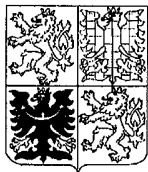


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05.03.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **05.03.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/1005445**

(33) Země priority: **NL**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.02.2000**
(Věstník č. 2/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/NL98/00129**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/47471**

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 3134

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 7/06

C 12 N 5/06

C 12 N 5/00

(71) Přihlašovatel:

GHOST HOLDING B. V., Bunde, NL;

(72) Původce:

Gho Conradus Ghosal, Bunde, NL;

(74) Zástupce:

**PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1, Praha 4,
140 00;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

Metoda vlasové propagace

(57) Anotace:

Metoda reprodukce vlasů, která obsahuje následující kroky: /1/ odebrání vlasů v anagenní fázi z jedné nebo více donorových oblastí tak, že je stále zachována cibulková podstata odebraného vlasu v anagenní fázi; /2/ pěstování vlasových folikulových buněk z odebraného vlasu za takových podmínek, že vlasové folikulové buňky jsou schopné množení, a /3/ implantace vypěstovaných vlasových folikulových buněk do recepčních oblastí. Prostředek obsahující nejméně jeden vhodný keratinocytový kultivační prostředek neobsahující sérum a extrakty z nejméně jedné řady lidské žírné buňky a metoda pro pěstování vlasových folikulových buněk z vlasů a anagenní fázi, při níž je jeden nebo více vlasů v anagenní fázi vloženo do zmíněného prostředku.

Upravené nároky

METODA VLASOVÉ PROPAGACE

Oblast techniky

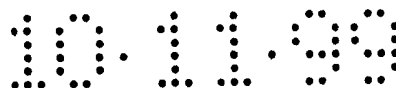
Předložený vynález se týká nejprve metody reprodukce vlasů. Vynález se také týká metody pěstování vlasových folikulových buněk z anagenetických vlasů v anagenní fázi, dále prostředku, který je velmi vhodný pro pěstování vlasových folikulových buněk, metody přípravy takového prostředku a výchozího prostředku.

Dosavadní stav techniky

Hlavní růstové struktury vlasů jsou tzv. vlasové folikuly, které jsou přítomny v pokožce. Vlasové folikulové buňky nebo keratinocyty se reprodukuji z těchto vlasových folikulů, během jejich cesty na povrch pokožky je přeměněna cytoplazma zmíněných buněk velkým počtem komplexních procesů v pevnou a pružnou hmotu, která je známa jako vlas. Růstový cyklus vlasu může být rozdělen do tří fází: anagenní nebo růstová fáze, katagenní nebo přechodová fáze a telogenní nebo odumírací fáze. Vlasový folikul je jedinečný svou cyklickou povahou tvorby vlasu a vlasového růstu. Zvláštností je, že vlasový folikul je jedinou částí lidského těla, která obsahuje růstové jádro, z něhož mohou být produkovány nové vlasy po odstranění vlasu starého.

Je známo, že vlasové folikulové buňky můžou být vypěstovány z vytrženého lidského vlasu. Je také známo, že je možné použít takto pěstovaných buněk k vytvoření diferenciovaného nebo plně rozvinutého epidermis, oba in vitro a in vivo. Vlasové folikulové buňky vypěstované u myši mohou stimulovat vlasový růst, když jsou zmíněné buňky implantovány do testovaných zvířat. Nicméně dodnes se neukázalo možným docílit nového růstu vlasů u člověka na takovém místě, kde není žádný vlas (již dlouho) za pomoci vypěstovaných autologovaných vlasových folikulových buněk.

Lidé vždy považovali ztrátu vlasů z kosmetického a estetického hlediska za nežádoucí. Avšak holohlavost se vyskytuje často a je známým fenoménem, který začíná zvláště u stárnoucích mužů. Tato forma ztráty vlasů je známa jako alopecia androgenetica. Dodnes není přesně známo, proč některé části skalpu jsou



náchylné k této alopecii andragogenetice a jiné ne. Avšak u žen se také pravidelně objevuje to, že vlasy jsou slabší a dokonce do značné míry hrozí jejich vypadávání. Hlavně pro ženy je to velmi nepříjemné z kosmetického a estetického hlediska.

