



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 33 377 T2** 2009.01.02

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 278 559 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 33 377.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/13617**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 928 939.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/082992**

(86) PCT-Anmeldetag: **27.04.2001**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **08.11.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **29.01.2003**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **26.03.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **02.01.2009**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61L 27/36** (2006.01)  
**A61L 27/38** (2006.01)

(30) Unionspriorität:  
**200220 P 28.04.2000 US**

(73) Patentinhaber:  
**Baylor College of Medicine, Houston, Tex., US**

(74) Vertreter:  
**Patentanwälte Lippert, Stachow & Partner, 51427  
Bergisch Gladbach**

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

(72) Erfinder:  
**CHEN, Changyi, Decatur, GA 30033, US;  
LUMSDEN, Alan B., Atlanta, GA 30324, US**

(54) Bezeichnung: **DEZELLULARISIERTE GEFÄSSPROTHESEN**

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**

## Technisches Gebiet der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf dezellularisierte Gefäßprothesen, die beständig gegenüber Verschluss durch Thromben sind und einen niedrigen Grad von Immunogenität aufweisen. Die Gefäßprothesen sind frei von Zellen und beschichtet mit einem antithrombogenen Wirkstoff und mit einem Wachstumsfaktor, der die Neubildung von Zellen fördert und ferner die Immunogenität vermindert.

## Technischer Hintergrund der Erfindung

**[0002]** Die chronische Veneninsuffizienz ist in den Vereinigten Staaten und weltweit ein großes gesundheitliches Problem. Mehr als 7 Millionen Menschen sind betroffen und mindestens 500 000 entwickeln daraus ein Unterschenkelgeschwür. Jährlich treten schätzungsweise 900.000 neue Fälle auf. Die chronische venöse Insuffizienz ist ein allgemeiner Begriff, der alle Ursachen der chronischen Venenkrankheit einschließt. Sie tritt in einer primären Form mit gedehnten Klappen und erweiterten Venenwänden und in einer auf Thrombophlebitis folgenden Sekundärform mit vernarbten und verformten Klappen und verdickten Venenwänden mit Längssepta und schwer geschädigtem Lumen auf. Andere Ursachen der venösen Insuffizienz, wie Klappenaplasie, kongenitale Missbildungen und externe Obstruktion treten weniger häufig auf.

**[0003]** Die mit der venösen Insuffizienz verbundenen klinischen Symptome reichen von schweren Schmerzen und wiederkehrenden Geschwürbildungen bis zu nicht manifesten Symptomen. Die betroffene Stelle scheint für die Schwere der Symptome wichtig zu sein. So ist die Varikose des oberflächlichen Venensystems gewöhnlich gutartig und die Inzidenz von ernsten Komplikationen ist niedrig. Dagegen ist die Insuffizienz der tiefen Venen oder der Perforansvenen häufiger mit Schmerzen, Schwellung, Geschwürbildung und langandauernder Behinderung verbunden.

**[0004]** Die gegenwärtigen grundsätzlichen Behandlungsverfahren der venösen Insuffizienz beruhen auf der Verhinderung des Refluxes und der Verminderung des venösen Drucks. Jedoch zielen die konservativen Behandlungen, darunter Bettruhe, Hochlegen der Gliedmaßen, Verabreichung milder Diuretika und elastische Kompressionsstrümpfe mehr auf die Linderung der Symptome als auf die zu Grunde liegende Erkrankung. Sie sind nicht besonders erfolgreich.

**[0005]** Eine direkte Klappenplastik kann durch Straffung überflüssiger spitzer Ränder ausgeführt werden, während eine indirekte Klappenplastik eine Manschette aus Dacron oder Polytetrafluorethylen (PTFE) um die Klappe herum anwendet. Ungeachtet merklicher Gewinne bei den hämodynamischen Messungen tritt eine klinische Verbesserung häufig weniger hervor. Reparatur und Ersatz der Venenklappen sind Versuche, die Leistungsfähigkeit des tiefen Venensystems wieder herzustellen. Die Reparatur der Venenklappen ist jedoch der Beschränkung unterworfen, dass sie nur für Patienten ohne vorausgegangene tiefe Venenthrombose geeignet ist. Wenn der Klappenmechanismus merklich beschädigt oder zerstört ist, kann die Klappentransplantation die einzige verfügbare Option sein, die eine Linderung der Symptome und eine Verminderung des venösen Drucks bietet.

**[0006]** Menge und Qualität der Spenderklappen bleiben in hohem Maße problematisch. Beim typischen Patienten sind bis zu 30 bis 40% der brachialen oder axillaren Klappen fehlerhaft. Zusätzlich haben viele Patienten ein erweitertes Venensystem, das nicht zu einem axillaren oder brachialen Venentransplantat mit kleinerem Durchmesser passt. Folglich unterliegt die Klappentransplantation beträchtlichen Einschränkungen bei der Anwendung als chirurgische Methode.

**[0007]** Kleinkalibrige Gefäßtransplantate mit Innendurchmessern von weniger als 6 mm werden in großem Umfang für Bypässe der Aorta-Koronararterie und der Infrapoplitealarterie zur Behandlung der arteriellen Verschlusskrankung und als arteriovenöse Zuleitungen für die Hämodialyse im Endstadium der Nierenerkrankung verwendet. Zurzeit sind weiterhin autogene Saphenavenen die meist verwendeten Gefäßprothesen für Verfahren zur Rekonstruktion kleinkalibriger Arterien. Die primäre Durchgängigkeit eines arteriellen Bypass mit Saphenavenen nach vier Jahren ist 40–70%. Ein praktisches Hindernis für die Herstellung solcher Bypässe ist jedoch die Tatsache, dass 10 bis 40% der Patienten keine brauchbare Saphenavene haben, die erfolgreich transplantiert werden kann.

**[0008]** Die vorausgehende Gewinnung von Gefäßgewebes zur Verwendung bei chirurgischen Verfahren am Herzen oder an Gefäßen, Venenstripping der Varikose und vorausgehende Thrombophlebitis sind die meist

verbreiteten Gründe für eine erfolglose autogene Saphenavenen-Transplantation. Für die klinische Anwendung werden alternative Quellen für kleinkalibrige Gefäßprothesen mit einer Durchgängigkeit, die vergleichbar oder besser als jene der autogenen Saphenavenen ist, dringend benötigt.

**[0009]** Es wurden auch allogene venöse Transplantate von Leichen verwendet. Diese liefern eine annehmbare Funktion des frischen Transplantats, zeigen nach zwei Jahren jedoch schlechte Ergebnisse. Moderne Verfahren der Kryokonservierung, darunter Einfrieren mit gesteuerter Geschwindigkeit, Lagerung bei  $-190^{\circ}\text{C}$  und Gefrierschutzmittel wie Dimethylsulfoxid und Chondroitinsulfat verbessern die Lebensfähigkeit von kryokonservierten allogenen Saphenavenen-Transplantaten. Erfolgreiche Ergebnisse mit unveränderten kryokonservierten allogenen Saphenavenen-Transplantaten für die Rekonstruktion der infrainguinalen Tibia-Arterie erreichten eine Durchgängigkeit im Bereich von 10 bis 50% nach einem Jahr. Die langfristigen Vorteile für den Patienten wurden jedoch durch Abstoßung und unerwartet frühen Verschluss des Venentransplantats beeinträchtigt. Die mit mechanischem Versagen des Gefäßes, wie Aneurysma oder Ruptur des Transplantats, zusammenhängenden Komplikationen traten im Vergleich mit frischen autogenen Venen häufiger auf und verursachten höhere Morbidität.

**[0010]** Synthetische Gefäßprothesen aus Dacron und PTFE haben einen gewissen klinischen Erfolg erzielt, obwohl sie für die Rekonstruktion großer und mittelgroßer Arterien nicht ideal sind. Außerdem neigen Ersatzgefäße mit einem Durchmesser von weniger als 6 mm zu einem frühen Verschluss des Transplantats. Das am häufigsten angetroffene Versagen synthetischer Transplantate beruht auf Thrombose und anastomotischer Hyperplasie. Die den synthetischen Transplantatmaterialien innewohnenden Eigenschaften und ihre begrenzte spontane Reendothelisierung beim Menschen tragen zur hohen Thrombogenität der Oberfläche bei.

**[0011]** Das Implantieren von mit Glutaraldehyd fixierten Nabelvenen-Transplantaten von Rindern und Menschen wurde umfangreich geprüft und wegen des häufigen Auftretens von Aneurysmen innerhalb von zwei Jahren nach dem Implantieren weitgehend verworfen. Die meisten dieser Transplantate versagten wegen verzögerter Heilung der Gefäße und degenerativer Veränderungen. Die Immunreaktion auf das hoch immunogene, chemisch modifizierte Venenmaterial war gekennzeichnet durch Einwanderung vielkerniger Riesenzellen und verminderter Rezellularisierung des Transplantats. Außerdem störte die Fixierung mit Glutaraldehyd die natürliche Konfiguration des Matrixproteins. Die cytotoxische Wirkung des Glutaraldehyds verhinderte die Einwanderung von Zellen in die Wand des Transplantats. Die Degeneration der Transplantate führte zu einer hoch thrombogenen Oberfläche und daraus folgendem Verschluss der Gefäße durch Thrombose.

**[0012]** Bei einer bestimmten Prothese tragen viele Faktoren zum erreichten Ausmaß der Durchgängigkeit bei. Dazu gehören die dem gewählten Material innewohnenden Eigenschaften, die Thrombogenität der Oberfläche, die Verträglichkeit, und bei textilen Transplantaten die Porosität. Die Oberflächeneigenschaften des Materials scheinen entscheidend dafür zu sein, die gewünschte langfristige Durchlässigkeit von kleinen Ersatzgefäßen sicherzustellen. Zahlreiche Forscher haben versucht, durch Modifizieren des Prothesenmaterials, um es biologisch inert zu machen, die klinische Leistungsfähigkeit von Gefäßtransplantaten mit kleinem Durchmesser zu optimieren, aber ein solches inertes Material muss erst noch entwickelt werden. Ein alternativer Lösungsweg zur Optimierung der biologischen Komponenten des Prothese-Gewebe-Komplexes führte zur Entwicklung von Biohybrid-Materialien. Einige Beispiele umfassen synthetisches Material, das mit lebensfähigen Zellen gepimpft ist, Beschichtungen aus biologischen Verbindungen wie Albumin und Kollagen und aus Polymeren, die für günstige biologische Reaktionen bekannt sind, synthetisierte Materialien.

**[0013]** Im Allgemeinen haben von Tieren oder Menschen gewonnene biologische Materialien spezielle und einzigartige mikrostrukturelle, mechanische, hämodynamische und biochemische Eigenschaften, die mit der gegenwärtig verfügbaren Technologie nicht völlig reproduziert werden können. Daher haben biologisch gewonnene Materialien ein großes Potenzial als Rohstoffe für implantierbare künstliche Organe. Die Verwendung von Schweineorganen zur Xenotransplantation ist eine attraktive Option, um den Mangel an verfügbaren Organen für die Transplantation in Menschen zu überwinden. Das Problem der akuten Abstoßung bleibt jedoch ungeklärt. Für die beim Wirt hervorgerufene Abstoßungsreaktion sind hauptsächlich die Moleküle auf der Zelloberfläche der xenogenen Organe verantwortlich. So ist die Immunabstoßung von allogenen oder xenogenem Gewebe und die daraus folgende Abnahme der Langzeitstabilität des Transplantats Haupthindernisse für die erfolgreiche Entwicklung des idealen Transplantats.

**[0014]** Die am stärksten immunogenen Teile von allogenen oder xenogenen Gefäßtransplantaten sind die Zellbestandteile. Dagegen zeigt reifes Kollagen geringe oder gar keine Antigenität, insbesondere wenn es von Individuen derselben Art übertragen wird. Beispielsweise ist die Induktion einer Immunreaktion gegen gereinigtes Rinderkollagen, wenn es für kosmetische Zwecke injiziert wird, oder in mit Rinderkollagen imprägnierten

Gefäßstransplantaten, sehr gering. Andererseits macht die chemische Vernetzung des Kollagens dieses hoch immunogen und kann die Biokompatibilität mit dem Wirt drastisch vermindern.

**[0015]** Eine leicht verfügbare synthetische, biologische oder biohybride Venenklappe in verschiedenen Größen würde die rekonstruktive Venenchirurgie, einschließlich des erwünschten Zieles, Klappen an mehreren Stellen einzusetzen, sehr erleichtern. Die Entwicklung einer Klappenprothese für Gefäße oder Venen, welche die Wahrscheinlichkeit der langfristigen Thrombose und Immunabstoßung vermeidet, würde die Behandlung der chronischen venösen Insuffizienz revolutionieren.

**[0016]** Auch bei implantierbaren Stents für Gefäße gibt es Probleme mit Thrombogenität und schlechter Gewebeerträglichkeit. Gefäßstents sind Stützvorrichtungen, die zur Verstärkung oder Dehnung eines Blutgefäßes nach Ballonangioplastie oder Endarterektomie angewendet werden. Sie werden aus synthetischem Material hergestellt, das typischerweise thrombogen ist und geringe Gewebeerträglichkeit hat. Stents versagen hauptsächlich wegen thrombolytischen Verschlusses und Restenose durch übermäßiges Gewebewachstum.

**[0017]** Daher besteht ein Bedürfnis nach einem Transplantat, das haltbar ist und seine strukturelle Integrität aufrechterhalten kann. Insbesondere muss es seine mechanische Festigkeit in allen Dimensionen erhalten, so dass Verformungen durch Aufweitung und Streckung minimiert werden. Das Transplantat muss lange Zeit lagerfähig sein. Es muss in vielen Größen verfügbar sein, um die große Vielfalt von Gefäßrekonstruktionen zu bedienen. Die Prothese muss Infektionen widerstehen. Bei der Operation muss das ideale Transplantat hervorragende Eigenschaften bei der Handhabung haben, darunter Flexibilität, leichtes Anbringen der Naht und minimale Nahtloch- und interstitielle Blutung. Die Nachgiebigkeit des idealen Transplantats sollte sich nahe an die des Wirtgefäßes annähern. Idealerweise sollte die Turbulenz an der Anastomose minimal sein, um Intimahyperplasie zu vermindern. Außerdem sollte nach dem Anbringen im Patienten die innere Oberfläche beständig gegen Thrombozytenaggregation und Thrombose sein und Immunogenität vermeiden, wie sie durch chemische Modifikation von biologischem Material hervorgerufen werden kann. Schließlich muss in dieser Zeit der Kostenbeschränkung das Transplantat relativ kostengünstig und leicht herzustellen sein.

**[0018]** Pieper et al. (2000), Biomaterials 21(6): 581–593, offenbaren das Konzept, Glykosaminoglykane unter Verwendung von 1-Ethyl-3-(dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid kovalent an Kollagen zu binden.

**[0019]** US-A-5,899,936 offenbart eine Gefäßprothese, die dezellularisiert, mit Zelladhäsionsfaktoren, einem Glykosaminoglykan und einem Wachstumsfaktor behandelt und dann durch Inkubation mit einem speziellen Zelltyp rezellularisiert ist. US-A-5,899,936 offenbart keine kovalent mit einer antithrombogenen Verbindung und einem Wachstumsfaktor verbundene Gefäßprothese, bei der das Gefäßgewebe vor der Implantation dezellularisiert bleibt.

**[0020]** WO 98/04300 offenbart ein Verfahren zur Behandlung von Geweben unter Verwendung von lebensfähigen oder nicht lebensfähigen Zellen, bevorzugt Mikroorganismen. Die Erfindung bezieht sich insbesondere auf die Verwendung von Mikroorganismen als in vitro-Quelle von Verbindungen für die Verarbeitung von Gewebe zur Herstellung von Biomaterial, das bei der Herstellung von Bioprothesen verwendbar ist. WO 98/04300 offenbart, dass ein erfindungsgemäß behandeltes Bioprothese-Gewebe weiter bearbeitet werden kann, offenbart aber nicht explizit, dass es zur Verbindung des Gewebes mit einer antithrombogenen Verbindung und einem Wachstumsfaktor verwendet werden kann.

#### Zusammenfassung der Erfindung

**[0021]** Die vorliegende Erfindung löst die oben beschriebenen Probleme durch Bereitstellung einer Gefäßprothese, umfassend dezellularisiertes, an eine antithrombogene Verbindung kovalent gebundenes Gefäßgewebe, wobei die antithrombogene Verbindung ferner an einen Wachstumsfaktor nichtkovalent gebunden ist. Die dezellularisierten Blutgefäße und Gefäßklappen umfassen Kollagen- und Elastinmatrixproteine von minimaler Immunogenität, einen antithrombogenen Wirkstoff und einen Wachstumsfaktor zur Förderung der Rezellulierung des Transplantats.

