



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 60 2004 000 323 T2** 2006.09.07

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 484 070 B1**

(51) Int Cl.⁸: **A61L 27/24** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 000 323.9**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 253 332.3**

(96) Europäischer Anmeldetag: **04.06.2004**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **08.12.2004**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **11.01.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **07.09.2006**

(30) Unionspriorität:

475995 P **05.06.2003** **US**

533289 P **30.12.2003** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR

(73) Patentinhaber:

Baxter International Inc., Deerfield, Ill., US; Baxter Healthcare S.A., Wallisellen, CH

(72) Erfinder:

**Schachtler, Ralph, 69168 Wiesloch, DE;
Stemberger, Axel W., 58879 Neubiberg, DE;
Sepehrnia, Abolghassem, 30826 Garbsen, DE;
Odar, Johann, 69242 Muehlhausen, DE**

(74) Vertreter:

Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European Patent Attorneys, 81671 München

(54) Bezeichnung: **Zubereitungen zur Wiederherstellung und Regeneration humaner Dura Mater**

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 betrifft die Verwendung von im Wesentlichen nicht-porösen Kollagenfolienzusammensetzungen als Transplantatmaterial zur Wiederherstellung und/oder Regeneration von Dura Mater-Gewebe von Säugern. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung von Kollagenfolienzusammensetzungen nicht-menschlicher Herkunft als Dura Mater-Ersatzmaterial und als Biomatrix für die Dura-Regeneration.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die Dura Mater ist eine funktionell signifikante Struktur in der Anatomie des Zentralnervensystems und bildet ein Membransystem, welches das gesamte Zentralnervensystem umgibt und es vor äußeren Einflüssen schützt.

[0003] Die Dura Mater kann aufgrund einer Anzahl von Ursachen, einschließlich eines Traumas, entzündlicher oder neoplastischer Prozesse, chirurgischer Verfahren oder angeborener Anomalien eine Wiederherstellung erfordern. Das Erfordernis des Schließens von Dura-Defekten, insbesondere nach chirurgischen Verfahren und in der Gegenwart posttraumatischer Fisteln, hat die Suche nach einem idealen Dura Mater-Ersatz angeregt. Diese Defekte können zu postoperativen Komplikationen führen, insbesondere zur einem Heraussickern von Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit, zu Infektionen und resultierenden zerebralen Anfällen. Bei nahezu 30% der Kraniotomien sind gewisse Formen von Dura-Transplantationsverfahren erforderlich. Da der Primärverschluss des Dura-Defekts häufig fehlschlägt, ist die Verfügbarkeit eines Dura-Ersatzes zur Vermeidung der vorstehend genannten Komplikationen von großer praktischer Signifikanz.

[0004] Ein permanenter flüssigkeitsdichter Verschluss der Dura Mater ist erforderlich, um ein Austreten von Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit nach Schädelverletzungen oder chirurgischen Eingriffen zur Entfernung maligner Tumore im Gehirn oder in der Wirbelsäule zu vermeiden. Neurochirurgen verwenden gegenwärtig resorbierbare oder nicht-resorbierbare Dura Mater-Ersatzmaterialien und heften diese üblicherweise mit Nähten und/oder Fibrinkleber im Schädel oder in der Wirbelsäule an. Beispiele für resorbierbare Materialien umfassen Dura Mater von menschlichen Leichen, menschlicher Oberschenkel-faszie, Rinderperikard, xenogene Kollagenschwämme und Implantate aus gewebten Materialien, die aus resorbierbarem Polyester (Polyglactin und/oder Poly-p-dioxanon) bestehen. Beispiele für nicht-resorbierbare Dura-Ersatzmaterialien umfassen Materialien, die aus Polytetrafluorethylen (PTFE) oder Polyester-urethan hergestellt sind.

[0005] Nahezu alle bisher untersuchten Dura-Transplantate sind mit Komplikationen verbunden, wobei einige davon schwerwiegend sind. Die Hauptkomplikationen, die beschrieben worden sind, sind chronische Entzündungs- und Abstoßungsreaktionen und die Bildung kortikomeningealer Anhaftungen, die unter anderem zur Entwicklung epileptogener Herde führen. Hämatom und Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit-Fisteln werden ebenfalls beobachtet, die wiederum einen Eintrittspunkt für verschiedene, Krankheiten verursachende Organismen bereitstellen.

[0006] Während der letzten Jahrzehnte wurden bei der Suche nach dem idealen Dura-Transplantat zahlreiche Materialien und Verfahren bewertet, einschließlich verschiedene Metalle, Implantate, synthetische Materialien, autologe Gewebetransplantate und konservierte Dura Mater von menschlichen Leichen. Die meisten dieser Produkte sind aufgrund der damit verbundenen postoperativen Komplikationen, wobei einige davon schwerwiegend sind, ungeeignet. Beispiele für die Komplikationen umfassen chronische Entzündungs- und Abstoßungsreaktionen, die Entwicklung kortikomeningealer Anhaftungen, Hämorrhagien und die Einkapselung von Dura Mater-Transplantaten in einer dicken Schicht von Bindegewebe. Vorhergehende Studien bezüglich geeigneter Dura-Ersatzmaterialien zeigen, dass eine frühe Transplantatabsorption gekoppelt mit der Bildung einer endogenen Neodura die Hauptfaktoren sind, die für eine ereignislose und dauerhafte Durafusion prädictiv sind.

[0007] In der Vergangenheit wurden mehrere autologe Gewebe als Dura Mater-Ersatzmaterialien verwendet. 1911 verwendete Kostling den Bruchsack eines Patienten zur Bildung eines Dura-Transplantats, W. Kostling, Med. Wochenschr., 58, 1042 (1911). Andere autologe Gewebe, wie z.B. eine Fascia temporalis, eine Oberschenkel-faszie und Knochenhautlappen, wurden seitdem verwendet. Barrow et al. haben eine große Dura-Läsion mit endogenem großen Netz erfolgreich rekonstruiert, Barrow et al., J. Neurosurg. 60, 305-1 (1987). Der Vorteil autologer Transplantate besteht darin, dass kein Risiko einer Pathogenübertragung oder einer Gewe-

beabstößung besteht. Die zusätzliche Entfernung von Gewebe verstärkt jedoch das chirurgische Trauma und verlängert ein fast immer kompliziertes chirurgisches Verfahren.

[0008] Konservierte Dura Mater von menschlichen Leichen wurde für viele Jahre als Dura Mater-Ersatz für einen Dura-Ersatz in Menschen routinemäßig verwendet. Diese Präparate bestehen aus Bindegewebsfasern, die wie die körpereigene Dura Mater ineinander verwoben sind. Nachdem die Dura Mater von menschlichen Leichen in der Neurochirurgie verwendet worden ist, wird davon ausgegangen, dass sie einen flüssigkeitsdichten Verschluss ähnlich wie die körpereigene Dura Mater bildet und dass sie während eines Abbauvorgangs über einen längeren Zeitraum schließlich durch körpereigenes Gewebe ersetzt wird. Das von Leichen stammende Material wird durch Gefriertrocknen (Lyophilisierung) und Gamma-Sterilisation (Lyodura, B. Braun Melsungen Aktiengesellschaft, Melsungen, Deutschland) oder in einem mehrstufigen chemischen Verfahren (Tutoplast®-Verfahren, Tutoplast®-Dura, Tutogen Medical GmbH, Neunkirchen am Brand, Deutschland) konserviert. Dura Mater-Transplantate von menschlichen Leichen wurden jedoch mit signifikanten Risiken dahingehend in Verbindung gebracht, dass sie Viren und Prionen enthalten, welche die gefürchtete Krankheit der spongiformen Enzephalitis (Creutzfeld-Jakob-Krankheit oder Gerstmann-Straussler-Syndrom) verursachen können. Aufgrund der zahlreichen Todesfälle, die nach der Implantation von menschlicher Dura Mater auftraten, wurde die Verwendung von Dura Mater von menschlichen Leichen in einer Anzahl von Ländern eingeschränkt oder verboten.

[0009] Als Dura Mater-Ersatzmaterial wurden auch menschliche Oberschenkel- und Perikardpräparate mit einer geringeren Gefahr einer Übertragung infektiöser Mittel als bei Dura Mater von menschlichen Leichen verwendet. Während diese Präparate ein geringeres Risiko einer Krankheitsübertragung aufweisen, werden sie über Zeiträume von Monaten oder Jahren langsam resorbiert, was zu einer Narbenbildung und Einkapselung des Dura-Ersatzmaterials führen kann.

[0010] Dura-Ersatzmaterialien wurden auch von nicht-menschlichen Quellen abgeleitet, wie z.B. von Rinder- oder Schweinekollagen, das aus Haut oder Sehnen und von Rinderperikardgewebe isoliert worden ist. Ähnlich wie bei vom Menschen stammenden Quellen wurde bezüglich einiger Rinder-Dura-Ersatzmaterialien angenommen, dass sie auf den Patienten, der das Dura Mater-Transplantat erhält, eine Krankheit übertragen, nämlich bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE). Die Verwendung von Dura-Ersatzmaterialien, die vom Schwein stammen, führte jedoch zu Anhaftungen an dem darunter liegenden Zerebralgewebe.

[0011] Narotam et al., US 5,997,895, beschreiben Dura-Ersatzmaterialien, die von behandeltem xenogenen Kollagen in Form eines porösen Kollagenschwamms, -filzes oder -films abgeleitet sind. Die Behandlung von Kollagen inaktiviert eine virale Kontamination und eine Prionenkontamination, so dass das Ersatzmaterial keine infektiösen Mengen an Viren und Prionen enthält. Es ist beschrieben, dass die Porosität von Dura-Ersatzmaterialien erforderlich ist, um ein Infiltrieren des Dura-Ersatzmaterials durch Gefäße, Zellen und meningeales Gewebe zu ermöglichen. In der klinischen Praxis ist die Anwendung der verfügbaren porösen Materialien jedoch mit Nachteilen verbunden, da die Formstabilität und die Primärflüssigkeitsdichtigkeit nicht immer garantiert sind. Narotam et al. beschreiben auch ein Dura-Ersatzmaterial, bei dem es sich um ein Sandwich aus zwei oder mehr Formen eines Kollagenschwamms, -filzes oder -films handelt, wobei mindestens eine Form für ein Einwachsen von meningealem Gewebe ausreichend porös ist.

[0012] Resorbierbare Polyester sind ebenfalls für die klinische Verwendung verfügbar, weisen jedoch den Nachteil einer niedrigen Elastizität und eines langsamen Abbaus auf. In speziellen Situationen verursachen diese Implantate Wundheilungsprobleme und können Infektionen verstärken.

[0013] Folien oder Blätter, die aus Metall, wie z.B. Gold, Platin, Silber, Nickel, Tantal oder Stahl, oder aus Polymeren, wie z.B. Polytetrafluorethylen (PTFE) oder anderen Polyestern, bestehen, wurden ebenfalls als Dura Mater-Ersatzmaterialien verwendet. Diese Ersatzmaterialien werden vom Patienten nicht absorbiert, jedoch in einer zähen Schicht aus Bindegewebe eingekapselt und verbleiben für die Lebenszeit des Patienten als Fremdkörper im Körper des Patienten, ohne von den körpereigenen Strukturen ersetzt zu werden. Dies kann aufgrund der porösen Struktur der PTFE-Folienmembranen zu einem hohen Risiko eines Keimwachstums in den inneren Poren führen, das nicht durch den körpereigenen Abwehrmechanismus kontrolliert werden kann.

[0014] Produkte auf Kollagenbasis werden immer populärer. Chemische Verfahren können zur Modifizierung von Strukturen mit einer stark Bindegewebe-haltigen Komponente, wie z.B. dem Perikard oder der Lederhaut, verwendet werden, so dass nur ein azelluläres, Antigen-freies Kollagengerüst bewahrt wird. Es sind Produkte verfügbar, die vollständig aus Kollagenfibrillen oder Kollagen-beschichteten synthetischen Materialien bestehen. In beiden Fällen wirkt das Kollagenfasernetzwerk als Matrix zum Wachsenlassen von endogenem Binde-

gewebe.

[0015] Chaplin et al. haben ein Produkt, das aus Meerschweinchenhaut erhalten wird (XenoDerm, Lifecell Corp., The Woodlands, TX), in einem Tiermodell getestet, *Neurosurgery*, 45, 2, 320-7 (August 1999). Das Vergleichsmaterial war autologes Perikranium. Die Epidermis, alle zellulären Komponenten und andere potenziell antigenischen oder infektiösen Elemente wurden in dem Herstellungsverfahren chemisch entfernt. Die Kollagenfasern und die strukturelle Architektur der Haut wurden unverändert bewahrt. Es wurde berichtet, dass das Produkt der Gegenwart einer schwachen zellulären Reaktion schnell in die Dura einbezogen wurde. Eindringende Fibroblasten wurden vorzugsweise an der Implantationsstelle festgestellt. Es ist beschrieben, dass das Transplantat und die ursprüngliche Dura Mater am Ende der Studie 6 Monate nach der Operation kaum unterscheidbar waren.

[0016] Nach dem Erhalt dieser Ergebnisse haben Warren et al. (2000) AlloDerm® (Lifecell Corp., The Woodlands, TX) als Dura-Ersatz in Menschen untersucht, *Neurosurgery* 46(6), 1391-96 (2000). Zweihundert Patienten erhielten während der Studie eine AlloDerm-Dura-Transplantation. Dieses Material wird aus menschlicher Lederhaut erhalten. Es ist beschrieben, dass das Herstellungsverfahren mit demjenigen für XenoDerm identisch ist, wobei eine azelluläre Kollagen-Biomatrix erzeugt wird, die Haupthistokompatibilitätskomplex-Antigen-frei (MHC-Antigen-frei) ist. Sieben der 200 Patienten entwickelten postoperative Komplikationen, wie z.B. eine Infektion und eine Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeitsfistel (CSF-Fistel), jedoch wurde beschrieben, dass keiner dieser Vorfälle durch das Transplantat selbst verursacht worden ist. Es ist beschrieben, dass eine chirurgische Nachsorge zeigte, dass keiner dieser Patienten Anhaftungen oder Abstoßungsreaktionen an der Stelle des Dura-Transplantats aufwies. Es ist beschrieben, dass das Material bei einer makroskopischen Untersuchung der umgebenden Dura sehr stark ähnelt. Langzeitstudien Daten bezüglich dieses Produkts stehen noch nicht zur Verfügung.

[0017] Filippi et al. (2001) haben Experimente bezüglich der Verwendung von Lösungsmittelkonserviertem, gamma-sterilisierten Rinderperikard (Tutopatch®, Tutogen Medical GmbH, Neunkirchen, Deutschland) als Dura-Ersatz in 32 Personen beschrieben, Filippi et al., *Neurosurg. Rev.*, 24, 103-107 (2001). Es ist beschrieben, dass der postoperative Verlauf in allen Patienten bis auf einen ereignislos war, der kurz nach der Operation aus Herzgründen starb. Das Transplantat wurde als einfach handhabbar, dauerbeständig und kostengünstig beschrieben. Langzeitstudien Daten, die mögliche spät auftretende Komplikationen ausschließen, stehen noch nicht zur Verfügung.

[0018] Collins et al. (1991), *J. Biomed. Mat. Res.* 25, 267-276, beschreiben ein vernetztes, rekonstituiertes Kollagenprodukt zur Verwendung als Dura-Ersatz.

[0019] WO 02/22184 (Organogenesis Inc.) beschreibt ein vernetztes Wundverbandprodukt zum Wiederherstellen von Wunden wie z.B. Geschwüren.

[0020] US 6,312,447 (Bio-Vascular Inc.) beschreibt ein dezellularisiertes Produkt, das aus der Haut menschlicher Leichen hergestellt worden ist, zur Verwendung als Dura-Ersatz.

[0021] Kollagenprodukte sind zur Verwendung als Biomaterial bei vielen Gelegenheiten geeignet: Die chemotaktische Wechselwirkung, die sie eingehen, erleichtert ein schnelles Infiltrieren von Endothelzellen und von Fibroblasten, die wiederum neue Kollagenfasern erzeugen und abscheiden, und eine begleitende begrenzte lymphozytische Entzündungsreaktion in umgebenden Strukturen fördert die Absorption der Kollagenbiomatrix. Kollagen weist auch hämostatische Eigenschaften auf, die therapeutisch eingesetzt werden. Plättchen selbst scheiden sich auf der Kollagenstruktur ab, zerfallen und setzen dabei Gerinnungsfaktoren frei, die eine Fibrinbildung in Verbindung mit Plasmafaktoren erleichtern.

[0022] Bekannte Dura-Ersatzmaterialien und verwandte Verfahren der Verwendung solcher Materialien können keinen flüssigkeitsdichten, resorbierbaren Dura Mater-Ersatz bereitstellen, der eine Einkapselung, eine Dura-Narbenbildung oder ein Anhaften an zerebralem Gewebe vermeidet, und der ferner ein geringes Risiko der Übertragung von Keimen, Viren und Prionen aufweist, die eine spongiforme Enzephalitis oder andere Krankheiten verursachen können. Ein idealer Dura Mater-Ersatz sollte keine Immunabwehrreaktion oder Entzündung erzeugen und muss nicht-toxisch sein. Er sollte schnell absorbiert werden und gleichzeitig den Aufbau einer Bindegewebsarchitektur ermöglichen, so dass sich eine endogene Neodura entwickelt. Das Transplantat sollte während dieses Verfahrens nicht an zerebralem Gewebe oder Knochen anhaften oder mit diesem verschmelzen. Das Material sollte reißfest sein, dessen Form beibehalten und einem Durchdringen von Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit widerstehen. Der Dura Mater-Ersatz sollte auch volumen- und formstabil

sein, wobei er einer Ausdehnung oder einer Kontraktion nach der Implantation widersteht. Andere wichtige Kriterien sind eine Viren- und Prionensicherheit, eine Anwenderfreundlichkeit und wirtschaftliche Herstellungskosten.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0023] Unter den verschiedenen Aspekten der vorliegenden Erfindung ist daher ein Aspekt die Bereitstellung eines Dura Mater-Ersatzmaterials, das resorbierbar, flüssigkeitsdicht, elastisch, volumen- und formstabil ist, und das ein hervorragendes Sicherheitsprofil bezüglich des Risikos einer Krankheitsübertragung bereitstellt.

[0024] Die vorliegende Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Wiederherstellung und/oder Regeneration von Dura Mater-Gewebe in einem Säuger. Das Dura Mater-Gewebe wird mit einer Kollagenfolie eines Equiden in Kontakt gebracht, die eine Biomatrix aus Kollagenfibrillen umfasst. Die Kollagenfolie eines Equiden wird durch ein Verfahren gebildet, bei dem eine Suspension von Kollagenfibrillen ausgefällt wird, um eine mehrschichtige Folie aus Kollagenfibrillen zu bilden, und bei dem die Kollagenfibrillen nicht durch Chemikalien oder Strahlung vernetzt werden.

[0025] In einem anderen Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Wiederherstellung von Dura Mater-Gewebe in einem Säuger, umfassend das Inkontaktbringen des Dura-Mater-Gewebes mit einer im Wesentlichen nicht-porösen Kollagenfolie eines Equiden, die eine nicht natürlich vorkommende mehrschichtige Biomatrix aus Kollagenfibrillen umfasst, wobei die Kollagenfolie eines Equiden im Wesentlichen aus azellulären Komponenten besteht, und wobei die Kollagenfibrillen nicht durch Chemikalien oder Strahlung vernetzt sind.

[0026] In einem anderen Aspekt betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Wiederherstellung und/oder Regeneration von Dura Mater-Gewebe in einem Säuger, umfassend das Inkontaktbringen des Dura-Mater-Gewebes mit einer im Wesentlichen nicht-porösen Kollagenfolie eines Equiden, die im Wesentlichen aus einer mehrschichtigen Kollagen-Biomatrix besteht, wobei die Kollagen-Biomatrix nicht durch Chemikalien oder Strahlung vernetzt ist.

[0027] Andere Aspekte und Merkmale dieser Erfindung sind zum Teil offensichtlich und werden zum Teil nachstehend dargestellt.

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0028] [Fig. 1](#) ist eine SEM-Photographie (Rasterelektronenmikroskop-Photographie), welche die Oberfläche einer trockenen Kollagenfolie eines Equiden veranschaulicht. Die Kollagenfibrillen sind deutlich veranschaulicht. Aus der Abbildung ergibt sich, dass die Oberfläche im Wesentlichen nicht porös ist.

[0029] [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) sind Photographien, die unter ESEM-Bedingungen (Environmental-Rasterelektronenmikroskopie-Bedingungen) aufgenommen worden sind, d.h. unter nahezu natürlichen Bedingungen in einer geringfügig feuchten Atmosphäre, und veranschaulichen die obere Oberfläche, von der Seite her betrachtet, einer Kollagenfolie eines Equiden. Aus den Photographien ergibt sich, dass im Wesentlichen keine Porosität vorliegt.

[0030] [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#) sind Photographien, die unter ESEM-Bedingungen aufgenommen worden sind und veranschaulichen die untere Oberfläche einer Kollagenfolie eines Equiden. Kollagenfibrillen sind in der [Fig. 3A](#) veranschaulicht. Aus den Abbildungen ergibt sich, dass die Oberfläche im Wesentlichen nicht porös ist.

[0031] [Fig. 4](#) ist eine SEM-Photographie, welche die Oberfläche einer hydratisierten Kollagenfolie eines Equiden veranschaulicht. Die Kollagenfibrillen sind in der [Fig. 4](#) deutlich veranschaulicht. Aus der Abbildung ergibt sich, dass die Oberfläche im Wesentlichen nicht porös ist.

[0032] [Fig. 5A](#), [Fig. 5B](#) und [Fig. 5C](#) sind Photographien, die unter ESEM-Bedingungen (feuchte Atmosphäre) aufgenommen worden sind und veranschaulichen den Querschnitt einer Kollagenfolie eines Equiden. Das Material zeigt eine Struktur wie ein Stapel von Blättern, die sehr eng anliegend gepackt sind. In der Abbildung sind Zwischenräume zwischen den Kollagenschichten gezeigt.