Známostou metodou v boji proti ztrátě vlasů je transplantace vlasů. Tímto postupem se odejme včetně kůže část vlasy pokryté donorové oblasti, která se často nachází v týle hlavy, a rozřeže se na malé kousky, které mají obvykle jen jeden až tři vlasy. Tyto části jsou pak implantovány do ztrátou vlasů postižené oblasti (recepční oblasti). Velkou nevýhodou této metody je fakt, že je na úkor donorové oblasti. Vlas je odebrán z této oblasti a znovu už se tam neobjeví. Transplantační metoda proto nabízí jen omezené možnosti.

Podstata vynálezu

Cílem předloženého vynálezu je poskytnout metodu, pomocí které se mohou na holých místech znovu objevit vlasy, ale která nemá nevýhody vlasové transplantace, jak bylo zmíněno výše. Druhým cílem vynálezu je poskytnout metodu, díky níž by bylo dosaženo nového růstu vlasů u člověka, pomocí vypěstovaných vlasových folikulových buněk. Dalším cílem vynálezu je poskytnout metodu, jejíž provádění je relativně jednoduché.

Zmíněných cílů je dosaženo pomocí metody ve shodě s vynálezem, v níž je vlas reprodukován. Podle vynálezu je vlas odebrán z donorové oblasti takovým způsobem, že se nové vlasy vrátí na své místo. Zatímco jsou pěstovány nové vlasové folikulové buňky z buněk odebraných vlasů, tvoří se postupně nové vlasy.

Vynález tudíž pojednává o metodě reprodukce vlasů, která obsahuje následující kroky:

- (1) odebrání vlasů v anagenní fázi z jedné nebo více donorových oblastí tak, že je stále zachována cibulková podstata odebraného vlasu v anagenní fázi;
- (2) pěstování vlasových folikulových buněk z odebraného vlasu za takových podmínek, že vlasové folikulové buňky jsou schopné množení; a
- (3) implantace vypěstovaných vlasových folikulových buněk do recepční oblasti.

Metoda ve shodě s vynálezem má tu hlavní výhodu, že růstu vlasů může být dosaženo znovu na holých místech, aniž by to bylo na úkor donorové oblasti.

Krok (1) metody podle vynálezu zahrnuje odebrání vlasu v anagenní fázi z donorové oblasti, kde se vyskytují takové vlasy. Jak bylo vysvětleno výše, růst vlasu má tři fáze: anagenní, katagenní a telogení. Pouze vlasy v anagenní fázi jsou vhodné pro

metodu podle vynálezu. Ve srovnání s vlasy v katagenní a telogenní fázi jsou vlasy v anagenní fázi charakteristické tím, že mají v dolní části vlasu - často pigmentovanou - cibulku tvaru, jenž je charakteristický pro vlasy v anagenní fázi. Toto je obecně známo, a proto pro zkušené oko je vlas v anagenní fázi ihned rozpoznatelný podle tvaru cibulky. V případě pochybnosti poskytne konečnou odpověď mikroskop. Odebrání vlasů v anagenní fázi může proto být prováděno různými způsoby, zůstane-li v anagenní fázi charakteristická cibulka vlasů na odebíraném vlasu.

Počet vlasů v anagenní fázi potřebných k vypěstování přiměřeného množství vlasových folikulových buněk není omezený, protože v podstatě může být vypěstován nekonečný počet vlasových folikulových buněk z jediného vlasu. Subkultury mohou být postupně vypěstovány z první kultury a postupně může být vypěstováno několik kultur z každé subkultury. V praxi budou rozmnoženy 3 vlasy na 10 vlasů v anagenní fázi. Vlasy, které se konečně vytvoří v recepci oblasti z vypěstovaných vlasových folikulových buněk, přejímají vlastnosti vlasů z donorové oblasti, z nichž byly vypěstovány vlasové folikulové buňky. Proto oblast, která není náchylná k alopecii androgenetice, je považována za vhodnou donorovou oblast. Avšak to není podstatné.

