") in den Körper und insbesondere in das Gesicht, um ein ästhetisches Ergebnis zu bewirken, geht bis in das neunzehnte Jahrhundert zurück. Zum Beispiel erfreute sich die Injektion von Paraffin zur Korrektur von Gesichtskonturdefekten für einen kurzen Zeitraum in den Jahren vor dem ersten Weltkrieg einer Akzeptanz. Allerdings bedingten Komplikationen und die nicht zufriedenstellende Natur der langfristigen Ergebnisse, dass diese Praxis aufgegeben wurde. Die Vertügbarkeit injizierbaren Silicons führte zu einem Aufkommen einer tatsächlichen Wiederholung dieser Vorgänge zu Beginn der frühen 1960er. Speziell hergestellte Siliconlösungen "medizinischer Qualität", z. B. Dow Corning MDX 4,4011, wurden auf einer experimentellen Basis in einer Reihe zugelassener Testzentren in den Vereinbigten Staaten verwendet.

[0003] Komplikationen, wie lokale und systemische Reaktionen auf das Silicon, Migration des Implantats und lokale Gewebezusammenbrüche, schränken die Verwendung von Siliconinjektionen ein. Obwohl die ursprünglichen Befürworter von Siliconinjektionen ihre experimentellen Programme mit einer begrenzten Anzahl von Probanden weitertührten, scheint es sehr unwahrscheinlich, dass diese Technik von einer größeren Gemeinschaft von Chirurgen und Ärzten angenommen wird. Zusammengefasst in Matton, G. et al., 1985, Aesthetic Plastic Surgery 9:133-40; Spira, M. & Rosen, T., 1993, Clin. Plastic Surgery 20 : 181–9.

[0004] Die durch die Injektion nicht-biologischer Materialien gewonnenen schlechten Ergebnisse führten zu Versuchen Fremdproteine, insbesondere Rinderkollagen, als Implantat zu verwenden. Obwohl nicht verarbeitetes Rinderkollagen zur Injektion in den Menschen zu immunogen ist, führt das Entfernen C- und N-terminaler Peptide von Rinderkollagen durch enzymatischen Abbau zu einem Material ("Atelokollagen"), das in kleineren Mengen verwendet werden kann, wenn Patienten voruntersucht werden, um auszuschließen, dass diese Patienten immunoreaktiv sind. Verfahren zur Herstellung und Verwendung dieser Produkte werden in US-Patent 3,949,073, US-Patent 4,424,208 und US-Patent 4,424,208 und US-Patent 4,488,911 beschrieben. Das Produkt wurde unter dem Warnzeichen ZYDERM® als Atelokollagen in Lösung bei einer Konzentration von 35 mg/ml und 65 ml/ml vertrieben. Obwohl in weit verbreiteter weltweiter Anwendung, es gab seit 1987 mehr als 200000 Probanden in den Vereinigten Staaten, wird die Verwendung von ZYDERM mit der Entwicklung von Anti-Rinderantikörpem in ungefähr 90 % der Probanden und mit offenkundigen immunologischen Komplikationen in ungefähr 1–3% der Probanden assoziiert. DeLustro, F., et al., 1987, Plastic and Reconstructive Surgery 79 : 581.

[0005] Atelokollagen in Lösung erwies sich als weniger als vollständig befriedigend, da dieses Material innerhalb eines Zeitraums von Wochen bis Monaten durch den Probanden an dem Ort der Injektion ohne Ersatz durch Wirtsgewebe adsorbiert wird. Obwohl Protokolle, die aus wiederholten Injektionen bestehen, angedacht wurden, sind die Programme in der Praxis durch die Entwicklung von Immunreaktionen gegen das Rinder-Atelokollagen, die Kosten und den Widerstand des Patienten eingeschränkt. Um diese Einschränkungen zu überkommen wurde Rinder-Atelokollagen weiter mit Glutaraldehyd-Vernetzung verarbeitet, gefolgt durch Filtration und Scheren mittels Passage durch ein feines Netz. Die Herstellung und Verwendung dieses Materials wird in US-Patent 4,582,640 und US-Patent 4,642,117 beschrieben. Ein entsprechend hergestelltes Produkt wird unter dem Warenzeichen ZYPLAST® als vernetztes Rinder-Atelokollagen vertrieben. Der Vorteil, den die Vernetzung zur Verfügung stellen soll, ein erhöhter Widerstand gegen Wirtsabbau, wird durch die Erhöhung der Viskosität zunichte gemacht. Die erhöhte Viskosität und insbesondere die unregelmäßige Viskosität ("Klumpenbildung") macht das Material schwer zu verwenden und macht es sogar für bestimmte Zwecke unverwendbar. Siehe z. B. US-Patent 5,366,498.

