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

(10) **DE 698 39 155 T2** 2009.02.26

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 039 873 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 39 155.1**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/25265**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 958 709.2**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/026595**
(86) PCT-Anmeldetag: **25.11.1998**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **03.06.1999**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **04.10.2000**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **20.02.2008**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.02.2009**

(51) Int Cl.[8]: ***A61Q 5/00*** (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
C08G 63/48 (2006.01)
C08G 63/91 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01)
C08H 1/06 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
C07K 1/113 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
979456 **26.11.1997** **US**

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

(73) Patentinhaber:
Keraplast Technologies Ltd., San Antonio, Tex., US

(74) Vertreter:
LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(72) Erfinder:
BLANCHARD, Cheryl R., San Antonio, TX 78209, US; TIMMONS, Scott F., San Antonio, TX 78253, US; SMITH, Robert A., Jackson, MS 39211, US

(54) Bezeichnung: **HYDROGEL AUF KERATIN-BASIS FÜR BIOMEDIZINISCHE ANWENDUNGEN UND DESSEN HERSTELLUNGSVERFAHREN**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft vernetzte Kerstin-Hydrogele sowie Verfahren zur Herstellung dieser. Diese sind als Wundverbandmaterialien und als Grundgerüste in der Gewebetechnologie von Nutzen.

Hintergrund

[0002] Chronische Wunden können durch eine Vielzahl an Vorkommnissen, unter anderem durch Operationen, anhaltende Bettruhe und traumatische Verletzungen, hervorgerufen werden. Wunden, die sich über einen Teil der Dicke erstrecken, können Verbrennungen zweiten Grades, Abschürfungen und Hauttransplantationsdonorstellen umfassen. Die Abheilung dieser Wunden kann problematisch sein, besonders bei Fällen von Diabetes mellitus oder chronischen Immunerkrankungen. Bei Wunden, die sich über die gesamte Dicke erstrecken, bleibt keine Haut übrig, dabei kann es sich um das Resultat von Traumen, Diabetes (z. B. Beingeschwüre) und venöser Stase handeln, die an den unteren Extremitäten Geschwüre über die ganze Dicke hervorrufen können. Wunden über die ganze Dicke neigen dazu, sehr langsam zu heilen. Richtige Wundversorgungsverfahren, unter anderem die Verwendung von Wundverbänden, sind von besonders großer Bedeutung für das erfolgreiche Management chronischer Wunden. Schätzungen zufolge betreffen chronische Wunden etwa vier Millionen Menschen pro Jahr, was zu Milliarden-Dollar-Beträgen an Kosten für das Gesundheitssystem führt. T. Phillips, O. Kehinde und H. Green, Treatment of Skin Ulcers with Cultivated Epidermal Allografts, J. Am. Acad. Dermatol., Band 21, 191–199 (1989).

[0003] Der Wundheilungsprozess umfasst eine komplexe Reihe biologischer Wechselwirkungen auf zellulärer Ebene, die in drei Phasen eingeteilt werden können: Hämostase und Entzündung; Bildung von Granulationsgewebe und erneute Epithelialisierung; und Remodellierung. R. A. F. Clark, Cutaneous Tissue Repair: Basic Biological Considerations, J. Am. Acad. Dermatol., Band 13, 701–725 (1985). Keratinozyten (Epidermiszellen, die Kerstin produzieren und enthalten) migrieren von Wundrändern, um die Wunde zu bedecken. Wachstumsfaktoren, wie z. B. der transformierende Wachstumsfaktor β (TGF-β), spielen eine entscheidende Rolle in der Stimulation des Migrationprozesses. Die Migration tritt im Bestfall unter der Abdeckung einer feuchten Schicht auf. Es wurde herausgefunden, dass Keratine für die erneute Epithelialisierung notwendig sind. Spezifisch wurde herausgefunden, dass die Keratintypen K5 und K14 in den unteren erzeugenden Epidermiszellen und die Typen K1 und K10 in den oberen differenzierten Zellen zu finden waren. Wound Healing: Biochemical and Clinical Aspects, I. K. Cohen, R. F. Diegleman und W. J. Lindblad (Hrsg.), W. W. Saunders Company (1992). Von den Keratintypen K6 und K10 wird angenommen, dass sie in heilenden Wunden, jedoch nicht in normaler Haut vorhanden sind. Keratine sind wichtige Strukturproteine aller Epithelzelltypen und scheinen bei der Wundheilung eine bedeutende Rolle zu spielen.