Jelikož rozdíl mezi vlasy v různých stádiích růstu je nejlépe viděn, jakmile jsou vlasy odebrány, upřednostňuje se provedení kroku (1) následujícími mezikroky:

(1a) vytržení vlasu z donorové oblasti, a

(1b) výběr vhodných vlasů v anagenní fázi.

Pro vytrhávání vlasů z donorové oblasti jsou velmi vhodné například pinzety.

Při kroku (2) metody podle vynálezu jsou vlasy pěstovány z odebraných vlasů za takových podmínek, že vlasové folikulové buňky jsou schopné množení. V podstatě vlasové folikulové buňky mohou být vypěstovány z vlasů známým způsobem. Kultivační prostředky pro tento účel jsou obchodně dostupné stejně tak jakékoliv přídavné růstové doplňky. Takovými kultivačními prostředky jsou také takzvané keratinocytové kultivační prostředky neobsahující sérum a obvykle obsahující esenciální a neesenciální aminokyseliny, vitamíny, stopové prvky, organické složky a anorganické soli. Tyto kultivační prostředky mohou být kombinovány také s růstovými doplňkovými činidly, která obsahují růstové faktory, hormony, antibiotika a extrakty tkáně jako např. BPE (extrakt hovězí hypofýzy), inzulin, hydrokortizon, HEGF (lidský epidermální růstový faktor), TGF (transformační růstový faktor), L-cystein, L-leucin a gentamicin.

Bylo zjištěno, že zvláště dobré výsledky byly získány tehdy, když kultivační prostředek, který kromě známého výše popsaného kultivačního prostředku případně doplněného jedním nebo více růstovými činidly, obsahuje extrakty nejméně z jedné řady lidské žírné buňky a je použit v kroku (2) metody podle vynálezu. Lidské žírné buňky jsou obecně známy. Obsahují různé růstové faktory a jsou produkovány a spotřebovávány v různých místech těla. Výtažky z řady lidských žírných buněk a/nebo autologované (vypěstované) buňky CD34⁺ a/nebo činidla podporující růst obsahují růstové faktory. Nicméně dodnes tyto extrakty z řady lidské žírné buňky a/nebo z autologovaných (vypěstovaných) buněk CD34⁺ a/nebo činidel podporujících růst nebyly použity v prostředku pro pěstování vlasových folikulových buněk. Řada lidské žírné buňky, z níž se použije extrakt, je HMC-1 (řada lidské žírné buňky 1) nebo buněčná řada z ní odvozená, jako jsou subklony 5C6 a KU812. Řady žírných buněk jako HMC-1 a její subklony jsou proto obchodně dostupné.

Extrakty z řady lidské žírné buňky můžou být velmi vhodně zavedeny do prostředku přidáním alespoň jedné řady lidské žírné buňky nebo jejího subklonu a nejméně jednoho degranulačního činidla do keratinocytového kultivačního prostředku neobsahujícího sérum. Můžou být také přidány anorganické soli pro lepší využití působení degranulačního činidla. V tomto kontextu je vhodnou solí NaCl₂. Degranulační prostředek potom takřka rozřeže žírné buňky na menší části (degranulace), výsledkem čehož je uvolnění růstových faktorů do prostředku. Po degranulaci jsou zbytky žírných buněk odstraněny např. odstředěním. Výsledný upravený prostředek lze pak použít k pěstování vlasových folikulových buněk.

Degranulační činidla jsou obecně známa a můžou být rozdělena zhruba do tří skupin:

- hormony jako estrogeny a bradykinin,
- nervové mediátory a antigeny jako apitoxin; substance P a Ig E, a
- syntetická činidla jako Compound 48/80 a Inophore A23187.

Tato degranulační činidla, která jsou schopna degranulace případně použitých žírných buněk, jsou vhodná pro použití v metodě podle předloženého vynálezu.

Alternativou je nejprve oddělená příprava extraktů žírných buněk a přidání těchto extraktů do keratinocytového kultivačního prostředku neobsahujícího sérum.

