PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:
2000 - 1295

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
A 61 L 31/00
A 61 L 27/00
A 61 L 15/32
A 61 L 15/40

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05.10.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.10.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/9721585**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11.10.2000**
(Věstník č. 10/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/GB98/02976**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/19005**

(71) Přihlašovatel:
ED GEISTLICH SÖHNE AG FÜR CHEMISCHE INDUSTRIE, Wolhusen, CH;

(72) Původce:
Geistlich Petr, Stansstad, CH;
Eckmayer Zdenek, Weinheim, DE;
Schlosser Lothar, Darmstadt, DE;

(74) Zástupce:
Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Vícevrstevná membrána

(57) Anotace:

Vícevrstevná membrána, vhodná pro použití in vivo při rekonstrukci kostní nebo chrupavkové tkáně, je tvořena vrstvou matrice, převážně z kolagenu II s otevřenou houbovitou strukturou a nejméně jednou bariérovou vrstvou s uzavřenou, poměrně nepropustnou strukturou. Membrána se užívá ve formě implantátu, který se uloží na defekt kosti nebo chrupavky tak, že podporuje regeneraci těchto tkání a současně brání vrůstání nežádoucích typů tkání.

CZ 2000 - 1295 A3

26.06.00

00-1295

Vícevrstevná membrána

Oblast techniky

Vynález se týká kolagenové membrány, určené k implantaci při řízené regeneraci tkání, zvláště in vivo při rekonstrukci tkáně kosti nebo chrupavek.

Dosavadní stav techniky

Při regeneraci tkání se již dlouho jeví jako velmi obtížné rekonstruovat chrupavku, např. při jejím poškození. K poškození chrupavky může dojít v jakémkoliv kloubu, přestože větší riziko existuje u velkých kloubů, např. kolena a kotníku. Může přitom jít o poranění, degenerativní choroby nebo specifické choroby, jako osteochondritis dissecans. Poškození chrupavky je nejčastějším faktorem při vývoji arthrózy. Uvolnění enzymů vede k zánětlivým pochodům v synovii a tyto pochody mají za následek abrasi chrupavky a destrukci vnitřního povrchu kloubu. V poslední době byly vyvíjeny snahy o regeneraci chrupavky v kloubech in vivo, např. implantací vlastních chondrocytů z tkáňových kultur, CAC. Tento postup měl však jen omezený úspěch.

Nyní je všeobecně přijímáno, že pro rekonstrukci tkáně je nezbytné zajistit matrici, která bude sloužit pro buňky jako vodítko, takže nová buněčná tkáň bude růst podél a mezi vlákny matrice. V poslední době bylo navrhováno použití CAC, které byly naočkovány přímo do syntetické nebo přírodní vstřebatelné matrice. Avšak pokusy s rekonstrukcí chrupavky při použití matrice na bazi kyseliny polymléčné, polyglykolové a kolagenu I nebo III vyžadovaly, aby chondrocyty byly uloženy do matrice in vitro před její implantací. Tím vznikají komplikace, pokud jde o sterilní kulturu, takže je možno předpokládat zánětlivé imunitní reakce obřích buněk a fibroblastů na rozhraní mezi implantátem a tkání.

26.06.00

V mezinárodní patentové přihlášce WO-A-96/25961 se navrhuje jako implantát matrice na bazi kolagenu II. Tato matrice je určena k implantaci in vivo a předpokládá se růst vlastních chondrocytů na povrch této matrice a tím regenerace chrupavky. Schopnost takové matrice vyvolat úplnou regeneraci chrupavkové tkáně je však omezena.

Je tedy zřejmé, že by bylo zapotřebí mít k dispozici matrici, určenou k implantaci, která by umožnila úspěšné prorůstání přirozených chondrocytů a tím regeneraci chrupavkové tkáně po implantaci matrice in vivo.

Nyní bylo zjištěno, že chrupavku a také nově vytvořenou kostní tkáň je možno rekonstruovat při použití matrice z kolagenu II, která je in vivo stíněna nejen od obklopující pojivové tkáně, nýbrž také proti defektu kosti nebo chrupavky. Toho je možno dosáhnout použitím vícevrstevné membrány, která může bránit nežádoucímu prorůstání okolních tkání do matrice, membrána může být chirurgicky implantována na místo defektu k dosažení tohoto účinku.