[0006] Zudem berichten mehrere Untersuchende, dass es keine oder nur eine geringfügig erhöhte Dauerhaftigkeit von ZYPLAST im Vergleich zu ZYDERM gibt und dass die Dauer der Wirkungen von Injektionen höchstens ungefähr 4 bis 6 Wochen dauert. Matti, B. A. & Nicolle, F. V., 1990, Aesthetic Plastic Surgery 14:227-34; Ozgentas, H. E. et al., 1994, Ann Plastic Surgery 33 : 171. Die Erfahrung der meisten praktischen Ärzte zeigt, dass eine bemerkbare Adsorption nach ungefähr 4 bis 6 Wochen erkennbar ist.

[0007] Die durch die Immunogenizität von Rinderkollagenprodukten in Menschen vermittelten Einschränkungen haben andere dahingehend bewegt, die Herstellung menschlichen Kollagens aus Plazenta in Erwägung zu ziehen, siehe z. B. US-Patent 5,002,071, und aus chirurgischen Proben, siehe z. B. US-Patent 4,969,912 und US-Patent 5,332,802. Das weitere Verarbeiten menschlichen Kollagens durch

Vernetzen und andere chemische Modifikationen ist notwendig, da menschliches Kollagen dem gleichen Abbauverfahren wie Rinderkollagen ausgesetzt ist.

[0008] Menschliches Kollagen zur Injektion, das vollständig aus einer Probe des eigenen Gewebes des Probanden abgeleitet ist, ist verfügbar und wird unter dem Markennamen AUTOLOGEN™ vertrieben. Es gibt keinen Nachweis, dass Injektionen mit menschlichem Kollagen in dauerhafteren Wirkungen als Rinderkollageninjektionen resultieren. Zudem ist die Verwendung von autolog prozessiertem Kollagen auf Probanden eingeschränkt, die ein Gesichtsstraffungsvertahren vorgenommen haben, da das Ausgangsmaterial für deren Herstellung die während dieser Operation entfernte Haut ist. Es ist somit klar, dass, obwohl autolog hergestelltes Kollagen die Immunogenizität von Rinderkollagen vermeidet, dass es wie Rinderkollagen keine langfristigen therapeutischen Vorteile zur Verfügung stellt und auf Patienten eingeschränkt ist, die sich einem chirurgischen Eingriff unterzogen haben.

[0009] Andere haben eine Mischung von Gelatinepulver, ε-Aminocapronsäure und Plasma des Probanden ("FIBRELR™") als Alternative zu Atelokollagen für den Zweck der Vergrößerungmehrung der angrenzenden unterliegenden Dermis injiziert. Multicenter trial, 1987, J. Am. Acad. Dermatol. 16 : 1155–62.

[0010] FIBREL™'s Wirkung scheint teilweise von der Induktion einer sklerogenen entzündlichen Reaktiont abzuhängen, um das weiche Gewebe zu verstärken. Gold, M. H., 1994, J. Dermatologic Surg. Oncol. 20 : 586–90. Obwohl die Berichte von FIBREL™-Behandlungen aussagen, dass ein Teil der Patienten davon profitiert, siehe z. B. Millikan, L., et al., 1991, J. Dermatologic Surg. Oncol. 17:223-29, leiden die Ergebnisse unter Beulenbildung und mangelnder Dauerhaftigkeit. Die Verwendung von FIBREL™ wird außerdem durch die Unannehmlichkeit, die mit den Injektionen assoziiert ist, eingeschränkt und da die Ärzte dessen Herstellung als aufwendig empfanden.

[0011] Zusammenfassend ist festzustellen, dass keines der verfügbaren nicht-lebenden injizierbaren Materialien für den Zweck der Verstärkung der angrenzenden unterliegenden Dermis und Weichgewebe vollständig zufriedenstellend ist.