Podmínky, za nichž můžou být pěstovány vlasové folikulové buňky v kroku (2) se můžou podstatně lišit a jsou závislé mj. na použitém prostředku. Nicméně bylo zjištěno, že pěstování vlasových folikulových buněk při teplotě od 30 °C do 40 °C,

přednostně v inkubátoru, kde teplota může být udržována konstantní, v atmosféře, která je nasycena vodou a která obsahuje 3 % až 10 % objemových procent CO_2 kromě jiných složek vzduchu v obvyklých kvantitách, přináší dobré výsledky. Avšak tyto podmínky nejsou nijak omezující a i jiné podmínky můžou být také využity. Doba pěstování se liší od kultury, obvykle od 10 dnů do 40 dnů. Pro získání dobrého výsledku se upřednostňuje nahrazení prostředku čerstvým prostředkem každé 2 až 5 dnů.

Krok (2) metody podle vynálezu může být proveden v jednom stupni pěstování, ale také v několika podstupních pěstování subkultur z původní kultury nebo kultur. To může být uskutečněno odebráním dostatečného počtu vlasových folikulových buněk ze základní kultury, když tato obsahuje dostatek vlasových folikulových buněk. Vlasové folikulové buňky ze základní kultury jsou vypěstovány postupně, přednostně - ale ne nezbytně - ve stejném kultivačním prostředku jako byla pěstována původní základní kultura. V průběhu času je možné, ne-li žádoucí, vypěstovat ještě další kultury od zmíněných subkultur, atd. atd.

Poté, co byly vlasové folikulové buňky vypěstovány, musí být odděleny od substrátu, na němž rostly. To je provedeno známými metodami např. užitím roztoku trypsinu (0,1 % až 0,5 % hmotnostních procent ve vodě) případně v kombinaci s roztokem EDTA (0,1 % až 0,5 % hmotnostních procent) v PBS (fosfátový pufovaný fyziologický roztok). Takové metody jsou obecně známy. Před použitím vypěstovaných vlasových folikulových buněk v kroku (3) je lepší odstranit žírné buňky, jsou-li (stále) přítomny.

V kroku (3) metody podle tohoto vynálezu jsou vypěstované vlasové folikulové buňky implantovány do pokožky v recepční oblasti. Bylo zjištěno, že velmi dobré výsledky jsou získány, když vypěstované vlasové folikulové jsou implantovány přímo do pórů recepční oblasti. Pokud jsou póry špatně vidět, což se může stát hlavně u bledé barvy kůže, můžou být zviditelněny aplikací tekutiny (obvykle žlutě zbarvené) na pokožku v recepční oblasti, která ztmavne tam, kde jsou póry, což je výsledek vyloučení potu z potních žláz přítomných v pórech. Příkladem takového roztoku je 1% až 10% roztok oftaldialdehydu např. ve xylenu nebo ethyléteru, jak ho popsali L. Juhlin a W. B. Suelley v Nature, 28. ledna 1967, strana 408.

Přednostně je množství suspenze vypěstovaných vlasových folikulových buněk zavedeno do každého póru tak, že zmíněné množství obsahuje dostatek vlasových folikulových buněk, aby umožnilo rozvoj vlasového folikulu, z něhož může vyrůst vlas. Počet vypěstovaných vlasových folikulových buněk potřebných k tomu, aby se

vytvořil vlasový folikul, je velmi závislý na stupni diferenciaci nebo růstovém potenciálu vypěstovaných buněk. Přirozeně bude zapotřebí méně vypěstovaných buněk, když vypěstované vlasové folikulové buňky budou mít relativně vysoký stupeň diferenciaci, než když vypěstované buňky mají tento stupeň relativně nízký. Existuje velký počet faktorů, které ovlivňují stupeň diferenciaci vypěstovaných vlasových folikulových buněk. Například použitý prostředek a doba pěstování jsou takovými důležitými faktory. Přednostně se používá suspenze vypěstovaných vlasových folikulových buněk v prostředku, v němž zmíněné buňky byly pěstovány. Suspenze má přednostně takovou koncentraci vlasových folikulových buněk, že 0,01 μ l až 5 μ l, lépe však 0,1 μ l až 5 μ l suspenze stačí na jeden pór. Toto malé množství je vstříknuto do póru pomocí dávkovacího zařízení, které je opatřeno dutou jehlou, přednostně jehlou 18 až 30 Gauche (G). Použitým dávkovacím zařízením může být např. elektronický dávkovací systém pro pipetu, jehla 18 - 30 G je na konci vybavena dávkovací hadičkou nebo pipetou. Pro průměr póru se hlavně u skalpu užívá přednostně dutá jehla 27 G. Nicméně menší nebo větší jehly mohou být také použity v jiné části těla.