Podstata vynálezu

Podstatu vynálezu tedy tvoří vícevrstevná membrána, tvořená vrstvou matrice, převážně z kolagenu II a mající otevřenou houbovitou strukturu a alespoň jednu bariérovou vrstvu s uzavřenou, poměrně nepropustnou strukturou.

Výhodou takové membrány je skutečnost, že při použití nemohou buňky okolní tkáně proniknout nebo prorůstat do vrstvy, která má uzavřenou, poměrně nepropustnou strukturu.

I když není žádoucí se vázat na jakékoliv teoretické vysvětlení, je nyní pravděpodobné, že pro úspěšnou regeneraci chrupavky je

26.06.00

nezbytné, aby do místa defektu nedocházelo k prorůstání pojivové tkáně, krevních cév ani novotvořené kostní tkáně. Tohoto účelu je možno dosáhnout při použití dvouvrstevné membrány podle vynálezu, která chrání kolagenovou matrici od prorůstání buněk z jedné strany. V průběhu implantace je tuto membránu možno použít v kombinaci se štěpem tkáně, např. s periostálním štěpem, tak aby nemohlo dojít k prorůstání tkání z druhé strany. Je např. možno postupovat tak, že se nejprve přišije periostální štěp na místo tak, aby překrýval defekt kosti nebo chrupavky. Pak se na místo defektu implantuje dvouvrstevná membrána podle vynálezu tak, že je ve styku se štěpem, přičemž vrstva matrice je přivrácena ke kostnímu defektu. S výhodou se dvouvrstevná membrána podle vynálezu zpočátku implantuje na místo defektu tak, že bariérová vrstva je ve styku s kostním nebo chrupavkovým defektem. Pak se implantuje periostální štěp tak, aby byl ve styku s vrstvou matrice. Štěp je možno připojit pomocí biologicky kompatibilní a lepivé látky, např. fibrinu nebo je možno použít vstřebatelné trny z kyseliny polymléčné nebo je možno štěp přišít tak, aby bylo dosaženo nepropustné bariéry pro prorůstání okolních pojivových tkání.

V jednom z možných provedení vynálezu může membrána jako taková účinně bránit prorůstání jakýchkoliv nativních buněk. Může např. jít o membránu, tvořenou třemi vrstvami, přičemž vrstva matrice je vyrobena převážně z kolagenu II a má otevřenou houbovitou strukturu, tato matrice je na obou stranách opatřena dvěma bariérovými vrstvami s uzavřenou, poměrně nepropustnou strukturou.

Vrstva matrice je prostředím k prorůstání nativních chondrocytů a tím i k regeneraci chrupavkové tkáně. Aby bylo možno dále podporovat regeneraci chrupavky, je možno tuto matrici impregnovat chondrocyty před implantací nebo po implantaci in vivo. Matrici je možno impregnovat chondrocyty bezprostředně před implantací, např.

26.06.00

pomocí injekce, je však výhodnější vstříknout chondrocyty do vrstvy matrice ve formě suspenze přímo po implantaci. Tímto způsobem mohou chondrocyty, přítomné ve vrstvě matrice vyvolat regeneraci chrupavky a tvorbu nové kostní tkáně, přičemž membrána v téže době brání prorůstání jiných typů buněk z okolních tkání.

Chondrocyty pro použití podle vynálezu je možno získat z různých buněčných zdrojů, včetně allogenních nebo autogenních buněk, izolovaných z kloubních chrupavek, periostu a perichondria, může také jít o mesenchymální buňky z kostní dřeně. Vzhledem k tomu, že při použití allogenních buněk vzniká potenciální nebezpečí nežádoucí imunitní reakce a infekčních komplikací, je výhodnější izolovat chondrocyty z autogenních buněk, zvláště z kloubní chrupavky. Postupy pro odběr buněk jsou známé a zahrnují enzymatické štěpení a pěstování v kultuře. Pěstováním v kultuře je možno odebrané buňky pomnožit před jejich implantací zpět do organismu. Obecně je možno uvést, že do vrstvy matrice by mělo být dodáno nejméně 10^6, s výhodou nejméně 10^7 buněk k dosažení optimální regenerace chrupavkové tkáně.