[0012] Die Unfähigkeit, mit Atelokollagen-Injektionen dauerhafte Resultate zu erzielen und die Probleme der Verwendung von FIBREL™ führten einige dazu, zu versuchen, lebendes lipöses Gewebe zu gewinnen und zu injizieren (Transplantat) zur Verstärkung der angrenzenden unterliegenden Dermis und weichem Gewebe. Es können gute Resultate in der Korrektur großer Defekte erzielt werden, wenn Fettgewebe chirurgisch entfernt und reimplantiert wird. Siehe z. B. McKinney, P. & Pandya, S., 1994, Aesthetic Plastic Surgery 18:383-5; Davies, R. E. et al., 1995, Arch of Otolaryngology – Head & Neck Surgery 121:95-100. Allerdings sind die Ergebnisse für Reparaturen, die das Platzieren des Implantats durch Injektion voraussetzen, deutlich weniger vorteilhaft. Ersek, R. A., 1991, Plastic & Reconstructive Surgery 87 : 219–27. Obwohl einige vorteilhafte Ergebnisse berichtet worden waren, haben sogar die Befürworter des Verfahrens, siehe z. B. Hambley, R. M. & Carruthers, J. A., 1992, J. Derm. Surgery & Oncol. 18 : 963–8, zugegeben, dass die Technik für die meisten Ärzte unbefriedigende Ergebnisse zur Verfügung stellt. Lewis, C. M., 1993, Aesthetic Plastic Surgery 17:109-12. Unter den häufig von Ärzten und Patienten festgestellten Problemen sind es die mangelnde Voraussagbarkeit und Beulenbildung der Resultate, welches das Verfahren für die Behandlung feiner Falten ungeeignet macht und ein Zeitraum von extremer Schwellung nach der Injektion, welcher zwischen 4 bis 6 Wochen dauert.

3. ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0013] Die vorliegende Erfindung stellt die Verwendung dermaler Fibroblasten in der Herstellung eines Mittels zur Verwendung in der kosmetischen Verstärkung von kosmetischen oder ästhetischen Defekten in der Haut eines Subjekts, zur Verfügung, wobei das Mittel expandierte autologe dermale Fibroblasten umfasst, die im Wesentlichen frei von Kulturmedium-Serum-abgeleiteten Proteinen sind. Das Mittel kann in der Form einer Suspension in die Dermis und subkutanes Gewebe injiziert werden, das unterliegend an den Defekt angrenzt. Typische Defekte, die korrigiert werden können, umfassen Falten, langgezogene Kerben, abgesenkte Narben, kutane Vertiefungen nicht-traumatischen Ursprungs, Narbenbildung durch Acne vulgaris und Hypoplasie der Lippe. Die Zellen, die injiziert werden, sind Zellen, die mit dem Subjekt histokompatibel sind und die durch Passage in einem Zellkultursystem expandiert wurden. Die eingepflanzten Zellen sind vorzugsweise dermale Fibroblasten, die aus einer Biopsie-Probe abgeleitet sind, die dem Subjekt entnommen wurde.

[0014] Die passagierten dermalen Fibroblasten sind im Wesentlichen frei von Serumproteinen, die aus dem Kulturmedium abgeleitet sind, das verwendet wurde, um die Zellen zu expandieren, so dass sie verwendet werden können, um Defekte in der Haut zu korrigieren. Dieses kann durch Inkubieren der expandierten Fibroblasten in proteinfreiem Medium für einen Zeitraum bewirkt werden.

4. DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0015] Die vorliegende Erfindung basiert teilweise auf der Erkenntnis, dass das ideale Material, welches zur Verstärkung der Dermis und subkutanen Gewebes, das unterliegend an einen Defekt angrenzt, lebende Zellen des Gewebetyps sein würden, der normalerweise in der Dermis vorhanden ist. Diese Erfindung basiert auch auf der Erkenntnis, dass ein großzügiger Vorrat autologer Zellen des gewünschten

Typs durch Kultivieren einer Biopsieprobe hergestellt werden kann, die vorher dem Subjekt mehrere Wochen vor der Injektion entnommen wurden. Die Erfindung basiert des Weiteren auf der Erkenntnis, dass nach der Gewebekulturexpansion die autologen Zellen eine wesentliche Menge antigener Proteine enthalten werden, aber dass die antigenen Proteine vor der Injektion in das Subjekt entfernt werden können.