Vynález se také týká metody pěstování vlasových folikulových buněk z vlasů v anagenní fázi; jeden nebo více vlasů v anagenní fázi je umístěno do prostředku, který obsahuje nejméně jeden vhodný keratinocytový kultivační prostředek neobsahující sérum a extrakty alespoň z jedné řady lidské žírné buňky. Způsob, jakým může být takový prostředek získán, byl již popsán výše.

Pokud jde o přednosti různých použitých látek prostředku a podmínek pěstování, jsou stejné jako ty pro prostředek a podmínky užití v kroku (2) metody již popsané výše. Proto je lepší použít extrakty řady lidské žírné buňky HMC-1 nebo buněčnou řadu od ní odvozenou, přednostně subklonu 5C6 nebo KU812. Vhodné podmínky zahrnují kultivační teplotu od 30 °C do 40 °C v atmosféře, která je nasycena vodou a obsahuje 3 % až 10 % objemových procent CO₂.

Vynález se také týká prostředku pro pěstování vlasových folikulových buněk z vlasů v anagenní fázi a metody přípravy zmíněného prostředku. Prostředek podle vynálezu obsahuje nejméně jeden keratinocytový kultivační prostředek neobsahující sérum a extrakty alespoň z jedné řady lidské žírné buňky. Zvláštním význačným rysem takového prostředku je hlavně to, že obsahuje růstové faktory pocházející z jedné nebo více řad lidských žírných buněk.

Upřednostňovaný prostředek obsahuje keratinocytový kultivační prostředek neobsahující sérum a extrakty z řady lidské žírné buňky HMC-1 nebo z buněčné

řady z ní odvozené jako 5C6 nebo KU812. Další podrobnosti o základních složkách prostředku podle vynálezu byly už předloženy výše.

Metoda přípravy zmíněného prostředku obsahuje následující fáze:

- (a) přidání nejméně jedné řady žírné buňky nebo subklonu téže a alespoň jednoho degranulačního činidla případně v kombinaci s anorganickou solí jako např. CaCl_2 do keratinocytového kultivačního prostředku neobsahujícího sérum;
- (b) degranulace řady (řad) lidské žírné buňky nebo subklonů téže, takže růstové faktory se uvolní do prostředku; a
- (c) odstranění zbytků žírné buňky z prostředku např. odstředěním, po kterém získáme (upravený) prostředek.

Podmínky, za kterých může být metoda provedena, nejsou nijak kritické a budou zřejmé pro každého odborníka ve stavu techniky. Degranulačním činidlem použitým ve fázi (a) je přednostně Compound 48/80 v kombinaci s CaCl_2 .

Nakonec se vynález týká výchozího prostředku pro pěstování vlasových folikulových buněk z vlasů v anagenní fázi, který obsahuje nejméně jedno vhodné keratinocytové kultivační činidlo neobsahující sérum nejméně jednu řadu lidské žírné buňky a/nebo alespoň jedno degranulační činidlo. Zmíněný výchozí prostředek může být užit pro přípravu vhodného upraveného prostředku pro pěstování vlasových folikulových buněk z vlasů v anagenní fázi. To může být provedeno jednoduše provedením degranulace, jestliže jak řada lidské žírné buňky, tak degranulační činidlo jsou oba přítomny. Pokud jeden z nich chybí, musí být nejprve chybějící komponent přidán před provedením degranulace žírných buněk.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Metoda reprodukce vlasů, která obsahuje následující kroky:
 - (1) odebrání vlasů v anagenní fázi z jedné nebo více donorových oblastí tak, že je stále zachována cibulková podstata odebraného vlasu v anagenní fázi;
 - (2) pěstování vlasových folikulových buněk z odebraného vlasu za takových podmínek, že vlasové folikulové buňky jsou schopné množení; a
 - (3) implantace vypěstovaných vlasových folikulových buněk do recepční oblasti.
2. Metoda podle nároku 1 vyznačující se tím, že krok (1) obsahuje následující mezikroky:
 - (1a) vytržení vlasu z donorové oblasti, a
 - (1b) výběr vhodných vlasů v anagenní fázi.
3. Metoda podle nároku 1 nebo 2 vyznačující se tím, že vlasové folikulové buňky jsou pěstovány v kultivačním prostředí, který obsahuje extrakty alespoň z jedné řady lidské žírné buňky.
4. Metoda podle nároku 3 vyznačující se tím, že řady lidské žírné buňky je HMC-1 nebo buněčná řada z ní odvozena.
5. Metoda podle jakéhokoli z předchozích nároků vyznačující se tím, že vlasové folikulové buňky jsou pěstovány při teplotě od 30 °C do 40 °C v atmosféře, která je nasycena vodou a obsahuje 3 % až 10 % objemových procent CO_2 .
6. Metoda podle jakéhokoli z předchozích nároků vyznačující se tím, že vypěstované vlasové folikulové buňky jsou zaváděny do porůrecepční oblasti.
7. Metoda podle nároku 6 vyznačující se tím, že množství suspenze vypěstovaných vlasových folikulových buněk je zavedeno do každého póru tak, že zmíněné množství obsahuje dostatek vlasových folikulových buněk, aby umožnilo rozvoj vlasového folikulu.

„ZMĚNĚNÝ LIST“

8. Metoda podle nároku 7 vyznačující se tím, že množství suspenze zaváděné do póru je od 1 μ l do 5 μ l.
9. Metoda podle nároku 7 nebo 8 vyznačující se tím, že suspenze je vsříknuta jednotlivě do každého póru pomocí dávkovací pipety, která je opatřena dutou jehlou přednostně jehlou 18 až 30 Gauche (G).
10. Metoda pro pěstování vlasových folikulových buněk z vlasů v anagenní fázi vyznačující se tím, že jeden nebo více vlasů v anagenní fázi je umístěno do prostředku, který obsahuje nejméně jeden vhodný keratinocytový kultivační prostředek neobsahující sérum a extrakty nejméně z jedné řady lidské žírné buňky.
11. Metoda podle nároku 10 vyznačující se tím, že řada lidské žírné buňky je HMC-1 nebo buněčná řada z ní odvozená.
12. Metoda podle nároku 10 nebo 11 vyznačující se tím, že vlasové folikulové buňky jsou pěstovány při teplotě od 30 °C do 40 °C v atmosféře, která je nasycena vodou a obsahuje 3 % až 10 % objemových procent CO_2 .
13. Prostředek pro pěstování vlasových folikulových buněk z vlasů v anagenní fázi vyznačující se tím, že prostředek obsahuje nejméně jeden keratinocytový kultivační prostředek neobsahující sérum a extrakty alespoň z jedné řady lidské žírné buňky.
14. Prostředek podle nároku 13 vyznačující se tím, že řada lidské žírné buňky je HMC-1 nebo buněčná řada z ní odvozená.
15. Metoda pro přípravu prostředku podle jednoho z nároku 13 nebo 14, vyznačující se tím, že obsahuje následující fáze:
- (a) přidání nejméně jedné řady lidské žírné buňky nebo subklonu téže a alespoň jednoho degranulačního činidla přednostně v kombinaci s CaCl_2 do keratinocytového kultivačního prostředku neobsahujícího sérum;
 - (b) degranulace řady (řad) žírných buněk nebo subklonů téže, takže růstové faktory se uvolní do prostředku; a
 - (c) odstranění zbytků žírné z prostředku.

16. Výchozí prostředek pro pěstování vlasových folikulových buněk z vlasů v anagenní fázi vyznačující se tím, že prostředek obsahuje nejméně jedno vhodné keratinocytové kultivační činidlo neobsahující sérum a alespoň jednu řadu lidské žírné buňky a/nebo nejméně jedno degranulační činidlo.

17. Výchozí prostředek podle nároku 16 vyznačující se tím, že degranulační činidlo je Compound 48/80, přednostně v kombinaci s CaCl_2 .