Je žádoucí, aby vrstva matrice membrány podle vynálezu obsahovala glykosaminoglykany GAG, jako jsou kyselina hyaluronová, chondroitin-6-sulfát, keratinsulfát, dermatan sulfát apod. Tyto látky zajistí přirozené prostředí, v němž mohou chondrocyty růst. I když je možné zařadit do kolagenové matrice glykosaminoglykany z různých zdrojů, které nemusí mít vždy totéž složení, molekulovou hmotnost a fyziologické vlastnosti jako glykosaminoglykany z chrupavky, je výhodné použít materiál, pocházející z chrupavky. Vrstva matrice s výhodou obsahuje jeden až 10 % hmotnostních, např. 2 až 6 % hmotnostních glykosaminoglykanů. I když určité množství těchto látek může být přítomno i v nepropustné vrstvě, většina tohoto materiálu se bude nacházet ve vrstvě matrice.

26.06.00

V nativní kolagenové tkáni se vyskytují GAG alespoň z části jako složka proteoglykanů PG. Použití GAG ve formě PG je však nežádoucí vzhledem k potenciálním imunologickým problémům, k nimž může docházet vzhledem k přítomnosti bílkoviny v PG. Z tohoto důvodu je vrstva matrice s výhodou v podstatě prostá jakýchkoliv proteoglykanů. Toho je možno snadno dosáhnout tím, že se vrstva matrice připraví z čištěného kolagenu II, prostého telopeptidů a z glykosaminoglykanů.

Vrstva matrice může obsahovat ještě další přísady. Jde např. o chondronectin, laminin, fibronectin, alginát vápenatý nebo anchorin II pro snadnější připojení chondrocytů k vláknům kolagenu II, je také možno přidávat růstové faktory, např. faktor, vyvolávající tvorbu chrupavky CIF, růstový faktor, podobný insulinu IGF, transformační růstový faktor beta TGFbeta, přítomný ve formě homodimerů nebo neterodimerů a kostní morfogenetický faktor BMP, jde např. o nativní nebo rekombinantní lidský BMP-2, BMP-3 (osteogenin), BMP-4 a BMP-7 (OP-1, osteogenetická bílkovina 1). BMP-2 ovlivňuje dva způsoby tvorby kostní tkáně nezávisle, a to přímou tvorbu kostní tkáně i tvorbu chrupavky, která je pak odstraněna a nahrazena kostní tkání. Složené materiály s obsahem BMP a kolagenu včetně kostní matrice, získané extrakcí kosti z různých zdrojů nebo extrakcí demineralizované kostní matrice mohou být tvořeny 90 % kolagenu a 10 % bílkovin nekolagenní povahy NCP pro tvorbu chrupavky, vyvolanou účinkem BMP nebo spojeným účinkem BMP a NCP. Kostní matrice, nerozpustná kolagenní matrice a laminin nebo fibronectin jsou nosičem pro BMP. Některé růstové faktory mohou být přítomny také v nepropustné vrstvě. Větší podíl těchto látek se však bude nacházet ve vrstvě matrice. Obecně lze uvést, že membrána bude obsahovat 100 mikrogramů až 5 miligramů růstových faktorů.

Jak již bylo uvedeno svrchu, je membrána tvořena nejméně dvěma vrstvami s odlišnou strukturou. Bariérová vrstva membrány je v

26.06.00

s výhodou tvořena převážně kolagenem I a III. Může být obsažen také syntetický materiál, např. syntetická vstřebatelná polymerní síť, popř. opatřená povlakem kolagenního materiálu, např. kolagenem typu I a/nebo typu III.

Jako příklady vhodných syntetických materiálů je možno uvést polyestery, kyselinu polyglykolovou a kyseliny polymléčné PLA, jejich homopolymery a kopolymery, glykolidové a laktidové kopolymery, polyorthoestery a polykaprolaktony. Řada těchto látek se běžně dodává, např. pod obchodním názvem Resomer (Boehringer Ingelheim). Polymery PLA ve formě vosku s molekulovou hmotností v rozmezí 650 až 1200 a s pomalou degradací jsou výhodnými látkami pro toto použití. Zvláště výhodným biologicky degradovatelným polymerem je kyselina poly-D,L-mléčná, v níž je poměr D-laktidu k L-laktidu přibližně 70:30. Výhoda těchto syntetických materiálů spočívá v tom, že mají vysokou mechanickou stálost, takže je membránu možno přetahovat přes složité trojrozměrné kostní defekty, aniž by přitom došlo k jejímu protržení. Uvedené materiály jsou také velmi vhodné pro šití.

