

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12.04.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **12.04.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/283253**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu:
(Věstník č: 5/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/US2002/011497**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2002/083878**

(21) Číslo dokumentu:

2003-3051

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁷ :
C 12 N 5/00

(71) Přihlašovatel:

VERIGEN TRANSPLANTATION SERVICE
INTERNATIONAL (VTSI) AG, Leverkusen, DE

(72) Původce:

Giannetti Bruno M., Bonn, DE
Asculai Samuel S., Toronto, CA
Idouraine Ahmed, Chandler, AZ, US

(74) Zástupce:

Čermák Karel jr., JUDr. Ph.D., Národní 32, Praha 1,
11000

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob autologní transplantace

(57) Anotace:

Řešení popisuje různá nosná lůžka, ke kterým mohou buňky přilnout a množit se. Taková nosná lůžka jsou užitečná jako implantáty do poraněného místa a podporují hojení a regeneraci poškozené tkáně. Dále je popisován výrobek zahrnující membránu, která má alespoň jednu vrstvu s pórovitým povrchem a také zahrnující submukózní střevní tkáň a buňky, které k této vrstvě přilnuly. Rovněž se popisuje, že přilnuté buňky k této vrstvě zahrnují chondrocytové buňky.

CZ 2003 - 3051 A3

12.01.04

1

PV2003-3057

Způsob autologní transplantace

95081

Oblast techniky

Předložený vynález se týká transplantace chondrocytových buněk, štěpů kostí a chrupavky, hojení, léčení kloubu a prevence patologické artritidy. Předložený vynález se zejména týká nových způsobů a nástrojů pro transplantaci chondrocytových buněk a regeneraci chrupavky.

Dosavadní stav techniky

V USA se ročně provádí více než 500.000 artroplastických operací a totálních kloubových náhrad. Přibližně stejný počet podobných operací se provádí v Evropě. V tom je zahrnuto asi 90.000 totálních náhrad kolenního kloubu a kolem 50.000 operací vad kolena (A. Praemer, S. Fumer, D. P. Rice: *Musculoskeletal conditions in the United States*, Park Ridge, III.: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1992, 125). Nejprospěšnější by byl způsob regenerativní léčby chrupavky a mohl by se provádět v raném stádiu poškození kloubu, a tím snížit počet pacientů, kteří potřebují operaci umělé kloubní náhrady. S takovými preventivními způsoby léčby by se také snížil počet pacientů s rozvinutou osteoartritidou.

Techniky používané pro vyhlazení povrchu struktury chrupavky v kloubech se hlavně pokoušejí o vyvolání reparace chrupavky za použití subchondrálního vrtání, obrušování a dalších způsobů, pomocí nichž se nemocná chrupavka a subchondrální kost odstraní a zanechá se vaskularizovaná houbovitá kost odkrytá (J. Insall: *Clin. Orthop.* 1974, 101, 61; R. P. Ficat a spol.: *Clin. Orthop.* 1979, 144, 74; L. Johnson v: *Operative Arthroscopy*, (J. B. McGinty ed.) New York: Raven Press, 1991, 341).

Coon a Cahn (*Science*, 1966, **153**, 1116) popsali techniku pro kultivaci buněk, které syntetizují chrupavku, z kuřecích embryonálních prvotních článků. Později použili Cahn a Lasher (*PNAS USA*, 1967, **58**, 1131) tento systém pro analýzu účasti DNA syntézy jako nezbytného předpokladu pro chrupavkovou diferenciaci. Chondrocyty odpovídají jak na EGF tak FGF růstem (Gospodarowicz a Mescher: *J. Cell Physiology*, 1977, **93**, 117), ale nakonec ztrácejí svoji diferenciační funkci (Benya a spol.: *Cell*, 1978, **15**, 1313). Popsaly se způsoby růstu chondrocytů a principiálně se s menšími úpravami používají tak, jak je popsali M. Brittberg a spol. (M. Brittberg a spol.: *New Engl. J. Med.* 1994, **331**, 889). Buňky vypěstované těmito způsoby se použily jako autologní transplantáty do kolenních kloubů pacientů. Kolettas a spol. navíc prozkoumali expresi pro chrupavku specifických molekul, jako jsou kolageny a proteoglykany, při dlouhodobé kultivaci buněk. Zjistili, že navzdory morfologickým změnám během kultivace v jednovrstvých kulturách (A. Aulthouse a spol.: *Vitro Cell Dev. Biol.*, 1989, **25**, 659; C. Archer a spol.: *J. Cell Sci.*, 1990, **97**, 361; H. Haanselmann a spol.: *J. Cell Sci.*, 1994, **107**, 17; J. Bonaventure a spol.: *Exp. Cell Res.*, 1994, **212**, 97), když se porovnaly s kulturami rostoucích v suspenzi na gelech agarózy, alginátových ložích nebo jako spinnerové kultury (zachovávající si sférickou morfologii buňky), se exprimované markery, například kolageny typů II a IX a velké agregující proteoglykany, agrekan, versikan a vazebný protein nezměnily (E. Kolettas a spol.: *J. Cell Science*, 1995, **108**, 1991).

Artikulární chondrocyty jsou specializované, z mezenchymu odvozené, buňky nalézající se výlučně v chrupavce. Chrupavka je avaskulární tkáň, jejíž fyzikální vlastnosti závisejí na extracelulárním matrixu produkovaném chondrocyty. Během endochondrální osifikace procházejí chondrocyty zráním, které vede k buněčné hypertrofii, charakterizované začátkem exprese

kolagenu typu X (W. B. Upholt a R. R. Olsen ve: *Cartilage Molecular Aspects* (editoři: B. Hall a Newman) CRC Boca Raton 1991, 43; E. Reichenberger a spol.: *Dev. Biol.*, 1991, 148, 562; T. Kirsch a spol.: *Differentiation*, 1992, 52, 89; M. Stephens a spol.: *J. Cell Sci.*, 1993, 103, 1111).

Přes pokroky v kultivaci chondrocytů a v nápravách kosti a chrupavky, nedosáhlo se většího úspěchu při pokusech transplantovat chrupavku nebo chondrocyty pro nápravu spojovacích kloubních povrchů. Poznatky současného vynálezu zajišťují faktické a účinné prostředky zavedení transplantace chrupavky a/nebo chondrocytů do poruchy ve spojovacím kloubu, pomocí nichž se chrupavka regeneruje a porucha se opraví.

Podstata vynálezu

Stručný souhrn vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu je v jednom provedení implantabilní výrobek, implantát, zahrnující podpůrnou mateřskou půdu nebo lůžko, které dokáže podporovat růst buněk a jejich vazbu k němu a způsob implantace takového implantátu, aby se regenerovaly buňky na implantovaném místě. Předmětem předloženého vynálezu je v jednom provedení způsob účinného léčení povrchu chrupavky kloubního spojení u zvířat pomocí transplantace implantátu obsahujícího chondrocytové buňky zadržené v absorbovatelné podpůrné mateřské půdě.

V jednom provedení se chondrocytové buňky zadržují pouze na okraji lůžka. V jednom provedení je podpůrnou mateřskou pūdou krycí lůžko připravené z kolagenu a chondrocytové buňky jsou autologní nebo homologní. V jiném provedení se podpůrná mateřská půda připravuje z kolagenu a elastinu nebo z kolagenu a jednoho nebo více dalších materiálů schopných resorpce.

V dalším provedení se podpůrná mateřská půda připravuje ze submukózy tenkého střeva živočišného původu.

V dalším provedení se podpůrné lůžko připravuje z perikardu. V odlišném provedení se podpůrné lůžko připravuje z kolagenu a jednoho nebo více dalších materiálů na bázi polyesterů.

Implantát se na transplantovaném místě výhodně upevňuje pomocí lepících nebo mechanických úchytných prostředků. Předmětem předloženého vynálezu je také nástroj pro umístění a manipulaci s implantátem do místa implantace a příchytne zařízení pro zajištění implantátu k místu implantace.

Předmětem předloženého vynálezu je také implantabilní výrobek pro reparaci chrupavky u zvířat, který obsahuje chondrocytové buňky zadržené na podpůrné mateřské půdě schopné resorpce a způsob jeho výroby.

V dalším provedení je předmětem předloženého vynálezu způsob léčení povrchu chrupavky kloubního spojení zahrnující umístění chondrocytů na povrch, který se má léčit, a přikrytí povrchu, aby se léčil krycím lůžkem. Krycí lůžko se připevní k oblasti chrupavky obklopující poruchu.

Podrobný popis vynálezu

Předmětem předloženého vynálezu je podle jednoho provedení použití určitých produktů, které inhibují tvorbu vaskulární tkáně, například takové, jako kapilárních vlásečnic vystupujících do chrupavky, která se vytvořila během procesu autologní transplantace chondrocytů do defektů v chrupavce. Takové produkty jsou prospěšné při reparaci defektů chrupavky v kostech, kde se defekty rozšiřují do subchondrální vrstvy

nebo pod ní, občas nazývanými jako defekt v plné tloušťce. Tvorba vaskulární tkáně z kosti ležící pod chrupavkou bude mít tendenci vystupovat do nové chrupavky, která se má vytvořit, což vede k objevení se jiných buněk než požadovaných mezenchymálních buněk specializovaných chondrocytů.

Kontaminující buňky zavedené vaskularizací mohou způsobit zasahování a nadměrné přerůstání do chrupavky, která se má vytvořit pomocí implantovaných chondrocytů. Jeden z typů komerčních výrobků, který lze použít v tomto vynálezu je Surgicel® (Ethicon Ltd, UK), který se absorbuje po 7 až 14 dnech. Je to pravý opak k obvyklému použití hemostatického prostředku, jako je Surgicel®, jak se popisuje v přiložené inzerci výrobku firmou Ethicon Ltd.

Překvapivě jsem zjistili, že v situaci, kdy se požaduje inhibice re-vaskularizace chrupavky, lze použít hemostatický materiál a ten bude působit jako gelu podobný umělý koagulát. Obr. 1C znázorňuje takovou hemostatickou bariéru 1, kterou lze použít, aby inhibovala re-vaskularizaci defektu chrupavky. Pokud by byly v defektu v plné tloušťce přítomné červené krvinky v artikulární chrupavce, která je překryta takovou hemostatickou bariérou, tyto červené krvinky by se chemicky změnily na hematin a nebudou takto schopné indukovat vaskulární růst.

Hemostatický produkt použitý jako inhibiční bariéra opětovné vaskularizace, jako je například Surgicel®, který obsahuje nebo neobsahuje fibrinová lepidla, je proto účinný pro předpokládaný způsob zamýšlený tímto vynálezem. V jiném aspektu tohoto vynálezu se mateřská půda, například mateřská půda prostá buněk nebo jiná mateřská půda, která se popisuje níže, používá jako náplast překrývající nebo vložená do defektní oblasti kloubu, do kterého se mají kultivované

chondrocyty transplantovat s použitím například autologních chondrocytů pro transplantaci. V předloženém vynálezu lze pro hojení defektu chrupavky dále použít alogenních nebo xenogenních chondrocytů. Obr. 2 znázorňuje podpůrnou mateřskou pŕdu 2, kterou lze použít jako náplasti k překrytí defektní oblasti a obr. 3B zobrazuje lokalizaci defektu chrupavky 18.

V jednom provedení jsou tudíž předmětem tohoto vynálezu způsoby účinné reparace nebo léčení defektů chrupavky na površích artikulárního spojení kostí, které zahrnuje dodání činidla nebo prostředku, aby se zabránilo vaskulární invazi do místa v chrupavce, které se má reparovat, a také je předmětem mateřská pŕda, která izoluje reparované místo a udržuje transplantované buňky na správném místě. Předmětem stávajícího vynálezu je také souprava, obsahující volitelnou hemostatickou složku pro vložení do místa, které se má reparovat, takovou, která je účinnou inhibicí vaskularizace do místa, které se má reparovat; a jakmile se chondrocyty, které se mají transplantovat, umístí do místa, které se má reparovat, mateřská pŕda 2 překryje reparované místo tak, že se chondrocyty drží na správném místě, ale mají stále zajištěný přístup k živinám.

Konkrétní aspekty vynálezu se doložily příklady, ve kterých se použil *in vitro* systém pro studium chování chondrocytů při kontaktu s určitým výrobkem nebo kombinací určitých výrobků, které budou inhibovat tvorbu vaskulární tkáně. Toto testování *in vitro* předpovídá schopnost určitých testovaných materiálů, že v nich dojde k podpoře růstu chondrocytové buňky, testuje mateřská lůžka pro použití jako implantátů, ve kterých se udrží chondrocyty, a testuje schopnost každého lůžka inhibovat vaskularizace, jak se stane *in vivo*, kde kapilární smyčky přečnivají do chrupavky vzniknou během procesu autologní transplantace chondrocytů do defektů v

chrupavce.

Vhodné hemostatické výroby se budou charakterizovat jejich schopností inhibovat růst nebo invazi vaskulární tkáně, osteocytů, fibroblastů atd. do nově vznikající chrupavky. Vhodný hemostatický materiál naplní cíle způsobů předloženého vynálezu, když se zabrání vaskulární a buněčné invazi do rozvíjející se chrupavky, aby se optimalizovala tvorba chrupavky a dosáhlo reparace v plné tloušťce jakýchkoli poruch v artikulární chrupavce. Hemostatická bariéra bude pokud možno stálá po dosti dlouhý čas, který postačuje k tomu, aby se umožnila celková reparace chrupavky a aby se potom tato bariéra byla schopna časem absorbovat nebo jinak odbourat. Jeden materiál, u kterého se našly tyto vlastnosti, se nazývá Surgicel® W1912 (skupina GG3DH, Ethicon Ltd. UK), a je absorbovatelným hemostatem takovým, jakým je oxidovaná regenerovaná sterilní celulóza.

Předmět předloženého vynálezu také zahrnuje implabilní výrobek na reparaci chrupavky, způsob a zařízení pro takový implantát. Implantát zahrnuje podpůrnou mateřskou půdu a autologní nebo homologní chondrocytové buňky v ní uchovávané.

V jednom provedení jsou chondrocytové buňky zachycené pouze na jednom nebo více okrajích nebo vrstvách mateřského lůžka. Podpůrná mateřská půda je obecně materiál, který bude podporovat růst chondrocytových buněk a který se časem absorbuje v těle pacienta, příjemce implantátu. Transplantaci lze provést artroskopickou minimálně invazní technikou nebo technikami otevřené operace. Způsob vynálezu také počítá s použitím vhodných alogenních a xenogenních chondrocytových buněk pro reparaci poruchy chrupavky.

Takový implantát se znázorňuje na obr. 4. Implantát 20

konkrétněji zahrnuje podpůrnou mateřskou půdu 22, v které se uchovávají chondrocytové buňky 24. Vhodnou podpůrnou mateřskou půdou 22 je pevný nebo gelovitý skelet, který charakterizuje schopnost udržet si stabilní tvar po dobu, ve které se umožní, aby v něm rostly chondrocytové buňky, jak před transplantací, tak po ní, a který poskytuje systém podobný přirozenému prostředí pro chondrocytové buňky, aby se optimalizovala diferenciace růstu chondrocytových buněk.

Podpůrná mateřská půda 22 bude stabilní po časový úsek postačující k úplné reparaci chrupavky a potom jí časem, například během tří měsíců, tělo absorbuje, aniž by po ní zůstaly jakékoli významné stopy a aniž by se vytvořily toxické degradační produkty. Výrazem „absorbovat“ se míní, že zahrnuje procesy, pomocí kterých se podpůrná mateřská půda rozpadne přirozenými biologickými procesy a rozpadlá podpůrná mateřská půda a její degradační produkty se vyloučí, například lymfatickými nebo krevními cévami.

Podpůrná mateřská půda 22 je proto výhodně fyziologicky absorbovatelnou, neantigenní, membráně podobnou látkou. V jednom provedení má dále podpůrná mateřská půda 22 výhodně formu podobnou fólii, která má jednu relativně hladkou stranu 21 a jednu relativně drsnou stranu 23. Drsná strana 23 je obrácená k poruše chrupavky 18 a podporuje růst chondrocytů dovnitř, zatímco hladká strana 21 je typicky odvrácená od poruchy chrupavky 18 a brání zarůstání tkáně. V jiném provedení má podpůrná mateřská půda 22 dvě hladké strany s podobnou pórovitostí.

V jednom provedení se podpůrná mateřská půda 22 vytváří z polypeptidů nebo proteinů. Polypeptidy nebo proteiny se výhodně získávají z přírodních zdrojů, např. ze savců. Pro vytvoření podpůrné mateřské půdy 22 lze však také použít umělé

materiály, které mají srovnatelné fyzikální a chemické vlastnosti s polypeptidy nebo proteiny z přírodních zdrojů. Také je výhodné, aby se podpůrná mateřská půda 22 vratně tvarovala, přitom jak s ní uživatel manipuluje, tak, že s implantátem 20 lze manipulovat a potom se vrátí ke svému původnímu tvaru, jak se popisuje níže v jednom z aspektů předloženého vynálezu.

Výhodným materiálem, z kterého se vytváří podpůrná mateřská půda je kolagen, například získaný z koní, prasat, hovězího dobytka, ovcí nebo kuřat.

Vhodné materiály, z kterých lze vytvořit podpůrnou mateřskou půdu 22, zahrnují ChondroCell® (komerčně dostupná mateřská půda kolagenu typu II, Ed. Geistlich Sohne, Švýcarsko) a Chondro-Gide® (komerčně dostupná mateřská půda kolagenu typu I, Ed. Geistlich Sohne, Švýcarsko). Podpůrná mateřská půda 22 vytvořená z kolagenu typu I je poněkud tužší než podpůrná mateřská půda vytvořená z kolagenu typu II, ačkoli mateřské půdy s kolagenem typu II lze také používat. Dalším výhodným materiálem, z kterého se podpůrná mateřská půda vytváří, je zesíťovaná a nezesíťovaná forma Permakolu™ (Tissue Science Laboratories, UK).

Kolagen se jinak získává z mořské houby, jak se popisuje v práci Swatschek a spol.: *Eur. J. of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2002, **53**, 107-113 a v australské patentové přihlášce č. AU 3741701. Stručně řečeno se kolagen izoluje z mořské houby několikerým promytím houby vodou, rozemletím a homogenizací houbové tkáně, zpracováním roztoku s vysokými koncentracemi močoviny, odstředěním vzniklého roztoku a vysrážením kolagenu ze supernatantu.