[0033] [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) sind SEM-Photographien, die den Querschnitt einer trockenen Kollagenfolie eines Equiden veranschaulichen. In den Abbildungen sind mehrere Schichten aus Kollagen und Zwischenräume

zwischen den Kollagenschichten veranschaulicht.

[0034] [Fig. 7](#) ist eine Photographie, die einen intraoperativen Aspekt eines linksseitigen Dura-Defekts nach dem Einsetzen einer Kollagenfolie eines Equiden veranschaulicht, wobei die umgebenden Dura-Kanten mit Blutgerinnseln bedeckt sind.

[0035] [Fig. 8](#) ist eine Photographie, die einen Trichrom-gefärbten mikroskopischen Überblick (Frontalschnitt) der Operationsstelle veranschaulicht, der kortikale Strukturen und die darüber liegende Dura Mater mit beiden Transplantaten zeigt (Kollagenfolie eines Equiden auf der rechten Seite; Tutoplast®-Dura auf der linken Seite) (Vergrößerung 8×).

[0036] [Fig. 9](#) ist eine Photographie, die Dura Mater-Transplantate acht Wochen nach der Operation veranschaulicht. Auf der linken Seite sieht das Tutoplast®-Dura-Transplantat aus Leichen-Dura mit deutlich sichtbaren Kanten unverändert aus. Restliche Teile der dünnen Bindegewebsmembran, die das Transplantat bedecken, sind sichtbar. Auf der rechten Seite sieht das Kollagenfolienbiomatrix-Transplantat eines Equiden so aus, dass es vollständig in die umgebende Dura einbezogen ist. Die dunklen Flecken werden durch kleine Blutgerinnselrückstände innerhalb der Neodura verursacht.

[0037] [Fig. 10](#) ist eine Photographie, die einen makroskopischen Aspekt des Kollagenfolienbiomatrix-Transplantats eines Equiden, das auf den Kortex gerichtet ist, acht Wochen nach der Operation veranschaulicht. Das Transplantat erscheint glatt, mobil und vollständig in die umgebende Dura einbezogen. Es sind keine kortikalen Läsionen sichtbar.

[0038] [Fig. 11](#) ist eine Photographie, die einen makroskopischen Aspekt des Tutoplast®-Dura-Transplantats aus Leichen-Dura, das auf den Kortex gerichtet ist, acht Wochen nach der Operation veranschaulicht. Das Transplantat sieht glatt und homogen aus, jedoch liegen keine Anzeichen für ein Einziehen des Transplantats vor. Kortikomeningeale Anhaftungen liegen nicht vor.

[0039] [Fig. 12](#) ist eine Photographie, die zwei vielkernige Riesenzellen mit intrazellulären Fragmenten des Kollagenfolienbiomatrix-Transplantats eines Equiden zwei Wochen nach der Operation veranschaulicht (Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung); Vergrößerung 800×).

[0040] [Fig. 13](#) ist eine Photographie, die Fibroblasten und phagozytische Zellen veranschaulicht, die das Kollagenfolienbiomatrix-Transplantat eines Equiden vier Wochen nach der Operation infiltriert haben. Neokapillaren mit Erythrozyten sind ebenfalls sichtbar (HE-Färbung, Vergrößerung 600×).

[0041] [Fig. 14](#) ist eine Photographie, die Fragmente des Kollagenfolienbiomatrix-Transplantats eines Equiden vier Wochen nach der Operation veranschaulicht, die von phagozytischen Zellen und einer schwachen lymphozytischen Entzündung umgeben sind (HE-Färbung, Vergrößerung 600×).

[0042] [Fig. 15](#) ist eine Photographie, welche die Tutoplast®-Dura aus Leichen-Dura vier Wochen nach der Operation veranschaulicht. Die Leichen-Dura zeigt minimale Anzeichen einer zellulären Infiltration oder Transplantat-Remodellierung. Eine dichte lymphozytische Reaktion findet sich oberhalb und unterhalb des Transplantats (HE-Färbung, Vergrößerung 250×).

[0043] [Fig. 16](#) ist eine Photographie eines mikroskopischen Aspekts der Neodura acht Wochen nach der Operation, die neu gebildete Schichten aus Kollagenfasern, Fibroblasten und Rückstände des Kollagenfolienbiomatrix-Transplantats eines Equiden veranschaulicht (Trichrom-Färbung, Vergrößerung 150×).

[0044] [Fig. 17](#) ist eine Photographie eines mikroskopischen Aspekts der Neodura sechzehn Wochen nach der Implantierung der Kollagenfolie eines Equiden, die dichte Kollagenfasern und neu gebildete Kapillaren, die mit Erythrozyten gefüllt sind, veranschaulicht (van Gieson-Färbung, Vergrößerung 200×).

[0045] [Fig. 18](#) ist eine Zeichnung, welche die Testvorrichtung veranschaulicht, die zur Messung der Wasserdichtigkeit, der Zugfestigkeit und der Elastizität/Flexibilität des Dura Mater-Ersatzmaterials verwendet wurde. Das Ausmaß der Konvexität des Materials, das sich aus einer spezifischen Wassersäulenhöhe ergab, wurde gemessen, um das Elastizitäts/Flexibilitätsniveau zu messen. Die durch die Testmaterialien gedrückte Wassermenge wurde gemessen, um die Wasserdichtigkeit zu testen.

[0046] [Fig. 19](#) ist ein Graph, der das Ausmaß der Konvexität einer Kollagenfolie eines Equiden (Kollagenge-

halt: 5,6 mg/cm²) gegen einen erhöhten hydrostatischen Druck (Wassersäulenhöhen) zeigt.

[0047] [Fig. 20](#) ist ein Graph, der das Ausmaß der Konvexität einer Kollagenfolie (Kollagengehalt: 4 mg/cm²) gegen einen erhöhten hydrostatischen Druck (Wassersäulenhöhen) zeigt.

[0048] [Fig. 21](#) ist ein Graph, der das Ausmaß der Konvexität von DuraGen gegen einen erhöhten hydrostatischen Druck (Wassersäulenhöhen) zeigt. DuraGen riss bei einem hydrostatischen Druck von 200 cm H₂O.

[0049] [Fig. 22](#) ist ein Graph, der das Ausmaß der Konvexität mehrerer Dura Mater-Ersatzprodukte gegen einen erhöhten hydrostatischen Druck (Wassersäulenhöhen) zeigt.

[0050] [Fig. 23](#) ist ein Graph, der das Ausmaß der Konvexität und des Wasserverlusts einer Kollagenfolie eines Equiden (Kollagengehalt: 5,6 mg/cm²) gegen einen erhöhten hydrostatischen Druck (Wassersäulenhöhen) zeigt.

[0051] [Fig. 24](#) ist ein Graph, der das Ausmaß der Konvexität und des Wasserverlusts einer Kollagenfolie (Kollagengehalt: 4 mg/cm²) gegen einen erhöhten hydrostatischen Druck (Wassersäulenhöhen) zeigt.

[0052] [Fig. 25](#) ist ein Graph, der das Ausmaß der Konvexität und des Wasserverlusts von DuraGen gegen einen erhöhten hydrostatischen Druck (Wassersäulenhöhen) zeigt.

[0053] [Fig. 26](#) ist ein Graph, der das Ausmaß der Konvexität und des Wasserverlusts mehrerer Dura Mater-Ersatzprodukte gegen einen erhöhten hydrostatischen Druck (Wassersäulenhöhen) zeigt.

[0054] [Fig. 27](#) ist ein Graph, der die Reißfestigkeit/äußerste Zugkraft verschiedener Kollagenenthaltender Implantate zeigt. Die Probe E ist eine Kollagenfolie eines Equiden.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0055] Erfindungsgemäß wurde überraschenderweise gefunden, dass eine im Wesentlichen nicht poröse Folie, die Kollagenfibrillen eines Equiden in einer nicht natürlich vorkommenden Biomatrix umfasst, als resorbierbarer Dura Mater-Ersatz für eine Dura-Wiederherstellung, -Regeneration und -Rekonstruktion in Säugern, einschließlich Menschen, Labortieren und dergleichen effektiv verwendet werden kann. Die erfindungsgemäße Kollagenfolie eines Equiden ist flüssigkeitsdicht und stellt sehr gute Sicherheitsmerkmale gegen das Risiko einer Übertragung von Viren oder Prionen bereit. Darüber hinaus ist die Kollagenfolie eines Equiden flexibel und elastisch, während sie eine hohe Zugfestigkeit beibehält. Diese Folie, die nachstehend als „Kollagenfolie eines Equiden“ bezeichnet wird, entspricht, wenn sie implantiert wird, bezüglich wichtiger Eigenschaften der menschlichen Dura Mater. Die Kollagenfolie eines Equiden dient als Biomatrixgerüst für das zelluläre Einwachsen in vivo und wird während der Regeneration und Rekonstruktion durch eine Neodura ersetzt.

[0056] In einer Ausführungsform umfasst die Biomatrix der Kollagenfolie eines Equiden Bindegewebsproteine, die im Wesentlichen aus Kollagenfibrillen bestehen. Vorzugsweise umfasst die Biomatrix der Kollagenfolie eines Equiden Bindegewebsproteine, die aus Kollagenfibrillen bestehen. Mehr bevorzugt umfasst die Biomatrix der Kollagenfolie eines Equiden Bindegewebsproteine, die aus Typ I-Kollagenfibrillen bestehen.

[0057] Die Kollagenfolie eines Equiden kann zusätzlich dazu, dass sie Kollagenfibrillen umfasst, ferner ein Mittel, ein Konservierungsmittel, einen Wachstumsfaktor oder ein Additiv, welches die Flexibilität und die Elastizität des Endprodukts unterstützt, umfassen.

Kollagenfolie eines Equiden

[0058] Die erfindungsgemäße Kollagenfolie eines Equiden ist eine Biomatrix aus Kollagenfibrillen, die behandelt worden ist, um zelluläre Komponenten zu entfernen und ein Blatt aus Kollagenfibrillen zu bilden.

[0059] Die Kollagenfolie eines Equiden, die in einer erfindungsgemäßen Ausführungsform verwendet wird, ist eine nicht natürlich vorkommende mehrschichtige Kollagenmembran, die aus vielen, in mehreren Richtungen ineinander greifenden Kollagenfibrillen besteht. Eine Veranschaulichung der trockenen Kollagenfolie eines Equiden ist in der [Fig. 1](#) gezeigt. Die Photomikrographie (SEM) veranschaulicht die Oberfläche der Kollagenfolie eines Equiden, in die Kollagenfibrillen eingebettet sind. In den [Fig. 2A](#) und [Fig. 2B](#) ist eine Photographie der oberen Oberfläche der Kollagenfolie eines Equiden unter ESEM-Bedingungen (Environmental-Rastere-

lektronenmikroskopie-Bedingungen) gezeigt, wobei eine geringfügig feuchte Atmosphäre nahezu natürliche Bedingungen bereitstellt. Die Kollagenfibrillen sind auf der Oberfläche sichtbar. Die Oberfläche erscheint glatt und im Wesentlichen nicht porös. Photographien (ESEM) der unteren Oberfläche der Kollagenfolie eines Equiden sind in den [Fig. 3A](#) und [Fig. 3B](#) gezeigt. Die Photographie der unteren Oberfläche veranschaulicht auch die im Wesentlichen fehlende Porosität der Kollagenfolie eines Equiden.

[0060] Vor der Verwendung der Kollagenfolie eines Equiden zur Wiederherstellung eines Dura Mater-Gewebes eines Säugers kann die trockene Kollagenfolie eines Equiden hydratisiert werden. Die [Fig. 4](#) ist eine SEM-Photographie, welche die Oberfläche einer hydratisierten Kollagenfolie eines Equiden veranschaulicht, wobei Kollagenfibrillen deutlich gezeigt sind. Aus der Abbildung ergibt sich, dass die Oberfläche im Wesentlichen nicht porös ist.

[0061] Die spezielle Ausrichtung der Kollagenfasern in zweidimensionalen Richtungen in den mehreren Schichten ist in erster Linie für die Flüssigkeitsdichtigkeit selbst unter einem hohen hydrostatischen Druck verantwortlich und stellt eine hohe Festigkeit mit einer hohen Elastizität bereit. Aufgrund der zahlreichen, parallel ausgerichteten dünnen Kollagenfibrillenschichten der Kollagenfolie eines Equiden ist dieses Material für einen vorübergehenden Ersatz der körpereigenen Dura Mater zum Bedecken des Defekts nach der Implantierung geeignet, um ein flüssigkeitsdichtes Verschließen einer Leckage von Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit zu erreichen, und es stellt ein Biomatrixgerüst für ein Einwachsen von Zellen zur Bildung einer Neodura bereit. Diese Eigenschaft ist beim Wundheilungsprozess wichtig, da sie das Risiko des Patienten vermindert, den Zustand einer Liquorrhoe zu entwickeln.

Struktur und Resorptionseigenschaften der Kollagenfolie eines Equiden

[0062] Die Kollagenfolie eines Equiden kann von dem Säuger, in den sie implantiert ist, resorbiert werden. Es wird angenommen, dass diese Eigenschaft durch die Struktur der Kollagenfolie eines Equiden verstärkt wird. Das Verfahren, das zur Herstellung der Kollagenfolie eines Equiden eingesetzt wird, bildet gestapelte Schichten von Kollagenfibrillen. Zwischen jeder Schicht befinden sich Zwischenräume, in die Zellen und Gefäße des Patienten wandern und Neodura-Gewebe bilden können.

[0063] Jede Schicht von Kollagenfibrillen ist im Wesentlichen nicht porös. Die wenigen Poren, die vorliegen können, sind typischerweise voneinander isoliert und stehen durch mehrere Schichten von Kollagenfibrillen nicht miteinander in Verbindung. Die mehrschichtige Struktur der vorliegenden Erfindung verstärkt die Eigenschaften der Flüssigkeitsdichtigkeit der Kollagenfolie eines Equiden. Die Rasterelektronenmikroskop-Abbildungen der [Fig. 1](#) bis [Fig. 4](#) veranschaulichen die nicht-poröse Natur der Kollagenfolie eines Equiden.

[0064] Während die Kollagenfolie eines Equiden im Wesentlichen nicht porös ist, liegen zwischen den Schichten von Kollagenfibrillen Zwischenräume vor. Die Zwischenräume und die schichtartigen Eigenschaften sind in den [Fig. 5A](#), [Fig. 5B](#) und [Fig. 5C](#) gut sichtbar, bei denen es sich um Querschnittsphotographien der Kollagenfolie eines Equiden unter ESEM-Bedingungen (feuchte Atmosphäre) handelt. Die [Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#) sind SEM-Photographien der trockenen Kollagenfolie eines Equiden. Folglich ist die Kollagenfolie eines Equiden zu einem Stapel von Blättern analog, wobei jedes Blatt im Wesentlichen glatt und nicht porös ist, wobei sich zwischen jedem Blatt ein Zwischenraum befindet. Wenn die Kollagenfolie eines Equiden in der trockenen Form vorliegt ([Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#)), sind die Zwischenräume ausgeprägter. Die Zwischenräume werden kleiner, wenn die Kollagenfolie eines Equiden unter nahezu natürlichen Bedingungen in einer geringfügig feuchten Atmosphäre betrachtet wird. Die [Fig. 5A](#), [Fig. 5B](#) und [Fig. 5C](#) sind Abbildungen von Querschnitten einer Kollagenfolie eines Equiden in einer feuchten Atmosphäre, wobei die Verkleinerung der Zwischenräume der Kollagenfolie eines Equiden veranschaulicht ist.

[0065] Zusätzlich zur Förderung der Eigenschaften der Flüssigkeitsdichtigkeit dienen die vielen parallel ausgerichteten dünnen Kollagenfibrillenschichten der Kollagenfolie eines Equiden gleichzeitig als Biomatrixgerüst zum Einwachsen von Zellen für einen Neuaufbau der körpereigenen Dura. Bisher wurde üblicherweise angenommen, dass eine poröse Gerüststruktur erforderlich ist, um das Einwachsen von autonomem Gewebe und autonomen Gefäßen in ein Dura Mater-Ersatzgewebe zu fördern. Es wurde überraschenderweise gefunden, dass die nicht poröse, geschichtete Struktur der Kollagenfolie eines Equiden das Einwachsen von Zellen, von Gefäßen und die Bildung neuer Kollagenstrukturen über die Kollagenfolie eines Equiden und in den Zwischenräumen, die zwischen ihren mehreren Schichten vorliegen, fördert, wodurch eine Neodura mit einer typischen Schichtstruktur einer natürlichen Dura innerhalb von Wochen nach der Implantierung gebildet wird. Wie es weiter unten und im Beispiel 1 beschrieben ist, ist das Einwachsen von Zellen, Gefäßen und einer neuen Kollagenstruktur so ausgedehnt, dass die Neodura innerhalb von Wochen nach der Operation nur schwer von dem

in einem Patienten vorher vorhandenen Dura Mater-Gewebe unterschieden werden kann. Etwa vier bis acht Wochen nach der Operation beträgt die zelluläre Organisation meningealer Zellen etwa 40% bis 70%. Nach etwa sechzehn Wochen ist das Transplantat vollständig organisiert (100%).

[0066] Tierversuche zeigen eine schnelle zelluläre Infiltration in den Bereich der mehrschichtigen Kollagenfolie eines Equiden. Histologisch wurde eine dichte Infiltration der Kollagen-Biomatrix mit Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten innerhalb von 14 Tagen nach der Implantierung festgestellt. Kapillaren bilden sich in dem Transplantat zu einem späteren Zeitpunkt. Ein kontinuierlicher Übergang zwischen der Kollagenfolie eines Equiden und der umgebenden Dura aufgrund einer Neogenese von Kollagenfasern ist deutlich erkennbar. Nach nur 4 Wochen ist die Kollagenfolie eines Equiden partiell durch körpereigenes, lose strukturiertes Gewebe ersetzt. Nach 24 Wochen ist es schwierig, die vorher vorliegende Dura des Patienten von der neu gebildeten, Neodura-artigen Bindegewebsarchitektur zu unterscheiden, welche die Kollagenfolie eines Equiden in dem defekten Bereich ersetzt.

Krankheitsübertragung/Immunreaktion

[0067] Ein signifikanter Nutzen der Verwendung der erfindungsgemäßen Kollagenfolie eines Equiden ist das sehr geringe Risiko der Übertragung einer Krankheit auf einen Patienten, in den sie implantiert wird. Das Herstellungsverfahren, in dem die Kollagenfibrillen mit Säuren (z.B. mit Chlorwasserstoffsäure, Essigsäure und dergleichen) und Basen, wie z.B. Natriumhydroxid, behandelt werden, um die Kollagenfolie eines Equiden zu erzeugen, wirkt in nützlicher Weise dahingehend, dass das infektiöse Niveau von Bakterien, Viren und Prionen, die vorliegen können, inaktiviert oder vermindert wird. Die Behandlung von Biomaterial mit Chlorwasserstoffsäure, Natriumhydroxid, Ethylenoxid (ETO) und dergleichen wurde von Behörden als zulässiges Verfahren in Arzneistoff- und Biomaterialverordnungen zur Inaktivierung von Prionen und Viren anerkannt. Eine solche Behandlung kann bei manchen Verordnungen die vorgeschriebenen Anforderungen zum Testen der Kollagenfolie eines Equiden auf einer Charge-zu-Charge-Basis erleichtern. Folglich erhöht die Behandlung der Kollagenfibrillen während des Herstellungsverfahrens die Produktsicherheit und vermindert das Risiko einer Krankheitsübertragung auf einen Patienten.

[0068] Bezüglich des Materials eines Equiden, das dem vorstehend beschriebenen Herstellungsverfahren unterworfen worden ist, ist nicht bekannt, dass es irgendwelche Pathogene auf Patienten überträgt. Zusätzlich zu dem Herstellungsverfahren vermeidet deshalb die Verwendung von Kollagen auf Equidenbasis ferner die Risiken einer Übertragung einer spongiformen Enzephalitis, die bisher mit Ersatzmaterialien von menschlichen Leichen zusammenhing. Die Verwendung von Kollagen, das von einem Equiden stammt, wie z.B. Kollagen, das von Achillessehnen eines Equiden stammt, vermeidet die Risiken der Übertragung einer übertragbaren spongiformen Enzephalopathie (TSE), die auch als bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE) oder Scrapie bekannt ist. Die Übertragung dieser Krankheit hing mit der Verwendung von biologischem Material zusammen, das von Wiederkäuer-Quellen erhalten worden ist (z.B. von biologischem Material von Rindern, Ziegen, Schafen und dergleichen).

[0069] Die erfindungsgemäße Kollagenfolie eines Equiden, bei der das Kollagen von einem Equiden stammt und behandelt worden ist (z.B. mit Enzymen), vermindert zusätzlich das Risiko des Auslösens einer Immunreaktion. Während mehr als zehn Jahren, in denen Kollagen auf Equidenbasis in Gewebeersatzverfahren verwendet worden ist (für Gewebe, die von Dura Mater verschieden sind), wurden keine Immunreaktionen beschrieben.

[0070] Die von einem Equiden stammende Kollagenfolie resultiert auch in einer verminderten Entzündungsreaktion. Verglichen mit Dura Mater-Ersatzmaterialien, die Kollagen enthalten, das von Quellen wie z.B. einer menschlichen Oberschenkelkelfaszie abgeleitet ist, ist die Anzahl entzündlicher Zellen, die aus der Implantierung des Kollagenfolienersatzes eines Equiden resultieren, signifikant geringer. Die entzündlichen Vorgänge, die durch die Implantierung der Kollagenfolie eines Equiden ausgelöst werden, halten verglichen mit Dura Mater-Ersatzmaterialien, die von anderen Quellen abgeleitet sind, viel weniger lang an. Diese Eigenschaften vermindern das Risiko einer Transplantatabstoßung der Kollagenfolie eines Equiden durch das Immunsystem eines Patienten signifikant, wodurch der Erfolg neurochirurgischer Verfahren, die einen Dura Mater-Ersatz erfordern, verbessert wird.