4.1 Verfahren zur Gewinnung einer injizierbaren Zellsuspension

[0016] Die Erfindung kann durch Injizieren jeglicher nicht differenzierter mesenchymaler Zelle durchgeführt werden, die in Kultur expandiert werden kann. In einer bevorzugten Ausführungsform werden dermale Fibroblasten injiziert, da sie leicht zu gewinnen und zu expandieren sind und da sie einer der Zelltypen sind, die normalerweise in der Dermis und in angrenzendem unterliegendem Geweben vorhanden ist.

[0017] Eine dermale Fibroblastenkultur wird aus einer 2 × 5 mm Biopsieprobe der Haut in voller Dicke injiziert. Bedingt durch das Phänomen der Implantatabstoßung, welches den Chirurgen und Immunologen in der Transplantation wohl bekannt ist, ist es wesentlich, dass die kultivierten Fibroblasten histokompatibel mit dem Wirt sind. Histokompatibilität kann durch das Gewinnen einer Biopsie des Subjekts, dessen dermaler Defekt korrigiert werden soll und das Kultivieren der Fibroblasten dieser Person sichergestellt werden.

[0018] Bevor die Kultur initiiert wird, wird die Biopsie wiederholt mit antibiotischen und antifungiziden Mitteln gewaschen. Danach wird die Epidermis und das subkutane Adipocytenenthaltende Gewebe entfernt, so, dass die resultierende Kultur im Wesentlichen frei von Nicht-Fibroblastenzellen ist und die Probe der Dermis wird mit einem Skalpell oder einer Schere fein aufgeteilt. Die Teile der Probe werden einzeln mit einer Pinzette auf die trockene Oberfläche eines Gewebekulturgefäßes plaziert und für zwischen 5 und 10 Minuten anheften gelassen, bevor eine kleine Menge Medium langsam hinzugefügt wird, wobei darauf geachtet wird, dass die angehefteten Gewebefragmente nicht abgelöst werden. Nach 24 Stunden Inkubation wird das Gefäß mit zusätzlichem Medium versorgt. Wenn ein T-25 Gefäß zum Starten der Kultur verwendet wird, beträgt die ursprüngliche Menge an Medium 1,5 bis 2,0 ml. Das Etablieren einer Zelllinie aus einer Biopsieprobe nimmt normalerweise zwischen 2 und 3 Wochen in Anspruch, zu welchem Zeitpunkt die Zellen aus dem ursprünglich verwendeten Kulturgefäß zur Expansion entnommen werden können.

[0019] Während der frühen Stadien der Kultur ist es wünschenswert, dass die Gewebefragmente an dem Boden des Kulturgefäßes haften bleiben; Fragmente, die freigesetzt werden, sollten in neue Gefäße reimplantiert werden. Die Fibroblasten können durch ein kurzes Aussetzen der Gewebekultur zu EDTA-Trypsin dahingehend stimuliert werden, zu wachsen, gemäß Techniken, die denen den Fachleuten auf dem Gebiet wohl bekannt sind. Das Aussetzen zu Trypsin ist zu kurz, um die Fibroblasten von ihrer Anheftung an die Wand des Kulturgefäßes freizusetzen. Direkt nachdem die Kulturen etabliert wurden und Konfluenz anstreben, können Proben der Fibroblasten zur Gefrieraufbewahrung entfernt werden. Die Gefrieraufbewahrung von Fibroblasten früher anstatt später Passagen ist bevorzugt, da die Anzahl der Passagen in Zellkultur von normalen menschlichen Fibroblasten eingeschränkt ist.

[0020] Die Fibroblasten können in jeglichem Gefriermedium eingefroren werden, das geeignet ist, die Fibroblasten zu konservieren. Es kann ein Medium, bestehend aus 70% Wachstumsmedium, 20% (v/v) fetales Rinderserum und 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) mit guter Wirkung verwendet werden. Aufgetaute Zellen können verwendet werden, um sekundäre Kulturen zu initiieren, um Suspensionen zur Verwendung in dem gleichen Subjekt zu erhalten, ohne den Nachteil, dass eine weitere Probe genommen werden muss.