Bariérová vrstva je s výhodou tvořena dlouhými kolagenovými vlákny, která jsou spojena tak, že touto bariérou nemohou projít látky s vysokou molekulovou hmotností. Dlouhá vlákna dodávají materiálu vysokou pevnost v tahu a odolnost proti protržení, takže materiál nejen dobře odděluje jednotlivé části, nýbrž je také možno jej dobře šít. Při chirurgických zákrocích je velmi důležité, aby bylo možno implantáty ve formě membrán přišívat nebo jinak upevnit a řada membrán dříve navrhovaných tuto schopnost nemá. Membrána podle vynálezu je k uvedenému účelu dostatečně mechanicky stálá a je proto velmi vhodná pro chirurgickou implantaci.

26.06.00

Vrstva matrice je velmi porézní a může mít nízkou specifickou hmotnost, např. 0,02, takže buňky mohou do této vrstvy velmi rychle prorůstat. Tato vrstva membrány, která obvykle také obsahuje glykosaminoglykany, rychle bobtná a může pojmout až 5000 % kapaliny. Z ideálních podmínek má vrstva matrice strukturu pórů (objem pórů a velikost pórů) která dovoluje přilnutí buněk a jejich prorůstání a která rovněž dovoluje, aby si buněčný materiál udržel fenotyp chondrocytů, který je charakterizován syntézou bílkovin, specifických pro chrupavku. Rozměr pórů bude záviset na lyofilizaci, použité pro přípravu matrice z kolagenu II, obvykle je v rozmezí 10 až 120, např. 20 až 100 mikrometrů. Běžná velikost pórů je přibližně 85 mikrometrů. Této velikosti pórů je možno snadno dosáhnout pomalým zmrazením z teploty -5 na -10 °C v průběhu 24 hodin z následnou lyofilizací nebo také tak, že se před lyofilizací k materiálu přidá hydrogenuhličitanamonný.

Vrstva matrice membrány obvykle a s výhodou obsahuje kolagen II, získaný z chrupavky, s výhodou z hyalinní chrupavky vepře.

Požadovaná tloušťka vrstvy matrice bude záviset na povaze defektu kosti nebo chrupavky, který má být napraven, obvykle jde o tloušťku 2 až 10 mm, např. 4 až 6 mm. Tloušťka bariérové vrstvy se s výhodou pohybuje v rozmezí 0,2 až 2 mm, např. 0,2 až 0,7 milimetrů.

Bariérová vrstva může být také přírodní membrána živočišného původu, tvořená kolagenem I a III. Membrána, odvozená z přírodního zdroje je v organizmu úplně vstřebatelná a při jejím vstřebávání se netvoří toxické degradační produkty. Tyto membrány obvykle také mají zvláště vysokou odolnost proti protržení v suchém i vlhkém stavu a je tedy možno je na určené místo v případě potřeby přišívat. Za vlhka je materiál velmi elastický, tak že je možno jej dobře upevnit i na kostních defektech nepravidelného tvaru.

Kromě kolagenu obsahují živočišné membrány přírodního původu řadu dalších biologických materiálů, které je nutno odstranit. Je známo působit na takové membrány enzymy, rozpouštědly nebo jinými chemickými látkami k čištění těchto membrán tak, aby byly možno pro použití v lékařství řada těchto materiálů je velmi tenká a jejich použití je často obtížné. Fibrily kolagenu při čištění často ztrácejí svůj přirozený charakter a výsledný materiál tak může mít nedostatečnou pevnost, pro šití, může ztratit svou bobtnavost ve vodě a ztrácí se také rozdíl mezi hladkou a drsnější stranou vlákna. Vláknité formy kolagenu typu I nebo II prosté telopeptidu jsou méně rozpustné a méně biologicky degradovatelné a bylo zjištěno, že jde o nejvýhodnější nosný materiál.

Membrány, které mohou tvořit bariérovou vrstvu zahrnují peritoneální membránu telat nebo vepřů, tyto membrány si zachovávají svou přirozenou kolagenní strukturu.

Zvláště výhodné jsou peritoneální membrány z mladých vepřů ve stáří 6 až 7 týdnů s hmotností 60 až 80 kg.

Bariérová vrstva by měla být s výhodou tvořena čistým, nedenaturovaným nerozpustným kolagenem a může být připravena např. způsobem, popsaným v mezinárodní patentové přihlášce WO-A-95/18638. Přírodní membrány se nejprve zpracovávají působením zásady, např. vodného roztoku hydroxidu sodného z koncentrací 0,2 až 4 % hmotnostní. Tím dojde ke zmýdelnění jakýchkoliv tuků a také bílkovin, které jsou citlivé na působení zásad. Ve druhém stupni se materiál zpracovává působením kyseliny. Obvykle jde o anorganickou kyselinu, např. kyselinu chlorovodíkovou. Tím se odstraní nečistoty, citlivé na kyselinu. Pak se materiál promývá do dosažení pH 2,5 až 3,5. Pak má membrána hladkou stranu a volnější vláknitější stranu. Může být výhodné uskutečnit zesítění

membrány do určitého stupně jejím zahřátím na teplotu v rozmezí 100 až 120 °C.