Volumen/Größenstabilität

[0071] Wenn sich ein Dura Mater-Ersatz bei der Hydratisierung signifikant ausdehnt oder zusammenzieht, können Probleme auftreten. Poröse Dura Mater-Kollagensersatzprodukte des Standes der Technik neigten in

einigen Fällen nach der Hydratisierung zu einer signifikanten Schrumpfung. In solchen Fällen kann das Dura Mater-Ersatzmaterial an Nähten zerren, die es an die Dura Mater des Patienten anheften, wodurch eine Schädigung des Implantats und der autologen Dura Mater und der chirurgischen Stelle verursacht wird. Andere Komplikationen umfassen einen Druck, der an der chirurgischen Stelle ausgeübt wird, wenn sich das Dura Mater-Ersatzmaterial nach der Implantierung weiter ausdehnt, wodurch ein unerwünschter Druck auf angrenzendes neurologisches Gewebe ausgeübt wird.

[0072] Die Volumenänderung der erfindungsgemäßen Kollagenfolie eines Equiden ist bei der Hydratisierung gering oder vernachlässigbar. Im Gegensatz zu porösen Ersatzprodukten behält die Kollagenfolie eines Equiden nach der Hydratisierung im Wesentlichen ihre Größe und Form bei, weist eine hervorragende Formstabilität auf, bleibt selbst nach der Hydratisierung biologisch stabil und verursacht keine Probleme eines Quellens oder Schrumpfens im Gehirn nach der Implantierung. Sobald die Kollagenfolie eines Equiden hydratisiert und implantiert worden ist, findet bei der Kollagenfolie eines Equiden bezüglich der Fläche oder der Dicke keine signifikante Expansion oder Kontraktion in einem Ausmaß statt, das chirurgische Nähte zerreißen würde oder Fibrinkleberversiegelungsstellen auseinanderreißen würde, welche die Kollagenfolie eines Equiden an der Dura Mater des Patienten halten.

[0073] In einer Ausführungsform kann das Schrumpfen oder Quellen der Fläche der trockenen Kollagenfolie eines Equiden von etwa -5% bis etwa 20% variieren, wenn sie vollständig hydratisiert ist. In einer anderen Ausführungsform kann die Fläche der trockenen Kollagenfolie eines Equiden zwischen etwa -5% bis etwa 10% variieren, wenn sie vollständig hydratisiert ist. In einer anderen Ausführungsform variiert die Fläche der trockenen Kollagenfolie eines Equiden zwischen etwa -5% bis etwa 5%, wenn sie vollständig hydratisiert ist. In einer anderen Ausführungsform nimmt die Fläche der trockenen Kollagenfolie eines Equiden nach der vollständigen Hydratisierung um nicht mehr als etwa 4% zu.

[0074] In einer Ausführungsform nimmt die Dicke der Kollagenfolie eines Equiden auf etwa das 4-fache ihrer Trockendicke zu, wenn sie vollständig hydratisiert ist. In einer anderen Ausführungsform nimmt die Dicke der Kollagenfolie eines Equiden auf etwa das 3-fache ihrer Trockendicke zu, wenn sie vollständig hydratisiert ist. In einer anderen Ausführungsform nimmt die Dicke der Kollagenfolie eines Equiden auf etwa das Doppelte ihrer Trockendicke zu, wenn sie vollständig hydratisiert ist.

[0075] Die Dicke der Dura eines erwachsenen Menschen variiert von etwa 0,5 mm an der Schädelbasis bis zu etwa 2,0 mm. Die Dicke der Dura Mater kann auch abhängig vom Alter des Patienten variieren, wobei bei Kleinkindern und jungen Kindern typischerweise erwartet wird, dass sie ein dünneres Dura Mater-Gewebe aufweisen als Erwachsene. Die Dicke der erfindungsgemäßen Kollagenfolie eines Equiden kann so eingestellt werden, dass sie für den gewünschten Bereich der Anwendung und den behandelten Patienten variiert.

[0076] In einer Ausführungsform weist die erfindungsgemäße Kollagenfolie eines Equiden in trockener Form eine Dicke zwischen etwa 0,01 mm bis etwa 3,0 mm auf. In einer anderen Ausführungsform weist die Kollagenfolie eines Equiden eine Dicke zwischen etwa 0,02 mm bis etwa 2,0 mm auf. In einer anderen Ausführungsform weist die Kollagenfolie eines Equiden eine Dicke zwischen etwa 0,03 mm bis etwa 1,5 mm auf. In einer anderen Ausführungsform weist die Kollagenfolie eines Equiden eine Dicke zwischen etwa 0,05 mm bis etwa 1 mm auf. In einer anderen Ausführungsform weist die Kollagenfolie eines Equiden eine Dicke von etwa 1,0 mm oder weniger auf.

[0077] Das Trockengewicht der Kollagenfolie eines Equiden hängt von ihrer gewünschten Dicke ab. In einer Ausführungsform liegt das Trockengewicht der Kollagenfolie eines Equiden zwischen etwa 1 mg/cm² bis etwa 50 mg/cm². In einer anderen Ausführungsform liegt das Trockengewicht der Kollagenfolie eines Equiden zwischen etwa 1,5 mg/cm² bis etwa 30 mg/cm². In einer anderen Ausführungsform liegt das Trockengewicht der Kollagenfolie eines Equiden zwischen etwa 2 mg/cm² bis etwa 20 mg/cm². In einer anderen Ausführungsform liegt das Trockengewicht der Kollagenfolie eines Equiden zwischen etwa 2,5 mg/cm² bis etwa 15 mg/cm². In einer anderen Ausführungsform liegt das Trockengewicht der Kollagenfolie eines Equiden zwischen etwa 3 mg/cm² bis etwa 10 mg/cm².

[0078] In einer Ausführungsform nimmt das Gewicht der Kollagenfolie eines Equiden bei der Hydratisierung bis auf etwa das 15-fache von dessen Trockengewicht zu. In einer anderen Ausführungsform nimmt das Gewicht der Kollagenfolie eines Equiden bei der Hydratisierung bis auf etwa das 10-fache von dessen Trockengewicht zu. In einer anderen Ausführungsform nimmt das Gewicht der Kollagenfolie eines Equiden bei der Hydratisierung bis auf etwa das 7-fache von dessen Trockengewicht zu. In einer anderen Ausführungsform nimmt das Gewicht der Kollagenfolie eines Equiden bei der Hydratisierung bis auf etwa das 5-fache von dessen Tro-

ckenzustand zu.

[0079] Um als angemessener Dura Mater-Ersatz dienen zu können, sollten die implantierten Dura Mater-Ersatzmaterialien nicht schlaft werden, sondern stattdessen selbst nach der Hydratisierung eine ziemlich hohe Stabilität/Zugfestigkeit aufweisen. Die erfindungsgemäße Kollagenfolie eines Equiden weist in vorteilhafter Weise eine hohe Zugfestigkeit auf, welche die Handhabung der Kollagenfolie eines Equiden während ihres chirurgischen Aufbringens verbessert und unterstützt, und stellt nach ihrer Implantierung einer erhöhte mechanische Stabilität bereit. In den nachstehenden Beispielen sind Vergleichsexperimente angegeben, bei denen die Zugfestigkeit der Kollagenfolie eines Equiden verglichen mit porösen Kollagenpräparaten (z.B. Kollagenschäumen) überlegen war. Zusätzlich kann die Vergrößerung der Dicke der Kollagenfolie eines Equiden die Zugfestigkeit signifikant erhöhen.

[0080] Die Neigung eines Kollagenfolienmaterials eines Equiden, unter einem ausgeübten Druck zu reißen, kann als deren „äußerste Zugbelastung“ oder „äußerste Zugkraft“ gemessen werden, die nachstehend als „äußerste Zugkraft“ bezeichnet wird. Die äußerste Zugkraft einer Kollagenfolie eines Equiden kann durch Ausüben von Druck auf einen Streifen einer Kollagenfolie eines Equiden mit einer spezifischen Breite und Bestimmen des Ausmaßes des Drucks, der in einem Versagen (z.B. einem Reißen oder Brechen) der Kollagenfolie eines Equiden resultiert, bestimmt werden. Die äußerste Zugkraft kann unter Verwendung der folgenden Gleichung quantifiziert werden:

„Äußerste Zugkraft“ = ausgeübte Kraft/Breite des Streifens der Kollagenfolie eines Equiden = Newton/cm – Streifen.

[0081] In einer Ausführungsform weist die Kollagenfolie eines Equiden eine äußerste Zugkraft zwischen etwa 1 und etwa 30 Newton/cm – Streifen, vorzugsweise zwischen etwa 1,5 und etwa 15 Newton/cm – Streifen, vorzugsweise zwischen etwa 2 und etwa 10 Newton/cm – Streifen, noch mehr bevorzugt zwischen etwa 3 und etwa 6 Newton/cm – Streifen auf.

[0082] Während die erfindungsgemäße Kollagenfolie eines Equiden eine hohe Zugfestigkeit aufweist, bleibt sie nach der Hydratisierung elastisch und flexibel. Dieses Merkmal ermöglicht es der Kollagenfolie eines Equiden, sich optimal an die anatomischen Bedingungen (z.B. Krümmungen) anzupassen, die an der Implantationsstelle vorliegen.

[0083] Wenn sich die Kollagenfolie eines Equiden im hydratisierten Zustand befindet, kann sie in der chirurgischen Stelle einfach bewegt und optimal zu der Form des Defekts, an dem sie implantiert wird, modelliert werden. Nach der Implantierung bleibt das Transplantat der Kollagenfolie eines Equiden glatt und mobil. Mit der Zeit wandern Zellen und Gefäße über die Kollagenfolie eines Equiden und ersetzen sie schließlich durch eine Dura-artige Neodura. Nach der zellulären Organisation mit meningealen Zellen haftet die Kollagenfolie eines Equiden nicht am Nerven-, Gehirn-, Schädel- oder Wirbelsäulengewebe an.

Herstellung der Kollagenfolie eines Equiden

[0084] Die erfindungsgemäße Kollagenfolie eines Equiden kann aus Suspensionen von Kollagenfibrillen mit hohem Molekulargewicht durch ein kontrolliertes Trocknungsverfahren hergestellt werden. Eine abgestufte Ausfällung der Kollagenfibrillensuspension resultiert aus einer Verdampfung von Wasser und einer gleichzeitigen pH-Wert-Erhöhung. Das kontrollierte Trocknungsverfahren resultiert in einem mehrschichtigen Aufbau einer Kollagenfolie, die von Neurochirurgen als Ersatz für menschliche Dura Mater implantiert werden kann. Der mehrschichtige Aufbau der Kollagenfolie stellt eine Anzahl der vorstehend beschriebenen Eigenschaften bereit, die in einem Dura Mater-Ersatz und als Biomatrix zur Regeneration von lebendem Dura-Gewebe nützlich sind.

[0085] In einer Ausführungsform entfernt das Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Kollagenfolie eines Equiden alle zellulären Komponenten, wobei eine Kollagenfolie eines Equiden aus Kollagenfibrillen erzeugt wird, die im Wesentlichen aus azellulären Komponenten besteht.

[0086] Unter Verwendung etablierter Verfahren der Kollagenchemie wird ein Kollagen-enthaltendes Gewebe als Ausgangsmaterial zur Herstellung der erfindungsgemäßen Kollagenfolie eines Equiden verwendet. In einer Ausführungsform werden Sehnen eines Equiden als Ausgangsmaterial verwendet. In einer weiteren Ausführungsform werden Achillessehnen eines Equiden als Ausgangsmaterial verwendet.

[0087] In einer Ausführungsform wird das Ausgangsmaterial, wie z.B. Achillessehnen eines Equiden, zuerst

zerkleinert und mindestens eine Stunde mit 1 N Natriumhydroxid behandelt und mit Chlorwasserstoffsäure neutralisiert. Das Kollagen-Ausgangsmaterial wird unter sauren Bedingungen bei pH 2 behandelt. Die verwendete Säure kann Chlorwasserstoffsäure, Essigsäure oder dergleichen sein. Anschließend werden die nicht-Kollagen-enthaltenden Proteine und intermolekular vernetzende Bindungen, die in dem Ausgangsmaterial vorliegen, mit Pepsin enzymatisch abgebaut, um eine Kollagensuspension zu bilden.

[0088] Die Suspension wird dann neutralisiert. In einer Ausführungsform wird die Suspension auf zwischen etwa pH 6,5 und etwa pH 8,0 neutralisiert. In einer anderen Ausführungsform wird die Suspension auf zwischen etwa pH 6,9 und etwa pH 7,5 neutralisiert. In einer anderen Ausführungsform wird die Suspension auf etwa pH 7 neutralisiert.

[0089] Die Kollagensuspension wird zentrifugiert, der Überstand wird entfernt und der Niederschlag wird in Essigsäure bei etwa pH 2 bis 4,5 resuspendiert. Nicht-Kollagen-enthaltende Proteine werden dadurch erfolgreich aus der Kollagensuspension entfernt.

[0090] Gegebenenfalls kann eine Wiederholung der vorstehend beschriebenen Schritte durchgeführt werden, um restliche, nicht-Kollagen-enthaltende Proteine zu entfernen, die in dem Niederschlag vorliegen.

[0091] Ein überraschendes Ergebnis des Verfahrens zur Herstellung der Kollagenfolie eines Equiden besteht darin, dass eine kontrollierte pH-Wert-Erhöhung der Kollagensuspension in Essigsäure aufgrund der spezifischen Entfernung von Wasser durch Verdampfen über einen langen Zeitraum, z.B. 24 Stunden, erreicht wird. Die angegebene Erhöhung des pH-Werts verursacht die Ausfällung der in mehreren Richtungen ineinander greifenden Kollagenfibrillen in Schichten in zweidimensionalen Richtungen unter Bildung eines mehrschichtigen Aufbaus der Kollagenfolie eines Equiden. In einer Ausführungsform wird das Verfahren in einem Trocknungssofen bei einer Temperatur von etwa 20°C bis etwa 55°C mit einer Anlage zur Entfernung von Dampf und der gleichzeitigen Dampfneutralisation von Essigsäure durchgeführt.

[0092] In einer anderen Ausführungsform wird das Verfahren in einem Trocknungssofen bei einer Temperatur von etwa 30°C bis etwa 45°C durchgeführt.

[0093] Es wird davon ausgegangen, dass die Kollagenfolie eines Equiden, die mit diesem Herstellungsverfahren erhalten wird, in der trockenen Form vorliegt, wenn kein weiterer Wasserverlust nachweisbar oder ein weiterer Wasserverlust vernachlässigbar ist. Der Wassergehalt der „trockenen Form“ der Kollagenfolie eines Equiden liegt typischerweise zwischen etwa 2 Gew.-% bis etwa 18 Gew.-%. Der relativ hohe Restwassergehalt, der in der „trockenen Form“ der Kollagenfolie eines Equiden vorliegt, verhindert oder beschränkt die Denaturierung von Kollagenmolekülen, welche die Kollagenfolie eines Equiden umfasst.

[0094] Das vorstehend beschriebene Verfahren ist für die Ausfällung der Kollagenfibrillen aus der Suspension verantwortlich, da Komponenten mit einer geringen Löslichkeit zu Beginn des Verfahrens bei einer geringen pH-Wert-Erhöhung ausfallen. Diese Technik führt zu einer Ausfällung von Kollagenfibrillen während der Wasserverdampfung und der gleichzeitigen pH-Wert-Erhöhung.

[0095] Während des Ausfällungsverfahrens werden die Kollagenfibrillen in natürlicher Weise vernetzt, wenn die Fibrillen aus der Lösung ausfallen, wobei eine Kollagenfolie gebildet wird. Anders als die Vernetzung der Kollagenfibrillen mit Chemikalien oder Strahlung (z.B. ionisierender Strahlung oder Ultraviolettstrahlung), die zu erhöhten Resorptionszeiten führen kann, fördert das Vernetzenlassen der Kollagenfibrillen in natürlicher Weise verminderte Resorptionszeiten, nachdem die Kollagenfolie eines Equiden implantiert worden ist. Die natürliche Vernetzung der Fibrillen in der Kollagenfolie, die in der Erfindung verwendet wird, findet durch natürliche, Physiologie-artige Mittel statt. In erster Linie findet diese natürliche Vernetzung mittels nicht-kovalenter Wechselwirkungen (z.B. durch van der Waals- oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen) oder durch die Bildung leicht dissoziierbarer Schiffbasen-Bindungen zwischen den Aminosäureseitenketten des Kollagenmoleküls statt. Eine intermolekulare Vernetzung von Kollagen ist für die physikalische und chemische Stabilität verantwortlich. Der Schlüsselschritt bei der Bildung von Kollagenvernetzungen hängt von der enzymatischen Umwandlung von Lysin- oder Hydroxylysinresten ab und führt zu Aldehyden, Allysin und Hydroxyallysin. Diese Aldehydgruppen reagieren spontan mit reaktiven Aminogruppen, was zur Bildung von Schiffbase-Komponenten führt, die labile Aldolkondensationsprodukte mit labilen Aldimin-Verknüpfungen (-CH=N-) enthalten. Folglich können die Fibrillen des erfindungsgemäßen Produkts durch eine Behandlung z.B. mit einer schwachen Säure dissoziiert werden. Die Vernetzung, die durch die Verwendung chemischer Vernetzungsmittel erhalten wird, kann aufgrund der Gegenwart stabiler, kovalent vernetzter Vernetzungsreste nachgewiesen werden. Gewöhnlich wird dies unter Verwendung eines Schiffbase-Reagenzes (z.B. Glutaraldehyd) zur Bildung von Schiffba-

se-Reaktionsprodukten und dann Stabilisieren der Bindungen entweder durch eine Amadori-Umlagerung oder durch reduzierende Bedingungen erreicht. Darüber hinaus kann Kollagen durch verschiedene bifunktionelle Carbodiimidreagenzien vernetzt werden. Die Vernetzung, die durch die Verwendung von Strahlung erhalten wird, kann durch die Gegenwart stabiler kovalenter Bindungen zwischen den Kollagenfibrillen nachgewiesen werden, die durch die Reaktion von freien Radikalresten verursacht werden, welche während der Bestrahlung erzeugt werden. Die Fibrillen in dem erfindungsgemäßen Produkt sind andererseits im Wesentlichen nicht mit irgendwelchen stabilen kovalenten Bindungen vernetzt und wurden nicht mit Chemikalien oder durch Bestrahlung behandelt. Folglich ist jedwede Assoziierung zwischen den Fibrillen in dem erfindungsgemäßen Produkt im Wesentlichen nicht kovalent oder leicht reversibel und die Fibrillen sind nicht stabil vernetzt. Chemikalien wie z.B. Cyanamid, Glutaraldehyd, Formaldehyd, Acrylamid, Carbodiimidione, Diimidate, Bisacrylamide und dergleichen wurden in der Vergangenheit verwendet, um Kollagenfibrillen in Dura Mater-Ersatzmaterialien chemisch zu vernetzen. Die Verwendung solcher Chemikalien kann jedoch zu Toxizitätsrisiken führen, die mit einem versehentlichen Kontaktieren von Gehirngewebe mit Chemikalienresten in einem Dura Mater-Ersatzmaterial verbunden sind. Das Ausfällungsverfahren vermeidet dadurch die Toxizitätsrisiken von Vernetzungschemikalien und längere Resorptionszeiten, die mit der Vernetzung der Kollagenfibrillen mit Chemikalien oder Strahlung verbunden sind.

[0096] Die resultierende getrocknete, ausgefällte Kollagenzusammensetzung bildet eine Kollagenfolie eines Equiden, die eine mehrschichtige Kollagenmembran mit hohem Molekulargewicht umfasst, die aus zahlreichen, in mehreren Richtungen in natürlicher Weise ineinander greifenden Kollagenfibrillen besteht. Die Kollagenfolie eines Equiden enthält in erster Linie interstitielles Typ I-Kollagen. Die Kollagenfolie eines Equiden weist im Wesentlichen keine Poren auf und ist primärflüssigkeitsdicht. Immundiffusionstests können mit dem Produkt durchgeführt werden, um die Abwesenheit von fremdem Protein zu garantieren.

[0097] Das vorstehend beschriebene Verfahren, das zur Herstellung der Kollagenfolie eines Equiden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, wird auch von der Resorba Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg, Deutschland, zur Herstellung von Kollagenfolien verwendet, die von Baxter AG, Wien, Österreich, käuflich sind. Die käuflichen Folien sind zur Verwendung als hämostatische Mittel, als temporärer Gewebeersatz, zur Bedeckung von Wunden und als Fibrin-Dichtmittelträgersubstanzen vorgesehen.

[0098] Die Dicke der Kollagenfolie eines Equiden zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung kann je nach der speziellen Anwendung variieren. Beispielsweise kann zur Wiederherstellung von pädiatrischem Dura Mater-Gewebe eine dünnere Kollagenfolie eines Equiden verwendet werden, wohingegen bei der Wiederherstellung von adultem Dura Mater-Gewebe eine dickere Kollagenfolie eines Equiden verwendet werden kann.

[0099] Die Dicke der Kollagenfolie eines Equiden kann durch Variieren des zur Herstellung einer bestimmten Größe einer Kollagenfolie eines Equiden verwendeten Ausgangsmaterials gesteuert werden.

[0100] Die Kollagenfolie eines Equiden wird mit Ethylenoxid (ETO) oder einem entsprechenden Sterilisationsgas gassterilisiert oder durch Bestrahlen sterilisiert.