[0004] EP-A-0628573 beschreibt Verfahren zur Solubilisierung von Keratinproteinmaterial, wie z. B. Haar, durch Reduktion in einem wässrigen alkalischen Medium, z. B. mit Thioglycolat, um Disulfid-Bindungen zu spalten, sowie anschließendes Oxidieren in Gegenwart von Thioglycolsäure, um ein gemischtes lösliches Disulfid (Carboxymethyldisulfid) zu bilden.

[0005] GB-A-531446 beschreibt die Herstellung eines gemahlenen Presspulvers (Füllmaterial) aus keratinhältigem Material durch Oxidieren des körnigen Materials mit Wasserstoffperoxid, Waschen und gegebenenfalls Reduzieren unter Verwendung des unlöslichen Teils.

[0006] US-A-5047249 beschreibt auf Kerstin basierende Zusammensetzungen zur Wundbehandlung, die unter Verwendung von Reduktionsmitteln hergestellt wurden, um Kerstin-Disulfid-Bindungen zu zerstören, und unter Verwendung dieses „aktivierten" Materials direkt zur Wundbehandlung.

[0007] Ein optimaler Wundverband schützt das verletzte Gewebe, erhält eine feuchte Umgebung, ist wasserdurchlässig, erhält eine mikrobielle Kontrolle aufrecht, sorgt für die Anlieferung von Heilmitteln an die Wundstelle, ist leicht anzulegen, erfordert kein häufiges Wechseln und ist nicht-toxisch und nicht-antigen. Obwohl sie für chronische Wunden nicht ideal sind, sind momentan mehrere Wundverbände auf dem Markt, unter anderem Verschlussverbände, nicht-adhärente Verbände, absorbierende Verbände sowie Verbände in Form von Folien, Schäumen, Pulvern und Gelen. S. Thomas, Wound Management and Dressing, The Pharmaceutical Press, London (1990).

[0008] Es wurden Versuche unternommen, verbesserte Verbände bereitzustellen, die den Wundheilungsprozess unter Verwendung biologischer Materialien, wie z. B. von Wachstumsfaktoren, unterstützen würden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt erwiesen sich diese biologischen Materialien als sehr kostspielig und zeigten bei der Beschleunigung des Heilungsprozesses chronischer Wunden minimale klinische Relevanz. In Fällen schwerwiegender Wunden über die gesamte Dicke werden oftmals Autotransplantate (Hauttransplantate vom Körper des Patienten) verwendet. Obwohl das Transplantat nicht-antigen ist, muss es einer Spenderstelle auf dem Körper des Patienten entnommen werden, wodurch eine zusätzli-

che Wunde geschaffen wird. Zusätzlich dazu kann die Verfügbarkeit von autologem Gewebe nicht ausreichend sein. Allotransplantate (Hauttransplantate von anderen Spendern als dem Patienten) werden ebenfalls verwendet, wenn Donorstellen keine Option darstellen. Allotransplantate stellen im Wesentlichen einen „Wundverband" bereit, der eine feuchte, wasserdurchlässige Schicht darstellt, jedoch normalerweise vom Patienten innerhalb von zwei Wochen abgestoßen wird und nicht Teil der neuen Epidermis wird.

[0009] Was wünschenswert wäre und vordem noch nicht bereitgestellt wurde, ist ein Wundverband, der das verletzte Gewebe schützt, eine feuchte Umgebung erhält, wasserdurchlässig ist, leicht anzulegen ist, kein häufiges Wechseln erfordert und nichttoxisch und nicht-antigen ist sowie, was am wichtigsten ist, wirksame Heilmittel an die Wundstelle anliefert.

[0010] Die Gewebetechnologie ist ein schnell wachsendes Gebiet, das eine Reihe verschiedener Technologien umfasst, deren Ziel es ist, Gewebe- und Organfunktion zu ersetzen oder wiederherzustellen. Der konstante Erfolg eines gewebetechnologischen Implantats beruht auf der Erfindung eines biokompatiblen, mitogenen Materials, welches das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung erfolgreich unterstützen kann und sich in existierendes Gewebe integrieren kann. Solch ein Grundgerüstmaterial könnte den Status der Gewebetechnologieverfahren weit vorantreiben und zu einer breiten Anordnung gewebetechnologischer Implantate führen, die zelluläre Komponenten, wie z. B. Osteoblasten, Chondrozyten, Keratinozyten und Hepatozyten, enthalten, um Knochen-, Knorpel-, Haut- bzw. Lebergewebe wiederherzustellen oder zu ersetzen.