Výše popsany implantát lze například připravit pomocí

kultivace chondrocytových buněk v této mateřské půdě, jak se detailněji popisuje níže.

Pro přípravu autologního implantátu se nejprve chrupavková biopsie odebere artroskopickou technikou z nezatěžované oblasti kloubu pacienta a přenesse se do laboratoře v živném roztoku obsahující 20 % fetálního telecího séra.

Chrupavková biopsie se pak smísí s enzymem, například trypsinethyldiamintetraoctovou kyselinou (EDTA), proteolytickým enzymem a pojivovým činidlem, aby se izolovaly a extrahovaly chondrocytové buňky chrupavky. Extrahované chondrocytové buňky se potom kultivují v živném roztoku z počátečního počtu buněk okolo 50.000 do konečného počtu asi 20 milionů chondrocytových buněk nebo více.

Tři (3) dny před re-implantací se živný roztok zamění za transplantační roztok, který obsahuje 10 % autologní sérum (to jest sérum extrahované z pacientovy krve, jak se popisuje níže). Kultivované chondrocytové buňky v transplantačním roztoku se nechají vsáknout a pronikají do jedné nebo více vrstev podpůrné mateřské půdy 22 a jejich množení pokračuje, aby se vytvořil implantát 20. Výhodně chondrocytové buňky přilnou pouze k jednomu okraji vnější vrstvy podpůrné mateřské půdy 22. Implantát 20 se pak implantuje pacientovi na místo poruchy chrupavky 18.

Je pochopitelné, že poruchu nebo poranění 18 lze přímo ošetřit, lehce zvětšit nebo odstranit operačním postupem před implantací tak, jak se popisuje v US patentové přihlášce č. 09/320,246, aby se přizpůsobila implantátu 20. Způsob kultivace, jakož i živné a transplantační roztoky se níže detailně popisují ve formě příkladu, počínaje nejprve popisem

laboratorního postupu zpracování odebrané chrupavkové biopsie a kultivací chondrocytových buněk, v souladu s předloženým vynálezem.

Kultivační půdy (dále „živné roztoky“), použité pro nakládání s chrupavkovou biopsií během kultivačního procesu a pro růst chondrocytových buněk chrupavky, se připraví smísením 2,5 mL sulfátu gentomycinu (koncentrace 70 mikromolů/litr), 4,0 mL amfotericinu (koncentrace 2,2 mikromolu/litr; obchodní značka Fungizone®, fungicid dostupný od fy Squibb), 15 mL kyseliny L-askorbové (300 mikromolů/litr), 100 mL fetálního telecího séra (konečná koncentrace 20 %) a doplní se roztokem DMEM/F13, aby se připravilo 400 mL živného roztoku. (Stejný živný roztok se také používá k přenosu chrupavkové biopsie z nemocnice do laboratoře, ve které se chondrocyty extrahují a množí.)

Krev získaná od pacienta se odstředí při přibližně 3000 otáčkách za minutu, aby se oddělilo krevní sérum od jiných složek krve. Oddělené krevní sérum se uloží a použije se v pozdějším stadiu kultivačního postupu a při transplantaci.

Biopsie chrupavky dříve získaná od pacienta pro autologní transplantaci se odešle ve výše popsaném živném roztoku do laboratoře, kde se bude kultivovat. V laboratoři se oddělí biopsie chrupavky dekantací od živného roztoku a ten se vylije. Biopsie chrupavky se pak aspoň třikrát promyje čistým DMEM/F12, aby se odstranil film fetálního telecího séra z povrchu chrupavkové biopsie.

Biopsie chrupavky se pak promyje ve směsi, která obsahuje výše popsaný živný roztok, do kterého se přidalo 28 mL trypsinové EDTA (koncentrace 0,06 %). V této směsi se inkubuje pět až deset minut při 37 °C a v atmosféře s 5 % CO₂. Po

inkubaci se biopsie chrupavky promyje dvakrát až třikrát v živném roztoku, aby se biopsie omyla od enzymu trypsinu. Chrupavka se pak zváží. Minimální množství chrupavky, typicky požadované pro růst chondrocytů, je asi 80-100 mg. Výhodnější je poněkud větší množství, tak asi 200 až 300 mg. Po zvážení se chrupavka umístí do směsi 2 mL kolagenázy (trávicí enzym; koncentrace 5000 enzymatických jednotek) s přibližně 50 mL čistého roztoku DMEM/F12, a rozmělní se, aby enzym částečně natrávil chrupavku. Po rozmělnění se rozmělněná chrupavka převede nálevkou do baňky a přidá se k ní asi 50 mL kolagenázy a čisté směsi DMEM/F12. Rozmělněná chrupavka se pak 17 až 21 hodin inkubuje při 37 °C a v atmosféře s 5 % CO₂.

V jednom provedení se potom rozmělněná inkubovaná chrupavka scedí přes 40 µm síto, odstředí se (při 1054 otáčkách za minutu, nebo 200 násobku g) během 10 minut a promyje se dvakrát živným roztokem. Potom se chondrocytové buňky sečtou, aby se určila jejich schopnost růstu, po čemž se chondrocytové buňky inkubují v živném roztoku alespoň dva týdny při 37 °C a v atmosféře s 5 % CO₂, přičemž se během této doby živný roztok vymění tři až čtyřikrát.

Nejméně tři dny před re-implantací pacientovi, se chondrocytové buňky odstraní ze živného roztoku pomocí trypsinizace a odstřeďování a převedou se do transplantačního roztoku obsahujícího 1,25 mL gentamycin-sulfátu (koncentrace 70 mikromolů/litr), 2,0 mL amfotericinu (koncentrace 2,2 mikromolu/litr; obchodní značka Fungizone®, fungicid dostupný od fy Squibb), 7,5 mL kyseliny L-askorbové (300 mikromolů/litr), 25 mL autologního krevního séra (konečná koncentrace 10 %) a doplní se roztokem DMEM/F12, aby se připravilo asi 300 mL transplantačního roztoku.

Podpurná mateřská půda 22 se pak seřízne na vhodnou

velikost pro dno jamky destičky NUNCLON™ pro kultivaci buněk a pak se za aseptických podmínek umístí na dno jamky s 1-2 mL transplantačního roztoku. Dostatečný počet kultivovaných chondrocytových buněk chrupavky (např. 3-10 milionů chondrocytových buněk) v přibližně 5-10 mL transplantačního roztoku se pak nasákne do podpůrné mateřské půdy 22 a inkubací po dobu přibližně 72 hodin při 37 °C a v atmosféře s 5 % CO₂ se buňky chondrocytů nechají dále růst. Během této inkubace se chondrocytové buňky poskládají do chumlvů a přilnou k podpůrné mateřské půdě 22. V jednom provedení přilnou chondrocytové buňky pouze k jedné vnější vrstvě jedné strany podpůrné mateřské půdy 22. Použitím tohoto způsobu se zjistilo, že podpůrná mateřská půda 22 podporuje růst a zadržuje v sobě dostatečný počet chondrocytových buněk, aby vytvořila implantát 20, bez významné ztráty biomechanických vlastností podpůrné mateřské půdy 22. Podpůrná mateřská půda 22 také poskytuje prostředí k podpoře nepřetržitého růstu chondrocytových buněk po implantaci implantátu 20 na místo defektu chrupavky 18.

V jiném provedení se po 17 až 21 hodinové inkubační době a stanovení počtu buněk a jejich životaschopnosti, jak se diskutuje výše, chondrocytové buňky převedou do transplantačního roztoku a pak alespoň dva týdny rostou přímo na podpůrné mateřské půdě 22, jak se popisuje výše.

Zjistilo se, že implantát 20 lze přechodně deformovat bez mechanického poškození nebo bez ztráty chondrocytových buněk, které přilnuly k podpůrné mateřské půdě 22. Tato deformace je zcela reverzibilní jakmile se implantát 20 jednou zavede do kloubu nebo se umístí na povrch, který se má ošetřit, jak se popisuje níže.

Podle toho a v souladu s dalším aspektem předloženého

vynálezu, lze podpůrnou mateřskou půdu 22, na níž chondrocytové buňky rostou nebo na níž se vložily v dostatečném počtu, přechodně deformovat způsobem, který dovoluje její zavedení do pracovního zařízení artroskopu, aniž by se mechanicky zničila nebo aniž by došlo ke ztrátě chondrocytových buněk na ní vložených.

Současně se zjistilo, že tuto podpůrnou mateřskou půdu lze připevnit k místu poruchy chrupavky přilnavými nebo mechanickými úchytnými prostředky, aniž by se narušila další diferenciace chondrocytů *in situ* a regenerace přirozeného materiálu chrupavkového lůžka.

Další aspekty předloženého vynálezu zahrnují nástroje pro umístění implantátu 20 na implantační místo a mechanické úchytné zařízení, aby se implantát 20 udržel v místě implantace.

V jednom provedení předloženého vynálezu se implantační postup provádí pomocí artroskopické techniky. Obr. 5 ukazuje, jak lze implantát 20 svinout po celé délce jeho průměru 25, aby se vytvořil spirálovitý válcovitý transplantát tak, že se implantát 20 může dopravit na místo implantace přes pracovní kanálek 32 artroskopického zaváděcího zařízení 30. Vhodné artroskopické zaváděcí zařízení se znázorňuje na obr. 6.

Artroskopické zaváděcí zařízení 30 na obr. 6 zahrnuje pracovní kanálek 32, který má vhodnou délku 35 a průměr 31 pro proniknutí do daného kloubu a pro dopravení implantátu 20 s požadovanou velikostí. Pro většinu postupů je například průměr pracovního kanálku 32 přibližně 8 až 20 mm a délka 35 je přibližně 30 až 60 cm. Uvnitř je podélně, vzhledem k pracovnímu kanálku 32, pohyblivý injekční kanálek 34 se zatahovatelnou a vyměnitelnou jehlou 36. Injekční kanálek 34

se připojuje k násadě 38, která je teleskopicky stlačitelná, alespoň zčásti, do pracovního kanálku 32. Jehla 36 prodlužuje délku injekčního kanálku 34 a umožňuje, aby se kapaliny přes ní protlačily k místu implantace. Injekční kanálek 34 se pohybuje uvnitř pracovního kanálku 32 pomocí teleskopicky se pohybující násady 38 k implantačnímu místu nebo od něho.

Zaváděcí zařízení 30 také zahrnuje čepičku, zvon 40 z gumy nebo z jiného vhodného materiálu, kluzně nasazenou na zaváděcí zařízení 30. Při použití obklopí čepička 40 místo poruchy chrupavky a nevpustí kapaliny, například krev a další přirozené kapaliny, aby přitékaly do místa poruchy chrupavky. Zaváděcí zařízení 30 má také dva nebo více směrem ven vychýlených uchopovacích prvků 42, připojených k násadě 38, pro uchopení, zavedení a umístění implantátu 20 na implantační místo. Jak se při použití násada 38 teleskopicky pohybuje směrem k uživateli nebo od něho, uchopovací prvky 42 se zatahují dovnitř pracovního kanálku 32 a pohybují se jeden k druhému uchopovacím způsobem (zatímco se násada 38 pohybuje směrem k uživateli) a směrem jeden od druhého uvolňují uchopení (zatímco se násada 38 pohybuje směrem od uživatele). Takový teleskopický pohyb lze řídit šikmým prvkem (který není znázorněn na obrázku) umístěným uvnitř násady 38, který umožňuje injekčnímu kanálku 34 a uchopovacím prvkům 42, aby se kluzně vysunovaly a zatahovaly uvnitř pracovního kanálku 32.

Obrázky 7 až 9 znázorňují typický artroskopický postup implantace implantátu 22 na takové místo implantace, jakým je kolenní kloub 10. Defektní chrupavka 18 se z místa poruchy odstraní, výhodně do hloubky nad subchondrální vrstvu 44, čímž vznikne jamka 46 (viz obr. 8 a 9). Po odstranění defektní chrupavky 18 je místo poruchy připravené pro vložení implantátu 22. Pokud je subchondrální vrstva natolik narušena, že dochází ke krvácení v místě implantace, lze nejprve místo

volitelně překrýt jakýmkoli absorbovatelným materiálem, který slouží jako hemostatická bariéra.

Příprava místa může jinak zahrnovat injekci lepidla slučitelného se živou tkání přes jehlu 36 do jamky 46. Takové lepidlo slučitelné s živou tkání, označené na obr. 8 jako lepidlo 48, může obsahovat organické fibrinové lepidlo (např. Tissel®, lepidlo na fibrinovém základu, Baxter, Rakousko, nebo fibrinové lepidlo připravené na operačním sále za použití vzorku autologní krve).

Implantát 20 se nejdříve seřízne na požadovaný rozměr a svine do spirálně-válcovitého tvaru, jak se znázorňuje na obr. 7, pak se uchopí uchopovacími prvky 42 a drží se na konci artroskopického zaváděcího zařízení 30. Artroskopické zaváděcí zařízení 30 držící implantát 20 na svém konci, se potom vsune k místu implantace přes přístupový kanálek 33, implantát se uvolní z uchopovacích prvků 42 a rozvine se pomocí uchopovacích prvků 42 nebo se nechá rozvinout, když opouští pracovní kanálek 32. Přístupový kanálek 33 zahrnuje jeden nebo více kanálků 60, které dovolují, aby instrumenty, například zaváděcí zařízení 30 a pozorovací zařízení, měly přístup k transplantačnímu místu. S použitím uchopovacích prvků 42 se s implantátem 20 manipuluje tak, že strana nesoucí chondrocyty, v tomto provedení hrubá strana 23 implantátu 20, směřuje do jamky 46 a je jemně přidržována na místě v jamce 46, aby umožnila lepidlu 48 ztuhnout a držet implantát 20 v jamce 46.

Jak se ukazuje na obr. 7, lze použít druhý přístupový kanálek 60, který má jeden nebo více kanálků, aby se umožnil přístup instrumentů k místu, nápomocných při umísťování implanátu, lepidla a/nebo úchytných mechanických prostředků, nebo aby se umožnil přístup pozorovacích zařízení k místu implantace. Takový oddělený přístupový kanálek 60 lze také

použít tak, aby splňoval jednu nebo více funkcí popisovanou ve vztahu k artroskopickému zaváděcímu zařízení 30 nebo k dalším artroskopickým instrumentům.

V jiném provedení (obr. 9) se k zajištění implantátu 20 v jamce 46 používají mechanické upínací prostředky, například absorbovatelné svorky, skoby, šroubky nebo stehy. Vhodné svorky 50 zahrnují Ortho-Pin™ (komerčně dostupnou svorku z laktidového kopolymeru, Ed. Geistlich Sohne, Švýcarsko). Obr. 10 znázorňuje jedno provedení absorbovatelné svorky 50. V tomto provedení svorku 50 tvoří hlava 52, intramedulární kanálek 54 uvnitř osy 56 a jeden nebo více přidržovacích kroužků 58. Rozměry svorky 50 se budou měnit podle konkrétního použití, ale typicky je svorka 50 asi 10-15 mm dlouhá, hlava 52 má průměr asi 4 mm, intramedulární kanálek 54 má průměr asi 1,2 mm, osa 56 má průměr přibližně 2 mm a přidržovací kroužky 58 mají průměr asi 2,5 mm. Přidržovací kroužky 58 slouží k ukotvení svorky 50 ve zdravé chrupavce, která obklopuje poruchu chrupavky. Svorka 50 se vyrábí z jakéhokoli materiálu, který tělu nebude škodit a je schopný se po určitém čase absorbovat nebo být tělem jinak odbourán. Svorku 50 lze například vyrobit z polylaktidu.

Jako předmět předloženého vynálezu se také zamýšlí použití kombinace lepidla 48 a mechanického přidržovacího zařízení, například svorky 50, k upevnění implantátu 20 v jamce 46.

Jak se výše naznačilo, v případech, kdy se porucha chrupavky 18 rozšiřuje do subchondrální vrstvy 44 nebo pod ní, či vyžaduje odstranění chrupavky do subchondrální vrstvy 44 nebo pod ní, jak znázorňují obr. 11 a obr. 12, lze výše uvedený postup modifikovat tak, aby zahrnoval umístění hemostatické bariéry 62 do jamky 46 před vložením implantátu

20. U takových defektů může lékař volitelně použít hemostatickou bariéru 62, aby se inhiboval růst nebo invaze vaskulární tkáně, osteocytů, fibroblastů atd. do rozvíjející se chrupavky. Má se za to, že toto umožní vytvoření hladké chrupavky v místě transplantace. Vhodné hemostatické bariéry budou inhibovat vaskularizaci a invazi buněk do rozvíjející se chrupavky, aby se optimalizovala tvorba chrupavky a docílil se v místě poruchy růst chrupavky v plné tloušťce. Hemostatická bariéra je výhodně stálá dlouhou dobu, aby umožnila úplnou reparaci chrupavky a po této době se časem absorbuje nebo se jinak rozloží v organismu. Vhodnou hemostatickou bariérou je Surgicel® W1912 (Ethicon, Ltd, Spojené království), absorbovatelný hemostat vytvořený z oxidované, regenerované, sterilní celulózy.

Výše popsané chirurgické nástroje se vyrábějí z jakéhokoli materiálu, například z kovu a/nebo plastu nebo silikonu, vhodného pro výrobu chirurgických nástrojů na jedno nebo vícenásobné použití.

Podpůrná mateřská půda 22 nebo krycí lůžko 2 předloženého vynálezu se tvoří z kolagenové membrány, jak se vyrábí postupem popsaným v US patentu č. 5,028,695 (uděleného společnosti Chemokol Gesellschaft zur Entwicklung von Kollagenprodukten), který se zde zahrnuje jako odkaz. Kolagenovou membránu lze připravit ze surového hovězího nebo vepřového kolagenového materiálu podle tohoto postupu: kolagenová surovina se zbaví zbytků mastných kyselin, promyje vodou, nechá se reagovat v alkalickém prostředí, promyje se vodou, nechá se reagovat s kyselinou, promyje se vodou, znovu se nechá reagovat se silnou alkálií, pak s kyselinou, což způsobí nabobtnání, nechá se reagovat s anorganickou solí, aby došlo ke smrštění, materiál se vymačká na suchou hmotnost 40-50 % hmotnostních, zadržená voda v tomto materiálu se odstraní

přidavkem rozpouštědla, je-li potřebné, tak lze materiál zesíťovat, a pak se v napnuté formě suší.

Podpůrnou mateřskou půdu 22 nebo krycí lůžko 2 lze také vytvořit z membrány obsahující kolagen, například kolagen typu I nebo typu II a z elastinu, například z membrány, která se popisuje v US patentu č. 5,397,353 (uděleného Oliveru a spol. z University of Dundee), který se zde zahrnuje jako odkaz. Kolagen kolagenové/elastinové membrány se může získat z koňského, vepřového, hovězího, ovčího a kuřecího zdroje. V jednom provedení je podpůrná mateřská půda 22 nebo krycí lůžko 2 kolagenová/elastinová vepřová kůže, která prodělala řadu organických extrakcí, aby se z ní odstranil tukový obsah. Jakmile se tuk odstraní, podrobí se řezy řadě enzymatických extrakcí, aby se odstranil všechny buněčný materiál. O takovém produktu, který se připraví v souladu s US patentem 5,397,353, se má za to, že jde o Permacol™ a různé zesíťované verze Permacolu™.

V předloženém vynálezu lze použít další membrány podobné Permacolu™, například Rapi-Seal Patch (Fusion Medical Technologies, Inc., Fremont, CA) a Tissue Repair Patch (Glycar Vascular Inc., Dallas, TX).

Kolagen/elastinová membrána může být až do 20 % zesíťovaná s polyisokyanáty, výhodně s hexamethylen-diisokyanátem (HMDI). Kolagen/elastinová membrána použitá jako podpůrná mateřská půda 22 nebo jako krycí lůžko 2 může být ve formě folie, která má dvě hladké strany a póry stejné velikosti a textury.

Kolagen/elastinová membrána má výhodně následující specifikaci: tloušťka 0,75 mm, délka 4,8 až 5,2 cm, šířka 4,8 až 5,2 cm, obsah kolagenu větší než 79 % a obsah tuku 0,4 %.

Na tomto lůžku lze kultivovat chondrocytové buňky, aby vytvořily implantabilní výrobek, jak se předtím výše popsalo. Implantabilní výrobek lze umístit do místa poruchy chrupavky nebo přes toto místo.

V jiném provedení se podpůrná mateřská půda 22 může zhotovit ze submukózy tenkého střeva (SIS - Small Intestine Submucose). Způsob přípravy SIS ze segmentu tenkého střeva se detailně popisuje v US patentu č. 4,902,508, který se zde zahrnuje jako odkaz. Segment střeva, výhodně se užívá střevo vepřové, ovčí nebo hovězí, se nejprve oškrábe pomocí podélných stíracích pohybů, aby se odstranily obě vnější vrstvy (obzvláště *tunica serosa* a *tunica muscularis*) a vnitřní vrstvy (aspoň luminální podíly *tunica mucosa*). Sliznice tenkého střeva se typicky máčí v solance a volitelně se skladuje v hydratovaném nebo dehydratovaném stavu, než se použije, jak se popisuje níže. Velké množství na sebe položených vrstev tkáně sliznice tenkého střeva se pak zlisuje, přitlačí se jedna k druhé a vytvaruje se, aby poskytly mnohovrstvou předělanou strukturu, jak se popisuje v US patentech č. 5,788,625, 5,922,028 a 6,176,880 (všechny udělené DePuy Orthopaedics (Warshaw, IN)), které se zde zahrnují jako odkaz. Mnohovrstvá struktura je vybavena dostatečným množstvím submukózních vrstev, aby vytvořila strukturu rekonstrukčního tkáňového implantátu s požadovanou tloušťkou pro náhradu endogenní chrupavkové struktury.

Další SIS membrány, které jsou užitečné v předloženém vynálezu zahrnují Suspend Sling™ z Mentor Corporation (Santa Barbara, CA), Staple Strips™ z Glycar Vascular, Inc. (Dallas, TX), Surgical Fabrics z Boston Scientific (Natick, MA), SurgiSIS™ Sling a SurgiSIS™ Mesh z Cook Biotech, Inc. (West Lafayette, IN), SIS Hernia Repair Device ze Sentron Medical, Inc. (Cincinnati, OH) a Restor® Soft Tissue Implant z DePuy

Orthopaedics.

Další membrána, kterou lze využít pro podpůrnou mateřskou půdu 22 nebo krycí lůžko 2 v souladu s předloženým vynálezem, je resorbovatelná kolagenová membrána popsaná v US patentu č. 5,837,278 (uděleném Ed. Geistlich Sohne AG), který se zde zahrnuje jako odkaz. Tato resorbovatelná membrána se může získat z přirozeně se vyskytujících membrán, například vrstev kůže s lícovou stranou, šlach, a rozličných zvířecích membrán. Tato kolagenová membrána má vláknitou stranu, ve které dochází k podpoře růstu buněk, a hladkou stranu, která inhibuje přilnutí buněk k ní. Membrána se připraví reakcí s alkálií, aby se zmýdelnily tuky a degradovaly látky citlivé na alkálii, reakcí s kyselinou, aby se degradovaly látky citlivé na kyselinu, promytím, sušením, zbavením tuků a je-li potřebné, tak se zesítuje.

Další kolagenové membrány, které lze použít jako podpůrnou mateřskou půdu 22 nebo krycí lůžko 2 v souladu s předloženým vynálezem, zahrnují FortaFlex™ (připravený z kolagenu typu I) a GraftPatch® (připravený ze zesítovaného kolagenu) od firmy Organogenesis, Inc. (Canton, MA). V předloženém vynálezu je navíc také užitečný přípravek koňského kolagenu typu I Antema® od Opicrin S.p.A. (Corlo, Itálie).

Další membrány vhodné pro použití jako podpůrná mateřská půda 22 nebo krycí lůžko 2 zahrnují CollaTec membránu od Colla-Tec, Inc. (Plainsboro, NJ), Collagraft od NeuColl (Campbell, CA), BioMend od Integra Life Sciences Corporation (Plainsboro, NJ) a BioMend® Absorbable Collagen Membrane od Collagen Matrix, Inc. (Franklin Lakes, NJ). Biosynthetic Surgical Mesh od Advanced UroSciences, Inc., Brennen Medical, Inc. (St. Paul, MN), která se připravuje z vepřové kůže (v

podstatě čistý kolagen) a BIOBAR™ od Col-Bar, Ltd. (Ramat-Hasharon, Izrael) jsou také užitečnými materiály pro podpůrnou mateřskou půdu 22 nebo krycí lůžko 2 v předloženém vynálezu.

Kolagenové membrány s uspořádanými vlákny na makromolekulární úrovni jsou ještě navíc také vhodné pro použití jako podpůrná mateřská půda 22 nebo krycí lůžko 2. Takové membrány se popisují například v mezinárodním patentu s publikačním č. WO 02/09790 firem Mediolanum Farmaceutici S.P.A. a Opocrin S.P.A..

V jiném provedení lze podpůrnou mateřskou půdu 22 a/nebo krycí lůžko 2 vytvořit z kolagenových vlákenek, která se vzájemně zesítují přes redukující cukr nebo jeho derivát, jak se například zveřejňuje v US patentu č. 5,955,438 (uděleném ColBer R&D Ltd., Ramat-Hasharon, Izrael), který se zde ve své úplnosti zahrnuje jako odkaz. Takové cukry mohou zahrnovat, ale nejsou tím omezeny, ketony nebo aldehydy monosacharidů, ribózu, glycerózu, threózu, erythrózu, lyxózu, xylózu, arabinózu, allózu, altrózu, glukózu, mannózu, gulózu, idózu, galaktózu, talózu nebo jakékoli další diózy, triózy, tetrózy, pentózy, hexózy, septózy, októzy, nanózy či dokózy a kombinace jednoho nebo více těchto sacharidů. Podpůrná mateřská půda 22 a/nebo krycí lůžko 2 může také zahrnovat antimikrobiální látky, které mají terapeutický účinek během regenerace chrupavky. Takové antimikrobiální látky zahrnují penicilin, cefalosporiny, tetracykliny, streptomycin, gentamicin, sulfonamidy, fungicidy, například mykonazol, protizánětlivé látky, například kortizon, a kombinace jedné nebo více těchto látek. V podpůrné mateřské půdě 22 jsou také obsaženy faktory s tkáňově induktivními vlastnostmi, například fibroblastový růstový faktor, růstové faktory získané z krevních destiček, transformační růstové faktory, diferenciační růstové faktory a podobně.

Další kolagenové materiály, užitečné v předloženém vynálezu, se zveřejňují v US patentech č. 5,256,418 a č. 5,993,844 (uděleném Organogenesis, Inc.), v US patentu č. 6,206,931 (uděleném Cook Biotech, Inc.) a v US patentu č. 5,026,381 (uděleném Colla-Tec Inc.), které se zde všechny zahrnují jako odkaz a které mohou náležet jednomu nebo více produktům zde diskutovaným.

Produkty, které se dosud neprodávají v USA a které lze použít jako podpůrnou mateřskou půdu 22 nebo krycí lůžko 2 zahrnují MACI-MaixR (Matricel, Herzogenrath, Německo), Bio-Seed C (Biotissue, Miami, FL) a VivesCart a PLA/PGA kopolymery (IsoTis, Bilthoven, Nizozemí).

V dalším provedení se může podpůrná mateřská půda 22 nebo krycí lůžko 2 vytvářet z pórovitého materiálu kolagenových vláken obsahujících antibakteriální látky taurolidin a/nebo taurultam, jak se popisuje v EP 446,262 (uděleném Geistlich Soehne AG, Wolhusen, Švýcarsko), který se zde zahrnuje jako odkaz. Kolagenová pórovitá hmota se může získat z komerčních zdrojů, například od Pentapharm AG z Bazileje, Švýcarsko, od Dr. Otto Suwelak Gmg Hof Billerbeck, Německo nebo od Ed. Geistlich Sohne A.G. Wolhusen, Švýcarsko. Kolagenovou pórovitou hmotu lze také vyrobit obvyklými způsoby. Například se může hovězí kůže zpracovat chemicky a mechanicky tak, aby se oddělila epidermis od spodního přidruženého tuku. Vrstvu lze potom zpracovat se středně silnou alkálií, následně s kyselinou a potom promýt. K separaci kolagenu od ostatních proteinů se může použít proteolytický enzym a k oddělení zbytkového tuku se může použít lipáza. Kolagenový produkt se pak může nechat reagovat s oxidačním činidlem, homogenizuje se a lyofilizuje. Včlenění taurolidinu nebo taurultamu lze provést před lyofilizací nebo opětným rozpuštěním lyofilizovaného kolagenu v roztoku taurolidinu nebo taurultamu

a opětovnou lyofilizací.

V dalším provedení lze podpůrnou mateřskou půdu 22 nebo krycí lůžko 2 vytvořit v souladu se způsobem pro výrobu porézních struktur popsaných ve WO 99/27315 (Dip. Ing. Ingo Heshcel, Německo), který se zde zahrnuje jako odkaz. Porézní struktury se tvoří z kapalně nebo pastové směsi látek, které alespoň částečně ztuhnou ochlazením směsi mezi dvěma vnořenými povrchy, které se mohou temperovat a mají odlišné teploty. Během tuhnutí se tvoří uspořádaná struktura. Částečně ztuhlý produkt se pak suší vymražením a poskytne homogenní porézní strukturu.

Podpůrnou mateřskou půdu 22 nebo krycí lůžko 2 lze také vytvořit z jednoho nebo více biologicky absorbovatelných polymerů, například z kolagenu, fibrinu, lamininu a fibronektinu, které mají velké, vzájemně propojené póry, v souladu se způsobem popsaným v US patentu č. 5,869,080 (uděleném Johnson & Johnson Medical Inc., NJ), který se zde zahrnuje jako odkaz. Tento biologicky absorbovatelný polymer lze před zmrazením zesíťovat, například s hexamethylen-diisokyanátem (HMDI).

Podpůrnou mateřskou půdu 22 nebo krycí lůžko 2 lze vytvořit z kolagenové pórovité hmoty, například Instat™ (Johnson & Johnson), jak se popisuje v brožuře Johnson & Johnson nazvané "Instat Collagen Absorbable Hemostat", září 1985, která se zde zahrnuje jako odkaz.

V dalším provedení lze podpůrnou mateřskou půdu 22 nebo krycí lůžko 2 vyrobit z biologicky absorbovatelné pórovité hmoty v souladu se způsobem popsaným v US patentu č. 5,700,476 (Johnson & Johnson Medical Inc., NJ), který se zde zahrnuje jako odkaz. Pórovitá hmota zahrnuje strukturu lůžka a aspoň

jednu substrukturu a aspoň jedno farmakologicky aktivní činidlo. Lůžko a substruktura se, mezi jinými, může vyrobit z biologicky absorbovatelných materiálů, například kolagenu, lamininu, elastinu a fibronektinu. Pórovité lůžko může také obsahovat jeden nebo více proteinů nebo jeden nebo více polysacharidů či jejich směsi. Farmakologické činidlo může, mezi jinými, zahrnovat antimikrobiální látku, cytokin, růstový faktor nebo protilátku.

V dalším provedení se podpůrná mateřská půda 22 nebo krycí lůžko 2 utváří z kolagenových vláken, jak se popisuje v patentu WO 96/25961 (Geistlich Soehne AG), který se zde zahrnuje jako odkaz. Lůžko může dále obsahovat látku podobnou hydrogelu obsahující glykosaminoglykany, například chondroitin-sulfát, keratan-sulfát, dermatan-sulfát a kyselinu hyaluronovou a růstové faktory. Příklad takového lůžka se popisuje v US patentu č. 5,489,304 (Orgill a spol.), který se zde ve své úplnosti zahrnuje jako odkaz.

Podpůrnou mateřskou půdu 22 nebo krycí lůžko 2 lze také utvořit z mnohovrstvé membrány obsahující porézní lůžkovou vrstvu převážně z kolagenu II a aspoň jednu hustou bariérovou vrstvu, jak se popisuje v patentu WO 99/19005 (Geistlich Soehne AG) a US patentu publikační č. 2002/0013627 (Geistlich a spol), které se zde zahrnují jako odkaz. Lůžková vrstva má otevřenou houbovitou texturu a bariérová vrstva má uzavřenou relativně nepropustnou texturu. Lůžková vrstva může navíc obsahovat glykosamino-glykany, mezi jinými například kyselinu hyaluronovou, chondroitin-sulfát, keratan-sulfát a dermatan-sulfát. Lůžková vrstva může také obsahovat laminin, fibronektin-kalcium-alginát nebo anchorin II a růstové faktory. Bariéra se může vyrobit z kolagenu I a III nebo ze syntetických materiálů, například polyesterů, homopolymerů a kopolymerů kyseliny polyglykolové a polymléčné, kopolymerů

glykolidu a laktidu, polyortoesterů a polykaprolaktonů.

Příklady membrán, ve kterých jsou začleněné syntetické látky, například polystery, se zahrnují do předloženého vynálezu a jejich příklady jsou Parietex® Mesh a Parietex® Composite Mesh od Sofradim Production (Trevoux, Francie), SepraMesh™ od Genzyme Corporation (Framingham MA) a Composix™ Mesh od C. R. Bard, Inc. (Murray Hill, NJ).

V dalším provedení vynálezu se podpůrná mateřská půda 22 a/nebo krycí lůžko 2 vytvoří z perikardia. Příklady membrán utvořených z perikardia, které jsou užitečné v předloženém vynálezu, zahrnují Tutopatch® od Tutogen Medical, Inc. (Parsipanny, NJ), Peri-Guard linie membrán a Bio Vascular Sling od Bio Vascular (St. Paul, MN).

Určité aspekty vynálezu se dokládají příklady pomocí použití systému *in vitro* ke studiu chování chondrocytových buněk, které jsou ve styku s rozdílnými nosnými lůžky. Tyto *in vitro* testy předpovídají způsobilost určitých materiálů, aby mechanicky vydržely artroskopický postup, a také poskytují informaci o chování růstu chondrocytových buněk.

Tyto a další aspekty předloženého vynálezu lze lépe pochopit z následujících příkladů, jejichž smyslem je předložený vynález ilustrovat a nikoli omezovat.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1A je nákres zobrazující typické kloubní ukončení kosti 3. Kostní materiál je charakteristicky pokryt na povrchu kloubu chrupavčitou čepičkou 4. Dojde-li k poškození nebo k poranění chrupavčité čepičky (prohlubeň v chrupavčité čepičce 18 na obr. 1B), může se poškozené místo 18 léčit přímo nebo se

může poněkud rozšířit operačními výkony. Do poškozeného místa chrupavčité čepičky se volitelně může umístit hemostatická bariéra 1, aby inhibovala nebo předcházela vaskularizaci do obnovující se chrupavky z pod ní ležící kosti (obr. 1C), když je to nutné, například při poruchách, které se rozšiřují do subchondrální vrstvy nebo pod ní. Chondrocyty, které se mají implantovat do dutiny poruchy se potom vrství na vršek této hemostatické bariéry 1 nebo přímo na vršek poškození.

Obr. 2 je nákres zobrazující léčenou poruchu (mezera v tečkované části) v chrupavčité čepičce (tečkovaná část) pokrytá lůžkem, které se používá k vytvoření čepičky/náplasti nebo bandáže (krycí lůžko - 2) na poškozeném místě. Toto lůžko se na místě fixuje buď šitím nebo lepením k okraji dutiny ke zdravé chrupavce nebo se připevňuje jinak. Lůžko kryje poškozenou oblast kloubu, do které se transplantovaly kultivované chondrocyty.

Obr. 3A ukazuje typický artikulární konec kosti kolenního kloubu, který má na kloubním povrchu chrupavčitou čepičku 16.

Obr. 3B ukazuje defekt chrupavky nebo poranění chrupavčité čepičky artikulárního konce kosti 18.

Obr. 4 ukazuje jedno provedení implantabilního výrobku (implantátu) 20 v souladu s předloženým vynálezem.

Obr. 5 ukazuje, jak se může implantát 20 z obr. 4 použít k implantaci pomocí artroskopického zaváděcího zařízení 30, například jak se znázorňuje na obr. 6.

Obr. 6 ukazuje artroskopické zaváděcí zařízení 30 pro implantaci implantátu 20 na místo implantace 18 v souladu s předloženým vynálezem.

Obr. 7 je náčrtek schématicky zobrazující umístění implantabilního výrobku (implantátu) 20 z obr. 5 na místo defektu nebo poranění 18 v chrupavčité čepičce 16 pomocí dvou přístupových kanálků 33 a 60, které mohou pojmout artroskopické instrumenty.

Obr. 8 je schématický průřez chrupavkou 16 s poškozením nebo poraněním, které nezasahuje do subchondrální vrstvy 44, a implantátem 20 v souladu s předloženým vynálezem, který se připevňuje k místu poruchy lepidlem 48.

Obr. 9 je schématický průřez chrupavkou 16 s poškozením nebo poraněním, které nezasahuje do subchondrální vrstvy 44, a implantátem 20, který se připevňuje k místu poruchy mechanickým upínacím zařízením 50.

Obr. 10 zobrazuje jedno provedení mechanického upínacího zařízení 50, které se používá k uchycení implantátu k místu defektu nebo poranění.

Obr. 11 je schématický průřez chrupavkou 16 s poškozením nebo poraněním, které zasahuje do subchondrální vrstvy 44, a implantátem 20 v souladu s předloženým vynálezem, který se připevňuje k místu poruchy lepidlem 48.

Obr. 12 je schématický průřez chrupavkou 16 s poškozením nebo poraněním, které zasahuje do subchondrální vrstvy 44, a implantátem 20, který se připevňuje k místu poruchy mechanickým upínacím zařízením 50.

Obr. 13A je černobílá kopie barevné mikrofotografie histologického preparátu na počátku růstu chondrocytových buněk na pevné podpůrné mateřské půdě.

Obr. 13AA je digitalizovaná mikrofotografie obr. 13A.

Obr. 13B je černobílá kopie barevné mikrofotografie histologického preparátu podpůrné mateřské pudy z obr. 13A s nasazenými chondrocytovými buňkami po třítýdenním růstu na tomto pevném nosném lůžku.

Obr. 13BB je digitalizovaná mikrofotografie obr. 13B.

Obr. 13C je fotografie ukazující podpůrnou mateřskou pudu utvořenou z kolagenu, ve kterém rostou chondrocytové buňky, zviditelněné imunohistochemickým vybarvením.

Obr. 13D je fotografie ukazující podpůrnou mateřskou pudu utvořenou z kolagenu, ve kterém rostou chondrocytové buňky v bioreaktorovém systému, zviditelněné imunohistochemickým vybarvením.

Obr. 14 je fotomikrograf ukazující chondrocytové buňky na podpůrné mateřské půdě DePuy.

Obr. 15 je graf znázorňující celkový počet buněk v kontrolním vzorku (stínováno černě), na membráně skupiny Chondro-Gide (tečkováno) a na membráně skupiny DePuy (stínováno šedě) po třech dnech, po dvou týdnech a po šesti týdnech. Pro uvedené časy jsou hodnoty v kontrolním vzorku: 72.000, 575.167 a 528.333 buněk. Na membráně Chondro-Gide: 109.167, 427.500 a 153.333. Na membráně DePuy: 169.583, 494.167 a 100.833 buněk.

Obr. 16 je graf znázorňující životaschopnost buněk (v procentech) v kontrolním vzorku (stínováno šedě), na membráně skupiny Chondro-Gide (tečkováno) a na membráně skupiny DePuy (stínováno šedě) po třech dnech, po dvou týdnech a po šesti

týdnech.

Příklady provedení vynálezu

PŘÍKLAD 1

Proto, aby se Surgicel® použil v souladu s naším vynálezem v prevenci rozvoje krevních cév do autologně implantované chrupavky nebo chondrocytů, nechali jsme Surgicel® reagovat s fixativem, například glutaraldehydem; zvolili jsme reakci 0,6 % glutaraldehydu se Surgicel® po dobu 1 minuty, následovanou promytím k odstranění zbytků glutaraldehydu, který by jinak mohl být pro tkáň toxický. Alternativně se Surgicel® před reakcí s glutaraldehydem zpracoval s fibrinovým lepidlem zvaným Tisseel® (Immuno AG, Vídeň, Rakousko), jak se popisuje v příkladě 2. Zjistili jsme, že Surgicel® fixovaný například takovým fixativem, jako je glutaraldehyd, promytý sterilní fyziologickou solankou (0,9 %) a uložený v ledničce se nerozpouští po dobu jednoho až dvou měsíců.

Surgicel® se obecně resorbuje v období mezi 7 až 14 dny. Tato doba by byla příliš krátká, protože pro prevenci rozvoje krevních cév nebo vaskularizace jako takové z kostní struktury do implantované chrupavky je potřeba delší čas před tím, než implantované chondrocyty rostlé do pevné chrupavkové vrstvy získávají svou potřebnou výživu z okolní chrupavky. Jinými slovy pro dostatečnou inhibici vaskularizace je zapotřebí delší časový úsek, jakým je například jeden měsíc. Proto by se produkt neměl absorbovat významně dříve před touto dobou. Na druhé straně je resorpce nakonec potřebná.

Organický materiál použitý jako inhibující bariéra musí tudíž mít tyto schopnosti a my jsme zjistili, že Surgicel®

zpracovaný tímto způsobem tuto funkci poskytuje.

PŘÍKLAD 2

Surgicel® byl také potažen organickým lepidlem a my jsme v tomto případě použili jako lepidlo Tisseel®. Tento produkt spolu se Surgicel® vytváří užitečnou bariéru pro náš konkrétní účel. Tisseel® se mísil, jak se popisuje níže. Surgicel® se pak potáhl Tisseelem® použitým jako sprej po obou stranách Surgicelu®, dokud se nepromočil. Tisseel® (fibrinové lepidlo) se pak nechal při laboratorní teplotě ztuhnout. Bezprostředně před úplným ztuhnutím se potom Surgicel® umístil do 0,6 % glutaraldehydu na jednu minutu a potom se promyl 0,9 % sterilní fyziologickou solankou. Hodnota pH se pak adjustovala pomocí PBS a/nebo NaOH dokud se nestabilizovala na hodnotě 7,2 až 7,4. Takto zpracovaný Surgicel® byl později promyt v tkáňovém kultivačním roztoku, například minimálním základním roztokem/HAM F12 s 15 mM Hepes pufrem.

Jak jsme se zmínili, v tomto příkladě jsme použili Tisseel® jako fibrinové lepící činidlo ke smočení Surgicelu®. Fibrinové lepící činidlo nebo lepidlo lze dále také použít přímo na dně léze směrem ke kosti, na kterou se Surgicel® přilepuje. Použitý systém *in vitro*, namísto testování *in vivo*, se skládá z NUCLEON™ Delta 6-jamkové sterilní jednoúčelové destičky pro výzkum buněk (NUNC (InterMed) Roskilde, Dánsko). Každá jamka má průměr přibližně 4 cm.

V tomto vynálezu může být fibrinovým lepícím činidlem jakékoli lepící činidlo, které spolu s fibrinovou komponentou poskytne lepidlo, které lze připustit pro použití u lidí (N. Ihara a spol.: *Burns Incl. Therm. Inj.*, 1984, 10, 396). Vynález také předvídá jakoukoli další lepící složku, která se může použít místo fibrinového lepícího činidla. V tomto

příkladě jsem použili Tisseel® nebo Tissucol® (Immuno AG, Vídeň, Rakousko). Souprava Tisseel® sestává z následujících složek:

Tisseel®, lyofilizovaný, virově inaktivovaná těsnicí hmota obsahující proteinum coagulabilis, z toho: fibrinogenum, plasmafibronectinum (CIG), factor coagulationis XIII a plasminogenum

roztok aprotininu (hovězí)

thrombin 4 (hovězí)

thrombin 500 (hovězí) a

roztok kalcium-chloridu.

Suprava Tisseel® obsahuje aplikační systém DUPLOJECT®. Fibrinové lepící činidlo nebo dvousložkový tmel používající Tisseel® soupravu se mísí způsobem podle přiloženého návodu Immune AG.

PŘÍKLAD 3

Chondrocyty se kultivovaly v minimálním základním kultivačním roztoku obsahujícím HAM F12, 15 mM Hepes pufru a 5 až 7,5 % autologního séra v CO₂ inkubátoru při 37 °C a zpracovaly se v laboratoři Class 100 ve Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Kodaň, Dánsko. Pro kultivaci chondrocytů lze použít jiná složení kultivačního roztoku. Buňky se trypsinizovaly pomocí trypsinové EDTA po dobu 5 až 10 minut a počítaly za pomoci vybarvení životaschopných buněk trypanovou modří v Bürker-Türk komůrce. Počet buněk se nastavil na 7,5 x 10⁵ buněk v 1 mL. Jedna NUNCLON™ destička nebyla v laboratoři Class 100 změněna.

Hemostatická bariéra Surgicel® se seřízla na vhodnou velikost, která se hodí na dno jamky v NUNCLON™ destičce pro kultivaci tkáně. V tomto případě kruh s průměrem přibližně 4

cm (ale mohla by mít jakoukoli velikost) a vložil se za aseptických podmínek na dno jamky NUNC[™] destičky pro kultivaci tkáně. Delta 6-jamková destička na jedno použití pro výzkum buněk (NUNC (InterMed) Roskilde, Dánsko). Hemostatická bariéra, která se má vložit na dno jamky se předem zpracovala, jak se popisuje v příkladě 1. Toto zpracování významně zpožďuje absorpci Surgicelu®. Hemostatická bariéra se potom několikrát promyla destilovanou vodou a následně ještě několikrát, dokud se nevymyl nezreagovaný glutaraldehyd. Použilo se malé množství buněčného kultivačního roztoku obsahujícího sérum, aby se absorbovalo do hemostatické bariéry a současně udržovalo hemostatickou bariéru na dně jamky vlhkou.

Přímo na vršek hemostatické bariéry se umístilo přibližně 10^6 buněk v 1 mL kultivačního media, dispergovalo se na povrchu hemostatické bariéry, která se předzpracovala 0,4 % glutaraldehydem, jak se popisuje výše. Destička se potom inkubovala v CO₂ inkubátoru při 37 °C po dobu 60 minut. Množství 2 až 5 mL tkáňového kultivačního roztoku obsahujícího 5 až 7,5 % séra se opatrně přidalo do jamky obsahující buňky tak, že se špička pipety držela tangenciálně ke stěně jamky při výtoku roztoku, aby se buňky sérem nevyplachovaly. Ukázalo se, že pH roztoku je příliš nízké (pH asi 6,8). Hodnota pH se potom upravila na 7,4 až 7,5. Následující den začaly některé chondrocyty na hemostatické bariéře růst a utvářely chumle. Některé buňky uhynuly díky vystavení nízkému pH před úpravou jeho hodnoty. Destička se inkubovala 3 až 7 dní s výměnou roztoku ve třetím dnu.

Na konci inkubačního doby se roztok slil a destička se ochlazením zmrazila po přidavku 2,5 % glutaraldehydu obsahujícího 0,1 M sodné soli kyseliny dimethylarsinové, zvané také sodium-kakodylát, s pH nastaveným HCl na 7,4, jako

fixačního prostředku pro preparát buňky a jako nosič (hemostatická bariéra) pro pozdější přípravu pro elektronovou mikroskopii.

PŘÍKLAD 4

Chondrocyty se kultivovaly v minimálním základním kultivačním roztoku obsahujícím HAM F12, 15 mM Hepes pufru a 5 až 7,5 % autologního séra v CO₂ inkubátoru při 37 °C a zpracovaly se v laboratoři Class 100 ve Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Kodaň, Dánsko. Pro kultivaci chondrocytů lze použít jiná složení kultivačního roztoku. Buňky se trypsinizovaly pomocí trypsinové EDTA po dobu 5 až 10 minut a počítaly za pomoci vybarvení životaschopných buněk trypanovou modří v Bürker-Türk komůrce. Počet buněk se nastavil na 7,5 x 10⁵ buněk v 1 mL. Jedna NUNCLON™ destička nebyla v laboratoři Class 100 změněna.

Surgicel® (pro použití jako hemostatická bariéra) se nechal reagovat 1 minutu s 0,6 % glutaraldehydem, jak se popisuje v příkladě 1, a promyl se 0,9 % sterilním roztokem chloridu sodného nebo výhodně puforem, například puforem PBS nebo kultivačním roztokem, například MEM/F12, protože pH po reakci s glutaraldehydem je 6,8 a výhodně by mělo být 7,0 až 7,5. Na obě strany Surgicelu® se aplikoval Tisseel® pomocí systému DUPLOJECT®, čímž se pokryly fibrinovým lepidlem obě strany Surgicelu®, zamýšlené náplasti. Lepidlo se nechá schnout za aseptických podmínek alespoň 3 až 5 minut. „Pokrytá“ hemostatická bariéra se umístila na dno jamky v NUNCLON™ Delta 6-jamkové sterilní destičce na jedno použití pro výzkum buněk (NUNC (InterMed) Roskilde, Dánsko). Použilo se malé množství tkáňového kultivačního roztoku obsahujícího sérum, aby se absorbovalo do hemostatické bariéry. Přibližně 10⁶ buněk v 1 mL tkáňového kultivačního roztoku obsahujícího

sérum se umístilo přímo na vršek hemostatické bariéry, rozptýlené na povrchu hemostatické bariéry. Destička se potom inkubovala v CO₂ inkubátoru při 37 °C po dobu 60 minut. Množství 2 až 5 mL tkáňového kultivačního roztoku obsahujícího 5 až 7,5 % séra se opatrně přidalo do jamky obsahující buňky tak, že se špička pipety držela tangenciálně ke stěně jamky při výtoku roztoku, aby se buňky sérem nevyplachovaly. Po 3 až 6 dnech ukázalo mikroskopické zkoumání, že buňky přilnuly k Surgicelu® a vrostly do něho uspokojivým způsobem, z čehož lze usuzovat, že Surgicel® nevykazuje vůči chondrocytům toxicitu a že chondrocyty uspokojivě vrůstají do Surgicelu®.

Destička se inkubovala 3 až 7 dní s výměnou roztoku ve třetím dnu. Na konci inkubační doby se roztok slil a destička se ochlazením zmrazila po přidavku 2,5 % glutaraldehydu obsahujícího 0,1 M sodné soli kyseliny dimethylarsinové, zvané také sodium-kakodylát, s pH nastaveným HCl na 7,4, jako fixačního prostředku pro preparát buňky a jako nosič (hemostatická bariéra) pro pozdější přípravu pro elektronovou mikroskopii.

PŘÍKLAD 5

Chondrocyty se kultivovaly v minimálním základním kultivačním roztoku obsahujícím HAM F12, 15 mM Hepes pufru a 5 až 7,5 % autologního séra v CO₂ inkubátoru při 37 °C a zpracovaly se v laboratoři Class 100 ve Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Kodaň, Dánsko. Buňky se trypsinizovaly pomocí trypsinové EDTA po dobu 5 až 10 minut a počítaly za pomoci vybarvení životaschopných buněk trypanovou modří v Bürker-Türk komůrce. Počet buněk se nastavil na $7,5 \times 10^5$ až 2×10^6 buněk v 1 mL. Jedna NUNC[™] destička nebyla v laboratoři Class 100 změněna.

Bio-Gide® je resorbovatelná dvojvrstvá membrána, která se používá jako náplast nebo bandáž pokrývající oblast poruchy kloubu, do které se mají kultivované chondrocyty transplantovat pomocí autologní transplantace. Bio-Gide® je čistá kolagenová membrána získaná standardizovaným, řízeným průmyslovým postupem firmou E. D. Geistlich Sohne AG, CH-61 10 Wolhusen. Kolagen se extrahuje z veterinárně certifikovaných vepřů a pečlivě se očistí, aby se vyhnulo antigenní reakci a sterilizuje se dvojitou gama-radiací. Dvojvrstvá membrána má pórovitý povrch a hutný povrch. Membrána se zhotovuje z kolagenu typu I a typu III bez dalšího zesíťování nebo chemického zpracování. Kolagen se resorbuje v průběhu 24 týdnů. Membrána si uchová svou vlastní strukturní integritu dokonce i když je vlhká a může se fixovat stehy nebo hřebíčky. Membrána se také může „lepit“ pomocí fibrinového lepidla, například Tisseel®, k okolní chrupavce nebo tkáni buď místo stehu nebo spolu se stehem.

Bio-Gide® nebyl v laboratoři Class 100 změněn a vložil se za aseptických podmínek na dno jamek NUNCLON™ tkáňové kultivační 6-jamkové Delta sterilní destičky na jedno použití pro výzkum buněk (NUNC (InterMed) Roskilde, Dánsko), buď s pórovitým povrchem dvojvrstvé membrány nahoru nebo s hutným povrchem membrány obráceným vzhůru. Přibližně 10^6 buněk v 1 mL tkáňového kultivačního media obsahujícího sérum, se umístilo přímo na vršek Bio-Gide®, dispergované buď na pórovitém nebo na hutném povrchu Bio-Gide®. Destička se potom inkubovala v CO₂ inkubátoru při 37 °C po dobu 60 minut. Množství 2 až 5 mL tkáňového kultivačního roztoku obsahujícího 5 až 7,5 % séra se opatrně přidalo do jamky obsahující buňky tak, že se špička pipety držela tangenciálně ke stěně jamky při výtoku roztoku, aby se buňky sérem nevyplachovaly.

Ve druhém dni poté, co se chondrocyty vložily do jamky

obsahující Bio-Gide®, se buňky prohlédly mikroskopem Nikon Invert. Zjistilo se, že některé chondrocyty přilnuly k okraji Bio-Gide®. Nebylo ovšem možné se podívat tímto mikroskopem skrze samotný Bio-Gide®.

Destička se inkubovala 3 až 7 dní s výměnou roztoku ve třetím dnu. Na konci inkubačního doby se roztok slil a destička se ochlazením zmrazila po přidavku 2,5 % glutaraldehydu obsahujícího 0,1 M sodné soli kyseliny dimethylarsinové, zvané také sodium-kakodylát, s pH nastaveným HCl na 7,4, jako fixačního prostředku pro preparát buňky a jako nosič pro Bio-Gide® s buňkami kultivovanými buď na pórovitém nebo na hutném povrchu. Bio-Gide® náplasti se pak poslaly na elektronovou mikroskopii na Department of Pathology, Herlev Hospital, Dánsko.

Elektronová mikroskopie ukázala, že chondrocyty kultivované na hutném povrchu Bio-Gide® nevrostly do kolagenové struktury Bio-Gide®, kdežto buňky kultivované na pórovitém povrchu do kolagenové struktury vrůstaly a dále ukázala přítomnost proteoglykanů a žádné známky fibroblastových struktur. Tento výsledek nám ukázal, že když se kolagenová náplast, jako například náplast Bio-Gide®, přišívá jako náplast pokrývající chrupavkovou poruchu, měl by být pórovitý povrch kolagenového lůžka otočen dolů směrem k poruše, do které se mají chondrocyty injektovat. Chondrocyty pak budou schopné pronikat kolagenem a vytvářet hladký povrch chrupavky v linii s intaktním povrchem a v této oblasti se vytvoří hladká vrstva proteoglykanů. Kdežto, směruje-li hutný povrch kolagenové náplasti směrem dolů k poruše, chondrocyty, které se mají implantovat, se nebudou spojovat s kolagenem a buňky nebudou vytvářet stejně hladký povrch, jak se popisuje výše.

PŘÍKLAD 6

Chondrocyty se kultivovaly v minimálním základním kultivačním roztoku obsahujícím HAM F12, 15 mM Hepes pufru a 5 až 7,5 % autologního séra v CO₂ inkubátoru při 37 °C a zpracovaly se v laboratoři Class 100 ve Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Kodaň, Dánsko. Buňky se trypsinizovaly pomocí trypsinové EDTA po dobu 5 až 10 minut a počítaly za pomoci vybarvení životaschopných buněk trypanovou modří v Bürker-Türk komůrce. Počet buněk se nastavil na $7,5 \times 10^5$ až 2×10^6 buněk v 1 mL. Jedna NUNCLON™ destička nebyla v laboratoři Class 100 změněna.

Membránu Bio-Gide® používanou jako resorbovatelnou dvojvrstvou membránu lze také použít společně s organickým lepidlem, jako je Tisseel®, s dalším významně vyšším obsahem aprotininu, než se obvykle nachází v Tisseelu®, jak se popisuje v inzerovaném produktu. Zvýšením obsahu aprotininu na asi 25.000 KIU/mL, se resorpce materiálu pozdrží o týdny místo obvyklého trvání ve dnech.

Pro testování tohoto rysu *in vitro* se Tisseel® nanese na dno jamky NUNCLON™ destičky a nechá se neúplně ztuhnout. Na Tisseel® se pak nanese kolagenová náplast, například Bio-Gide®, a přilepila se ke dnu jamky. Toto spojení Bio-Gide® a Tisseel® se navrhuje, aby tvořilo hemostatickou bariéru, která bude inhibovat nebo bránit rozvoji či infiltraci krevních cév do oblasti transplantace chondrocytů. Tuto hybridní kolagenovou náplast lze dnes použít jak jako hemostatickou bariéru na spodku poruchy (nejblíže povrchu, který se má reparovat), ale také jako nosné lůžko pro tvorbu chrupavky, protože distálním povrchem může být pórovitá strana kolagenové náplasti, a tak podporovat infiltraci chondrocytů a chrupavkového lůžka. Tuto hybridní kolagenovou náplast lze tudíž také použít k zakrytí

vrchní strany implantátu s pórovitým kolagenovým povrchem směřujícím k implantovaným chondrocytům a jako bariéry tvořící vršek. Hybridní kolagenová náplast se zvýšenou složkou aprotininu se může také použít bez jakéhokoli organického lepidla, jako je Tisseel®, a umístit přímo do poruchy s přilnutím pomocí přirozených sil. Kolagenovou náplast lze tudíž použít jak jako hemostatickou bariéru, tak jako bezbuněčné přikrytí reparovaného či transplantačního místa, s pórovitým povrchem náplasti orientovaným k transplantovaným chondrocytům nebo k chrupavce. Další varianta by využívala kolagenovou náplast, která sestává z kolagenu typu II (Geistlich Sohne AG, CH-61 10 Wolhusen).

Předmětem tohoto vynálezu je tudíž hybridní kolagenová náplast, kde zmíněnou náplastí je kolagenové lůžko se zvýšenými hladinami složky aprotininu, výhodně asi 25.000 KIU/mL, ve spojení s lepidlem organického lůžka, kde je kolagenová složka podobná Bio-Gide® resorbovatelnému dvojvrstvému materiálu nebo kolagenu typu II a organické lepidlo je podobné materiálu Tisseel®. V dalším provedení se u hybridní kolagenové náplasti nepoužívá na přilnutí k reparovanému místu žádné organické lepidlo.

PŘÍKLAD 7

Souprava, jak se předvídá, umožní vhodnou praxi způsobu předloženého vynálezu. Ve výhodném provedení souprava podle vynálezu poskytne sterilní komponenty vhodné pro bezproblémové použití v operačním prostředí a poskytne vhodnou hemostatickou bariéru, vhodnou krycí náplast a bude-li třeba vhodné organické lepidlo. Souprava tohoto vynálezu může také poskytnout sterilní materiál lůžka bez buněk jako nosný základ autologních chondrocytů, které se mají implantovat do poruchy na povrchu kloubního spojení. V jednom provedení souprava

vynálezu obsahuje hemostatickou bariéru Surgicel® a krycí náplast Bio-Gide® spolu s vhodným organickým lepidlem na potažení hemostatické bariéry Tisseel®, kde Surgicel® a Bio-Gide® se zpracovaly v souladu s poznáním tohoto vynálezu na prodloužení času, než dojde k resorpci. V případech, ve kterých se Tisseel® předem pokryje, se v jednom provedení Tisseel® doplní dalším aprotininem, aby se zvýšil čas resorpce.

V dalším výhodném provedení jsou hemostatická bariéra a krycí náplast z polopropustné kolagenové matrice, která se zpracovala tak, aby se prodloužil čas resorpce materiálu. Je také možné poskytovat lepidlo Tisseel® ve zvýšeném množství, jako zvláštní složku, aby se nanášela jak bude potřebné, vzhledem k neodmyslitelné proměnlivosti a jedinečnosti okolností, se kterými se každá reparační/transplantační operace bude setkávat.

Odborníci v technice ocení, že lze provést četné obměny a/nebo modifikace vynálezu, jak se ukazuje ve zvláštních provedeních, aniž by se odchýlily od ducha nebo rámce vynálezu, jak se v celku popisuje. Předložená provedení a příklady se proto mají chápat ve všech ohledech jako ilustrativní a nikoli jako omezující.

PŘÍKLAD 8

Chondrocytové buňky se kultivovaly tři týdny ve výše popsaném kultivačním roztoku v CO₂ inkubátoru při 37 °C a zpracovaly v laboratoři Class 100 ve Verigen Transplatation Service A/S, Kodaň, Dánsko nebo na University of Lübeck, Lübeck, Německo. (Zaznamenejte, že ke kultivaci chondrocytových buněk lze použít také další směsi kultivačních roztoků.) Buňky se trypsinizovaly pomocí trypsinové EDTA po

dobu 5 až 10 minut a počítaly s pomocí vybarvení životaschopných buněk trypanovou modří v Bürker-Türk komůrce. Počet buněk se nastavil na $7,5 \times 10^5$ buněk na mililitr. Jedna NUNCLON™ destička nebyla v laboratoři Class 100 změněna.

Materiál podpůrné mateřské půdy, konkrétně kolagenová membrána Chondro-Gide® (identická s Bio-Gide® vyjma toho, že Chondro-Gide® má větší šířku a délku než Bio-Gide®; obě dostupné od Ed Geistlich Sohne, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Švýcarsko), se ořízla na vhodnou velikost, aby zapadala na dno jamky na NUNCLON™ destičce pro kultivaci buněk. V tomto případě se za aseptických podmínek umístil na dno jamky kruh s průměrem asi 4 cm.

Po třech týdnech se chondrocytové buňky převedly z kultivačního roztoku do výše popsaného transplantačního roztoku a asi 5×10^6 chondrocytových buněk v 5 mL transplantačního roztoku se umístilo přímo na vršek podpůrné mateřské půdy a rozptýlilo se na jejím povrchu. Destička se tři dny inkubovala v CO₂ inkubátoru při 37 °C. Po této době se chondrocytové buňky uspořádaly do chumlů a začaly růst na podpůrné mateřské půdě a nebylo možné je z podpůrného lůžka odstranit pomocí jeho oplachování roztokem nebo dokonce mechanicky za použití mírného přitlačení na lůžko.

Na konci inkubační doby se transplantační roztok slil a podpůrná mateřská půda s chondrocytovými buňkami do ní vrostlými se chladem zmrazila v 2,5 % glutaraldehydu obsahujícího 0,1 M sodnou sůl dimethylarsinové kyseliny, přidaném jako fixační činidlo. Podpůrná mateřská půda se obarvila safraninem O pro histologické vyhodnocení. Černobílá kopie barevné mikrofotografie se uvádí na obr. 13A. Pro lepší ilustraci rysů mikrofotografie je také uvedena její digitalizovaná forma na obr. 13AA.

PŘÍKLAD 9

Chondrocyty se kultivovaly tři týdny ve výše popsaném kultivačním roztoku v CO₂ inkubátoru při 37 °C a zpracovaly se v laboratoři Class 100 ve Verigen Transplantation Service A/S, Kodaň, Dánsko, nebo na University of Lübeck, Lübeck, Německo. Buňky se trypsinizovaly pomocí trypsinové EDTA po dobu 5 až 10 minut a počítaly s pomocí vybarvení životaschopných buněk trypanovou modří v Bürker-Türk komůrce. Počet chondrocytových buněk se adjustoval na 5×10^5 buněk na mililitr. Jedna NUNCLON™ destička nebyla v laboratoři Class 100 změněna.

Podpůrná mateřská půda Chondro-Gide®, jako v příkladě 1, se ořezala na vhodnou velikost, aby zapadla na dno jamky na NUNCLON™ destičce pro kultivaci buněk. V tomto případě se za aseptických podmínek umístil na dno jamky kruh s průměrem asi 4 cm.

Po třech týdnech se chondrocytové buňky převedly z kultivačního roztoku do výše popsaného transplantačního roztoku a asi 5×10^5 chondrocytových buněk v 5 ml transplantačního roztoku se umístilo přímo na vršek podpůrné mateřské půdy a rozptýlilo se na jejím povrchu. Destička se inkubovala tři týdny v CO₂ inkubátoru při 37 °C.

Na konci inkubační doby se transplantační roztok slil a podpůrná mateřská půda s chondrocytovými buňkami do ní vrostlými se chladem zmrazila v 2,5 % glutaraldehydu obsahujícím 0,1 M sodnou sůl dimethylarsinové kyseliny, přidaném jako fixační činidlo. Podpůrná mateřská půda se obarvila safraninem O pro histologické vyhodnocení. Pro imunohistochemické vyhodnocení se kolagenové membrány fixovaly ve směsi methanol-aceton a obarvily se pro agrekan a kolagen typu II pomocí králičího anti-lidského kolagenu typu II a

myšího anti-lidského agrekanu. Primární protilátky se zviditelnily pomocí fluorescenčních sekundárních protilátek. Černobílá kopie barevné mikrofotografie na obr. 13B ukazuje chondrocytové buňky 24. Pro lepší ilustraci rysů mikrofotografie je také uvedena její digitalizovaná forma na obr. 13BB.

Během třítýdenní inkubační doby na podpůrné mateřské půdě Chondro-Gide® se pozorovalo, že chondrocytové buňky rostly a rozmnožovaly se na nosném lůžku a vytvářely chumly ve středu nosného lůžka a řadily se podél povrchu.

PŘÍKLAD 10

Chondrocyty se kultivovaly tři týdny ve výše popsaném kultivačním roztoku v CO₂ inkubátoru při 37 °C a zpracovaly se v laboratoři Class 100 ve Verigen Transplantation Service A/S, Kodaň, Dánsko, nebo na University of Lübeck, Lübeck, Německo. Buňky se trypsinizovaly pomocí trypsinové EDTA po dobu 5 až 10 minut a počítaly se s pomocí vybarvení životaschopných buněk trypanovou modří v Bürker-Türk komůrce. Počet chondrocytových buněk se adjustoval na 5×10^5 buněk na mililitr. Jedna NUNCLON™ destička nebyla v laboratoři Class 100 změněna.

Podpůrná mateřská půda Chondro-Gide®, jako v příkladě 1, se ořezala na vhodnou velikost, aby zapadla na dno jamky na NUNCLON™ destičce pro kultivaci buněk. V tomto případě se za aseptických podmínek umístil na dno jamky kruh s průměrem asi 4 cm.

Po třech týdnech se chondrocytové buňky převedly z kultivačního roztoku do výše popsaného transplantačního roztoku a asi 5×10^5 chondrocytových buněk v 5 ml transplantačního roztoku se umístilo přímo na vršek podpůrné

mateřské půdy a rozptýlilo se na jejím povrchu. Destička se inkubovala tři týdny v CO₂ inkubátoru při 37 °C.

Podpurná mateřská půda s vyrostlými chondrocytovými buňkami se potom inkubovala 16 hodin. Podpurná mateřská půda nesoucí chondrocytové buňky se pak odstředila. Buňky se vysely na NUNCLON™ destičku a spočítal se alikvotní podíl pomocí vybarvení životaschopných buněk trypanovou modří v Bürker-Türk komůrce. Na obr. 11C je ukázána jejich mikrofotografie. Zjistilo se, že celkový vypočítaný počet buněk byl 6×10^6 a životaschopnost byla větší než 95 %.

PŘÍKLAD 11

Tento příklad popisuje test toxicity a biokompatibility membrány připravené podle US patentu č. 4,902,508 (uděleném DePuy, dceřinému podniku Ethicon, Inc.; membrána DePuy nebo „Ethicon“) a membrány Chondro-Gide® (Ed Geistlich Sohne, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Švýcarsko). Životaschopnost a počet chondrocytových buněk, které přilnuly na membránách DePuy a Chondro-Gide®, po třech dnech, po dvou a po šesti týdnech se stanovil vizuálním spočítáním počtu buněk, které přilnuly k membránám.

DePuy membrána se testovala s membránou Chondro-Gide® jako pozitivní kontrolou a negativní kontrola použitím stejného způsobu, ale bez jakékoli membrány.

Dříve zmrazené lidské chondrocytové buňky (14 milionů buněk) se rozmrazily a promyly a stanovil se počet buněk a životaschopnost. Po rozmrazení se získalo zpět 3,2 milionu buněk při 87 % životaschopnosti. Do každé ze dvou lahví pro tkáňové kultury se přidalo 1,6 milionu buněk s koncentrací $5,3 \times 10^4$ buněk na mililitr a tři dny se inkubovaly při 37 °C.

Výsledný počet buněk a životaschopnost v lahvích byla 3,5 milionu buněk s 98 % životaschopností resp. 3,6 milionu buněk s 93 % životaschopností.

Počet buněk a životaschopnost se analyzovala pro šest vzorků od každé membrány a pro šest vzorků kontrolní skupiny bez membrány. Membrány se analyzovaly po třech dnech, po dvou týdnech a po šesti týdnech. Vzorky membrán DePuy a Chondro-Gide® se ořezaly na velikost čtverečku jeden čtvereční palec (tj. 6,4516 cm²). Kvůli suché konzistenci membrány DePuy bylo oříznutí membrány jaksí obtížné.

Chondrocyty se trypsinizovaly a stanovila se životaschopnost buněk a jejich počet, jak se naznačilo výše. Buňky se odstředily a opět suspendovaly na koncentraci 1 milion buněk na mililitr.

Membrány DePuy a Chondro-Gide® se dvakrát promyly solankou tlumenou fosfátem (PBS) na pH 7,17. Každá membrána se vložila do jamky kultivační destičky. Jedno sto mikrolitrů suspenze chondrocytových buněk s koncentrací jeden milion buněk na mililitr se nanese na každou membrány a na dno šesti jamek bez membrány. Do každé jamky se přidal další kultivační roztok (3 mL). Kultivační destičky se inkubovaly alespoň tři dny při 37 °C.

Obr. 14 ilustruje chondrocytové buňky přilnuté k membráně DePuy. Buňky se izolovaly a počítaly po třech dnech, po dvou týdnech a po šesti týdnech.

Membrány DePuy a Chondro-Gide® se zpracovaly s roztokem enzymu obsahujícího směs dvou mililitrů 0,25 % trypsinu a jednoho mililitru kolagenázy (celkem 5000 jednotek), aby se membrány rozpustily a mohl se stanovit počet buněk a jejich

životaschopnost. Jakmile se membrána rozpustila, chondrocytové buňky se izolovaly odstředěním a spočítaly se. Doba působení roztoku enzymu se mění v závislosti na typu membrány. Pro membránu DePuy trvala reakce s kolagenázou mnohem déle než pro membránu Chondro-Gide®. Membrána DePuy se úplně nerozpustila po dvou hodinách, zatímco membrána Chondro-Gide® se zcela rozpustila po asi jedné až jedné a půl hodině. Proto, aby nedocházelo ke stresu buněk, by nemělo trávení kolagenázou trvat déle než dvě hodiny.

Kontrolní skupina chondrocytů se trypsinizovala, promyla a peletovala odstředěním. Buňky se pak znovu suspendovaly v DMEM roztoku a zjistil se konečný počet buněk.

Dále se uvádějí výsledky pokusu. V životaschopnosti kontrolních buněk ve srovnání s buňkami vyrostlými na nosných lůžkách DePuy a Chondro-Gide® nebyly podstatné rozdíly. Životaschopnost v kontrolní skupině, nosném lůžku Chondro-Gide® a nosném lůžku DePuy byla, jak je ukázáno na obr. 16, vysoká, asi 87 % pro kontrolní skupinu, asi 94 % pro nosné lůžko Chondro-Gide® a 93 % pro nosné lůžko DePuy. Po dvoutýdenním intervalu byla životaschopnost v kontrolní skupině asi 90 %, pro skupinu Chondro-Gide® asi 91 % a asi 83 % pro skupinu DePuy. Po šesti týdnech bylo asi 80 % buněk schopných života v kontrolní skupině, zatímco asi 74 % bylo životaschopných na membráně Chondro-Gide a asi 74 % bylo životaschopných za podmínek na nosném lůžku DePuy. Nebylo tudíž širokého rozpětí v životaschopnosti buněk za rozdílných růstových podmínek.

Konkrétní počet buněk se významně neovlivnil nosným lůžkem DePuy a Chondro-Gides® až do pozdní kultivace. Jak se ukazuje na obr. 15, po třech dnech obnášela kontrolní skupina asi 72.000 buněk, zatímco na nosném lůžku Chondro-Gide® jich

bylo asi 109.167 a na nosném lůžku DePuy asi 169.583 buněk. Po dvou týdnech se kontrolní buňky rozmnožily asi osmkrát na hodnotu 575.167 buněk, zatímco buňky na Chondro-Gide® téměř čtyřikrát na počet 427.500 a buňky na DePuy téměř třikrát na hodnotu 494.167. Konečně po šesti týdnech se počet buněk v kontrolní skupině trochu snížil na hodnotu 528.333, zatímco počet buněk na Chondro-Gide® a na DePuy poklesl dramaticky na hodnotu 153.333, resp. 100.833.

Zatímco se tento vynález popsal s odkazem na charakteristická provedení, je zřejmé, že odborníci v technice možná navrhnou další provedení a obměny tohoto vynálezu, aniž by se odchýlili od skutečného ducha a rámce vynálezu. Připojené patentové nároky se zamýšlejí tak, aby jejich interpretace zahrnovala všechna taková provedení a rovnocenné obměny.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Výrobek zahrnující membránu vyznačující se tím, že má alespoň jednu vrstvu s pórovitým povrchem a zahrnuje submukózní střevní tkáň a buňky, které přilnuly k uvedené vrstvě.
2. Výrobek podle nároku 1 vyznačující se tím, že uvedené buňky jsou chondrocytové buňky.
3. Výrobek podle nároku 1 vyznačující se tím, že uvedená membrána neobsahuje buňky.
4. Výrobek podle nároku 1 vyznačující se tím, že uvedená membrána je kolagen.
5. Výrobek podle nároku 1 vyznačující se tím, že uvedená membrána je kolagen typu I a kolagen typu III.
6. Výrobek podle nároku 1 vyznačující se tím, že uvedená membrána je resorbovatelná.
7. Výrobek podle nároku 1 vyznačující se tím, že uvedené chondrocytové buňky jsou autologní.
8. Výrobek podle nároku 1 vyznačující se tím, že dále zahrnuje biologicky kompatibilní lepidlo přiléhající k uvedené membráně.
9. Výrobek podle nároku 1 vyznačující se tím, že uvedená membrána se přizpůsobí tak, aby se mohla umístit přes defekt artikulární chrupavky.

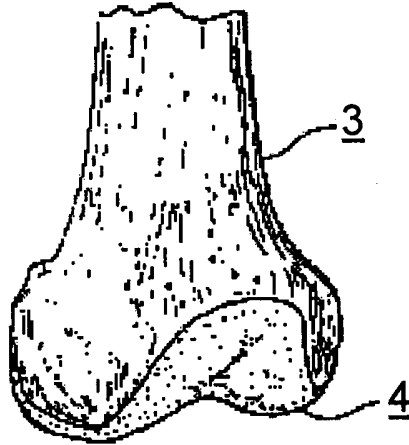
10. Výrobek podle nároku 1 vyznačující se tím, že uvedená membrána se přizpůsobí tak, aby se mohla umístit do defektu artikulární chrupavky.
11. Výrobek podle nároku 1 vyznačující se tím, že uvedená membrána se umístí přes defekt artikulární chrupavky.
12. Výrobek podle nároku 1 vyznačující se tím, že uvedená membrána se umístí do defektu artikulární chrupavky.

12.01.04

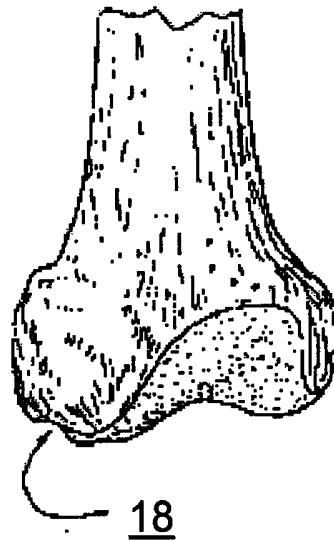
2003-2007

93047

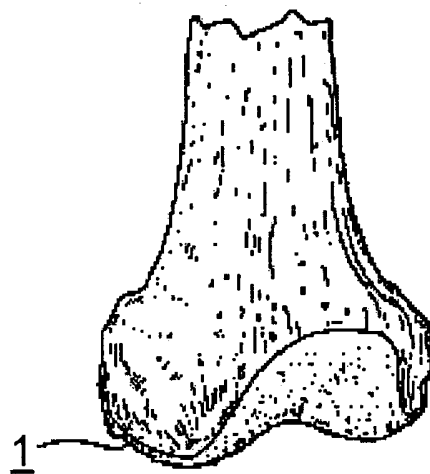
Obr. 1A



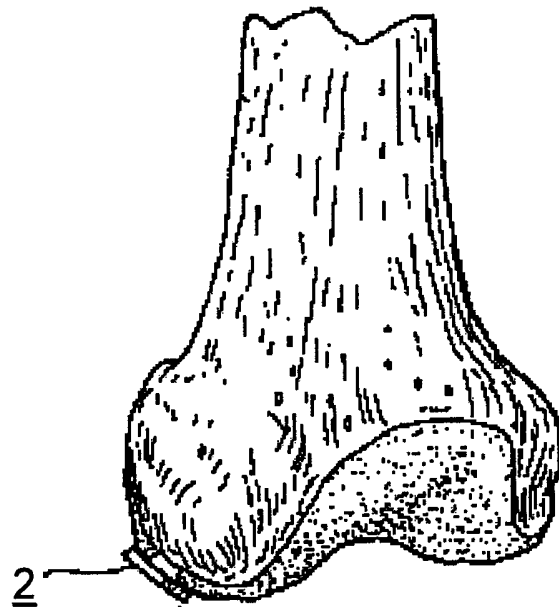
Obr. 1B



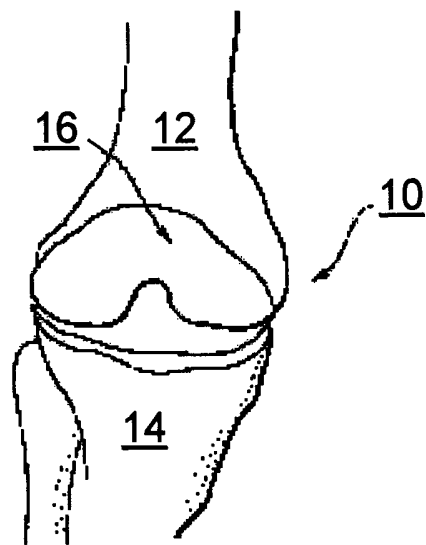
Obr. 1C



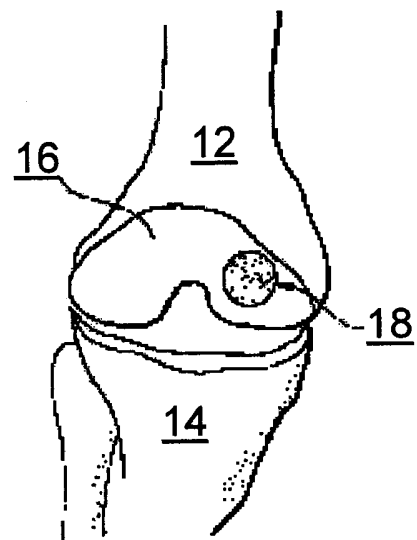
12.01.04



Obr. 2

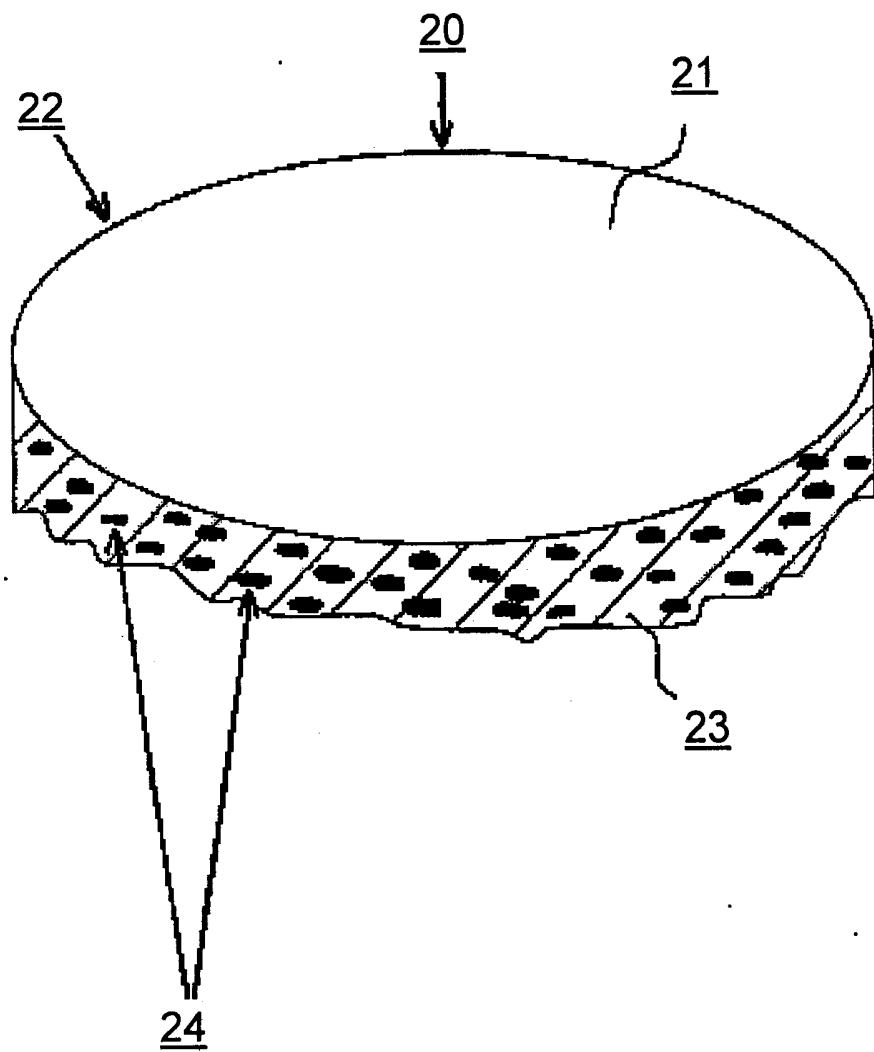


Obr. 3A

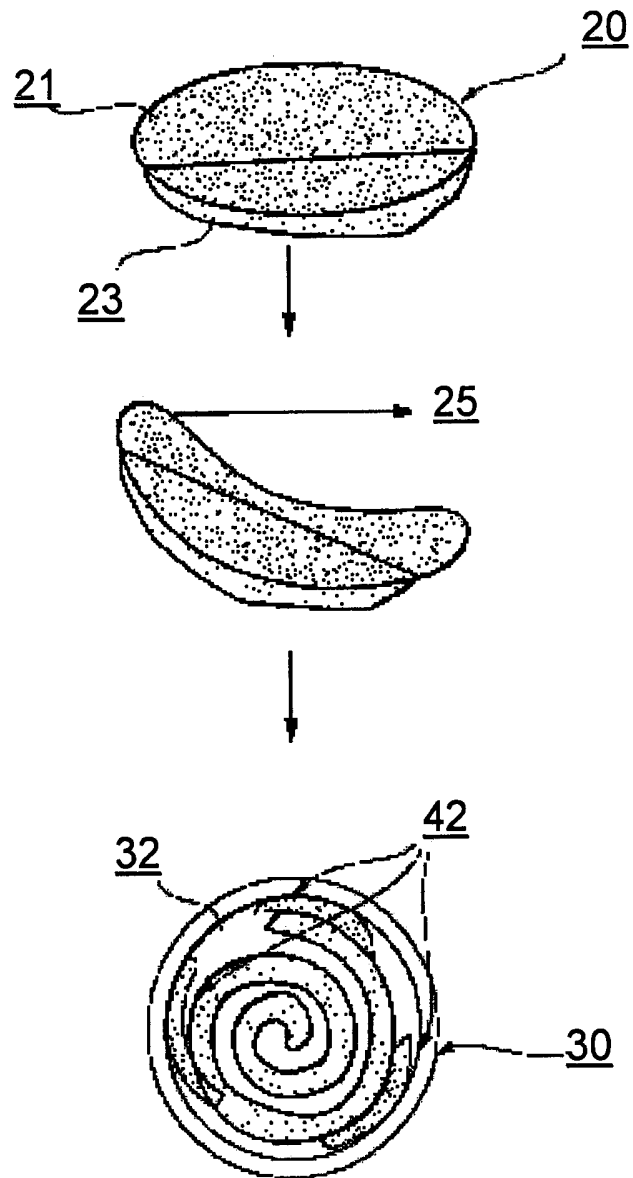


Obr. 3B

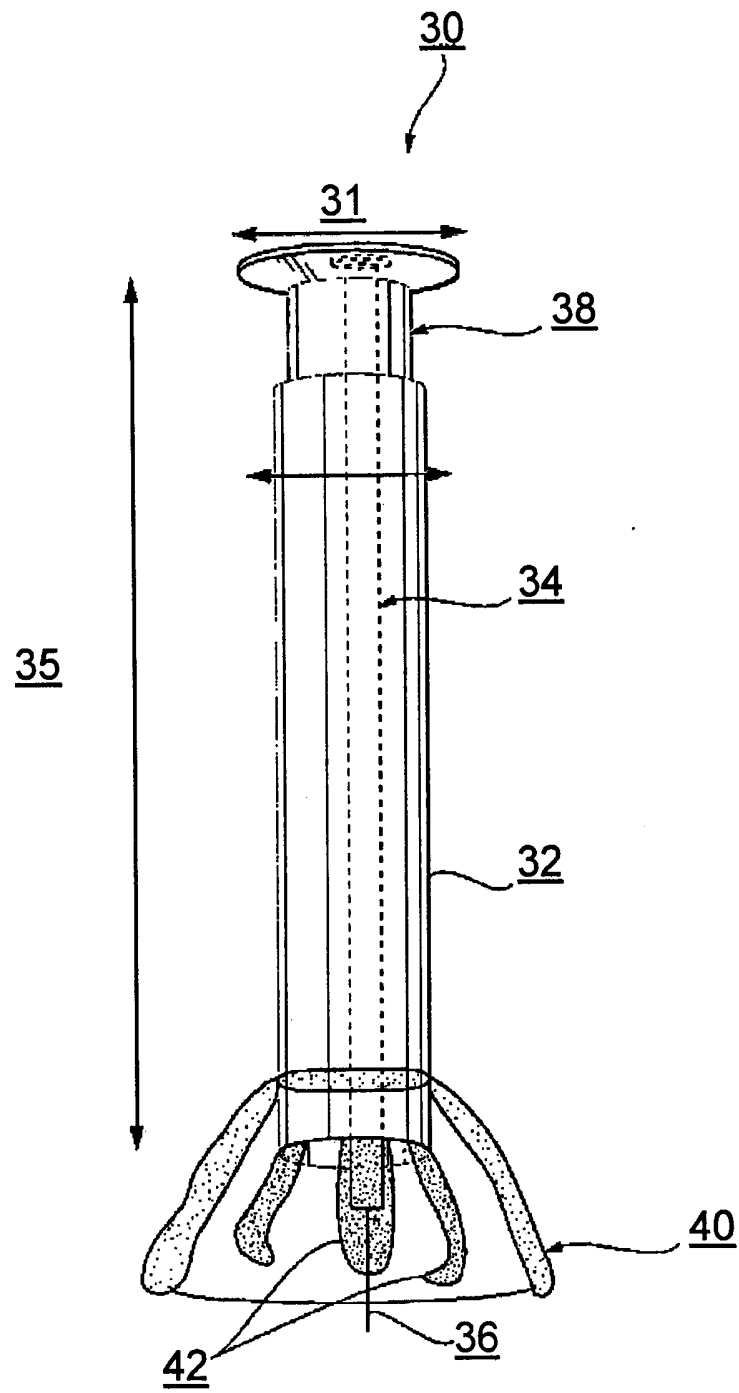
12.01.04



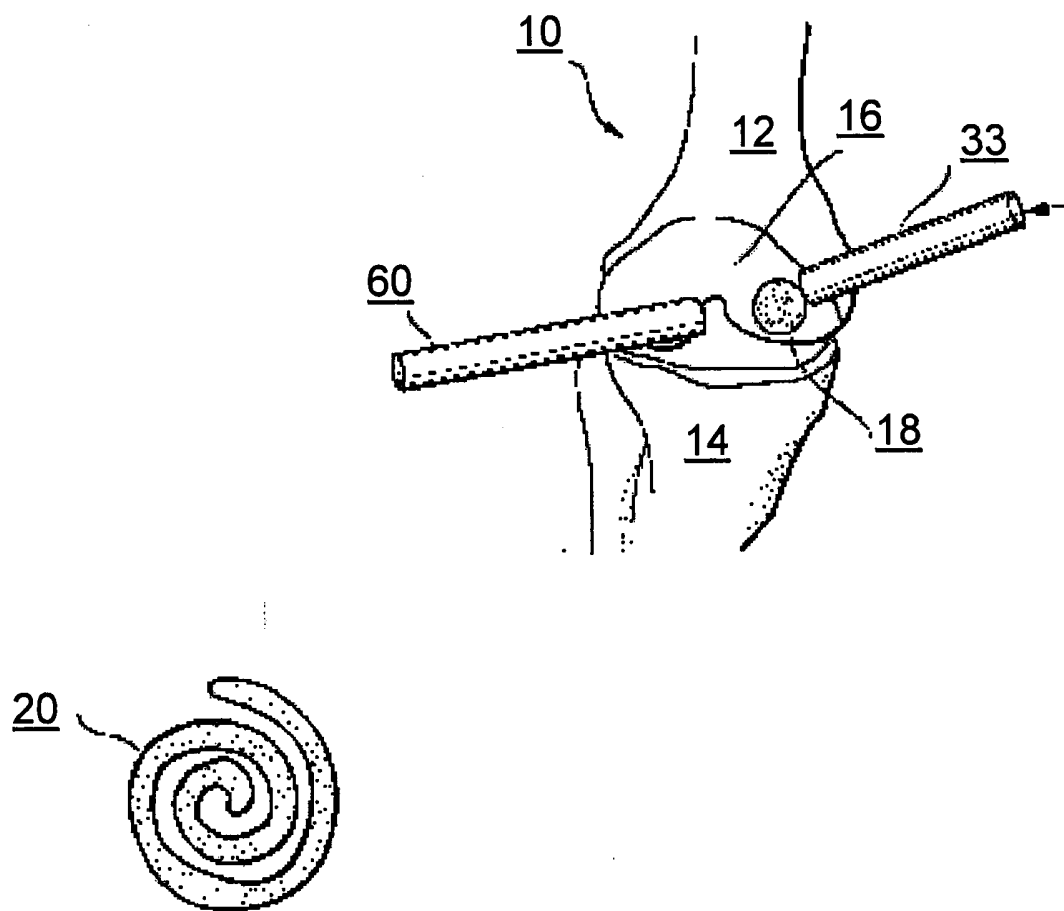
Obr. 4



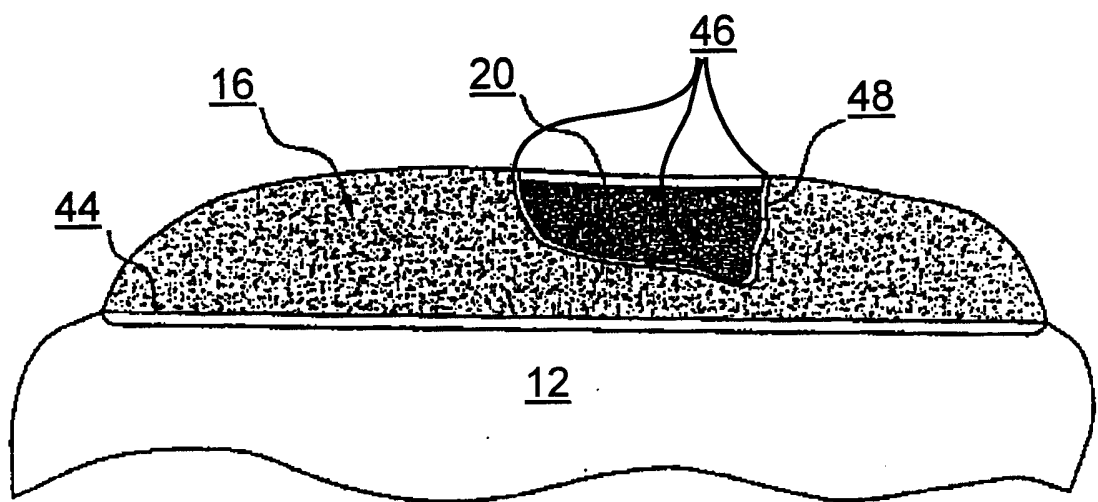
Obr. 5



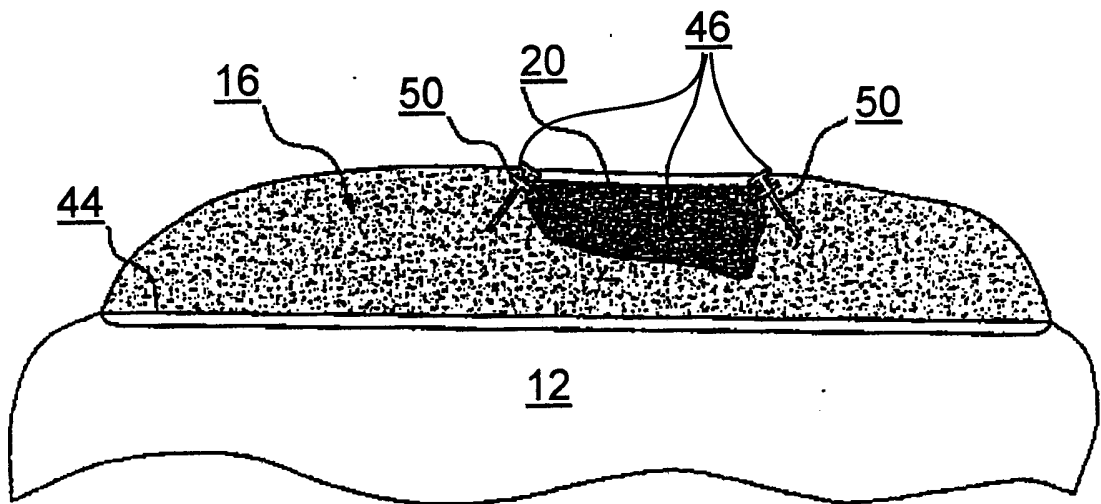
Obr. 6



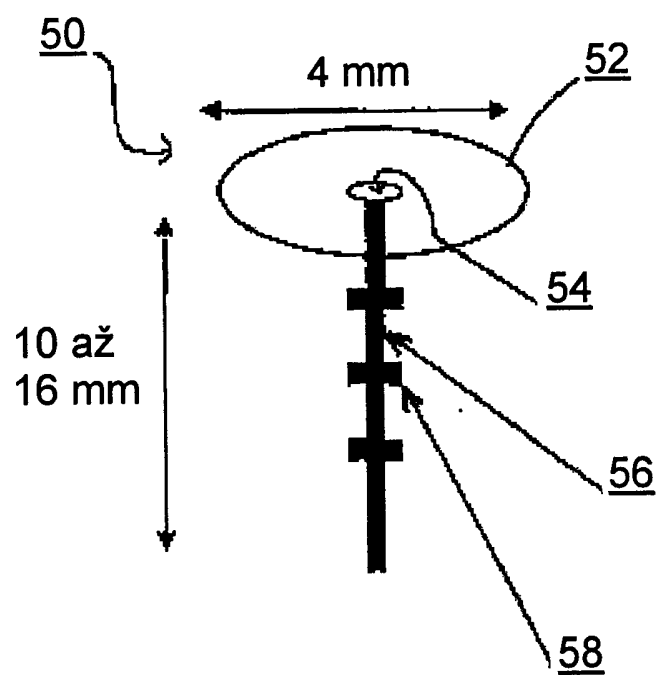
Obr. 7



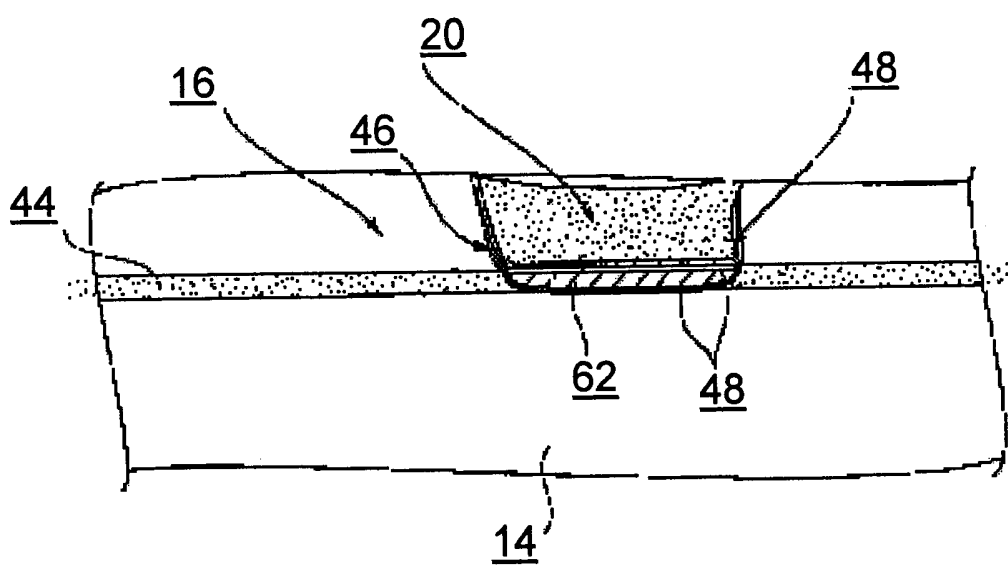
Obr. 8



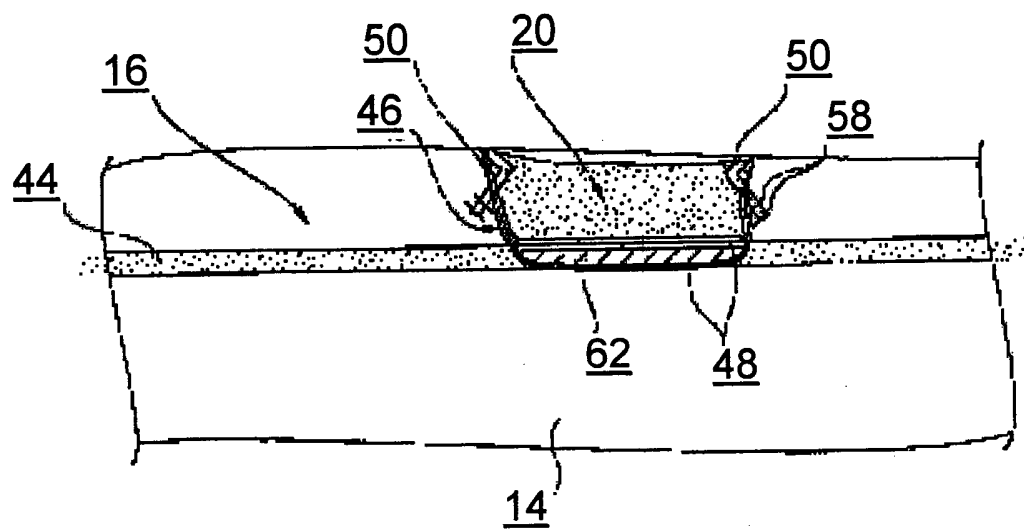
Obr. 9



Obr. 10

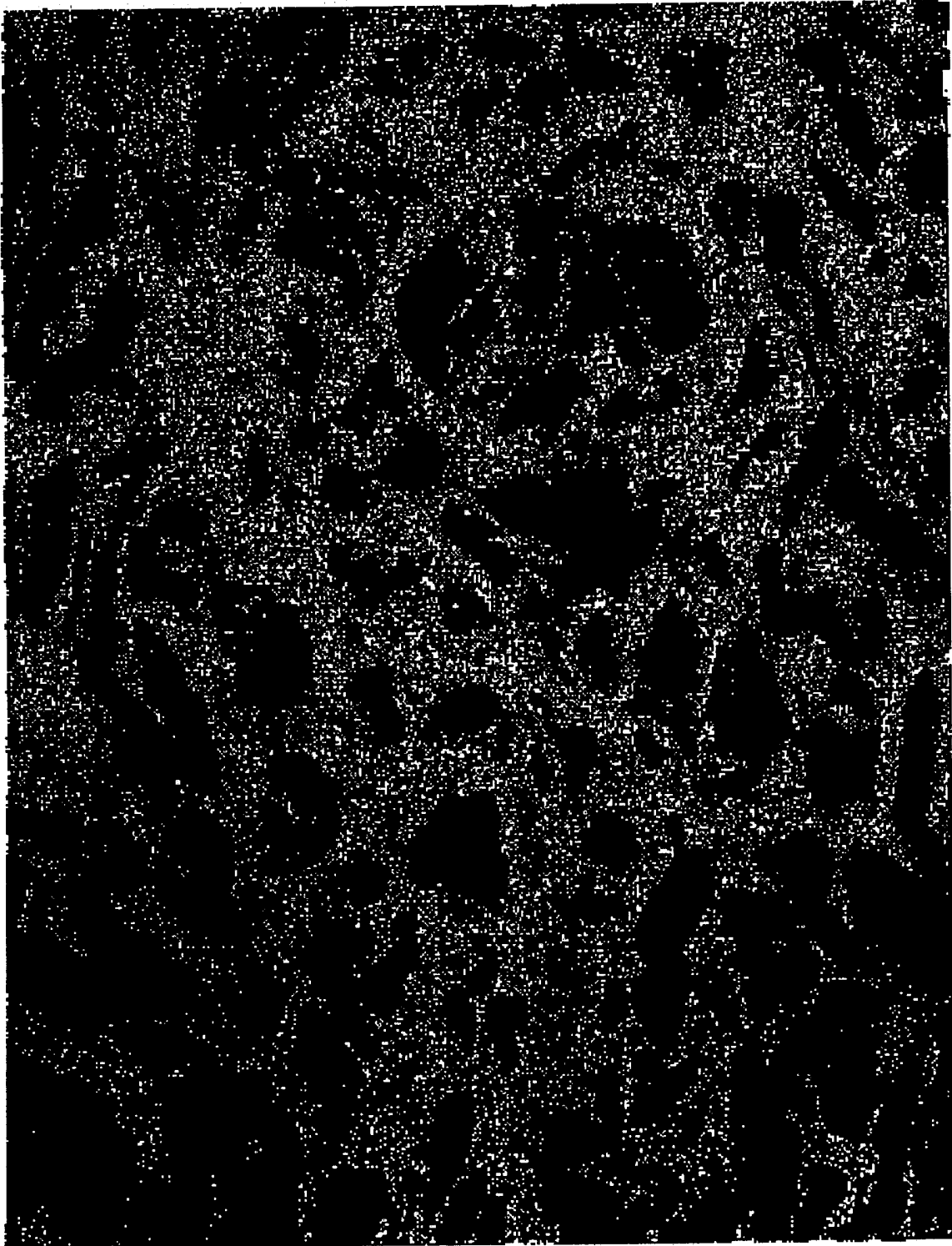


Obr. 11



Obr. 12

120104



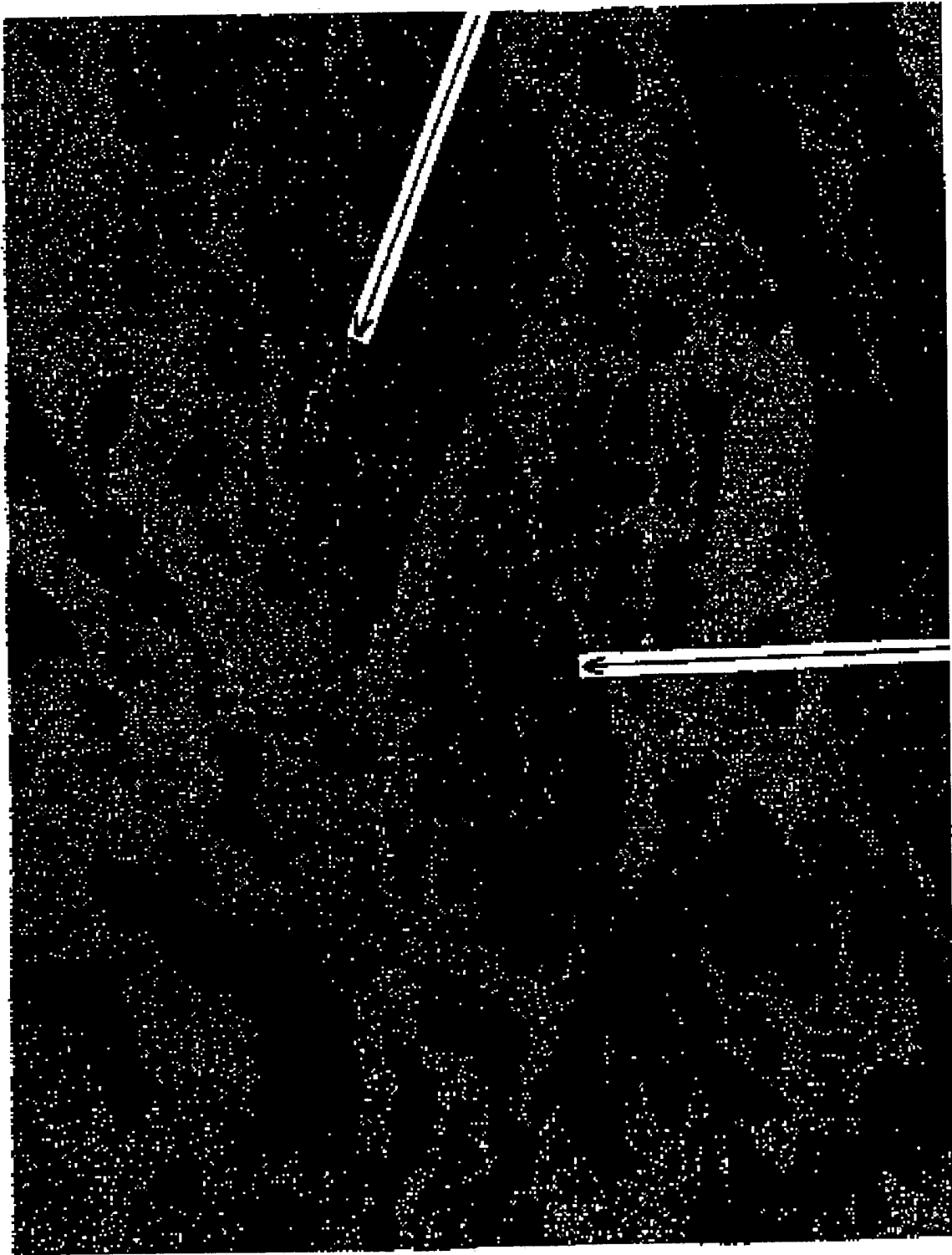
Obr. 13A

12.01.04



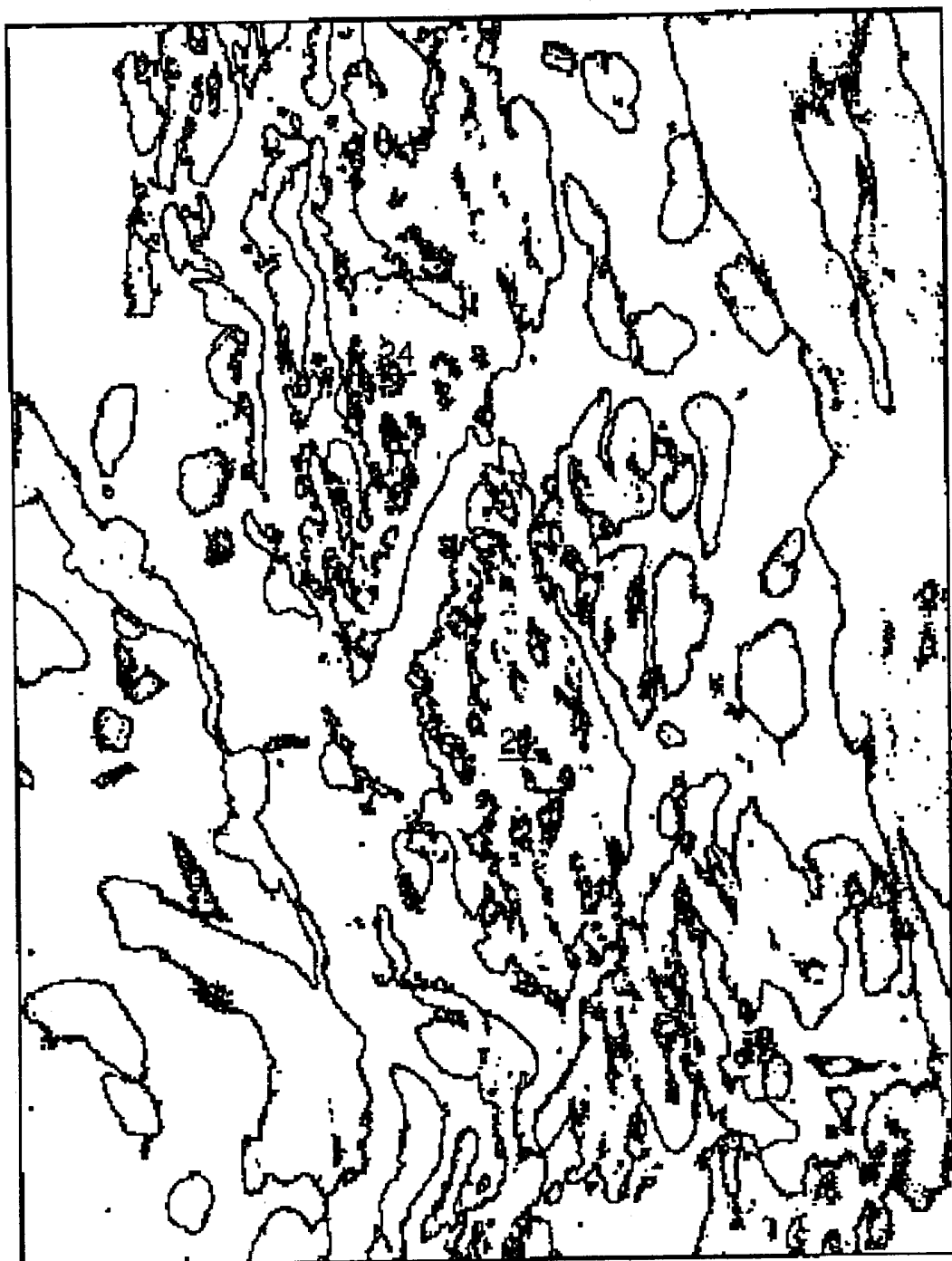
Obr. 13AA

24

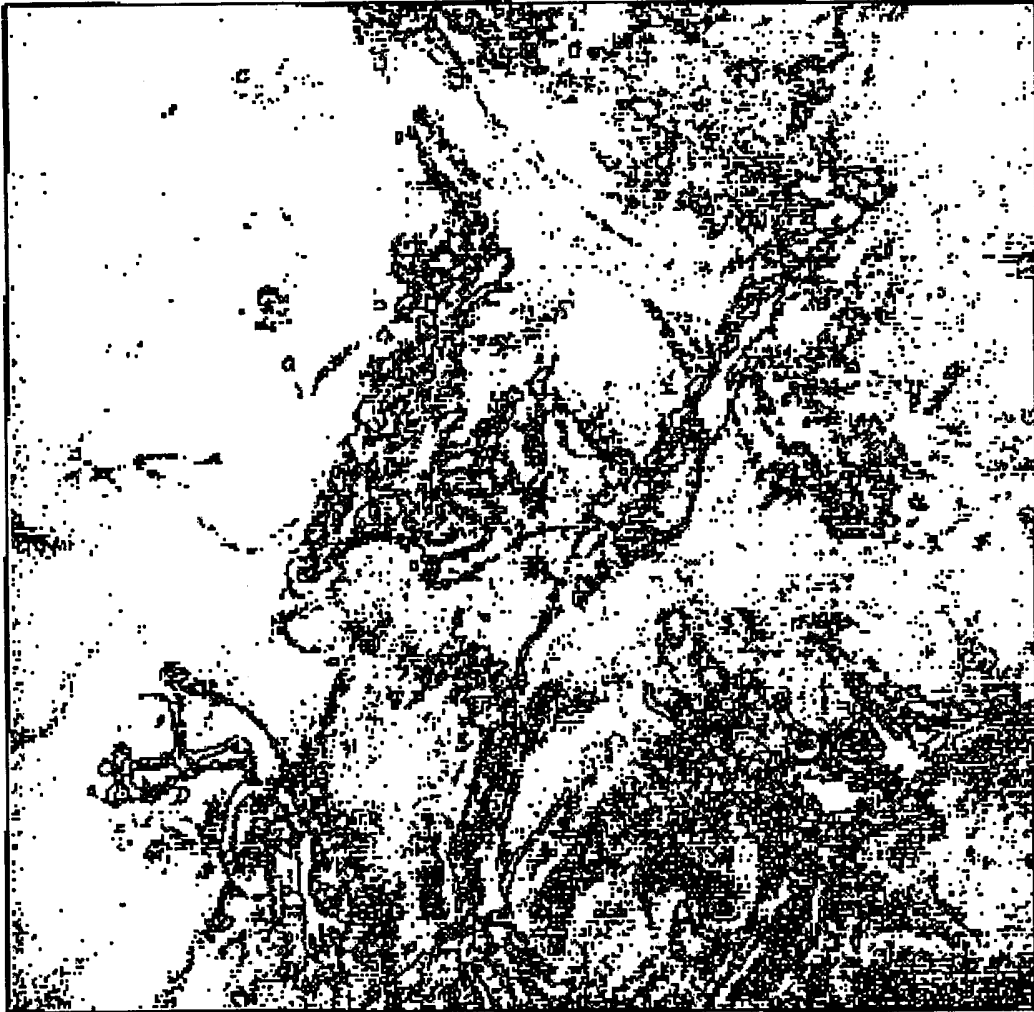


24

Obr. 13B

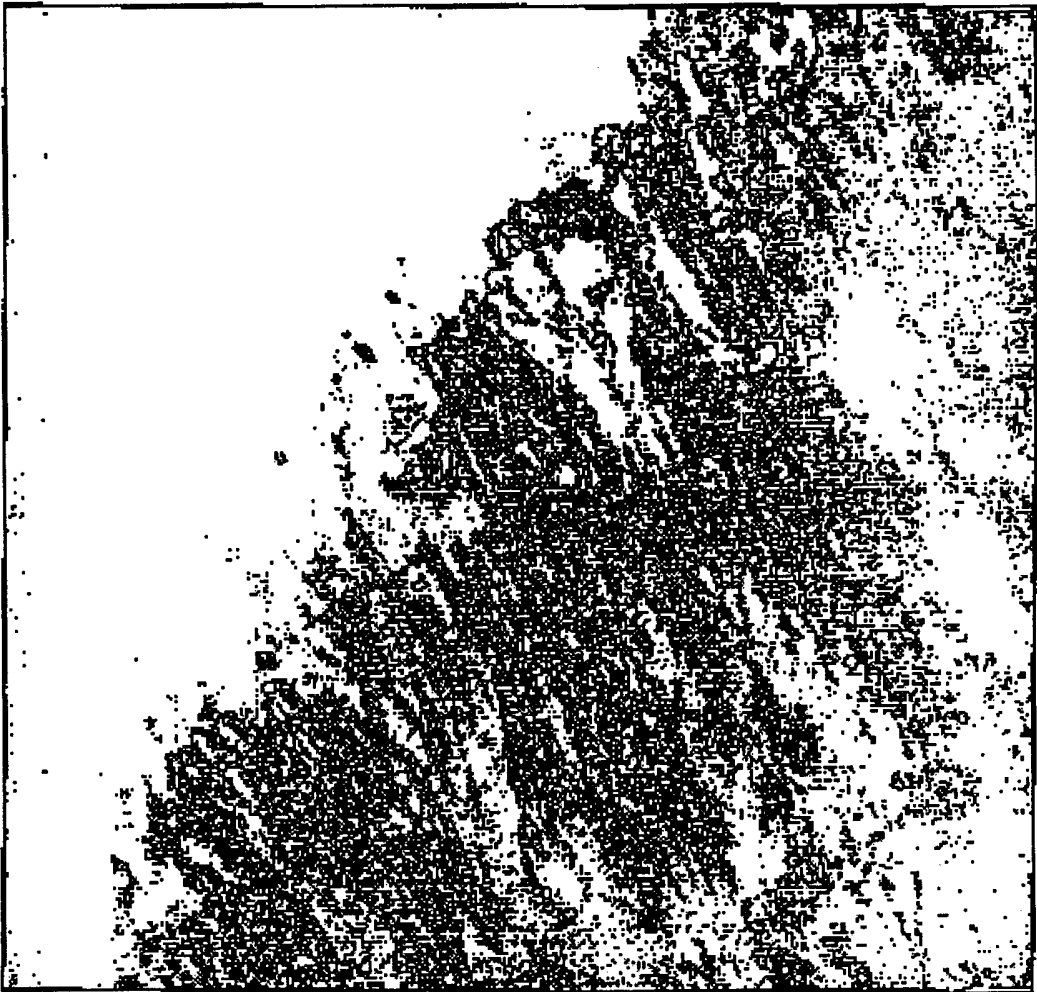


Obr. 13BB



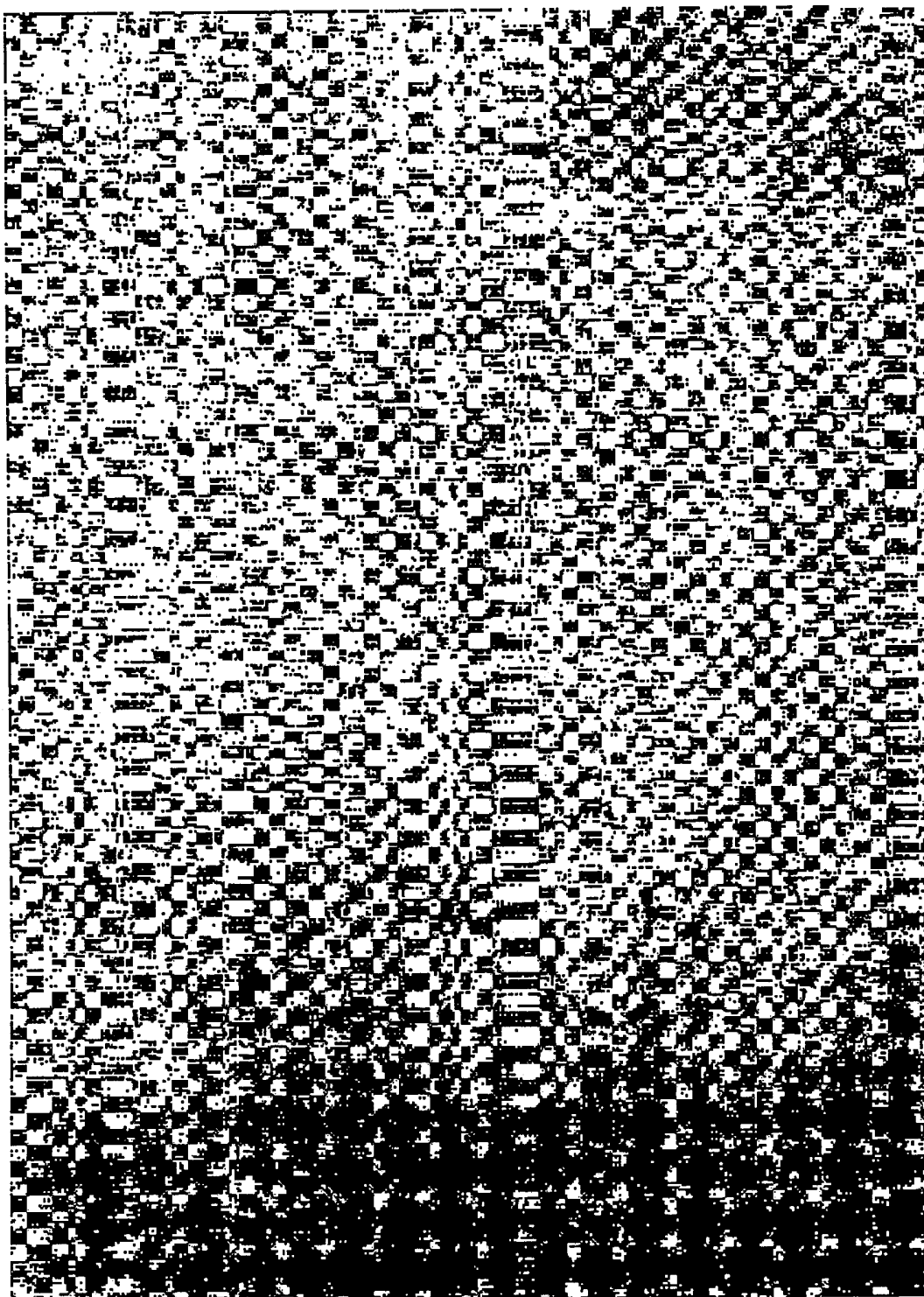
Obr. 13C

120104

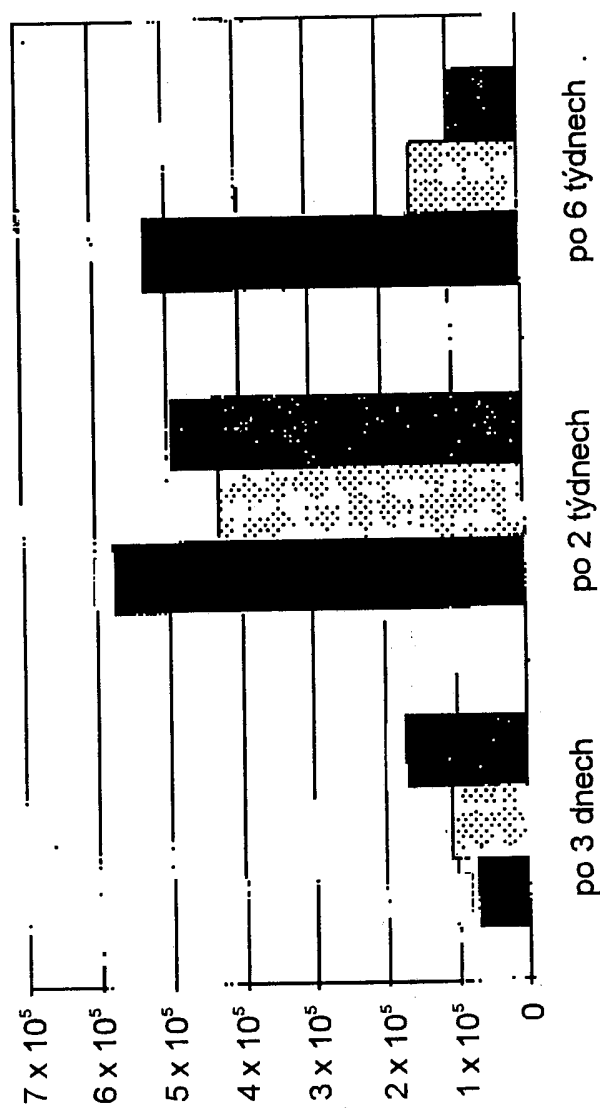


Obr. 13D

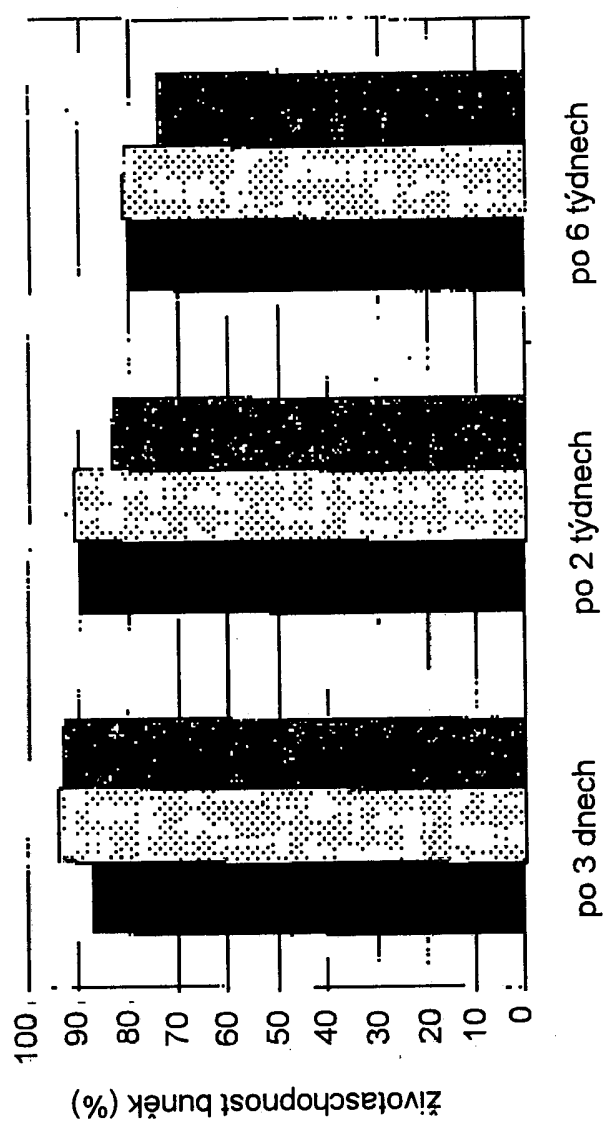
120104



Obr. 14



Obr. 15



Obr. 16