Anheftungsverfahren

[0101] Vor der Verwendung kann die Kollagenfolie eines Equiden hydratisiert werden, d.h. in physiologischer Kochsalzlösung. In einer Ausführungsform umfasst die physiologische Kochsalzlösung eine 0,9%ige Natriumchloridlösung. In einer anderen Ausführungsform wird die Kollagenfolie eines Equiden in Mittel- bzw. Vehikel- oder Arzneistoff-enthaltenden Lösungen hydratisiert. Die Zeit, die zur Hydratisierung der Kollagenfolie eines Equiden erforderlich ist, hängt mit der Dicke der Folie zusammen. Die Kollagenfolie eines Equiden wird hydratisiert, bis sie über ihrer gesamten Fläche eine einheitliche Dicke aufweist. In einer Ausführungsform wird die Kollagenfolie eines Equiden zwischen etwa 5 Sekunden und etwa 1 Stunde in physiologischer Kochsalzlösung hydratisiert. In einer anderen Ausführungsform wird die Kollagenfolie eines Equiden zwischen etwa 5 Sekunden und etwa 30 Minuten in physiologischer Kochsalzlösung hydratisiert. In einer anderen Ausführungsform wird die Kollagenfolie eines Equiden zwischen etwa 5 Sekunden und etwa 20 Minuten in physiologischer Kochsalzlösung hydratisiert. In einer anderen Ausführungsform wird die Kollagenfolie eines Equiden zwischen etwa 5 Sekunden und etwa 10 Minuten in physiologischer Kochsalzlösung hydratisiert. In einer anderen Ausführungsform wird die Kollagenfolie eines Equiden zwischen etwa 1 Minute und etwa 6 Minuten in physiologischer Kochsalzlösung hydratisiert. In einer anderen Ausführungsform wird die Kollagenfolie eines Equiden etwa 5 Minuten in physiologischer Kochsalzlösung hydratisiert. In einer anderen Ausführungsform wird die Kollagenfolie eines Equiden vor der Implantierung nicht hydratisiert.

[0102] Die Kollagenfolie eines Equiden kann an die Dura Mater des Patienten mit etablierten chirurgischen Techniken angeheftet werden, wie z.B. mit einem Fibrin-Dichtmittel, mit Gewebekleber, chirurgischen Nähten oder durch chirurgische Druck-Einpass-Techniken. Alternativ kann die natürliche Anziehung zwischen der Kollagenfolie eines Equiden und Dura Mater-Gewebe genutzt werden, um die Kollagenfolie eines Equiden an das Dura Mater-Gewebe ohne die Verwendung von Dichtmittel, Kleber, Nähten oder Druck-Einpass-Techniken anzuheften. Sobald die Kollagenfolie eines Equiden hydratisiert worden ist, kann die Kollagenfolie eines Equiden etwas größer als die chirurgische Öffnung in der Dura Mater des Patienten geschnitten werden. Die Kollagenfolie eines Equiden überlappt dadurch geringfügig die Dura Mater des Patienten, an der sie angeheftet wird. In einer Ausführungsform wird die hydratisierte Kollagenfolie eines Equiden in einer Größe bereitgestellt, so dass sie eine Überlappung von etwa 0,5 bis etwa 1 cm mit der Dura aufweist. Das Ausmaß der Überlappung kann abhängig von den Vorlieben und den Fähigkeiten des Neurochirurgen variieren.

[0103] In einer Ausführungsform kann die Kollagenfolie eines Equiden gemäß der bekannten Wechselwirkung von Kollagen mit Fibrin mit einem Fibrin-Dichtmittel, das für eine neurologische Verwendung zugelassen ist, an die Dura Mater angeheftet werden. Beispiele für Fibrin-Dichtmittel, die für eine neurologische Anwendung zugelassen sind, umfassen Tissucol- und Tisseel-Fibrin-Dichtmittel (Baxter AG, Wien, Österreich). Alternativ kann auch ein Gewebekleber, der für eine neurologische Verwendung zu gelassen ist, verwendet werden. Das Fibrin-Dichtmittel oder der Gewebekleber kann in einer kontinuierlichen Linie um den Abschnitt der Kollagenfolie eines Equiden aufgebracht werden, der die Dura Mater überlappt, um eine flüssigkeitsdichte Versiegelung zu bilden. Wie es vorstehend beschrieben worden ist, ist eine flüssigkeitsdichte Versiegelung vorteilhaft, da sie Komplikationen vermeidet, die mit dem Verlust an Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit zusammenhängen, wie z.B. eine Liquorrhoe.

[0104] In einer anderen Ausführungsform erzeugt die Kollagenfolie eines Equiden eine flüssigkeitsdichte Versiegelung, wenn sie mit einer kontinuierlichen Linie eines Fibrin-Dichtmittels oder eines Gewebeklebers an die autologe Dura Mater angeheftet wird.

[0105] In einer anderen Ausführungsform kann die Kollagenfolie eines Equiden, welche die Dura Mater überlappt, punktwise mit einem Fibrin-Dichtmittel oder einem Gewebekleber versehen werden, um sie an die Dura Mater anzuheften.

[0106] In einer anderen Ausführungsform wird die Kollagenfolie eines Equiden, sobald sie an der gewünschten Implantationsstelle positioniert worden ist, durch chirurgisches Vernähen an die Dura Mater angeheftet. Während diese Ausführungsform verwendet werden kann, um die Kollagenfolie eines Equiden an die autologe Dura Mater des Patienten anzuheften, können die Nähte Verzweigungskanäle verursachen, die wiederum zu Fisteln und einer Leckage von Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit führen können. Wenn die Kollagenfolie eines Equiden vernäht werden soll, müssen spannungsfreie Nähetechniken eingesetzt werden, um ein Reißen der Folie zu verhindern. Es wird empfohlen, die Nahtlinien z.B. mit einem Fibrin-Dichtmittel zu versiegeln bzw. abzudichten.

[0107] In einer anderen Ausführungsform wird die Kollagenfolie eines Equiden gemäß bekannter Druck-Einpass-Techniken positioniert und implantiert. Bei dieser Technik wird die Kollagenfolie eines Equiden in der gewünschten Implantationsstelle positioniert und durch den natürlichen Innendruck, der im Kranium oder der Wirbelsäule vorliegt, an Ort und Stelle gehalten. Folglich bleibt das Transplantat an Ort und Stelle, ohne dass chirurgische Nähte, ein Fibrin-Dichtmittel oder ein Gewebekleber verwendet werden bzw. wird.

[0108] In einer anderen Ausführungsform wird die Kollagenfolie eines Equiden ohne die Verwendung jedweden bzw. jedweder Dichtmittels, Klebers, Nähte oder Druck-Einpass-Techniken positioniert und implantiert. Bei dieser Technik wird die Kollagenfolie eines Equiden in der gewünschten Implantationsstelle positioniert und durch die natürliche Anziehung oder Haftung, die zwischen der Kollagenfolie eines Equiden und dem Dura Mater-Gewebe stattfindet, an Ort und Stelle gehalten.

[0109] Die erfindungsgemäße Kollagenfolie eines Equiden kann als Dura Mater-Ersatztransplantat zur Wiederherstellung von Dura Mater-Gewebe aufgrund eines angeborenen Zustands, eines Geburtsfehlers, einer Krankheit, einer Verletzung, einer Tumorentfernung oder eines anderen chirurgischen Verfahrens, das die Dura Mater eines Patienten trennt oder durchdringt, oder aufgrund jedweden anderen Zustands, bei dem die Dura Mater wiederhergestellt werden muss, verwendet werden. Die Kollagenfolie eines Equiden kann auch zur Wiederherstellung von Dura Mater-Gewebe anderer Säuger verwendet werden, einschließlich unter anderem Schafe, Affen, Pferde, Labortiere oder anderer Säuger. Die Kollagenfolie eines Equiden kann zur Wiederherstellung von Dura Mater-Gewebe im Kranium oder entlang der Wirbelsäule verwendet werden.

[0110] Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Kit, das eine Kollagenfolie eines Equiden und Anweisungen zu deren Herstellung und Verwendung als Dura Mater-Ersatz umfasst.

Kontraindikationen

[0111] Bei einem Patienten, von dem bekannt ist, dass er allergische Reaktionen auf Pferde oder Produkte eines Equiden aufweist, wäre der Erhalt einer Kollagenfolie eines Equiden kontraindiziert.

[0112] Andere Kontraindikationen könnten Patienten umfassen, bei denen kurz nach einem chirurgischen Eingriff eine Strahlentherapie durchgeführt wird. Beispielsweise sind Patienten, die kurz nach einer Gehirntumorsektion eine Strahlentherapie erhalten, keine guten Kandidaten als Empfänger der erfindungsgemäßen Kollagenfolie eines Equiden. Die Strahlentherapie kann das Wachstum der Neodura verlangsamen oder hemmen, die sich schnell teilende Zellen umfasst, wobei die Kollagenfolie eines Equiden resorbiert wird. In einer solchen Situation wäre ein nicht-resorbierbarer Dura Mater-Ersatz, wie z.B. Teflon, besser geeignet. Ein fähiger Chirurg würde jedoch die Behandlungen erkennen, bei denen ein nicht-resorbierbarer Ersatz erforderlich wäre.

Definitionen

[0113] „Kollagenfolie eines Equiden“ steht für eine Biomatrix (d.h. eine Matrix aus biologisch verträglichem Material) aus Kollagenfibrillen eines Equiden, die behandelt worden sind, um zelluläre Komponenten zu entfernen und ein Blatt aus Kollagenfibrillen zu bilden. Der Ausdruck „Kollagenfolie eines Equiden“ umfasst keine Verbundfolie aus einem nicht-porösen Blatt oder mehreren nicht-porösen Blättern von Kollagenfibrillen, das bzw. die an ein Blatt oder mehrere Blätter von porösem Kollagen gebunden ist bzw. sind. „Dura Mater-Gewebe“ steht für das autologe Dura Mater-Gewebe eines Säugers.

[0114] „Nicht natürlich vorkommende Biomatrix“ steht für eine hergestellte Matrix oder ein hergestelltes Grundgerüst, das Kollagenfibrillen umfasst, und die bzw. das aus (1) einem Material gebildet worden ist, welches in der Natur vorkommt (d.h. ein natürliches Material), das in einer Weise behandelt oder verarbeitet worden ist, so dass die Kollagenfibrillen, die in dem natürlichen Material enthalten sind, bezüglich ihrer natürlich vorkommenden Anordnung innerhalb der Kollagenstruktur des natürlichen Materials bewegt oder repositioniert worden sind, oder die bzw. das (2) aus einem Material gebildet worden ist, das in der Natur nicht vorkommt (d.h. ein nicht-natürliches Material), das mit Kollagenfibrillen behandelt oder verarbeitet worden ist. Beispielsweise kann eine nicht natürlich vorkommende Biomatrix aus einem Ausgangsmaterial gebildet werden, das Kollagen umfasst, das mechanisch oder chemisch verarbeitet worden ist (z.B. zerkleinert, zerhackt, usw.). Im Gegensatz dazu ist eine Kollagen-Biomatrix, die durch die Behandlung oder Verarbeitung eines Ausgangsmaterials in einer Weise, welche die Struktur des Kollagengrundgerüsts bewahrt, gebildet wird, keine nicht-natürlich vorkommende Biomatrix (z.B. epidermales Gewebe, das zur Entfernung von zellulären Komponenten behandelt worden ist, während die natürlich vorkommende Kollagenstruktur bewahrt worden ist).

[0115] „Im Wesentlichen nicht porös“ bedeutet, dass jedwede Poren, die in einer Kollagenfolie eines Equiden als Ergebnis der Ausfällung von Kollagenfibrillen zur Bildung eines Kollagenblatts vorliegen, vorwiegend voneinander isoliert sind. Poren, die miteinander verbunden sein können, sind nicht in einer Weise miteinander verbunden, so dass sie durch die Dicke der Kollagenfolie eines Equiden verlaufen. Mechanische Perforationen, die Löcher in der Kollagenfolie eines Equiden erzeugen, sind keine Poren. Vorzugsweise ist das Material im Wesentlichen frei von Poren, die unter Verwendung eines Rasterelektronenmikroskops bei einer Vergrößerung von 1500× sichtbar sind.

[0116] Die folgenden Beispiele veranschaulichen die Erfindung weiter.

Beispiel 1

[0117] Dieses Beispiel stellt die Ergebnisse von Experimenten in Schafen dar, um eine Kollagenfolie eines Equiden bezüglich ihrer Eignung als Dura Mater-Ersatz zu bewerten, die zur Wiederherstellung von Dura Mater-Gewebe und als Biomatrix zur Dura-Regeneration verwendet wird.

[0118] Es wurde ein Experiment durchgeführt, um die Eigenschaften einer Kollagenfolie eines Equiden zur Verwendung als kranialer Dura Mater-Ersatz zu bewerten, was in einem Schaf-Modell untersucht wurde. Die Kollagenfolie eines Equiden umfasst native Kollagenfibrillen eines Equiden (5,6 mg/cm²), die aus zerkleinerter Achillessehne eines Equiden aufgereinigt wurden und keine zellulären Komponenten enthalten.

[0119] Das verwendete Referenzprodukt war konservierte Dura von menschlichen Leichen (Tutoplast®-Dura). Beide Produkte wurden nur unter Verwendung von Fibrinkleber (Tissucol Duo S Immuno, Baxter AG, Wien, Österreich) in der richtigen Position angeheftet.

[0120] Die folgenden Gegenstände wurden untersucht:
Makroskopische Aspekte des Einbringens von zwei Transplantaten;
Reaktionen angrenzender Gewebestrukturen (Entzündung, Anhaften, Fibrose, Nekrose); und histologische Bewertung des Einbringungsverfahrens und der Bindegewebsorganisation.

[0121] Das Reinigungsverfahren zur Herstellung der Kollagenfolie eines Equiden beginnt mit einer mindestens 1-stündigen Behandlung mit einer Natriumhydroxidlösung des Sehnen-Ausgangsmaterials, worauf in Chlorwasserstoffsäure neutralisiert wird. Dann wird Pepsin verwendet, um die Sehnen abzubauen. Das so erzeugte kolloidale Kollagen wird in Form von Fibrillen ausgefällt. Trocknen und eine Gassterilisation ergeben dann eine Kollagenfolie eines Equiden mit 5,6 mg nativen Kollagenfibrillen pro cm². Es wird nichts weiter zugesetzt und es werden keine künstlichen Vernetzungsverfahren (d.h. unter Verwendung von Chemikalien oder Strahlung) durchgeführt. Immundiffusionstests stellen sicher, dass keine Fremdproteine vorliegen.

Materialien und Verfahren

Tiere für Experimente

[0122] Die Studie wurde in 25 erwachsenen Schafen durchgeführt. Die Schafe waren gemischtrassige domestizierte Tiere, die in der Landwirtschaft eingesetzt wurden. Die Tiere wogen zum Zeitpunkt des chirurgischen Eingriffs durchschnittlich 53,0 kg und deren Durchschnittsalter betrug 2 Jahre. Alle Tiere waren weiblich. Die Tiere wurden in dem Tierlaufstall der Medizinischen Universität zu Lübeck gehalten, der mit überdachten Strukturen und einem Freiluftbereich ausgestattet ist. Die Tiere erhielten herkömmliches Mischfutter. Die Tiere wurden für histologische Tests und eine Charakterisierung verschiedener Stufen des Implantateinbaus in Gruppen von fünf Tieren eingeteilt (Gruppe 1 bis Gruppe 5). Die Überlebenszeiten pro Gruppe waren 2, 4, 8, 16 und 24 Wochen.

Produkt der Studie

[0123] Die untersuchte Kollagenfolie eines Equiden wird aus nativen Kollagenfibrillen eines Equiden (vorwiegend interstitielles Typ I-Kollagen) hergestellt. Ein Quadratzentimeter des Materials enthält 5,6 mg Kollagenfibrillen ohne zelluläre Komponenten. Das Vergleichsmaterial (Tutoplast®-Dura, Tutogen Medical GmbH, Neunkirchen am Brand, Deutschland) ist eine Dura von menschlichen Leichen, die durch ein Gewebeersatzverfahren konserviert worden ist.

[0124] Ein Fibrinkleber, Tissucol Duo S, wurde zum Anheften der Transplantate an die Dura Mater verwendet. Dieser biologische Zweikomponenten-Kleber besteht aus einer vorgefüllten Spritze, die menschliche Plasmaproteine, Fibrinogen, Gerinnungsfaktor XIII, Plasmafibronektin und Aprotinin enthält, und einer anderen vorgefüllten Spritze, die Thrombin und Calciumchlorid enthält.

Anästhesie

[0125] Die Tiere wurden mit einer intramuskulären Injektion von Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland), Dosierung: 0,1 mg pro kg Körpergewicht, (S)-Ketamin (Ketanest S, Parke-Davis GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Dosierung: 2 mg pro kg Körpergewicht, und 0,5 mg Atropin, 1 ml Injektionslösung (Atropinsulfat Braun 0,5 mg, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in einem Injektionscocktail einer Prämedikation unterzogen. Eine venöse und eine arterielle Leitung wurden in das rechte Ohr eingesetzt. Zur Anästhesie wurde Propofol (Disoprivan 2%, AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland), 1 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Die Tiere wurden endotracheal (I.D. 7,0 mm) intubiert und 100% Sauerstoff wurde für eine kontrollierte Normoventilation verabreicht (Sulla 808V Anästhesieventilator, Dräger, Lübeck, Deutschland).

[0126] Propofol, (S)-Ketamin und Sevofluran wurden verabreicht, um eine ausgewogene Anästhesie aufrechtzuerhalten. Während des chirurgischen Eingriffs wurden die Druck- und Volumenverhältnisse innerhalb des Atmungszyklus, der Einatemsaurestoffanteil (Oxydig, Dräger, Lübeck, Deutschland), die End-Ausatem-Kohlenhydratkonzentration (Kapnodig, Dräger, Lübeck, Deutschland), das Elektrokardiogramm und der invasive arterielle Blutdruck überwacht.

Präoperative Antibiotikumprophylaxe

[0127] Unmittelbar vor dem chirurgischen Eingriff erhielt jedes Tier eine intravenöse Dosis von 2,0 g Cefazolin (Basocef 2,0 g, Curasan AG, Kleinostheim, Deutschland). Die Antibiotikumprophylaxe wurde weitere 4 Tage nach der Operation durch zwei subkutane Dosen eines Depotprodukts, Strepdipen-Suspension (1,0 ml enthält 100000 IU Benzylpenicillinbenzathin und 100000 IU Dihydrostreptomycinsulfat, Dosierung: 1,0 ml pro kg Körpergewicht) aufrechterhalten. Die subkutanen Injektionen wurden unmittelbar nach dem Ende des Verfahrens und erneut 48 Stunden später verabreicht.

Chirurgische Technik

[0128] Das bereits intubierte Tier wurde in eine linke laterale Position gebracht. Der Kopf wurde dann auf die rechte Seite gedreht und durch Klemmen an den Operationstisch in einer horizontalen Position gehalten. Der Schädel wurde dann sorgfältig rasiert, die Haut wurde mit Petrolether entfettet und dann desinfiziert. Ein steriles Blatt mit einer Öffnung, die den zu operierenden Bereich freiließ, wurde befestigt und das gesamte Tier wurde mit sterilen Abdeckungen bedeckt.

[0129] Der erste Hauteinschnitt wurde 1,5 cm links von der Mittellinie durchgeführt und auf etwa 6 cm verlängert. Jegliches Bluten von der Kopfhaut wurde unter Verwendung von bipolaren Pinzetten koaguliert. Ein Wundspreizer wurde eingesetzt und der Schädelknochen wurde im temporoparietalen Bereich durch Zurückziehen und Spreizen der Kopfschwarte freigelegt. Dann wurden zwei Löcher (Durchmesser: 0,8 cm), die etwa 5 cm voneinander entfernt waren, unter Verwendung einer handbetriebenen Bohrmaschine gebohrt. Eine Säge (Mikrotom, Aesculap, Melsungen, Deutschland) wurde dann verwendet, um eine länglich-ovale Knochenscheibe von dem Schädel zwischen den Bohrlöchern zu entfernen.

[0130] Jegliches Bluten von dem Schädel wurde unter Verwendung von Knochenwachs gestoppt. Zur Durchführung eines Einschnitts in die Dura mit einer Länge von etwa 0,5 cm wurde ein Skalpell verwendet. Eine Dura-Schere wurde dann verwendet, um ein ovales Stück der Dura Mater mit einer Abmessung von etwa 3 × 2 cm entlang des Knochenrands herauszuschneiden. Es wurde besonders darauf geachtet, die kraniale Spinnwebenhaut nicht zu verletzen. Zum Stoppen jeglicher Blutung aus den Dura-Blutgefäßen wurde ein hämostatisches Mittel, Tacho Comb® (Nycomed Austria GmbH, Linz, Österreich), verwendet.

[0131] Ein ovales Stück einer Kollagenfolie eines Equiden (mit den Abmessungen 3,5 × 2,5 cm) wurde dann zugeschnitten und 5 min in sterile 0,9%ige Kochsalzlösung eingetaucht. Zum Schließen des Defekts wurde die Kollagenfolie eines Equiden überall unter die Dura Mater-Ränder geschoben und punktförmig mit Fibrinkleber versehen, um sie an Ort und Stelle zu halten, vgl. [Fig. 7](#).

[0132] Die Schädelscheibe wurde dann unter Verwendung von zwei Miniplatten (Bioplates, Codman, Nordestedt, Deutschland) wieder angebracht. Die Kopfschwarte wurde dann unter Verwendung einer absorbierbaren Naht (Vicryl 2.0) geschlossen und die Haut wurde mit Ethilon 3.0 vernäht.

[0133] Das Tutoplast®-Dura-Produkt wurde in einer ähnlichen Weise auf der rechten Seite des Schädels angewandt, vgl. die [Fig. 8](#). Beide Wunden wurden schließlich mit einem Sprühverband behandelt (Hansaplast Sprühpflaster, Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland).

[0134] Die durchschnittliche Operationszeit betrug 120 min. Die mittlere Dauer von der Induktion der Anästhesie bis zum Beginn des chirurgischen Eingriffs betrug etwa 60 min und die mittlere Dauer von Ende des Nähvorgangs bis zum Ende der Anästhesie betrug 5 bis 10 min.

Postoperative Beobachtung der Tiere

[0135] Die Tiere wurden etwa 30 min nach der Extubation in ihren Laufstall zurückgebracht. Die Tiere wurden in regelmäßigen Intervallen vom Chirurgen, einem Tierarzt und Tierpflegern im Hinblick auf Zeichen einer Entzündung oder neurologischer Anomalitäten untersucht. Die Tiere wurden acht Tage nach dem chirurgischen Eingriff in den Freiluftbereich gelassen.

Tiereuthanasie

[0136] Die Tiere wurden für Probenahmезwecke bei den vorgegebenen Überlebenszeiten von 2, 4, 8, 16 und 24 Wochen nach der Operation getötet.

[0137] Vor dem Töten wurden die Tiere mit einer intramuskulären Injektion von 1 mg pro kg Körpergewicht Rompun 2% sediert. Ein Elektrokardiogramm-Monitor (EKG-Monitor) wurde aufgestellt und eine venöse und eine arterielle Leitung wurden im rechten Ohr angeordnet. Die tief sedierten Tiere wurden dann durch eine intravenöse Injektion von T-61[®] (Hoechst Roussel Vet, Somerville, New Jersey) getötet. 1 ml Injektionslösung enthält 0,2 g Embutramid, 0,05 g Mebezoniumiodid und 0,005 g Tetracainhydrochlorid; Dosierung: 0,3 ml pro kg Körpergewicht). Der Vorgang wurde mittels EKG und einer Messung des arteriellen Drucks überwacht.

Probenahme

[0138] Die Köpfe der Tiere wurden rasiert und so positioniert, wie es vorstehend für das chirurgische Verfahren beschrieben worden ist. In die Haut um die beiden chirurgischen Narben wurde ein kreisförmiger Einschnitt mit einem Durchmesser von etwa 9 cm durchgeführt. Die Kopfschwarte wurde zurückgezogen, um einen großen Abschnitt des Schädeldachs freizulegen, und in den rechten vorderen Bereich wurde ein Loch gebohrt. Mit einer Säge wurde eine kreisförmige Scheibe des Schädels, die etwa 8 cm maß, entfernt. Die gesamte Transplantatstelle, die aus Knochen, Dura und zerebralem Parenchym bestand, wurde durch Schneiden entlang des Knochens mit einem Skalpell zugänglich gemacht. Das Dura-Gewebe und das Knochengewebe wurden dann sorgfältig von dem darüber liegenden Knochen getrennt und für eine histologische Aufarbeitung in Formaldehyd fixiert. Die Transplantatprobe wies einen Durchmesser von etwa 7 cm auf.

Histologische Verfahren

[0139] Die Transplantatproben wurden makroskopisch untersucht und in Frontalschnitte aufgeteilt. Die beiden chirurgischen Stellen wurden gleichzeitig präpariert. Von jeder Probe wurden 5 Schnitte mit einer Dicke von etwa 2 bis 3 µm entnommen.

[0140] Standard-Färbeverfahren, die verwendet wurden, um die Veränderungen zu bewerten, umfassten Hämatoxylin-Eosin für die zellulären Komponenten, Elastica van Gieson für mesenchymale Strukturen, Trichrom für mesenchymale Strukturen und zur Bewertung der Kollagenfaser-Neogenese und eine Eisenfärbung zur Bestimmung des Blutungsmaßes.

Ergebnisse

Intraoperativer und postoperativer Verlauf

[0141] Die Anästhesie, der chirurgische Eingriff und der postoperative Nachsorgezeitraum waren bei allen Tieren bis auf zwei ereignislos. Ein Tier starb während der Induktion der Anästhesie als Ergebnis einer refraktären Herzrhythmie. Ein anderes Tier starb plötzlich und unerwartet 14 Tage nach dem chirurgischen Eingriff nach einem bis dahin ereignislosen postoperativen Verlauf. Eine mikroskopische Untersuchung des Gehirns zeigte eine ausgedehnte kortikale Nekrose mit Anzeichen für eine Vernarbung. Die wahrscheinlichste Ursache für den Tod ist deshalb eine seit langem vorhandene zerebrale Ischämie unbekannter Ätiologie.

[0142] Es gab sehr wenige intraoperative Blutungen, die schwach waren und in den meisten Fällen von kleinen Blutgefäßen der Dura Mater stammten. Die Blutungen wurden unter Verwendung von bipolaren Pinzetten oder hämostatischen Mitteln schnell unter Kontrolle gebracht.

[0143] Keines der Tiere zeigte während der postoperativen Nachsorge neurologische Anomalitäten. Entsprechend zeigte keines der Tiere Anzeichen einer Entzündung, eines Austretens von Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit oder einer beeinträchtigten Wundheilung.

Makroskopie

[0144] Die folgenden Parameter wurden während der Entfernung der Proben von den chirurgischen Stellen untersucht und quantifiziert:

- Bildung von Anhaftungen zwischen dem Schädel und der Dura;
- Austreten von Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit und entzündliche Veränderungen;
- sichtbare Veränderungen bei den Dura-Transplantaten; und
- meningokortikale Anhaftungen und kortikale Reaktionen.

Mikroskopie

- [0145]** Die histologischen Schnitte wurden bezüglich der folgenden Punkte systematisch bewertet:
- Beschreibung und Quantifizierung von Entzündungsreaktionen in der Transplantatstelle (epidural, subdural, Übergangszone zwischen Dura und Transplantat);
 - Grad der Bindegewebsorganisation des Transplantats;
 - Ausmaß der Fremdkörperreaktion;
 - Veränderungen des subarachnoidalen Raums (Entzündungsprozesse, Fibrose gegenüber offenem subarachnoidalen Raum); und
 - Veränderungen des Kortex (Entzündung, Nekrose).

Makroskopie und histologische Ergebnisse

[0146] Die nachstehend beschriebenen histologischen Ergebnisse sind bezüglich der zellulären Zusammensetzung identisch, während sie bezüglich der Intensität in verschiedenen frontalen Abschnitten bei dem gleichen Tier und in allen Tieren der gleichen Gruppe variieren.

Makroskopische Bewertung des Transplantateinbaus

[0147] Die Entfernung des Schädelknochens nach einem Zeitraum von zwei Wochen zeigt minimale Anhaftungen auf beiden Seiten zwischen den Fibrinkleberresten und dem darüber liegenden Knochen. Die Anhaftungen können leicht abgelöst werden. Es liegen keine Zeichen für eine Entzündung oder ein Heraussickern von Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit an beiden Transplantatstellen vor. Beide Transplantate sind fleckenartig mit einzelnen Blutgerinnseln bedeckt, die einen Durchmesser von wenigen mm aufweisen.

[0148] Die linke Hemisphäre der Kollagenfolie eines Equiden ist nach wie vor abgrenzbar und scheint weniger transparent zu sein als deren ursprüngliches, Mattglas-artiges Aussehen. Das Kollagenprodukt behält dessen Anhaftung an die Dura-Ränder bei, wenn die Dura vorsichtig vom Kortex abgehoben wird. Es liegen wenige, sehr geringe Anhaftungen vor, die ohne Schädigung des Kortex leicht gelöst werden können.

[0149] Die Tutoplast®-Dura in der rechten Hemisphäre erscheint für das bloße Auge unverändert. Die Tutoplast®-Dura wird stellenweise in der Transplantat-Dura-Kontaktzone abgelöst, wenn das Produkt entfernt wird. Es liegen weniger subarachnoidale Anhaftungen vor, wenn die Dura vom Kortex abgehoben wird, jedoch können diese leicht mit einer Pinzette gelöst werden.

[0150] Vier Wochen nach der Operation gibt es immer noch wenige Anhaftungen zwischen den Rändern des darüber liegenden Knochens und der darunter liegenden Dura. Diese sind auf Fibrinkleberreste zurückzuführen. Der Knochen wird von der Dura Mater ohne Ziehen leicht gelöst, ohne dass die Dura oder das Transplantat verletzt wird. An der Stelle in der linken Hemisphäre der Kollagenfolie eines Equiden ist die Grenzzone zwischen der Dura Mater und dem Transplantat nicht länger deutlich. Das Transplantat ist weniger transparent als vorher und hat eine blass-rote Farbe angenommen. Das Aussehen des Transplantats auf der Seite der Gehirnoberfläche ist homogen, glatt und mobil. Die subduralen Anhaftungen sind nicht mehr vorhanden. Es sind wenige Blutgerinnselreste sichtbar.

[0151] Die Tutoplast®-Dura sieht auch hier unverändert aus, wenn sie mit dem bloßen Auge betrachtet wird. Die Untersuchung des Kontaktbereichs zwischen dem Transplantat und der Dura zeigt ein unzureichendes, leicht zu lösendes Anheften.

[0152] Acht Wochen nach der Operation ist die Übergangszone zwischen der Dura und dem Kollagenfolien-transplantat eines Equiden in der linken Hemisphäre nicht länger vorhanden. Die strukturelle Kontinuität ist auf beiden Seiten der Meningen sichtbar. Der Bereich, an dem die Kollagenfolie eines Equiden platziert worden ist, ist nur als etwas dünnere Membran und geringfügig rötliches Aussehen sichtbar, vgl. die [Fig. 9](#) und [Fig. 10](#). Die Tutoplast®-Dura in der rechten Hemisphäre ist zu diesem Zeitpunkt auf beiden Seiten mit einer dünnen Bindegewebsmembran bedeckt, vgl. die [Fig. 11](#). Die Kanten des Transplantats sind unterhalb der überlappenden Dura nach wie vor deutlich sichtbar. Ein geringfügiges Ziehen an der Tutoplast®-Dura ist ausreichend, um sie von der vorhandenen Dura abzulösen.

[0153] Nach 16 Wochen ist die Neodura-Bildung an der Stelle der Kollagenfolie eines Equiden weiter fortgeschritten und die Dura und die Neodura sind kaum unterscheidbar.

[0154] Die Bindegewebeinkapselung des Tutoplast®-Dura-Transplantats in der rechten Hemisphäre ist ausgeprägter geworden.

[0155] Nach einem Zeitraum von 24 Wochen unterscheiden sich Schnitte von beiden Transplantationsstellen makroskopisch nicht von denjenigen der vorhergehenden Gruppe.

Mikroskopische Bewertung des Transplantateinbaus

[0156] Zwei Wochen nach der Operation zeigt die Stelle des Kollagenfolientransplantats eines Equiden erwartungsgemäß ausgedehnte Bereiche einer entzündlichen Veränderung. Der gesamte subarachnoidale Bereich ist durch Anhaftungen verschlossen, die aus einer kopiösen Exsudation von Lymphozyten, segmentierten Granulozyten und Makrophagen resultiert. Einige Bereiche mit einer sehr starken entzündlichen Exsudation sind auch oberhalb des Transplantats sichtbar. Zusätzlich zu den lymphozytischen und monozytischen Komponenten liegen hier auch kleine Knochensplitter mit einer entsprechenden Fremdkörperreaktion durch vielkernige Riesenzellen vor.

[0157] Das Kollagenfolientransplantat eines Equiden selbst zeigt ein Lösen homogener Strukturen und eine Invasion von Entzündungszellen, die herzförmig oder ausgedehnt sind, vgl. die [Fig. 12](#). In wenigen Fällen liegt eine (mit dem chirurgischen Eingriff zusammenhängende) ischämische Nekrose oberflächlicher Bereiche des zerebralen Kortex vor.

[0158] Die Tutoplast®-Dura-Probe zeigt auch eine ausgedehnte Entzündungsreaktion, insbesondere im subarachnoidalen Raum. Das Transplantat selbst ist nicht von Entzündungszellen infiltriert, jedoch sind an beiden Enden Entzündungslymphozyten und -monozyten und eine Fremdkörperreaktion feststellbar.

[0159] Nach einem Zeitraum von vier Wochen haben die entzündlichen Veränderungen in der Stelle des Kollagenfolientransplantats eines Equiden signifikant abgenommen, jedoch liegen nach wie vor rasenartige lymphozytische und monozytische Exsudate vor, vgl. die [Fig. 13](#) und [Fig. 14](#). Vielkernige Fremdkörper-Riesenzellen liegen häufiger vor, insbesondere in der Nähe von Knochensplittern. Innerhalb des ursprünglichen Kollagenfolientransplantats eines Equiden sind zahlreiche Fibroblasten sichtbar. Die typischen homogenen Strukturen des Transplantats sind in den HE-Abschnitten (Abschnitte mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung) nicht nachweisbar. Die mit EVG (Elastica van Gieson) und Trichrom gefärbten Proben zeigen eine umfangreiche Neogenese von Kollagenfasern an der ehemaligen Transplantatstelle. Die vorhandene Dura Mater macht allmählich für lose strukturiertes Gewebe Platz, das aus neu gebildeten Kollagenfasern besteht, die eine Entzündungsinfiltration zeigen. Die vorher festgestellte entzündliche Anhaftung von Leptomeningen ist nicht länger vorhanden. Der subarachnoidale Raum liegt wieder vor, wobei ein Spalt zurückgeblieben ist. Die Pia Mater zeigt weiterhin kleine Knötchen an Stellen einer lymphozytisch-monozytischen Infiltration.

[0160] Es gibt keine Anzeichen einer Bindegewebsorganisation an der Tutoplast®-Dura-Stelle. Eine Entzündungsexsudation liegt oberhalb und unterhalb des implantierten Gewebes vor und Entzündungsinfiltrate liegen in der Übergangszone zur vorhandenen Dura vor. Der subarachnoidale Raum ist nachweisbar und deutlich, vgl. die [Fig. 15](#).

[0161] Acht Wochen nach der Operation haben in der Gruppe mit der Kollagenfolie eines Equiden entzündliche Prozesse in der Neodura weiter abgenommen. Nur kleine Cluster einer lymphozytischen und monozytischen Infiltration liegen noch vor. Der subarachnoidale Raum ist leer und auch hier liegen nur kleine Herde mit entzündlicher Aktivität vor. Die Abschnitte, die mit EVG und Trichrom gefärbt worden sind, zeigen eine ausgeprägte Kontinuität zwischen der stark kollagenhaltigen endogenen Dura und den neu gebildeten Kollagenfasern der Neodura. Die Dicke dieser neuen Membran scheint zu variieren und zeigt in Teilen ein Lösen der Struktur, vgl. die [Fig. 16](#).

[0162] Auch in der Tutoplast®-Dura-Stelle hat sich die Entzündungsaktivität stark vermindert. An manchen Stellen fehlt das Einbeziehen mit der angrenzenden Dura und an anderen Stellen gibt es Anzeichen einer entzündlichen Infiltration und eines Anhaftens an der angrenzenden Dura.

[0163] Nach 16 Wochen sind in der Gruppe mit der Kollagenfolie eines Equiden Cluster von lymphozytischen und monozytischen knötchenförmigen entzündlichen Infiltraten nach wie vor sichtbar. Die Kontinuität zwischen der stark kollagenhaltigen vorhandenen Dura und der Neodura ist unverändert, wobei Strukturen bezogen auf die Ergebnisse bei 8 Wochen keine großen Veränderungen zeigen. Kollagenfasern mit variierender Dicke liegen vor, wobei an manchen Stellen ein Lösen der Struktur vorliegt.

[0164] Die Tutoplast®-Dura-Stelle zeigt auch hier entzündliche Veränderungen und Anhaftungen mit der umgebenden Dura, wobei diese Ergebnisse bezüglich ihrer Intensität variieren.

[0165] Nach 24 Wochen gibt es in der Gruppe mit der Kollagenfolie eines Equiden neben einer weiteren Verminderung der zellulären Entzündungsreaktion keine relevanten histologischen Unterschiede zu der Transplantateinbaustufe bei 16 Wochen, vgl. die [Fig. 17](#).

Histologische Ergebnisse

[0166] Die Quantifizierung der Entzündungsreaktion, der Bindegewebsorganisation und des Ausmaßes der Fremdkörperreaktion in Transplantatstellen und im subduralen und epiduralen Raum ist in der nachstehenden Tabelle 1 angegeben.

Tabelle 1 – Untersuchung von Transplantaten, des subduralen und des epiduralen Raums

Zeit	Tier	Kollagenfolie eines Equiden			TutoPlast®-Dura		
		Transplantat, sub-/epiduraler Raum			Transplantat, sub-/epiduraler Raum		
		Entzündung	Organisation	Fremdkörperreaktion	Entzündung	Organisation	Fremdkörperreaktion
Woche 2	1	+++	--	+	++	--	++
	2	+++	--	++	++	--	+
	3	+++	--	+++	++	--	++
	4	+++	--	++	+++	--	+++
	5	+++	--	+++	++	--	++
Woche 4	6	++	u	+	++	--	+
	7	+	u	--	+	--	++
	8	+	u/K	--	+	--	+
	9	++	u	+	++	--	+
	10	+	u/K	+	++	--	+
Woche 8	11	+	K	+	++	--	+
	12	+	K	+	--	--	--
	13	++	K	u/+	++	--	+
	14	u/+	K	--	++	--	+
	15	+	K	u	--	--	+
Woche 16	16	--	K	--	+	--	--
	17	--	K	--	+	--	--
	18	--	K	--	--	--	--
	19	--	K	--	++	--	--
	20	--	K	--	+	--	--
Woche 24	21	--	K	--	+	--	--
	22	--	K	--	--	--	--
	23	--	K	--	--	--	--
	24	--	K	--	+	--	--
	25	--	K	--	--	--	--

Entzündung (Entzündungsreaktion):

- Keine sichtbaren Zeichen einer Entzündungsreaktion
- u Nur eingegrenzte entzündliche Infiltrate
- + Schwache Entzündungsreaktion
- ++ Signifikante Entzündungsreaktion
- +++ Starke entzündliche Infiltrate

Organisation des Transplantats:

- Bindegewebsorganisation fehlt oder ist schwach
- + Isolierte Fibroblasten innerhalb des Transplantats
- u Eingegrenzte Gewebeorganisation (40% bis 70%)

u/K Gewebeorganisation > 70%

K Sichtbare Kontinuität von Neodura und Dura, vollständige Organisation (100%) des Transplantats

Fremdkörperreaktion mit vielkernigen Riesenzellen:

- Keine Fremdkörperreaktion
- u Nur eingegrenzte Fremdkörperreaktion
- + Schwache Fremdkörperreaktion
- ++ Signifikante Fremdkörperreaktion
- +++ Ausgedehnte Fremdkörperreaktion

[0167] Die histologischen Untersuchungsergebnisse des subarachnoidalen Raums an beiden Transplantatstellen sind in der nachstehenden Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2 – Untersuchung des subarachnoidalen Raums (SAS)

Zeit	Tier	Kollagenfolie eines Equiden			TutoPlast®-Dura		
		subarachnoidaler Raum			subarachnoidaler Raum		
		Entzündung	geschlossen	offen	Entzündung	geschlossen	offen
Woche 2	1	+	+	--	++	+	--
	2	++	+	--	++	+	--
	3	+++	+	--	++	+	+
	4	+++	+	--	+++	+	--
	5	++	+	--	++	+	+
Woche 4	6	--	--	+	+	--	+
	7	--	F	+	--	F	+
	8	--	F	+	--	F	+
	9	+	F	+	+	F	+
	10	--	--	+	+	F	--
Woche 8	11	+	--	+	--	--	+
	12	+	u	+	--	--	+
	13	--	--	+	--	--	+
	14	--	u	+	--	--	+
	15	--	--	+	--	--	+
Woche 16	16	--	F	--	--	F	--
	17	--	F	--	--	F	+
	18	--	F	--	--	F	--
	19	--	F	--	--	F	--
	20	--	F	--	--	F	--
Woche 24	21	--	F	+	--	F	+
	22	--	F	+	--	F	+
	23	--	F	+	--	F	+
	24	--	F	+	--	F	+
	25	--	F	+	--	F	+

Entzündung:

- Keine Entzündungsreaktion
- + Schwache Entzündungsreaktion
- ++ Signifikante Entzündungsreaktion
- +++ Starke Entzündungsreaktion

SAS (subarachnoidaler Raum) geschlossen:

- Verstreute Entzündungszellen
- + SAS durch zelluläres Infiltrat geschlossen
- u Isolierte Entzündungsinfiltrate im SAS
- pF/F Partielle Fibrose/Fibrose des SAS

SAS offen:

- SAS vorwiegend leer mit isolierten Zellgruppen
- + Subarachnoidaler Raum leer

Diskussion

Bewertung der chirurgischen Verfahren und der Handhabung beider Transplantate

[0168] Die Kollagenfolie eines Equiden war durch eine problemlose intraoperative Handhabung gekennzeichnet. Die Rehydratisierung in physiologischer Kochsalzlösung für 5 min erzeugte einen extrem zähen, etwa 2 mm dicken Film, der seine Form nicht verlor, nicht verklebte und einfach zuzuschneiden war. Das Material konnte unter Verwendung einer Pinzette und eines stumpfen Hakens einfach in dem Dura-Defekt positioniert werden. Aufgrund ihrer Mobilität konnte die Position der Kollagenfolie eines Equiden auf der Gehirnoberfläche vor dem Anheften an der richtigen Position auch einfach korrigiert werden. Der Film musste nicht vernäht werden, da das Transplantat unter Verwendung von Fibrinkleber schnell und einfach an der Duragrenze angeheftet werden konnte. Vorhergehende Studien haben auch gezeigt, dass Fibrinkleber ein zuverlässiges Dichtmittel für einen Duraverschluss ist.

[0169] Experimentell angebrachte Haltenähte zogen die Kollagenfolie eines Equiden beim geringfügigsten Ziehen ab, was zeigt, dass der Fibrinkleber für dieses Transplantat der bessere Ansatz ist.

[0170] Wenn die Produkte später entfernt wurden, gab es in manchen Fällen Anzeichen dafür, dass eine zu intensive Anwendung des Fibrinklebers an manchen Stellen zu einem Anhaften an dem darüber liegenden Knochen geführt hatte. Diese Anhaftungen mussten vorsichtig mit einem Dissektor gelöst werden, um ein Ziehen an den Meningen und dem Kortex zu vermeiden. Dieses Problem wurde durch Aufbringen oder punktförmiges Aufbringen geringer Mengen des Fibrinklebers vermieden. Wenn die Produkte entfernt wurden, war klar, dass die Anwendung eines Fibrinklebers einen sicheren Duraverschluss erzeugt und ein Heraussickern von Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeit verhindert. Dies war bereits zwei Wochen nach der Operation ersichtlich, als keines der Tiere eine subkutane CSF-Leckage oder eine Gehirn- und Rückenmarksflüssigkeitsfistel entwickelte.

[0171] Das Tutoplast®-Dura-Produkt kann nach einem kurzen Rehydratisierungszeitraum von mehreren Minuten einfach gehandhabt werden, ist jedoch viel starrer und zeigt eine große Variation bezüglich des Durchmessers.

[0172] Der Fibrinkleber erzeugte eine angemessene Haftung, so dass die Tutoplast®-Dura anfänglich an Ort und Stelle gehalten wurde, jedoch war die Verbindung zwischen der ursprünglichen Dura und dem Transplantat lose, wenn die chirurgische Stelle wieder geöffnet wurde. Dies war in der 24. Woche nach der Operation immer noch der Fall, und zwar aufgrund der Tatsache, dass die Tutoplast®-Dura selbst nicht mit der autologen Dura Mater verschmolzen war. Die Praxis des Anheftens dieses Transplantats mit einzelnen Nähten scheint daher der Verwendung von Fibrinkleber überlegen zu sein, da Untersuchungen zeigen, dass ein angemessener Einbau ansonsten nicht stattfindet. Es gab sehr selten Anhaftungen in der Übergangszone zwischen der Tutoplast®-Dura und dem Kortex, die unter Verwendung eines Dissektors einfach gelöst werden konnten.

[0173] Die Technik, die zum Einsetzen der Kollagenfolie eines Equiden zwischen der Dura und dem Kortex verwendet wird, kann in bestimmten chirurgischen Situationen ungeeignet sein. Insbesondere ist es unwahrscheinlich, dass eine angemessene Fixierung mit diesem Verfahren bei Verfahren erreicht werden kann, die große Defekte des zerebralen Parenchyms umfassen, wie z.B. Tumorrhohlräume.

[0174] Makroskopisch zeigten alle Tiere einen zuverlässigen Verschluss des Dura-Defekts ohne Transplantatabstoßungsreaktionen. Kleine Anhaftungen zwischen dem Implantat und kortikalen Strukturen entwickelten sich in wenigen Fällen, möglicherweise aufgrund sehr kleiner Verletzungen der kranialen Spinnwebenhaut während des chirurgischen Eingriffs. Eine übermäßige Anwendung von Fibrinkleber führte bei einigen Tieren zu kleinen Anhaftungsbereichen mit dem darüber liegenden Knochen, die leicht gelöst werden konnten.

[0175] Histologisch lag 14 Tage nach der Implantierung eine dichte Infiltration der Kollagenfolie eines Equiden mit Lymphozyten, Makrophagen und Fibroblasten vor. In dem Transplantat bilden sich später Kapillaren. Gleichzeitige entzündliche Veränderungen in dem subarachnoidalen und dem subduralen/epiduralen Raum und in der Dura-Transplantat-Übergangszone nahmen bereits nach 4 Wochen nach der Operation ab. Ein kon-

tinuierlicher Übergang zwischen dem Kollagenfolientransplantat eines Equiden und der umgebenden Dura aufgrund der Neogenese von Kollagenfasern liegt zu diesem Zeitpunkt ebenfalls vor.

[0176] Diese Neodura, die durch die Kollagenfolie eines Equiden induziert worden ist, ist 24 Wochen nach der Operation nicht so dick wie die ursprüngliche Dura, und zwar möglicherweise deshalb, weil die Dura Mater-Folie von Beginn an nur eine bestimmte Dicke bereitstellte. Es ist jedoch möglich, dass dieser Unterschied später ausgeglichen wird, wenn mehr Kollagenfasern erzeugt werden.

[0177] Zwei Wochen nach der Operation zeigt die Tutoplast®-Dura eine makroskopisch sichtbare Einkapselung des Produkts in einer dünnen Schicht aus Bindegewebe, die mit der Zeit dicker wird. Alle Tiere zeigen einen angemessenen Dura-Verschluss ohne CSF-Fistel und es liegen wenige Anhaftungen zwischen dem Transplantat und dem Kortex oder dem Knochen vor.

[0178] Trotz ähnlicher Entzündungsreaktionen in den Strukturen, die das Transplantat umgeben, gibt es keine Anzeichen postoperativer Organisationsprozesse und geringe Anzeichen einer zellulären Infiltration und einer Revitalisierung des Transplantats.

[0179] Keines der Tiere entwickelte neurologische Anomalien oder Wundinfektionen, abgesehen von einer beabsichtigten lokal begrenzten lymphozytischen und monozytischen Entzündungsreaktion.

Beispiel 2 – Quellungsvermögen der Kollagenfolie eines Equiden

[0180] Die Untersuchungen bezüglich des Quellungsvermögens der Kollagenfolie eines Equiden wurden wie folgt durchgeführt:

- 1) Die Kollagenfolie eines Equiden wurde zunächst in quadratische Stücke von 1 cm² geschnitten.
- 2) Proben dieser geschnittenen Stücke wurden unter einem herkömmlichen Rastermikroskop untersucht, um die makroskopische morphologische Konsistenz und die Dicke des Materials als Referenz für die Quellungsverfahren festzulegen.
- 3) Diese Stücke wurden dann in Kunststoff-Kulturschalen eingebracht.
- 4) Das Fluidaufnahmevermögen und das Quellungsvermögen wurden dann durch aufeinander folgende Titration mit physiologischer Kochsalzlösung untersucht, die mit Eppendorf-Mikropipetten unter Verwendung steigender Fluidmengen ausgehend von 10 µl/cm² bis zu 150 µl/cm² verabreicht wurde (vgl. die Tabelle 3).

Tabelle 3

		An die Kollagenfolie eines Equiden verabreichte Fluidmenge									
Zeit	10 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ kein Quellungeffekt	20 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$	30 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$	40 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$	50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$	75 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$	100 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$	125 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$	150 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$		
1 Stunde	kein Quellungeffekt	Fluid vollständig von dem Material aufgesaugt, kein Überstand nach 1 Stunde	Fluid vollständig von dem Material aufgesaugt, kein Überstand nach 1 Stunde	Fluid vollständig von dem Material aufgesaugt, kein Überstand nach 1 Stunde	Fluid vollständig von dem Material aufgesaugt, kein Überstand nach 1 Stunde	25 μl Überstand	50 μl Überstand	75 μl Überstand	100 μl Überstand		
2 Stunden	kein Quellungeffekt	Fluid vollständig von dem Material aufgesaugt, kein Überstand nach 2 Stunden	Fluid vollständig von dem Material aufgesaugt, kein Überstand nach 2 Stunden	Fluid vollständig von dem Material aufgesaugt, kein Überstand nach 2 Stunden	Fluid vollständig von dem Material aufgesaugt, kein Überstand nach 2 Stunden	25 μl Überstand	50 μl Überstand	75 μl Überstand	100 μl Überstand		
3 Stunden	kein Quellungeffekt	Fluid vollständig von dem Material aufgesaugt, kein Überstand nach 3 Stunden	Fluid vollständig von dem Material aufgesaugt, kein Überstand nach 3 Stunden	Fluid vollständig von dem Material aufgesaugt, kein Überstand nach 3 Stunden	Fluid vollständig von dem Material aufgesaugt, kein Überstand nach 3 Stunden	25 μl Überstand	50 μl Überstand	75 μl Überstand	100 μl Überstand		

Ergebnisse:

[0181] Die Fluidmenge, die von der Kollagenfolie eines Equiden aufgesaugt worden ist, wurde nach 1, 2 und 3 Stunde(n) bestimmt, wie es vorstehend angegeben ist.

[0182] Ein Stück des Kollagenfolienmaterials eines Equiden mit einer Abmessung von 1 cm² absorbierte eine Menge von 10 µl des Kochsalzlösungsfluids vollständig ohne ein signifikant sichtbares Quellen der Dicke.

[0183] Eine Menge von 20 µl des Kochsalzlösungsfluids wurde durch das 1 cm²-Stück der Kollagenfolie eines Equiden vollständig absorbiert und führte zu einer geringfügigen Zunahme der Dicke des Materials.

[0184] In der gesamten Reihe wurde nur eine minimale Zunahme der Dicke der Kollagenfolie eines Equiden festgestellt. Es wird angenommen, dass die maximale Dickenzunahme selbst nach 3 Stunden nur etwa das Doppelte des ursprünglichen Volumens beträgt.

[0185] Nach der ersten Stunde wurde keine signifikante Zunahme der Dicke oder der Fluidabsorption festgestellt.

Beispiel 3 – Zunahme der Länge der hydratisierten Kollagenfolie eines Equiden

[0186] Sieben trockene Stücke der Kollagenfolie eines Equiden mit einer Abmessung von 1,0 cm² wurden 1 Stunde in isotonischem Natriumchlorid hydratisiert. Die durchschnittliche Längenerweiterung, die aus der Hydratisierung der trockenen Stücke der Kollagenfolie eines Equiden resultierte, betrug etwa 3,4%.

Tabelle 4

Stück Nr.	Länge trocken (mm)	Länge hydratisiert (mm)
1	17,5	18
2	17,7	18,3
3	17	17,9
4	17,8	18,5
5	18,1	18,7
6	18,6	19,5
7	17,7	18,2
Durchschnitt	17,8	18,4

Beispiel 4 – Zunahme des Gewichts der hydratisierten Kollagenfolie eines Equiden

[0187] Sieben trockene Stücke der Kollagenfolie eines Equiden mit einer Abmessung von 1,0 cm² wurden 1 Stunde in isotonischem Natriumchlorid hydratisiert. Die hydratisierten Stücke der Kollagenfolie eines Equiden wogen etwa fünfmal mehr als in einem trockenem Zustand.

Tabelle 5

Stück Nr.	Trockengewicht (mg)	hydratisiertes Gewicht (mg)
1	8,4	40,2
2	7,6	37,9
3	8	39,3
4	8,1	39,6
5	8,6	41,9
6	8,7	46,8
7	7,7	38,3
Durchschnitt	8,2	40,6

Beispiel 5 – Zugfestigkeit und Elastizität/Flexibilität der Kollagenfolie eines Equiden

[0188] Die Zugfestigkeit mehrerer Dura Mater-Produkte und der erfindungsgemäßen Kollagenfolie eines Equiden wurde gemessen. Die Proben wurden am unteren Ende eines Rohrs montiert und die Zugfestigkeit wurde durch eine kontinuierlich wachsende Wassersäule bis maximal 300 cm bestimmt. Die [Fig. 18](#) veran-

schaulicht die Testkammer.

[0189] Mit der Testkammer konnte die Festigkeit der Dura Mater-Ersatzprodukte durch Identifizieren des Punkts bestimmt werden, an dem ein Produkt aufgrund des Drucks, der die Zugfestigkeit des Produkts überschreitet, versagt. Die erfindungsgemäße Kollagenfolie eines Equiden (Kollagengehalt: 5,6 mg/cm²) und eine Kollagenfolie (Kollagengehalt: 4,0 mg/cm²) wurden mit Duragen (Integra NeuroSciences, Plainsboro, NJ) verglichen.

[0190] Die Testergebnisse zeigten, dass die Kollagenfolie eines Equiden (Kollagengehalt: 5,6 mg/cm²) und die Kollagenfolie (Kollagengehalt: 4,0 mg/cm²) einer Wassersäule von 300 cm ohne Versagen widerstanden, vgl. die [Fig. 19](#) und [Fig. 20](#). Im Vergleich dazu überschreitet der Druck, der in einem gesunden Schädel ausgeübt wird, mehr als etwa 15 cm Wassersäule nicht. In pathologischen Situationen kann der Druck bis auf etwa 50 cm steigen.

[0191] Bei DuraGen wurde eine signifikant niedrigere Zugfestigkeit gemessen und diese riss bei einem Druck von 200 cm Wassersäule, vgl. die [Fig. 21](#).

[0192] Mit der Testkammer konnte auch die Elastizität der Produkte durch Identifizieren des Ausmaßes verglichen werden, in dem das Produkt unter dem Druck gedehnt wird. Die Elastizität/Flexibilität eines Produkts wurde daher durch Messen der Konvexität des Produkts unter dem Gewicht der Wassersäule bestimmt.

[0193] Die Elastizität/Flexibilität der Kollagenfolie eines Equiden (Kollagengehalt: 5,6 mg/cm²) und der Kollagenfolie (Kollagengehalt: 4,0 mg/cm²) wurde mit DuraGen, einer Kollagentestfolie, Tutoplast-Oberschenkel faszie (Tutogen Medical GmbH, Neunkirchen am Brand, Deutschland) und Ethisorb Dura-Patch (Ethicon GmbH & Co. KG, Norderstedt, Deutschland) verglichen, vgl. die [Fig. 22](#) bis [Fig. 25](#).

[0194] Im Vergleich zu den anderen Produkten zeigte die Kollagenfolie eines Equiden (Kollagengehalt: 5,6 mg/cm²) eine Mischung aus einer signifikanten Zugfestigkeit gekoppelt mit einer Elastizität/Flexibilität. Dies ermöglicht es, dass sie dem Druck widersteht, der gegen sie als Dura Mater-Ersatz ausgeübt wird, während sie flexibel und elastisch bleibt, wodurch sie die Konturen des Gehirns und des Kraniaums ausbilden kann. Im Gegensatz dazu zeigten Ethisorb und Tutoplast eine hohe Zugfestigkeit in dem Wassersäulenexperiment, wiesen jedoch eine viel geringere Elastizität/Flexibilität auf.

Beispiel 6 – Flüssigkeitsdichtigkeitseigenschaften

[0195] Messungen von Flüssigkeitsdichtigkeitseigenschaften von Dura Mater-Ersatzprodukten wurden unter Verwendung des gleichen experimentellen Aufbaus durchgeführt, wie er im Beispiel 5 diskutiert worden ist.

[0196] Bei diesem Experiment wurde die Entwicklung von Wassertropfen und das Volumen an verlorengangenenem Wasser bezogen auf die Höhe der Wassersäule gemessen. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in den [Fig. 23](#) bis [Fig. 26](#) veranschaulicht.

[0197] Bei diesem Experiment blieb die Kollagenfolie eines Equiden (Kollagengehalt: 5,6 mg/cm²) unter mehr als 300 cm Wassersäule flüssigkeitsdicht. Die Kollagenfolie (Kollagengehalt: 4,0 mg/cm²) zeigte unter 300 cm Wassersäule einen Verlust an feinen Wassertropfen. DuraGen, das eine poröse Struktur aufweist, war nicht wasserdicht und zeigte selbst bei niedrigen Wasserdrücken einen deutlich sichtbaren Wasserverlust. Entsprechend war die Tutoplast-Oberschenkel faszie ebenfalls nicht wasserdicht und zeigte einen Wasserverlust bei niedrigen Drücken.

Beispiel 7 – Stabilität und Reißfestigkeit

[0198] Nur Materialien, die in einer feuchten und trockenen Umgebung ausreichend stabil, elastisch und reißfest sind, sind als Implantate in speziellen chirurgischen Situationen geeignet, wie z.B. als Dura Mater-Ersatz. Die Bestimmung der Reißfestigkeit/äußersten Zugkraft des befeuchteten Materials stellt daher wertvolle Informationen bezüglich der Struktur, der Stabilität und der Wahrscheinlichkeit bereit, mit der das Material an der chirurgischen Stelle in der richtigen Position bleibt.

[0199] Die Reißfestigkeit Kollagen-enthaltender chirurgischer Implantate wurde mit hydratisierten Prüfkörpern bestimmt, um die Bedingungen nachzuahmen, die im Körper vorherrschen. Die Materialien wurden fünf Minuten in isotonische Kochsalzlösung gelegt.

[0200] Zur Messung der Reißfestigkeit/äußersten Zugkraft wurden Streifen der Kollagenenthaltenden Implantate in eine Allzweck-Testvorrichtung Modell 1120 von Zwick (Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) eingespannt. Die getesteten Kollagen-enthaltenden Implantate sind in der Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6 – Kollagen-enthaltende Implantate

Teststreifen	Mittel	Konzentration	Herkunft
A	„komprimierter“ Kollagenschwamm	10,0 mg/cm ²	Rinder-Lederhaut
B	„Schaum“-Kollagenschwamm	etwa 2,6 mg/cm ²	Achillessehne eines Equiden
C	Kollagenschwamm	2,8 mg/cm ²	Achillessehne eines Equiden
D	Kollagenfolie	4,0 mg/cm ²	Achillessehne eines Equiden
E	Kollagenfolie eines Equiden	5,6 mg/cm ²	Achillessehne eines Equiden

[0201] Die Gerätesteuerung, die Datenerfassung und das Testen, einschließlich einer statistischen Bewertung, wurden unter Verwendung der TestExpert-Software (Zwick GmbH & Co. KG, Ulm, Deutschland) durchgeführt. Die Testschwammprüfkörper A, B und C schienen ziemlich zerbrechlich zu sein. Die Prüfkörper A, B und C wurden in 4 cm-Streifen mit einer Breite von 1,4 cm geschnitten. Die Testergebnisse aller Prüfkörper wurden proportional für einen Streifen mit einer Breite von 1,0 cm berechnet. Die Werte der äußersten Zugkraft der Teststreifen wurden in Newton/cm – Streifen gemessen. Die Testergebnisse sind in der Tabelle 7 und in der [Fig. 27](#) angegeben.

Tabelle 7 – Reißfestigkeit/äußerste Zugkraft

Teststreifen	Reißfestigkeit/äußerste Zugkraft (Newton/cm - Streifen)	Standardabweichung
A	0,46	0,19
B	0,45	0,11
C	1,64	0,69
D	3,21	0,69
E	4,09	0,24

Schlussfolgerungen

[0202] Das spezielle Verfahren zur Herstellung der Kollagenfolie eines Equiden erhöht deren Reißfestigkeit/äußerste Zugkraft.

[0203] Verglichen mit Kollagen-enthaltenden Schwämmen zeigten Kollagen-enthaltende Folien eine signifikant höhere Reißfestigkeit/äußerste Zugkraft.

[0204] Die Reißfestigkeit von Kollagen-enthaltenden Folien erhöhte sich mit dem Kollagengehalt pro Quadratcentimeter (z.B. Kollagengehalt von 4,0 mg/cm²: 3,21 N/cm – Streifen; Kollagengehalt von 5,6 mg/cm²: 4,09 N/cm – Streifen).

[0205] Im Hinblick auf die vorstehenden Erläuterungen ist ersichtlich, dass die verschiedenen Aufgaben der Erfindung gelöst worden sind.

[0206] Bezüglich der Verwendung des Worts (der Worte) „umfassen“ oder „umfasst“ oder „umfassend“ in der gesamten Beschreibung (einschließlich der nachstehenden Ansprüche) wird angemerkt, dass diese Worte, falls sich aus dem Zusammenhang nichts anderes ergibt, auf der Basis und dem eindeutigen Verständnis verwendet werden, dass sie als einschließlich und nicht als ausschließlich interpretiert werden sollen, und dass jedes dieser Worte bei der Analyse der gesamten Beschreibung so interpretiert werden soll.