Kolagen II, použitý pro tvorbu matrice membrány je možno získat z chrupavky obdobným postupem, jaký byl popsán svrchu pro bariérovou vrstvu, tvořenou převážně kolagenem I a III. Je výhodné odstranit z chrupavky vodu působením acetonu, pak se odstraní extrakcí tuk působením uhlovodíkového rozpouštědla, např. n-hexenu, i když je možno použít také alkanoly, např. ethanol, ethery, jako diethylether nebo chlorované uhlovodíky, jako chloroform nebo směsi těchto látek. Materiál, zbavený tuku se pak zpracovává působením zásady, která zmýdelní jakýkoliv zbývající tuk a degraduje některé z přítomných bílkovin. Konečně se materiál zpracovává působením kyseliny, což vyvolá degradaci dalších bílkovin. Pak se materiál nechá bobtnat ve vodě a nechá se projít koloidním mlýnem, čímž se získá suspenze materiálu.

Aby bylo možno připravit vícevrstevnou membránu, nanese se suspenze s obsahem kolagenu II na vláknitou stranu připravené hladké membrány, která byla připravena např. podle mezinárodní patentové přihlášky WO-A-95/18638. Obvykle bude membrána uložena na hladký povrch hladkou stranou dolů, takže bude možno přímo nanášet suspenzi kolagenu II, např. vetřením do vláknité strany membrány. Tímto způsobem je možno pomocí suspenze vytvořit vrstvu jakékoliv tloušťky, která pevně lne ke kolagenové membráně. Dvouvrstevná membrána, vytvořená tímto způsobem se pak zmrazí a lyofilizuje, čímž vzniká požadovaná houbovitá struktura s požadovanou velikostí porů. V případě potřeby je možno určitý podíl matrice odstranit tak, aby byla získána dvouvrstevná membrána s rovnoměrnou tloušťkou. K získání třívrstevné membrány je pak možno uložit na vrstvu matrice druhou hladkou membránu tak, aby její vláknitá vrstva byla ve styku s vrstvou matrice.

Suspenze kolagenu II pro nanesení na membránu obvykle obsahuje 1,0 až 4,0 % hmotnostních kolagenu, výhodné množství je 2 až 3 % hmotnostní. Hodnota pH této směsi se upravuje na 2,5 až 4,5, s výhodou 3,0 až 4,0.

Materiál kolagenu II se po lyofilizaci s výhodou zesítí pro stabilizaci vrstvy matrice. Tímto způsobem je také možno zvýšit mechanickou stabilitu vrstvy matrice a zpomalit rychlost jejího vstřebávání v organismu. Stupeň zesítění by za ideálních podmínek měl být takový, aby rychlost degradace matrice byla v souladu s rychlostí regenerace tkáně. Zesítění je možno uskutečnit zahříváním, toto zahřívání však je nutno provádět opatrně, tak aby nedošlo ke ztrátě vstřebatelnosti. Obvykle se užívá zahřátí na 100 až 120 °C po dobu 30 minut až 5 hodin. Ještě výhodnější je uskutečnit zesítění ozářením ultrafialovým světlem, např. po dobu až 8 hodin.

Materiál kolagenu II s výhodou obsahuje glykosaminoglykany. Tyto látky obvykle reagují s kolagenem II za určitého stupně zesítění a za vzniku nerozpustného produktu. V případě potřeby je možno dosáhnout dalšího zesítění zahřátím materiálu nebo ozářením ultrafialovým světlem, jak bylo uvedeno svrchu. Reakci mezi glykosaminoglykanem a kolagenem je možno uskutečnit při teplotě místnosti a při pH v rozmezí 2,5 až 3,5. Množství glykosaminoglykanu se může pohybovat v rozmezí 1 až 10 % hmotnostních. Materiál může být zmrazen a lyofilizován okamžitě po této reakci.

Suspenzi je možno vytvořit také úpravou pH kolagenu II na vyšší hodnotu. V tomto případě se směs zchladí na teplotu přibližně 4 °C a pak se hodnota pH pomalu upravuje přidáváním chladného vodného roztoku hydroxidu sodného s teplotou 4 °C až na hodnotu 6,5 až 7,5. Pak se směs udržuje 15 až 25 hodin při teplotě místnosti. Po této době se vytvoří suspenze a materiál je možno zmrazit a lyofilizovat.

26.06.00

Další možností je neutralizovat kolagen II na pH 6,8 až 7,4 po odstranění vzduchu. Směs se vloží do formy a inkubuje 15 až 20 hodin při teplotě 37 °C. Vytvoří se jemná suspenze, kterou je možno zmrazit a lyofilizovat.

Která z uvedených tří metod bude užita závisí na požadovaných vlastnostech výsledného výrobku. První postup poskytuje nejstálejší produkty. Avšak při srážení mohou vznikat shluky materiálu, takže postup je nutno provádět velmi pečlivě. Při druhém způsobu se získává měkký a homogenní produkt, který je však rozpustnější než produkt, získaný prvním postupem.

V průběhu těchto postupů je možné přidávat další žádoucí přísady, např. léčiva, jako antibakteriální látky, např. taurolidin nebo antibiotika, např. gentamicin.

Po nanesení suspenze na membránu se materiál zmrazí. Aby bylo možno dosáhnout reprodukovatelných rozměrů pórů, je nutno zmrazování pečlivě řídit, zejména pokud jde o rychlost a dobu zmrazování, hodnotu pH a tvorbu pórů, jejichž rozměr je nutno přesně řídit. V případě, že mají být získány velmi malé póry, je zapotřebí použít rychlého zmrazení na velmi nízké teploty.

Zmrazená membrána se pak lyofilizuje, načež se zahřívá na 110 až 130 °C. Při tomto postupu dojde k určitému zesítění. Pak je možno upravit tloušťku membrány tak, aby tloušťka vrstvy matrice byla všude přibližně 2 mm. Dvouvrstevná membrána se pak sterilizuje, např. ozářením gamma-zářením nebo působením ethylenoxidu. Sterilizací příliš silným ozářením např. pomocí ^{60}Co v dávce 25 kGy může dojít k deaktivaci BMP. Za těchto okolností je pak možno impregnovat sterilní matrici roztokem BMP ve sterilním fyziologickém roztoku chloridu sodného až těsně před implantací.

Membránu podle vynálezu je možno použít v lékařství k následujícím účelům:

Jako materiál pro řízenou regeneraci tkání je možno membránu využít tak, že matrice podporuje růst buněk. Bariérová vrstva na druhé straně brzdí růst nežádoucích buněk.

Dále je matrici využít k náhradě defektu chrupavky, které nepronikají až do kosti pod chrupavkou a k náhradě osteochondrálních defektů.

Vynález se rovněž týká použití vícevrstevné kolagenní membrány při řízené regeneraci tkání. Obsah kolagenu II v membráně je zvláště vhodný pro regeneraci chrupavkové tkáně, je však vhodný i pro regeneraci jiných typů tkání.

Zvláště je svrchu uvedená membrána výhodná pro použití formou implantátu.

Praktické provedení vynálezu bude osvětleno následujícími příklady, které však nemají sloužit k omezení rozsahu vynálezu. Ve všech příkladech mají být postupy prováděny za aseptických podmínek.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

(A) Peritoneální membrány mladých telat se úplně zbaví pojiva a tuku mechanickým způsobem, promyjí se pod tekoucí vodou a pak se zpracovávají 12 hodin působením 2% roztoku hydroxidu sodného. Pak se membrány znovu promyjí pod tekoucí vodou a okyselí 0,5% roztokem kyseliny chlorovodíkové. Po okyselení materiálu v celé jeho tloušťce, což trvá přibližně 3 hodiny se materiál promývá až do dosažení pH 3,5. Pak se materiál sráží působením 7% roztoku chloridu sodného, neutralizuje se 1% roztokem hydrogenuhličitanu sodného a

znovu se promyje pod tekoucí vodou. Pak se materiál dehydratuje acetonem a zbaví tuku působením n-hexanu.

(B) Zmrazená chrupavka z čerstvě poražených vepřů se máčí ve studené vodě, důkladně se promyje a mechanicky se očistí od zbytků masa, kostí a tvrdých součástí. Pak se materiál promývá 30 minut pod tekoucí vodou.

Pak se materiál 3krát mele v homogenizátoru. Velikost částic na konci tohoto postupu byla přibližně 8 mm.

Pak se částice chrupavky zbaví vody tak, že se 4krát promyjí acetonem vždy po dobu 8 hodin. Pak se odstraní tuk 4násobnou extrakcí n-hexanem, každá extrakce trvá nejméně 8 hodin. Poměr hexanu k chrupavce je 1:10.

Po odstranění tuku se chrupavka nechá bobtnat v pitné vodě. Poměr vody k materiálu je 10:1, zpracování trvá 24 hodin.

Pak se na materiál působí hydroxidem sodným ve formě roztoku s koncentrací 5 % hmotnostních, poměr chrupavky k roztoku je 1:4 a zpracování trvá 32 hodin. V průběhu tohoto zpracování se materiál míchá. Pak se roztok zásady z chrupavky vymyje, čímž se původní pH 14 sníží na pH 9 až 11. Rozpuštěné nečistoty se vymyjí a oddělí od chrupavky. Kapalina, zbývající po tomto zpracování se uchová pro izolaci glykosaminoglykanu.

Pak se kolagenní materiál zpracovává roztokem kyseliny chlorovodíkové s koncentrací přibližně 3 % hmotnostní při počátečním pH nižším než 1,0. Toto zpracování trvá 4 až 6 hodin.

Pak se materiál promývá chladnou vodou tak dlouho, až se pH zvýší na 3 až 3,5. Všechny nečistoty jsou odstraněny a produktem je kolagen, prostý solí a vhodný pro výrobu houbovitého nebo jiného kolagenního materiálu. K tomuto účelu je možno výsledný materiál zbavit plynů, zmrazit a lyofilizovat.

Extrakt, zbývající po svrchu uvedeném zpracování roztokem zásady obsahuje glykosaminoglykan, zásadu, denaturované bílkoviny a soli. Tento extrakt se nejprve neutralizuje kyselinou chlorovodíkovou, hodnota pH po neutralizaci je přibližně 6. Pak se extrakt zfiltruje při použití pomocného prostředku, zvláště infusoriové hlinky pro odstranění denaturovaných bílkovin. K materiálu se obvykle přidá 0,5 % hmotnostních hlinky, která se pak odstraní spolu s denaturovanou bílkovinou.

Supernatant se pak podrobí ultrafiltraci při použití membrány, která oddělí látky s molekulovou hmotností 10 000. Tímto způsobem se odstraní soli a získá se čistý glykosaminoglykan.

Takto získaný roztok glykosaminoglykanu se smísí se svrchu získaným kolagenovým materiálem, čímž se získá matrice kolagenu II s obsahem glykosaminoglykanu.

Kolagen II, získaný uvedeným způsobem má následující vlastnosti:
TG = 2,8 % hmotnostních
GAG = 3 % hmotnostní, vztaženo na hmotnost kolagenu,
pH = 3,5

(C) Čerstvě připravená peritoneální membrána podle stupně (A) se máčí ve vodě a pak uloží na plochou skleněnou desku vláknitou stranou směrem vzhůru. Pak se na membránu nanáší hmota

kolagenu II, připravená podle stupně (B). Membrána se udržuje na ploché desce tak, aby stále k této desce lnula. Současně se hmota kolagenu II do membrány vtírá.

Velmi hustá hmota se po nanesení na membránu nechá přes noc v lednici při teplotě přibližně 4 °C. V průběhu této doby se vytvoří velmi hustá suspenze.

Celý materiál se pak zmrazí za následujících podmínek:
Teplota lázně = -12 °C
Doba zmrazení = 40 minut

Zmrazený materiál se pak lyofilizuje, načež se zahřeje na teplotu 125 °C.
Doba lyofilizace = 14 hodin.

Vrstva matrice kolagenu II se pak dále zpracovává na rovnoměrnou tloušťku 1 mm.

Příklad 2

Čerstvě připravená peritoneální membrána z příkladu 1(A) se uloží na skleněnou desku a do membrány se vtírá hustá hmota kolagenu II s vlastnostmi z příkladu 1. 50 g hmoty kolagenu II se zředí na 100 ml destilovanou vodou a směs se důkladně promíchá. V průběhu míchání se přidá 100 ml roztoku glykosaminoglykanu. Kolagen se vysráží spolu s GAG. Po vysrážení se materiál homogenizuje a vzniklá disperze se nanese na membránu. Vzniklá dvouvrstevná membrána se dále zpracovává stejně jako v příkladu 1.

Zastupuje:

26.06.00 00-1291

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Vícevrstevná membrána, vhodná pro použití in vivo při rekonstrukci kostní nebo chrupavkové tkáně, v y z n a č u j í c í s e t í m, že je tvořena vrstvou matrice, převážně z kolagenu II s otevřenou houbovitou strukturou a nejméně jednou bariérovou vrstvou s uzavřenou, poměrně nepropustnou strukturou.

2. Vícevrstevná membrána podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje pouze jednu bariérovou vrstvu.

3. Vícevrstevná membrána podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vrstva matrice je uložena mezi dvěma bariérovými vrstvami.

4. Vícevrstevná membrána podle některého z nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vrstva matrice je vytvořena z materiálu kolagenu II, odvozeného od přírodní chrupavky.

5. Vícevrstevná membrána podle nároku 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kolagen II je získán z hyalinní chrupavky vepře.

6. Vícevrstevná membrána podle nároku 4 nebo 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že materiál kolagenu II je fyzikálně zesítěn.

7. Vícevrstevná membrána podle některého z nároků 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že bariérová vrstva nebo bariérové vrstvy jsou vytvořeny převážně z kolagenu I a III.

8. Vícevrstevná membrána podle nároku 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že bariérová vrstva nebo bariérové vrstvy jsou vytvořeny z peritoneální membrány telat nebo vepřů.

9. Vícevrstevná membrána podle některého z nároků 1 až 6, vyznačující se tím, že bariérová vrstva nebo bariérové vrstvy jsou tvořeny sítí ze syntetického vstřebatelného polymeru, popř. opatřenou povlakem kolagenního materiálu.

10. Vícevrstevná membrána podle nároku 9, vyznačující se tím, že kolagenní materiál je tvořen kolagenem typu I a/nebo typu III.

11. Vícevrstevná membrána podle nároku 9 nebo 10, vyznačující se tím, že síť ze syntetického polymeru obsahuje polymer ze skupiny polyestery, homopolymery kyseliny polyglykolové a polymléčné a kopolymery těchto kyselin, kopolymery glykolidů a laktidů, polyorthoestery a polykaprolaktomy.

12. Vícevrstevná membrána podle nároku 11, vyznačující se tím, že jako polymer obsahuje kyselinu poly-D,L-mléčnou, v níž je poměr D-laktidu k L-laktidu přibližně 70:30.

13. Vícevrstevná membrána podle některého z nároků 1 až 12, vyznačující se tím, že se vrstva matrice impregnuje chondrocyty, izolovanými z kloubní chrupavky, periostu, perichondria nebo mesenchymálních buněk kostní dřeně.

14. Vícevrstevná membrána podle některého z nároků 1 až 13, vyznačující se tím, že se vrstva matrice a/nebo bariérová vrstva impregnuje glykosaminoglykanem.

15. Vícevrstevná membrána podle nároků 14, vyznačující se tím, že jako glykosaminoglykan obsahuje kyselinu hyaluronovou, chondroitin-6-sulfát, keratinsulfát nebo dermatan sulfát.

16. Vícevrstevná membrána podle některého z nároků 1 až 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vrstva matrice a bariérové vrstvy jsou v podstatě prosté proteoglykanů.

17. Vícevrstevná membrána podle některého z nároků 1 až 16, v y z n a č u j í c í s e t í m, že vrstva matrice a/nebo bariérové vrstvy dále obsahují chondronectin, laminin, fibronectin, alginát vápenatý, anchorin II, růstové faktory nebo morfogenetické kostní faktory.

18. Způsob výroby vícevrstevné membrány podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se suspenze kolagenu II nanese na povrch bariérové membrány s uzavřenou, poměrně nepropustnou strukturou a pak se materiál lyofilizuje za vzniku vrstvy matrice s otevřenou houbovitou strukturou.

19. Vícevrstevná membrána podle některého z nároků 1 až 17 pro použití při řízené regeneraci tkáně.

20. Vícevrstevná membrána podle některého z nároků 1 až 17 pro použití při rekonstrukci kostní nebo chrupavkové tkáně.

21. Použití vícevrstevné membrány podle některého z nároků 1 až 17 pro výrobu implantátu pro řízenou regeneraci tkáně.

22. Způsob léčení defektu kosti nebo chrupavky, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se na defekt nanese vícevrstevná membrána podle některého z nároků 1 až 17 tak, že bariérová vrstva brání vrůstání nežádoucích typů tkáně do oblasti regenerace kosti nebo chrupavky.

Zastupuje: