



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 34 713 T2** 2006.07.06

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 738 161 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 34 713.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB95/00008**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 904 642.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/018638**

(86) PCT-Anmeldetag: **04.01.1995**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **13.07.1995**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.10.1996**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **28.12.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.07.2006**

(51) Int Cl.⁸: **A61L 31/00** (2006.01)

A61L 15/32 (2006.01)

A61L 15/40 (2006.01)

A61L 27/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9400163 06.01.1994 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, CH, DE, ES, FR, GB, IT, LI, NL, SE

(73) Patentinhaber:

**Ed. Geistlich Söhne AG für chemische Industrie,
Wolhusen, Luzern/Lucerne, CH**

(72) Erfinder:

**GEISTLICH, Peter, CH-6362 Stansstad, CH;
ECKMAYER, Zdenek, D-69469 Weinheim, DE;
BOYNE, Philip, Loma Linda, US**

(74) Vertreter:

**TER MEER STEINMEISTER & Partner GbR
Patentanwälte, 33617 Bielefeld**

(54) Bezeichnung: **VERWENDUNG EINER KOLLAGENMEMBRANE ZUR HERSTELLUNG EINES IMPLANTATES FÜR GESTEUERTE GEWEBEREGENERATION**

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

[0001] Die vorliegende Erfindung beschäftigt sich mit Wundheilung und insbesondere mit der Verwendung von Collagen enthaltenden Membranen bei der gelenkten Geweberegeneration (Guided Tissue Regeneration; GTR).

[0002] In jeder Situation, in der Wundheilung wünschenswert ist, wie nach Operationen, insbesondere in der Mund- und Zahnchirurgie, hat sich gezeigt, dass es schwierig ist Bedingungen zu schaffen, unter denen das Einwachsen anderen Gewebes in den Bereich der Wundheilung verhindert wird. Daher ist es beispielsweise wünschenswert, dass dort, wo ein substanzialer Teil einer Zahnwurzel auf Grund von Fäule oder Krankheit entfernt wurde, eine Regeneration des gesunden Knochens stattfindet um das entfernte Knochengewebe zu ersetzen. Allerdings hat sich gezeigt, dass der bei der Entfernung des Knochens zurückbleibende Hohlraum schnell mit Bindegewebe gefüllt wird, und dass dieses Einwachsen von Bindegewebe eine Regeneration des Knochens effektiv unterbindet.

[0003] Um diese Schwierigkeiten zu überwinden, wurde eine Technik entwickelt, die als „Guided Tissue Regeneration“ (GTR) bekannt ist. Bei dieser Methode wird eine Membran chirurgisch um die Peripherie der Wundhöhle herum aufgebracht. Die Membran ver- oder behindert das Eindringen unerwünschter Zelltypen und erlaubt daher den gewünschten Zellen in der Wundhöhle zu wachsen und so die Wunde zu heilen.

[0004] Zwei Membrantypen werden derzeit bei der GTR verwendet:

- 1) Synthetische, nichtresorbierbare PTFE Membranen, wie beispielsweise Goretex (trade mark); und
- 2) Synthetische resorbierbare Membranen, welche aus Glycoiden oder Lactidcopolymeren bestehen.

[0005] Allerdings haben diese beiden Membrantypen erhebliche Nachteile. Die PTFE Membran, auch wenn sie geeignete Eigenschaften bezüglich Porosität, Stärke und Flexibilität aufweist, verbleibt als nichtresorbierbar und folglich ist eine zweite Operation notwendig um die Membran zu entfernen. Die Notwendigkeit einer weiteren Operation mag für den Patienten traumatisch sein und kann zudem zu einer Beschädigung des neuen Gewebes führen, was die Behandlungsdauer verlängert.

[0006] Der zweite Membrantyp ist ein Gewebe aus Glycoiden und Lactidcopolymerfasern. Während diese Membran resorbierbar ist, führen die Abbauprodukte zu einer Reizung, und diese Reizung kann unvorhersehbare Folgen für den Patienten haben.

[0007] Beide nach Stand der Technik bekannten Membranen fungieren als Filter. Sie erlauben den Durchtritt von Flüssigkeiten und stellen eine Barriere für Zellen dar. Allerdings ist die Membranoberfläche nicht „zellfreundlich“, d.h. sie stabilisiert keine Blutgerinnsel und unterstützt das Zellwachstum nicht. Folglich schafft keine dieser, nach dem Stand der Technik bekannten Membranen optimale Bedingungen für Zellwachstum und Wundheilung.

[0008] Bei Menschen und Tieren bestehen bestimmte Membranen, die wichtige Organe umgeben und verschiedene Gewebe und Zellen trennen, aus Collagen. Beispiele solcher Membranen umfassen das Bauchfell und Placentamembranen auf der Makroskala und Basalmembranen auf der Mikroskala.

[0009] Collagenprodukte finden heute in der Medizin breite Anwendung. Eine Vielzahl von Collagenmaterialien ist verfügbar, darunter lösliches Collagen, Collagenfasern, -schwämme, -membranen und Knochenimplantate, was einen vielseitigen Einsatz dieses Materials erlaubt, beispielsweise von Collagenfasern und -tupfern zur Blutstillung, Collagenmembranen zur Bedeckung von oder zur Implantation in Wunden und Injektionen von löslichem Collagen in der plastischen Chirurgie.

[0010] Verschiedene künstliche, Collagen enthaltende Membranen wurden im Stand der Technik beschrieben und für das Verbinden oder Abdecken von Wunden vorgeschlagen. So wird in WO-A-8808305 (The Regents of The University of California) eine Komposit-Ersatzhaut beschrieben, welche aus einer Lage menschlicher Hautzellen zusammen mit einer Lage biosynthetischer Membran, die aus Collagen oder Mucopolysacchariden bestehen kann, zusammengesetzt ist. Allerdings hat der Collagen/Mucopolysaccharid-Anteil überall eine einheitliche Oberflächenbeschaffenheit und besitzt nicht die Eigenschaften der Membran, die hier für die GTR vorgeschlagen wird. Weiterhin sind solche Membranen hochgradig immunreaktiv und können nur beim Spender der Zellen eingesetzt werden. Eine weitere künstliche Collagen enthaltende Membran wird in DE-A-26 31 909 (Massachusetts Institute of Technologie) beschrieben. Diese Membran besteht aus mindestens zwei Schichten wobei die erste Schicht eine Kombination aus Kollagen und Mucopolysacchariden ist und die zweite Schicht

aus einem künstlichen Polymer, wie etwa einem Polyacrylat, besteht. Allerdings ist diese Membran vollständig nichtresorbierbar, da die Collagenschicht intern so dicht quervernetzt ist, dass keine Resorption stattfinden kann.

[0011] EP-A-0 331 786 (Chemokol Gesellschaft zur Entwicklung von Kollagenprodukten) beschreibt ein Verfahren zur Herstellung von Collagenmembranen für die Blutstillung, als Verbandsmaterial und als implantierbares Material. Diese Membranen wurden entwickelt um mit einer schnell quellenden Oberfläche und einer lockeren, schwammähnlichen Struktur ein Stoppen von Blutungen in Situationen zu ermöglichen, in denen Blut unter Druck austritt.

[0012] DE-A-36 07 075 (American Hospital Supply Corp.) betrifft eine Methode zur Behandlung von Knochenbrüchen, bei der bioprothetisches Gewebe rund um den Bruch auf die Knochenoberfläche aufgebracht wird um die Bildung von fibrösen Adhäsionen zwischen dem heilenden Knochen und dem umliegenden Körpergewebe zu unterbinden. Bei dem bioprothetische Gewebe kann es sich um eine Collagenmembran handeln, die gegenüberliegende glatte und faserige Seiten besitzt. In diesen Ausführungsbeispielen kann die faserige Seite zur Knochenoberfläche hin positioniert werden, um eine bessere Verankerung zu gewährleisten; die glatte Seite stellt dann eine vorteilhaft schmierende Oberfläche zur Verfügung. Das bioprothetische Gewebe nimmt nicht am Heilungsprozess teil, der zwischen den Bruchstellen unter der Knochenoberfläche abläuft, und wird vorzugsweise behandelt, um ihn im Wesentlichen gegen Verkalkung resistent zu machen, d.h. um das Einwachsen von Knochengewebe in das bioprothetische Gewebe zu verhindern.

[0013] WO-A-9013302 (Brigham and Women's Hospital) offenbart resorbierbares Material zur Verwendung in der GTR, welches Collagenmembranen beinhaltet, welche eine oder mehrere biologisch aktive Substanzen, wie Arzneimittel, Hormone, Wachstumsfaktoren, Peptide oder Proteine enthalten.

[0014] WO-A-9302718 (Coletica) offenbart langsam bioresorbierbare, Glycosaminoglycan enthaltende, quervernetzte Collagenmembranen zur Verwendung in der GTR.

[0015] Die vorliegende Erfindung basiert auf der Erkenntnis, dass Collagenmembranen, die direkt von natürlich vorkommenden Membranen abgeleitet sind und welche so weit wie möglich ihre natürliche Collagenstruktur beibehalten, Membranen bilden, welche ideale Eigenschaften für die GTR aufweisen.

[0016] Entsprechend stellt die Erfindung eine physiologisch verträgliche und resorbierbare Collagenmembran zur Verfügung, die durch Reinigung einer natürlichen Collagenmembran gewonnen wird, sodass sie im Wesentlichen ihre natürliche Collagenstruktur beibehält, und die gegenüberliegende faserige und glatte Seiten hat, zur Herstellung eines GTR-Implantats zur Einbringung in den menschlichen oder tierischen Körper derart, dass die besagte faserige Seite zu jenem Gebiet des besagten Körpers gerichtet ist, in welchem Gewebeheilung notwendig ist, und dass Zellwachstum darauf möglich ist, und dass die besagte, gegenüberliegende, glatte Seite Zellanlagerung darauf verhindert und als Barriere fungiert, welche den Durchtritt von Zellen durch die Membran verhindert.

[0017] Die beiden gegenüberliegenden Seiten oder Oberflächen der Membran haben unterschiedliche Oberflächenbeschaffenheiten, welche das Zellwachstum in unterschiedlicher Weise beeinflussen. So fungiert die glatte Seite als Barriere oder als Filter, um das Einwachsen von Zellen zu behindern, und verhindert die Besiedlung der, von der Membran durch physikalische Trennung erzeugten, Höhlung durch unerwünschte Zellen. Im Gegensatz dazu verhindert die faserige Seite der Membran die Bildung von Blutgerinnseln und unterstützt das Zellwachstum durch Bereitstellung eines geeigneten Trägers für die neuen Zellen. Aus diesem Grund sollte die Membran so eingeführt werden, dass die glatte Seite nach außen weist und die faserige Seite zu den Zellen weist, an denen eine Neubildung gewünscht ist.

[0018] Da die Membran, welche in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, aus einer natürlichen Quelle stammt ist sie im Körper vollständig resorbierbar und bildet keine giftigen Abbauprodukte.

[0019] Weiterhin besitzt die Membran sowohl im nassen als auch im trockenen Zustand eine Rissfestigkeit und eine Widerstandskraft gegenüber der Ausbreitung von Rissen, vergleichbar mit der von Textilien. Die Membran kann daher, falls notwendig, chirurgisch gedehnt werden. Das Membranmaterial ist stark hydrophil und zeigt im nassen Zustand eine gute Haftfähigkeit, was es erlaubt, mehrere Lagen übereinander zu stapeln. In feuchtem Zustand ist das Material sehr elastisch und erlaubt es so, ungewöhnlich geformte oder unebene Wunden angemessen zu bedecken.

[0020] Natürliche Collagenquellen umfassen Teile von Tierhäuten mit einer vernarbten Seite, Sehnen, verschiedene Tiermembranen etc. Eine bevorzugte Membranquelle ist die natürlich vorkommende Bauchfellmembran, insbesondere von Kälbern und Ferkeln. Bauchfellmembranen von jungen Schweinen im Alter von 6–8 Wochen (Gewicht 60–80 kg) sind besonders bevorzugt.

[0021] Das physiologisch verträgliche Membranmaterial zur Verwendung im Sinne der vorliegenden Erfindung sollte bevorzugt aus reinem, natürlichem (d.h. nicht denaturiertem), unlöslichen Collagen bestehen. Allerdings kommt Collagen im Tierkörper vergesellschaftet mit einer Anzahl von Substanzen vor, welche unvorhersagbare chemische, physikalische und/oder physiologische Eigenschaften besitzen. Folglich muss das Collagen durch einen Aufreinigungsprozess von diesen Substanzen befreit werden. Da die Natur dieser Substanzen stark variiert, ist eine enzymatische Aufreinigung nahezu unmöglich. Daher ist eine chemische Aufreinigung zu bevorzugen, wobei darauf zu achten ist, jede Veränderung der chemischen Struktur des Collagens zu vermeiden und so seine ursprünglichen, natürlichen Eigenschaften beizubehalten.

[0022] Gemäß der bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die benötigte physiologisch verträgliche Membran hergestellt, indem eine Säugetier-Collagenmembran, welche eine glatte und eine faserige Oberfläche besitzt, mit Alkali behandelt wird, um Fette zu verseifen und alkaliempfindliche Substanzen zu entfernen, und dann angesäuert wird um säureempfindliche Substanzen zu entfernen, gefolgt von Waschen, Trocknen, Entfetten und auf Wunsch Quervernetzung.

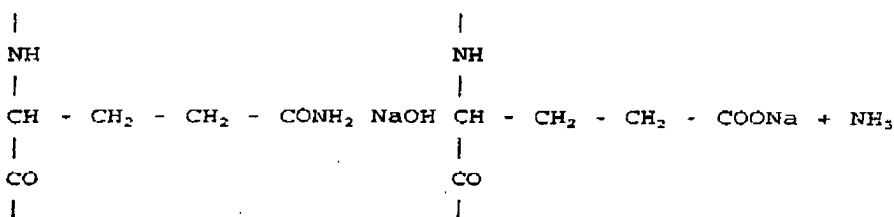
[0023] Während der Aufreinigung finden die folgenden Veränderungen statt:

- nicht-collagene Proteine werden entfernt
- Glycosaminoglycane und Proteoglycane werden gelöst und entfernt
- die Fette werden teilweise verseift und vollständig entfernt.

[0024] Während dieser Behandlung können zudem die folgenden unerwünschten Veränderungen auftreten:

- Hydrolyse der Amid-Gruppen von Asparagin und Glutamin
- eine Verschiebung des isoelektrischen Punkts
- Spaltung von quervernetzenden Bindungen
- Transamidierung unter Bildung von Isopeptiden
- Racemisierung von Aminosäuren
- Spaltung von Peptid-Bindungen.

[0025] Die Menge von Amidstickstoff in der Membran dient als Indikator für diese Veränderungen. Beispielsweise hat sich gezeigt, dass bei einer Halbierung der Amidstickstoff-Gehalts (d.h. von 0,7 mmol/g auf 0,35 mmol/g) mehr als 95% des Collagens weiterhin in seinem ursprünglichen Zustand vorliegt. Grundlage dieser Messung ist die Hydrolyse von Amid-Gruppen der Aminosäuren Asparagin und Glutamin:



[0026] Der Reinheitsgrad des Collagens kann durch Aminosäureanalyse bestimmt werden. Collagen wird zu Aminosäuren hydrolysiert, was bedeutet, dass diese Analyse reines Collagen und die Entfernung von nicht-collagenen Proteinen nachweist, nicht aber die Denaturierung von Collagen.

[0027] Zusammen mit der Aminosäureanalyse des Collagens kann auch der Gehalt an Glycosamin und Proteoglycan bestimmt werden. Diese Verunreinigungen werden hydrolysiert, und der monomere Glycosamin- und Hexosamingehalt der Membran wird chromatographisch bestimmt. Es wurde festgestellt, dass die Menge Glycosamin und Galactosamin nach der Aufreinigung ein Molekül pro 10 000 Moleküle Aminosäuren beträgt.

[0028] Bei einer Methode der Membranherstellung werden die Rohmaterialien zunächst mit Alkali behandelt. In diesem Schritt werden NaOH-Lösungen in einem Konzentrationsbereich von 0,2–4 Gew.-% verwendet. Die Fette werden verseift, und alle begleitenden alkaliempfindlichen Proteine, zusammen mit allen anderen alkaliempfindlichen Substanzen, wie beispielsweise Glycosaminoglycanen, Proteoglycanen etc., werden entfernt. Dieser Prozess wird durch Bestimmung des Amidstickstoffs kontrolliert. Am Ende der Alkalibehandlung sollte

der Amidstickstoffgehalt zwischen 0,3 und 0,5 mmol/g betragen.

[0029] Der zweite Schritt besteht in der Behandlung mit einer anorganischen Säure, üblicherweise HCl. Säureempfindliche Verunreinigungen werden entfernt, die Fasern schwellen stark an, und auf diese Weise wird die Faserstruktur gelockert. Das Ansäuern wird fortgesetzt, bis das Material gleichmäßig angesäuert ist.

[0030] Dannach wird das Material gewaschen. Es hat sich als sinnvoll erwiesen, das Material zu waschen, bis der pH-Wert sich von 0,5–1,5 (während des Ansäuerns mit HCl) auf 2,5–3,5 erhöht hat. Es wird vorzugsweise mit destilliertem Wasser gewaschen.

[0031] Das aufgequollene Material kann nun gespalten werden um eine einheitliche Dicke zu erreichen. Weitere Schritte umfassen ein Verfahren zum Abquellen, Neutralisieren und gründlichen Waschen des Materials. Hierzu wird das Material zunächst mit einer sauren (pH 2,8–3,5) Kochsalzlösung (Konzentration 5–10 Gew.-%) behandelt. Das Material ist nun vollständig abgequollen. Es wird dann mit einem Überschuss leicht alkalischen, destillierten Wassers versetzt, bis das Material einen pH-Wert von 5,8–6,5 erreicht. Das Material wird dann gründlich mit destilliertem Wasser (pH 6,0) gewaschen. Damit ist die erste Phase der Herstellung, nämlich die Reinigung, beendet. Diese wird vom Trocknen und Entfetten gefolgt.

[0032] Das Material wird durch wiederholtes Waschen mit Aceton getrocknet. Dies verursacht ein Schrumpfen der Collagenfasern, und als Ergebnis bleibt eine offene Struktur zurück. Das Entfetten wird mit n-Hexan durchgeführt. Hierbei werden die letzten Spuren hydrophober Substanzen aus dem Material entfernt.

[0033] Die Dicke der trockenen Membran zur Verwendung in der GTR gemäß der vorliegenden Erfindung sollte idealerweise zwischen 0,1 und 1,0 mm liegen, kann aber durch Quellen des Materials beeinflusst werden.

[0034] Die Membran muss daher gespalten oder geschnitten werden um die erforderliche Dicke zu erhalten, vorausgesetzt, dass die zweiseitige Textur der Membran erhalten bleibt.

[0035] Die Membran kann weiterbehandelt werden, um ihre Eigenschaften einem bestimmten Wundtyp anzupassen. So kann das Collagen der Membran quervernetzt werden, um die Membran zu stabilisieren und den Grad der Absorption durch den Körper zu verringern.

[0036] Alle bisher bekannten Quervernetzungsreagentien, die für medizinische Produkte Verwendung finden, können für die Membranen eingesetzt werden (z.B. Formaldehyd, Glutardialdehyd, Hexamethylendiisocyanat, Dicyclohexylcarbodiimid etc.) Eine physikalische Quervernetzung kann durch Wärmebehandlung erreicht werden. In diesem Fall ist der Quervernetzungseffekt allerdings geringer, aber für die meisten Anwendungen dennoch ausreichend. Das Collagen der Membran wird durch Erhitzen auf 100–120°C (für 30 min–5 h) in geeigneter Weise physikalisch quervernetzt, wobei die Abbauphase verlängert wird.

[0037] Sinnvollerweise wird der Quervernetzungsgrad so gewählt, dass der Abbaugrad der Membran mit dem Wachstum neuen Gewebes und der Wundheilung korreliert. Beispielsweise benötigen Knochenzellen ungefähr 6 Wochen um eine Zahnhöhle zu füllen, und daher ist eine Membran, welche innerhalb von 8–12 Wochen absorbiert wird, geeignet, um diesen Wundtyp zu bedecken. Selbstverständlich sollte die Membran nicht stark quervernetzt sein, da die Absorptionsrate ansonsten zu gering wäre und die Membran im Extremfall nicht absorbiert würde.

[0038] Eine andere Modifikation, welche auf die Membran angewandt werden kann, besteht darin, die faserige Seite mit einem Glycosaminoglycan (GAG), wie z.B. Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat, Dermatan-sulfat oder Keratansulfat zu überziehen oder zu beschichten.

- Glycosaminoglycane, wie Hyaluronsäure, sind wichtig als Regulatormoleküle, welche die Gewebestruktur beeinflussen. Sie haben einen günstigen Einfluss auf:
 - das Eindringen von Zellen
 - den Auf- und Abbau der Fibrinmatrix
 - das Quellen der Matrix
 - Phagozytose
 - Gefäßneubildung

[0039] Kurz nach einer Verletzung steigt der Gehalt an GAG in einer Wunde. Hyaluronsäure und dazugehörige GAGs verbinden sich zu Fibrin und bilden eine dreidimensionale Matrix (Gerinnsel), welche mit der Fibrin-

matrix verwoben ist. Die ursprüngliche Fibrinmatrix wird dabei deformiert, quillt und wird poröser. Dies bedingt ein leichteres und schnelleres Eindringen von Zellen in die Matrix und Austreten von Zellen aus der Matrix.

[0040] Hyaluronsäure und Fibrinogen reagieren spezifisch miteinander, selbst wenn sich eines der Moleküle im Festkörperzustand befindet.

[0041] Im Entzündungszustand der Verletzung stimuliert Hyaluronsäure die Funktion der Granulozyten, verändert die Oberflächenbeschaffenheit von polymorphkernigen Leukozyten und reguliert die Phagozytoseaktivität der Zellen.

[0042] Während der Umwandlung und des Abbaus der Hyaluronsäure-Fibrin-Matrix werden kleinere Fragmente der Hyaluronsäure produziert. Kleine Fragmente der Hyaluronsäure stimulieren die Bildung neuer Blutgefäße.

[0043] Zudem hindern GAGs, wie Hyaluronsäure, Collagen daran, eine Immunreaktion im Wirtstier auszulösen. Um dies zu erreichen, muss das Collagen mit mindestens 1 Gew.-% GAG-Säure zur Reaktion gebracht werden.

[0044] GAGs sind Träger von strukturell und biologisch aktiven Proteinen. Es wurde festgestellt, dass GAG-Proteinkomplexe eine wichtige Rolle bei der narbenfreien Wundheilung im Fötus spielen.

[0045] Aus diesem Grund führt eine Imprägnierung der Collagenmembran mit GAGs, wie Hyaluronsäure, zu einer verbesserten Gewebeneubildung in einer Wunde oder Knochenverletzung.

[0046] Vorzugsweise nimmt die GAG-Konzentration durch die Dicke der Membran zu, mit der höchsten Konzentration auf der faserigen Seite der Membran.

[0047] Das GAG-Material kann in Form eines Gels in die Membran eingeführt werden, welches auf der faserigen Seite der Membran aufgebracht wird und dann trocknet. Diese Herangehensweise führt zu einem abnehmenden Konzentrationsgradienten in die Membran hinein, während das GAG die Membran jedoch nicht vollständig durchdringt.

[0048] Auch wenn wir uns nicht durch theoretische Überlegungen einschränken lassen wollen, so wird doch angenommen, dass die Ketten der GAGs mit hohem Molekulargewicht neue Zellen an die Membranoberfläche dirigieren, wo sie unterstützend für das Zellwachstum wirken können.

[0049] Es ist deshalb besonders vorteilhaft, dass die faserige Seite der Membran die Form einer Kompositmatrix aufweist, welche GAGs enthält.

[0050] Hyaluronsäure und andere GAGs kommen natürlich im Körper vor, wobei die Haut 19 Gew.-% und das Bauchfell 13 Gew.-% Hyaluronsäure enthält. Als natürlich vorkommende Substanzen verursachen GAGs keine Probleme bezüglich Toxizität oder Resorption, sondern es wird sogar angenommen, dass als natürliche Nährstoffe für die Zellen zu fungieren.

[0051] Hyaluronsäure und andere GAGs werden industriell hergestellt und stehen daher in kommerziellen Mengen zur Verfügung.

[0052] Zweckmäßig enthalten Membranen zum Einsatz gemäß der vorliegenden Erfindung 0,1–30,0 Gew.-% GAG, z.B. Hyaluronsäure, vorteilhafterweise 2–10 Gew.-%.

[0053] Falls notwendig können andere Pharmazeutika, wie Antibiotika (z.B. Tetracycline), Chemotherapeutika (z.B. Taurolidin) und andere Medikamente, ebenfalls in die Membranen eingebettet werden.

[0054] Besonders nützlich ist die Anwendung von Membranen in der GTR entsprechend der Erfindung nach der Orofacial- oder Zahnchirurgie. Hier ist oft Knochenheilung notwendig, beispielsweise nach der teilweisen Entfernung einer Zahnwurzel oder eines Kiefertails. Der enge Mundraum macht chirurgische Eingriffe schwierig, und deshalb ist ein ungiftiges, vollresorbierbares Implantat für die GTR von großem Vorteil. Zudem ist die Natur der Membran besonders geeignet, das Wachstum von Knochenzellen zu fördern.

[0055] [Fig. 1](#) zeigt eine Membran gemäß der vorliegenden Erfindung im Gebrauch bei der Knochenheilung

eines Zahns (1), welcher um die Wurzel (2) herum viel Knochengewebe verloren hat, was zu einer Höhlung (3) führt, welche normalerweise mit dem gesunden Zahn gefüllt ist. Der Zahn (2) ragt durch eine Schicht von Bindegewebe oder Zahnfleisch (4) in einen Zahnsocket (5). Um das Einwachsen von Bindegewebe (4) in die Höhlung (3) zu verhindern wurde eine Membranhülle (6) rund um den äußersten Rand der Wunde platziert. Die Membran (6) erstreckt sich rund um die gesamte Wundhöhle (3). Die Membran hat eine glatte Seite (7) welche von der Wundhöhle (3) weg weist, und eine faserige Seite (8) welche zur Wundhöhle (3) hin weist. Die faserige Seite (8) stellt eine Hilfsfläche für neues Zellwachstum, welches von der Zahnwurzel (2) ausgeht, zur Verfügung, während die glatte Fläche (7) der Membran (6) Zellen des Bindegewebes (4) daran hindert in die Wunde einzudringen. Die Membran (6) wird langsam vom Körper resorbiert, idealerweise korreliert die Membranabsorption mit der Zeit, welche für die Wundheilung benötigt wird.

[0056] Die vorliegende Erfindung kann mit Hilfe des folgenden, nicht einschränkenden Beispiels weiter erläutert werden:

Beispiel

[0057] Die Bauchfellmembranen junger Kälber werden mechanisch vollständig von Fleisch und Fett befreit, unter fließendem Wasser gewaschen und 12 h mit 2%iger NaOH-Lösung behandelt. Dann werden die Membranen unter fließendem Wasser gewaschen und mit 0,5%iger HCl angesäuert. Nachdem das Material über seine gesamte Dicke angesäuert wurde (ca. 3 h) wird das Material gewaschen, bis ein pH-Wert von 3,5 erreicht wird. Das Material wird dann mit 7%iger Kochsalzlösung geschrumpft, mit 1%iger NaHCO₃-Lösung neutralisiert und unter fließendem Wasser gewaschen. Das Material wird danach mit Aceton dehydriert und mit n-Hexan entfettet. Der Amidstickstoffgehalt des Materials beträgt 0,47 mmol/g.

Bestimmung des Amidstickstoffgehalts:

[0058] (Eastoe, E; Courts, A; Practical Analytical Methods for Connective Tissue Proteins (1963)).

Reagenzien

1. 2 N HCl (160 ml konz. HCl auf 1 L auffüllen)
2. 0,05 M Borax-0,1 N NaOH-Lösung (19,1 g Na₂B₄O₇·10 H₂O) + 6 g NaOH in 1 l, aufgefüllt mit kaltem, destilliertem H₂O.
3. Indikator – angesetzt in Ethanol (0,33% Methylenblau + 0,05% Methylenrot)
4. 1% Borsäure mit dem Indikator
10 g Borsäure in 1 l kaltem, destilliertem H₂O
8 mL Indikator.
0,7 ml 0,1 N – NaOH
5. 0,01 N HCl

Method

1. 1 g trockenes Collagen wird in 50 ml 2N HCl dispergiert und 1 h zum Sieden erhitzt. Das Volumen wird bei 20°C auf 50 ml aufgefüllt.
2. 5 ml dieser Dispersion werden zusammen mit 20 ml von Lösung 2 in ein Mikrokjehldahl-Gefäß gefüllt; das Gemisch wird in 20 ml von Lösung 4 destilliert. Die Destillation dauert 6 min.
3. Die Lösung wird mit Reagenz 5 titriert.

Berechnung

ml Säureverbrauch × 20 = mmol% Amid-N

Beispiel

1,36 ml 0,01 N HCl × 20 = 27,2 mmol%
= 0,27 mmol/g Amid-N

Patentansprüche

1. Verwendung einer physiologisch verträglichen und resorbierbaren Collagenmembran, die durch Reini-

gung einer natürlichen Collagenmembran gewonnen wird, sodass diese im Wesentlichen ihre natürliche Collagenstruktur beibehält, und die gegenüberliegende faserige und glatte Seiten hat, zur Herstellung eines GTR-Implantats zur Einbringung in den menschlichen oder tierischen Körper, wobei die Membran so angewandt wird, dass die besagte faserige Seite zu jenem Gebiet des besagten Körpers gerichtet ist, in welchem Gewebeheilung notwendig ist, und dass Zellwachstum darauf möglich ist, und dass die besagte, gegenüberliegende, glatte Seite Zellanlagerung darauf verhindert und als Barriere fungiert, welche den Durchtritt von Zellen durch die Membran verhindert.

2. Verwendung nach Anspruch 1, bei der die besagte Membran aus der Bauchfell-, Herzbeutel-, Plazenta- oder Basalmembran eines Säugetiers gewonnen ist.

3. Verwendung nach Anspruch 2, bei der die besagte Bauchfellmembran von Kälbern oder Ferkeln stammt.

4. Verwendung nach Anspruch 3, bei der die besagte Bauchfellmembran von einem 6–8 Wochen alten Schwein stammt.

5. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, bei der die besagte Membran im Wesentlichen frei von Fett ist.

6. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 5, bei der die besagte Membran im trockenen Zustand eine Dicke von 0,1–1,0 mm hat.

7. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 6, bei der das Collagen quervernetzt ist, ohne nicht-resorbierbar zu werden.

8. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 7, bei der die faserige Seite der Membran mit Glycosaminoglycan imprägniert ist.

9. Verwendung nach Anspruch 8, bei der es sich bei dem Glycosaminoglycan um Hyaluronsäure handelt.

10. Verwendung nach Anspruch 8, bei der es sich bei dem Glycosaminoglycan um Chondroitinsulfat, Dermatan-sulfat und/oder Keratansulfat handelt.

11. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 10, bei der die imprägnierte Membran 0,1 bis 30,0 Gew.-% Glycosaminoglycan enthält.

12. Verwendung nach Anspruch 11, bei der die imprägnierte Membran 2 bis 10 Gew.-% Glycosaminoglycan enthält.

13. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, bei der das hergestellte Implantat ein oder mehrere Pharmazeutika enthält.

14. Verwendung nach Anspruch 13, bei der das hergestellte Implantat Taurolidin enthält.

15. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 14, bei der das hergestellte Implantat zur GTR von Knochengewebe des besagten Körpers dient.

16. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, bei der das hergestellte Implantat der GTR in der Mundregion besagten Körpers dient.

17. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 16, bei der eine Säugetiercollagenmembran mit einer glatten und einer faserigen Seite mit Alkali behandelt wird, um Fette zu verseifen und alkaliempfindliche Substanzen zu entfernen, und dann angesäuert wird, um säureempfindliche Substanzen zu entfernen, gefolgt von Waschen, Trocknen und Entfetten, sodass eine physiologisch verträgliche und resorbierbare Collagenmembran entsteht, welche weitgehend ihre natürliche Collagenstruktur beibehält.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

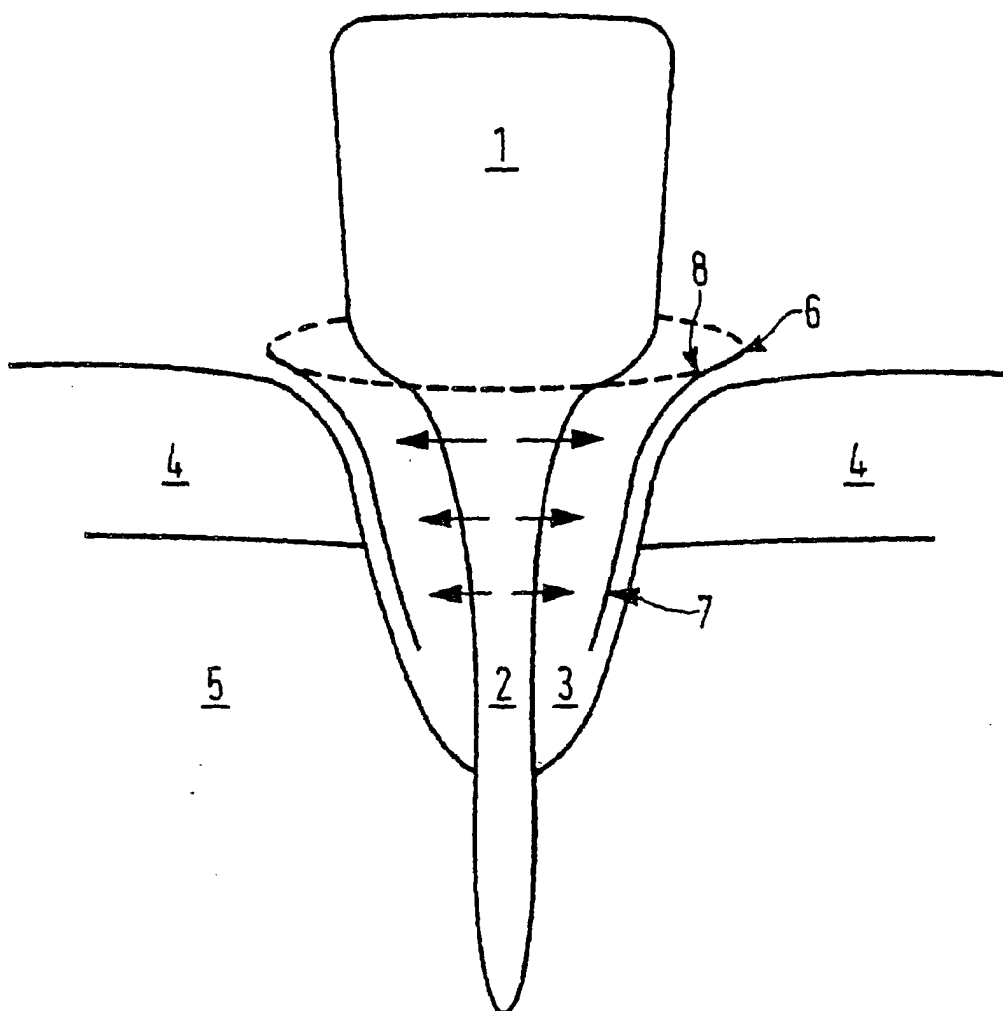


FIG.1