**[0022]** Die erfindungsgemäßen Gefäßprothesen haben neuartige Eigenschaften, die Vorteile gegenüber derzeitigen synthetischen oder modifizierten natürlichen Gefäßstransplantaten bieten. Die Rezellulierung der Transplantate beseitigt die Hauptursache für die Induktion der Immunabstoßung. Diese Prothesen sind auch geeignete Substrate für das Einwandern von Gefäßzellen des Wirts, das Anheften von Zellen, Proliferation, Migration und Differenzierung, weil sie aus nativen Matrixproteinen bestehen.

**[0023]** Die kovalentes Verknüpfung der Gefäßprothese mit einem antithrombogenen Wirkstoff, einschließlich von, aber nicht beschränkt auf Heparin, eröffnet eine nichtkovalente Verknüpfungsstelle für Wachstumsfaktoren wie Heparin bindende Wachstumsfaktoren, einschließlich von, aber nicht beschränkt auf den basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), der die Heilung und Remodellierung der Gefäße verbessert und beschleunigt. Daher haben die erfindungsgemäßen biotechnischen biologischen Gefäßprothesen langfristige Durchgängigkeit und geringere Wahrscheinlichkeit für postoperative Komplikationen. Diese Transplantate begünstigen die Patienten, indem die Rekonvaleszenz beschleunigt und die Möglichkeit der Abstoßung oder Blockierung des Transplantats vermindert wird.

**[0024]** Die erfindungsgemäßen dezellularisierten Transplantate bestehen hauptsächlich aus Kollagen- und Elastinmatrixproteinen, die unter den Arten weitgehend erhalten sind und geringe Immunogenität aufweisen. Dies erlaubt die Verwendung von xenogenen Transplantaten einer Art für eine andere, vermindert die derzeitige Abhängigkeit von allogenen Quellen für Transplantatmaterial und erweitert wesentlich die Versorgung mit verfügbaren Prothesen. Die dezellularisierte Matrix ist bei Langzeitlagerung stabil, so dass das gewünschte Transplantat bei Bedarf leicht verfügbar ist. Diese Eigenschaft ermöglicht dem Gefäßchirurgen, eine Prothese auszuwählen, die besser dem Durchmesser des aufnehmenden Blutgefäßes entspricht. Daher erhält man einen besseren Blutstrom, bei dem eine anastomotische Thrombusbildung weniger wahrscheinlich ist.

**[0025]** Die erfindungsgemäßen Gefäßprothesen erlauben auch, andere pharmazeutische Wirkstoffe an die immunologisch inerte biologische Matrix zu binden oder anderweitig zu immobilisieren. Diese und andere Vorteile der vorliegenden Erfindung können mit den derzeit verfügbaren Technologien nicht erzielt werden.

**[0026]** Es ist daher ein Ziel der vorliegenden Erfindung, eine Gefäßprothese bereitzustellen, die einen an der dezellularisierten Gefäßprothese immobilisierten antithrombogenen Wirkstoff umfassen kann, um Oberflächen mit verminderter Thrombogenität zu schaffen.

**[0027]** Es ist ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung, eine Gefäßprothese mit verminderter Immunogenität bereitzustellen, die ein hohes Maß mechanischer Festigkeit für eine Langzeitstabilität aufrecht erhält und für die chirurgische Implantation geeignet ist.

**[0028]** Noch ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, eine Gefäßprothese bereitzustellen, die lagerstabil ist.

**[0029]** Es ist ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung, eine dezellularisierte Gefäßprothese bereitzustellen, welche eine ausreichende mechanische Festigkeit behält, um der Bildung eines Aneurysmas zu widerstehen, und die das chirurgische Nähen bei minimaler Leckage am Ort der Naht unterstützt.

**[0030]** Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, eine dezellularisierte, antithrombogene, an einen Wachstumsfaktor gebundene Gefäßprothese mit synthetischen Gefäßstents und Stentklappenvorrichtungen zu kombinieren.

**[0031]** Noch ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zur Dezellularisierung von Gefäßgewebe bereitzustellen, so dass dieses eine verminderte Thrombogenität und Immunogenität aufweist und sich an die mechanische Festigkeit von nativen Blutgefäßen annähert.

**[0032]** Es ist auch ein Ziel der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren zur Verknüpfung dezellularisierten Gefäßgewebes mit zumindest einem antithrombogenen Wirkstoff und zum Anbringen einer zweiten Verknüpfung mit zumindest einem Zellwachstumsfaktor bereitzustellen, so dass das modifizierte Gefäßgewebe als Gefäßprothese verwendet werden kann.

**[0033]** Die erfindungsgemäßen dezellularisierten, heparinierten und an den Wachstumsfaktor gebundenen Gefäßgewebe sind den derzeit verwendeten Prothesen überlegen, weil sie xenogene Transplantate mit verminderter Neigung zu immunologischer Abstoßung bereitstellen.

**[0034]** Noch ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, dass die dezellularisierten, heparinierten, ein Wachstumsfaktor gebundenen Gefäßprothesen in vielfältigen Verfahren zum Ersatz oder zur Rekonstruktion von Gefäßen, bei der Transplantation von Venenklappen bei chronischer venöser Insuffizienz, zum Ersatz von Venen, zum Ersatz von Herzklappen und als Gefäßflicken nach Endarterektomie der Carotisarterie, Thrombektomie der Femoralarterie und anderen Reparaturen von Gefäßwänden Anwendung finden können.

**[0035]** Ein weiterer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist es, dass die Kombination aus dezellularisiertem Gefäßimplantat, Heparin und Heparin bindendem Wachstumsfaktor eine neue technologische Plattform für die Entwicklung von vielen Medizinprodukten bereitstellt.

**[0036]** Diese und andere Merkmale, Aufgaben und Vorteile der Erfindung und bevorzugte erfindungsgemäße Ausführungsformen werden aus der folgenden eingehenden Beschreibung offensichtlich.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0037]** [Fig. 1A](#) und [Fig. 1B](#) zeigen die Nachgiebigkeit (Elastizität) verschiedener Gefäßprothesen, gezeigt durch die Veränderung des Durchmessers der Prothese bei unterschiedlichem Innendruck.

**[0038]** [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) zeigen den Einfluss von bFGF auf die Zellproliferation und die Migration in vitro.

**[0039]** [Fig. 3A](#) zeigt die kovalente Bindungseffizienz und die Stabilität von dezellularisierten Schweinearterien bei der Lagerung in 70% Alkohol über verschieden lange Zeit.

**[0040]** [Fig. 3B](#) zeigt die kovalente Bindungseffizienz und die Stabilität von dezellularisierten Schweinearterien bei Inkubieren in PBS bei 37°C über verschiedene lange Zeit.

**[0041]** [Fig. 4](#) zeigt den Berstdruck von Gefäßen, die in Alkohol konserviert wurden, dezellularisiert oder mit Heparin behandelt.

**[0042]** [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#) zeigen die Nahtfestigkeit von frischen, in Alkohol konservierten und mit Heparin behandelten Gefäßen.

#### Eingehende Beschreibung der Erfindung

**[0043]** In einer Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung dezellularisierte Gefäßprothesen bereit, an denen ein antithrombogener Wirkstoff immobilisiert ist und bei denen ein Wachstumsfaktor an den antithrombogenen Wirkstoff gebunden ist. Die Entfernung der Zellbestandteile des Gefäßgewebes eliminiert die Hauptquelle der antigenen Determinanten des Gewebes und vermindert weitgehend das immunogene Potenzial der Transplantate. Der antithrombogene Wirkstoff vermindert die Wahrscheinlichkeit einer Gefäßthrombose, die typischerweise postoperative Komplikationen wegen der hoch thrombogenen Natur des frisch freigelegten Kollagens des entkleideten Transplantats verursacht.

**[0044]** Die Beschichtung des Transplantatgewebes mit zumindest einem Wachstumsfaktor fördert die Rezellularisierung des inerten Matrixgewebes, was die Durchgängigkeit des Transplantats wesentlich steigert, und vermindert die Möglichkeit der Abstoßung oder Stenose des Gefäßes. Dies verringert die Beschwerden und die Gefahr für den Patienten, der andernfalls weitere Korrekturmaßnahmen, einschließlich Nachoperation, benötigen würde. In einer Ausführungsform bietet die vorliegende Erfindung ein immunologisch inertes Prothesenmaterial, das bei Langzeitlagerung stabil ist, leicht mit Wachstumsfaktor beschichtet werden kann und die Prognose für eine erfolgreiche Gefäßtransplantation verbessert. Diese Transplantate sind für den Empfänger immunologisch annehmbar und widerstehen dem Verschluss durch Thrombose oder Restenose.

**[0045]** In einer anderen Ausführungsform stellt die vorliegende Erfindung Verfahren zum Dezellularisieren eines ausgeschnittenen Gefäßgewebes und zum Verknüpfen der extrazellulären Matrix mit einem antithrombogenen Wirkstoff und einen Wachstumsfaktor bereit. Dieses Verfahren setzt aufeinander folgende Schritte ein: Einweichen des Gewebes in Wasser, mechanischer Entfernung der Zelltrümmer, und dann Behandeln des Gewebes mit zumindest einer Protease, zumindest einer Lipase und zumindest einer Nuklease. Die Prothese wird in mindestens einem Netzmittel gespült und mit dem Fachmann bekannten Mitteln gelagert, so dass ihre strukturelle und mechanische Integrität und die antithrombogene Beschichtung erhalten bleiben.

**[0046]** Der Begriff "Gefäßgewebe" wird hier so verwendet, dass er ein Blutgefäß, einen Abschnitt davon, eine oder mehrere aus einem Blutgefäß ausgeschnittene Klappen, eine in einem Abschnitt eines Blutgefäßes zurückgehaltene Klappe, eine ausgeschnittene und von nicht zur Klappe gehörendem Gewebe freie Aorten- oder Lungenklappe, eine in ausgeschnittenen Blutgefäßen oder im Herzgewebe zurückgebliebene Aorten- oder Lungenklappe oder beliebiges anderes Gefäßgewebe, das für die Verwendung als Prothese geeignet ist, bedeutet. Blutgefäße können Arterien und Venen, Abschnitte davon und Gefäßbetten mit Arterien oder Venen umfassen.

**[0047]** Der Begriff "dezellularisiert" wird hier so gebraucht, dass die Zellbestandteile aus dem Gefäßgewebe durch physikalische, chemische oder enzymatische Mittel oder eine beliebige Kombination daraus entfernt wurden. Das zurückbleibende dezellularisierte Gefäßgewebe umfasst die extrazelluläre Matrix des nativen Gefäßgewebes und kann, ohne darauf beschränkt zu sein, Elastin, Kollagen, Fibrin und andere extrazelluläre Proteine oder Nichtproteinverbindungen umfassen, die in Gefäßgewebe zu finden sind, oder eine beliebige dem Fachmann bekannte Kombination aus diesen.

**[0048]** Der Begriff "Prothese", "Gefäßprothese", "Gefäßprothesen" oder "Gefäßimplantat" sind hier so verwendet, da sie ein chirurgisches Implantat oder Implantate bedeuten, die aus dem Gefäßsystem eines menschlichen oder tierischen Patienten abgeleitet oder in dieses eingesetzt sind. Der Begriff soll auf chirurgische Implantate aus synthetischen oder natürlichen Materialien oder eine beliebige Kombinationen daraus angewendet werden, einschließlich, aber nicht beschränkt auf dezellularisiertes Gefäßgewebe.

**[0049]** Der Begriff "Transplantat" wird hier so verwendet, dass er ein beliebiges chirurgisches Implantat bedeutet, sei es von Geweben des empfangenden Patienten oder von Geweben eines Spenders derselben oder einer anderen Art als der Empfänger abgeleitet. Das Transplantat kann vollständig oder teilweise synthetisch sein und aus beliebigem geeignetem, dem Fachmann wohlbekanntem Material bestehen.

**[0050]** Der Begriff "antithrombogenen Wirkstoff" wird hier so verwendet, dass er eine beliebige Verbindung oder eine Kombination von Verbindungen bedeutet, welche die Induktion der Thrombusbildung oder die Stabilität des Thrombus minimieren. Antithrombogene Verbindungen umfassen Glykosaminoglykane wie Heparin, Heparinsulfat, Dermatansulfat und jedes andere dem Fachmann bekannte Glykosaminoglykan mit antithrombotischer Aktivität. Antithrombogene Verbindungen können auch Dextran und seine Derivate, Hirudin und seine Derivate und Cumarin und seine Derivate umfassen, einschließlich von, aber nicht beschränkt auf 4-Hydroxycumarin, Warfarin, Dicumarol, Phenprocumon und Acenocumarol, Indan-1,3-dion, Anisidon und jede andere dem Fachmann bekannte verwandte Verbindung. Die antithrombogene Verbindung kann thrombolytische Wirkstoffe umfassen, einschließlich von, aber nicht beschränkt auf Proteine, die Blutthrombi auflösen, einschließlich Urokinase, Plasminogenaktivator, Antithrombin III und modifizierte Formen von diesen. Die antithrombogene Verbindung kann auch jede andere Verbindung umfassen, die auf einer dezellularisierten Gefäßprothese immobilisiert werden kann und welche die Bildung von thrombolytischen Verschlüssen der Gefäßprothese verhindert oder bei deren Destabilisierung mitwirkt.

**[0051]** Der Begriff "Wachstumsfaktor" wird hier so verwendet, dass er jedes Protein oder jede Nichtproteinverbindungen bedeutet, welche das Wachstum von Zellen induzieren oder fördern kann. Solche Zellen umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten. Wachstumsfaktoren können, ohne darauf beschränkt zu sein, den Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), den basischen Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), den sauren Fibroblastenwachstumsfaktor (aFGF), den Heparin bindenden Epidermiswachstumsfaktor (HBEGF), den von Thrombozyten abgeleiteten Wachstumsfaktor (TDGF), den Epidermiswachstumsfaktor (EGF), den transformierenden Wachstumsfaktor Alpha (TGF- $\alpha$ ), den transformierenden Wachstumsfaktor Beta (TGF- $\beta$ ), den Gefäßendothelzellen-Wachstumsfaktor (VEGF), den Plazenta-Wachstumsfaktor (PIGF), den insulinartigen Wachstumsfaktor (IGF) oder jeden anderen dem Fachmann bekannten Wachstumsfaktor, oder ein Fragment oder Derivat davon, umfassen.

**[0052]** Die Begriffe "Stent" und "Gefäßstent" werden hier so verwendet, dass sie eine in einen Patienten implantierte Prothesenvorrichtung bedeuten, sei es im Lumen eines Blutgefäßes oder das Äußere eines Blutgefäßes umschließend. Die Vorrichtung kann ganz oder teilweise aus synthetischem Material bestehen, einschließlich von, aber nicht beschränkt auf Dacron, PTFE oder anderes vom Fachmann verwendetes Material. Die synthetische Stentvorrichtung kann auch mit biologisch erhaltenem Material kombiniert werden oder ausschließlich aus nicht synthetischem Material bestehen.

**[0053]** Der Begriff "allogen" wird hier so verwendet, dass er ein Transplantat aus chirurgisch implantiertem Material bedeutet, das von einem Spender einer Art gewonnen wurde und in einem Empfänger der gleichen Art verwendet wird.

**[0054]** Der Begriff "xenogen" wird hier so verwendet, dass er ein Transplantat aus chirurgisch implantiertem Material bedeutet, das von einem Tier einer Art gespendet und in einen Empfänger einer anderen Art implantiert wurde. Die Arten der Spender können Schweine, Schafe, Kühe, verschiedene Primaten, Menschen und jede genetisch modifizierte Variante von diesen umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein.

**[0055]** Die Begriffe "Protease" oder "Peptidase" werden hier so verwendet, dass sie jedes Enzym bedeuten,

das ein Protein zu Peptiden oder ein Peptid zu den Aminosäurebestandteilen verdauen kann, einschließlich von, aber nicht beschränkt auf Trypsin, Proteinase K oder jede andere dem Fachmann bekannte Protease oder Peptidase.

**[0056]** Der Begriff "Lipase" wird hier so verwendet dass er jedes dem Fachmann bekannte Enzym, modifiziertes Enzym oder Kombinationen aus diesem bedeutet, welches Lipide verdauen kann.

**[0057]** Der Begriff "Nuklease" wird hier so verwendet, dass er ein Enzym oder ein chemisches Verfahren oder Kombinationen daraus bedeutet, welche spezifisch Nukleinsäuren abbauen und zerstören, einschließlich von, aber nicht beschränkt auf Desoxyribonuklease (DNase), Ribonuklease (RNase), Mikrokokkenuklease, Exonuklease III, S1-Nuklease oder jede andere den Fachmann bekannte Nuklease.

**[0058]** Der Begriff "Netzmittel" wird hier so verwendet, dass er jede Verbindung oder Zusammensetzung bedeutet, welche Lipide aus Gewebe solubilisieren und extrahieren kann, einschließlich von, aber nicht beschränkt auf Triton X-100, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumlaurylsulfat (SLS) oder jedes andere den Fachmann bekannte Netzmittel oder Kombinationen daraus.

**[0059]** Die Entfernung der Zellbestandteile aus Gefäßgewebe eliminiert die Hauptquelle der Immunogenität einer von einem natürlichen Spender gewonnenen Gefäßprothese. Die vorliegende Erfindung führt keine künstliche Immunogenität ein, weil eine chemische Vernetzung der Matrixproteine vermieden wird.

**[0060]** Die erfindungsgemäßen Prothesen haben mehrere Anwendungen, einschließlich von, aber nicht beschränkt auf Verfahren zur Rekonstruktion von Arterien, Behandlung von arteriellen Verschlusserkrankungen, Verfahren zum Ersetzen oder zur Rekonstruktion von Venen, Behandlung von venösen Verschlusserkrankungen, venöse Klappentransplantate und Modifikationen von Gefäßstents zur Verwendung bei der Behandlung von Gefäßstenosen. Die vorliegende Erfindung ist als prothetischer Ersatz für kleinkalibrige Gefäße in der Aorta-Koronararterie, als Bypass für die Arteria iliaca externa und die Arteria infrapoplitea, die Vena cava superior und inferior, die Vena portae und die Vena iliaca externa und andere Venen der Gliedmaßen, bei denen Schäden zu chronischer venöser Insuffizienz führen können, geeignet, ohne darauf beschränkt zu sein. Eine Stent-Klappenvorrichtung kann auch für einen minimal invasiven Zugang zur Venenklappen-Transplantation verwendet werden. Ein Gefäßflicken kann zur Endarterektomie der Carotisarterie, zur Thrombektomie der Femoralarterie und zur Reparatur von Gefäßwänden verwendet werden.

**[0061]** Heparin übt einen starken antikoagulierenden Effekt aus, indem es die Inhibitorwirkung von Antithrombin III induziert. Einige bei der Gefäßheilung beteiligte Wachstumsfaktoren haben eine hohe Affinität für die Bindung an Heparin. bFGF ist ein Heparin bindender Wachstumsfaktor mit starker Wirkung auf Proliferation und Migration von Endothelzellen und glatten Muskelzellen. Wenn er an einer heparinierten Oberfläche erfolgreich gebunden ist, fördert bFGF Proliferation und Migration der Wirtszellen in das Transplantat, beschleunigt Heilung und Wiederaufbau der Gefäße und vermindert den Abbau des Transplantats.

**[0062]** Eine Stentvorrichtung kann die heparinierte und mit Wachstumsfaktor beschichtete dezellularisierte Gefäßprothese weiter unterstützen. Der Stent kann angrenzend auf die äußere Oberfläche des Gefäßes angebracht oder in das Lumen des Transplantats eingesetzt werden, so dass seine Außenfläche an der Innenfläche des Gefäßes anliegt. Dieser Weg verleiht dem entkleideten Gefäß mechanische Unterstützung bis die Rezellularisierung die Matrix durch die neuerliche Abscheidung von Kollagen, Elastin oder anderen Matrixbausteinen wieder verstärkt hat. Der Stent wirkt jeglicher Tendenz zur Ruptur der implantierten Prothese entgegen.

**[0063]** Eine Gefäßklappenprothese, die erfindungsgemäß dezellularisiert und mit antithrombogenem Wirkstoff und Wachstumsfaktor beschichtet ist, ist voll arbeitsfähig und stellt einen großen Fortschritt gegenüber alternativen Mitteln zur Linderung der Veneninsuffizienz dar, wie Venenmanschetten, Anwendung äußeren Drucks auf das betroffene Gebiet und Verabreichung von Diuretika.

**[0064]** Die vorliegende Kombination aus Dezellularisierung, Heparinbindung und einem Heparin bindenden Wachstumsfaktor ist eine neue technologische Plattform für die Entwicklung von vielen Medizinprodukten. Sie bietet auch ein Mittel zum Anheften weiterer pharmazeutisch aktiver Wirkstoffe an die immunologisch inerte biologische Matrix.

**[0065]** Nach Implantieren eines erfindungsgemäßen biotechnischen Gefäß-Xenotransplantats in einen Menschen oder eine andere Tierart besiedeln die Wirtszellen rasch das zellfreie Xenotransplantat. Bei geeigneter hämodynamischer Stimulation und Remodellierung des Matrixproteins dringen glatte Muskelzellen und Endo-



thelzellen des Wirtsgefäßes in die Prothese ein und lassen sich im Transplantat beziehungsweise auf seiner inneren Oberfläche nieder. Schließlich gleicht das Xenotransplantat einer nativen Gefäßstruktur mit funktionellen Zelltypen und Matrixbausteinen und liefert eine ausgedehnte Durchgängigkeit.

**[0066]** In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform wird ein antithrombogener Wirkstoff am dezellularisierten Gefäßgewebe immobilisiert und bedeckt dieses, wodurch es weniger thrombogen wird. Die beschichtete Prothese umfasst auch einen immobilisierten Wachstumsfaktor, der seine physiologische Funktion beibehält und mit Endothelzellen, glatten Muskelzellen oder Fibroblasten wechselwirkt, um die Rezellularisierung nach der Implantation der Gefäßprothese zu fördern.

**[0067]** In einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform ist der antithrombogene Wirkstoff Heparin. Der Wachstumsfaktor kann jeder Faktor sein, der den Prozess der Heilung und der Remodellierung des Gefäßtransplantats beschleunigt, wobei er die langfristige Durchgängigkeit des biotechnischen biologischen Transplantats wesentlich verbessert. Der bevorzugte Wachstumsfaktor kann, ohne darauf beschränkt zu sein, ein Heparin bindender Wachstumsfaktor wie bFGF oder aFGF sein, der eine hohe Affinität für das an das dezellularisierte Gefäßtransplantate gebundene Heparin hat.

**[0068]** In einer weiter bevorzugten Ausführungsform ist das Heparin kovalent an die Oberfläche des dezellularisierten Gefäßgewebes mittels eines Linkermoleküls wie etwa, ohne darauf beschränkt zu sein, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimid. Der bevorzugte Heparin bindende Wachstumsfaktor ist bFGF, der an das Heparin auf der Oberfläche des Gefäßgewebes gebunden ist.

**[0069]** In einer erfindungsgemäßen Ausführungsform ist das dezellularisierte Gefäßgewebe ein arterielles Gefäßtransplantat, das bezüglich des Empfängers des Transplantats allogene oder xenogene sein kann.

**[0070]** In noch einer anderen Ausführungsform ist das Gefäßgewebe ein Venenklappentransplantat, das bezüglich des Empfängers des Transplantats allogene oder xenogene sein kann.

**[0071]** In einer weiteren Ausführungsform ist das Gefäßgewebe eine Venenklappenprothese, wobei das ausgeschnittene Venensegment zumindest eine funktionelle Klappe umfasst, die dezellularisiert und hepariniert werden kann und auf der Wachstumsfaktoren immobilisiert werden können, ohne dass die Klappenwirkung verloren geht.

**[0072]** Noch eine andere erfindungsgemäße Ausführungsform stellt eine Gefäßstentabdeckung bereit, worin allogene oder xenogene Venen oder Arterien erfindungsgemäß dezellularisiert und hepariniert werden können und Wachstumsfaktoren an das Heparin gebunden werden können. Die Gefäßprothese kann entweder auf der inneren oder der äußeren Oberfläche von Gefäßstents angebracht werden, und zwar vor oder nach der chirurgischen Implantation in den Wirt. Die Stents können aus jedem geeigneten, dem Fachmann bekannten Material bestehen. Für einen minimal invasiven Weg zur Transplantation von Venenklappen können an den erfindungsgemäßen Venenklappenprothesen Gefäßstents oder Stent-Klappen-Vorrichtungen angebracht werden.

**[0073]** Noch eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Gefäßflicken, wobei allogene oder xenogene Venen oder Arterien dezellularisiert, hepariniert, mit Wachstumsfaktoren behandelt und als arterielles oder venöses Flickmaterial in Verfahren wie Endarterektomie der Carotisarterie und Thrombektomie des Femoralarterie, Ersatz von Venen und Reparatur von Venenverletzungen verwendet werden.

**[0074]** Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum Dezellularisieren von Gefäßgewebe, Verknüpfen des Gewebes mit zumindest einem antithrombogenen Wirkstoff und Anbringen einer zweiten Beschichtung aus zumindest einem Wachstumsfaktor.

**[0075]** In einer bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform wird das ausgeschnittene Gefäßgewebe durch aufeinander folgendes Waschen des Gewebes mit hypotonischer Lösung und mechanisches Entfernen der Zelltrümmer dezellularisiert. Das mechanische Entfernen kann, ohne darauf beschränkt zu sein, Schaben, Schütteln, Entfernen mit Pinzetten oder anderen geeigneten Instrumenten, Schneiden oder jedes andere dem Fachmann bekannte Verfahren umfassen. Die teilweise dezellularisierte Prothese kann dann mit zumindest einer Protease, zumindest einer Lipase, zumindest einer Nuklease und zumindest einem Netzmittel behandelt werden, so dass die extrazelluläre Matrix der Prothese von Zellmaterial entkleidet ist.

**[0076]** Die Protease kann im Konzentrationsbereich von etwa 0,1% w/v bis angenähert 10% w/v sein. Die Behandlungsdauer mit der Protease kann von mindestens 5 Minuten bis zu etwa einer Stunde reichen, bei einer

Temperatur von etwa 20 bis näherungsweise 37°C.

**[0077]** Die Lipase kann im Konzentrationsbereich von etwa 0,1% w/v bis angenähert 10% w/v sein. Die Behandlungsdauer mit der Lipase kann von mindestens 5 Minuten bis zu etwa einer Stunde reichen, bei einer Temperatur von etwa 20 bis näherungsweise 37°C.

**[0078]** Die Nuklease kann im Konzentrationsbereich von etwa 0,1 U/ml bis angenähert 10 U/ml sein. Die Behandlungsdauer mit der Nuklease kann von mindestens 5 Minuten bis zu etwa einer Stunde reichen, bei einer Temperatur von etwa 20 bis näherungsweise 37°C.

**[0079]** Jeweils nach dem Protease-, Lipase- und Nukleaseschritt wird das Gefäßgewebe in vorgewärmter phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) oder in Wasser gewaschen. Die Gewebe werden dann mit den folgenden Schritten behandelt: a) Netzmittel mit einer Konzentration von etwa 10%, b) Dehydrocholsäure mit einer Konzentration von etwa 5 bis näherungsweise 30%, c) Waschungen mit destilliertem Wasser und d) eine Lösung von Natriumdodecylsulfat mit einer Konzentration von etwa 0,5% w/v bis etwa 10% w/v. Das Netzmittel und die nachfolgenden Schritte können bei einer Temperatur von etwa 20 bis etwa 37°C ausgeführt werden. Bei dieser Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird das dezellularisierte Gefäßgewebe in einer Alkohollösung gelagert.

**[0080]** Eine andere bevorzugte erfindungsgemäße Ausführungsform ist ein Verfahren zum Immobilisieren eines antithrombogenen Wirkstoffs an zumindest einer Oberfläche des dezellularisierten Gefäßgewebes durch Perfundieren des Gewebes mit einer Lösung von Hydroxylamin mit einer Konzentration von etwa 0,5 mol/l bis etwa 1,0 mol/l, gefolgt von Perfundieren mit einer Lösung eines Linkermoleküls wie, ohne darauf beschränkt zu sein, 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) und einem antithrombogenen Wirkstoff wie, ohne darauf beschränkt zu sein, Heparin, in einem Gewichts Verhältnis von etwa 1:1.

**[0081]** In der meist bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das dezellularisierte und heparinierte Gefäßgewebe etwa 5 Minuten mit einer Lösung eines Wachstumsfaktors wie, aber nicht beschränkt auf, bFGF mit einer Konzentration von etwa 5 µg/ml bis etwa 50 µg/ml behandelt.

**[0082]** In anderen Ausführungsformen können die dezellularisierten, heparinierten und mit Wachstumsfaktor behandelten Transplantate andere Verbindungen mit therapeutischen Eigenschaften umfassen, einschließlich, ohne darauf beschränkt zu sein, Urokinase, Stickoxidendonoren, Vektoren zur Einführung von Genen oder andere vasoaktive Wirkstoffe. Diese Verbindungen können Thrombose des Transplantats verhindern oder den Heilungsprozess des Transplantats abwandeln, die Hämostase steuern oder die Physiologie des Transplantats oder seines Empfängers in anderer Weise modifizieren.

**[0083]** Die Erfindung wird anhand spezieller Beispiele eingehender beschrieben. Die folgenden Beispiele werden zur Veranschaulichung angeboten und sind nicht dazu gedacht, die Erfindung in irgendeiner Weise zu beschränken oder zu definieren.

#### Beispiel 1

##### Verfahren zum Dezellularisieren von Gefäßgewebe

**[0084]** Die vorliegende Erfindung umfasst ein Verfahren, das alle zellulären Komponenten des ausgeschnittenen Gefäßgewebes wirksam entfernt und dabei das extrazelluläre Gerüst aus Kollagen und Elastin intakt lässt. Die bevorzugte Vorschrift zum Dezellularisieren folgt nun.

**[0085]** Gefäßgewebe wurde etwa 4 Tage bei etwa 4°C in destilliertes Wasser eingetaucht. Das destillierte Wasser wurde täglich gewechselt. Das gelöste Adventitiagewebe wurde von den Gefäßen abgeschnitten. Das dezellularisierte Gewebe wurde dreimal mit 200 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), pH 7,4, vorgewärmt auf 37°C, gewaschen. Das Gefäßgewebe wurde dann nacheinander eingeweicht in: (1) 200 ml 0,25% Trypsin-EDTA 30 min bei 37°C, (2) dreimal in PBS, pH 7,4, vorgewärmt auf 37°C, 200 ml pro Waschung, (3) 200 ml 0,5% Lipase 30 min bei 37°C, (4) dreimal in PBS, pH 7,4, vorgewärmt auf 37°C, 200 ml pro Waschung, (5) dreimal in PBS, pH 8,8, vorgewärmt auf 37°C, 200 ml pro Waschung, (6) 200 ml Mikrokokkennuklease, 1 U/ml, 30 min bei 37°C, (7) destilliertes Wasser von 37°C, (8) 200 ml Triton X-100, 10%, 10 min bei 37°C, (9) destilliertes Wasser bei 37°C, (10) 200 ml Dehydrocholsäure, 10%, 10 Minuten bei 37°C, (11) destilliertes Wasser, (12) SDS, 10%, 200 ml 10 min bei 37°C und (13) destilliertes Wasser bei 37°C. Die dezellularisierten Gewebe wurden sterilisiert und in 70% Ethanol bei 4°C oder eingefroren gelagert.

**[0086]** Mehr als 200 Gefäße, darunter aus einem lokalen Schlachthof gewonnene frische Carotisarterien von Schweinen und frische Klappen externer Jugularvenen (EJV) von Hunden wurden nach diesem Verfahren verarbeitet.

#### Beispiel 2

Prüfung mit dem Lichtmikroskop und dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM)

**[0087]** Die histologische Prüfung der Schweine-Carotisarterien nach dem Prozess der Dezellularisierung zeigte intakte interne elastische Schichten und lamellare Elastinblätter in der Media. Färbung mit Hämatoxylin und Eosin zeigte keine Anzeichen von zurückgebliebenem Kernmaterial in den Gefäßwänden, was eine erfolgreiche Dezellularisierung über die gesamte Dicke der Gefäße anzeigte. Um mikrostrukturelle Veränderungen in den Gefäßen durch die Dezellularisierung und die Mobilisierung von Heparin zu untersuchen und die Entfernung der Zellrümpfer zu bestätigen, wurde TEM durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten eine vollständige Entfernung des Zellmaterials aus den Mediaschichten, während die grundlegende extrazelluläre Mikrostruktur intakt geblieben war. Die histologische Färbung einer Klappe der Hunde-EJV vor der Dezellularisierung zeigte Endothelzellen auf der luminalen Oberfläche der Vene und der Klappe. In der Media des Gefäßes waren glatte Muskelzellen (SMCs) vorhanden. In einer dezellularisierten Klappe einer Hunde-EJV waren andererseits alle Endothelzellen und SMCs entfernt und die Proteine Kollagen und Elastin der extrazellulären Matrix waren zurückgeblieben. Die Klappe behielt ihre strukturelle Integrität.

#### Beispiel 3

Biotinylierung dezellularisierten Gefäßgewebes

**[0088]** Die Biotinylierung der dezellularisierten Transplantate erlaubte eine Untersuchung des Metabolismus und der Remodellierung der Matrixproteine des Transplantats nach der Implantation, weil die histologische Färbung die Originalmatrix des Transplantats darstellte. Neu gebildete dezellularisierte Prothesen wurden durch Substitution mit Aminogruppen unter Verwendung von N-Hydroxysuccinimidylbiotin biotinyliert. Die dezellularisierten Gefäßgewebe wurden in 10 ml N-Hydroxysuccinimidylbiotin (1 nmol/μl in N,N-Dimethylformamid) oder Biotinamidocaproat-N-hydroxysuccinimidester (1 nmol/μl in N,N-Dimethylformamid) eingetaucht und auf einer Schüttelmaschine 18–24 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transplantate wurden dann mit destilliertem Wasser gewaschen und bei 4°C gelagert. Die Wirksamkeit der Biotinylierung wurde durch Streptavidin-Peroxidase-Färbung nach dem Verfahren von Chen et al., J. Surg. Res. 60, 409–416 (1996), das hier durch Zitat vollständig einbezogen wird, untersucht.

**[0089]** Mehr als 50 dezellularisierte Arterien wurden unter Anwendung des oben beschriebenen Verfahrens biotinyliert. Alle Gefäße zeigten starke Streptavidin-Peroxidase-Färbung, was eine erfolgreiche Biotinylierung anzeigt. Um die Stabilität der Markierung mit Biotin zu prüfen, wurden die biotinylierten Gefäße in einem Gewebekulturinkubator inkubiert. Nach 80 Tagen Inkubationszeit wurde keine wesentliche Abschwächung der Biotinfärbung festgestellt.

#### Beispiel 4

Immobilisierung von Heparin und bFGF an dezellularisiertem Gefäßgewebe

**[0090]** Dezellularisierte Gefäße bestehen hauptsächlich aus den Matrixproteinen Kollagen und Elastin, die eine geringe Immunogenität haben. Diese Proteine sind die bestgeeigneten Substrate für das Anheften, die Proliferation, Migration, den Metabolismus und die Differenzierung von Gefäßzellen. Dezellularisierte Gefäße legen auf der inneren Oberfläche jedoch Kollagen frei, welches eine hohe Thrombogenität hat. Die kovalente Immobilisierung von Heparin auf den Matrixproteinen des Transplantats vermindert die Thrombogenität der Prothese.

**[0091]** bFGF hat eine starke Affinität für Heparin ( $K_d = 2 \times 10^{-9}$  mol/l). Die mit bFGF verbundenen heparinieren Transplantate bieten eine verstärkte Reendothelisierung und Zellmigration über das Transplantat und eine beschleunigte Heilung des Transplantats. Die beschleunigte Heilung der biohybriden Venenklappentransplantate mit vollständiger Reendothelisierung, Remodellierung des subendothelen Gewebes und Neoangiogenese kann die langfristige Durchgängigkeit verbessern und die Klappenfunktion erhalten. Detaillierte Verfahren sind unten beschrieben.

**[0092]** Heparin wurde durch Verknüpfung mit den Aminogruppen der dezellularisierten extrazellulären Matrixproteine immobilisiert. Ein dezellularisiertes und biotinyliertes Transplantat wurde mit Hydroxylaminsulfat (1 mol/l) perfundiert. Das Transplantat war in einem Umlaufsystem eingebaut und das Hydroxylaminsulfat wurde mit einer Geschwindigkeit von 7,4 ml/min eine Stunde lang durch das Gefäß gepumpt. Das Vernetzungsmittel 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) aktivierte die Carboxylgruppen des Heparins. Die Immobilisierung des Heparins auf vorbehandelten Transplantaten wurde durch Zirkulieren einer Heparin-EDC-Lösung (Gewichtsverhältnis 1:2) durch das Umlaufsystem mit einer Geschwindigkeit von 7,4 ml/min über 18 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Mit 0,05 mol/l Salzsäure wurde ein pH von 1,5 aufrechterhalten. Nach der Reaktion wurde destilliertes Wasser mit 7,4 ml/min eine Stunde lang durch das Transplantat zirkuliert um ungebundenes Heparin auszuwaschen. Das Transplantat kann dann sterilisiert und bei etwa 4°C in 70% Ethanol gelagert werden. Nach der Lagerung in 70% Ethanol wurden die heparinierten Transplantate in physiologischer Salzlösung gespült und dann in 2 ml bFGF (50 µg/ml) 5 min lang eingetaucht und eingeweicht, unmittelbar bevor sie in den Patienten oder das Tier implantiert wurden.

#### Beispiel 5

##### Wirksamkeit und Stabilität des Heparins nach der Immobilisierung von Heparin auf den Gefäßgeweben

**[0093]** Um die Menge des Heparins in einer Probe zu bestimmen wurde eine colorimetrische Analyse durchgeführt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurde in jedes von sieben Reagenzgläsern 2,5 ml Toluidinblau O eingebracht. Unterschiedliche Mengen Heparin von etwa 0,01 bis 0,07 mg wurden zum Farbstoff zugegeben und das Volumen mit 0,2% w/v Natriumchlorid auf 5 ml aufgefüllt. Die Reagenzgläser wurden 30 Sekunden gerührt. Zu jedem Reagenzglas wurden 5 ml n-Hexan zugegeben und 30 Sekunden heftig gerührt. Die wässrige Schicht wurde 1:10 mit Ethanol verdünnt und die optische Dichte einer jeden Probe wurde spektralfotometrisch bei 631 nm innerhalb von 30 Minuten nach der Reaktion bestimmt.

**[0094]** Der Heparin Gehalt des heparinierten Transplantats wurde analysiert, in dem man einen 1 cm-Abschnitt des Transplantats in ein Reagenzglas gab und 2,5 ml Toluidinblau O und 2,5 ml 0,2% w/v Natriumchlorid zugefügte. Das Verfahren wurde fortgesetzt wie für die im vorigen Absatz beschriebene Bestimmung des löslichen Heparins.

**[0095]** Mehr als 200 dezellularisierte Arterien wurden kovalent mit Heparin verknüpft. Die Heparinanalysen wurden unter Anwendung der Bestimmungsmethode mit Toluidinblau O wie oben beschrieben ausgeführt. Die Bindungseffizienz des Heparins wurde durch quantitative Bestimmung des Heparin Gehalts unmittelbar nach der Immobilisierung des Heparins ausgeführt.

**[0096]** Paraffinschnitte von dezellularisierten Gefäßen mit oder ohne Heparinbehandlung wurden mit Toluidinblau (Konzentration 0,05% mg/ml) eingefärbt, um die Wirksamkeit der Heparinimmobilisierung weiter zu untersuchen. Gefäße mit Heparinbehandlung zeigten eine gleichmäßige positive Färbung mit Toluidinblau über die ganze Dicke der Gefäßwände, während dezellularisierte Gefäße ohne Heparinbehandlung mit Toluidinblau nicht anfärbten. Diese Ergebnisse zeigen, dass Heparin erfolgreich mit den dezellularisierten Gefäßen über ihre ganze Dicke verknüpft war.

**[0097]** Die Stabilität der Heparinbindung wurde mit dem colorimetrischen Verfahren mit Toluidinblau entweder nach Lagerung des mit Heparin verknüpften Transplantats in 70% Alkohol oder in PBS bei 37°C über 1 Tag, 7 Tage, 14 Tage bzw. 21 Tage geprüft.

**[0098]** Es wurde nur ein minimaler Verlust von Heparin aus dezellularisierten heparinierten Arterien von Schwein oder Hund beobachtet, selbst nach 10 Tagen bei 37°C. Diese Daten zeigen: (a) dass das Verfahren zur Immobilisierung von Heparin wirksam und zuverlässig ist, (b) die Biotinylierung der erfindungsgemäß hergestellten Gefäßprothesen die Wirksamkeit der Heparinbindung nicht beeinträchtigt und (c) die Heparinbindung mindestens 21 Tage stabil ist. Außerdem werden die verarbeiteten Transplantate mit 70% Alkohol leicht sterilisiert und sind bei Langzeitlagerung stabil. Die mit Heparin verknüpften Prothesen verlieren selbst nach 2 Jahren Lagerung in 70% Alkohol keine wesentlichen Mengen Heparin.

**[0099]** bFGF-Bindung: Nach Lagerung in 70% Ethanol werden die heparinierten Transplantate in physiologischer Kochsalzlösung gespült und dann in 2 ml bFGF (50 µg/ml) 5 min eingetaucht und eingeweicht, bevor sie unmittelbar in den empfangenden Patienten oder das Tier implantiert werden. Die [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#) zeigen die kovalente Verknüpfung des Heparins mit dezellularisierten Carotisarterien vom Schwein nach Lagerung in 70% Alkohol über unterschiedliche Zeiträume und Inkubation in PBS bei 37°C über einen anderen Zeitraum.

## Beispiel 6

## Messung der durch Gefäßprothesen induzierten Blutgerinnung (Reagenzglasmethode)

**[0100]** 2 cm lange Gefäßabschnitte mit oder ohne Heparinbehandlung wurden in PBS bei 37°C 0, 3, 7, 14 oder 21 Tage inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Gefäße in Längsrichtung aufgeschnitten und ein 1 cm<sup>2</sup> großes Stück wurde aus der Mitte eines jeden Gefäßes ausgeschnitten. Die Adventitia wurde von jeder Probe durch vorsichtiges Sezieren entfernt. Jede quadratische Gewebeprobe wurde dann in 9 Teile gleicher Größe zerschnitten und in 5 ml-Reagenzgläser eingebracht.

**[0101]** Für jede Untersuchung wurde von der gleichen freiwilligen Versuchsperson venöses Blut entnommen und nachfolgend 2 ml Blut rasch in jedes Reagenzglas mit der Gewebeprobe eingebracht. Die Reagenzgläser wurden dann schnell mit Folie verschlossen und in eine Schüttelmaschine gestellt. Die Gläser wurden visuell auf die Bildung von Gerinnseln auf den Gewebeproben während des Schüttelns untersucht. Die zwischen dem Auftragen des Blutes und der Bildung von Gerinnseln vergangene Zeitdauer wurde als Gerinnungszeit notiert. Wenn sich kein Gerinnsel bildete, wurde der Versuch nach einer Stunde abgebrochen. Zu jedem Zeitpunkt wurden drei heparinierte Gefäße und zwei Vergleichsgefäße geprüft. Alle Vergleichsgefäße bildeten Gerinnsel bei einer mittleren Gerinnungszeit von 13,9 Minuten.

**[0102]** Keines der heparinierten Gefäße bildete während der 60 Minuten Versuchsdauer Gerinnsel. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Heparin trotz der kovalenten Verknüpfung mit der Gefäßwand seine Wirkung, die Gefäße nichtthrombogen zu machen, behält. Ferner blieb die Verknüpfung des Heparins während 3 Wochen Inkubation in PBS bei physiologischer Temperatur stabil. Tabelle 1 beschreibt die Ergebnisse der in vitro Bestimmung der Gerinnungszeit.

Tabelle 1

Invitro-Bestimmung der Gerinnungszeit		
Tag	Heparin	Vergleich
0	– (> 60 min)	– (> 60 min)
3	– (> 60 min)	+ (7,1 min)
7	– (> 60 min)	+ (12,1 min)
14	– (> 60 min)	+ (20,5 min)
21	– (> 60 min)	+ (19,4 min)

**[0103]** Die heparinierten dezellularisierten Transplantatabschnitte (Heparin) bildeten innerhalb von 60 min Versuchsdauer auch nach Inkubation bis zu 21 Tagen im PBS bei 37°C keine Gerinnsel, während alle nicht heparinierten dezellularisierten Transplantatabschnitte (Vergleich) Gerinnsel bildeten.

## Beispiel 7

## Implantation von dezellularisiertem nicht hepariniertem Gefäßgewebe in Tiere

**[0104]** Nach den in den Beispielen 1–5 beschriebenen Verfahren dezellularisierte und heparinierte Schweinearterien haben hervorragende Handhabungseigenschaften, darunter gute Flexibilität, leichtes Anbringen der Naht und minimales Bluten an den Nadelstichen. Drei dezellularisierte und heparinierte Schweine-Carotisarterien (Xenotransplantate) wurden in die rechte Carotisarterie von drei Hunden implantiert. Jeder Hund erhielt ein Transplantat. Postoperativ wurde den Hunden keine Antikoagulation gegeben. Ein bzw. zwei nach 24 bzw. 67 Tagen getötete Hunde hatten durchgängige Transplantate. Die Anastomosen waren ohne Erweiterung des Lumens völlig ausgeheilt.

**[0105]** Das nach 24 Tagen durchgängig befundene Transplantat zeigte, dass Fibroblasten in die dezellularisierte Matrix des Transplantats eingewandert waren und dass endothelartige Zellen die Innenfläche nicht kontinuierlich bedeckten. Die nach 67 Tagen durchgängigen Transplantate zeigten ausgedehnte Bedeckung der Innenfläche mit Endothelzellen, wie sich durch positive Einfärbung des für Endothelzellen spezifischen, zum Faktor VIII gehörenden Antigens zeigte. Auf beiden ursprünglichen Matrixflächen waren glatte Muskelzellen vorhanden, welche die Immunreaktion des  $\alpha$ -Aktins zeigten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Oberfläche

des dezellularisierten und heparinierten Transplantats nicht thrombogen war und dass durchgängige Transplantate eine beschleunigte Heilung und Remodellierung aufweisen, die zum langfristigen Aufrechterhalten der Durchgängigkeit notwendig ist. Weitere zwei Hunde erhielten einen Monat lang bilaterale arteriovenöse Femoraltransplantate (dezellularisierte und heparinierte Schweine-Carotisarterien). Die histologische Untersuchung zeigte eine ausgedehnte Infiltration mit Wirtszellen und einen beschleunigten Heilungsprozess.

#### Beispiel 8

Einfluss von Heparin auf die Abscheidung von Thrombozyten auf einer dezellularisierten Gefäßprothese, und die Funktion von Gefäßklappenprothesen

**[0106]** Es wurden das Nulllinien-Ausmaß der Thrombozyten Abscheidung auf einer frischen EJV-Klappe vom Hund und auf einer dezellularisierten EJV-Klappe vom Hund und der Einfluss von Biotinylierung, kovalenter Verknüpfung von Heparin und Bindung von bFGF darauf untersucht. Die kombinierte Wirkung von Dezellularisierung, Biotinylierung und Heparinierung auf die Funktion der Venenklappen wurde in einer Ex vivo-Studie an einem arteriovenösen (A-V) Shunt untersucht. Die Einzelheiten des Verfahrens sind in den folgenden Absätzen erklärt.

Radioaktive Markierung der Thrombozyten und Ex vivo-Abscheidung der Thrombozyten im A-V-Shunt

**[0107]** Autologe Thrombozyten werden mit <sup>111</sup>Indiumoxid markiert. Ungefähr 30 Minuten vor der Shunt-Untersuchung werden die markierten Thrombozyten intravenös in die Tiere reinfundiert. Sechs erwachsene Mischlings-Hunde werden mit Natriumthiamylal (15 mg/kg) anästhesiert und mit Isofluran erhalten. Carotisarterie und EJV werden isoliert und an den entsprechenden Enden für Eingang und Ausgang eines A-V-Shunts mit Kanülen versehen. Der A-V-Shunt besteht aus jeweils einem Abschnitt des Transplantatmaterials, in Serie miteinander verbunden. Die Transplantate haben einen nominalen Durchmesser von 6 mm und sind etwa 5 cm lang. Der Blutstrom wird auf etwa 100 ml/Minute eingestellt, indem der Ausgangsschlauch des Shunts teilweise verschlossen wird. Im Abstand von 30 Minuten werden drei Bilder des Implantats aufgenommen.

**[0108]** Prüfsystem für Venenklappen. Ein Prüfsystem für Venenklappen besteht aus einem Gefäßadapter, zwei Spritzen, zwei Manometern und einem Angioskopsystem. Schließen und Öffnen der Venenklappen wird auf dem Bildschirm direkt sichtbar gemacht und auf Videoband aufgenommen. Gleichzeitig wird der Druck stromab und stromauf von der Klappe registriert.

**[0109]** Fünf Paare frischer und dezellularisierter EJV-Klappen wurden in diesem System geprüft und entsprechen den Kriterien einer funktionsfähigen Venenklappe. Das heißt, eine voll funktionsfähige Venenklappe mit einem externen Träger öffnet und schließt vollständig bei Druckdifferenzen unterhalb von etwa 3, und nach dem Schließen der Klappe erfolgt auch bei oberhalb etwa 100 kein Rückfluss. Beim Druck null sind die Segel der Klappen offen. Es wurden keine Unterschiede zwischen frischen und dezellularisierten Venenklappen festgestellt.

#### Beispiel 9

Einfluss von bFGF auf die Proliferation und Migration der Zellen in vitro

**[0110]** Glatte Muskelzellen (SMCs) und Endothelzellen wurden aus der Carotisarterie beziehungsweise der Femoralvene vom Hund isoliert. Für die Bestimmung der Zellproliferation wurden SMCs oder Endothelzellen in Platten mit 24 Nöpfchen plattiert und nach 24 Stunden wurden unterschiedliche Mengen von bFGF zu jeweils vier Nöpfchen zugefügt. Als Vergleich dienten Zellen ohne Zusatz von bFGF. Die Zellen wurden nach der in Chen et al., J. Surg. Res. 69, 300–308 (1997) angegebenen Methode gezählt, welche hier vollständig durch Zitat einbezogen wird.

**[0111]** Die Zellmigration wurde in einer modifizierten Boyden-Kammer mit einem Cellulosenitratfilter von 5 µm Porendurchmesser bestimmt. Die Zellen und verschiedene Mengen bFGF wurden in die Kammer gegeben. Nach 3 Stunden Inkubation wurden die durch die Poren gewanderten Zellen gezählt. Die Wirkungen von bFGF auf die Proliferation und Migration der Zellen sind in den [Fig. 2A](#) bzw. [Fig. 2B](#) gezeigt. Humanes rekombinantes bFGF hat einen starken positiven Effekt auf Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und Endothelzellen vom Hund. Diese Ergebnisse veranschaulichen die Bedeutung von bFGF für die Beschleunigung der Heilung des Gefäßtransplantats.

## Beispiel 10

## Leistungsfähigkeit des Venenklappen-Allotransplantats

**[0112]** Die Leistungsfähigkeit eines biohybriden Venenklappen-Allotransplantats wird mit einer autogenen EJV-Klappe in einem Vergleichsversuch gegenübergestellt. Ein biohybrides Venenklappen-Allotransplantat wird in die Femoralvene eines Hundes mittels Anastomose Ende an Ende implantiert. In gleicher Weise wird eine autogene EJV-Klappe in die gegenüberliegende Femoralvene implantiert. Die Hunde werden 5 Gruppen von je 6 Hunden zugeordnet. Die Gruppen sind zur Tötung nach 7, 14, 28 Tagen, 3 Monaten und 6 Monaten vorgesehen. Die geprüften Parameter umfassen die Durchgängigkeit, die Klappenfunktion, die Morphometrie, die Remodellierung der Matrix und den zellulären Aufbau der Wand des Transplantats (d. h. Endothelzellen, SMCs, T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Neutrophile).

**[0113]** Erwachsene männliche Mischlingshunde wurden anästhesiert. Nach Sektion der geeigneten Längen einer EJV und beider Femoralvenen wurde Heparin (100 Einheiten/kg) systemisch verabreicht und eine Kontrolle der Gefäße eingerichtet. Ein Abschnitt der EJV-Klappe von 5 cm wurde entfernt und mit einer PTFE-Transplantatmanschette in eine Femoralvene implantiert. In der kontralateralen Femoralvene wurde ein biohybrides Venenklappen-Allotransplantat angebracht. Unmittelbar nach der Implantation der Transplantate und nach der Tötung wurde eine Kontrastphlebographie durchgeführt. Nach der Entnahme wurde auch eine angioskopische Untersuchung und eine Druckprüfung in der Klappe durchgeführt. Alle Hunde wurden mit Coumadin antikoaguliert, beginnend 1 Woche vor der Operation, nach dem Verfahren von Rosenberg et al. (J. Neurochem. 46, 640–648 (1985)), das hier vollständig durch Zitat einbezogen wird. Die Verabreichung von Bromdeoxyuridin, Tötung, die in situ Perfusionsfixierung und die Entnahme der Proben wurden ausgeführt wie von Chen et al. (Ann. Vasc. Surg. 10, 147–155 (1996), J. Vasc. Surg. 22, 237–247 (1995)) beschrieben, welche hier vollständig durch Zitat einbezogen werden. Histologische, morphometrische, immunocytochemische und statistische Analysen wurden nach Verfahren ausgeführt, die dem Fachmann wohlbekannt sind.

## Beispiel 11

## Dezellularisierte, heparinierte und mit Wachstumsfaktor beschichtete Schweinearterien-Transplantate

**[0114]** Carotisarterien vom Schwein mit etwa 4 mm Durchmesser wurden dezellularisiert, wobei hauptsächlich die Matrixproteine Kollagen und Elastin zurückblieben. Weil die Aminosäuresequenzen von Kollagen und Elastin zwischen den verschiedenen Arten weitgehend aufrechterhalten sind, ist dieses auf der Matrix basierende Transplantat weniger immunogen, wenn es in Schweine (allogenes Transplantat) oder in andere Arten (xenogenes Transplantat) implantiert wird. Anders als bei Transplantaten aus synthetischen Kollagenschläuchen, die kein Elastin enthalten und nicht flexibel sind, behalten die erfindungsgemäßen dezellularisierten Prothesen die native Konfiguration von Kollagen und Elastin und auch ihre Festigkeit, Elastizität und Flexibilität bei. Wegen der passenden Nachgiebigkeit zwischen Transplantaten und Wirtsgefäßen ist die Dehnungsbelastung und die Hyperplasie an der Anastomose vermindert. Die Biotinylierung der dezellularisierten Transplantate erlaubt die Untersuchung von Metabolismus und Remodellierung des Matrixproteins des Transplantats nach der Implantation, weil das histologische Biotin-Streptavidin-Peroxidase-Färbeverfahren die ursprüngliche Matrix des Transplantats nachweist.

**[0115]** Eine dezellularisierte Schweinearterie hat freiliegendes, hoch thrombogenes Kollagen auf der inneren Oberfläche. Die kovalente Verknüpfung von Heparin mit den Aminogruppen der Matrixproteine des Transplantats vermindert die Thrombogenität des Transplantats. Verfahren und Bedingungen für die kovalente Verknüpfung von Heparin sind im Beispiel 4 beschrieben. Diese Verfahren werden modifiziert, um eine Bindung von ungefähr 15 USP Heparin/cm<sup>2</sup> des dezellularisierten Transplantats zu erreichen.

**[0116]** Zum Sterilisieren des Transplantats und zur Stabilisierung der Heparin-Verknüpfung wurde eine 70%-Lösung von Ethanol verwendet. bFGF wurde wie in Beispiel 4 beschrieben an das Transplantat gebunden.

**[0117]** Bestimmung der bFGF-Bindung: Die Effizienz der bFGF-Bindung wurde durch radioaktive Markierung des bFGF untersucht. Die Bindung des bFGF wurde in vivo unter Verwendung eines Perfusionssystems für Gefäße über unterschiedliche Inkubationszeiten bei 37°C geprüft. Nach der Methode von Bashkin et al. (Biochem. 28, 1737–1743 (1989)), die hier durch Zitat vollständig einbezogen wird, wurde bFGF mit <sup>125</sup>I markiert. bFGF (100 µg) wurde 2,5 Stunden auf Eis mit <sup>125</sup>I-markiertem Bolton-Hunter-Reagenz in 400 µl 100 mmol/l-Natriumphosphatpuffer bei pH 8,5 gemischt. Überschüssiges Bolton-Hunter-Reagenz wurde durch Zugabe von 3

ml Wasser mit 0,2 mg Lysin und 45 min Inkubation auf Eis zerstört. Danach wurden 300 µl einer 0,5% Gelatine zugesetzt und das Reaktionsgefäß mit 3,5 ml Gelfiltrationspuffer (50 mmol/l Tris-HCl, 0,05% Gelatine, 1 mmol/l Dithiothreitol und 0,3 mol/l NaCl, pH 7,5) gespült. Die vereinigte Probe wurde der Gelfiltration auf einer Sephadex G-25-Säule unterworfen, die mit dem gleichen Puffer äquilibriert war.

**[0118]** Die Effizienz der <sup>125</sup>I-bFGF-Bindung wurde durch Inkubation verschiedener Verdünnungen von <sup>125</sup>I-bFGF mit heparinierten Transplantaten gemessen. Alle Transplantate wurden dreimal mit PBS gewaschen, in 0,5 cm lange Abschnitte geschnitten und die Radioaktivität mit einem Gammazähler gemessen.

**[0119]** Die Stabilität der <sup>125</sup>I-bFGF-Bindung an die heparinierten Transplantate wird geprüft, indem PBS durch mit <sup>125</sup>I-bFGF beschichtete Transplantate mit 100 ml/min bei 37°C gepumpt wird. Die auf dem Transplantat zurückbleibende Radioaktivität wird nach 4 Stunden, 8 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden, 7 Tagen und 14 Tagen gemessen.

**[0120]** Verarbeitete Schweinearterien behalten ihre Festigkeit (Bersten bei einem Druck von 5 Atmosphären) und haben hervorragende Handhabungseigenschaften, darunter gute Flexibilität, Leichtigkeit des Anbringens der Naht und minimales Nadelstichbluten.

#### Beispiel 12

##### Thrombozytenablagerung im A-V-Shunt ex vivo

**[0121]** Sechs erwachsene Schweine von jeweils 40 bis 60 kg wurden mit Natriumthiamylal (15 mg/kg) anästhesiert, intubiert und mit 1% Isofluran erhalten. Im Hals wurde ein ventraler Mittellinienschnitt angebracht und die Carotisarterien und die externe Jugularvene isoliert. Die Gefäße wurden an den entsprechenden Eingängen und Ausgängen eines A-V-Shunts mit Kanülen angeschlossen. Die Schweine erhielten kein Antikoagulant. Der A-V-Shunt besteht aus jeweils einem Abschnitt des Transplantatmaterials, in Serie miteinander verbunden. Zur Verbindung der einzelnen Abschnitte und zur Bildung der Eingänge und Ausgänge des Shunts wird Polyethylenschlauch von medizinischer Qualität mit einem Innendurchmesser von etwa 3,17 mm verwendet. Die Transplantate haben einen Nenndurchmesser von 4 mm und sind etwa 5 cm lang.

**[0122]** Autologe Thrombozyten werden mit <sup>111</sup>Indiumoxid markiert. Ungefähr 30 Minuten vor der Untersuchung werden die markierten Thrombozyten den Tieren reinfundiert. Der Blutstrom wird durch teilweises Verschließen des Ausgangsschlauches des Shunts auf etwa 150 ml/min eingestellt. Mit einer Gammakamera werden alle 30 min über 90 min Bilder des Transplantats aufgenommen.

#### Beispiel 13

Modifizierte allogene Gefäße sind nicht immunogen und nicht thrombogen, haben beschleunigte Heilung und langfristige Durchgängigkeit mit wenigen Komplikationen durch das Transplantat

**[0123]** Die biotechnischen kleinkalibrigen Transplantate aus Carotisarterien vom Schwein (allogen) werden durch Anastomose Ende-zu-Seite in Femoralarterien von Schweinen implantiert. Die Anastomose Ende-zu-Seite ist die gebräuchlichste Methode für einen Bypass aus kleinkalibrigem Transplantat bei der Rekonstruktion menschlicher Arterien.

Gruppe 1 (Heparineffekt): Die Leistungsfähigkeit eines mit Biotin-Heparin verknüpften dezellularisierten Transplantats wird mit einem mit Biotin verknüpften Transplantat verglichen. In jedem Tier erhält eine Femoralarterie ein mit Biotin-Heparin verknüpftes dezellularisiertes Transplantat und das kontralaterale Gefäß erhält ein mit Biotin verknüpftes dezellularisiertes Transplantat als internen Vergleich. Zu jedem der 4 Zeitpunkte, nach 1 Woche, 2 Wochen, 4 Wochen und 3 Monaten, wurden sechs Schweine verwendet.

Gruppe 2 (bFGF-Effekt): Um zu prüfen, ob bFGF die Heilung des Transplantats beschleunigt, wurden jedem der 4 Zeitpunkte, nach 1 Woche, 2 Wochen, 4 Wochen und 3 Monaten, sechs Schweine zugeordnet. Bei jedem Tier erhielt eine Femoralarterie ein mit Biotin-Heparin verknüpftes dezellularisiertes Transplantat mit bFGF-Behandlung und das kontralaterale Gefäß erhielt ein mit Biotin-Heparin verknüpftes dezellularisiertes Transplantat ohne bFGF-Behandlung als internen Vergleich.

**[0124]** Die Durchgängigkeit des Transplantats, die Anzahl der Blutzellen und die Gerinnungsparameter wurden regelmäßig überwacht. Die Zellreaktionen, einschließlich der Endothelisierung des Transplantats, der entzündungsbedingten Infiltration durch Neutrophile, Lymphozyten und Makrophagen und die Immigration von Fibroblasten und SMCs in die Media des Transplantats wurden quantitativ erfasst. Der Metabolismus des Trans-



plantatproteins, hauptsächlich Proteinabbau, und die Absorption wurden dokumentiert. Es wurden morphometrische Messungen aufgezeichnet, darunter Lumendurchmesser, Dicke und Fläche der Neointima und Zellproliferation an der Anastomose und in der Mitte des Transplantats. Detaillierte Aufzeichnungen sind unten aufgeführt.

**[0125]** Erwachsene männliche Schweine von 40 bis 60 kg werden anästhesiert. Nach Sektion der geeigneten Längen der Femoralarterien wurde Heparin (100 Einheiten/kg) systemisch verabreicht und eine Gefäßkontrolle eingerichtet. Ein dezellularisiertes Transplantat mit einer Länge von 5 cm und einem Innendurchmesser von 4 mm wurde durch Anastomose Ende-zu-Seite in eine Femoralarterien eingesetzt, während im kontralateralen Gefäß ein Vergleichstransplantat (4 mm Durchmesser, 5 cm lang) angebracht wurde. Die Tiere wurden nach 1 Woche, 2 Wochen, 4 Wochen und 3 Monaten getötet. Die Durchgängigkeit des Transplantats wurde mit Doppler-Ultraschall überwacht. Einmal wöchentlich wurde Blut entnommen, um das Blutbild und die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) zu prüfen.

**[0126]** 24 Stunden vor der Tötung wurde 50 mg/kg Bromdeoxyuridin (BrdU) in 50 ml normaler Salzlösung gelöst intraperitoneal verabreicht. Bei der Tötung wurden die Tiere anästhesiert und die Femoralarterien und die Transplantate freigelegt. Die Durchgängigkeit der Transplantate wird durch direkte Inaugenscheinnahme, durch Messung des Blutstroms mit einem Ultraschall-Durchflussmesser und durch histologische Analyse bestimmt.

**[0127]** Es wurde eine Sternotomie ausgeführt und Ringerlösung mit einem Druck von etwa 120 durch eine großkalibrige Nadel in den linken Ventrikel infundiert, während das Tier gleichzeitig durch eine im rechten Atrium angebrachte Kanüle blutleer gemacht wurde. Nach Entfernung des Bluts aus dem Kreislaufsystem wurde das Tier in situ durch Perfusion mit 2,5% Glutaraldehyd in PBS über 20 Minuten bei einem Druck von etwa 120 fixiert. Die Transplantate mit 3 cm-Abschnitten der anhängenden Femoralarterie wurden entnommen, über Nacht in 10% gepuffertem Formalin fixiert und in 70% Alkohol überführt.

**[0128]** Senkrecht zur Längsachse des Gefäßes wurden Querschnitte der Proben im Abstand von 2 mm zwischen Ferse und Spitze einer jeden Anastomose und im Abstand von 5 mm längs des gesamten Transplantats und der anhängenden nativen Gefäße genommen. Die Proben wurden in Paraffin eingebettet und Schnitte angefertigt, die mit Hämatoxylin und Eosin und Verhoff-Masson-Färbung gefärbt wurden. Mit einem Computer wurden morphometrische Messungen der Dicke und der Fläche der Neointima und der Lumendurchmesser durchgeführt.

**[0129]** Um charakterisierende Zelltypen und proliferierende Zellen zu identifizieren wurde ein Avidin-Biotin-Komplex/Immunoperoxidase-Verfahren nach dem Fachmann wohlbekannten Techniken durchgeführt. Zur Identifizierung von glatten Muskelzellen, Endothelzellen, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen wurden primäre monoklonale Antikörper verwendet die spezifisch für  $\alpha$ -Aktin, Faktor VIII-verwandtes Antigen, T-Zellen (CD43), B-Zellen (L26) bzw. Makrophagen (HAM56) sind. Für negative Vergleiche wird anstelle von primärem Antikörper präimmunes Mausserum verwendet.

**[0130]** Proliferierende Zellen wurden mit einem primären monoklonalen Antikörper für BrdU identifiziert. BrdU-positive Zellen wurden manuell gezählt. Positiv gefärbte Zellen wurden als Prozentsatz aller Zellen ausgedrückt, was den BrdU-index ergibt. Je Schnitt wurden mindestens 10 Gesichtsfelder gezählt.

**[0131]** Zur Ermittlung der Signifikanz der Unterschiede in der Durchgängigkeit zwischen den behandelten Transplantaten und den Vergleichen wurde die Chi-Quadrat-Analyse angewendet. Zum Vergleich der Zellzahlen und der Daten der morphometrischen Messungen wurde der Student-t-Test angewendet. Die Ergebnisse wurden als signifikant angesehen, wenn der p-Wert kleiner als 0,05 war.

**[0132]** In allen Fällen zeigten die erfindungsgemäßen Transplantate überlegene Durchgängigkeit, höhere Invasion des Transplantats durch die Wirtszellen und ausgedehntere Absorption des extrazellulären Matrixproteins des Transplantats, als man es bei jedem anderen Typ eines mit Glutaraldehyd gehärteten biologischen Transplantats sieht, mit dem die erfindungsgemäßen Prothesen verglichen werden.

## Beispiel 14

Vergleich zwischen erfindungsgemäßen biotechnischen allogenen Transplantaten sowie autogenen Venentransplantaten und einem ePTFE-Transplantat am Modell Schwein

**[0133]** Diese Untersuchung vergleicht erfindungsgemäße biotechnische allogene Transplantate mit autogenen Venentransplantaten und ePTFE-Transplantaten am Modell Schwein. Die Saphenavene des Schweins ist sehr kurz und enger als die Femoralarterie des Schweins und ist daher als Transplantat für einen Femoral-Bypass ungeeignet. Dagegen ist die epigastrische Vene des Schweins lang und hat einen ähnlichen Durchmesser wie die Femoralarterie des Schweins.

Gruppe 3 (Allotransplantat vs. Autotransplantat). Um die erfindungsgemäßen biotechnischen Allotransplantate mit frischen autogenen Venentransplantaten zu vergleichen, wird ein biotinyliertes und hepariniertes Allotransplantat mit oder ohne angeheftetem bFGF in die Femoralarterie eines Schweins implantiert. Ein frisches autogenes epigastrisches Venentransplantat wird in das kontralaterale Gefäß implantiert. Sechs Tiere wurden nach einem Monat und nach sechs Monaten untersucht.

Gruppe 4 (Allotransplantat vs. ePTFE-Transplantat). Um die erfindungsgemäßen biotechnischen Allotransplantate mit ePTFE-Transplantaten zu vergleichen, wird ein biotinyliertes und hepariniertes Allotransplantat, oder das gleiche mit angeheftetem bFGF, in die Femoralarterie eines Schweins und ein ePTFE-Transplantat in das kontralaterale Gefäß implantiert. Sechs Tiere wurden nach einem Monat und nach sechs Monaten untersucht.

**[0134]** Die Inkorporierung der Wirtszellen, der Abbau des Transplantatmaterialproteins und morphometrische Messungen werden zahlenmäßig erfasst. Die Durchgängigkeit des Transplantats, das Blutbild und die Gerinnungsparameter wurden regelmäßig überwacht. Detaillierte Vorschriften sind in den vorangehenden Beispielen angegeben.

**[0135]** In allen Fällen zeigten die erfindungsgemäßen Transplantate überlegene Durchgängigkeit, höhere Invasion des Transplantats durch die Wirtszellen und ausgedehntere Adsorption des extrazellulären Matrixproteins des Transplantats, als man mit den PTFE-Transplantaten sehen konnte, mit denen die erfindungsgemäßen Prothesen verglichen werden.

## Beispiel 15

Vergleich zwischen erfindungsgemäßen biotechnischen xenogenen Prothesen vom Schwein sowie autogenen Venentransplantaten vom Hund und ePTFE-Transplantaten am Modell Hund

**[0136]** Vernetzte xenogene biologische Gefäßtransplantate wurden viele Jahre lang als alternative Wahl für Prothesen bei der arteriellen Rekonstruktion verwendet. Ein Hauptvorteil der xenogenen Transplantate ist ihre im Vergleich zu allogenen Transplantaten bequeme Verfügbarkeit in verschiedenen Größen. Dezellularisierte xenogene Transplantate sind weniger immunogen bei besseren Heilungseigenschaften. Die kovalente Verknüpfung mit Heparin beugt der Thrombose vor und die Behandlung mit bFGF beschleunigt den Heilungsprozess des Gefäßes und verhindert einen Abbau des Transplantats. In dieser Untersuchung wurden erfindungsgemäß biotechnisch hergestellte xenogene Transplantate vom Schwein mit autogenen Venentransplantaten und mit ePTFE-Transplantaten am Modell Hund verglichen. Die Saphenavene des Hundes ist relativ lang und hat eine ähnliche Größe wie die Femoralarterie des Hundes. Daher benutzt man die Saphenavene als Transplantat für den femoralen Bypass.

Gruppe 5 (Xenotransplantat vs. Autotransplantat). Um die biotechnischen Xenotransplantate mit frischen autogenen Venentransplantaten zu vergleichen, wird ein biotinyliertes und hepariniertes Xenotransplantat, oder das gleiche Transplantat mit angeheftetem bFGF, in die Femoralarterie eines Hundes, und ein frisches autogenes Saphenavenen-Transplantat in das kontralaterale Gefäß implantiert. Die Gefäße werden nach einem Monat und nach sechs Monaten untersucht. Zu jedem Zeitpunkt wurden sechs Tiere ausgewählt.

Gruppe 6 (Xenotransplantat vs. ePTFE-Transplantat). Um die erfindungsgemäßen biotechnischen Xenotransplantate mit ePTFE-Transplantaten zu vergleichen, wurde ein biotinyliertes und hepariniertes Xenotransplantat, oder das gleiche mit angeheftetem bFGF, in eine Femoralarterie des Hundes und ein ePTFE-Transplantat in das kontralaterale Gefäß implantiert. Nach einem Monat und nach sechs Monaten wurden jeweils sechs Tiere untersucht. Die Infiltration der Wirtszellen, der Abbau des Transplantatmaterialproteins und morphometrische Messungen wurden zahlenmäßig erfasst. Die Durchgängigkeit des Transplantats, das Blutbild und die Gerinnungsparameter wurden regelmäßig überwacht. Detaillierte Vorschriften sind in den vorangehenden Beispielen angegeben.

**[0137]** In allen Fällen zeigten die erfindungsgemäßen Transplantate überlegene Durchgängigkeit, höhere Invasion des Transplantats durch die Wirtszellen und ausgedehntere Adsorption des extrazellulären Matrixproteins des Transplantats, als man mit den PTFE-Transplantaten sehen konnte, mit denen die erfindungsgemäßen Prothesen verglichen werden.

## Beispiel 16

## Histologie der Klappe der externen Jugularvene beim Hund

**[0138]** In einer normalen Klappe der externen Jugularvenen des Hundes sind die Zellbestandteile deutlich sichtbar. Bei dezellularisierten Klappen der externen Jugularvenen des Hundes sind jedoch die Zellbestandteile vollständig entfernt.

## Beispiel 17

## Histologie der EJV-Klappe beim Hund

**[0139]** Eine normale, mit Hämatoxylin und Eosin gefärbte EJV-Klappe vom Hund zeigte Endothelzellen. Dezellularisierte EJV-Klappen vom Hund zeigten Venenklappen ohne Endothelzellen.

## Beispiel 18

## Immobilisierung von Heparin auf dezellularisierten biologischen Gefäßprothesen

**[0140]** Die dezellularisierten Transplantate wurden umgestülpt (innen nach außen) und mit 1 mol/l Hydroxylaminsulfat 1 Stunde lang vorbehandelt. Die Carboxylgruppen des Heparins wurden durch das Vernetzungsmittel 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) aktiviert. Die Immobilisierung des Heparins auf dezellularisierten Transplantaten wurde durch Inkubation des dezellularisierten Gefäßmaterials über Nacht bei 27°C mit Heparin-EDC-Lösung, Gewichtsverhältnis 1:2, wobei der pH mit 0,05 mol/l Salzsäure auf 1,5 gehalten wurde, erreicht. Ungebundenes Heparin wurde mit destilliertem Wasser ausgewaschen. Eine colorimetrische Bestimmung zur Ermittlung der Menge Heparin in der Probe wurde wie im einzelnen im Beispiel 5 angegeben ausgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 2 gezeigt.

	Heparin-Immobilisierung	
	1 Tag (USP/cm <sup>2</sup> )	10 Tage (USP/cm <sup>2</sup> )
Schweinecarotisarterie	17,02	15,01
Hundecarotisarterie	14,71	13,62
Hunde-EJV	13,33	12,07

## Beispiel 19

## Gefäßimplantation in Hunde

**[0141]** Erfindungsgemäß bearbeitete Schweine-Carotisarterien wurden in die Carotisarterien und die Femoralarterie und Femoralvene von Hunden implantiert. Jeder Hund erhielt bilaterale carotis-arterio-arterielle Bypass-Transplantate und bilaterale femoral-arterio-venöse Transplantate für einen Zeitraum von einer Woche, zwei Wochen, einem Monat, zwei Monaten, drei Monaten und sechs Monaten. Die Durchgängigkeit wird mittels einer wöchentlichen Duplexultraschalluntersuchung und mit Durchflussmessungen bei der Tötung dokumentiert. Die Gefäßheilung des Transplantats wird durch histochemische und immunhistochemische Untersuchungen, darunter Identifikation des Zelltyps, die Zellproliferation und morphometrische Analysen (Lumendurchmesser sowie Dicke und Fläche der Neointima) analysiert.

**[0142]** Der Metabolismus des Matrixproteins wird durch Biotin-Streptavidin-Färbung wie oben in Beispiel 3 beschrieben gemessen. Die Immunreaktion der empfangenden Hunde auf die Implantation des Xenotransplantats wird ebenfalls untersucht, einschließlich der Aktivierung des Komplementärsystems, Produktion spezifischer Antikörper für das Schweinekollagen und die T-zellspezifische Aktivierung gegenüber dem Schweinekollagen.

**[0143]** Die Rolle der bFGF-Bindung bei der Beschleunigung der Gefäßheilung wird durch Verwendung paar-

weiser interner Vergleiche in unterschiedlichen Hunden untersucht. Bei dieser Studie wurden sechs Hunde verwendet. Jeder Hund erhielt ein Transplantat mit gebundenem bFGF in eine Carotisarterie und ein anderes in eine Femoralarterie und Femoralvene. Jeder Hund erhielt auch auf der kontralateralen Seite zum internen Vergleich in die Carotisarterien und Femoralvene Transplantate, aber ohne gebundenes bFGF. Die Hunde wurden nach einem Monat getötet. Die Durchgängigkeit und die Gefäßheilung der mit bFGF beschichteten und der unbeschichteten Gefäßprothesen wurden miteinander verglichen.

**[0144]** Die Leistungsfähigkeit der erfindungsgemäßen biotechnischen Transplantate der Schweine-Carotisarterien wird am Modell Hund mit autogenen Saphenavenen-Transplantaten sowohl mittels carotis-arterio-arterieller Bypass-Transplantate als auch femoral-arterio-venöser Transplantate verglichen. Bei dieser Studie wurden sechs Hunde verwendet. Jeder Hund erhielt sowohl in der Carotisarterie als auch in der Femoralvene je ein biotechnisches Xenotransplantat und die kontralaterale Seite erhielt als internen Vergleich ein autogenes Saphenavenen-Transplantat. Die autogenen größeren Saphenavenen wurden von den Beinen des Hundes entnommen. Die Hunde wurden nach einem Monat getötet. Die Durchgängigkeit und die Gefäßheilung von biotechnischen Xenotransplantaten und autogenen Saphenavenen-Transplantaten wurden miteinander verglichen.

**[0145]** Die Leistungsfähigkeit der Xenotransplantate in vivo wird mit kleinkalibrigen ePTFE-Transplantaten (mit einem Innendurchmesser von Ziffer 4 mm) verglichen. Bei dieser Studie wurden sechs Hunde verwendet. Jeder Hund erhielt ein biotechnisches Xenotransplantat sowohl in der Carotisarterie als auch in der Femoralvene und die kontralaterale Seite erhielt ePTFE-Transplantate als internen Vergleich. Die Hunde wurden nach einem Monat getötet. Die Durchgängigkeit und die Gefäßheilung wurden zwischen Xenotransplantaten und ePTFE-Transplantaten verglichen.

**[0146]** Die Leistungsfähigkeit von Xenotransplantaten in vivo wird mit im Handel erhältlichen glutaraldehydfixierten Carotisarterien-Transplantaten vom Rind (bezogen von St. Jude Medical, Inc. St. Paul, Minnesota) verglichen. Wiederum wurden bei dieser Untersuchung sechs Hunde verwendet. Jeder Hund erhielt sowohl in die Carotis- als auch in die femorale Position ein biotechnisches Xenotransplantat und die kontralaterale Seite erhielt als internen Vergleich glutaraldehydfixierte Rindercarotisarterien-Transplantate. Die Hunde wurden nach einem Monat getötet. Die Durchgängigkeit und die Gefäßheilung wurden zwischen den Xenotransplantaten und dem glutaraldehydfixierten Carotisarterien-Transplantaten vom Rind verglichen.

**[0147]** Unmodifizierte Xenotransplantate wurden mit erfindungsgemäßen biotechnischen Xenotransplantaten verglichen. Für diese Untersuchung wurden sechs Hunde verwendet. Jeder Hund erhielt je ein biotechnisches Xenotransplantat sowohl in die Carotisarterie als auch in die Femoralvene und die kontralaterale Seite erhielt frische Schweine-Carotisarterien als interne Vergleiche. Die Hunde werden nach einem Monat getötet. Durchgängigkeit und Gefäßheilung werden zwischen biotechnischen Xenotransplantat und frischen Schweine-Carotisarterien verglichen.

**[0148]** Die Remodellierung der Gefäße und die Gefäßfunktionen über längere Zeit wurden im Hundemodell der carotis-arterio-arteriellen Bypass-Transplantate und der femoral-arterio-venösen Transplantate untersucht. Bei dieser Studie wurden drei Tiere verwendet. Jedes Tier erhielt vier biotechnische Schweine-Carotisarterien, zwei an der Carotissposition und zwei an der Femoralposition. Jeden Monat wurde mittels Duplexultraschalluntersuchung die Durchgängigkeit bestimmt. Beginnend nach sechs Monaten wurde alle drei Monate die motorische Funktion der Gefäße der Gefäßprothesen als Reaktion auf Norepinephrin für die Kontraktion und auf Acetylcholin für die endothelabhängige Relaxation untersucht. Als Antwort auf die vasoaktive Wirkstoffe wurden Angiogramm und Lumendurchmesser des Transplantats analysiert. Alternativ wurden Messungen mit intraluminalen Gefäßultraschall (IVUS) zur Messung von Durchmesseränderungen des Transplantats als Antwort auf die Wirkstoffe durchgeführt. Nach drei Jahren wurden die Tiere getötet. Das Transplantat wurde zur myografischen Analyse der motorischen Gefäßfunktionen sowie zur histologischen und molekularen Analyse der normalen glatten Muskelzellen und der Endothelzellen-Phänotypen, wie auch der Matrixkomponenten und Struktur entnommen.

#### Beispiel 20

##### Messung der Nachgiebigkeit von biotechnischen Gefäßgeweben

**[0149]** Die Nachgiebigkeit von Gefäßen wurde unter Verwendung eines speziell angefertigten Systems bestimmt. Das System bestand aus einem digitalen Druckaufnehmer (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL), einer Kolbenpumpe (Harvard Apparatus, Holliston, MA), einer speziell angefertigten einstellbaren Kanüle, einem

Schlauchsystem (Cole-Parmer), einem Video-Camcorder (Panasonic, Japan) und einem Pentium II-PC (Dell, Round Rock, TX) mit einer Video-Aufnahmekarte (video acquisition board, Data Translations, Marlboro, MA). Die Gefäße wurden mit 2-0-Seidenfaden an die einstellbare Kanüle genäht. Danach wurde das System mit PBS von 37°C gespült, um Luft aus dem Gefäßabschnitt und dem Schlauchsystem zu entfernen. Um viskoelastische Effekte zu vermindern, wurden die Gefäße durch vorangehendes Testen auf Nachgiebigkeit konditioniert, indem sie langsam auf 220 mm Hg unter Verwendung der Kolbenpumpe aufgepumpt wurden und dieser Druck über 45 Sekunden gehalten wurde. Danach wurden die Gefäße langsam auf 0 mm Hg entleert. Nach 4 Zyklen Aufpumpen auf 220 mm Hg-Entleeren wurden die Gefäße langsam auf 200 mm Hg aufgepumpt und die Länge der Kanüle wurde eingestellt, um eine Krümmung im Gefäß zu beseitigen. Bei dieser Länge wurde die Kanüle fixiert.

**[0150]** Während des Nachgiebigkeitstests wurden Gefäß und Kanülenanordnung in ein Bad von PBS bei 37°C eingetaucht, um physiologische Temperaturbedingungen zu simulieren. Nachdem Äquilibrieren wurden die Gefäße unter Verwendung der Kolbenpumpe in Stufen von 10 mm von 0 auf 200 mm Hg aufgepumpt. Danach wurden die Gefäße in 10 mm-Stufen entleert. Die Außendurchmesser der Gefäße wurden bei jeder Stufe unter Verwendung des Video-Camcorders aufgezeichnet. Zur Messung des Durchmessers wurden die Videobilder dann auf einen PC heruntergeladen. Für jede Stufe des Drucks von 0 bis 200 mm und zurück auf 0 mm Hg wurden die Gefäßdurchmesser in Pixeln unter Verwendung von Scion Image (Scion Corp., Frederick, MD) gemessen. Die prozentuale Änderung des Durchmessers relativ zum Durchmesser bei 0 mm Hg wurde als  $\Delta D = 100 \times (D_p - D_0)/D_0$  berechnet, wobei  $\Delta D$  die prozentuale Änderung des Durchmessers,  $D_p$  der Durchmesser bei einem bestimmten Druck und  $D_0$  der Bezugsdurchmesser bei 0 mm Hg ist. Die mittlere Nachgiebigkeit im physiologischen Druckbereich, angenommen mit 70–130 mm Hg, wurde als Anstieg der linearen Regressionsgeraden durch  $\Delta D$  über dem Druck zwischen 70 und 130 mm Hg als Prozent Durchmesseränderung pro mm Hg berechnet. Die Daten wurden dann auf die Nachgiebigkeit von frischen Gefäßen normiert, die mit 100% angenommen wurde.

**[0151]** Die Nachgiebigkeit wurde für dezellularisierte und dezellularisierte heparinierte Gefäße bestimmt und mit der Nachgiebigkeit von frischen und in Alkohol konservierten Carotis-Communisarterien vom Schwein, mit ePTFE-Gefäßtransplantaten und mit im Handel erhältlichen glutaraldehydfixierten Rinder-carotisarterien und Gefäßtransplantaten aus menschlichen Umbilicalvenen (HUV) verglichen. Die ePTFE-Transplantate ( $n = 2$ ) waren am steifsten und änderten im Bereich von 0–200 mm Hg ihren Durchmesser nur um 2,8% ([Fig. 1A](#) und B). Das mit Glutaraldehyd fixierte Rindertransplantat ( $n = 2$ ) war fast so steif wie das ePTFE-Transplantat und änderte seinen Durchmesser im Bereich von 0–200 mm Hg nur um 4,8%, während das glutaraldehydfixierte HUV-Transplantat ( $n = 2$ ) im gleichen Druckbereich seinen Durchmesser nur um etwa 13,8% änderte. Frische, lebende Gefäße ( $n = 4$ ) nahmen über den Druckbereich von 200 mm Hg im Durchmesser um 73% zu, während dezellularisierte Gefäße ( $n = 4$ ) die am wenigsten steifen waren und zwischen 0 und 200 mm Hg ihren Durchmesser um 88% vergrößerten. Die Immobilisierung von Heparin versteifte die dezellularisierten Gefäße ( $n = 2$ ) etwas, die im Versuchsbereich ihren Durchmesser um 69% vergrößerten, was fast identisch mit dem Verhalten von frischen Gefäßen war. Die Konservierung frischer Gefäße ( $n = 4$ ) mit Alkohol versteifte diese beträchtlich im Vergleich zu frischem lebenden Gefäßen, weil sie ihren Durchmesser über 200 mm Hg nur um 56% ausdehnten.

**[0152]** Die mittlere Nachgiebigkeit der Gefäße im physiologischen Druckbereich von 70–130 mm Hg wurde ebenfalls aus den Druck-Durchmesser-Daten ([Fig. 2C](#)) berechnet. Die mittlere Nachgiebigkeit von frischen Gefäßen während des Aufblasens war 0,172%/mm Hg. Die Verknüpfung von Heparin mit den Gefäßen reduzierte die Nachgiebigkeit im physiologischen Druckbereich weiter auf 0,0975%/mm Hg, was ungefähr 57% der Nachgiebigkeit der frischen Gefäße war. Zum Vergleich wurde auch die Nachgiebigkeit von handelsüblichen Transplantaten aus glutaraldehydfixierten Rinderarterien und menschlichen Umbilicalvenen wie auch aus ePTFE berechnet. Glutaraldehydfixierte HUV-Transplantate hatten eine Nachgiebigkeit von 0,053%/mm Hg, nur 31% der Nachgiebigkeit frischer Gefäße. Die Nachgiebigkeit von glutaraldehydfixierten Rinderarterien Transplantaten war 0,031%/mm Hg; nur 18% der Nachgiebigkeit von frischen Schweine-Carotis-communis-Arterien. Die von den geprüften Proben am wenigsten nachgiebigen waren die ePTFE-Transplantate, die eine Nachgiebigkeit von nur 0,024%/mm Hg; etwa 14% der Nachgiebigkeit der frischen Gefäße im physiologischen Druckbereich hatten. Diese Ergebnisse deuten an, dass die heparinierten dezellularisierten Gefäß-Xenotransplantate, obwohl im physiologischen Bereich weniger nachgiebig als frische native Gefäße, fast doppelt so nachgiebig wie die vorhandenen kleinkalibrigen biologischen Gefäßtransplantate und etwa viermal nachgiebiger als synthetische Transplantate sind.

**[0153]** [Fig. 1A](#) und B zeigen den Druck über dem Durchmesser für frische Schweine-Carotis-communis-Arterien (PCA, frisch), alkoholkonservierte PCA (alkoholkonserviert), dezellularisierte PCA, heparinierte dezellu-

larisierte PCA (Heparin), ePTFE-Transplantat, glutaraldehydfixierte menschliche Umbilicalvene (HUV) und glutaraldehydfixierte Rinderarterien (Rind). Auf der Basis der Druck/Durchmesser-Daten wurde die mittlere Nachgiebigkeit im physiologischen Druckbereich von 70–130 mm Hg bestimmt und mit der Nachgiebigkeit frischer Gefäße verglichen. Die dezellularisierten Gefäße waren die nachgiebigsten, gefolgt von frischen Gefäßen, alkoholkonservierten bzw. heparinbehandelten Gefäßen.

#### Beispiel 21

##### Prüfung des Berstdrucks von biotechnischen Gefäßgeweben

**[0154]** Die für den Berstdruck der Gefäße verwendete Vorrichtung war dieselbe wie bei der Prüfung der Nachgiebigkeit. Die Gefäße wurden mit 2-0-Seidenfaden an die Kanüle genäht und man ließ sie sich bei ansteigendem Druck frei ausdehnen. Die Gefäße wurden mit PBS bei Raumtemperatur mit etwa 45 mm Hg/Sekunde aufgeblasen, wobei der Druck mit dem Druckaufnehmer auf einen Pentium II-PC (Gateway, North Sioux City, SD) mit einer Datenerfassungskarte (National Instruments Co., Austin, TX) aufgenommen wurde. Der Berstdruck wurde als höchster vor dem Versagen des Gefäßes erreichter Druck bis zur Messgrenze des Druckaufnehmers von 2300 mm Hg definiert.

**[0155]** Von den geprüften frischen Gefäßen ( $n = 4$ ) barst keines innerhalb der Versuchsgrenze von 2300 mm/Hg. Eines von vier alkoholkonservierten Gefäßen barst bei einem Druck von 1194 mm Hg, wie auch eines der vier dezellularisierten Gefäße bei 1654 mm Hg ([Fig. 4](#)). Zwei heparinierte Gefäße wurden geprüft und eines barst bei 1912 mm Hg, das andere aber bis zur Versuchsgrenze des Drucks nicht. Diese Ergebnisse zeigen an, dass die Gefäße immer noch einen hohen Sicherheitsabstand von über zehnfach gegenüber dem physiologischen Druck haben, obwohl sie während der Verarbeitung etwas von der Festigkeit verlieren können.

**[0156]** [Fig. 4](#) zeigt die Ergebnisse, wenn die Gefäße geprüft wurden, um den maximalen Druck zu bestimmen, dem sie vor dem Bersten widerstehen können, um die Sicherheit nach der Implantation sicherzustellen. Keines der vier frischen Gefäße barst bis zur Versuchsgrenze von 2300 mm Hg Druck. Von den geprüften vier alkoholkonservierten und dezellularisierten Gefäßen barst jeweils nur eins vor der Druckgrenze des Versuchs. Zwei heparinierte Gefäße wurden geprüft und eines barst. Diese Ergebnisse zeigen, dass die heparinierten Transplantate ausreichend fest sind, um dem physiologischen Druck zu widerstehen.

#### Beispiel 22

##### Prüfung der Nahtfestigkeit von biotechnischen Gefäßgeweben

**[0157]** Zur Prüfung der Gefäße auf Nahtfestigkeit wurde eine spezielle Vorrichtung verwendet, die aus einem Kraftaufnehmer (Omega Engineering Inc., Stamford, CT), einem digitalen Messgerät (Omega), einer Datenerfassungskarte (National Instruments), einem Pentium II-PC (Gateway) und einem motorgetriebenen Stativ (Harvard Apparatus) bestand. 3–4 cm lange Abschnitte der Gefäße wurden an einem Ende im Winkel von 45° abgeschnitten und mit dem anderen Ende in die Stativklemme der Vorrichtung für die Nahtfestigkeit eingeklemmt. Dann wurde ein Nahtfaden im abgewinkelten Ende des Gefäßes an der Spitze, an der Ferse, auf der linken oder rechten Seite, 2 mm vom Ende angebracht, als Schleife durch einen Haken am Kraftaufnehmer geführt und die Enden des Fadens mit mindestens 7 Knoten zusammen gebunden, um ein Abgleiten zu vermeiden. Das Gefäß wurde dann vom Kraftaufnehmer mit einer konstanten Geschwindigkeit von 0,8 mm/Sekunde weg gezogen, bis der Faden aus dem Gefäß herausgezogen wurde oder riss. Die maximale Kraft auf den Faden wurde als Nahtfestigkeit des Gefäßes aufgezeichnet.

**[0158]** Es wurden fünf gewöhnlich bei der Anastomose von Gefäßen verwendete Typen von Nahtfäden angewendet. Jeder Fadentyp wurde dreimal an der Ferse, Spitze, linken und rechten Position von frischen, alkoholkonservierten und heparinierten Gefäßen geprüft. Der Mittelwert der resultierenden 12 Versuche mit jeder Faden-Gefäß-Kombination wurde verglichen ([Fig. 5A](#)). Die heparinierten Gefäße hatten eine signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Nahtfestigkeit mit einem 5-0 Goretex-Faden im Vergleich mit frischem und alkoholkonservierten Gefäßen, während die alkoholkonservierten Gefäße eine signifikant höhere Nahtfestigkeit mit 8-0 Goretex im Vergleich mit frischen und heparinierten Gefäßen hatten. Es gab keinen Unterschied in der mittleren Nahtfestigkeit für alle geprüften Fadentypen zwischen frischen, alkoholkonservierten und heparinierten Gefäßen ([Fig. 5B](#)). Daher sollten heparinierten Transplantate eine ausreichende Nahtfestigkeit besitzen, um in vivo Kräften an der Anastomose zu widerstehen.

**[0159]** Die [Fig. 5A](#) und B zeigen die für frische, alkoholkonservierte und heparinierte Gefäße unter Verwen-

dung von 5 klinisch bedeutenden Nahtfäden bestimmte Nahtfestigkeit (A). Heparinierte Gefäße hatten mit 5-0 Goretex-Faden eine signifikant höhere Nahtfestigkeit, während die alkoholkonservierten Gefäße eine signifikant höhere Nahtfestigkeit mit 8-0 Goretex-Faden zeigten. Die mittlere Nahtfestigkeit für jeden Gefäßstyp wurde im Mittel bei den Festigkeiten für die 5 verwendeten Fadentypen gefundenen (B). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen frischen, alkoholkonservierten und heparinierten Gefäßen.

### Patentansprüche

1. Gefäßprothese, umfassend dezellularisiertes, an eine antithrombogene Verbindung kovalent gebundenes Gefäßgewebe, wobei die antithrombogene Verbindung ferner an einen Wachstumsfaktor nichtkovalent gebunden ist.

2. Gefäßprothese nach Anspruch 1, wobei das dezellularisierte Gefäßgewebe ein Blutgefäß, eine aus einem Blutgefäß ausgeschnittene Klappe, eine in einem Blutgefäßabschnitt gehaltene Klappe, eine Aortenklappe oder eine Pulmonalisklappe ist.

3. Gefäßprothese nach Anspruch 1, wobei die antithrombogene Verbindung ein Glykosaminoglykan ist.

4. Gefäßprothese nach Anspruch 3, wobei das Glykosaminoglykan Heparin ist.

5. Gefäßprothese nach Anspruch 1, wobei die antithrombogene Verbindung Dextran, Hirudin, Cumarin, ein oder mehrere thrombolytische Wirkstoffe, funktionelle Derivate von diesen oder eine Kombination aus diesem ist.

6. Gefäßprothese nach Anspruch 4, wobei der Wachstumsfaktor bFGF ist.

7. Gefäßprothese nach Anspruch 4, wobei der Wachstumsfaktor an das dezellularisierte Gefäßgewebe durch nichtkovalente Bindung an das Heparin gebunden ist.

8. Gefäßprothese nach Anspruch 1, wobei der Wachstumsfaktor Fibroblastenwachstumsfaktor, basischer Fibroblastenwachstumsfaktor, saurer Fibroblastenwachstumsfaktor, heparinbindender epidermaler Wachstumsfaktor, transformierender Wachstumsfaktor Alpha, transformierender Wachstumsfaktor Beta, Gefäßendothelzellen-Wachstumsfaktor, Plazenta-Wachstumsfaktor, insulinartiger Wachstumsfaktor oder eine Kombination aus diesen ist.

9. Gefäßprothese nach Anspruch 1, ferner einen pharmazeutisch aktiven Wirkstoff umfassend.

10. Gefäßprothese nach Anspruch 9, wobei der pharmazeutisch aktive Wirkstoff ein thrombolytischer Wirkstoff, ein Stickoxid-donor ein genabgebender Vektor oder ein vasoaktiver Wirkstoff ist.

11. Gefäßprothese nach Anspruch 10, wobei der thrombolytische Wirkstoff Plasmin, Plasminogen, Urokinase oder Thrombin ist.

12. Gefäßprothese nach Anspruch 1, ferner einen Stent umfassend.

13. Gefäßprothese nach Anspruch 1, wobei die Gefäßprothese für den Empfänger immunologisch verträglich ist.

14. Verfahren zur Herstellung einer dezellularisierten Gefäßprothese, umfassend die Schritte:

- a) Gewinnung von Gefäßgewebe von einem Menschen oder einem Tier,
- b) Dezellularisieren des Gefäßgewebes,
- c) kovalentes Binden des dezellularisierten Gefäßgewebes an eine antithrombogene Verbindung und
- d) nichtkovalentes Binden der antithrombogenen Verbindung an einen Wachstumsfaktor.

15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der Schritt des Dezellularisierens des Gefäßgewebes die Schritte

- a) Einweichen des Gefäßgewebes in Wasser,
- b) mechanisches Entfernen der Zellbruchstücke,
- c) Behandlung des Gefäßgewebes mit mindestens einer Protease, mindestens einer Lipase und mindestens einer Nuklease und
- d) Waschen des Gefäßgewebes in vorgewärmter phosphatgepufferter Salzlösung umfasst.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Protease eine Konzentration im Bereich von 0,1% w/v bis 10% w/v hat und wobei die Behandlung mit Protease von 5 Minuten bis zu einer Stunde bei einer Temperatur von 20 bis 37°C erfolgt.

17. Verfahren nach Anspruch 17, wobei die Lipase eine Konzentration von 0,1% w/v bis 10% w/v hat und wobei die Behandlung mit Lipase von 5 Minuten bis zu einer Stunde bei einer Temperatur von 20 bis 37°C erfolgt.

18. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Nuklease eine Konzentration von mindestens 0,1 Einheiten/ml bis 10 Einheiten/ml hat und wobei die Behandlung mit Nuklease von mindestens 5 Minuten bis zu einer Stunde bei einer Temperatur von mindestens 20°C bis 37°C erfolgt.

19. Verfahren nach Anspruch 15, ferner umfassend die Schritte

- a) Behandlung des Gefäßgewebes mit einem Netzmittel einer Konzentration von 10%,
- b) Behandlung des Gefäßgewebes mit Dehydrocholsäure einer Konzentration von mindestens 5% bis 30%,
- c) Waschen des Gefäßgewebes mit destilliertem Wasser und
- d) Behandeln des Gefäßgewebes mit einer Lösung von Natriumdodecylsulfat einer Konzentration von 0,5% w/v bis 10% w/v.

20. Verfahren nach Anspruch 14, wobei der Schritt des Beschichtens des dezellularisierten Gefäßgewebes mit der antithrombogenen Verbindung die Schritte

- a) Perfundieren des dezellularisierten Gefäßgewebes mit Hydroxylaminsulfat,
- b) kovalentes Binden von Heparin an das dezellularisierte Gefäßgewebe und
- c) Entfernen ungebundenen Heparins von dem heparinierten und dezellularisierten Gefäßgewebe umfasst.

21. Verfahren nach Anspruch 20, wobei das Hydroxylaminsulfat eine Konzentration von 0,5 bis 1,0 mol/l hat.

22. Verfahren nach Anspruch 20, ferner das Perfundieren des Gefäßgewebes mit einem Linkermolekül vor dem kovalenten Binden des Heparins an das dezellularisierte Gefäßgewebe umfassend.

23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei das Linkermolekül 1-Ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid ist.

24. Verfahren zur Bindung von heparinierten und dezellularisierten Gefäßgewebe an einen Wachstumsfaktor, umfassend die Schritte

- a) Waschen des heparinierten und dezellularisierten Gefäßgewebes und
- b) nichtkovalentes Binden des heparinierten und dezellularisierten Gefäßgewebes an einen Wachstumsfaktor.

25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei der Wachstumsfaktor eine Konzentration von 5 µg/ml bis 50 µg/ml hat.

26. Verfahren nach Anspruch 24, ferner den Schritt des Entferns ungebundenen Wachstumsfaktors aus dem behandelten heparinierten und dezellularisierten Gefäßgewebe umfassend.

27. Gefäßprothese nach einem der Ansprüche 1–13 zur Verwendung für die Behandlung von chronischer venöser Insuffizienz.

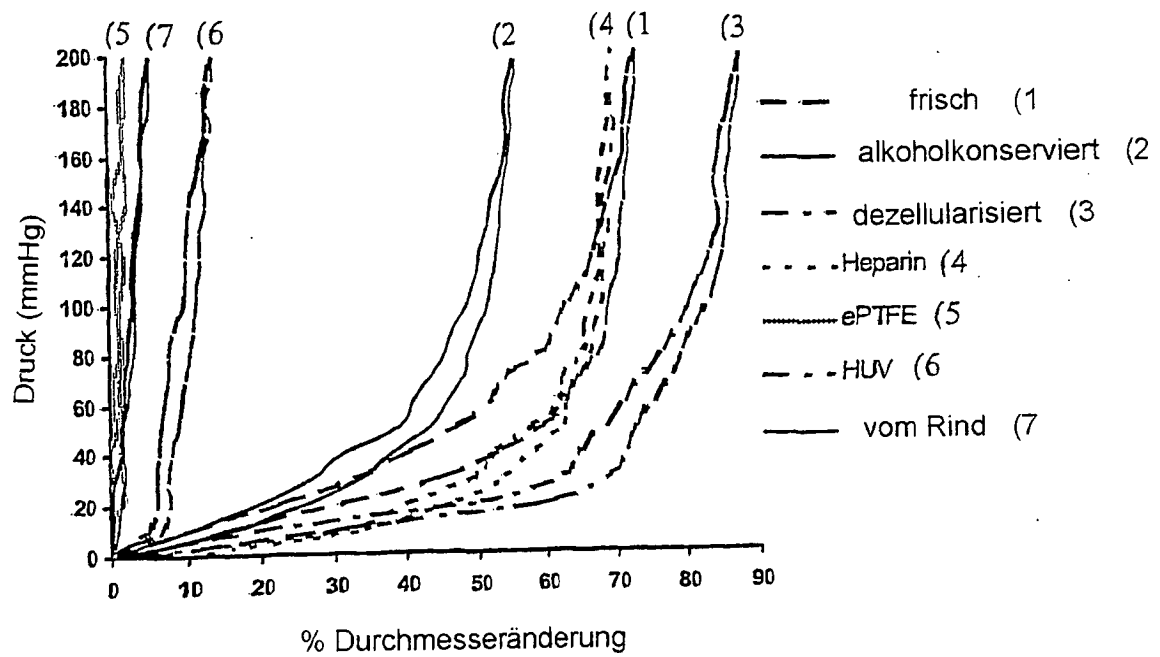
28. Gefäßprothese nach einem der Ansprüche 1–13 zur Verwendung für die Behandlung von chronischer venöser Insuffizienz, wobei die Gefäßprothese als ein Blutgefäß, eine in einem Blutgefäßabschnitt gehaltene Klappe, eine Aortenklappe oder eine Pulmonalisklappe wirkt.

Es folgen 9 Blatt Zeichnungen

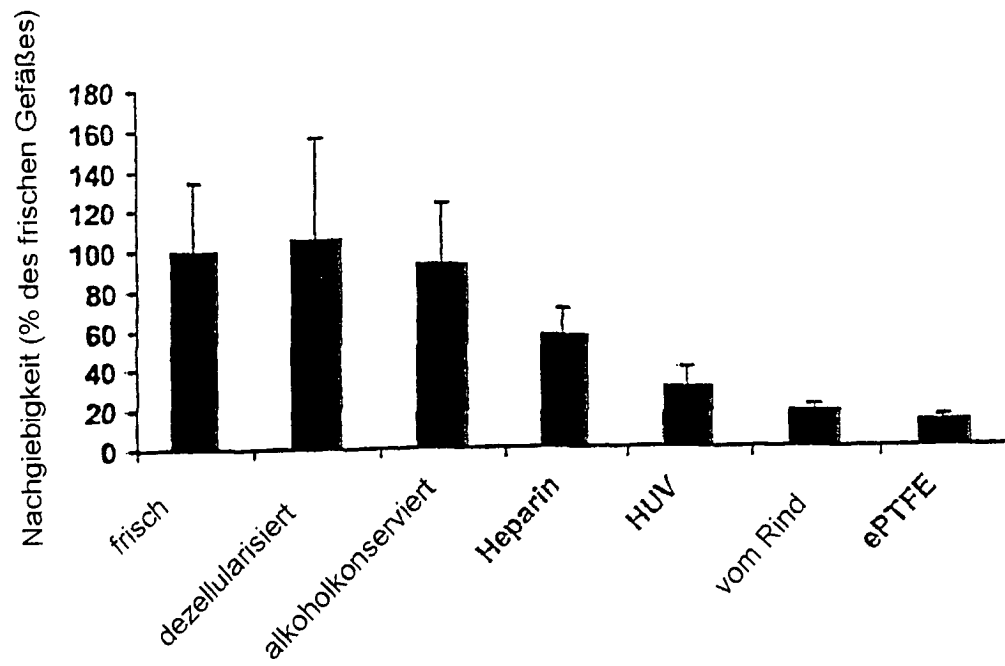


Anhängende Zeichnungen

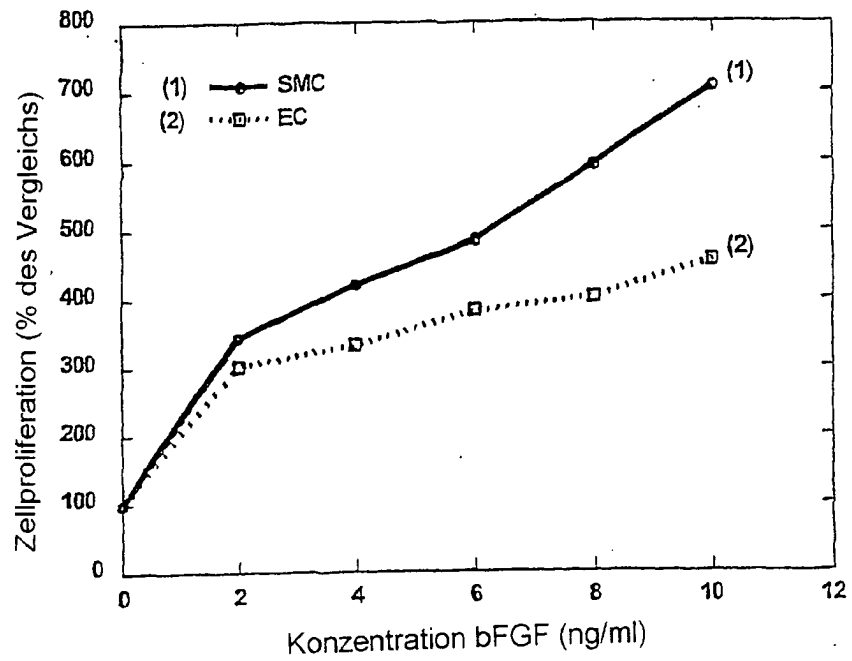
FIGUR 1A



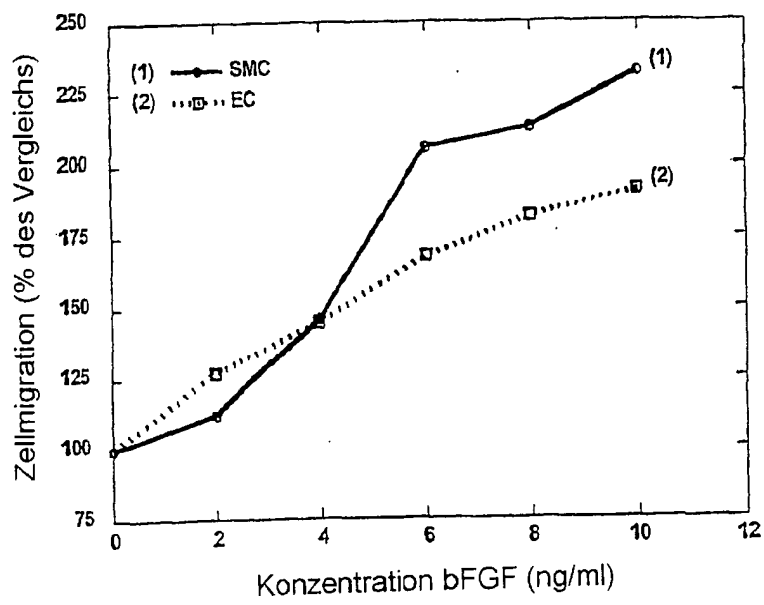
FIGUR 1B



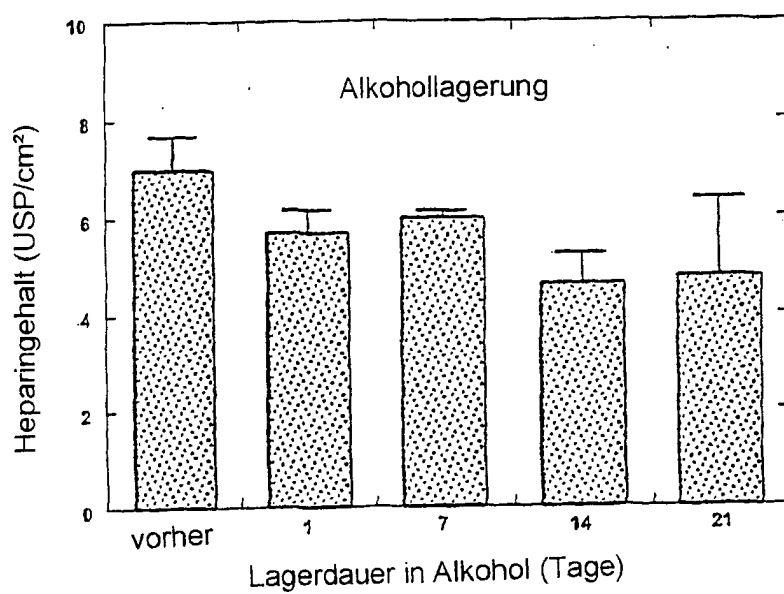
FIGUR 2A



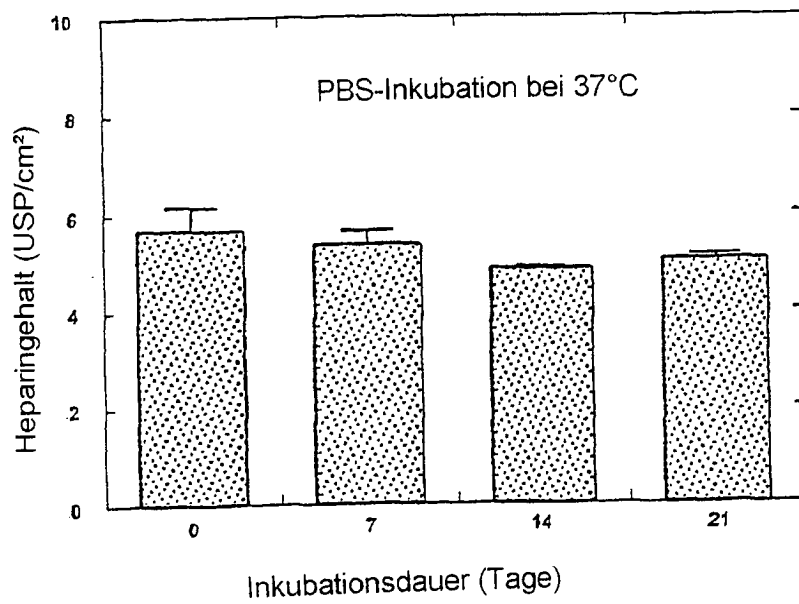
FIGUR 2B



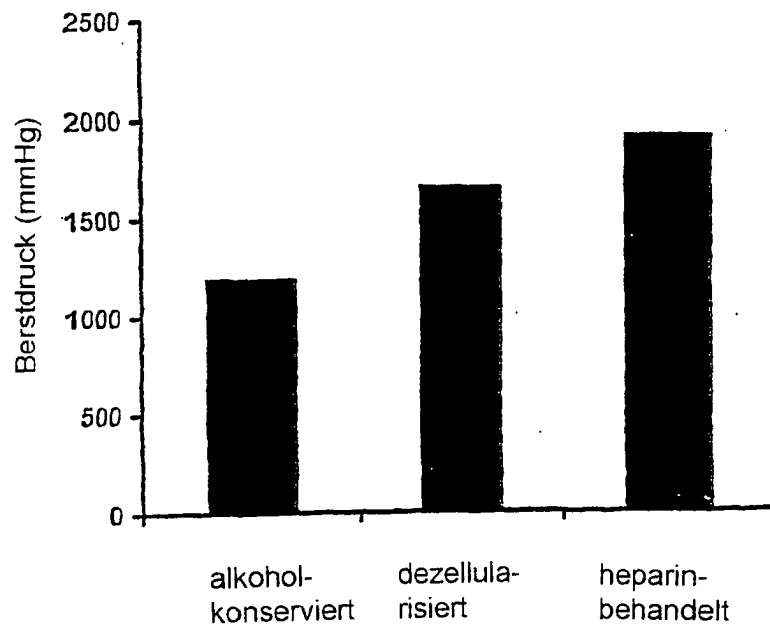
FIGUR 3A



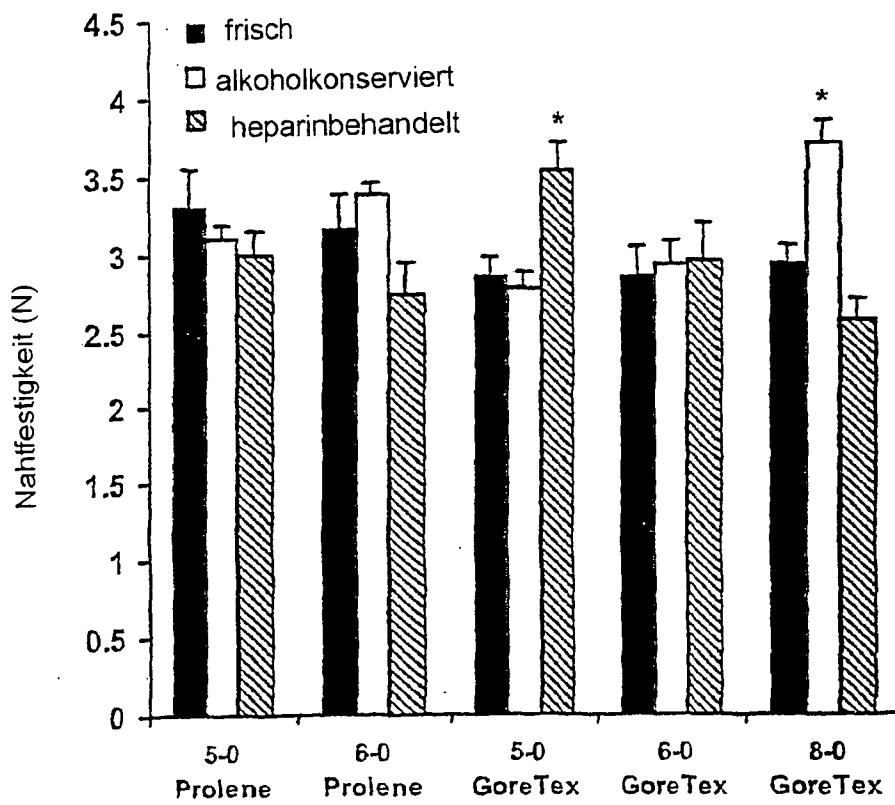
FIGUR 3B



FIGUR 4



FIGUR 5A





FIGUR 5B