[0021] Jegliche Gewebekulturtechnik, die geeignet ist für die Vermehrung dermaler Fibroblasten aus Biopsieproben, kann verwendet werden, um die Zellen zu expandieren, um die Erfindung zu praktizieren. Den Fachleuten auf dem Gebiet wohlbekannte Techniken sind in R. I. Freshney, Ed., ANIMAL CELL CULTURE: A PRACTICAL APPROACH (IRL Press, Oxford England, 1986) und R. I. Freshney, Ed., CULTURE OF ANIMAL CELLS: A MANUAL OF BASIC TECHNIQUES, Alan R. Liss & Co., New York, 1987), zu finden, welche hierbei durch Referenzieren aufgenommen werden.

[0022] Das Medium kann jegliches Medium sein, das für das Wachstum primärer Fibroblastenkulturen geeignet ist. In den meisten Fällen ist das Medium mit Serum in einer Menge von 0,5% und 20% (v/v) supplementiert, um das Wachstum der Fibroblasten zu unterstützen. Höhere Konzentrationen von Serum fördern schnelleres Wachstum der Fibroblasten. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Serum fetales Rinderserum, welches zu einer Endkonzentration von 10% des Mediums hinzugefügt wird. Das Medium kann z. B. mit 2 mM Glutamin, 110 mg/l Natriumpyruvat, 10% (v/v) fetales Rinderserum und Antibiotika supplementiertes hochglucosehaltiges DMEM ("vollständiges Medium") sein.

[0023] Die Zellen können durch Trypsinierung in neue Gefäße passagiert werden. Zur Expansion werden die Einzelgefäße 1 : 3 aufgeteilt. Dreifachboden T-150 Gefäße mit einer Gesamtkulturfläche von 450 cm^2 sind zur Durchführung der Erfindung geeignet. Ein Dreifachboden T-150 kann mit ungefähr 6×10^6 Zellen ausgesäht werden und hat eine Kapazität zur Herstellung von ungefähr $1{,}8 \times 10^7$ Zellen. Wenn die Kapazität des Gefäßes erreicht ist, was typischerweise 5 bis 7 Kulturtage benötigt, wird das Wachstumsmedium durch serumfreies vollständiges Medium er-

setzt; danach werden die Zellen inkubiert, d. h., bei ungefähr 30°C und ungefähr 40°C für mindestens 6 Stunden gehalten, vorzugsweise für mehr als 12 Stunden und am meisten bevorzugt von 16 bis 18 Stunden bei 37°C in dem Protein-freien Medium. Die Inkubation der Zellen in serumfreiem Medium entfernt im Wesentlichen die Proteine von den Zellen, die aus fetalem Rinderserum abgeleitet sind, welches, wenn vorhanden, immunogen in dem Subjekt sein würde und eine allergische Reaktion bewirken würde.

[0024] Am Ende der Inkubation in serumfreiem Medium werden die Zellen aus dem Gewebekulturgefäß durch Trypsin/EDTA entfernt; intensiv durch Zentrifugation und Resuspendierung gewaschen; und zur Injektion in einem gleichen Volumen injizierbarer isotonischer Salzlösung suspendiert. Sechs Dreifachboden T-150 Gefäße, die bis zur Kapazitätsgrenze ausgewachsen waren ergaben 10^8 Zellen, welche ausreichen, um ungefähr 1,0 ml Suspension zu machen.

[0025] Alternativ können die Zellen bei 4°C transportiert werden, solange sie innerhalb von 18 Stunden ab dem Zeitraum, an dem die Suspension hergestellt wurde, injiziert werden. Die Zellen können in einem gleichen Volumen vollständigem Medium suspendiert werden, außer der Abwesenheit von Phenol Rot pH-Indikator und den Ersatz von fetalem Rinderserum durch Serum des Subjekts für einen solchen Transport (Transportmedium). Die Zellen können abgesaugt und in das Transportmedium injiziert werden.

[0026] Das Volumen des Salz- oder Transportmediums, in welchem die Zellen suspendiert sind, ist nicht kritisch. Abhängig von solchen Faktoren, wie die Zahl der Fibroblasten, die der Arzt injizieren möchte, der Größe und Anzahl der Defekte, die zu behandeln sind, und der Eilbedürftigkeit des Wunsches des Subjekts, die Behandlungsergebnisse zu erzielen, kann der Arzt die Zellen in einem größeren Volumen an Medium suspendieren und entsprechend weniger Zellen an jeder Injektionsstelle injizieren.

4.2 Alternatives Verfahren zur Gewinnung einer injizierbaren Zellpopulation in einer viskosen Suspension

[0027] Wenn die Reparatur eines dermalen Defekts ein großes Volumen an Material notwendig macht, stellt die vorliegende Erfindung ein alternatives Vertahren zur Herstellung einer injizierbaren Zellsuspension zur Verfügung. Beispiele solcher Defekte umfassen solche, in denen das Subjekt eine Vergrößerung der Labia oralis, die Behandlung nasolabialer Falten und die Behandlung subkutaner Defekte benötigt.

[0028] Das alternative Vertahren ist mit dem oben beschriebenen Vertahren identisch, bis eine Population von ungefähr 1×10^6 Zellen erhalten wird. Ein Plasma-Gerinnsel wird auf dem Boden einer 100 mm Petri-Schale ausgebildet, die durch das Hinzufügen von 2 ml des Plasmas des Subjekts und 50 bis 100 Einheiten autologen Thrombins (typischerweise in 50 µl) behandelt wird, um eine Gewebekulturoberfläche aufzuweisen, so dass ein Gerinnsel ausgebildet wird. Kultivierte dermale Fibroblasten, 1×10^6 Zellen in 3 bis 5 ml, werden auf der Oberfläche des Gerinnsels ausgesät und für weitere 7 Tage in vollständigem Medium kultiviert. Am Ende von 7 Tagen wird das vollständige Medium gegen Serum-freies Medium ausgetauscht. Ein Protokoll, bei dem das Medium zweimal entfernt und mit Serum-freiem Medium in stündlichen Intervallen ersetzt wird und bei dem anschließend die Zellen weitere 14 bis 18 Stunden in einem Serum-freien Medium inkubiert werden, führt zu befriedigenden Ergebnissen. Nachdem die Inkubation in Serum-freiem Medium vollständig ist, kann das Gerinnsel in eine Spritze aufgesaugt werden und wie benötigt injiziert werden.

[0029] In einer alternativen Ausführungsform der Ertindung werden die Fibroblasten nicht in eine Suspension übertührt. Stattdessen wird das Gerinnsel intakt verwendet oder mit einem Skalpell in eine gewünschte Form geschnitten und die Fibroblasten-besetzte Oberfläche des Gerinnsels wird als Verband auf die Dermis des Subjekts nach dermalem Abtrag aufgetragen.

4.3 Die Verabreichung der Zellen an Probanden

[0030] Die Zellsuspensionen der Erfindung können verwendet werden, um dermale Defekte durch Verwendung der gleichen Techniken zu behandeln, die Fachleute auf dem Gebiet derzeit einsetzen, um ZYDERM® und ZYPLAST® einzusetzen. Die Zellsuspension kann anstatt Atelokollagen-Lösungen mit den oben genannten Vorteilen verwendet werden. Repräsentative Lehren bezüglich der Verwendung injizierbaren Materials zur Verstärkung der unterliegenden angrenzenden Dermis und subkutanen Gewebes sind in der chirurgischen Literatur zu finden. Gonzales, U. M., 1992, Aesthetic Plastic Surgery 16 : 231–4; Nicolle, F. V., 1985, Aesthetic Plastic Surgery 9 : 159–62; Pieyre, J. M., 1985, Aesthetic Plastic Surgery 9 : 153–54; welche hiermit in ihrer Gesamtheit durch Referenzieren eingefügt werden.

[0031] Die Behandlung feiner oberflächlicher Gesichtslinien, einer Ausführungsform der Erfindung, kann wie folgt erzielt werden. Die zu behandelnde Fläche wird mit Alkohol vorbereitet und gestrafft, um eine straffe Oberfläche zu erzielen. Eine Spritze wird mit einer Suspension gefüllt und mit einer Nadel mit 30 Einheiten zur Injektion versehen. Die Nadel wird in die Hautstelle so oberflächlich wie möglich eingeführt; die Orientierung des Winkels ist nicht kritisch. Eine intradermale Injektion wird durch leichten Druck, bis ein leichtes Bleichen zu sehen ist, durchgeführt. Es werden multiple serielle Injektionen durchgeführt.

[0032] Das Implantat kann in die obikulare Muskulatur plaziert werden, um Hypoplasie der Lippe zu behandeln oder in das subkutane Gewebe, um tiefe subkutane Defekte zu behandeln.

[0033] Große Flächen von Aknenarben können durch dermales Abtragen bis zu einer Ebene der mittleren oder tiefen Dermis behandelt werden. Ein Fibroblasten-enthaltendes Gerinnsel wird dann so aufgetragen, um die abgetragene Oberfläche zu bedecken und so appliziert, dass die mit Fibroblasten versehene Seite des Gerinnsels benachbart zu der abgetragenen dermalen Oberfläche ist. Das applizierte Gerinnsel wird dann mit einem Verband, wie Xeroform®, Adaptic® oder jeglichem nicht-verschließenden Verband bedeckt.

5. ZUSAMMENFASSUNG DER KLINISCHEN ERFAHRUNG

[0034] Sechs Patienten wurden auf verschiedene dermale Defekte gemäß dem oben beschriebenen Verfahren behandelt. Die Diagnosen waren wie folgt: Lachfalten (nasolabiale Falten), 2 Patienten; perioralе Falten, 2 Patienten; glabellare Furchen; abgesenkte Narbe; Lippen-Hypoplasie; und aktinische Wangenfalten.

[0035] Jeder Patient erhielt eine Unterarm-Versuchsdosis von 0,1 ml der Zellsuspension. Zwei Patienten entwickelten eine leichte Rötung; aber es gab keine anderen Anzeichen einer Reaktion auf die Injektionen. Drei Wochen später wurden therapeutische Injektionen mit einem Gesamtvolumen von 1,0 ml an der Stelle der dermalen Defekte durchgeführt. Vier Wochen später wurde an einigen Patienten eine zweite therapeutische Injektion von 1,0 ml durchgeführt. Nur an dem Patienten mit der Lippenverstärkung wurde eine zweite Injektion durchgeführt, um den gleichen Defekt zu reparieren; alle anderen Patienten hatten nur eine Injektion in jedem Behandlungsbereich.

[0036] Die Patienten wiesen eine minimale oder keine Rötung auf und es gab keine Zeichen unmittelbarer systemischer oder lokaler unerewünschter Reaktionen. Jeder Patient war direkt nach den Injektionen in der Lage zu arbeiten und bei jedem Patienten war die Besserung sofort erkennbar.

[0037] Es gab nur eine minimale Unannehmlichkeit, die mit den Injektionen assoziiert war. Die Unannehmlichkeit wurde als geringer als mit bovinen AteloKollagen-Injektionen berichtet. Die Patienten brachten ihre Zufriedenheit mit der Behandlung zum Ausdruck und ihren Wunsch, weitere Behandlungen von anderen Defekten zu unternehmen. Die Korrektur dermaler Defekte wurde von Freunden und Bekannten der Patienten wahrgenommen, die nicht von den Behandlungen wussten. Es gab keine sichtbaren Folgen der Behandlung der Haut, obwohl es einige Anzeichen der Behandlung gab, die durch Abtasten nachweisbar waren.

[0038] Es gab keine verzögerten lokalen oder systemischen Nebenwirkungen während der sechsmonatigen Studienzeit nach der Injektion. Keiner der Patienten entwickelte Beulen, Unregelmäßigkeiten oder Unebenheiten. Am Wichtigsten, die therapeutischen Wirkungen der Injektionen zeigten keinerlei Verringerung während des beobachteten Zeitraums, welcher auf mehr als sechs Monate vom Zeitpunkt der Injektion an erweitert wurde, während welcher Zeit die Absorbtion einer Rinder-Atelokollagen-Injektion erwartet worden wäre. Statt dessen zeigten die therapeutischen Wirkungen in einigen Patienten, die für langfristige Nachuntersuchungen zur Verfügung standen, die Vorteile, dass diese sich mit der Zeit vergrößerten. Das späte Einsetzen langfristiger Verbesserungen zeigt, dass die injizierten Fibroblasten metabolisch aktiv sind und eine zusätzliche extrazelluläre Matrix an der Stelle der Injektion aufbauen.

[0039] Die vorliegende Erfindung ist nicht auf den Umfang der spezifischen einzelnen Ausführungsformen eingeschränkt, die als Einzelillustrationen individueller Aspekte der Erfindung vorgesehen sind und funktionell äquivalente Verfahren und Komponenten liegen innerhalb des Umfangs der Erfindung. Tatsächlich werden verschiedene Modifikationen der Erfindung zusätzlich zu den gezeigten und hierin beschriebenen dem Fachmann auf dem Gebiet aus der vorgenannten Beschreibung zu erkennen sein. Solche Modifikationen sollen in den Umfang der nachstehenden Ansprüche fallen.

Patentansprüche

1. Verwendung von dermalen Fibroblasten in der Herstellung eines Mittels zur Verwendung in der kosmetischen Verstärkung von kosmetischen oder ästhetischen Defekten in der Haut eines Subjekts, wobei das Mittel expandierte autologe dermale Fibroblasten umfasst, die im Wesentlichen frei von Kulturmedium-Serum-abgeleiteten Proteinen sind.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das Mittel im Wesentlichen frei von Nicht-Fibroblastenzellen ist.

3. Verwendung gemäß Anspruch 1 oder Anspruch 2, bei der der kosmetische oder ästhetische Defekt eine Falte, langgezogene Kerbe, eine abgesenkte Narbe, eine kutane Vertiefung nicht-traumatischen Ursprungs oder eine Unterentwicklung der Lippe ist.

4. Verwendung gemäß einem vorangegangenen Anspruch, bei der das Mittel eine Suspension zur Injektion in angrenzendes unterliegendes Gewebe des kosmetischen oder ästhetischen Defekts in einem Subjekt umfasst.

5. Verwendung gemäß Anspruch 4, bei der die Suspension zusätzlich menschliches Fibrin in einer Menge umfasst, die wirksam ist, ein injizierbares Gel auszubilden.

6. Verwendung gemäß Anspruch 5, bei der das injizierbare Gel Thrombin-aktiviertes homologes

Plasma umfasst.

7. Verwendung gemäß einem vorangegangenen Anspruch, bei der Kulturmedium-Serum-abgeleitete Proteine aus den Fibroblasten durch Inkubation in Serumfreiem Medium entfernt werden.

8. Verwendung gemäß Anspruch 7, bei der die Fibroblasten für mindestens 6 Stunden in Serum-freiem Medium inkubiert werden.

9. Verwendung gemäß einem vorangegangenen Anspruch, bei der die Fibroblasten durch die Schritte des
(a) Passagierens dermaler Fibroblasten, die vormals durch eine dermale Biopsie aus dem Subjekt erhalten wurden, in einem Kulturmedium, das zwischen 0,5 % und 20% nicht-menschliches Serum umfasst, um dermale Fibroblasten zur Verfügung zu stellen, die im Wesentlichen frei von Adipocyten, Keratinocyten und extrazellulärer Matrix sind;
(b) Inkubierens der passagierten dermalen Fibroblasten in einem Serum-freien Medium für mindestens 6 Stunden bei zwischen ungefähr 30°C und ungefähr 40°C; und
(c) Aussetzens der inkubierten Fibroblasten zu einem proteolytischen Enzym, um die Fibroblasten zu suspendieren. erhalten werden

10. Verwendung von dermalen Fibroblasten in der Herstellung eines Mittels zur Verwendung in einem chirurgischen Verfahren für die langfristige kosmetische Verstärkung von subkutanem oder dermalem Gewebe in einem menschlichen Subjekt, bei der das Verfahren:
(a) das Zurverfügungstellen eines Mittels, das eine Suspension von autologen, passagierten, dermalen Fibroblasten umfasst, die im Wesentlichen frei von Kulturmedium-Serum-abgeleiteten Proteinen sind;
(b) das Identifizieren eines kosmetischen Defekts, der anfällig für die Verbesserung durch Verstärkung des angrenzenden unterliegenden subkutanen oder dermalen Gewebes ist; und
(c) das Injizieren eines wirksamen Volumens des Mittels in das angrenzende unterliegende Gewebe, wodurch das Gewebe verstärkt wird; umfasst

11. Verwendung gemäß Anspruch 1, in welcher das Mittel ein Fibroblasten-gekeimtes Gerinnsel umfasst, das aus dem Subjekt abgeleitete dermale Fibroblasten aufweist, und das Gerinnsel ist für die Anwendung auf eine Stelle der Folge von Akne Vulgaris des Subjekts, die bis zu einer Ebene der mittleren oder tiefen Dermis abgetragen wurde, so dass die eingesetzten Fibroblasten zur Dermis benachbart sind.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen