



(10) **DE 697 31 302 T3** 2011.01.20

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 930 876 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 31 302.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB97/01973**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 932 922.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/003180**

(86) PCT-Anmeldetag: **22.07.1997**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **29.01.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.07.1999**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **20.10.2004**

(97) Veröffentlichungstag  
des geänderten Patents beim EPA: **07.07.2010**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **20.01.2011**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 31/05** (2006.01)

**A61K 31/135** (2006.01)

**A61K 31/565** (2006.01)

**A61K 31/58** (2006.01)

**A61P 17/02** (2006.01)

**Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert**

(30) Unionspriorität:

**9615348**      **22.07.1996**      **GB**

**9701600**      **27.01.1997**      **GB**

(73) Patentinhaber:

**Renovo Ltd., Manchester, GB**

(74) Vertreter:

**derzeit kein Vertreter bestellt**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**FERGUSON, William, Mark, High Peak, Derbyshire  
SK23 7PX, GB; ASHCROFT, Sarah, Gillian, Attley  
Bridge, Wigan WN6 9AN, GB**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG VON SUBSTANZEN, DIE DIE ÖSTROGEN WIRKUNG FÖRDERN, ZUR BEHAND-  
LUNG VON WUNDEN**

**Beschreibung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Verbindungen, die die östrogene Wirkung fördern, zur Beschleunigung der Geschwindigkeit der Wundheilung.

**[0002]** Wundheilung bei Erwachsenen ist ein komplizierter Wiederherstellungsprozeß. Der Heilungsprozeß beginnt mit der Rekrutierung einer Vielfalt spezialisierter Zellen an die Stelle der Wunde und beinhaltet Ablagerung von extrazellulärer Matrix und Basalmembran, Angiogenese, selektive Proteaseaktivität und Reepithelisierung. Eine wichtige Komponente des Heilungsprozesses bei erwachsenen Säugern ist die Stimulierung von Fibroblasten, um die extrazelluläre Matrix zu erzeugen. Diese extrazelluläre Matrix macht eine Hauptkomponente des Bindegewebes aus, welches sich entwickelt, um die Wundfläche wiederherzustellen.

**[0003]** Das Bindegewebe, das sich während des Heilungsprozesses bildet, ist oftmals in der Beschaffenheit fibrös und nimmt gewöhnlich die Form einer Bindegewebsnarbe an (ein als Fibrose bekannter Prozeß).

**[0004]** Eine Narbe ist eine abnormale morphologische Struktur, resultierend aus einer vorherigen Verletzung oder Wunde (z. B. eine Inzision, eine Exzision oder ein Trauma). Narben bestehen aus einem Bindegewebe, welches vorwiegend eine Matrix aus den Kollagentypen 1 und 3 sowie Fibronectin ist. Die Narbe kann aus Kollagenfasern in einer abnormalen Organisation bestehen (wie gesehen in Narben der Haut), oder sie kann eine abnormale Ansammlung von Bindegewebe sein (wie gesehen in Narben des zentralen Nervensystems). Die meisten Narben bestehen aus abnormal organisiertem Kollagen und auch überschüssigem Kollagen. Beim Menschen können in der Haut Narben unter die Oberfläche abgesenkt oder über die Oberfläche der Haut erhöht sein. Hypertrophe Narben sind eine schlimmere Form normaler Narbenbildung, sind über die normale Oberfläche der Haut erhöht und enthalten überschüssiges Kollagen, angeordnet in einem abnormalen Muster. Ein Keloid ist eine weitere Form pathologischer Narbenbildung, welche nicht nur über die Oberfläche der Haut erhöht ist, sondern sich auch über die Grenzen der ursprünglichen Verletzung ausdehnt. In einem Keloid gibt es überschüssiges Bindegewebe, welches in einer abnormalen Weise vorwiegend in Wirbeln von Kollagengewebe organisiert ist. Es gibt genetische Prädispositionen zur Bildung von sowohl hypertrophen Narben als auch Keloiden. Sie sind besonders häufig bei afrikanisch-karibischen und mongoloiden Rassen.

**[0005]** Es gibt einen Bedarf, Medikamente bereitzustellen, die die Heilung von Wunden fördern. Zum Beispiel ist es in dem Fall akuter Wunden (wie beispielsweise durchbohrende Verletzungen, Brandwunden, Nervenschädigung oder sogar Wunden, resultierend aus elektiver chirurgischer Behandlung), chronischer Wunden (wie beispielsweise diabetisches, venöses und Dekubitusgeschwür) oder für allgemein in der Heilung beeinträchtigte Personen (zum Beispiel die älteren) oft wünschenswert, die Geschwindigkeit der Heilung zu vergrößern. In diesen Beispielen können die Wunden ernsthaft die Qualität des Lebens beeinflussen oder sogar zum Tod führen und daher muß die Geschwindigkeit der Heilung oft, so viel wie klinisch möglich ist, vergrößert werden. Wo die Geschwindigkeit der Wundheilung vergrößert ist, gibt es oftmals eine damit verbundene Vergrößerung der Narbenbildung, aber dies kann, verglichen mit der gewünschten Vergrößerung in der Geschwindigkeit der Heilung, von sekundärer Bedeutung sein.

**[0006]** Der Begriff „Wunde“, wie hier verwendet, wird nur auf Verletzungen an der Haut verwendet.

**[0007]** Wenn auch die vorstehenden Überlegungen hauptsächlich auf Leiden, Erkrankungen oder Krankheiten des Menschen angewendet werden, wird anerkannt, daß die Wundheilung auch bei andern Lebewesen, insbesondere Hof- oder Haustieren (z. B. Pferde, Rindvieh, Hunde, Katzen usw.), problematisch sein kann.

**[0008]** Es hat verschiedene neue Entwicklungen auf den Gebieten der Wundheilung gegeben. Einige von diesen Entwicklungen drehen sich um die neue Einsicht, daß eine Gruppe von Cytokinen und Wachstumsfaktoren eng mit der Wiederherstellung von Geweben verbunden ist.

**[0009]** WO-A-92/17206 offenbart die Verwendung neutralisierender Mittel für Fibrose-fördernde Wachstumsfaktoren, die verwendet werden können, um die Narbenbildung während der Wundheilung zu hemmen. Zum Beispiel demonstriert WO-A-92/17206, daß Zusammensetzungen, welche spezifisch die Aktivität der Transforming Growth Factors (transformierende Wachstumsfaktoren)  $\beta 1$  und  $\beta 2$  und des Platelet Derived Growth Factor (aus Blutplättchen stammender Wachstumsfaktor) hemmen, besonders vorteilhaft zur Verringerung der Narbenbildung sind.

**[0010]** WO-A-93/19769 offenbart die Verwendung nichtfibrotischer Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise der transformierenden Wachstumsfaktoren  $\beta 3$ , von welchen überraschenderweise gefunden wurde, daß sie

die Heilung einer Wunde fördern, ohne Fibrose auszulösen.

**[0011]** GB-A-2288118 offenbart die Verwendung spezifischer Antikörper, erzeugt gegen Wachstumsfaktoren, die die Heilung durch Potenzieren der Wirkungen der Wachstumsfaktoren verbessern.

**[0012]** Eine andere Entwicklung beinhaltet die Verwendung von Mannose-6-phosphat zur Verwendung bei der Behandlung fibrotischer Störungen, verbunden mit der Ansammlung extrazellulärer Matrix und mit erhöhten Niveaus der transformierenden Wachstumsfaktoren  $\beta 1$  oder  $\beta 2$  (GB-A-2265310). Es wird angenommen, daß Mannose-6-phosphat die Umwandlung latenter Formen dieser transformierenden Wachstumsfaktoren in ihre aktive Form beeinträchtigt.

**[0013]** Andere Zusammensetzungen, die die Wirksamkeit der Wachstumsfaktoren beeinflussen und die Wundheilung fördern, sind in WO-A-95/26203 offenbart.

**[0014]** Weiterhin offenbart Jaworski (Database Embase Elsevier Science Publishers, Amsterdam, NL Zugangs-Nr. 279680 Roczn. Akad. Marchewskiego, 1973S), daß Östradiol eine Auswirkung auf die Heilung von Wunden der Harnblase beim Meerschweinchen hat.

**[0015]** Trotz dieser Fortschritte bleibt ein Bedarf, die Entwicklung von Medikamenten fortzusetzen, die verwendet werden können, um die Heilung von Wunden zu modulieren.

**[0016]** Gemäss einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Anwendung einer Verbindung bereitgestellt, die östrogene Wirkung fördert, wobei die Verbindung ein Östrogen oder ein Östrogenrezeptor ist, ausgewählt aus Ethinylöstradiol, Dienoöstrol, Mestranol, Östradiol, Östriol, konjugierten Östrogenen, Piperazinöstronsulfat, Stilboöstrol, Fosfesteroltetranatrium, Polyöstradiolphosphat, Tibolon oder einem Phytoestrogen, bei der Herstellung eines Arzneimittels zur Beschleunigung der Heilung von Hautwunden, resultierend aus einer Verletzung der Haut.

**[0017]** Der Erfindung sind unsere Untersuchungen zugrunde gelegt worden, welche gezeigt haben, daß die Geschwindigkeit der Wundheilung in Form von Reepithelisierung, Ablagerung von extrazellulärer Matrix und Basalmembran mit dem Alter des Patienten abnimmt. Wir bemerkten auch, daß alte Frauen schneller heilen als alte Männer. Bei Frauen war dies mit einer vergrößerten Anzahl von Wundfibroblasten, Niveaus des transformierenden Wachstumsfaktors  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) und vergrößerter proteolytischer Aktivität, verglichen mit alten Männern, aber verringerter, verglichen mit jungen Männern und Frauen, verbunden. Es wurde ebenfalls bemerkt, daß es bei jungen Männern weniger Narbenbildung, verglichen mit der, gesehen bei jungen Frauen, gibt, was wir mit Unterschieden zwischen TGF- $\beta 1$ -Niveaus, beobachtet bei den beiden Geschlechtern, verbinden. Ein weiterer Unterschied zwischen den Geschlechtern war, daß die Heilung von Wunden bei Frauen im allgemeinen mit höheren Niveaus von Elastin und Angiogenese als bei Männern verbunden ist.

**[0018]** Diese Ergebnisse führten uns zu der Erkenntnis, daß Verbindungen gemäß der Erfindung einen Einfluß auf die Geschwindigkeit und Qualität (Ausmaß von Narbenbildung oder Fibrose) der Wundheilung haben und auch die Ablagerung von Fasergewebe bei fibrotischen Störungen beeinflussen. Diese Hypothese wurde untersucht und bestätigt, indem die Auswirkung der Hormone Replacement Therapy (Hormonersatztherapie) (HRT) auf die Geschwindigkeit und Qualität der Wundheilung bei Frauen nach der Menopause bewertet wurde. Frauen, die HRT aus Östrogen allein oder Östrogen und Progesteron nehmen, hatten bedeutend vergrößerte Geschwindigkeiten der Heilung von Hautwunden (in Form von Reepithelisierung und Ablagerung extrazellulärer Matrix), verglichen mit altersentsprechenden Frauen ohne Medikation. Die proteolytische Aktivität sowohl in normaler (unverletzter) Haut als auch in den Wunden der Frauen nach der Menopause auf HRT war gegenüber der einer Altersgruppe von 20-30-jährigen Frauen verringert. Diese Wirkungen waren auch mit der Umkehrung von mit dem Alter verbundenen Veränderungen bei dem transformierenden Wachstumsfaktor  $\beta 1$  oder den Interleukin-1-Profilen in normaler Haut verbunden.

**[0019]** Obwohl die Erfinder nicht wünschen, durch irgendeine Hypothese eingezwängt zu sein, nehmen sie an, daß es möglich ist, daß der Mechanismus, durch den die Verbindungen ihre Wundheilungswirkung ausüben, durch Modulieren der Aktivität der Moleküle geschieht, welche die Wundheilung regulieren, wie beispielsweise die Cytokine (z. B. TGF- $\beta 1$ , der Plättchen-abgeleitete Wachstumsfaktor oder Interleukin 1), und dadurch die zelluläre Funktion (zum Beispiel die Funktion von Fibroblasten) beeinflussen. Zum Beispiel haben unsere in-vitro-Untersuchungen festgestellt, daß Östrogen die Fibroblast-TGF- $\beta$ -Produktion vergrößert, was mit der Wirkung der Östrogene verbunden sein kann, eine Zunahme in der Geschwindigkeit der Wundheilung zu bewirken. Andere Verbindungen, welche das Geschlechtshormonsystem beeinflussen, modulieren die Fibro-

blastaktivität ebenfalls. Zum Beispiel hemmt Progesteron die Proliferation alter Fibroblasten, wohingegen Androgene ähnliche Wirkungen wie diejenigen der Östrogene haben.

**[0020]** Wir haben gefunden, daß Verbindungen gemäß der Erfindung auch Enzymprofile in einer Wunde oder einem Gewebe, befallen von einer fibrotischen Störung, modulieren. Insbesondere haben wir gefunden, daß die Enzymniveaus von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) (speziell MMP2 und MMP9) ebenso wie anderen lytischen Enzymen wie beispielsweise Elastasen durch Verbindungen wie beispielsweise Östrogen moduliert werden. Wir nehmen an, daß diese Modulierung ausreichend ist, um die Geschwindigkeit der Wundheilung zu beeinflussen oder Fibrose zu modulieren (und dadurch Narbenbildung oder fibrotische Störungen zu beeinflussen), und es ist möglich, daß diese Wirkungen einen komplementären, zusätzlichen oder sogar alternativen Mechanismus (zu dem im vorhergehenden Abschnitt diskutierten) darstellen, durch welchen die Verbindungen imstande sind, Wunden oder fibrotische Störungen zu behandeln.

**[0021]** Verbindungen, die imstande sind, die östrogene Wirkung zu fördern schließen Hormone (oder biologisch aktive Derivate davon) sowie Agonisten ein.

**[0022]** Wir haben festgestellt, daß Verbindungen, welche östrogene Wirkung fördern, imstande sind, die Geschwindigkeit zu beschleunigen, mit welcher eine Wunde heilt, obwohl dies auf Kosten der Schaffung verstärkter Narbenbildung oder Fibrose geschehen kann. Derartige Verbindungen sind offensichtlich besonders nützlich, wo die Geschwindigkeit der Wundheilung eine Priorität ist und die Qualität einer Narbe eine sekundäre Überlegung ist. So werden derartige Verbindungen für akute Wunden (wie beispielsweise durchbohrende Verletzungen oder sogar Wunden, resultierend aus elektiver chirurgischer Behandlung) und chronische Wunden (wie beispielsweise diabetisches, venöses und Dekubitusgeschwür) verwendbar sein. Derartige Wunden können ernsthaft die Qualität des Lebens beeinflussen oder sogar zum Tod führen, und daher mag die Geschwindigkeit der Heilung vergrößert werden müssen, so viel wie klinisch möglich ist.

**[0023]** Die Verbindungen, die gemäß der ersten Ausführungsform der Erfindung am meisten wirksam sind, sind im allgemeinen diejenigen, die östrogene Wirkung an der Stelle der Wunde fördern. Es ist diese Förderung, die die Wundheilung beschleunigt.

**[0024]** Zu Beispielen von Verbindungen, welche verwendet werden können, um die östrogene Wirkung zu fördern, gehören Östrogene, Östrogenrezeptor-Agonisten (wie beispielsweise Ethinylöstradiol, Dienoöstron, Mestranol, Östradiol, Östriol, konjugierte Östrogene, Piperazinöstronsulfat, Stilboöstron, Fosfesteroltetranatrium, Polyestradiolphosphat, Tibolon), oder Phytoöstrogene.

**[0025]** Die bevorzugte Verbindung zur Verwendung gemäß der Erfindung ist ein Östrogenhormonrezeptor-Agonist. 17- $\beta$ -Östradiol wird besonders bevorzugt.

**[0026]** Bevorzugte Behandlungsregimes, die durch die vorliegende Erfindung erwogen werden, sind nichtsystemische Behandlungen, da systemische Anwendung der Verbindungen unerwünschte Wirkungen, wie beispielsweise die Beeinflussung sekundärer Geschlechtsmerkmale, haben kann, wohingegen nichtsystemische Verabreichung (z. B. topische Anwendung auf die Haut) nur eine lokale Wirkung hat und daher keine derartigen unerwünschten Wirkungen hat. Jedoch gibt es Fälle (zum Beispiel ernste Verletzung oder wenn akute Therapie erforderlich ist), wo systemische Anwendungen nützlich sind.

**[0027]** Die Zusammensetzungen der Erfindung können eine Anzahl verschiedener Formen annehmen, abhängig insbesondere von der Art und Weise, in welcher die Zusammensetzung verwendet werden soll. So kann zum Beispiel die Zusammensetzung in der Form einer Flüssigkeit, einer Salbe, einer Creme, eines Gels, eines Hydrogels, eines Pulvers oder eines Aerosols sein. Es wird erkannt, daß das Vehikel der Zusammensetzung der Erfindung eines sein sollte, welches von dem Patienten gut vertragen wird und Freisetzung des Wirkstoffs in die Wunde erlaubt. Ein derartiges Vehikel ist vorzugsweise biologisch abbaubar, biologisch spaltbar und/oder nichtentzündlich.

**[0028]** Wenn die Verbindung ein Steroid ist (wie beispielsweise ein Östrogen), kann das Vehikel ein Trägermolekül enthalten, welches die Wasserlöslichkeit der Verbindung verbessert. Ein geeigneter Träger ist 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, welches vorzugsweise in der Zusammensetzung in ungefähr äquimolaren Konzentrationen zu der des Steroids vorhanden ist.

**[0029]** Die Zusammensetzung der Erfindung kann auf einer Anzahl von Wegen verwendet werden. So kann zum Beispiel eine Zusammensetzung gemäß der Erfindung in und/oder um die Wunde eines Patienten herum

aufgebracht werden, um die gewünschte Regulierung der Wundheilung bereitzustellen.

**[0030]** Wenn die Zusammensetzung direkt auf eine tatsächliche Wunde, ein Trauma oder eine Verletzung aufgebracht werden soll, dann ist das pharmazeutisch verträgliche Vehikel eines, welches nicht eine entzündliche Reaktion bewirkt oder für das Gewebe toxisch ist.

**[0031]** Es ist jedoch auch möglich, Zusammensetzungen gemäß der Erfindung als Prophylaktikum zu verwenden. Zum Beispiel kann es vor chirurgischer Behandlung (besonders elektiver chirurgischer Behandlung) wünschenswert sein, eine Verbindung bereitzustellen, welche zur Regulierung der Heilung der nachfolgend erzeugten chirurgischen Wunde das Geschlechtshormonsystem beeinflusst, um die Geschwindigkeit der Wundheilung zu vergrößern. In diesem Fall muß das Vehikel der Zusammensetzung eines sein, das imstande ist, die Verbindung an die Zielstelle zu liefern. Zum Beispiel kann das Vehikel zum Tragen der Verbindung durch die Keratinschicht der Haut geeignet sein müssen. Zu Beispielen geeigneter Vehikel für diesen Zweck gehören Dimethylsulfoxid und Essigsäure.

**[0032]** Die Zusammensetzung kann auf einem sterilen Verband oder Pflaster bereitgestellt werden, welche verwendet werden können, um eine zu behandelnde Wunde zu bedecken oder sogar zu verpacken. In dieser Hinsicht können herkömmliche Pflaster zur Hormonaustauschtherapie geeignet zur Behandlung von Wunden und/oder fibrotischen Störungen verwendet werden.

**[0033]** Es wird erkannt, daß die Menge der Verbindung, die in eine Zusammensetzung gemäß der Erfindung eingebracht werden soll, und/oder die Menge der Verbindung, die auf die Wundstelle aufgebracht werden soll, von einer Anzahl von Faktoren wie beispielsweise der biologischen Wirkung und der Bioverfügbarkeit der Verbindung abhängt, welche dann wieder von der Art der Verabreichung und den physikochemischen Eigenschaften der Verbindung abhängt. Zu anderen Faktoren gehören:

- A) Die Halbwertszeit der Verbindung in der Versuchsperson, die behandelt wird
- B) Das spezifische Leiden, das behandelt werden soll
- C) Ob schnelle Heilung oder verminderte Narbenbildung gewünscht wird
- D) Das Alter der Versuchsperson
- E) Das Geschlecht der Versuchsperson.

**[0034]** Die Häufigkeit der Verabreichung wird ebenfalls durch die vorstehend erwähnten Faktoren und besonders die Halbwertszeit der Verbindung innerhalb der Versuchsperson, die behandelt wird, beeinflusst.

**[0035]** Im allgemeinen sollte, wenn die Zusammensetzungen verwendet werden, um existierende Wunden zu behandeln, die Verbindung verabreicht werden, sobald wie die Wunde geschehen ist. Die Therapie mit der Zusammensetzung sollte andauern, bis die Wunde zur Zufriedenheit eines klinischen Arztes geheilt ist.

**[0036]** Zusammensetzungen, die die Geschwindigkeit der Wundheilung fördern, sollten auf eine Wunde so bald wie möglich, nachdem die Wunde erzeugt worden ist, aufgebracht werden. Für akute Wunden und Wunden von Versuchspersonen, die heilungskompetent sind (z. B. die Jungen), wird die Anwendung der Zusammensetzung idealerweise zu der Zeit der Verwundung, vorzugsweise innerhalb von Stunden der Verwundung und nicht länger als einige Tage nach der Verwundung, sein. Für chronische Wunden oder Wunden, die in der Heilung beeinträchtigt sind (z. B. der Alten), sollte die Verabreichung so bald als möglich sein.

**[0037]** Wenn als Prophylaktikum verwendet (z. B. vor chirurgischer Behandlung), sollten die Zusammensetzungen verabreicht werden, so bald wie das Risiko oder eine Möglichkeit für eine schlechte Geschwindigkeit der Wundheilung erkannt worden ist (wie es bei älteren Versuchspersonen der Fall sein mag). Zum Beispiel kann eine 17- $\beta$ -Östradiol enthaltende Creme oder Salbe auf eine Stelle auf der Haut des Patienten angewendet werden, wo elektive chirurgische Behandlung durchgeführt werden soll und nachfolgend eine erhöhte Geschwindigkeit der Wundheilung gewünscht wird. In diesem Fall kann die Zusammensetzung während der präoperativen Vorbereitung der Versuchsperson angewendet werden oder es kann sogar wünschenswert sein, die Zusammensetzung in den Stunden oder Tagen anzuwenden, die der chirurgischen Behandlung vorausgehen (abhängig von dem Gesundheitsstatus und dem Alter der Versuchsperson ebenso wie der Größe der zu erzeugenden Wunde).

**[0038]** Die Häufigkeit der Verabreichung wird von der biologischen Halbwertszeit der verwendeten Verbindung abhängen. Typischerweise sollte eine eine Verbindung enthaltende Creme oder Salbe derart an ein Zielgewebe verabreicht werden, daß die Konzentration der Verbindung an der Wundstelle oder dem von einer fibrotischen Störung befallenen Gewebe bei einem Niveau, geeignet, um eine therapeutische Wirkung zu ha-

ben, gehalten wird. Dies kann Verabreichung täglich oder sogar mehrere Male täglich erfordern. In dem Fall der Verwendung von 17- $\beta$ -Östradiol für Wundheilung haben wir gefunden, daß Verabreichung der Verbindung (durch ein Pflaster, aufgebracht auf die Wunde) für 24 Stunden nach der Verwundung ausreichend ist, um die Geschwindigkeit zu verbessern, mit welcher die Wunde heilt.

**[0039]** Bekannte Verfahrensweisen wie beispielsweise diejenigen, die herkömmlicherweise durch die pharmazeutische Industrie (z. B. beim in-vivo-Experimentieren, bei klinischen Versuchen usw.) angewendet werden, können verwendet werden, um spezifische Formulierungen von Zusammensetzungen und genaue therapeutische Regimes (wie beispielsweise tägliche Dosen der Verbindungen und die Häufigkeit der Verabreichung) festzusetzen.

**[0040]** Im allgemeinen enthalten Zusammensetzungen gemäß der Erfindung 0,001 Gew.-% bis 4 Gew.-% der Verbindung, welche das Geschlechtshormonsystem beeinflusst. Nur um ein Beispiel zu geben, ist eine Zusammensetzung, enthaltend zwischen 0,005 Gew.-% und 1 Gew.-% von Östriol, Östradiol oder Ethinylöstradiol, für die Aufbringung auf eine existierende (d. h. „offene“) Wunde geeignet.

**[0041]** Um ein weiteres Beispiel zu geben, kann eine Zusammensetzung, welche präoperativ als Prophylaktikum verwendet werden soll, zwischen 0,01 Gew.-% und 2 Gew.-% Östriol, Östradiol oder Ethinylöstradiol enthalten, um die gewünschte Wirkung auf die Wundheilung zu haben.

**[0042]** Eine bevorzugte Zusammensetzung zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung umfaßt maximal 1% (z. B. zwischen 0,005% und 1%) 17- $\beta$ -Östradiol.

**[0043]** Eine geeignete tägliche Dosis einer Verbindung hängt von den vorstehend diskutierten Faktoren ebenso wie der Größe der zu behandelnden Wunde ab. Typischerweise wird die Menge einer Verbindung, erforderlich für die Behandlung von Wunden oder fibrotischen Störungen, innerhalb des Bereiches von 1 ng bis 100 g der wirksamen Verbindung/24 Stunden sein, abhängig unter verschiedenen anderen Faktoren von der Größe der Wunde oder dem Ausmaß von Fibrose. Um ein Beispiel zu geben, sind 0,5–500  $\mu$ g/24 h von 17- $\beta$ -Östradiol eine geeignete Dosis zur Behandlung einer durch eine 4-mm-Stanzbiopsie der Haut erzeugten Wunde (um die Geschwindigkeit der Heilung zu vergrößern), stärker bevorzugt werden 10–100  $\mu$ g/24 h von 17- $\beta$ -Östradiol verwendet und am meisten bevorzugt werden 25  $\mu$ g/24 h von 17- $\beta$ -Östradiol verwendet.