Patentansprüche

1. Verwendung einer Kollagenfolie eines Equiden, welche eine nicht natürlich vorkommende Biomatrix aus mehreren Schichten von Kollagenfibrillen eines Equiden umfasst, die nicht durch Chemikalien oder Strahlung vernetzt sind, wobei die Biomatrix im Wesentlichen nicht porös ist und im Wesentlichen aus azellulären Komponenten besteht, wobei die Komponenten Bindegewebsproteine umfassen, zur Herstellung eines Medikaments für die Wiederherstellung und Regeneration von Dura Mater-Gewebe in einem Säuger durch Inkontaktbringen des Dura Mater-Gewebes mit der Folie.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Kollagenfibrillen eines Equiden sich von Sehnen ableiten.
3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei die Sehnen Achillessehnen sind.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Kollagenfolie eines Equiden resorbierbar ist.
5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Dura Mater-Gewebe Wiederherstellung und Regeneration in Folge eines angeborenen Zustands, eines Geburtsfehlers, einer Krankheit, einer Verletzung oder eines chirurgischen Verfahrens benötigt.
6. Verwendung nach Anspruch 5, wobei das chirurgische Verfahren die Entfernung eines Tumors ist.
7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Dura Mater-Gewebe im Cranium angeordnet ist.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Dura Mater-Gewebe in der Wirbelsäule angeordnet ist.
9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Kollagenfolie eines Equiden in ihrer trockenen Form eine Dicke von zwischen 0,01 mm und 3,0 mm, beispielsweise zwischen 0,02 und 2,0 mm, 0,03 mm und 1,5 mm oder 0,05 mm und 1,0 mm, aufweist.
10. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Kollagenfolie eines Equiden in ihrer trockenen Form eine Dicke von 1,0 mm oder weniger aufweist.
11. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Schritt des Inkontaktbringens das Anheften der Kollagenfolie eines Equiden an dem Dura Mater-Gewebe mit Fibrin-Dichtmittel, Gewebekleber und/oder chirurgischen Nähten und/oder unter Verwendung von Druck-Einpass-Techniken oder unter Verwendung der natürlichen Adhäsion zwischen der Kollagenfolie eines Equiden und dem Dura Mater-Gewebe umfasst.
12. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Kollagenfolie eines Equiden im Wesentlichen flüssigkeitsdicht ist.
13. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Kollagenfolie eines Equiden vor dem Schritt des Inkontaktbringens für beispielsweise 5 Sekunden bis 10 Minuten, bevorzugt 1 bis 6 Minuten, in physiologischer Kochsalzlösung vor dem Schritt des Inkontaktbringens hydratisiert wird.
14. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei die Kollagenfolie eines Equiden vor dem Schritt des Inkontaktbringens nicht hydratisiert wird.
15. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Kollagenfolie eines Equiden, wenn vollständig hydratisiert, bis zu 15 Mal, bevorzugt nur bis zu 10 oder bis zu 5 Mal so viel wiegt, wie das Trockengewicht.
16. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Kollagenfolie eines Equiden, wenn trocken, zwischen 1 mg/cm² und 50 mg/cm², beispielsweise zwischen 2,5 mg/cm² und 10 mg/cm², wiegt.
17. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 15, wobei die Oberfläche der Kollagenfolie eines Equiden, wenn vollständig hydratisiert, zwischen -5% und 20% größer, bevorzugt -5% bis 10% größer oder -5% bis 5% größer ist, als in ihrer trockenen Form, beispielsweise bis zu 4% größer als in ihrer trockenen Form.
18. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Dicke der Kollagenfolie eines Equiden, wenn vollständig hydratisiert, 2 Mal oder 3 Mal so groß ist, wie die Dicke in ihrer trockenen Form.
19. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Säuger aus der Gruppe, bestehend aus Menschen, Pferden, Schafen, Affen und Labortieren, ausgewählt wird.
20. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Kollagenfolie eines Equiden wei-

ter ein Mittel, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem Konservierungsmittel, einem Wachstumsfaktor, einem Additiv, welches die Flexibilität und Elastizität der Kollagenfolie eines Equiden unterstützt, und Kombinationen davon, umfasst.

21. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Kollagenfolie eines Equiden keine Viren oder Prionen enthält.

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Kollagenfibrillen im Wesentlichen aus Typ I Kollagen bestehen.

23. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Kollagenfolie eines Equiden eine äußerste Zugkraft von zwischen 0,5 Newton/cm-Streifen und 30 Newton/cm-Streifen, beispielsweise zwischen 1 Newton/cm-Streifen und 6 Newton/cm-Streifen, aufweist.

Es folgen 22 Blatt Zeichnungen

FIG. 1

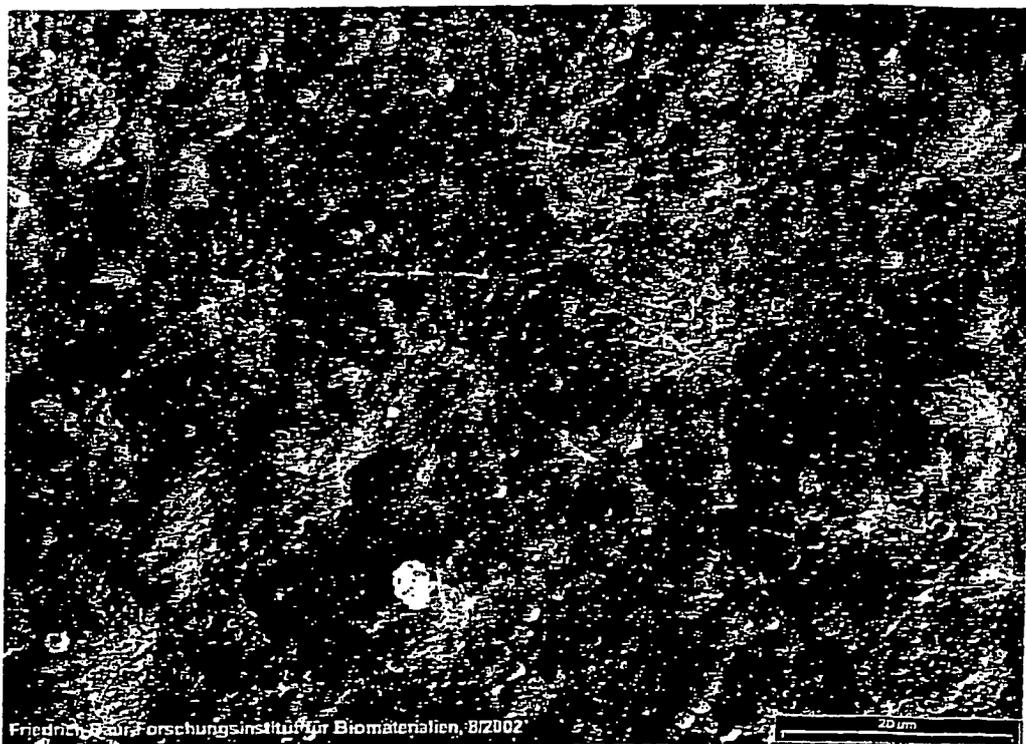


FIG. 2A

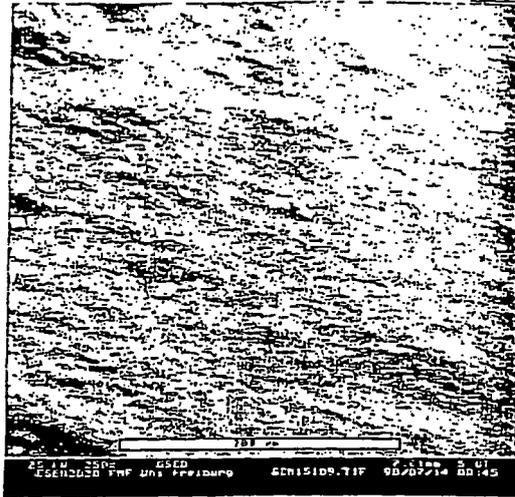


FIG. 2B

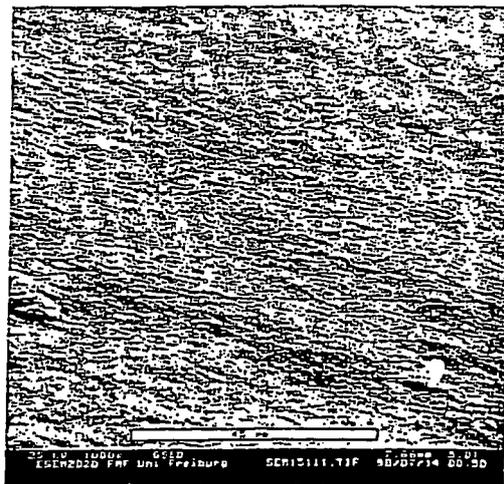


FIG. 3A



FIG. 3B

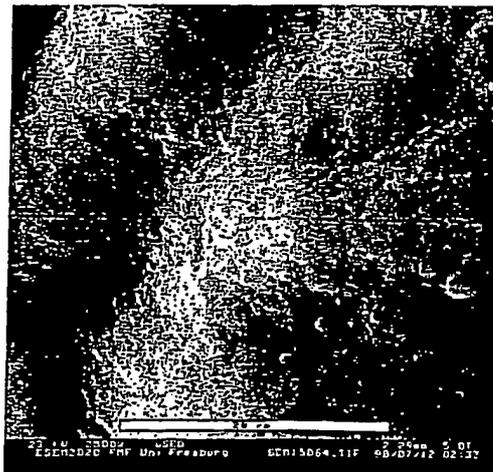


FIG. 4

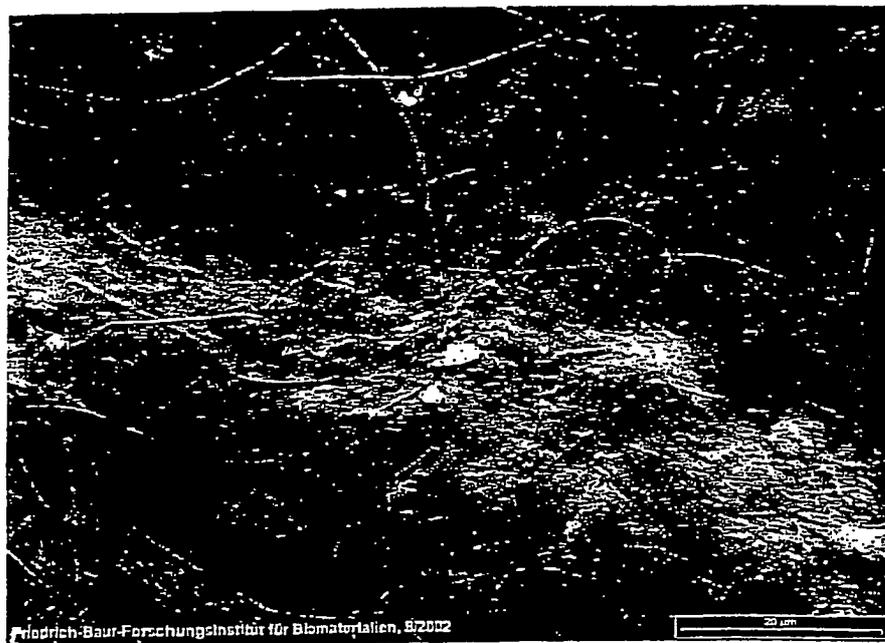


FIG. 5A

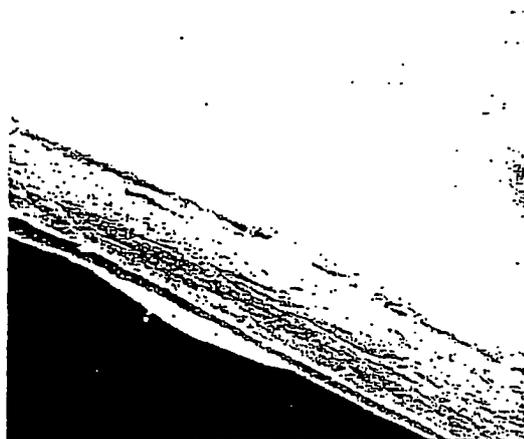


FIG. 5B

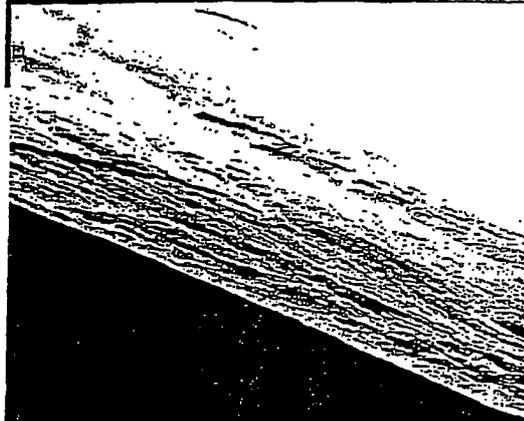


FIG. 5C

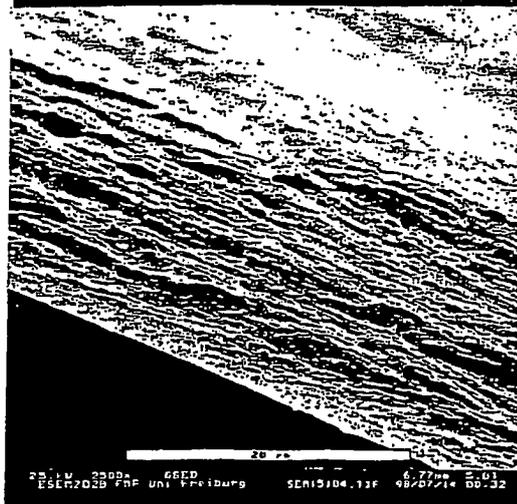


FIG. 6A

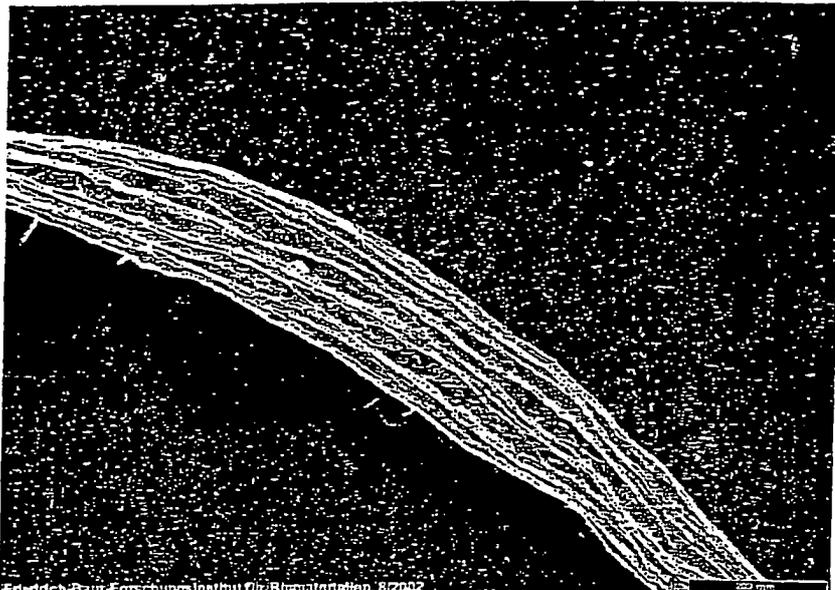


FIG. 6B

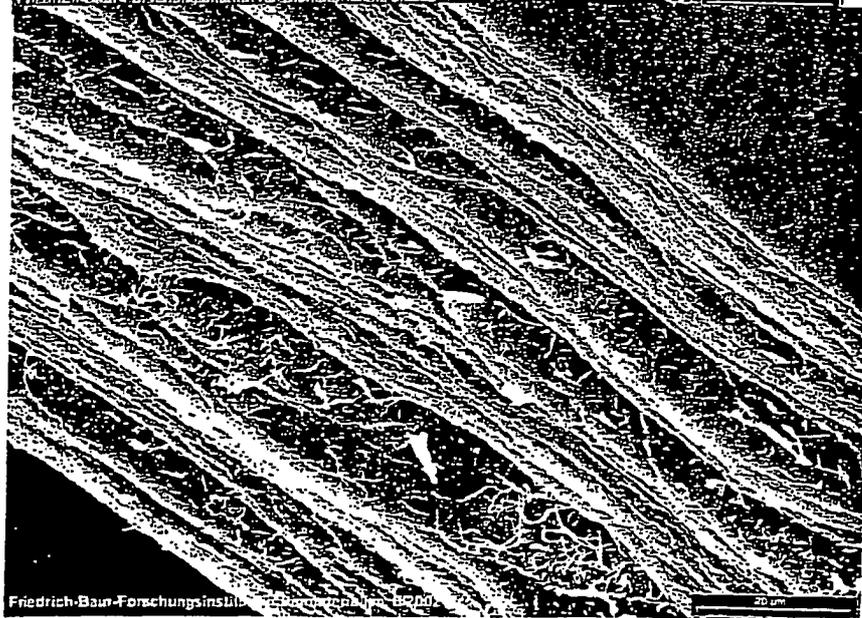


FIG. 7



FIG. 8



FIG. 9

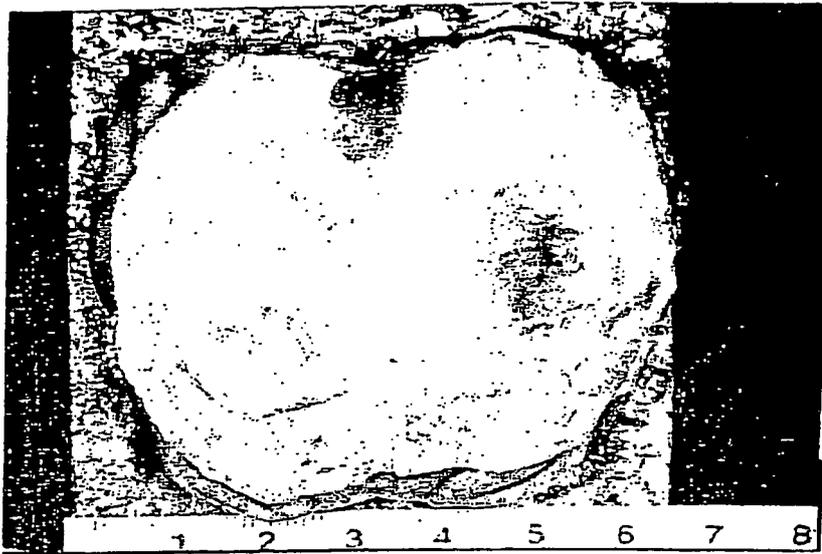


FIG. 10

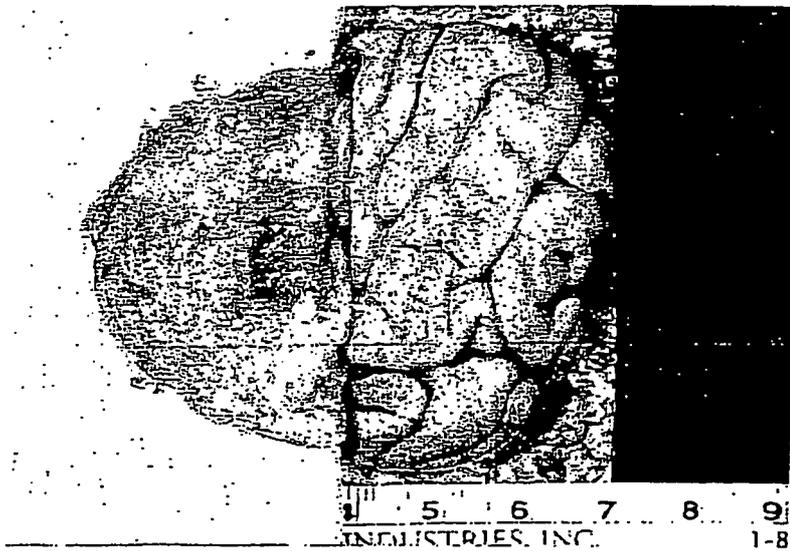


FIG. 11

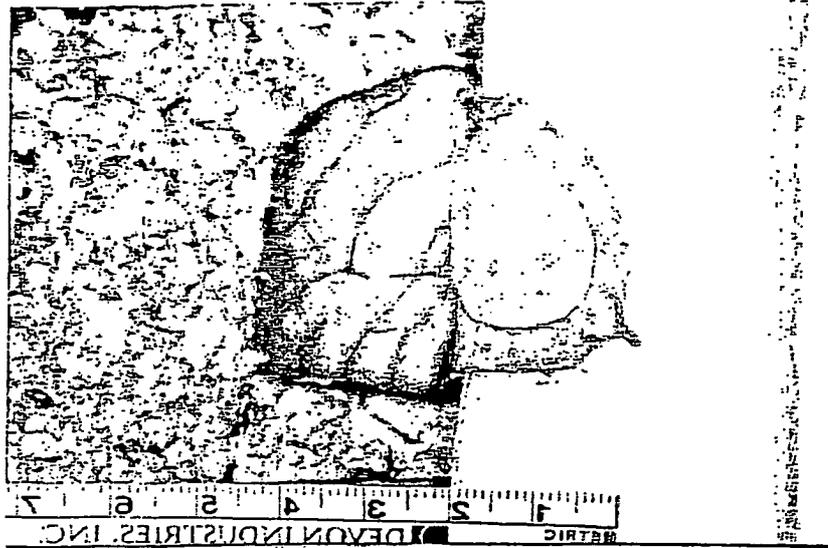


FIG. 12

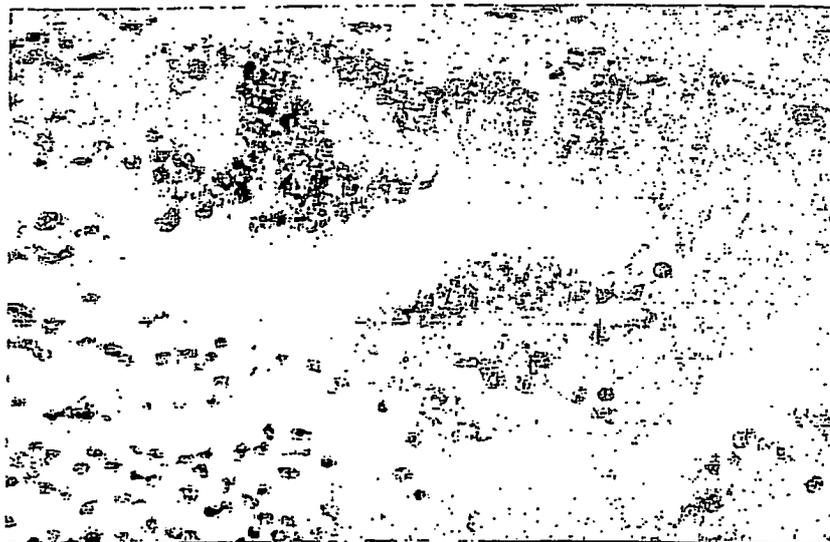


FIG. 13

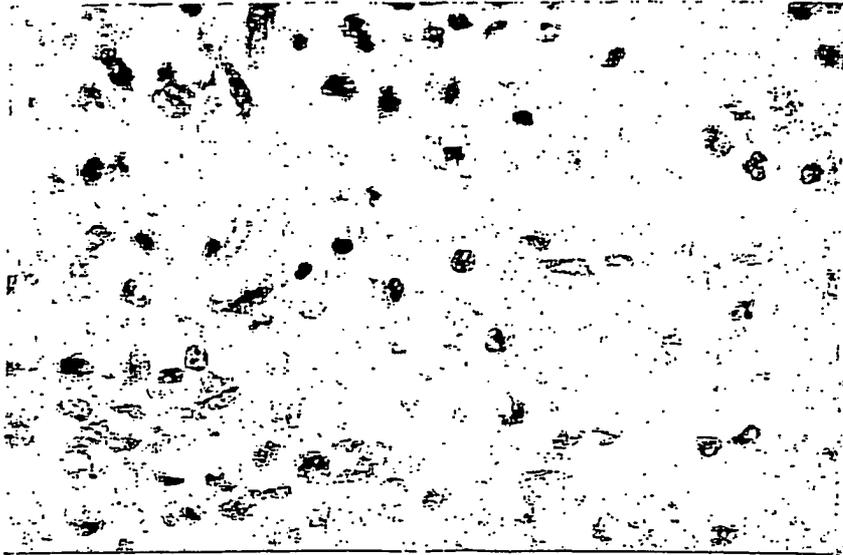


FIG. 14

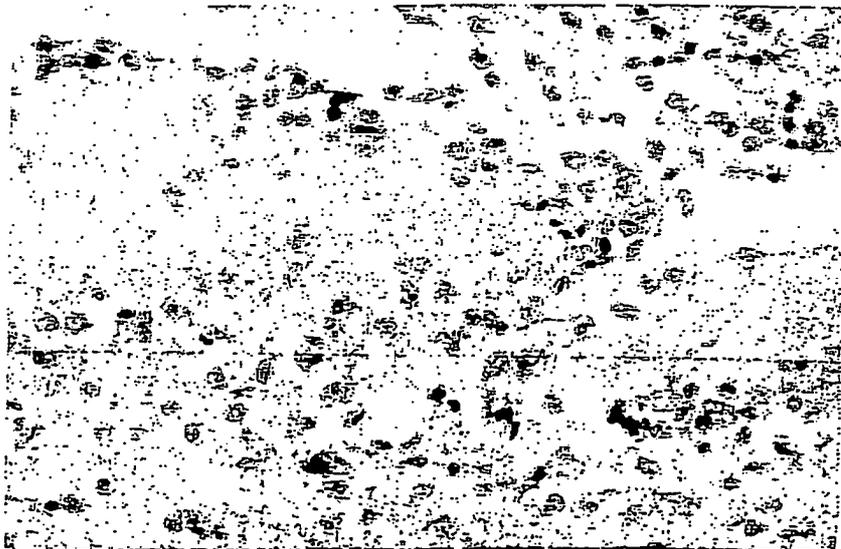


FIG. 15



FIG. 1



FIG. 17



FIG. 18

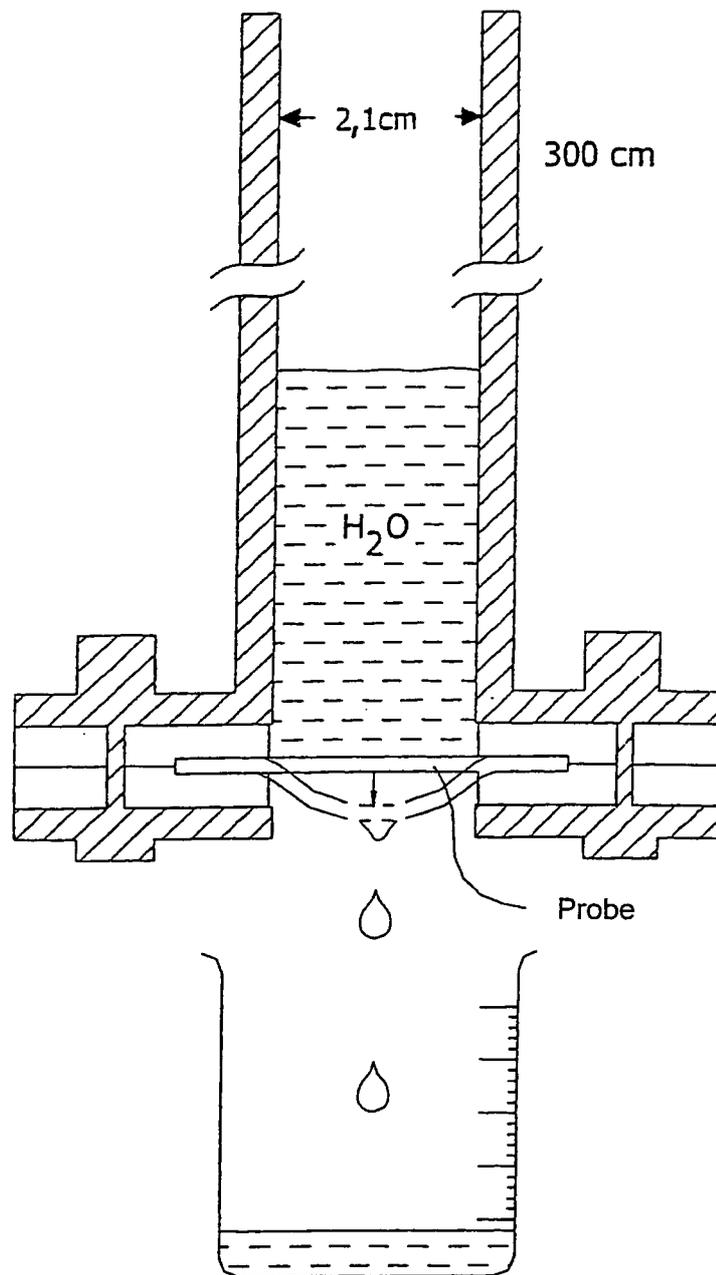


FIG. 19

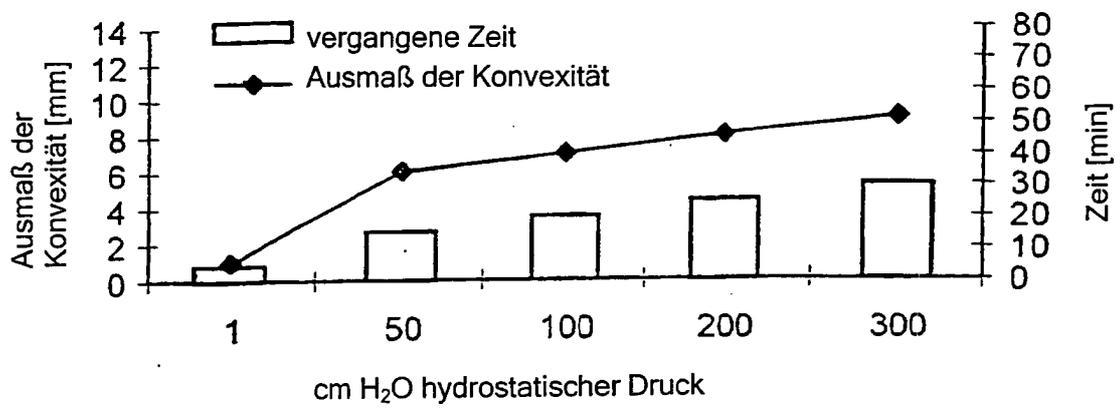


FIG. 20

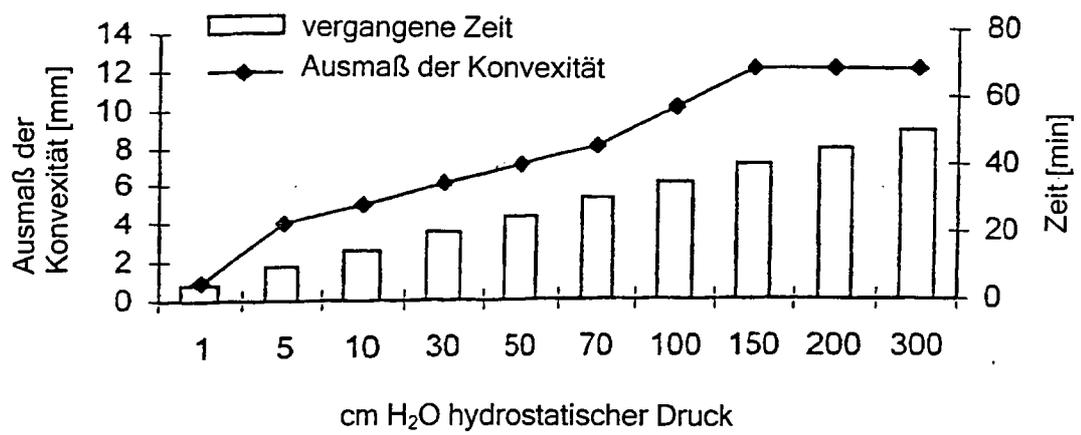


FIG. 21

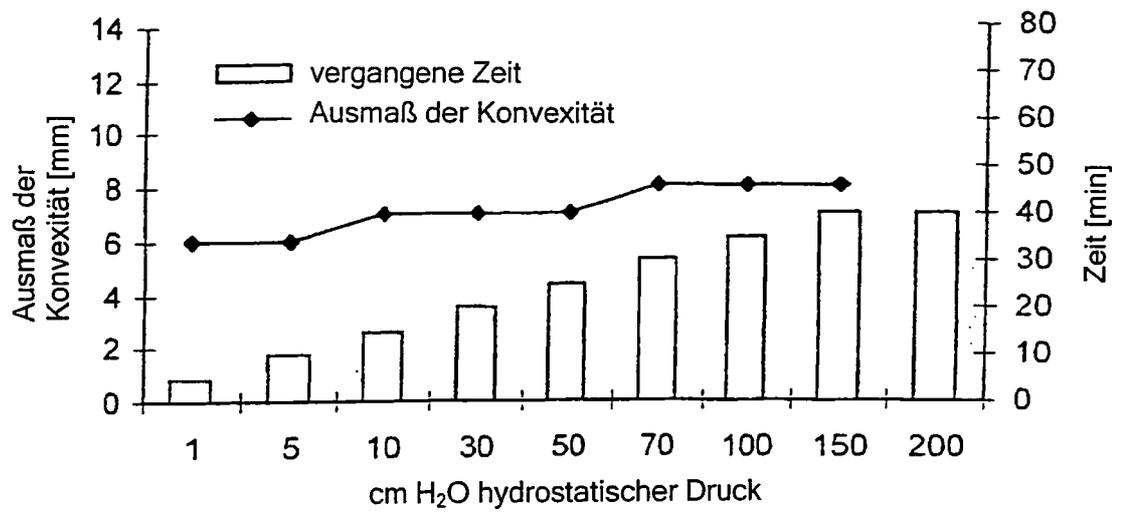


Fig. 22

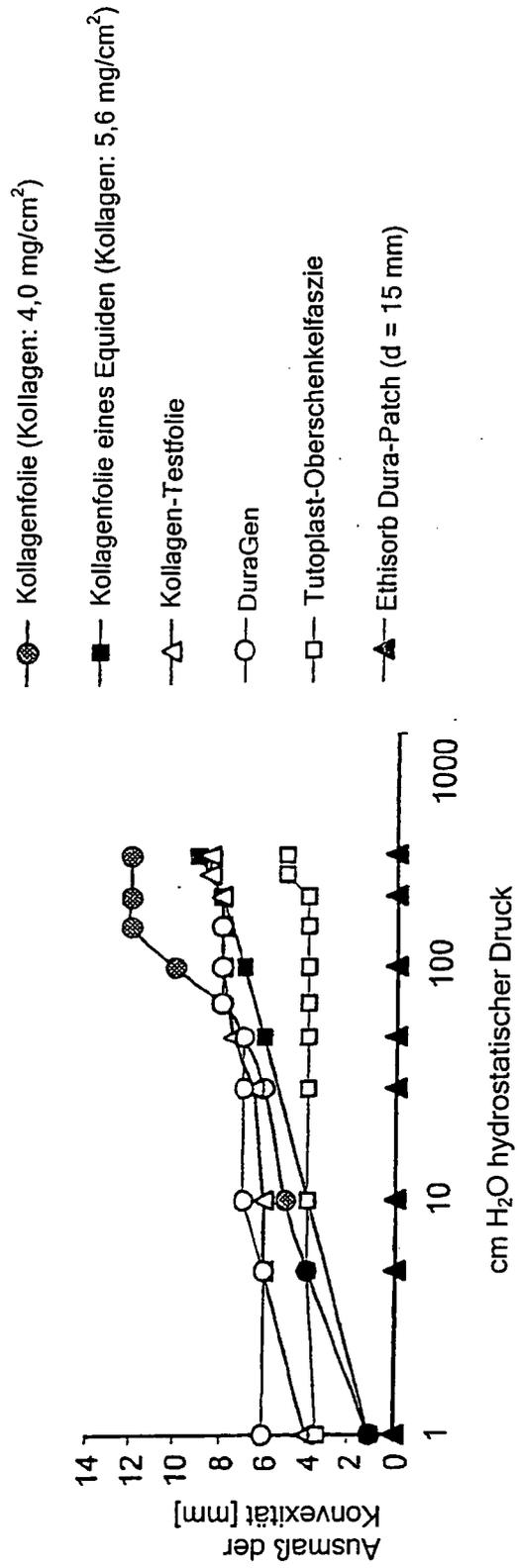


Fig. 23

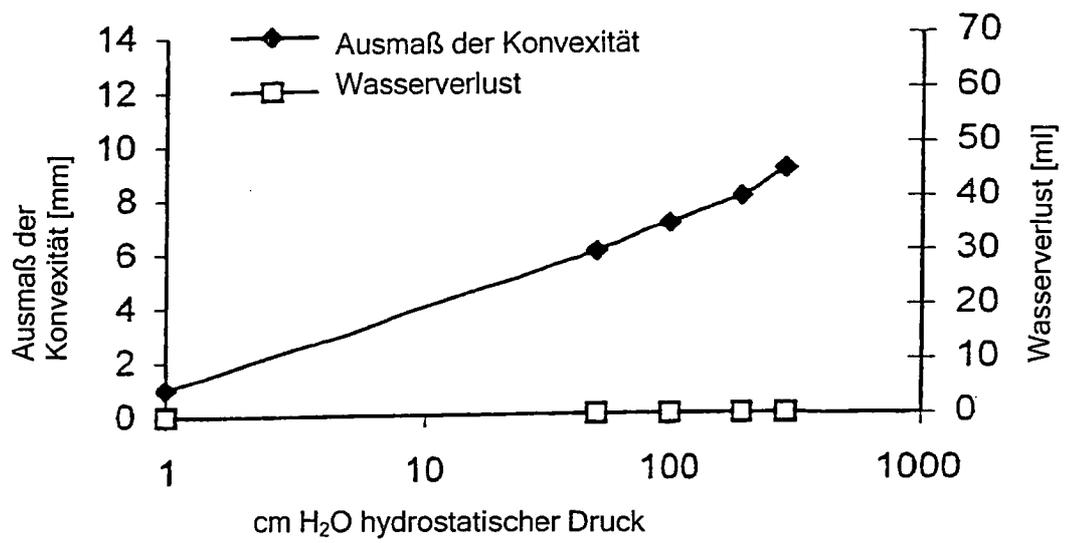


FIG. 24

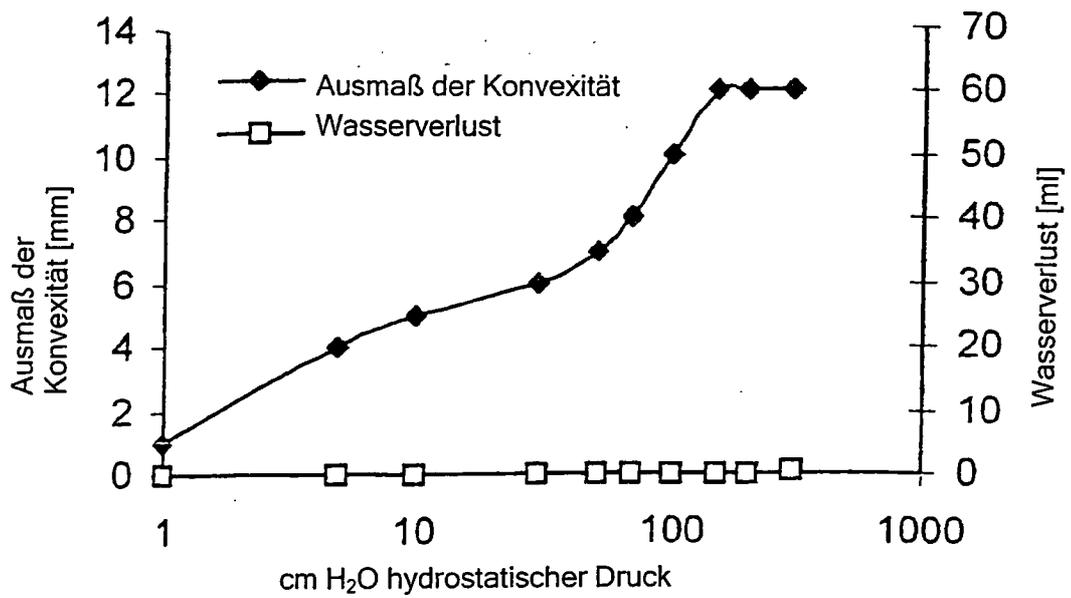


FIG. 25

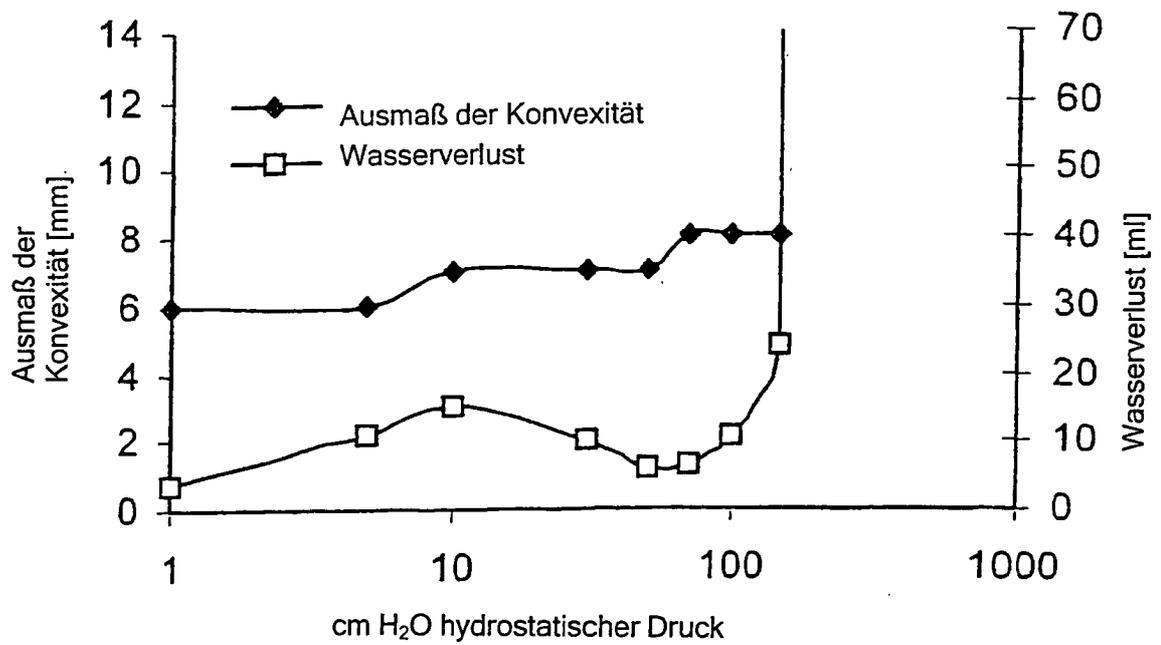


Fig. 26

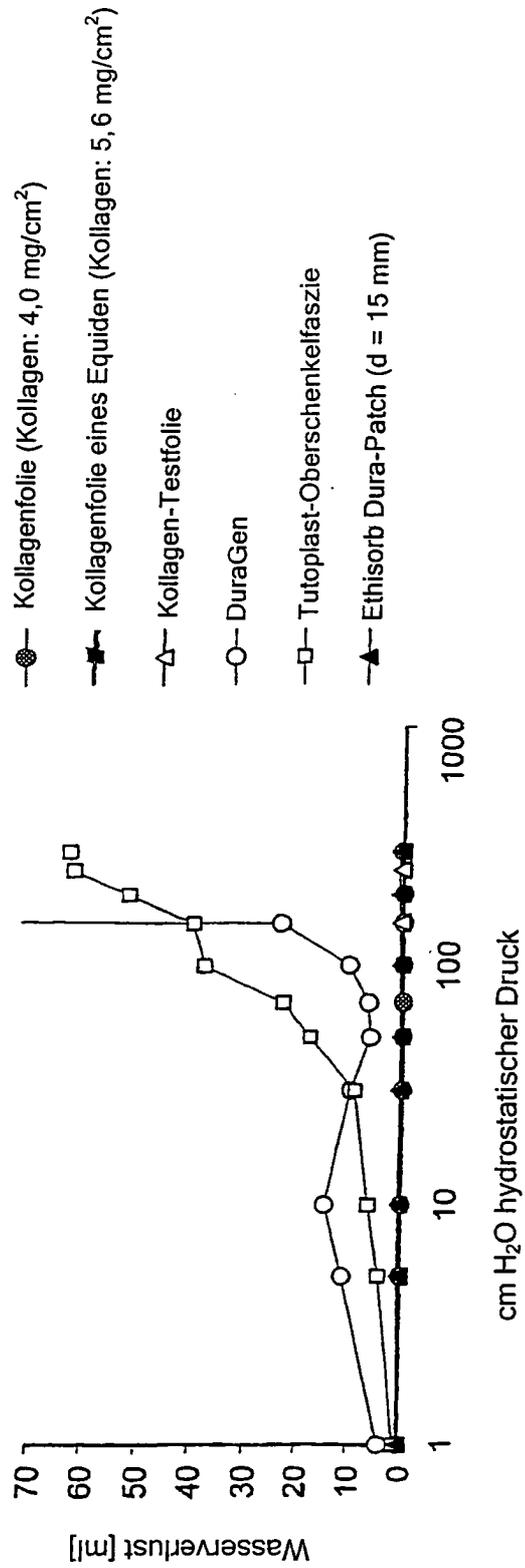


FIG. 27