[0011] In einem Aspekt, wie in Anspruch 1 dargelegt, stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Bildung eines Keratinhydrogels bereit, umfassend:

(a) – die Bereitstellung eines Keratinquellenmaterials, bei dem es sich um menschliche(s) oder tierische(s) Haar, Finger- oder Zehennägel handelt, worin das Kerstin Disulfid-Bindungen aufweist;

(b) – das teilweise Oxidieren des Kerstins mit einem ersten Oxidationsmittel, um einige der Disulfid-Bindungen in hydrophile Cysteinsäuregruppen umzuwandeln, während andere intakt bleiben;

(c) – das Reduzieren des teilweise oxidierten Kerstins mit einem Reduktionsmittel, um einige oder alle der verbleibenden intakten Disulfid-Bindungen zu Cysteingruppen zu reduzieren, und

(d) – das Oxidieren des reduzierten Kerstins mit einem zweiten Oxidationsmittel zur erneuten Bildung von Disulfid-Bindungen aus den Cysteingruppen.

[0012] Andere Aspekte sind das Keratinhydrogelprodukt (Anspruch 18) sowie dessen Verwendung zur Herstellung eines Wundverbands (Anspruch 19).

[0013] Daher ermöglichen die vorliegenden Vorschläge ein Hydrogel, das aus vernetztem Kerstin gebildet wird und kein zugesetztes Bindemittel erfordert. Vom Hydrogel wird angenommen, dass es von erneut gebildeten Disulfid-Bindungen und Wasserstoff-Bindungen zusammen gebunden wird. Eine bevorzugte Verwendung des Hydrogels ist jene eines Wundheilungsmittels. Eine weitere bevorzugte Verwendung ist als gewebetechnologisches Zeltgerüst für Implantatanwendungen. Noch eine weitere bevorzugte Anwendung ist als Hautpflegeprodukt. Das Hydrogel kann aus einer löslichen Proteinfraktion gebildet werden, die von Haaren abstammt. Kerstin kann aus einer Reihe an Quellen erhalten werden, unter anderem menschliches oder tierisches Haar sowie von Finger- oder Zehennägeln, wobei eine Quelle das Haar des Patienten oder von Spendern ist.

[0014] Das Hydrogel kann durch Bereitstellung von sauberem, gewaschenem, gespültem und getrocknetem Haar gebildet werden. Das Haar wird teilweise mit einem Oxidationsmittel, wie z. B. Peressigsäure, oxidiert. Das teilweise Oxidieren spaltet manche Disulfid-Bindungen, während andere intakt bleiben. Die gespaltenen Bindungen können Sulfonsäurereste bilden. Das teilweise oxidierte Haar kann durch Filtrieren gewonnen, mit entionisiertem Wasser gespült, in einem Vakuum getrocknet und zu einem Pulver zermahlen werden.

[0015] Das teilweise oxidierte Pulver kann anschließend manche der verbleibenden intakten Disulfid-Bindungen aufweisen, die mit einem Reduktionsmittel, wie z. B. Ammoniumthioglykolat, in Ammoniumhydroxid durch Suspendieren des Pulvers in solch einer reduzierenden Lösung gespalten werden. Die Proteinsuspension kann für eine Zeitspanne von etwa 4 Stunden auf 60°C erhitzt und auf Raumtemperatur abgekühlt werden. Die gespaltenen Disulfid-Bindungen werden reduziert, um Cysteingruppen und Cystein-Thioglykolat-Disulfidgruppen zu bilden, wodurch das Protein noch weiter solubilisiert wird. Der unlösliche Keratinanteil wird vorzugsweise aus der Suspension mittels Zentrifugierung der Suspension und Sammeln des Überstands entfernt. Der Überstand wird vorzugsweise unter Verwendung eines Verfahrens, wie z. B. der Dialyse, gereinigt. Der Überstand kann in einem Verfahren durch Verwendung eines Vakuums bei Umgebungstemperaturen oder Temperaturen unter der Umgebungstemperatur weiter eingeengt werden.

[0016] Der Überstand, der Kerstin mit Sulfonsäuregruppen, Cysteingruppen und Cystein-Thioglykolat-Disulfidgruppen aufweist, wird nun oxidiert, um die Bildung von Disulfid-Bindungen zwischen Protein-Hauptketten zu ermöglichen. Die Sulfonsäurereste verbleiben als hydrophile Stellen innerhalb des Pro-

teins. Die hydrophilen Stellen binden Wasser im Hydrogel. Das Hydrogel wird daher aus reinem Kerstin gebildet, das mit Disulfid-Bindungen und Wasserstoff-Bindungen zusammen gebunden ist. Das Hydrogel erfordert keine Bindemittel. Das Kerstin-Hydrogel stellt ein nicht antigenes, mitogenes Wundheilmittel dar, das die Wunde feucht hält und ein Gerüst für das Zellwachstum für gewebetechnologische Implantate darstellt. Eine weitere Anwendung für dieses Keratingel ist als Hautpflegeprodukt.

[0017] Von Kerstin wurde gezeigt, dass es biokompatibel und nicht-immunogen ist, dass es aktivierte T-Zellen nicht inhibiert und daher die normale zellvermittelte Immunantwort nicht stört und dass es für Keratinozyten, Fibroblasten und menschliche mikrovaskuläre Endothelzellen mitogen ist. Von Kerstin wurde ebenfalls in Wundheilungsstudien bei Ratten und Menschen gezeigt, dass es die Epithelialisierung fördert.

[0018] In einer Ausführungsform eines Verfahrens gemäß der vorliegenden Erfindung wird Haar bereitgestellt, vorzugsweise gewaschen und ungebleicht. Das Haar entstammt einer menschlichen oder tierischen Quelle. Der Patient oder ein menschlicher Spender stellt eine bevorzugte Quelle bezüglich des Haars dar, da Haar dieser Quellen mit der größten Wahrscheinlichkeit zu einem nicht-antigenen Wundheilungsprodukt führt, obwohl Tierhaar für gewisse Individuen, die keine Probleme mit Tierproduktallergien haben, annehmbar sein kann. In einem Verfahren wird das Haar mit Versa-Clean™ (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) gewaschen, mit entionisiertem Wasser gespült und lufttrocknen gelassen.

[0019] Das Haar kann in Peressigsäure oder einem anderen geeigneten Reagens, wie z. B. H_2O_2, oxidiert werden. Eine bevorzugte Behandlung verwendet von 1% bis zu 32% Peressigsäure bei einer Temperatur zwischen etwa 0°C und 100°C für eine Zeitspanne von zwischen 0,5 und 24 Stunden. Ein Verfahren behandelt 30 Gramm Haar mit 500 ml 32% Peressigsäure bei 4°C für eine Zeitspanne von 24 Stunden. Von dieser Behandlung mit Peressigsäure wird angenommen, dass sie die natürlich auftretenden Disulfid-Bindungen teilweise oxidiert, um ein Protein mit Cysteinsäureresten ($-CH_2SO_3H$) und verbleibenden Disulfid-Bindungen zu produzieren.

[0020] Das Haar wird gewonnen, vorzugsweise durch Filtration durch einen groben Frittenglasfilter, und mehrmals mit entionisiertem Wasser gespült, bis die Spüllösung einen pH von 6,0 oder höher aufweist. Das Haar kann anschließend in einem Vakuumofen bei zwischen 20°C und 50°C für eine Zeitspanne von zwischen 0,5 und 5 Tagen getrocknet werden. In einem Verfahren wird das Haar mehrere Tage lang in einem Vakuumofen bei 40°C getrocknet. Das getrocknete Haar kann anschließend pulverisiert und zu einem feinen Pulver zermahlen werden. Ein Verfahren des Zermahlen des Haars umfasst die Verwendung eines keramischen Stößels und Mörsers.

[0021] Das Keratinpulver kann in Ammoniumthioglykolat suspendiert werden. In einem Verfahren wird pulverisiertes Keratinpulver, das, wie oben stehend beschrieben, aus Haar gewonnen wird, in etwa 3 N Ammoniumhydroxid, enthaltend Ammoniumthioglykolat, suspendiert. Etwa sechs Gramm Keratinpulver können pro 75 ml Ammoniumhydroxid hinzugefügt werden. Die Stärke von Ammoniumhydroxid liegt vorzugsweise bei etwa 3 N, und die bevorzugte Konzentration von Ammoniumthioglykolat liegt bei etwa 11 ml (als Thioglykolsäure) pro 75 ml Ammoniumhydroxid. Die Suspension kann anschließend für eine Zeit erhitzt werden, die ausreicht, um den löslichen Anteil des Haars zu solubilisieren. Die Suspension in einem Verfahren wird für eine Zeitspanne von zwischen 1 und 24 Stunden auf zwischen 50°C und 90°C erhitzt, gefolgt von einem Abkühlungsschritt. In einem bevorzugten Verfahren wird die Suspension für eine Zeitspanne von etwa 4 Stunden auf etwa 60°C erhitzt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Anmelder nehmen an, dass diese Behandlung die verbleibenden Disulfid-Bindungen spaltet, um Cysteinreste in der Proteinstruktur zu produzieren. Zu diesem Zeitpunkt wird vom Keratinprotein angenommen, dass es Cysteinsäure-, Cystein- und Cystein-Thioglykolat-Disulfid-Reste enthält. Das Verhältnis von Cysteinsäureresten und Cysteinresten kann durch Variieren der Zeit, der Temperatur und der Konzentration des Oxidans in dem zuvor beschriebenen Peressigsäure-Behandlungsschritt kontrolliert werden. Die Gegenwart von Sulfonsäureresten verleiht dem Haar sowie dem endgültigen Hydrogelprodukt eine hydrophile Eigenschaft.

