



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 28 933 T2** 2008.02.14

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 320 391 B1**

(51) Int Cl.⁸: **A61L 27/38** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 28 933.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/29323**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 975 255.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/022185**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.09.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **21.03.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.06.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **13.06.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **14.02.2008**

(30) Unionspriorität:
233401 P 18.09.2000 US

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

(73) Patentinhaber:
Organogenesis, Inc., Canton, Mass., US

(72) Erfinder:
**PARENTEAU, Nancy L., Wayland, MA 01778, US;
ROBERTSON, James T., Memphis, TN 38119, US**

(74) Vertreter:
**Zenz, Helber, Hosbach & Partner GbR, 45128
Essen**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR BEHANDLUNG EINES PATIENTEN MIT EINEM KULTIVIERTEN BINDEGEWE-
BE-KONSTRUKT**

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

Gebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung liegt auf dem Gebiet des Gewebe-Engineerings, und insbesondere betrifft sie die Verwendung eines kultivierten Lebend-Bindegewebe-Konstrukts bei chirurgischen Korrekturindikationen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Verletzungen der Bandscheibe sind für den Patienten schmerzhaft, schwächend und kostenintensiv. Die Bandscheibe liegt zwischen den Gelenkoberflächen benachbarter Wirbelkörper. Die Scheibe besteht aus konzentrischen Schichten von Kollagenfasern, dem Faserring (annulus fibrosis) und dem zentralen Gallertkern (nucleus pulposus), welchen er umgibt. Der Gallertkern besteht aus einer viskosen fluiden Bindegewebematrix und Zellen. Die Zellen des Gallertkerns, physalide Zellen, sind in unregelmäßigen Aggregaten über die extrazelluläre Matrix, die aus Grundsubstanz besteht, verteilt. An der Außenseite des Wirbels sind der Faserring und der Wirbel periphär durch Längsbänder gestützt, die sich parallel zur Wirbelsäule erstrecken.

[0003] Die Bandscheibe funktioniert als eine Art hydraulischer Stoßdämpfer, wobei der Gallertkern als das Hydraulikfluid agiert. Mit zunehmendem Alter werden die Kollagenfasern des Faserrings dünner und schwächer. Der Gallertkern kann den Ring nach hinten durchbrechen und die Nervenenden zusammen drücken, ein Zustand, der üblicherweise als „Bandscheibenvorfall“ bekannt ist. Die in Hals/Nackenverletzungen verwickelten Scheiben liegen zwischen dem fünften und sechsten (C5-C6) Wirbel und dem sechsten und siebten (C6-C7) Wirbel, und bei Verletzungen im unteren Rückenbereich sind der vierte und fünfte Lendenwirbel (L4-5) oder der fünfte Lendenwirbel und der erste Kreuzbeinwirbel (L5-S1) am meisten betroffen. In Fällen, bei denen die Scheibe nicht aufbricht, kann eine Nervkompression durch einen Knochensporn von einer degenerativen Scheibenerkrankung bewirkt werden. Der Knochensporn ragt in das Zwischenwirbelloch und komprimiert das Nervenende, was zu einem kontinuierlichen, periodisch auftretenden chronischen Schmerz führt.

[0004] Wenn ein Chirurg die gesamte oder Teile einer aufgebrochenen (ruptured) Scheibe aus dem Rücken entfernt, vergrößert er die Öffnung in dem Faserring, durch welche die aufgebrochene Scheibe und loses Scheibengewebe in dem Zwischenraum entfernt werden. Die gebildete Öffnung verheilt niemals, was sowohl die Anfälligkeit gegenüber einem weiteren Scheibenaufbruch durch die bestehende Öffnung als auch gegenüber einer Entzündungskaskade erhöht, die von der Freilegung des Scheibein-

neren gegenüber dem Epiduralraum resultiert. Die Entzündung und die Fibrose treten in dem Zwischenwirbelraum auf, und führen häufig zu Veränderungen bei den umgebenden Geweben, einschließlich den Wirbeln, Hyaline-Platten, der Dura Mater und dem Rückenmark.

[0005] Jedes Jahr werden ungefähr 200 000 Diskektomien durchgeführt. Eine biologische Reparatur des Ringloches oder -defektes ist wesentlich, um die Standardversorgung des Patienten mit einer Bandscheibenerkrankung zu verbessern. Die WO 98/40111 beschreibt ein biomechanisches Implantat, welches zumindest zwei Matrixkomponenten aufweist, wobei die erste Matrixkomponente aus Kollagen mit einer porösen Makrostruktur mit der Fähigkeit Zugkräften oder Scherkräften zu widerstehen besteht, und die zweite Matrixkomponente ein hydriertes Alginatgel ist, welches im wesentlichen die poröse Makrostruktur der ersten Komponente ausfüllt und einen Quelldruck ausübt, wobei das Implantat zusätzlich eine Zellenpopulation aufweist, die Knorpelzellen, Fibrochondrozyte, Fibroblasten oder Osteoblasten oder Vorgänger davon enthält. Die WO 91/16867 beschreibt eine prosthetische Bandscheibe, welche in ein menschliches Skelett implantiert werden kann, und welche als Gerüst für ein erneutes Wachsen des Bandscheibenmaterials dienen kann. Die WO 99/04720 beschreibt ein Verfahren zum Verwenden einer Zelle mit einer Hydrogel-Suspension zum Behandeln eines Bandscheibenvorfalles durch Implantieren einer Zellsuspension in einen Patienten, wodurch eine Zelle mit einem Hydrogel gebildet wird, welches an zumindest einer Oberfläche des Faserrings und der Scheibe anhaftet, wobei die Zellen Knorpelzellen, Fibroblasten oder Osteoblasten sind. Die vorliegende Erfindung adressiert diese Reparatur des Faserrings durch Verwendung eines kultivierten Bindegewebe-Konstrukts, welches, wenn es chirurgisch auf den Defekt in dem Ring aufgebracht wird, die Öffnung schließt und eine Barriere ausbildet, um eine Entzündung und ein weiteres Bandscheibenbersten zu verhindern.

Zusammenfassung

[0006] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Reparieren einer verletzten Bandscheibe eines Patienten unter Verwendung eines kultivierten Bindegewebe-Konstrukts. Das Verfahren umfasst ein Modifizieren der Öffnung in dem Faserring der Bandscheibe, die durch das Bersten der Scheibe erzeugt wurde, und ein selektives Entfernen des Gallertkerns, und anschließend ein Transplantieren des kultivierten Bindegewebe-Konstrukts in die Öffnung. Der Verschluss des Faserrings ist wichtig, um ein erneutes Bersten der Scheibe zu verhindern, und um die Entzündungsreaktion und die Epiduralfibrose in dem Hohlraum zu lindern, die zu einem Nervenschaden führen können. Das kultivierte Bindegewebe-Kon-

strukt ist ein kultiviertes Lebendgewebe mit Bindegebezellen und einer extrazellulären Matrix, wie beispielsweise Kollagen. Aufgrund der gewebeähnlichen Eigenschaften des kultivierten Gewebe-Konstruktes ist es bioremodellierbar, was bedeutet, dass es in der Lage ist, eine Zellrepopulation mitzumachen, und zwar durch das Einwachsen von Wirtszellen, einer Gefäßneubildung und der Reorganisation und der Ersetzung von Matrixkomponenten des implantierten Konstruktes durch Wirtszellen und Enzyme.

Beschreibung der Figuren

[0007] [Fig. 1](#) zeigt eine Vorrichtung zum Bilden eines Bindegewebe-Equivalentes.

Detaillierte Beschreibung

[0008] Die Erfindung ist gerichtet auf ein Verfahren zum Gewebeersetzen und -reparieren unter Verwendung eines kultivierten Bindegewebe-Konstruktes. Das Bindegewebe-Konstrukt weist Kollagen und lebende Zellen auf und ist daher bioremodellierbar, was bedeutet, dass wenn es einem Patienten mit einem Bedürfnis nach einem Gewebeersatz und -reparatur transplantiert wird, es sofort als ein Ersatzgewebe funktioniert, während es zur gleichen Zeit beginnt, mit dem Gewebe des Patienten bei der Implantierstelle zu integrieren, um neues Gewebe zu bilden. Bei dem am meisten bevorzugten Ausführungsbeispiel ist die Erfindung gerichtet auf ein Verfahren zum Reparieren des Faserrings der Bandscheibe, und zwar nach einer Diskektomieoperation, bei welcher der Faserring geöffnet wurde, mit einem kultivierten Bindegewebe-Konstrukt.

[0009] Das kultivierte Bindegewebe-Konstrukt wird verwendet, um die Ringwand nach Entfernung von beschädigtem Bandscheibengewebe, wie beispielsweise dem Gallertkern und dem Faserring, zu schließen, zum Korrigieren von Wirbelsäulendeformationen nach mehrfachen Diskektomien, bei rekonstruktiver Wirbelsäulenchirurgie oder vollständiger oder teilweiser Entfernung einer verletzten Scheibe aufgrund einer Verletzung wie beispielsweise einem Ringriß, einer Ringschädigung, einem Ringaufbruch, einem Bandscheibenvorfall, einer Bandscheibenhernie oder einer Bandscheibenperforation. Ein Verschließen des Ringes mit diesem Verfahren versiegelt den Hohlraum, um die Entzündungsreaktion zu vermindern und eine postoperative epidurale Fibrose zu mildern, die üblicherweise der Entfernung des Gewebes aus dem Hohlraum nachfolgt. Die Verschließung des Faserrings verhindert ferner einen nachfolgenden Bandscheibenvorfall bei dem verbleibenden Bandscheibengewebe, welches in dem Zwischenwirbelraum verbleibt, und verlangsamt eine weitere Scheibendegeneration.

[0010] Das Verfahren umfasst ferner das Schließen des Faserrings unter Verwendung eines kultivierten Bindegewebe-Konstruktes nach Implantation eines Scheibenersatzes. Ein Stützen des Wirbels mit einem Scheibenersatz oder einem Spacer nach Scheibenentfernung wird gelegentlich durchgeführt, damit die Bandscheibe ihre Funktion beibehalten kann, und um einen Nervenschaden zu verhindern. Der Ersatz wird dem Zwischenwirbelraum durch eine Öffnung in dem Faserring bereitgestellt, und zwar entweder der gleichen, die für den Zugriff auf die beschädigte Scheibe verwendet wurde, oder eine zusätzliche Öffnung. Scheibenersätze werden verwendet, um die übliche Scheibenraumhöhe beizubehalten, um ein Zusammenstoßen der hinteren Facettengelenke zu vermeiden. Ein Druck auf die Spinalnerven kann Schmerzen oder eine Betäubung in dem Bereich ihrer Verteilung bewirken. Funktionale Spacer-Implantate übermitteln und dämpfen Kompressions- und Torsionskräfte und stabilisieren das Gelenk. Scheibenersatzmaterialien können Metall, Metalllegierungen, synthetische Feststoffe und synthetische Gewebe und Hydrogele umfassen, solange diese biokompatibel mit dem Gewebe des Patienten sind.

[0011] Um die beschädigte Scheibe zu entfernen ist eine beliebige Technik gemäß dem Stand der Technik der Bandscheibenentfernung verwendbar, einschließlich aber nicht begrenzt auf Diskektomie, Diskotomie, Laminektomie, oder Laminotomie. Abhängig von der Art und dem Grad der Scheibenverletzung kann auf die Bandscheibe auf eine beliebige Anzahl von Wegen einschließlich anterior, posterior oder posteriorlateral zugegriffen werden. Das Verfahren zum Zugreifen auf die Bandscheibe umfasst Laparatomie-Diskektomie Techniken. Ein Zugriff durch den Faserring umfasst uniportale und multiportale Ansätze, wobei entweder eine oder mehrere Öffnungen in den Faserring zum Entfernen des Scheibenmaterials und zum Implantieren und Positionieren einer Zwischenwirbel-Spacer-Prothese gemacht werden.

[0012] Nachdem die Diskektomie bei dem Patienten durchgeführt wurde, wird das kultivierte Bindegewebe-Konstrukt in die in dem Faserring bei einer chirurgischen Operation erzeugte Öffnung eingeführt, um den inneren Bereich der Bandscheibe zu versiegeln. In Abhängigkeit von der Größe des Patienten und der Größe des Loches in dem Ring können ein oder mehrere Teile verwendet werden, um die Öffnung zu verstopfen, wobei diese Stücke durch einen von den umliegenden Geweben aufgebauten Druck an ihrer Stelle gehalten werden. Wahlweise und zusätzlich wird ein kultiviertes Bindegewebe-Konstrukt über der Öffnung aufgebracht und an dieser Stelle entlang der Gewebegrenze der Öffnung und des Konstruktes befestigt. Wenn das Konstrukt über der Öffnung in dem Ring aufgebracht wurde, kann das Konstrukt durch eine Naht oder einen chirurgischen Klebstoff, wie bei-

spielsweise Fibrin-Kleber oder andere biologisch kompatible, bei chirurgischen Operationen verwendete Klebstoffe, befestigt werden.

[0013] Sobald das Verfahren des Implantierens des Konstruktes beendet ist, nimmt das Konstrukt sofort eine Funktion als eine Barriere zwischen dem Hohlrauminneren des Gallertkerns und dem Äußeren der Faserringe auf.

[0014] Bei einem anderen bevorzugten Ausführungsbeispiel der Erfindung wird das kultivierte Bindegewebe-Konstrukt bei einer chirurgischen Reparatur des zentralen Nervensystems verwendet. Das kultivierte Bindegewebe-Konstrukt wird zum Versiegeln der Dura Mater verwendet, welche das Gehirn und das Rückenmark abdeckt. Das Schicht-Konstrukt ist eine angemessene Form zum Verschließen von Duradefekten nach einer Verletzung oder nach Rückenmark- oder Schädeloperationen, um eine Separation des Inneren des zentralen Nervensystems von anderen Körperzellen und -geweben aufrecht zu erhalten.

[0015] Das kultivierte Bindegewebe-Konstrukt ist bioremodellierbar, was bedeutet, dass es in der Lage ist, eine Zellrepopulation durch das Einwachsen von Wirtszellen, Gefäßneubildung und Reorganisation und Ersatz von Matrixkomponenten des implantierten Konstruktes durch Wirtszellen und Enzyme mitzumachen. Die Transplantatprothese behält ihre funktionalen Charakteristika, während die Zellen des Patienten das gesamte oder im Wesentlichen das gesamte Konstrukt remodellieren, um es mit Wirtsgewebe zu integrieren, und als solches funktioniert es als ein Analogon des Gewebes, welches es repariert oder ersetzt.

[0016] Das kultivierte Bindegewebe-Konstrukt weist Bindegewebezellen auf, die durch eine extrazelluläre Matrix, primär aus Kollagen, gebunden sind. Der Aspekt der extrazellulären Matrix des Konstruktes kann bezüglich der Organisation und Zusammensetzung variieren und dennoch ein Bindegewebe-Konstrukt für die Verwendung bei dem erfindungsgemäßen Verfahren sein. Das Bindegewebe-Konstrukt kann ein kontrahiertes Kollagennetzwerk mit Fibroblasten sein, wie es von Bell in dem US Patent Nr. 4,485,096 oder von Kemp, et al. in dem US Patent Nr. 5,536,656 beschrieben wurde, bei denen das kontrahierte Kollagennetzwerk auf einem azellulären Kollagengel angeordnet ist. Jedoch bildet dieses Ausführungsbeispiel keinen Teil der vorliegenden Erfindung, es stellt lediglich Hintergrundinformationen dar, welche für das Verständnis der Erfindung nützlich sind. Ein weiteres Konstrukt für die Verwendung bei dem Verfahren ist ein biotechnisches Gewebe-Konstrukt aus kultivierten Zellen und endogen hergestellten extrazellulären Matrixkomponenten ohne die Erfordernis von exogenen Matrixkomponenten oder einer Netzwerk-

unterstützung oder Gerüstelementen, das in der PCT-Veröffentlichung Nr. WO 00/29553 von Murphy, et al. beschrieben wurde. Bindegewebe-Konstrukte wie solche, die ein synthetisches oder bioresorbierbares Gewebeelement mit kultivierten Fibroblasten aufweisen, umschließen es mit endogen hergestellter Matrix, wie sie in den US Patenten Nr. 5,580,781, 5,443,950, 5,266,480, 5,032,508, 4,963,489 von Naughton, et al. beschrieben ist, können ebenfalls verwendet werden, und eine faserige Kollagenmatrix mit kultivierten Zellen darin, wie beschrieben durch US Patente Nr. 4,505,266 und 4,280,954 von Yannas, et al. Xenogene Materialien, wie beispielsweise de-epidermalisierte und de-zellulärisierte Dermis und andere flache Schichtgewebe, die von antigenen Determinanten und zellulären Bruchstücken befreit wurden, können als eine Matrixkomponente verwendet werden, die mit nichtalloge-nen Zellen zum Wiederbevölkern des Konstruktes kultiviert wird.

[0017] Zelltypen für die Verwendung bei der Erfindung sind Fibroblasten, oder bei dem am meisten bevorzugten Ausführungsbeispiel, menschliche Fibroblasten. Menschliche Fibroblastenzellstämme können von einer Anzahl von Quellen bezogen werden, einschließlich aber nicht begrenzt auf die Vorhaut von männlichen Neugeborenen, die Dermis, eine Sehne, die Lunge, Nabelschnüre, Knorpel, die Hahnrohre, die Hornhautstroma, die Schleimhaut und den Darm. Eine bevorzugte Fibroblasten-Art wird von der Dermis erhalten. Die menschlichen Zellen können erhalten, sind aber nicht begrenzt auf: Fibroblasten, Eingeweidemuskelzellen, Knorpelzellen oder andere Bindegewebszellen von mesenchymalem Ursprung. Embryonale Vorläuferzellen, wie beispielsweise Mesenchymalstammzellen, können bei der Erfindung zum Herstellen des kultivierten Konstruktes verwendet werden und können entweder in vitro oder in vivo induziert werden, um sich zu dem gewünschten Gewebe zu entwickeln. Es ist für den Fachmann ersichtlich, dass das kultivierte Bindegewebe-Konstrukt entweder durch absichtliche Hinzufügung oder als Ergebnis der Kultivierung von Fibroblasten aus primären Quellen andere Zellen enthalten kann, die im Bindegewebe oder anderen extrazellulären Matrixkomponenten gefunden werden. Es ist bevorzugt aber nicht erforderlich, dass der Ursprung der bei der Herstellung des Gewebekonstruktes verwendet matrixherstellenden Zelle von einem Gewebetyp abgeleitet wird, der dem bzw. den nach Anwendung der Kultivierungsverfahren der Erfindung ähnelt oder vortäuscht. Beispielsweise wird ein Konstrukt mit Fibroblasten kultiviert, um ein Lebendbindegewebe-Konstrukt zu erhalten, oder mit Myoblasten für ein Skelett-Muskel-Konstrukt. Beim Herstellen eines Gewebe-Konstruktes können mehr als ein Zelltyp verwendet werden.

[0018] Obwohl menschliche Zellen bei der Verwen-

der Erfindung bevorzugt sind, sind die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zu verwendenden Zellen nicht begrenzt auf Zellen von menschlichen Quellen. Zellen von anderen Säugetierspezies umfassen, sind aber nicht begrenzt auf vom Pferd stammende, vom Hund stammende, vom Schwein stammende, vom Rind stammende, von Katzen stammende, von Ziegen stammende und von Schafen stammende Quellen können verwendet werden. Mauszellen, Zellen von Nagetierquellen können ebenfalls verwendet werden. Zellspender können in Entwicklung und Alter variieren. Zellen können von Spendergeweben von Embryos, Neugeborenen oder älteren Individuen einschließlich Erwachsenen erhalten werden.

[0019] Darüber hinaus können genetisch veränderte Zellen, die ohne fremde Einwirkung, chemisch oder viral transfiziert sind, bei dieser Erfindung verwendet werden. Für solche Ausführungsbeispiele, die mehr als einen Zelltyp verwenden, können Mischungen von normalen und genetisch modifizierten oder transfizierten Zellen verwendet werden, und Mischungen von Zellen von zwei oder mehr Spezies oder Gewebequellen oder beides können verwendet werden. Rekombinante oder genetisch veränderte Zellen können bei der Herstellung des Gewebe-Konstrukts verwendet werden, um ein Gewebe-Konstrukt zu erzeugen, dass als ein Medikamentzuführungsimplantat bei einem Patienten dienen kann, der erhöhte Level an natürlichen Zellprodukten oder eine Behandlung mit einem Therapeutikum benötigt. Die Zellen können rekombinante Zellprodukte, Wachstumsfaktoren, Hormone, Peptide oder Proteine für einen kontinuierlichen Zeitraum oder wie benötigt produzieren, wenn dies aufgrund der Zustände in der Kultur biologisch, chemisch oder thermisch signalisiert wird. Die Zellen können ferner genetisch verändert sein, um Proteine oder verschiedene Arten von extrazellulären Matrixkomponenten zu exprimieren, welche entweder „normal“ aber bei höheren Levels exprimiert werden oder irgendwie modifiziert sind, damit eine Transplantateinrichtung extrazelluläre Matrix und lebende Zellen aufweist, die therapeutisch vorteilhaft für eine verbesserte Wundheilung und vereinfachte oder gerichtete Gefäßneubildung sind. Diese Verfahren sind im Stand der Technik bekannt und sind beschrieben bei Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989), hierin durch Bezugnahme aufgenommen. Sämtliche der oben genannten Zelltypen können bei dieser Erfindung für die Herstellung eines kultivierten Haut-Konstrukts verwendet werden, dass die abhängigen Medien enthaltend Cytokine synthetisieren wird.

[0020] Während Kollagen die am meisten bevorzugte extrazelluläre Matrixzusammensetzung für eine Verwendung bei der Herstellung von Haut-Equivalenten ist, die Cytokine zum Konditionieren der Kulturmedien produzieren und absondern, können an-

dere extrazelluläre Matrixkomponenten verwendet werden. Diese extrazellulären Matrixkomponenten können alleine verwendet werden oder können vorzugsweise mit dem Kollagen umfasst sein, um eine natürliche Dermal-Matrix zu imitieren. Diese extrazellulären Matrixkomponenten können umfassen: andere Kollagene, sowohl faseriges als auch nicht-faseriges Kollagen aus der Kollagenfamilie wie beispielsweise die Kollagentypen II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, andere Matrixproteine, welche umfassen können aber nicht begrenzt sind auf Elastin, Proteoglycane wie beispielsweise Dimerin oder Biglycan, oder Glycoproteine wie beispielsweise Tenascin, Vitronectin, Fibronectin, Laminin, Thrombospondin I und Glycosaminoglycane (GAG) wie beispielsweise Hyaluronsäure (HA). Die Dermal-Matrix kann bezüglich der Zusammensetzung und der Struktur variieren. Kollagenschwämme, biokompatible, bioremodellierbare, de-zellularisierte Dermis oder Kollagengele. Anstatt den Hautzellen extrazelluläre Matrixkomponenten bereitzustellen, können sie auf biologisch abbaubaren Gewebeelementen (wie beispielsweise Nylon oder Polygalactin (PGA)) kultiviert werden, um einen Kulturträger bereitzustellen, und zum Erzeugen einer extrazellulären Matrix kultiviert werden, bis die Zellen und ihre Matrix den Träger umschließen. Bei dem bevorzugten Ausführungsbeispiel ist das kultivierte Bindegewebe-Konstrukt ein kontrahiertes Kollagengel, kontrahiert durch Fibroblasten, wie beispielsweise solche beschrieben in dem US Patent Nr. 4,485,096 von Bell. Bei einem alternativen Ausführungsbeispiel kann das kontrahierte Kollagengel auf einer azellulären Grundkollagenschicht auf einer porösen Membran angeordnet sein, um das Gel an der Membran zu befestigen und um eine exzessive radiale Kontraktion des Gels zu vermeiden. Verfahren zum Aufnehmen von azellulären Kollagenschichten sind beschrieben in dem US Patent Nr. 5,536,656 von Kemp, et al. Jedoch bildet dieses Ausführungsbeispiel keinen Teil der vorliegenden Erfindung, sondern stellt lediglich eine Hintergrundinformation dar, welche für das Verständnis der Erfindung nützlich ist.

[0021] Das erfindungsgemäße Gewebe-Equivalent kann unter Verwendung von Kollagen hergestellt werden, das von Haut und einer Sehne, einschließlich einer Rattenschwanzsehne, Kalbfellkollagen und der Kalbextensorsehne, erhalten wurde. Andere Kollagenquellen sind geeignet. Eine besonders bevorzugte von der gemeinsamen Kalbfingerextensorsehne erhaltene Kollagenzusammensetzung und Verfahren zum Erhalten solcher Kollagenzusammensetzungen sind in dem US Patent Nr. 5,106,949 von Kemp beschrieben.

[0022] Ein Haut-Equivalent wird direkt auf die untere Oberfläche einer Gewebekulturschale gegeben, oder direkt auf ein poröses Teil wie beispielsweise eine bezüglich einer Flüssigkeit permeable Membran, und

zwar unter Verwendung von Verfahren gemäß den vorgenannten Lehren von Kemp, et al. und wie es nachfolgend hier beschrieben wird. Eine Gießmischung mit Kollagen und Fibroblasten wird in den inneren Container **20** gegeben und unter Bedingungen gehalten, die ein Ausbilden des Gewebe-Equivalents ermöglichen. Die Kollagenkonzentration, die Anzahl von Zellen und das Volumen der Gießmischung können gesteuert werden, um den Durchmesser und die Dicke des Lebendgewebe-Equivalents zu steuern. Die Gießmischung weist Zellen mit einer Konzentration von $1,25 \times 10^4$ bis 5×10^4 Zellen/ml und Kollagen zu 0,5 bis 2,0 mg/ml in einem Nährmedium auf. Eine bevorzugte Zellenkonzentration ist $2,5 \times 10^4$ Zellen/ml. Die Kulturen werden in einem Inkubator aufbewahrt, um ausreichende Umgebungsbedingungen mit kontrollierter Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Gasmischung für die Zellkultur zu gewährleisten. Bevorzugte Bedingungen sind zwischen 34°C und 38°C , insbesondere $37 \pm 1^\circ\text{C}$, bei einer Atmosphäre zwischen $5\text{--}10 \pm 1\%$ CO_2 und einer relativen Luftfeuchtigkeit (Rh) zwischen 80 und 90%. Sobald sich die Kollagennetzwerke kontrahiert haben, können sie für chirurgische Anwendungen zum Behandeln eines Patienten verwendet werden, der eine Gewebereparatur oder einen Gewebeersatz benötigt.

[0023] Bei einem alternativen Ausführungsbeispiel kann ein azelluläres Kollagengel vor der Ausbildung des Bindegewebe-Konstrukts auf dem Kultursubstrat gebildet werden, um dem Substrat ein Haftmittel bereitzustellen. In einigen Fällen benötigt das Substrat dieses Haftmittel, und in anderen Fällen wird es nicht benötigt. Wenn die azelluläre Kollagengelkomponente bei der Herstellung des kultivierten Bindegewebe-Konstrukts verwendet wird, wurde gefunden, dass das Verhältnis des Volumens der Gießmischung für das Gewebe-Equivalent zu dem Volumen der Gießmischung für das azelluläre hydrierte Kollagengel eine Auswirkung auf die Zellebensfähigkeit und die Zelldifferentiation hat. Nützliche Verhältnisse, Volumen zu Volumen (v/v), von Gießmischung des Gewebe-Equivalents zu Gießmischung des Kollagen-gels sind 3:1 bis 1:3. Ein bevorzugtes Verhältnis, bei welchem die Zellkonzentration in dem Kollegennetzwerk $2,5 \times 10^4$ Zellen/ml beträgt, ist 3:1. Das azelluläre hydrierte Kollagengel **25** wird aus einer Kollegenzusammensetzung hergestellt, die 0,5 bis 2,0 mg/ml Kollagen, vorzugsweise ungefähr 0,9 bis 1,1 mg/ml, und Nährmedium enthält. Diese Kollegenzusammensetzung wird dem inneren Container **20** zugefügt und unter Bedingungen gehalten, welche es der Kollegenzusammensetzung ermöglichen, sich abzusetzen und ein azelluläres hydriertes Kollagengel mit geeigneten Dimensionen, üblicherweise 1 bis 5 mm dick, zu bilden, wobei ein bevorzugter Dickenbereich zwischen 2 mm und 3 mm beträgt. Ein azelluläres hydriertes Kollagengel **25** ist vorzugsweise dick genug, dass ein Abschnitt azellulär verbleibt, wenn Zellen von dem Gewebe-Equivalent in ein azelluläres hy-

driertes Kollagengel wandern, und dünn genug, so dass das Gewebe-Equivalent nicht unerwünscht von der in dem äußeren Container **10** bereitgestellten Nährquelle entfernt wird. Jedoch bildet dieses Ausführungsbeispiel keinen Teil der vorliegenden Erfindung, sondern stellt lediglich Hintergrundinformationen dar, die für das Verständnis der Erfindung hilfreich sind.

[0024] Bei einem anderen alternativen Ausführungsbeispiel wird das kultivierte Bindegewebe-Konstrukt aus Zellen gebildet, die unter Bedingungen zum Herstellen einer Schicht einer extrazellulären Matrix gewachsen sind, welche von den kultivierten Fibroblastenzellen synthetisiert und zusammengesetzt ist, wobei die kultivierten Fibroblastenzellen in der synthetisierten extrazellulären Matrixschicht enthalten sind, wobei die extrazelluläre Matrix durch die kultivierten Fibroblastenzellen in der Abwesenheit von exogenen Matrixkomponenten oder synthetischen Elementen während den Kultivierungsbedingungen produziert wird. Verfahren zum Herstellen dieser kultivierten Bindegewebe-Konstrukte sind in der PCT-Veröffentlichung Nr. WO 00/29553 von Murphy, et al. beschrieben.

[0025] Sobald eine ausreichende Zellzahl nach Isolation und Scale-Up erhalten wurde, werden die Zellen geerntet und auf einer geeigneten Kulturoberfläche angesetzt und unter geeigneten Wachstumsbedingungen kultiviert, um eine konfluierende Zellschicht zu erhalten. Bei einem anderen Ausführungsbeispiel werden die Zellen auf einer porösen Membran angesetzt, die untergetaucht wird, um einen Mediumkontakt von unterhalb der Kultur durch die Poren und direkt von oberhalb zu ermöglichen. Vorzugsweise werden die Zellen entweder in einem Basis- oder einem Wachstumsmedium suspendiert und werden auf der Zellkulturoberfläche mit einer Dichte zwischen 1×10^5 Zellen/ cm^2 bis $6,6 \times 10^5/\text{cm}^2$, bevorzugt zwischen 3×10^5 Zellen/ cm^2 bis $6,6 \times 10^5/\text{cm}^2$ und am bevorzugsten bei $6,6 \times 10^5$ Zellen/ cm^2 , angesetzt (Zellen pro Quadratzentimeter Oberflächenbereich). Die Kulturen werden in einem Wachstumsmedium kultiviert, um die Kultur zu etablieren, und werden bis zu einer Konfluenz zwischen 80% und 100% kultiviert, wobei sie zu dieser Zeit chemisch induziert werden, indem das Medium auf ein Matrixherstellungsmedium gewechselt wird, um die Synthese und Sekretion der extrazellulären Matrix hochzusteuern. Bei einem alternativen Verfahren werden die Zellen direkt auf Produktionsmedien angesetzt, um das Bedürfnis der Änderung von den Basismedien zu den Produktionsmedien zu vermeiden, jedoch ist dies ein Verfahren, das höhere Ansatzdichten benötigt.

[0026] Während der Kultivierung organisieren Fibroblasten die abgesonderten Matrixmoleküle, um eine dreidimensionale gewebeähnliche Struktur zu bilden, weisen jedoch keine signifikanten Kontrakti-

onskräfte auf, um die Ausbildung des Zellmatrix-Konstrukts zu bewirken, um sich zu kontrahieren und sich selbst von dem Kultursubstrat abzuheben. Medien-austausche werden alle zwei bis drei Tage mit einem frischen Matrixherstellungsmedium vorgenommen, und mit der Zeit nimmt die abgesonderte Matrix an Dicke und Organisation zu. Die Zeit, die zum Erzeugen eines Zellmatrix-Konstrukts notwendig ist, ist abhängig von der Fähigkeit der anfänglichen Ansatzdichte, dem Zelltyp, dem Alter der Zelllinie und der Fähigkeit der Zelllinie, eine Matrix zu synthetisieren und abzusondern. Nach vollständiger Ausbildung haben die erfindungsgemäßen Konstrukte aufgrund der erzeugten und durch die Zellen organisierte Faser-matrix eine Grunddicke bzw. Bulk-Dicke; sie sind keine gewöhnlich konfluierenden oder übermäßig konfluierenden Zellkulturen, bei welchen die Zellen lose aneinander haften können. Die Faserqualität gibt den Konstrukten kohäsive gewebeähnliche Eigenschaften unähnlich üblichen Kulturen, da sie einer physikalischen Beschädigung, beispielsweise Reißen und Spalten, oder einer Routinehandhabung in klinischer Umgebung widerstehen. Bei der Herstellung eines kultivierten Haut-Konstrukts bilden die Zellen eine organisierte Matrix um sich selbst auf der Zellkultur-oberfläche, vorzugsweise zumindest 30 Mikrometer oder mehr dick, bevorzugter zwischen 60 bis 120 Mikrometer dick, über die Oberfläche der Membran. Jedoch wurden Dicken von mehr als 120 Mikrometer erreicht und diese sind für eine Verwendung beim Testen oder klinischen Anwendungen geeignet, bei denen derartige größere Dicken benötigt werden.

[0027] Bei einem weiteren alternativen Ausführungsbeispiel kann das kultivierte Bindegewebe-Konstrukt vor der Aufbringung auf einen Patienten behandelt werden, um die Implantatannahme oder Heilung, oder beides, bei der Aufbringungsstelle bei dem Patienten zu erhöhen. Die Konstrukte können mit anderen Komponenten behandelt werden, indem diese mit einer Lösung mit den Komponenten durch beispielsweise Eintauchen in Kontakt gebracht werden. Komponenten für eine Behandlung eines Konstruktes vor der Anwendung umfassen extrazelluläre Matrixkomponenten wie beispielsweise Hyaluronsäure, Kollagen, Proteoglycan, Orglycosaminoglycane oder Cytokine einschließlich Wachstumsfaktoren wie beispielsweise: Basis-Fibroblast-Wachstumsfaktor (bFGF), epidermaler Wachstumsfaktor (EFG), keratino-cyter Wachstumsfaktor (KGF), Transforming-Growth-Faktor Alpha (TFG α), Transforming-Growth-Faktor Beta (TGF β) einschließlich Transforming-Growth-Faktor Beta-1 (TGF β 1) und Transforming Growth-Faktor Beta-2 (TGF β 2), Granulo-cyten-Kolonie stimulierender Faktor (FCSF), Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (IGF), Vascular-endo-thelial-Wachstumsfaktor (VEGF) und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF). Es sei angemerkt, dass die vorstehenden Begriffe in Klammern Abkürzungen sind, die allgemein bekannt sind und im Stand der Technik für

die formale Nomenklatur des Vorherstehenden verwendet werden.

[0028] Die folgenden Beispiele werden bereitgestellt, um die Ausführung der vorliegenden Erfindung besser zu erklären, und sollen nicht als den Umfang der vorliegenden Erfindung begrenzend interpretiert werden. Der Fachmann erkennt, dass verschiedene Modifikationen an den hier beschriebenen Verfahren vorgenommen werden können, ohne von dem Schut-zumfang der vorliegenden Erfindung abzuweichen.

BEISPIELE

Referenzbeispiel 1: Herstellung eines Bindegewe-be-Konstrukts mit einem kontrahierten Kollagennetzwerk

[0029] Menschliche neonatale Vorhaut-Fibroblasten (stammend von Organogenesis, Inc. Canton, MA) wurden bei 5×10^5 Zellen/162 cm² Gewebekultur in behandelten Flaschen angesetzt und in einem Wachstumsmedium gezüchtet. Das Wachstumsmedium besteht aus: Duplecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Hoch-Glukose-Formulierung, ohne L-Glutamin, BioWhittaker, Walkersville, MD) ergänzt mit 10% neugeborenem Kalbserum (NBCS) (HyC-lone Laborstories, Inc., Logan, Utah) und 4 mM L-Glu-tamin (BioWhittaker, Walkersville, MD). Die Zellen werden in einem Inkubator bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ mit einer At-mosphäre von $10 \pm 1\%$ CO₂ gehalten. Das Medium wurde alle zwei bis drei Tage gegen ein frisch zube-reitetes Medium ersetzt. Nach 8 Tagen in Kultur wa-ren die Zellen auf Konfluenz gewachsen, das heißt die Zellen hatten eine gepackte Monoschicht entlang dem Boden der Gewebekulturflasche gebildet, und das Medium wurde aus der Kulturflasche abgesaugt. Um die Monoschicht auszuspülen wurde eine steril gefilterte Phosphat-gepufferte physiologische Koch-salzlösung bei dem Boden jeder Kulturflasche zuge-gaben und dann aus den Flaschen abgesaugt. Die Zellen wurden aus den Flaschen durch Hinzufügung von 5 ml Trypsin-Versene-Glutamin (BioWhittaker, Walkersville, MD) in jede Flasche und sanftes Schüt-teln zur Sicherstellung der vollständigen Abdeckung der Monoschicht freigesetzt. Die Kulturen wurden in den Inkubator zurückgeführt. Sobald die Zellen frei-gesetzt waren, wurden 5 ml SBTI (Soyabohnen-Tryp-sin-Inhibitor) jeder Flasche zugegeben und mit der Suspension gemischt, um die Wirkung des Tryp-sin-Versene zu stoppen. Die Zellsuspension wurde aus den Flaschen entfernt und gleichmäßig auf steri-le konische Zentrifugierröhrchen verteilt. Die Zellen wurden durch eine Zentrifugierung bei ungefähr 800 bis 1000 \times g für 5 Minuten gesammelt.

[0030] Eine Vorrichtung ähnlich der in [Fig. 1](#) gezeig-ten wurde beim Ausführen der nachfolgend beschrie-benen Arbeiten verwendet. Die Abdeckung wird zum Bedienen entfernt, wird jedoch anderweitig zum Auf-

rechterhalten der Sterilität geschlossen gehalten. Sachdienliche Informationen bezüglich der Vorrichtung sind aufgeführt: Der äußere Container **10** weist einen Durchmesser von 100 mm oder mehr auf. Der innere Container **200** weist einen Durchmesser von 75 mm auf. Das permeable Element **24** besteht aus einer Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von ungefähr 3 µm und einer Dicke von 5 µm.

[0031] Eine „vorgeschmischte“ Lösung von 16,2 ml 10X Minium Essential Medium (MEM), 1,6 ml 200 mM L-Glutamin, 0,2 ml 50 mg/ml Gentamycin, 18,0 ml embryonales Rinderserum, 5,0 ml 71,2 mg/ml Natriumbicarbonat. Die Vorratslösungen wurden aseptisch in der obigen Reihenfolge kombiniert und bei 4°C für 30 Minuten in einer sterilen 50 ml Röhre gelagert. Ungefähr 27,44 ml einer 2,2 mg/ml Kollagenlösung (extrahiert durch Säure von der gemeinsamen Kalbfingerextensorsehne) in 0,05% v/v Essigsäure wurden in einer 50 ml Röhre ausgewogen und für 30 Minuten bei 4°C gelagert. Dulbecco's Minium Essential Medium (DMEM) complete (umfassend 10% FBS, 4 mM L-Glutamin, 50 µg/ml Gentamycin) wurde zugegeben und 1 ml Aliquote wurden auf die Membran des inneren Containers **20** pipettiert und eine Gelbildung bei Raumtemperatur wurde ermöglicht.

[0032] Die Bindegewebeschicht, ein hydriertes Kollagengel mit Zellen, wurde mit menschlichen Hautfibroblasten gegossen. Eine allgemeine Beschreibung der Verfahren und Reagentien kann ebenfalls gefunden werden in dem US Patent Nr. 4,485,096 von Bell, dem US Patent Nr. 5,536,656 von Kemp, et al. und dem US Patent Nr. 5,712,163 von Parenteau. Die Gießmischung für die Herstellung jedes Bindegewebe-Konstrukts umfasst ungefähr 12,5 ml der oben beschriebenen Vormischung, zu welcher 27,44 ml einer 2,2 mg/ml Kollagenlösung in 0,05% v/v Essigsäure, ebenfalls oben beschrieben, und $6,25 \times 10^5$ menschliche Hautfibroblasten zugefügt sind. Nachdem die Komponenten auf ein Gesamtvolumen von ungefähr 40 ml gemischt wurden, wurde dieses in dem Container **20** verteilt und die Gelbildung ermöglicht. Das Kollagengel enthaltend die suspendierten Fibroblasten wurde in Dulbecco's Minimum Essential Medium (DMEM) getaucht, welches vollständig in den äußeren Container **20** gegeben wurde, und dann bei 36°C/10% CO₂ für 4 bis 8 Tage inkubiert, um zu ermöglichen, dass die Zellen das Kollagen kontrahieren, um ein kontrahiertes Kollagennetzwerk zu bilden, welches das kultivierte Bindegewebe-Konstrukt **52** darstellt.

Beispiel 1: Herstellung eines Bindegewebe-Konstrukts aus kultivierten Zellen und endogen hergestellten extrazellulären Matrixkomponenten ohne die

Erfordernis von exogenen Matrixkomponenten oder Netzwerkunterstützung oder Gerüstelementen

[0033] Das Bindegewebe-Konstrukt von kultivierten Zellen und endogen hergestellten extrazellulären Matrixkomponenten wurde gemäß den Lehren von Murphy, et al., beschrieben in der PCT-Veröffentlichung WO 00/29553 hergestellt. Menschliche neonatale Vorhautfibroblasten wurden kultiviert, um deren Anzahl zu erhöhen, und zwar unter Verwendung der in dem Referenzbeispiel 1 beschriebenen Verfahren, jedoch in einem chemisch definierten Medium, dass heißt ohne Serum oder Organextrakte von Tieren. Die Zellen wurden dann resuspendiert auf eine Konzentration von 3×10^6 Zellen/ml und angesetzt auf behandelten Membraneinsätzen mit 0,4 µm Porengröße, 24 mm Durchmesser in einem Magazin mit 6 Mulden bei einer Dichte von $3,0 \times 10^6$ Zellen/TW ($6,6 \times 10^5$ Zellen/cm²). Die Zellen bei diesem Beispiel wurden vollständig in einem chemisch definierten Medium kultiviert.

[0034] Das Medium enthält: eine Basis 3:1 Mischung von DMEM, Hams F-12 Medium (Quality Biologics, Gaithersburg, MD) 4 mM Gluta-MAX (Gibco BRL, Grand Island, NY) und Zusätze: 5 ng/ml menschlicher rekombinanter Epidermal-Wachstumsfaktor (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), 1×10^{-4} M Ethanolamin (Fluka, Ronkonkoma, NY, Katalog Nr. 02400 ACS-Reinheit), 1×10^{-4} M o-Phosphoryl-Ethanolamin (Sigma, St. Louis, MO), 5 µg/ml Transferrin (Sigma, St. Louis, MO), 20 pM Triiodothyronin (Sigma, St. Louis, MO), 5 µg/ml Insulin (Sigma, St. Louis, MO), 0,4 µg/ml Hydrocortison (Sigma, St. Louis, MO), 6,78 µg/ml Selen (Sigma Aldrich Fine Chemicals Company, Milwaukee, WI), 50 µg/ml L-Ascorbinsäure (WAKO Chemicals USA, Inc.), 0,2 µg/ml L-Prolin (Sigma, St. Louis, MO), 0,1 µg/ml Glycin (Sigma, St. Louis, MO).

[0035] Proben für histologische Analysen wurden bei den Tagen 7, 14 und 21 gezogen und in Formalin fixiert, dann in Paraffin für eine Hemotoxylin- und Eosinfärbung für eine Lichtmikroskopanalyse eingebettet. Eine den Kollagengehalt des Konstrukts messende biochemische Analyse zeigt $170,88 \pm 9,07$ µg/cm². Neben endogen hergestellten Fibrillarkollagen waren ebenfalls Decorin und Glycosaminoglycan in den Zellmatrix-Konstrukten enthalten. Die gebildeten kultivierten Haut-Konstrukte weisen Hautfibroblasten und eine endogen erzeugte Matrix auf. Sämtliche weisen vollständig ausgebildete Kollagenfasern in gepackter Organisation, angeordnet zwischen den Zellen, auf. Deren Faserqualitäten, Dicke und Kohäsionsintegrität geben dem Konstrukt eine beträchtliche Stärke, die es diesem erlaubt, abschälend von der Kulturmembran entfernt zu werden und gehandhabt zu werden, wenn es auf einen mit dem Konstrukt zu behandelnden Patienten übertragen wird, und zwar als verpflanztes Gewebe oder Implantat.

Beispiel 2: Verwendung eines Bindegewebe-Konstrukts zum Reparieren des Faserrings nach einer teilweisen Diskektomie

[0036] Um die Persistenz der transplantierten Fibroblasten in dem kultivierten Bindegewebe-Konstrukt zu überwachen, werden Konstrukte mit vom Schwein stammenden Fibroblasten, gekennzeichnet mit grün-fluorisierendem Protein (GFP), in ein Schwein-Modell implantiert.

[0037] Sechs junge Schweine unterschiedlichen Geschlechts bis zu 50 kg wurden individuell mindestens zwei Tage vor der Operation aufgezogen, wobei sie mit üblichem Schweinefutter gefüttert wurden.

[0038] Versuchstiere wurden mit Telazol und Atropin voranästhesiert und intubiert. Sie werden auf ein Inhalationsgas aus Isofluran und Sauerstoff gesetzt und in der Narkose gehalten. Ihnen wird ebenfalls ein Antibiotika verabreicht.

[0039] Defekte an den Scheiben werden erzeugt, indem 5 × 10 mm große Einschnitte an dem Faserring vorgenommen werden, gefolgt von einer Standard-Diskotomie mit gleichmäßiger Kernentfernung bei jedem Raum. Eine Gesamtzahl von drei Scheiben werden pro Schwein operiert. Zwei Stellen werden mit kultivierten Bindegewebe-Konstrukten mit GFP-markierten Fibroblasten behandelt und die verbleibende Stelle dient als eine Kontrolle. Um das Bindegewebe-Konstrukt anzuwenden, wird es zunächst in drei oder vier kleinere Teile getrennt und dann in die Ringöffnung eingeführt. Zwei Tiere werden jeweils in den Wochen 2, 4 und 6 euthanisiert und die Operationsbereiche werden entfernt. Die Scheiben werden vor der histologischen Bearbeitung in Formalin und anschließend 70%igem Ethanol angeordnet. Die Scheiben werden nacheinander sektioniert und unter Fluoreszenz auf einen Nachweis von GFP-markierten Fibroblasten untersucht.

Beispiel 3: Verwendung eines Bindegewebe-Konstrukts mit Bandscheiben-Spacer zum Aufrechterhalten des Zwischenwirbels

[0040] Um die Persistenz von übertragenen Fibroblasten in dem kultivierten Bindegewebe-Konstrukt zu beobachten, werden Konstrukte mit Fibroblasten in ein Schwein-Modell implantiert.

[0041] Versuchstiere werden mit Telazol und Anpropin voranästhetisiert und intubiert. Sie werden auf ein Inhalationsgas aus Isofluran und Sauerstoff gesetzt und in der Narkose gehalten. Ihnen wird ebenfalls ein Antibiotika verabreicht.

[0042] Defekte an den Scheiben werden erzeugt, indem 5 × 10 mm große Einschnitte an dem Faserring vorgenommen werden, gefolgt von einer Stan-

dard-Diskotomie mit gleichmäßiger Kernentfernung bei jedem Raum. Eine Gesamtzahl von drei Scheiben werden pro Schwein operiert.

[0043] Über die in dem Faserring hergestellte Öffnung wird der Zwischenwirbelraum geöffnet und die Scheibe entfernt, und zwar begrenzt auf den vordringenden und mittleren dritten Abschnitt. Der Bandscheiben-Spacer weist ein Dacron-Gewebe auf, und ein Hydrogel wird in dem Thoraxhohlraum angeordnet, in dem es durch die Öffnung in dem Faserring eingeführt wird. Eine ordnungsgemäße Positionierung des Implantates wird sichergestellt unter Verwendung von radiologischen Verfahren, und dann wird der Spacer an Ort und Stelle fixiert. Das kultivierte Bindegewebe-Konstrukt wird dann auf die annuläre Öffnung aufgebracht, indem das Konstrukt zunächst auf die Größe der annulären Lochöffnung abgestimmt wird, und dann unter Verwendung resorbierbaren Nahtmaterials mit dem die Öffnung umgebenden Gewebe des Raumes vernäht wird. Während sämtliche drei Stellen mit einem Bandscheiben-Spacer versehen werden, werden zwei Stellen mit kultiviertem Bindegewebe-Konstrukten behandelt und die verbleibende Stelle dient als Kontrolle.

[0044] Zwei Tiere werden jeweils nach 2, 4 und 6 Wochen euthanisiert und die Operationsstellen werden entfernt. Die Scheiben werden in Formalin und anschließend in 70%igen Ethanol vor der histologischen Bearbeitung angeordnet. Die Scheiben werden seriell sektioniert und unter Fluoreszenzlicht auf ein Vorhandensein von GFP-markierten Fibroblasten untersucht.

[0045] Bei sämtlichen Proben verbleiben die Bandscheiben-Spacer an ihren ursprünglichen Stellen. Bei Kontrollproben zeigte der Gallertkern einen signifikanten Verlust an Proteoglycan und Kollagen und eine Zunahme von anderen Nicht-Kollagenen in dem Hohlraum. Bei Versuchsproben bildet das Bindegewebe-Konstrukt eine vollständige Narbe über der in dem Faserring erzeugten Öffnung. Die biochemische Zusammensetzung des Hohlraums hat sich geringfügig geändert, war jedoch näher an der Zusammensetzung der negativen Kontrollproben, was andeutet, dass die Fibrosis des Hohlraumes durch den Verschluss des Ringes nach der Scheibenverletzung wesentlich vermindert wurde.

Beispiel 4: Eine Studie bezüglich des zeitlichen Verlaufs bei Verwendung von Bindegewebe-Konstrukten bei der Korrektur des Faserrings bei Schweinen.

[0046] Eine Diskektomie zum Entfernen eines beschädigten und herausgedrängten Gallertkernes ist eine übliche klinische Praxis zum Mildern von Schmerz und einer neurologischen Störung. Die Operation erzeugt einen Defekt im Faserring, der sich oft mit faserigem Gewebe füllt, eine Situation, die

schließlich zu einem Kollaps der Bandscheibe führt und eine Fusion der benachbarten Wirbelsegmente erfordert.

[0047] Es wurden vom Schwein stammende Bindegewebe-Konstrukte hergestellt, und zwar unter Verwendung von vom Schwein stammenden Hautfibroblasten, die gemäß den in Referenzbeispiel 1 dargelegten Verfahren zum Exprimieren von grünem Fluoreszenzprotein (GFP) transfiziert wurden. Jedes Konstrukt wurde hergestellt aus einem vom Rind stammenden Typ-I-Kollagen mit 20 bis 30 Millionen wachstumsfähigen GFP-transfizierten vom Schwein stammenden Hautfibroblasten und war ungefähr 2 mm dick. Es war der Zweck dieser Studie, die Durchführbarkeit bzw. Geeignetheit von Bindegewebe-Konstrukten zum Reparieren des Faserrings bei einem von einem Schwein stammenden Modell zu untersuchen und die Biokompatibilität, die Persistenz und das Remodellieren der Konstrukte bei diesem Modell zu bestimmen.

[0048] Sechs drei bis vier Monate alte Schweine wurden für die Untersuchung verwendet. Bei jedem Tier wurden drei aufeinanderfolgende Bandscheiben durch eine Laminotomie posterior freigelegt. Bei jeder freigelegten Scheibe wurde ein chirurgischer Ringdefekt erzeugt. Mehrere Teile eines Bindegewebe-Konstruktes, jedes mit einem Durchmesser von ungefähr 2 bis 5 mm, wurden in zwei Defekte jedes Tieres implantiert. Der andere Scheibeneffekt wurde zur Kontrolle leer gelassen. Die Schweine wurden in Zweiergruppen 2, 4 und 6 Wochen nach der Implantierung euthanisiert. Die die operierten Scheiben enthaltende Wirbelsäule wurde entfernt und in 10%igem neutral gepuffertem Formalin fixiert. Bei Hemotoxillin- und Eosineingefärbten Sektionen wurde eine Hellfeldmikroskopie für einen allgemeinen Befund durchgeführt, und eine Fluoreszenzmikroskopie wurde zum Identifizieren von mit grünfluoreszierendem Protein markierten Zellen bei ungefärbten Abschnitten durchgeführt.

[0049] Die Mikroskopie erbrachte bei mehreren der behandelten Ringe von den zwei Tiergruppen, die nach 2 und 4 Wochen euthanisiert wurden, einen klaren Beweis von Resten von implantierten Bindegewebe-Konstrukten. Es war ferner identifizierbar eine Remodellierung der Reste des Bindegewebe-Konstruktes durch das Wirtsgewebe. Die implantierten Defekte zeigten eine geringere Entzündung und eine weiter fortgeschrittene Heilung als die Kontrollen zu jeder Zeit. Die implantierten Defekte wiesen die Öffnung überbrückendes knorpeliges Gewebe auf, wohingegen die Kontrolldefekte noch immer eine signifikante Menge faserigen Gewebes aufwiesen. Die Ergebnisse dieser Machbarkeitsstudie zeigen, dass das implantierte Schwein-Bindegewebe-Konstrukt bezüglich des Wirtsgewebes biokompatibel war, bis zu vier Wochen bestehen kann und die Wiederher-

stellungsaktivitäten des Ringes um sechs Wochen erhöhen kann.

[0050] Obwohl die vorstehende Erfindung zum Zwecke der Klarheit und des Verständnisses detailliert anhand einer Veranschaulichung und von Beispielen beschrieben wurde, ist es für den Fachmann verständlich, dass bestimmte Änderungen und Modifikationen innerhalb des Schutzbereichs der beigegebenen Ansprüche ausgeführt werden können.

Patentansprüche

1. Verwendung eines kultivierten Bindegewebe-Konstrukts bei der Produktion eines Medikaments, welches zur Wiederherstellung einer verletzten Bandscheibe verwendet wird, wobei das Bindegewebe-Konstrukt bioremodellierbar ist und mit Wirtsgewebe integriert; und wobei das kultivierte Bindegewebe-Konstrukt eine Schicht aus extrazellulärer Matrix ist, welche synthetisiert und zusammengesetzt ist aus kultivierten Fibroblastenzellen, wobei die kultivierten Fibroblastenzellen in der synthetisierten extrazellulären Matrixschicht enthalten sind und die Matrix durch die kultivierten Fibroblastenzellen in Abwesenheit von exogenen Matrixverbindungen oder synthetischen Elementen während der Kultivierung produziert wird.

2. Die Verwendung nach Anspruch 1, wobei die extrazelluläre Matrixschicht Kollagen enthält.

3. Die Verwendung nach Anspruch 1, wobei das kultivierte Bindegewebe-Konstrukt ein zusammengesetztes Kollagengitter enthaltend Fibroblasten ist.

4. Ein kultiviertes Bindegewebe zur Verwendung bei Korrekturoperationen, umfassend kultivierte Fibroblastenzellen in einer Kollagenmatrix, wobei das kultivierte Bindegewebe-Konstrukt eine Schicht aus extrazellulärer Matrix ist, welche synthetisiert und zusammengesetzt ist aus kultivierten Fibroblastenzellen, wobei die kultivierten Fibroblastenzellen in der synthetisierten extrazellulären Matrixschicht enthalten sind und die Matrix durch die kultivierten Fibroblastenzellen in Abwesenheit von exogenen Matrixverbindungen oder synthetischen Elementen während der Kultivierung produziert wird.

Es folgt ein Blatt Zeichnungen

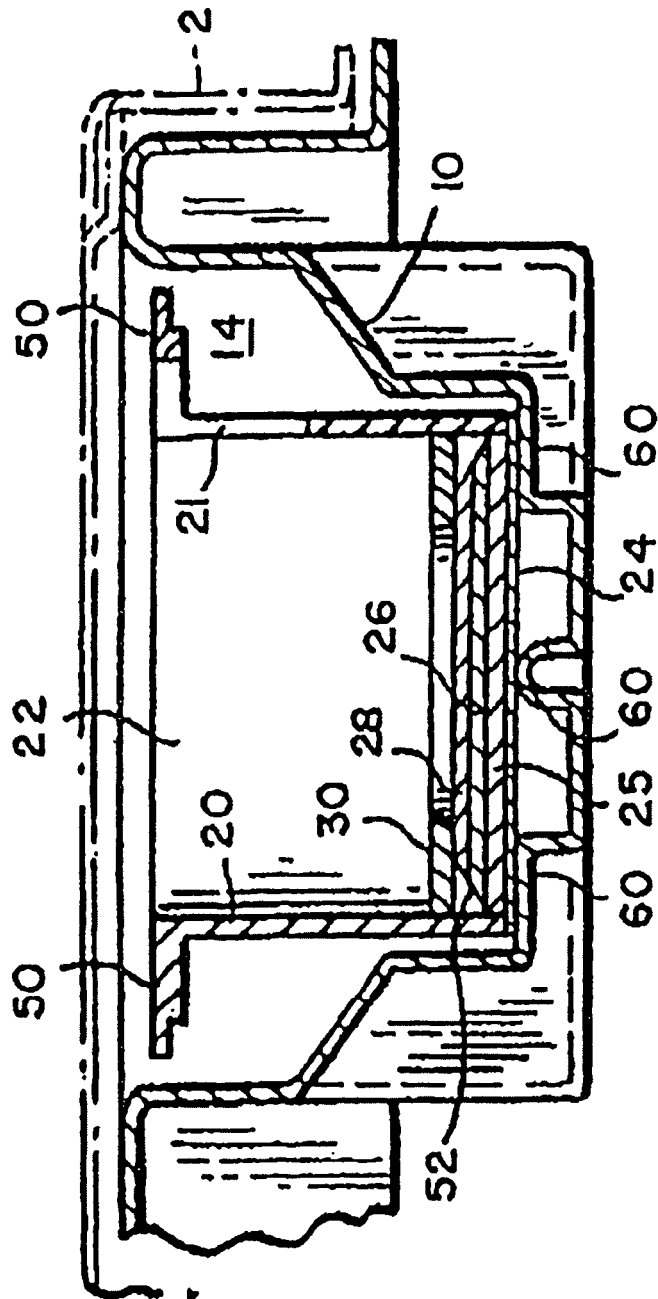


Fig. 1