**[0044]** Wenn auch die vorstehenden Überlegungen hauptsächlich auf Wunden des Menschen gerichtet sind, wird erkannt, daß Wundheilung bei anderen Lebewesen (insbesondere Haustiere wie beispielsweise Pferde, Hunde, Katzen usw.) ebenfalls problematisch sein kann. Die vorstehend diskutierten Verbindungen, Zusammensetzungen und Zuführungssysteme sind zur Verwendung bei der Heilung derartiger Lebewesen geeignet.

**[0045]** Die vorliegende Erfindung wird jetzt mit Bezugnahme auf die folgenden nichtbegrenzenden Beispiele und begleitenden Zeichnungen weiter beschrieben, bei welchen:

**[0046]** [Fig. 1](#) photographische Aufnahmen gefärbter histologischer Schnitte von Wunden von Ratten in Beispiel 1 darstellt;

**[0047]** [Fig. 2](#) eine graphische Darstellung ist, die die Geschwindigkeit der Reepithelisierung am Tag 7 nach der Verwundung bei den Versuchspersonen von Beispiel 2 darstellt;

**[0048]** [Fig. 3](#) photographische Aufnahmen histologischer Schnitte von Wunden, gefärbt mit H&E, für Versuchspersonen von Beispiel 2 darstellt;

**[0049]** [Fig. 4](#) Immunfärbung für Wundproben in Beispiel 2 darstellt;

**[0050]** [Fig. 5](#) TGF- $\beta$ 1-mRNA-Niveaus am Tag 7 nach der Verwundung bei den Versuchspersonen von Beispiel 2 darstellt;

**[0051]** [Fig. 6](#) eine graphische Darstellung ist, die die Wirkung von Östrogen auf humane Fibroblastproliferation bei Fibroblast, erhalten von den Versuchspersonen von Beispiel 2, darstellt; und

**[0052]** [Fig. 7](#) eine graphische Darstellung ist, die die Wirkung von Östrogen und Progesteron auf die Narbenbildung, ausgewertet mikroskopisch in Beispiel 3, darstellt; und

**[0053]** [Fig. 8](#) eine graphische Darstellung ist, die die Wirkung von Östrogen und Progesteron auf die Narbenbildung, ausgewertet makroskopisch in Beispiel 3, darstellt.

## BEISPIEL 1

**[0054]** Experimente wurden über die Auswirkung der Ovariectomie (und so die Entfernung von Östrogenen) auf die Wundheilung durchgeführt.

### 1.1 METHODEN

#### 1.1.1 Vorbereitung von Ratten

**[0055]** Weibliche Sprague-Dawley-Ratten wurden in drei Gruppen (1A, 1B und 1C) von neun zusammen untergebracht, um synchronisierten Östrogenzyklusstand zu erlauben. Gruppe 1A wurde 18 Tage vor der Verwundung ovariectomiert (OVX), um zu erlauben, daß zirkulierende Geschlechtshormonniveaus eliminiert werden. Gruppe 1B (Kontrolle) war unbehandelt und Gruppe 1C hatte die gleiche operative Prozedur wie die OVX (Gruppe 1A), aber ohne die Entfernung der Ovarien, um sicherzustellen, daß die operative OVX-Prozedur keine Wirkung auf die Untersuchungen der Verwundung hatte (Blindversuch).

#### 1.1.2 Behandlungen

**[0056]** 17- $\beta$ -Östradiol (Sigma) wurde als sterile 0,1%ige und 1%ige Lösung in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS), enthaltend 0,1% bzw. 1% 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin, zubereitet. 2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin wird in den Zubereitungen als Trägermolekül verwendet, um die Wasserlöslichkeit von  $\beta$ -Östradiol zu vergrößern. PBS/Cyclodextrin wurde als Kontrolle des Vehikels verwendet.

**[0057]** Tieren aus den Gruppen 1A, 1B und 1C wurden 4 × 1 cm lange Inzisionswunden mit voller Dicke bei 4,5–5,5 cm und 7,5–8,5 cm unterhalb der Schädelbasis, 1 cm auf jeder Seite der Mittellinie, gegeben. Eine einzelne intradermale 100- $\mu$ l-Injektion wurde dann an jeder von den vier Wundstellen gegeben. Jede von den Wunden (eine Gesamtmenge von 36 Wunden an 9 Ratten in jeder Gruppe) erhielt entweder 100  $\mu$ l Östradiol (0,1% oder 1%), 100  $\mu$ l der Vehikelkontrolle (0,1% oder 1% Cyclodextrin) oder wurde unmanipuliert gelassen (keine Injektion).

#### 1.1.3 Tests am Tag 7 nach der Verwundung

**[0058]** Die Wunden wurden für 7 Tage heilen gelassen, wonach das verwundete Gewebe für histologische Analyse exzidiert wurde.

**[0059]** Paraffin-eingebettete 7- $\mu$ m-Schnitte wurden mit H&E und Masson-Trichrome gefärbt. Die Geschwindigkeit der Reepithelisierung (am Tag 7 nach der Verwundung) und die Wundgrößen, wie durch Planimetrie bestimmt, wurden mit Bildanalyse unter Verwendung einer Kamera Olympus Vanox und eines PC-Bilderfassungssystems bestimmt. Die Kollagenmenge innerhalb der Wunde wurde durch zwei Beobachter, blind gemacht für die Identität des Probestücks, bestimmt.

### 1.2 ERGEBNISSE (7 Tage nach der Verwundung)

**[0060]** Die Wunden der unmanipulierten Blindprobengruppe (Gruppe 1C) und der Kontrollgruppe (Gruppe 1B) hatten reepithelisiert, waren zellulär und hatten neues Kollagen abgelegt. Wunden der unmanipulierten ovariectomierten Gruppe (OVX; Gruppe 1A) zeigten verzögerte Reepithelisierung, waren sehr weit und zellulär im Vergleich zu den Wunden der Blind-/Kontrollgruppe (1B und 1C) und hatten sehr wenig neues Kollagen abgelegt. Dies zeigte, daß OVX eine Verzögerung in der Geschwindigkeit der Wundheilung in 7 Tagen nach der Verwundung bewirkt (siehe Tabelle 1).

**[0061]** Cyclodextrin (Vehikelkontrollen) hatte in der höchsten Dosis von 1% eine nachteilige Wirkung auf die Wunden. In allen drei Gruppen waren die Wunden weit und zellulär mit wenig neuem Kollagen. Diese Auswirkungen waren mit 0,1% Cyclodextrin nicht merkbar, wo die Wunden ähnlich den Kontroll-PBS-Wunden waren, welche weniger Zellen hatten und etwas neues Kollagen abgelegt hatten.

**[0062]** Alle mit 1%  $\beta$ -Östradiol behandelten Wunden hatten reepithelisiert und neues Kollagen abgelegt. Wunden der OVX-Gruppe waren enger als die Wunden der Kontroll-/Blindgruppe, was anzeigt, daß sie eine erhöh-

te Geschwindigkeit der Wundheilung, verglichen mit PBS-behandelten und unmanipulierten Wunden der Kontrolle, hatten. Sie alle hatten eine Menge neues Kollagen, sehr wenige entzündliche Zellen und waren sehr eng. In den mit 0,1%  $\beta$ -Östradiol behandelten OVX-Wunden war eine einzige Anwendung von 0,1%  $\beta$ -Östradiol imstande, die nachteiligen Wirkungen von dem Cyclodextrin-Vehikel und OVX zu überwinden, wobei beschleunigte Wundheilung, verglichen mit Kontrollwunden, gezeigt wurde. Diese Ergebnisse korrelieren mit Werten menschlicher Wunden, welche eine Beschleunigung der Wundheilung zu frühen Zeitpunkten zeigen, wenn Frauen nach der Menopause Östrogen- und Progesteron-HRT nehmen.

**[0063]** Es gab Unterschiede zwischen den zwei Dosen von  $\beta$ -Östradiol, wobei die 0,1%  $\beta$ -Östradiol bessere Ergebnisse zeigten als die 1%  $\beta$ -Östradiol. Dies kann als Ergebnis der nachteiligen Wirkungen des Cyclodextrin-Vehikels geschehen, da es mit 1% in der 1%igen  $\beta$ -Östradiol-Lösung und mit 0,1% in der 0,1%igen  $\beta$ -Östradiol-Lösung vorhanden ist.

**[0064]** Diese Ergebnisse zeigen an, daß eine optimale Dosis von  $\beta$ -Östradiol weniger als 1% ist (besonders wenn Cyclodextrin als Träger verwendet wird), und die Verwendung eines unterschiedlichen Vehikels, unterschiedlicher Dosen und unterschiedlicher Zeiten der Verabreichung kann zu einer noch größeren Beschleunigung der Wundheilung führen.

**[0065]** In [Fig. 1](#) wurden die Schnitte mit Mallory-Trichrome gefärbt a = Wunde am Tag 7 bei einer intakten weiblichen Ratte (1B); b = Wunde am Tag 7 bei einer OVX-Ratte (1A) (man beachte verzögerte Reepithelisierung und verringerte Kollagenablagerung und eine signifikante Zunahme in der Wundbreite); c = Wunde am Tag 7 von einem intakten Weibchen, behandelt mit 5 mm Östrogen; d = Wunde am Tag 7 bei einer OVX-Ratte (man beachte verbesserte Wundheilung bei c und d mit großen Mengen von reifem Kollagen innerhalb einer engen Wunde und vollständige Reepithelisierung). Skalenstrich = 100  $\mu$ m.

TABELLE 1

Behandlung	Gruppe	Epithelisierung	Wundbreite	Neues Kollagen	Zellen
unmanipuliert	OVX	verzögert	sehr breit	+	+++
	Blindprobe	Y	durchschnittlich	++	++
1% Cyclodextrin (Vehikel)	OVX	verzögert	breit	++	+++
	Blindprobe	Y	breit	+	+++
0,1% Cyclodextrin (Vehikel)	OVX	Y	durchschnittlich	++	+
	Blindprobe	Y	durchschnittlich	++	++
1% Östradiol (mit 1% Cyclodextrin Vehikel)	OVX	Y	eng	+++	++
	Blindprobe	Y	breit	++	++
0,1% Östradiol (mit 0,1% Cyclodextrin Vehikel)	OVX	Y	eng	++++	+
	Blindprobe	Y	eng	+++	++

(Y = epithelisiert, + = wenige/einige, ++++ = Mengen)

BEISPIEL 2

**[0066]** Die Auswirkung der Hormonersatztherapie (d. h. Östrogenzusatz) auf die Wundheilung bei Frauen nach der Menopause wurde untersucht, um zu demonstrieren, wie Verbindungen, die östrogene Wirkung fördern, imstande sind, die Wundheilung zu modulieren.



## 2.1 METHODEN

### 2.1.1 Patienten

**[0067]** Die Genehmigung für diese Untersuchung wurde durch das lokale Ethik-Komitee gegeben. Zwanzig Frauen mit definiertem Gesundheitsstatus nach der Menopause im Alter von 55 bis 65 Jahren wurden in zwei Gruppen aufgeteilt:

- (i) Gruppe 2A umfaßte zehn Versuchspersonen, welche keine Medikation ausgenommen Hormone Replacement Therapy (Hormonersatztherapie) (HRT) nahmen (mittleres Alter 55,9 Jahre, SD 2,92; Östrogen-Pflaster und orale Progesteron-Kombination für mehr als 3 Monate).
- (ii) Gruppe 2B umfaßte zehn Versuchspersonen, welche keine Medikation nahmen und niemals HRT genommen hatten (alte Gruppe: mittleres Alter 59,5 Jahre, SD 4,28).

**[0068]** Außerdem bildeten zehn junge Frauen mit definiertem Gesundheitsstatus im Alter von 20–39 Jahren (Gruppe 2C; mittleres Alter 29,8 Jahre, SD 5,03), die keine Medikation (einschließlich der oralen kontrazeptiven Pille) nahmen, eine dritte Gruppe für die Untersuchung.

**[0069]** Alle Versuchspersonen hatten normale Anamnesen und Untersuchungen. CXR, ECG, hämatologische, Lipid- und biochemische Profile. Die Versuchspersonen waren alle Nichtraucher, mit normalen Ernährungsgeschichten und Body-Mass-Indizes.

### 2.1.2 Biopsien

**[0070]** Nach eingeholter Zustimmung unterzogen sich Versuchspersonen aus jeder der Gruppen 2A, 2B und 2C nach lokaler Infiltration mit 1 ml 1%igem Lignocain zwei 4-mm-Stanzbiopsien aus dem inneren Oberarm (eine nicht der Sonne ausgesetzte Stelle). Jede Biopsie aus normaler Haut wurde halbiert und eine Hälfte in Optimal-Cutting-Temperature (optimale Schnitt-Temperatur)-Verbindung (Miles Inc. Elkhart, IN) eingebettet, über flüssigem Stickstoff gefroren und bei –70°C aufbewahrt und eine Hälfte in flüssigem Stickstoff schnellgefroren und bei –70°C aufbewahrt.

**[0071]** Die Wunden wurden 24 Stunden lang mit einem trockenen Multisorb-Mullverband (Smith & Nephew, UK) bedeckt und dann unbedeckt gelassen.

### 2.1.3 Rebiopsie

**[0072]** Fünf Versuchspersonen aus den Gruppen 2A, 2B und 2C unterzogen sich einer Reexzision der Wunden am Tag 7 nach der Verwundung und die anderen fünf Versuchspersonen am Tag 84 nach der Verwundung.

**[0073]** Der linke innere Oberarm wurde mit Isopropylalkohol gereinigt, nach Infiltration von 1%igem Lignocain wurden elliptische Exzisionen der Wunden gemacht, und zwei Nähte wurden verwendet, um den Spalt zu schließen. Jede Wunde wurde halbiert und wie vorstehend beschrieben (2.1.2) bearbeitet.

### 2.1.4 Untersuchung der Biopsien

**[0074]** Einige Biopsien wurden für molekulare Analyse verwendet. Mikrodissektion dieser Wunden wurde unternommen, um sicherzustellen, daß es keine Kontamination von normaler Haut gab.

#### 2.1.4.1 Immunfärbung

**[0075]** 7-µm-Kryoschnitte wurden hergestellt und unter Verwendung eines TGF-β1-Antikörpers (BDA19; R&D Systems, Oxfordshire) immungefärbt, um auf die Anwesenheit von TGF-β1 in der Wunde zu testen.

#### 2.1.4.2 Bildanalyse und Narbenbewertung von Wunden

**[0076]** Die Geschwindigkeit der Reepithelisierung (nur am Tag 7 nach der Verwundung) wurde mit Bildanalyse unter Verwendung eines Joyce-Loebel-Mini-magiscan bestimmt. Das makroskopische Aussehen der mit Masson-Trichrome gefärbten heilenden menschlichen Wunden wurde unter Verwendung des folgenden Systems punktmäßig bewertet:

- a) Farbe (verglichen mit der umgebenden Haut) 1 = Perfekt; 2 = Kleinere Ungleichheit; 3 = Offensichtliche Ungleichheit; 4 = Grobe Ungleichheit.

b) Kontur 1 = Normal; 2 = Tastbar; 3 = Hypertroph; 4 = Keloid.

c) Textur 1 = Gleich wie normale Haut; 2 = Überstehend/eingedrückt; 3 = Fest; 4 = Hart.

**[0077]** Das mikroskopische Aussehen der heilenden Wunden wurde unter Verwendung des folgenden Punktbewertungssystems punktmäßig bewertet:

a) Kollagenorientierung (gesonderte Bewertungen für obere-papilläre und tiefe-retikuläre dermale Niveaus der Wunde): 1 = Normales Korbgeflecht; 2 = Korbgeflecht > Parallele Fasern; 3 = Parallele > Fasern als Korbgeflecht; 4 = Parallele Fasern.

b) Faserstrangdichte (gesonderte Bewertungen für die obere-papilläre und tiefe-retikuläre Wunde): 1 = Alle Faserstränge normal; 2 = > 50% Faserstränge normal; 3 = < 50% Faserstränge normal; 4 = Alle Faserstränge abnormal (vergrößerte oder verminderte Dichte).

c) NetZRückenbildung: 1 = Normales Aussehen; 2 = Verringerte Zahlen; 3 = Keine.

#### 2.1.5 Fibroblasten-Experimente in vitro

**[0078]** Fibroblasten wurden aus den Proben der ersten Biopsie der Gruppen 2A, 2B und 2C extrahiert und kultiviert, um die TGF- $\beta$ -Expression aus den Zellen zu messen.

##### 2.1.5.1 Zellkultur

**[0079]** Humane dermale Fibroblasten wurden aus den 4-mm-Stanzbiopsie-Prüfstücken von normaler Haut explantiert. Fibroblasten, die in der Untersuchung verwendet wurden, wurden bei 37°C in 95% Luft: 5% CO<sub>2</sub> bei 100% relativer Feuchtigkeit, in Phenolrot-freiem DMEM (Gibco), 100 Einheiten/ml Penicillin, 100 mg/ml Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat, 2 mM L-Glutamin, nichtessentielle Aminosäuren kultiviert und über Aktivkohle mit 10% FCS (Gibco, UK) gestrippt (um endogene Steroide zu entfernen).

##### 2.1.5.2 Behandlung von Fibroblasten

**[0080]** Kultivierte Zellen mit Passage 3–5 wurden über Nacht in Platten mit 24 Vertiefungen mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung in serumfreie Medien eingepflegt. Am folgenden Morgen wurden Östrogen oder Progesteron (löslich gemacht durch die Einbringung des Trägers Cyclodextrin; Sigma, Poole), mit Dosen im Bereich von 1 pM bis 1 mM, für 24 h zu dem Medium hinzugegeben. Alle Proben wurden dreifach bewertet. Das Medium wurde nach den 24 h Inkubation entfernt. 1 mg/ml von Aprotinin, Leupeptin und Pepstatin A wurde dann zu dem Medium hinzugegeben, welches sofort in einem TGF- $\beta$ -Assay (siehe nachstehend) verwendet wurde. Kontrollen schlossen Cyclodextrin in der passenden Konzentration und serumfreies Medium allein ein.

##### 2.1.5.3 Bewertung der Fibroblastproliferation

**[0081]** Die Zellen wurden dann mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin in serumfreien Medien (0,5  $\mu$ Ci/Vertiefung) inkubiert, um die Wirkung von Östrogen oder Progesteron auf die Fibroblastproliferation zu bewerten. Nach 24 h wurde die Thymidinlösung abgesaugt und durch 10% TCA für 4 h bei 4°C ersetzt. Das TCA wurde für 18 h durch 250  $\mu$ l 1M NaOH-Lösung ersetzt. Zwei 100- $\mu$ l-Aliquots aus jeder Vertiefung wurden in einem Szintillationszähler auf Radioaktivität vermessen. In parallelen Experimenten wurde die Wirkung von Hormonen/Kontrollen auf die Proteinsynthese durch die Zugabe von 20  $\mu$ g/ml Cycloheximid (um die Proteintranslation zu hemmen) für 15 min vor dem 24-h-Inkubationszeitraum untersucht. Progesteron wurde als Referenzverbindung verwendet.

##### 2.1.5.4 TGF- $\beta$ -Assay

**[0082]** TGF- $\beta$ -Niveaus in den Medien (2.1.5.2) wurden unter Verwendung eines Assays zur Hemmung des Nerzlungenwachstums bestimmt, wie von Danielpour et al. (J. Cell Physiol. 138p 79–86) beschrieben ist. Kurz gesagt wurden Nerzlungenepithelzellen (MLECs) in DMEM und 10% FCS bei 37°C in 10% CO<sub>2</sub> gehalten. Subkonfluente Zellen wurden trypsinisiert, in 10% FCS resuspendiert, mit 500 g für 5 min pelletisiert, mit 10 ml Assay-Puffer (DMEM, 2% FCS, 10 mM HEPES pH 7,4, Penicillin 25 Einheiten/ml, Streptomycin 25  $\mu$ g/ml) gewaschen, in Assay-Puffer resuspendiert und mit  $10^5$  Zellen/Vertiefung in eine Costar-Platte mit 24 Vertiefungen eingepflegt. Nach 1 h wurden konditionierte Medien oder Kontrollmedien (mit variierenden Konzentrationen von Hormonen im Bereich von 1 pM–1 mM oder Cyclodextrin allein) hinzugegeben. 22 h später wurden die Zellen mit [<sup>3</sup>H]-Thymidin (0,5  $\mu$ Ci/Vertiefung) für 2 h bei 37°C gepulst, und es folgte die vorstehend beschriebene Verfahrensweise für die Extraktion und Messung der Radioaktivität (2.1.5.3). Eine Standardkurve wurde unter Verwendung von 10–1000 pg/ml TGF- $\beta$ -Standard (R&D) erzeugt, aus welcher Inhibitionswerte in pg/ml umgewandelt werden konnten. Die Ergebnisse wurden als pg/ml TGF- $\beta$ /10<sup>5</sup> Zellen (relativ zu Kontrollwerten für jede in-

dividuelle Hormonkonzentration) dargestellt.

### 2.1.6 Quantitative RT-PCR

**[0083]** Quantitative RT-PCR wurde verwendet, um die Niveaus im stationären Zustand von TGF- $\beta$ 1-mRNA in der akuten Wunde und in  $10^5$  Zellen aus den Fibroblast-in-vitro-Untersuchungen (2.1.5) zu bestimmen. Zelluläre RNA wurde unter Verwendung der Methode von Chomczynski und Sacchi (Anal. Biochem. 162 p156–159 (1987)) aus Prüfstücken isoliert. Die Reinheit der Extraktion wurde unter Verwendung des  $A_{260/280}$ -Verhältnisses spektrophotometrisch bewertet, welche in allen Fällen über 1,75 war. Es wurde an keinem Zeitpunkt eine signifikante Differenz im gesamten RNA-Gehalt/ $\mu$ g Feuchtgewicht-Gewebe zwischen den Individuen beobachtet. Quantitative RT-PCR wurde durchgeführt, wie von Tarnuzzer et al. (Biotechniques 20 p670–674 (1996)) beschrieben ist. Kurz gesagt wurde die Reverse-Transkriptase-Reaktion unter Verwendung von 8 abnehmenden Verdünnungen der Matrize mit 1  $\mu$ g authentischer zellulärer RNA ausgeführt.  $\beta$ -Actin wurde als positive Kontrolle verwendet. PCR-Reaktionen wurden an der Reverse-Transkriptase-Reaktion ausgeführt. Elektrophorese wurde dann auf einem 25 ng/ml Ethidiumbromid enthaltenden 2%igen Agarose-Gel bei 100 V für 1 h unter Verwendung eines Electro-4-Tanks (Hybaid, Teddington, UK) ausgeführt und unter Verwendung eines Durchleuchtungsgeräts mit dualer Intensität (Genetic Research Instrumentation, Dunmow (UK)) mit einer Kamera Polaroid MP 4+ und dem Film 665 Polaroid Black and White photographiert. Photographische Bilder wurden unter Verwendung eines PC-Image-Software-Systems (Foster Finley, Newcastle, UK) auf einem Computer 486 DX2 Dan (Dan, UK) und einer CCD-Kamera (Swift, UK) erfasst. Die Bandenintensitäten wurden durch Bildanalyse unter Verwendung von einem Macintosh-Computer und NLH-Software-Programm bestimmt. Bandenintensitätswerte wurden basierend auf den Molekulargewichten der Produkte normalisiert. Der log des Verhältnisses von Bandenintensitäten innerhalb jeder Bahn wurde gegen den log der Kopienzahl der pro Reaktion hinzugegebenen Matrize aufgetragen. Die Mengen der Zielbotschaften wurden bestimmt, wo das Verhältnis von Matrizen- und Zielbandenintensitäten gleich 1 war. Die Kopienzahlen wurden pro Gesamt-RNA (für Wundgewebe) ausgedrückt oder pro Zelle (für in-vitro-Untersuchungen) ausgedrückt. Die letzteren wurden unter der Annahme von 26 pg RNA/Zelle berechnet.

### 2.1.7 Statistische Analyse

**[0084]** Alle Werte werden als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt. Alle Werte folgen einer normalen Verteilung. Differenzen zwischen den Mittelwerten wurden durch den unabhängigen Student-T-Test wo geeignet und durch Ein-Faktor und multiple ANOVA (Varianzanalyse), ergänzt durch den Tukey-HSD-Test, ausgewertet. Unter allen Umständen wurde  $p < 0,05$  als signifikant angesehen.

## 2.2 ERGEBNISSE

### 2.2.1 Die Auswirkungen von Alter und zirkulierenden Geschlechtssteroiden auf die Wiederherstellung von Wunden beim Menschen

#### 2.2.1.1 Geschwindigkeit der Heilung: Reepithelisierung und Kollagenablagerung

**[0085]** Intrinsische Alterung (Gruppe 2B) war mit einer Verzögerung in der Geschwindigkeit der Wundheilung in Form von Reepithelisierung am Tag 7 nach der Verwundung ([Fig. 2](#)) und verringerter Matrix-Kollagenablagerung an den Tagen 7 und 84 verbunden. Jedoch zeigte die HRT-Gruppe (2A) eine deutliche Beschleunigung der Geschwindigkeit der Reepithelisierung am Tag 7 ähnlich der in der jungen Gruppe (2C) beobachteten ([Fig. 2](#)). Darüber hinaus hatte die HRT-Gruppe, verglichen mit der alten Gruppe, deutlich erhöhte Niveaus der Kollagenablagerung (welche sich den Niveaus, beobachtet in der jungen Gruppe, 2C, näherte) an den Tagen 7 und 84.

**[0086]** [Fig. 3](#) stellt histologische Schnitte von Wunden, gefärbt mit H&E, für a = 28 Jahre alt (Gruppe 2C), b = 57 Jahre alt (Gruppe 2B) und c = 58 Jahre alt auf HRT (Gruppe 2A) dar. Die H&E-Färbung zeigt Kollagenablagerung (CO) in den Wunden der Gruppen 2A und 2C (c und a). In b (Gruppe 2B) ist das Granulationsgewebe (G) unreif mit abwesender Färbung für Kollagen. Die Reepithelisierung ist in a (2C) und c (2A) vollständig, wobei Neo-Epidermis (E) die Wunde vollständig bedeckte (Pfeile zeigen die Basalschicht der Epidermis an). In b zeigt der Pfeil zu der wandernden Neo-Epidermis, welche nur an der Wundkante vorhanden ist. C = Koagulum. Skalenstrich = 100  $\mu$ m.

## 2.2.1.2 Qualität der Heilung: Grad der mikroskopischen und makroskopischen Narbenbildung

**[0087]** Das makroskopische Aussehen von reifem Narbengewebe war bei den alten Versuchspersonen (Gruppen 2A und 2B) in Form von Farbe, Textur und Kontur, im Gegensatz zu hypertropher Narbenbildung bei den jungen Versuchspersonen (2C), signifikant überlegen (Punktbewertungen mit  $n = 5$  für jede Gruppe: junge (2C) Mittelwert = 10 SD = 1; alte (2B) Mittelwert = 4 SD = 2; HRT (2A) Mittelwert = 10 SD = 2;  $p < 0,001$ ). Die Narben der alten Gruppe (2B) waren durchweg blaß und flach, verglichen mit den pigmentierten evierten Läsionen in der jungen Gruppe (2C). Zunehmendes Alter war ebenfalls ein signifikanter Faktor bei der Bestimmung der Qualität von mikroskopischer Wiederherstellung mit Restauration der dermalen Architektur in den Wunden der alten Gruppe (Punktbewertungen jung (2C) Mittelwert = 13 SD = 2; alt (2B) Mittelwert = 9 SD = 2; HRT (2A) Mittelwert = 13 SD = 2;  $p < 0,01$ ). Bemerkenswerterweise hatten sich in den Wunden der alten Versuchspersonen Netzzücken regeneriert, große papilläre Blutgefäße wurden beobachtet und die Korbgeflechtsgewebeorganisation des Kollagens ähnelte der von normaler Dermis. In den Wunden der Jungen (2C) war die dermo-epidermale Verbindung flach, und dicht gepackte parallele Schichten von Kollagen waren überall in der Wunde vorhanden. HRT (2A) war mit ähnlichen ungünstigen Narbenbildungsprofilen, sowohl mikroskopisch als auch makroskopisch wie diejenigen von jungen Frauen, verbunden. Mikroskopisch war die dermo-epidermale Verbindung flach und die Dermis bestand aus parallelen Schichten von Narbengewebskollagen und Fibroblasten. Makroskopisch waren die Wunden ausnahmslos gehoben und pigmentiert.

2.2.1.3 TGF- $\beta$ 1-Immunfärbung und mRNA-Niveaus

**[0088]** TGF- $\beta$ 1-Niveaus der Wunde waren deutlich und übereinstimmend vermindert in der alten Gruppe (2B) am Tag 7 nach der Verwundung, verglichen mit sowohl der jungen Gruppe (2C) als auch der HRT-Gruppe (2A), wie in [Fig. 4](#) veranschaulicht ist, in welcher eine Färbung für TGF- $\beta$ 1 für a = 22 Jahre alt (Gruppe 2C), b = 60 Jahre alt (Gruppe 2B) und c = 61 Jahre alt auf HRT (Gruppe 2A) gezeigt ist.

**[0089]** Die quantitativen RT-PCR-Werte zeigten an, daß intrinsische Alterung bei Frauen von Gruppe 2B mit niedrigen Niveaus von stationärer mRNA für TGF- $\beta$ 1 mit einem Mittelwert von 87 Kopien/pg Gesamt-RNA (SD von 6) am Tag 7 nach der Verwundung und einem Mittelwert von 116 Kopien/pg Gesamt-RNA (SD von 9) am Tag 84 verbunden war, wohingegen für die junge Gruppe (2C) die mittlere Kopienzahl/pg Gesamt-RNA 5656 (SD von 74) am Tag 7, abnehmend auf 140 Kopien/pg (SD von 9) am Tag 84 war. Für die HRT-Gruppe (2A) waren die mittleren Niveaus 6216 Kopien/pg (SD von 97) am Tag 7, abnehmend auf 140 Kopien/pg Gesamt-RNA (SD von 9) am Tag 84.

**[0090]** Die Unterschiede zwischen den mRNA-Niveaus am Tag 7 zwischen den verschiedenen Gruppen sind in [Fig. 5](#) veranschaulicht. In [Fig. 5](#) werden die mRNA von a = 22 Jahre alt (Gruppe 2C), b = 60 Jahre alt (Gruppe 2B) und c = 61 Jahre alt auf HRT (Gruppe 2A) gezeigt. Unterschiede in mRNA zwischen der alten Gruppe (2B) und der jungen (2C) oder der HRT-Gruppe (2A) waren in hohem Maße signifikant ( $p = 0,0006$ ). So kehrt HRT die mit dem Alter zusammenhängende Abnahme in den lokalen stationären TGF- $\beta$ 1-mRNA-Niveaus, beobachtet während der frühen Wundheilung, um. Dies läßt darauf schließen, daß Verbindungen, welche das Geschlechtshormonsystem beeinflussen, das durch einen Mechanismus tun können, welcher Modulation der TGF- $\beta$ -Expression beinhaltet.

## 2.2.1.4 Die Auswirkung von HRT auf die Makrophagenzahlen

**[0091]** Immunfärbung für einen Monozyt/Makrophagen-Marker ließ erkennen, daß HRT (2A) mit einer Zunahme der Makrophagenzahlen in den Wunden vom Tag 7 mit einem Mittelwert von 39 Zellen/Feldfläche (SD von 6) verbunden war. Dies war ähnlich im Grad zu den Zahlen von Makrophagen, die in den Wunden von jungen Frauen (2C) beobachtet wurden: Mittelwert von 35 Zellen/Feldfläche (SD von 4). Die Wunden der alten Gruppe (2B) hatten signifikant verringerte Zahlen von Makrophagen, verglichen mit den anderen zwei Gruppen mit einem Mittelwert von 12 Zellen/Feldfläche (SD von 4) (Ein-Faktor ANOVA  $F(2,14) = 14,3$ ,  $p = 0,0007$ , Tukey-HSD-Bereich für 0,05-Niveau = 3,77). Die vergrößerte Makrophageninfiltration, die in den Wunden der HRT-Gruppe, verglichen mit der alten Gruppe, beobachtet wurde, kann bedeutende Konsequenzen für den Wundheilungsprozeß haben: zusätzlich zu ihrer Rolle in der Phagozytose erzeugen Makrophagen auch eine Vielfalt von Cytokinen, einschließlich TGF- $\beta$ , was bei der Stimulierung von Zellmigration, Proliferation und Matrixerzeugung wichtig ist.

2.2.3 Auswirkungen von Östrogen auf die humane dermale Fibroblastproliferation und TGF- $\beta$ 1-Produktion

**[0092]** Um die Auswirkungen von Verbindungen, welche das Geschlechtshormonsystem beeinflussen, auf

die Wundheilung weiter zu untersuchen, bestimmten wir die Auswirkungen von Östrogen und Progesteron gesondert auf Fibroblastproliferation und TGF- $\beta$ -Produktion, Progesteron wurde als Referenzverbindung verwendet. Die mittlere Basislinien-Fibroblastproliferation nach 24 h (nur die Medien) war zwischen den drei Gruppen nicht signifikant verschieden.

**[0093]** Östrogen hemmte mit Dosen im Bereich von 1 pM bis 1 mM die Proliferation von Fibroblasten von sowohl jungen als auch alten Versuchspersonen (verglichen mit Cyclodextrinkontrollen) ([Fig. 6](#)). Der Grad der Hemmung der Proliferation war für Fibroblasten von sowohl jungen als auch alten Frauen ähnlich.

**[0094]** Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde durch Hormonbehandlung nicht beeinflusst, wie durch den Trypanblau-Ausschlußtest bestimmt wurde. Präinkubation von Medien für 30 min mit einem neutralisierenden Antikörper zu TGF- $\beta$ 1 (10  $\mu$ g/1; R&D-Systeme) vor der Zugabe zu den Zellen kehrte die Hormonwirkung nicht um, was anzeigt, daß die Hemmung von Proliferation unabhängig von TGF- $\beta$ 1 erfolgte.

**[0095]** Unter Verwendung des Nerzlungenzell-Assays (2.1.5.2) zeigten konditionierte Medien aus Basislinien-Kontroll-Fibroblastkulturen von jungen weiblichen Versuchspersonen (Gruppe 2C), behandelt nur mit serumfreien Medien (ohne Hormone oder Cyclodextrinträger) signifikant größere Hemmung der Proliferation von Nerzlungenepithelzellen (MLEC), verglichen mit Fibroblasten bei alten Frauen (Gruppen 2A oder 2B) ( $p < 0,05$ ; Tabelle II). Präinkubation von Medien für 30 min mit einem neutralisierenden Antikörper zu TGF- $\beta$ 1 vor der Zugabe zu den MLECs kehrte die Hormonwirkung vollständig um, was anzeigt, daß die Hemmung der MLEC-Proliferation von TGF- $\beta$ 1 abhängig war.

**[0096]** Wenn Fibroblasten mit Östrogen oder Progesteron inkubiert wurden, induzierten konditionierte Medien Wachstumshemmung von MLECs abhängig von dem fraglichen Hormon und seiner Konzentration (relativ zu Kontrollen) (Tabelle II). Neutralisierender Antikörper zu TGF- $\beta$ 1 (mit 10  $\mu$ g/ml; R&D) hob die Wirkungen der Hormone bei allen bewerteten Konzentrationen auf, wenn mit Proben für 30 min vor der Zugabe zu den Nerzlungenzellen präinkubiert wurde (Antikörper zu TGF- $\beta$ 2 und  $\beta$ 3 hatten keine Wirkung).

**[0097]** Antikörper bei dieser Konzentration, hinzugefügt zu Nerzlungenzellen (in Kontrollmedien), hatten keine Wirkung auf die Thymidinaufnahme, verglichen mit Kontrollmedien allein. Die Gesamt-TGF- $\beta$ 1-Niveaus in den wärmeaktivierten konditionierten Medien waren nach 24 h Östrogenbehandlung bei allen getesteten Versuchspersonen vergrößert, mit einer maximalen Zunahme von TGF- $\beta$ 1 bei der mM-Östrogen-Dosis (verglichen mit Kontrollen), mit einer 4-fachen mittleren Zunahme in Niveaus für junge Zellen (2C) und einer 12-fachen Zunahme für Zellen von alten Versuchspersonen (2A und 2B) (Tabelle II). Progesteronbehandlung von Fibroblasten hatte keine signifikante Wirkung auf die TGF- $\beta$ 1-Produktion (verglichen mit Kontrollen) für junge Fibroblasten (Gruppe 2C), jedoch gab es eine signifikante 2-fache Zunahme in den Niveaus bei den nM- und  $\mu$ M-Dosen für die Fibroblasten von den alten Versuchspersonen (2A oder 2B). Es gab keine Zunahme an aktivem TGF- $\beta$ 1 nach entweder Östrogen- oder Progesteronbehandlung (d. h. nicht wärmeaktivierte Proben hatten keine Wirkung auf den Nerzlungenzell-Assay, verglichen mit der entsprechenden Kontrolle). Diese Werte lassen darauf schließen, daß Östrogen das Hauptgeschlechtssteroid ist, das an der dermalen Fibroblast-Produktion/Sekretion von TGF- $\beta$ 1 beteiligt ist, und daß der Mechanismus, durch welchen Verbindungen, die das Geschlechtshormonsystem beeinflussen, ihre Wirkung auf die Wundheilung ausüben, durch Modulation von TGF- $\beta$ 1-Niveaus geschehen kann.

TABELLE II

TGF- $\beta$ 1-Niveaus, sekretiert durch dermale Fibroblasten von jungen (2C) und alte Frauen (2A oder 2B), wie durch den Assay zur Hemmung des Nerzlungenzellwachstums bestimmt

Zelltyp	Behandlung	TGF-beta-Niveaus (pg/ml/10 <sup>5</sup> Zellen/24 h)	-fache Induzierung
Junge Frau	Kontrolle (Medien allein)	108 $\pm$ 26	
	pM Östrogen	118 $\pm$ 24	1
	nM Östrogen	312 $\pm$ 30	3*
	$\mu$ M Östrogen	282 $\pm$ 22	2,6*
	mM Östrogen	428 $\pm$ 58	4*
	pM Progesteron	70 $\pm$ 31	0,6
	nM Progesteron	115 $\pm$ 20	1
	$\mu$ M Progesteron	96 $\pm$ 13	1
	mM Progesteron	82 $\pm$ 13	0,8
Alte Frau	Kontrolle (Medien allein)	34 $\pm$ 11	
	pM Östrogen	80 $\pm$ 50	2,4*
	nM Östrogen	280 $\pm$ 60	8,3*
	$\mu$ M Östrogen	315 $\pm$ 47	9,3*
	mM Östrogen	416 $\pm$ 80	12,2*
	pM Progesteron	32 $\pm$ 13	1
	nM Progesteron	90 $\pm$ 38	2,6*
	$\mu$ M Progesteron	65 $\pm$ 15	2*
	mM Progesteron	33 $\pm$ 13	1

**[0098]** Um zwischen transkriptioneller und post-transkriptioneller Steuerung von TGF- $\beta$ 1-Niveaus zu unterscheiden, bestimmten wir die stationären mRNA-Niveaus von Fibroblasten, behandelt mit variierenden Konzentrationen von Östrogen. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in den TGF- $\beta$ 1-mRNA-Niveaus zwischen der Kontrolle und behandelten Fibroblasten von allen Frauen (ungeachtet des Alters) gefunden (Tabelle III). Cycloheximid, hinzugegeben in Verbindung mit den Hormonen oder Medien allein, hatte keine Wirkung auf die beobachteten Gesamt-TGF- $\beta$ 1-Proteinniveaus, was anzeigt, daß Hemmen der Proteinsynthese keine Wirkung auf die erhöhten Niveaus von TGF- $\beta$ 1 in den Medien nach der Östrogenbehandlung hatte. Cycloheximid hatte keine Wirkung auf die Lebensfähigkeit von Zellen bei der Dosis, die in der Untersuchung verwendet wurde. Die Werte lassen darauf schließen, daß die Zunahme in den Gesamt-Cytokin-Niveaus in den Medien sekundär zu der Östrogenbehandlung auf posttranslationale Ereignisse zurückzuführen war.

TABELLE III

Auswirkungen von Alter und Hormonbehandlung auf TGF- $\beta$ 1-mRNA-Niveaus dermalen Fibroblasten, wie bestimmt durch quantitative RT-PCR

Zelltyp	Behandlung	TGF-beta-mRNA-Niveaus (Kopien/Zelle)
Junge Frau (2C)	Kontrolle (Medien allein)	1200 $\pm$ 158
	pM Östrogen	1190 $\pm$ 300
	nM Östrogen	1300 $\pm$ 272
	$\mu$ M Östrogen	1180 $\pm$ 130
	mM Östrogen	1250 $\pm$ 188
	pM Progesteron	1130 $\pm$ 254
	nM Progesteron	1145 $\pm$ 206
	$\mu$ M Progesteron	1090 $\pm$ 280
	mM Progesteron	1100 $\pm$ 310
Alte Frau (2A oder 2B)	Kontrolle (Medien allein)	1080 $\pm$ 160
	pM Östrogen	1155 $\pm$ 215
	nM Östrogen	1100 $\pm$ 370
	$\mu$ M Östrogen	1100 $\pm$ 235
	mM Östrogen	990 $\pm$ 325
	pM Progesteron	950 $\pm$ 210
	nM Progesteron	1000 $\pm$ 275
	$\mu$ M Progesteron	1110 $\pm$ 290
	mM Progesteron	1300 $\pm$ 430

## BEISPIEL 3

**[0099]** Experimente wurden durchgeführt, um in einem klinischen Versuch unter Verwendung von Männern und Frauen die Wirkung topischer Östrogene auf die Wundheilung zu veranschaulichen.

## 3.1 METHODEN

## 3.1.1 Patienten

**[0100]** Die Genehmigung für diese Untersuchung wurde durch das lokale Ethik-Komitee gegeben. Vierzig Freiwillige mit definiertem Gesundheitsstatus wurden in vier Gruppen eingeteilt:

- (i) Gruppe 3A umfaßte zehn Frauen mit dem mittleren Alter 76,3 Jahre (SD 5,6); die Östrogenzusätze erhielten (25  $\mu$ g/24 h Östradiol).
- (ii) Gruppe 3B umfaßte zehn Frauen mit dem mittleren Alter 72,5 Jahre (SD 7,1); die Placebo anstatt Östrogen erhielten.
- (iii) Gruppe 3C umfaßte zehn Männer mit dem mittleren Alter 69,6 Jahre (SD 3,6); die Östrogenzusätze erhielten.
- (iv) Gruppe 3D umfaßte zehn Männer mit dem mittleren Alter 71,8 Jahre (SD 8,9); die Placebo anstatt Östrogen erhielten.

**[0101]** Alle Versuchspersonen hatten normale Anamnesen und Untersuchungen, CXR, ECG, hämatologische, Lipid- und biochemische Profile. Die Versuchspersonen waren alle Nichtraucher, mit normalen Ernährungsgeschichten und Body-Mass-Indizes.

## 3.1.2 Biopsien

**[0102]** Nach eingeholter Zustimmung unterzogen sich Versuchspersonen aus jeder der Gruppen 3A, 3B, 3C

und 3D zwei 4-mm-Stanzbiopsien aus dem inneren Oberarm (eine nicht der Sonne ausgesetzte Stelle) nach lokaler Infiltration von 1 ml 1%igem Lignocain. Jede Biopsie aus normaler Haut wurde halbiert und eine Hälfte in Optimal-Cutting-Temperature (optimale Schnitt-Temperatur)-Verbindung (Miles Inc. Elkhart, IN) eingebettet, über flüssigem Stickstoff gefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und eine Hälfte in flüssigem Stickstoff schnellgefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

**[0103]** Die Fläche für die Biopsie wurde mit einem Pflaster von  $2 \times 3$  cm bedeckt (Placebo-Gruppen 3B und 3D oder aktives Östradiol 3A und 3C), durch welches die Biopsien gemacht wurden. Das Pflaster wurde mit einem trockenen Multisorb-Mullverband (Smith & Nephew, UK) bedeckt und beide wurden nach 24 h entfernt. Die aktiven Pflaster enthielten hinreichend Östradiol, derart, daß die Wundstellen  $25 \mu\text{g}/24$  h Östradiol ausgesetzt wurden.

### 3.1.3 Rebiopsie

**[0104]** Fünf Versuchspersonen aus den Gruppen 3A, 3B, 3C und 3D unterzogen sich einer Reexzision der Wunden am Tag 7 nach der Verwundung und die anderen fünf Versuchspersonen aus jeder Gruppe am Tag 84 nach der Verwundung.

**[0105]** Der linke innere Oberarm wurde mit Isopropylalkohol gereinigt, elliptische Exzisionen der Wunden wurden nach Infiltration von 1%igem Lignocain gemacht, und zwei Nähte wurden verwendet, um den Spalt zu schließen. Jede Wunde wurde halbiert und wie vorstehend beschrieben (3.1.2) bearbeitet.

### 3.1.4 Messungen von endogenen Hormonen

**[0106]** Die zirkulierenden Östrogenniveaus in den weiblichen Gruppen (3A und 3B) waren  $< 50$  pmol/l mit Progesteron  $< 2$  nmol/l sowohl bei anfänglicher Biopsie als auch bei Reexzision.

**[0107]** Für die männlichen Gruppen (3C und 3D) waren alle Progesteronniveaus  $< 2$  nmol/l. Für Gruppe 3C: die Testosteronniveaus waren  $15,9$  nmol/l (SD  $3,9$ ), SHBG war  $47,3$  (SD  $14,2$ ) und die Östrogenniveaus waren  $92$  pmol/l (SD  $16,6$ ). Für Gruppe 3D: die Testosteronniveaus waren  $13,0$  nmol/l (SD  $3,5$ ), SHBG war  $46,9$  (SD  $27,4$ ) und die Östrogenniveaus waren  $100$  pmol/l (SD  $14,7$ ). Die Prolactinniveaus und PSA-Niveaus (3C und 3D) waren innerhalb normaler Grenzen.

### 3.1.5 Untersuchung von Biopsien

**[0108]** Einige Biopsien wurden für molekulare Analyse verwendet, und Mikrodissektion der Wunde wurde unternommen, um sicherzustellen, daß es keine Verunreinigung von normaler Haut gab.

#### 3.1.5.1 Bildanalyse von Wunden

**[0109]** Paraffin-eingebettete  $7\text{-}\mu\text{m}$ -Schnitte wurden mit H&E und Masson-Trichrome gefärbt. Die Geschwindigkeit der Reepithelisierung (am Tag 7 nach der Verwundung) und die Wundgrößen, wie bestimmt durch Planimetrie, wurden durch Bildanalyse unter Verwendung einer Kamera Olympus Vanox und eines PC-Bilderfassungssystems bestimmt. Die Kollagenmenge innerhalb der Wunde wurde durch zwei Beobachter, blind gemacht für die Identität des Probestücks, auf der folgenden Skala bestimmt + = minimale Mengen; ++ = weniger als normale Haut; +++ ähnlich normaler Haut; ++++ = größer als normale Haut.

#### 3.1.5.2 Dimensionsanalyse-System

**[0110]** Die Wundsteifheit am Tag 80 wurde unter Verwendung des nicht-zerreißenden Dimensional Analysis System (Dimensionsanalyse-System) (Das) bestimmt. Frühere Untersuchungen haben Werte der Reißfestigkeit einer Wunde (letzter Druck beim Reiß) mit Wundsteifheit unter Verwendung dieses Systems korreliert. Das System bringt eine multiaxiale Last (negativer Druck) auf die Wunde auf und mißt die Deformation aufgrund der Belastung von zwei reflektiven Zielen, platziert an den Wundkanten, unter Verwendung einer Kamera mit hoher Auflösung und eines Videoprozessors. Druck wurde bis zu einem Maximum von  $100$  mm Hg angelegt und dann entspannt. Die Steifheit wurde zwischen  $20$  und  $80$  mm Hg gemessen.

#### 3.1.5.3 Fibronectin-Zymographie

**[0111]** Proteasen, verantwortlich für Fibronectinabbau, wurden durch Zymographie unter Verwendung von Fi-



bronectin enthaltenden Acrylamidgelen (12% Acrylamid und 0,33 mg/ml Fibronectin, Central Blood Products Ltd.) identifiziert. Gewebeproben wurden lyophilisiert und homogenisiert, wobei ein Mattglashomogenisierer, enthaltend 0,5 ml Puffer (100 mM Tris/HCl, 6M Harnstoff 15 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,25% Triton-X100, pH 7,4) verwendet wurde. Nach Zentrifugation mit 11000 U/min für 10 min bei 4°C wurden die Proben (20 µg Trockengewicht) für 30 min bei 37°C mit 2 × Laemmli-Probenpuffer inkubiert und Elektrophorese unter nicht-reduzierenden Bedingungen (Laemmli, 1970) unterworfen. Nach der Elektrophorese wurden die Gele zweimal mit 2,5% Triton-X100 für 1 h gewaschen, um SDS zu entfernen. Die Gele wurden kurz mit doppelt destilliertem Wasser gewaschen und für 18 h bei 37°C in Entwicklungspuffer, enthaltend 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl und 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7,4, inkubiert. Am Ende der Inkubation wurden die Gele mit 0,5% Coomassie-Brilliantblau gefärbt und entfärbt. Flächen von Proteaseaktivität erschienen als klare Zonen gegen einen dunkelblauen Hintergrund. Duplikatgele wurden mit entweder der Zugabe von 10 mM Metalloprotease-Inhibitor, EDTA (BDH, Poole) oder 1,7 mM Serinprotease-Inhibitor, Aminoethylbenzolsulfonylfluorid (AEBSF; Sigma) inkubiert. Vorgefärbte Molekulargewichtsstandards mit breitem Bereich (Bio-rad) wurden als Molekulargewichtsmarker verwendet. Gesonderte Bahnen wurden mit 500 ng und 50 ng humaner neutrophiler Elastase (ICN) beladen.

#### 3.1.5.4 SDS-PAGE und Immunoblotting

**[0112]** Proteinproben (20 µg Trockengewicht), extrahiert wie vorstehend beschrieben, wurden der Elektrophorese auf einem 12%-Acrylamidgel unterworfen. Parallele Fibronectin-Zymogramme wurden gleichzeitig durchgeführt. Für das Immunoblotting wurden Polypeptide auf Nitrocellulosepapier (0,45 µm Porengröße, Bio-Rad) durch Elektrophorese bei 20 V für 30 min (Bio-Rad Semi dry transfer blot apparatus (Blot-Apparatur mit halbtrockener Überführung)) in Transferpuffer (25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 10% Methanol, pH 8,3) überführt. Um nichtspezifische Bindung zu blockieren, wurden Immunoblots in 4% fettarmer Milch von Marvel in TEST (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 0,5% Tween-20 pH 7,5) für 18 Stunden bei 4°C inkubiert. Die überführten Proteine wurden mit polyklonalem antihumanen neutrophilen Elastase-Antikörper (Calbiochem Co.), verdünnt 1:500 in TEST für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit Schütteln inkubiert und nachfolgend mit Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen-IgG (Sigma) mit 1:3000 Verdünnung in TEST mit 4% fettarmer Milch für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Antikörperbindung wurde unter Verwendung des ECL-Kits entsprechend den Instruktionen des Herstellers (Amersham Int.) sichtbar gemacht.

#### 3.1.5.5 Elastasebestimmung

**[0113]** Gewebeproben (20 µg Trockengewicht) und humane neutrophile Elastase (0,01–0,3 µg/ml) wurden für bis zu 1 h bei 37°C in 200 µl 0,1 M Hepes-Puffer, pH 7,5, enthaltend 0,5 M NaCl, 10% Dimethylsulfoxid und 0,1 mM Elastasesubstrat (Methoxysuccinyl-ala-ala-pro-val-p-nitroanilid; Calbiochem Co.) inkubiert. Der Substratabbau wurde durch Messen der  $\text{OD}_{410}$  (Dynatech MR50000) bestimmt. Eine Standardkurve für den Abbau wurde aus den Elastase-Werten hergestellt. Die Ergebnisse wurden als ng/ml Elastase-Aktivität/20 µg Trockengewicht ausgedrückt.

#### 3.1.6 Statistische Analyse

**[0114]** Alle Werte sind normalisiert und unter Verwendung eines unabhängigen Student-t-Tests bewertet.  $P < 0,05$  wird als signifikant angesehen.

### 3.2 ERGEBNISSE

#### 3.2.1 Die Wirkung von Östrogen auf die Geschwindigkeit der Wundheilung

**[0115]** Östrogenbehandlung beschleunigte die Geschwindigkeit der Reepithelisierung bei sowohl weiblichen (3A) als auch männlichen Versuchspersonen (3C) relativ zu Placebo-Kontrollen (3B bzw. 3D) (siehe Tabelle IV). Die Ergebnisse waren wegen einer Diskrepanz zwischen den Geschlechtern in der Placebo-Gruppe (Männer reepithelisierten schneller als Frauen) nur in der weiblichen Gruppe signifikant ( $p > 0,005$ ). Die Wundfläche am Tag 7 nach der Verwundung hatte sich mit Östrogenbehandlung in den beiden männlichen Gruppen 3C und 3D signifikant verringert ( $p < 0,05$ ). Die Kollagenniveaus waren übereinstimmend sowohl am Tag 7 als auch am Tag 80 nach der Verwundung bei beiden mit Östrogen behandelten Geschlechtern (3A und 3C) verglichen mit Placebo (3B und 3D) vergrößert. Die Wundsteifheit wurde durch Östrogenbehandlung am Tag 80 nach der Verwundung nicht beeinflusst.

## 3.2.2 Die Wirkung von Östrogen auf die Elastase-Aktivität der Wunde

**[0116]** Gewebeextrakte aus akuten Wunden vom Tag 7 bauten alle Fibronectin ab, das eine Hauptbande bei ungefähr 30 kd zeigt, aber übereinstimmend weniger Abbau erfolgte in den Östrogen-behandelten Gruppen (3A und 3C). Die 30-kd-Fibronectin-spezifische Proteaseaktivität in allen Proben wurde durch Inkubation mit dem Serinprotease-Inhibitor, AEBSF, mit breitem Bereich, aber nicht mit dem Metalloprotease-Inhibitor, EDTA, aufgehoben, was darauf schließen läßt, daß die hauptsächliche Fibronectinabbau-Aktivität auf eine Serinprotease zurückzuführen war, welche mit handelsüblicher neutrophiler Elastase mitwanderte. Immunoblotting bestätigte, daß die 30-kd-Protease-Aktivität, die auf Fibronectin-Zymogrammen gesehen wird, Elastase war. Elastase-Aktivität war nur in Placebo-behandelten Gruppen (3B und 3D) vorhanden. Elastase-Aktivität wurde quantifiziert, indem ein Assay zum Abbau von synthetischem Elastase-Substrat verwendet wurde, welches zeigte, daß Östrogenbehandlung Elastase-Aktivität in Tag-7-Wunden verglichen mit Placebo (< 50 ng Elastase pro 20 µg Trockengewicht von Gewebe für die Placebogruppen übereinstimmend mit den Western-Blot-Werten) signifikant verringerte (Tabelle IV).

TABELLE IV

**[0117]** Topisches Östrogen beschleunigt die Wundheilung bei älteren Männern und Frauen.

	FRAUEN		MÄNNER	
	PLACEBO (3B)	ÖSTROGEN (3A)	PLACEBO (3D)	ÖSTROGEN (3C)
Wundfläche	1408,7 (19)	1204 (49)*	1461 (28)	1173 (61)*
% Geschwindigkeit der Reepithelisierung	3,3 (3,3)	74,5 (10,5)*	30 (16,9)	62,5 (21,7)
Kollagenmengen Tag 7	+	++	+	++
Tag 80	+++	++++	+++	++++

## 3.2.3 Die Auswirkung von Östrogen auf die Narbenbildung

**[0118]** Die [Fig. 7](#) und [Fig. 8](#) veranschaulichen die Auswirkung von Östrogen (e) auf die Narbenbildung (mikroskopisch bzw. makroskopisch), wie sie in 2.1.4.2 bestimmt wurde. Die Östrogenbehandlung war mit einer schlechteren Qualität der Wunde verbunden (welche mit den TGF-β-Niveaus korreliert werden kann).

**Patentansprüche**

1. Verwendung einer Verbindung, die die östrogene Wirkung fördert, wobei die Verbindung ein Östrogen oder ein Östrogenrezeptor-Agonist, ausgewählt aus Ethinylöstradiol, Dienöströl, Mestranol, Östradiol, Östriol, konjugierten Östrogenen, Piperazinöstronsulfat, Stilböstrol, Fosfesteroltetranatrium, Polyestradiolphosphat, Tibolon oder einem Phytoestrogen, ist, bei der Herstellung eines Medikaments zur Beschleunigung der Heilung von Hautwunden, die von einer Verletzung der Haut herrühren.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Verbindung 17-β-Östradiol ist.

3. Verwendung nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei die Wunde eine akute Wunde ist.

4. Verwendung nach Anspruch 3, wobei die Wunde eine durchbohrende Verletzung, eine Brandwunde ist oder aus elektiver chirurgischer Behandlung resultiert.

5. Verwendung nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Wunde eine chronische Wunde ist.

6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei die Wunde ein diabetisches, venöses oder Dekubitusgeschwür ist.

7. Verwendung nach einem vorhergehenden Anspruch für nichtsystemische Anwendung.

8. Verwendung nach einem vorhergehenden Anspruch für die Herstellung eines Medikaments in der Form einer Flüssigkeit, einer Salbe, einer Creme, eines Gels, eines Hydrogels, eines Pulvers, eines Aerosols oder eines Implantats oder von Augentropfen.

9. Verwendung nach einem vorhergehenden Anspruch, wobei das Medikament 0,001 Gew.-% bis 4 Gew.-% der Verbindung enthält.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

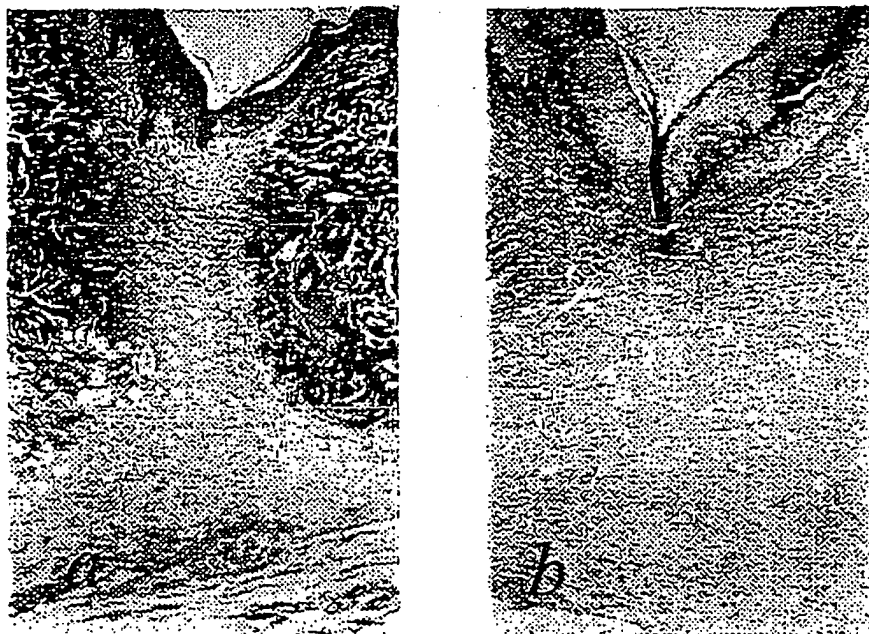
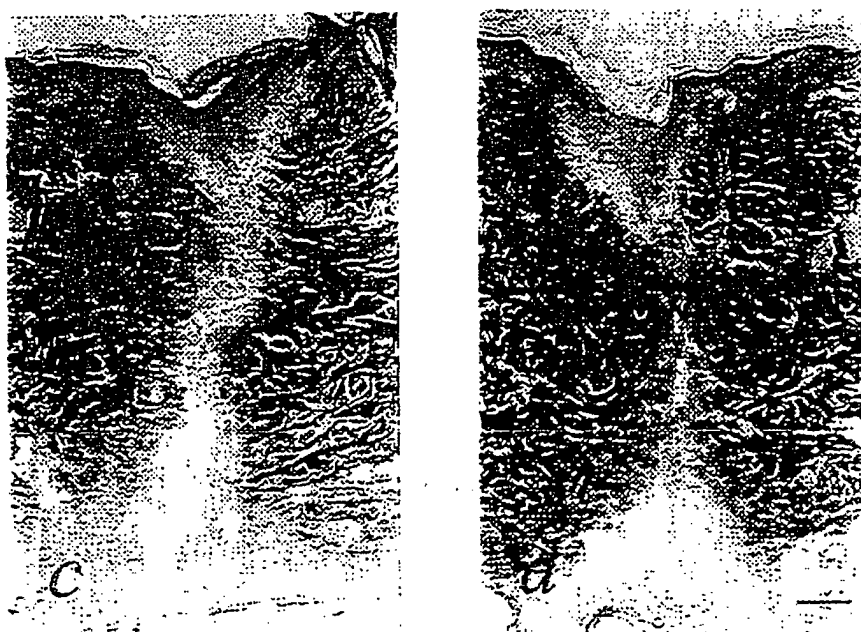
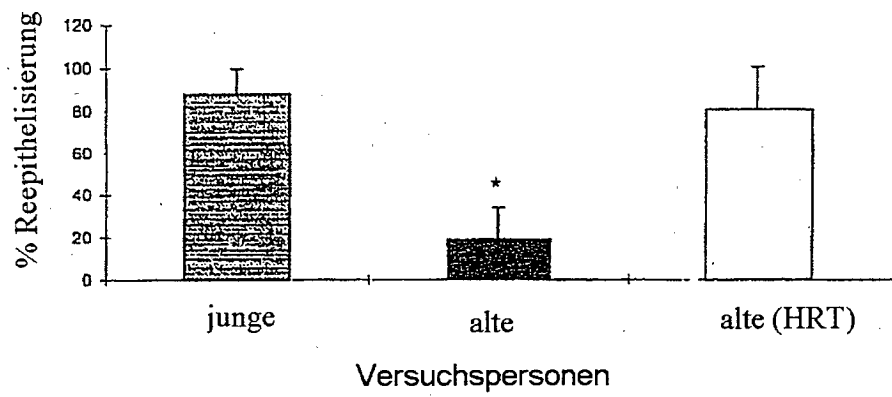
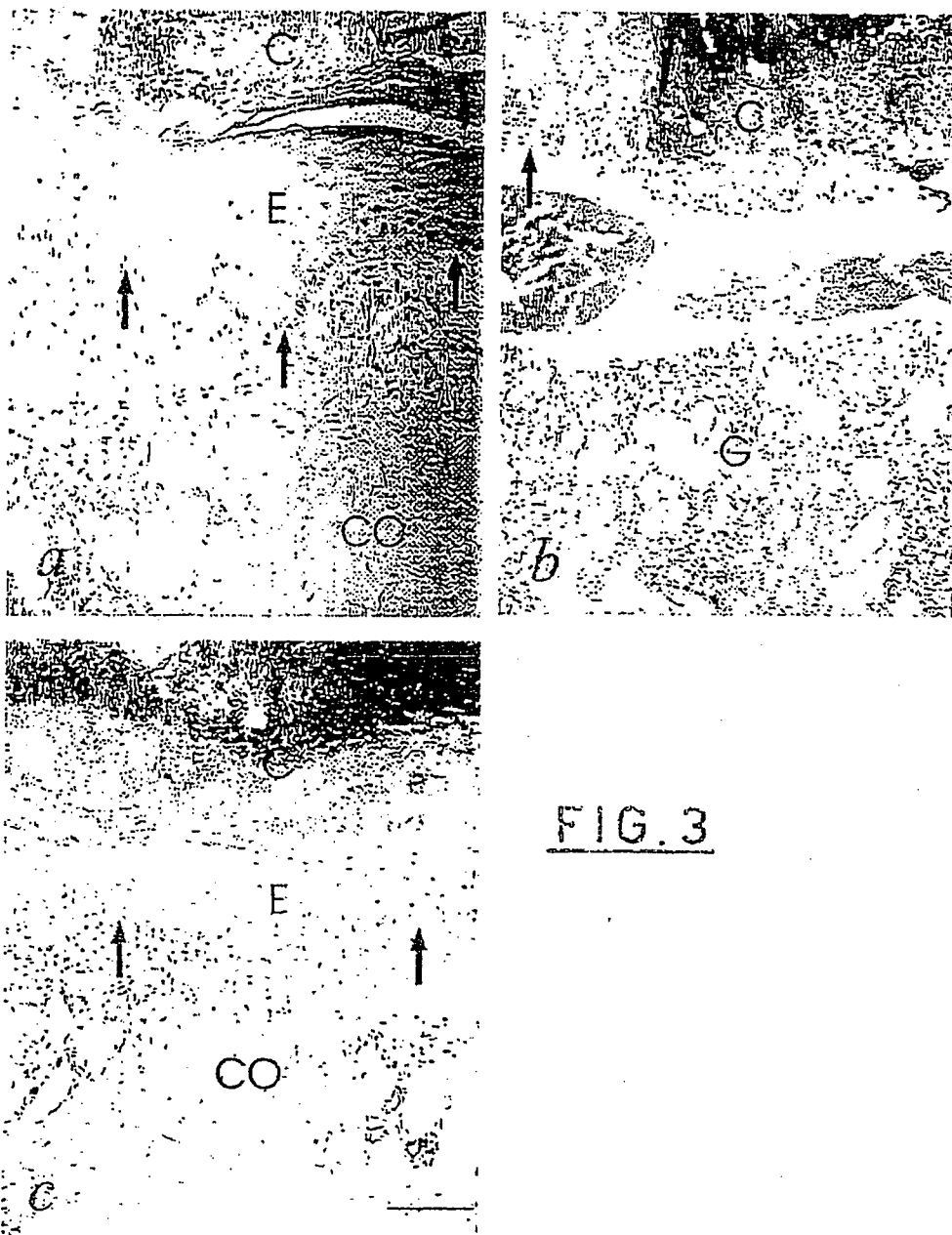


FIG. 1





**FIG. 2**



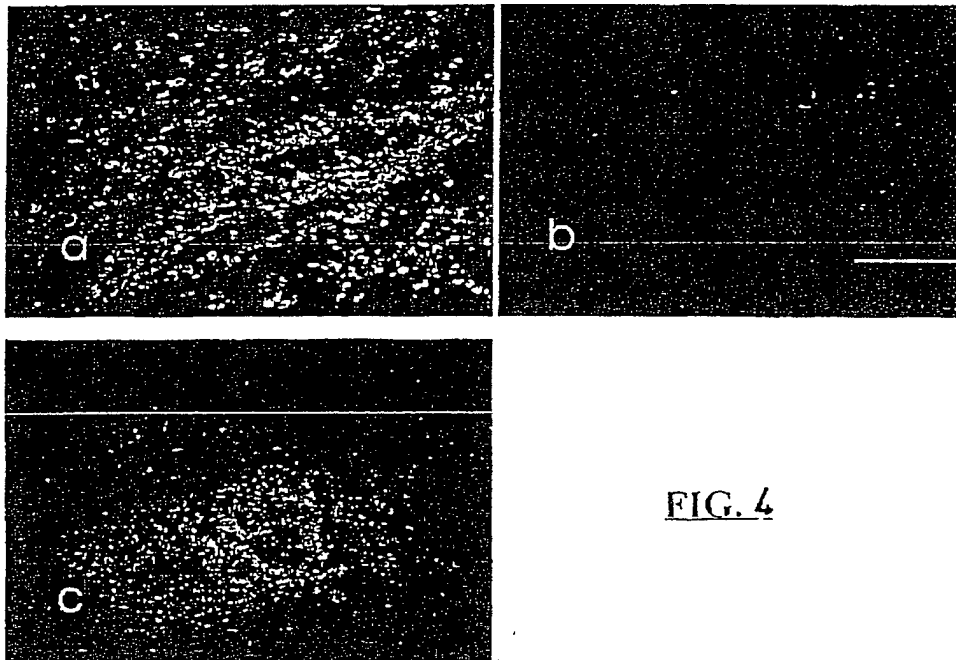


FIG. 4

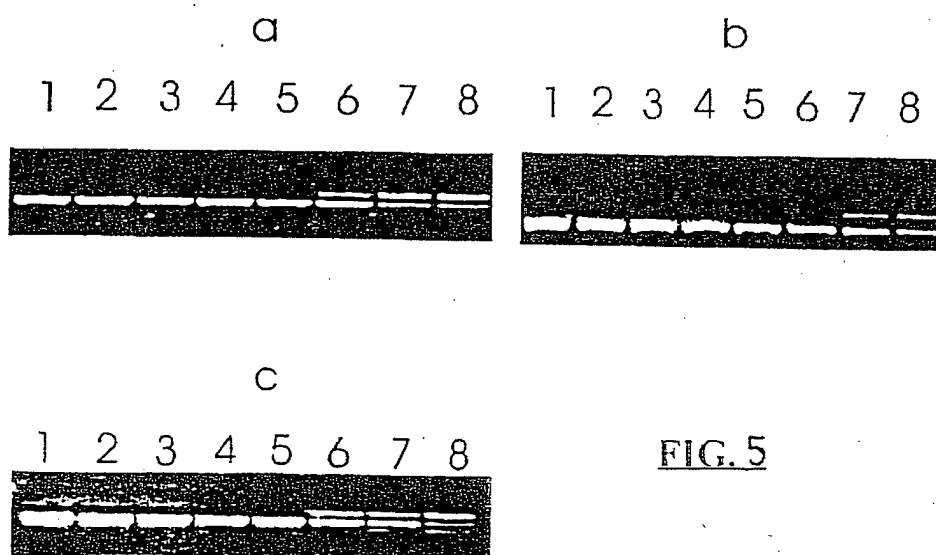
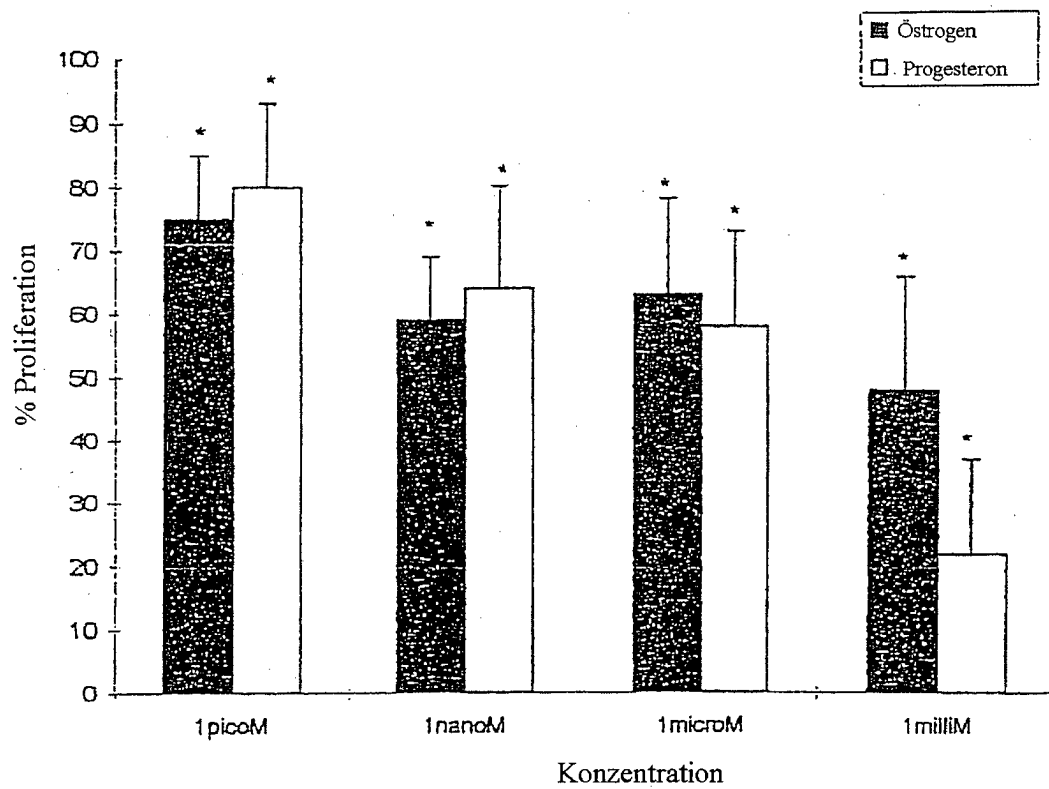
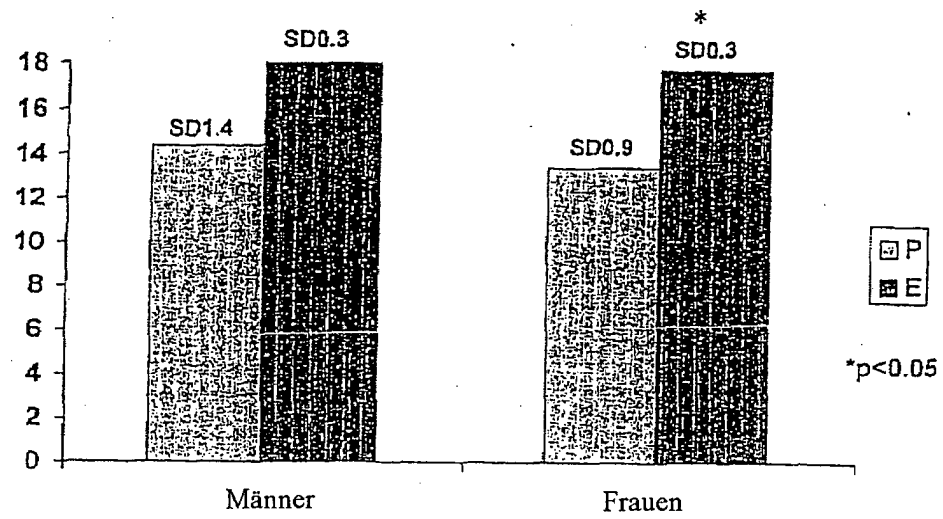


FIG. 5

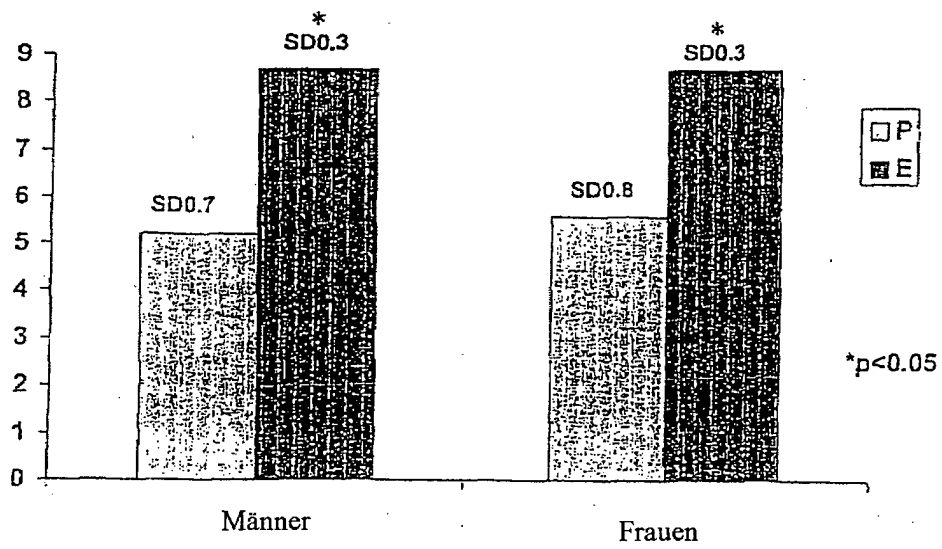


**FIG. 6**





**FIG. 7**



**FIG. 8**