[0022] Nach der oben stehend beschriebenen Behandlung bleibt ein Kerstin-Anteil übrig, der gegenüber der Behandlung resistent ist und hauptsächlich aus β-Kerstin besteht. Dieser Anteil ist in der Suspension unlöslich und wird in einem Verfahren durch Zentrifugierung bei etwa 10.000 g für eine Zeitspanne von etwa 10 Minuten entfernt. Der unlösliche Anteil wird für eine weitere Verwendung beiseite gelassen. Ein dicker, geleeartiger Überstand bleibt übrig, der einen löslichen Kerstin-Anteil inkludiert. Der Überstand wird gesammelt.

[0023] Der Überstand wird vorzugsweise gereinigt, und zwar unter Verwendung eines Verfahrens, wie etwa der Dialyse. Ein bevorzugtes Verfahren verwendet eine Dialyse gegen fließendes Wasser unter Verwendung einer Dialysemembran (Spectra/Por™) mit einem Cutoff von etwa 8000 MG. Die resultierende Lösung wird vorzugsweise bis auf eine Konzentration von etwa 0,1 Gramm pro ml konzentriert.

[0024] Das Kerstin in der Lösung ist nun zur Vernet-

zung bereit, um ein Hydrogel zu bilden. Ein Oxidationsmittel wird zum Kerstin hinzugefügt, um die Keratinproteine zu vernetzen. Bevorzugte Oxidationsmittel inkludieren Wasserstoffperoxid, organische Persäuren, Peroxycarbonate, Ammoniumsulfatperoxid, Benzoylperoxid und Perborate. Wasserstoffperoxid wird vorzugsweise mit etwa 0,5% bis etwa 1,0% (Gew./Vol.) zu der Keratinlösung hinzugefügt, gut gemischt und bei Raumtemperatur mehrere Tage stehen gelassen. Eine bevorzugte Standzeit umfasst etwa 3 Tage. Die frei fließende Lösung verdickt sich langsam und verwandelt sich nach etwa 72 Stunden in ein vernetztes Hydrogel.

[0025] Der Anteil löslichen Kerstins aus Haar ist daher teilweise oxidiert, damit die Protein-Hauptketten mit Disulfid-Bindungen verbunden sind und Sulfonsäurereste aufweisen. Das teilweise oxidierte Kerstin wird mit einem Reduktionsmittel behandelt, um manche oder alle der verbleibenden Disulfid-Bindungen zu spalten, wodurch Thiolgruppen und Cystein-Thioglykolat-Disulfid-Gruppen gebildet werden und mehr der Keratinproteine solubilisiert werden. Nach der Entfernung des unlöslichen Anteils wird das Kerstin oxidiert, um die Bildung von Disulfid-Vernetzungen zu ermöglichen. Daher werden erneut Disulfid-Vernetzungen gebildet. Wie hierin verwendet, bezieht sich der Ausdruck „erneut gebildet" auf gebrochene Vernetzungen, die zu einem späteren Zeitpunkt gebildet werden, wobei einzelne Bindungen, die später gebildet werden, zwischen denselben Aminosäure-Cystein-Paaren auftreten könnten, dies jedoch nicht notwendigerweise tun müssen.

[0026] Dies führt zu einem vernetzten, reinen Keratinhydrogel. Das Hydrogel besitzt Sulfonsäuregruppen, die hydrophil sind und Wasser innerhalb des Hydrogels binden. Die Anzahl an Sulfonsäuregruppen entspricht dem Ausmaß der Keratinoxidation in dem teilweisen Oxidationsschritt.

[0027] Die Anmelder gehen davon aus, dass das gemäß diesem Verfahren hergestellte Keratinprodukt zur Verwendung als Wundheilmittel und als mitogenes Zellwachstumsgerüst für gewebetechnologische Anwendungen sowie als Nährstoffunterstützung für das Zellwachstum geeignet ist. Es ist ebenfalls für Hauptpflegeanwendungen geeignet. Antibakterielle Additive, Salben und biologische Materialien, wie z. B. Wachstumsfaktoren oder Kollagen, können zum Keratinhydrogel hinzugefügt werden.

Experimentelle Ergebnisse

[0028] Ein auf Kerstin basierendes Hydrogel-Wundheilungsmittel, das kein Bindematerial erfordert, wurde aus Kerstin hergestellt, das aus menschlichem Haar stammt. Menschliches Haar wurde von Männern zwischen 12 und 20 Jahren erhalten, mit Versa-Clean™ (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) gewaschen, mit entionisiertem Wasser gespült und lufttrocknen gelassen. Dieses Haar wurde anschließend unter Verwendung einer Schere in etwa 6,35 bis 51 mm (0,25 Zoll bis 2 Zoll) lange Stücke geschnitten. Dreißig Gramm dieses Haars wurden mit 500 ml 32% Peressigsäure (Aldrich Chemical, Milwaukee, WI) 24 Stunden lang bei 4°C behandelt. Diese Behandlung oxidierte die Disulfid-Bindungen teilweise. Das Haar wurde durch Filtration durch einen groben Frittenglasfilter gewonnen und mehrmals mit entionisiertem Wasser gespült, bis die Spüllösung einen pH von 6,0 oder höher aufwies. Das Haar wurde bei Vakuumbedingungen mehrere Tage lang bei 40°C getrocknet, bis es vollständig trocken war, und mit einem keramischen Stößel und Mörser zu einem feinen Pulver zermahlen. Das resultierende Material, 19 Gramm, wurde verwendet, um ein Keratinhydrogel zu erzeugen.

[0029] Sechs Gramm des pulverisierten, oxidierten Haars wurden in 75 ml 3 N Ammoniumhydroxid, enthaltend 11 ml Ammoniumthioglykolat (als Thioglykolsäure), suspendiert. Die Suspension wurde 4 Stunden lang auf 60°C erhitzt und auf Raumtemperatur gekühlt. Diese Behandlung spaltete etwaige verbleibende Disulfid-Bindungen, um Cystein- und Cystein-Thioglykolat-Disulfidreste in der Proteinstruktur zu produzieren. Ein unlöslicher Anteil blieb übrig, der gegen eine Solubilisierung durch das Ammoniumhydroxid und das Ammoniumthioglykolat resistent war. Der unlösliche Anteil, von dem angenommen wird, dass er hauptsächlich aus β-Kerstin besteht, wurde mittels Zentrifugierung bei 10.000 g für eine Zeitspanne von 10 Minuten isoliert. Ein dicker, geleeartiger Überstand wurde aus dem zentrifugierten Material entfernt, wobei das unlösliche Material zur Verwendung in einem verwandten Produkt beiseite gelassen wurde.

[0030] Der Überstand wurde 72 Stunden lang unter Verwendung einer Dialysemembran mit einem 8000-MG-Cutoff (Spectra/Por™) gegen fließendes Wasser dialysiert. Die resultierende Lösung wurde in vacuo bei einer Temperatur unter der Umgebungstemperatur auf 50 ml eingeengt. Die Lösung wurde mit 3% Wasserstoffperoxid behandelt, das in einer Rate von 0,5% bis zu 1,0% (Gew./Vol.) hinzugefügt wurde, gut gemischt und 3 Tage lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die frei fließende Lösung verdickte sich langsam und verwandelte sich nach 72 Stunden in ein vernetztes Hydrogel. Das Hydrogel kann als Wundheilmittel oder als Zeltgerüst verwendet werden.

[0031] Die Verwendung von keratinhältigen Materialien bei der Förderung der Wundheilung wurde in mehreren Experimenten gezeigt. In einem ersten Experiment wurde verarbeitetes menschliches Haar mit Zellkulturmedium inkubiert. Das Medium/Haar-Gemisch wurde durch einen Mikrofilter filtriert. Zelllinien,

die für die Wundheilung relevant sind, unter anderem menschliche mikrovaskuläre Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten, wurden unter Verwendung dieses Mediumextrakts in Kultur platziert. Die signifikante Proliferation dieser VVundheilungszellen wurde gemessen. Keratinozyten vermehrten sich im Übermaß, Fibroblasten vermehrten sich in geringem Ausmaß und Endothelzellen vermehrten sich im Übermaß.

[0032] Die mitogene Aktivität, die in Fibroblasten-, Keratinozyten- und Endothel-Zeltkulturen beobachtet wurde, ist ein zusätzlicher Beweis dafür, dass das keratinöse Proteinmaterial nicht nur biokompatibel, sondern auch mit diesen Zelllinien mitogen ist. Zusätzliche Biokompatibilität wurde beobachtet, als Kerstin-Mikrofibrillen mit dem Mikroskop in direktem Kontakt mit Zellen in den Zellkulturen beobachtet wurden. Spezifisch wurde beobachtet, wie Keratinozyten und Fibroblasten an Mikrofibrillen anhafteten und sich um diese ansammelten, was darauf hinweist, dass die gewünschte Zellaktivität auf dieser natürlich entwickelten Biopolymer-Matrix aufrechterhalten werden kann.

[0033] In einem zweiten Experiment wurde verarbeitetes menschliches Haar-Pulver mit Zellkulturmedium inkubiert. Das Medium/Kerstin-Gemisch wurde durch einen Mikrofilter filtriert. Dieser Medium-Extrakt wurde in Proliferationsstudien mit Lymphozyten verwendet. Die Lymphozyten-Zelllinie zeigte keine Vermehrung, was darauf hinweist, dass das Material nicht-immunogen ist.

[0034] In einem dritten Experiment wurde verarbeitetes menschliches Haar-Pulver mit Zellkulturmedium inkubiert. Das Medium/Haar-Gemisch wurde anschließend durch einen Mikrofilter filtriert. Dieser Medium-Extrakt wurde in Proliferationsstudien mit aktivierten T-Lymphozyten verwendet. Die T-Lymphozyten vermehrten sich in normalem Ausmaß, was darauf hinweist, dass es zu keiner Inhibierung der normalen zellvermittelten Immunantwort durch das Kerstin kommt. Dies zeigte keine Inhibierung dieser sehr wichtigen Funktion von Immunzellen.

[0035] In einem vierten Experiment wurde menschliches Haar chemisch behandelt. Dies produzierte eine Kerstin-Aufschlämmung, die anschließend in eine Folie gegossen und chemisch vernetzt wurde, um eine nicht-lösliche Kerstin-Folie zu produzieren. Segmente der Folie wurden anschließend mit Keratinozyten, Fibroblasten und menschlichen mikrovaskulären Endothelzellen inkubiert. Von diesen Zellen wurde gezeigt, dass sie vorteilhaft auf der Kerstin-Folie wachsen und sich proliferieren. Dies weist darauf hin, dass sich Hautkomponentenzellen in der Gegenwart der Keratin-Folie, die durch das oben stehend beschriebene Verfahren produziert wird, vorteilhaft vermehren.

[0036] In einem fünften Experiment wurden achtundzwanzig haarlose Ratten auf beiden Seiten der dorsalen Mittellinie mit einem Dermatom verwundet, wodurch eine Wunde, die sich über einen Teil der Dicke erstreckt, entsteht, die 0,12 Zoll tief ist und eine Oberfläche von 2,0 × 4,0 cm aufweist. Die Hälfte der Wunden wurde mit Keratinpulver behandelt, die andere Hälfte nicht, beide Hälften wurden mit Polyurethanverband bedeckt. Die Heilung der Wunden wurde beobachtet und eine Biopsie wurde zur histochemischen Analyse an den Tagen 0, 2, 4 und 6 durchgeführt. Planimetriestudien zeigten an Tag 4 eine Epithelialisierung der keratinbehandelten Wunden von 97 % und eine Epithelialisierung der unbehandelten Wunden von 78%. Eine histologische Analyse durch eine H-&-E-Färbung zeigte unter dem Mikroskop eine vollständige Epithelialisierung der keratinbehandelten Wunden an Tag 2 und nur eine teilweise Epithelialisierung der unbehandelten Wunden an Tag 2. Histologische Analysen an den Tagen 4 und 6 zeigten ebenfalls eine Beschleunigung des Epithelialisierungs-Reifungsprozesses bei den keratinbehandelten Wunden.

[0037] Im Moment werden klinische Studien am Menschen an Donorstellen für Hauttransplantate durchgeführt. Eine Hälfte der Donor-Wundstelle wird mit sterilisiertem Keratinpulver behandelt, und die gegenüberliegende Hälfte wird auf eine herkömmliche Art und Weise mit nicht-adhärentem Adaptic™-Verband von Johnson & Johnson behandelt. Vorläufige Ergebnisse zeigen, dass es bei den keratinbehandelten Hälften zu einer früheren Epithelialisierung sowie zu einer schnelleren Reifung kommt. Dies wurde sowohl durch klinische Beobachtungen als auch durch histologische Ergebnisse von 4-mm-Stanzbiopsien bestätigt. Subjektiv berichteten die Patienten auch von viel weniger Schmerzen in den keratinbehandelten Wunden.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bildung eines Keratinhydrogels, umfassend:
(a) – die Bereitstellung eines Keratinquellenmaterials, bei dem es sich um menschliche(s) oder tierische(s) Haar, Finger- oder Zehennägel handelt, worin das Kerstin Disulfid-Bindungen aufweist;
(b) – das teilweise Oxidieren des Kerstins mit einem ersten Oxidationsmittel, um einige der Disulfid-Bindungen in hydrophile Cysteinsäuregruppen umzuwandeln, während andere intakt bleiben;
(c) – das Reduzieren des teilweise oxidierten Kerstins mit einem Reduktionsmittel, um einige oder alle der verbleibenden intakten Disulfid-Bindungen zu Cysteingruppen zu reduzieren, und
(d) – das Oxidieren des reduzierten Kerstins mit einem zweiten Oxidationsmittel zur erneuten Bildung von Disulfid-Bindungen aus den Cysteingruppen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin zwischen 1% und 90% der Disulfid-Bindungen bei dem Schritt des teilweisen Oxidierens (b) oxidiert werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, worin zwischen 50% und 100% der verbleibenden Disulfid-Bindungen in dem Reduktionsschritt (c) reduziert werden.

4. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin zwischen 1% und 100% der reduzierten Cysteingruppen aus Schritt (c) zur erneuten Bildung von Disulfid-Bindungen in dem Oxidationsschritt (d) oxidiert werden.

5. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das erste Oxidationsmittel Peressigsäure umfasst.

6. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin es sich bei dem Reduktionsmittel um alkalische Thioglykolat-Lösung handelt.

7. Verfahren nach Anspruch 6, worin es sich bei dem Reduktionsmittel um Ammoniumthioglykolat in Ammoniumhydroxid handelt.

8. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin das zweite Oxidationsmittel aus Wasserstoffperoxid, organischen Persäuren, Peroxycarbonaten, Ammoniumsulfatperoxid, Benzoylperoxid und Perboraten ausgewählt ist.

9. Verfahren nach einem der vorangegangenen Ansprüche, worin in Schritt (c) ein Pulver des teilweise oxidierten Keratinquellenmaterials in einer Lösung des Reduktionsmittels suspendiert wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, worin nach Schritt (c) ein löslicher Anteil des Kerstins von der Suspension zur Verwendung in Schritt (d) abgetrennt wird.

11. Verfahren nach Anspruch 10, worin die Abtrennung das Zentrifugieren der Suspension und das Sammeln des Überstands umfasst.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, umfassend die Reinigung des Überstands mittels Dialyse.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, umfassend das Erhitzen der Suspension vor dem Zentrifugieren.

14. Verfahren nach Anspruch 13, worin die Suspension auf eine Temperatur von etwa 60°C erhitzt wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 14, ferner umfassend das Konzentrieren des löslichen Anteils.

16. Verfahren nach Anspruch 15, worin der konzentrierte Anteil eine Konzentration von etwa 0,1 g Kerstin pro ml aufweist.

17. Verfahren nach Anspruch 1, umfassend folgende Schritte:
– die Bereitstellung von sauberem, gewaschenem Haar;
– bis zu 24 h langes Oxidieren des Haars mit etwa 32% Peressigsäure bei etwa 4°C;
– das Abfiltrieren des Haars;
– das Spülen des Haars mit entionisiertem Spülwasser, bis das Spülwasser einen pH-Wert von zumindest etwa 6,0 aufweist;
– das Trocknen des Haars unter Umgebungsbedingungen oder in Vakuum bei etwa 40°C, bis es vollständig trocken ist;
– das Zermahlen des Haars zu einem feinen Pulver;
– das Suspendieren des Pulvers in einer Lösung von etwa 3 N Ammoniumhydroxid, die etwa 11 ml Ammoniumthioglykolat als Thioglykolsäure pro 75 ml Ammoniumhydroxid enthält, wodurch eine Suspension gebildet wird;
– das etwa 4-ständige Erhitzen der Suspension auf etwa 60°C;
– das Abkühlen der Suspension auf Raumtemperatur;
– das etwa 10-minütige Zentrifugieren der Suspension bei etwa 10.000 g und das Sammeln des Überstands;
– die Reinigung des Überstands mittels Dialyse gegen laufendes Wasser für etwa 72 h unter Einsatz einer Dialysemembran mit einem Cutoff bei etwa 8000 MG;
– das Konzentrieren des gereinigten Überstands;
– das Oxidieren des Konzentrats durch die Zugabe von etwa 3% Wasserstoffperoxid mit einer Rate von etwa 0,5% bis etwa 1,0% (Gew./Vol.) und sorgfältiges Durchmischen und
– das Stehenlassen des Konzentrats bei Raumtemperatur für etwa 72 h, wodurch ein vernetztes Hydrogel gebildet wird.

18. Keratinhydrogel, das durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 17 erhältlich ist.

19. Hydrogel nach Anspruch 18, das 0,05 bis 0,4 g Kerstin pro ml enthält.

20. Hydrogel nach Anspruch 18 oder 19, das kein Bindemittel umfasst.

21. Verwendung eines Keratinhydrogels nach einem der Ansprüche 18 bis 20 zur Herstellung eines Wundverbandmaterials.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen