

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

37 144

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/51 (2015.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 31/726 (2006.01)
A61K 31/728 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2023-40977**
(22) Přihlášeno: **15.05.2023**
(47) Zapsáno: **21.06.2023**

- (73) Majitel:
Ústav experimentální medicíny AV ČR, v.v.i.,
Praha 4, Krč, CZ
Bioinova a.s., Praha 4, Krč, CZ
- (72) Původce:
Lucie Wolfová, Semice, CZ
Peter Bauer, Praha 4, Modřany, CZ
Eva Šebová, 96652 Tekovská Breznica, SK
- (74) Zástupce:
Kania, Sedlák, Smola, s.r.o., Mendlovo náměstí
907/1a, 603 00 Brno, Staré Brno

- (54) Název užitého vzoru:
**Biokompatibilní přípravek obsahující
decelularizovanou tkáň pupečníku**

CZ 37144 U1

Biokompatibilní přípravek obsahující decelularizovanou tkáň pupečníku

Oblast techniky

5

Technické řešení se týká biokompatibilního přípravku obsahujícího decelularizovanou tkáň pupečníku pro aplikace v oblasti hojení ran a regenerativní medicíny.

10

Dosavadní stav techniky

Nové poznatky z výzkumu a vývoje v oblasti hojení ran vedly v posledních desetiletích k významnému zefektivnění přístupů k jejich léčbě, která zaznamenala výrazné změny spojené s intenzivním rozvojem přípravků k léčbě a ošetřování ran. V rámci tohoto byla postupně vyvinuta řada nových léčebných metod a také produktů určených k lokální léčbě ran, včetně speciálních biologických krytí a léčivých přípravků v podobě různých typů umělých kožních štěpů. Rozvíjející se farmaceutický průmysl přinesl na trh také velké množství nových krycích materiálů, pozitivně se uplatňujících v jednotlivých fázích hojení ran při konzervativním způsobu ošetřování.

Rána je obecně definována jako porušení integrity kožního krytu, tvořícího bariéru mezi zevním a vnitřním prostředím. Hojení ran je složitý biologický proces zahrnující velké množství interakcí mezi všemi složkami dotčené tkáně, a to na buněčné i molekulární úrovni. Hojení rány vyžaduje velkou buněčnou a tkáňovou regenerační schopnost a současně reparační schopnost celého organismu. Rány, u kterých došlo k větším ztrátám nebo destrukcím tkáně, se hojí výstavbou nové vaskularizované tkáně a následnou epitelizací. Nezávisle na typu a rozsahu rány, proces hojení rány probíhá vždy ve třech fázích, které se vzájemně prolínají. První fází je fáze zánětlivá – exsudativní (čisticí), ve které dochází k zástavě krvácení a čištění rány. Druhou fází je fáze proliferační (granulační) během které dochází k tvorbě nové granulační tkáně včetně obnovy cévního systému. Třetí fáze v procesu hojení ran je fáze remodelační (reparační, reepitelizační), kdy je provizorní fibrózní tkáň postupně nahrazována kolagenovými vlákny a postupně dochází k obnově kožní tkáně.

Existuje řada klasifikací ran dělících se podle různých kritérií. Rány mohou být klasifikovány podle hloubky a rozsahu poškození na rány povrchové, kdy je poškozena jen kůže (sliznice) nebo podkoží (podslizniční vazivo), a dále rány hluboké, kdy jsou zasaženy hlubší struktury včetně nervově-cévních svazků, šlach apod. Pokud poranění pronikne stěnou do tělních dutin, mluvíme o ráně penetrující. Dále mohou být rány klasifikovány podle přítomnosti choroboplodných zárodků na rány aseptické a rány infikované, u kterých se dále rozlišuje primární infekce, vnikající do rány při jejím vzniku, nebo sekundární infekce, kdy se choroboplodné zárodky se dostávají do rány až v průběhu hojení. Dále se rány dělí např. dle mechanismu poranění na rány mechanické, mezi něž patří odřeniny, tržné a řezné rány, střelné rány, rány způsobené kousnutím apod. Další kategorií jsou termické rány, mezi něž patří popáleniny a omrzliny.

Rány lze klasifikovat také dle způsobu hojení na rány s primárním hojením, kdy k ucelení rány dochází pomocí slepení nebo sešití okrajů ran a není potřeba vzniku nové pojivové tkáně, která by vyplnila vzniklý defekt a nahradila tak tkáň, která byla ztracena díky jejímu poškození. Dále se jedná o rány se sekundárním hojením, kdy zahojení rány probíhá vznikem nově utvořené tkáně.

Důležitou klasifikací ran je také jejich rozdělení podle průběhu hojení, a to na rány akutní a chronické, které se zásadně liší průběhem hojení a většinou i způsobem vzniku. Akutní rána je definována jako rána, která je výsledkem traumatu, nebo operačního zásahu a je spojena s fyziologickým primárním hojením v adekvátním časovém rozmezí a bez komplikací. Chronická rána je nejčastěji výsledkem trofických tkáňových změn, na nichž se podílí současně několik faktorů. Je definována jako rána, která má dobu potřebnou k hojení delší než 6 týdnů a je spojena se ztrátou velkého objemu zdravé tkáně. K chronickým ranám se řadí např. rozsáhlé popáleniny,

diabetické ulcerace, bérkové vředy, dekubity, exulcerující malignity, amputační pahýly a ostatní sekundárně se hojící rány.

Pro léčbu ran jsou využívány různé typy léčivých přípravků, které jsou voleny dle typu rány a rozsahu poškození tkáně. Tyto přípravky jsou děleny především podle jejich základní funkce při léčbě poranění (různé typy krytí, antibakteriální a enzymatické přípravky, přípravky obsahující léčivé složky aktivně se podílejících na léčbě apod.). Dále se mohou dělit dle složení a typu materiálu použitého k výrobě daného přípravku (např. alginát, kolagen, kys. hyaluronová, polyuretan, přípravky na bázi jódu nebo stříbra apod.) nebo dle fyzikální formy (mast, film, pěna, gel, hydrokoloid apod.) Samostatnou speciální oblastí léčivých přípravků jsou pak bioaktivní kryty ran a přípravky pro náhradu kožní tkáně v podobě umělých kožních štěpů.

Přípravky v podobě krytů ran mají za úkol zejména vytvoření adekvátně vlhkého prostředí, ve kterém mohou probíhat biologické a biochemické procesy v rámci hojení, a v kterém dochází k stimulaci proliferaci fibroblastů, endoteliálních buněk a keratinocytů a je podporována epitelizace. Mezi tradiční přípravky v této skupině patří hydrokoloidní krytí, která jsou nepropustná pro vodu a téměř nepropustná pro vodní páry a plyny, vytváří hypoxické prostředí s nízkým pH, povzbuzují granulogenezi a angiogenezi. Proto u hlubokých defektů se doporučuje jejich kombinace s hydrokoloidními pastami.

Novější formou krytí z koloidů jsou přípravky na bázi netkaných hydrofilních textilií, u kterých při kontaktu s exsudátem dochází k bobtnání a vytvoření kompaktního gelu, který vytváří pro hojení ran ideální vlhké prostředí.

Hojně využívány jsou přípravky v podobě hydrogelových krytů ran na bázi syntetických i přírodních polymerů. Hydrogely na bázi syntetických polymerů jsou nerozpustné, hydrofilní materiály na bázi například polymetakrylátů, polyvinylpyrrolidinu nebo kyseliny mléčné a jejich kopolymerů. S výhodou jsou pak využívány přípravky tohoto typu na směsi syntetického polymeru a biopolymeru, které kombinují vlastnosti obou těchto typů materiálů.

Mezi hydrogelová krytí lze také zařadit přípravky pro krytí ran na bázi alginátu, který se při kontaktu se sekretem rány vytvoří nepřilnavý gel, který účinkuje jako vlhký obvaz. Současně se sekretem rány se pojímají zbytky odumřelých buněk, hnis a bakterie, což poukazuje na jejich čisticí efekt. Algináty bohaté na mannuronovou kyselinu vytvářejí měkké flexibilní gely (např. Sorbsan), zatímco alginátová krytí s převahou guluronové kyseliny vytvářejí pevnější gelové formy. Při reakci se sekretem rány se ionty vápníku uvolňují a jsou vyměňovány za ionty sodíku, které algináty zpět absorbují.

Dalším typem z tradičně využívaných přípravků v podobě krytů ran jsou pěnové obvazy, které jsou vyráběny buď jako polyuretanová nebo silikonová pěna. Pěnová polyuretanová krytí jsou jednoduchá nebo vícevrstevná krytí vyráběná z měkkých polyuretanových materiálů propustných pro vodní páry a plyny. Jsou to hydrofilní prostředky, které podle velikosti a uspořádání pórů vykazují různou drenážní schopnost a absorpční kapacitu. Pěnový polyuretan stimuluje fyziologické čištění rány, příznivě ovlivňuje granulaci a epitelizaci, chrání ránu před sekundární infekcí a svou měkkou konzistencí i před traumaty. Některé výrobky jsou na vnitřní straně přikládající se na ránu opatřeny neadherentní silikonovou vrstvou, která garantuje bezbolestnou výměnu obvazu. Silný absorpční účinek je u některých pěnových obvazů potencován speciálním uspořádáním postupně se zmenšujícími póry směrem k horní části obvazu.

Velkou skupinu přípravků tvoří také hydroaktivní krytí na bázi kombinace pěnové polyuretanové hmoty a hydrogelu. Toto strukturální uspořádání umožňuje absorpci velkého množství exsudátu, který současně chrání ránu před vyschnutím. Terapeutický efekt hydroaktivních krytí se podobá hydrokoloidům a klasickým pěnovým polyuretanům. Na rozdíl od hydrokoloidů se nevytvoří pod obvazem gelová hmota, ale stejně jako v případě hydrokoloidů dojde ke snížení pH v ráně, které brání množení mikrobů.

Mezi důležitou skupinu přípravků pro léčbu ran patří antimikrobiální kryty ran, na bázi antibiotik nebo antibakteriálních látek, sloužících pro prevenci nebo léčbu zánětu přítomného v ráně. Mezi běžná antibiotika začleněná do obvazů pro tyto aplikace patří např. dialkylkarbamoylchlorid.

5 Z řady antibakteriálních látek jsou hojně využívané stříbro, jód nebo např. gentamicin nebo širokospektrální antiseptikum chlorhexidin. Další prostředky s antiseptickým a antibakteriálním účinkem obsahují jód nebo stříbro.

10 Kromě uvedených tradičních forem krytí, je většina moderních přípravků pro zefektivnění účinku na bázi vzájemné kombinace výše uvedených typů.

Odlišně fungující skupinou přípravků pro léčbu ran je kategorie léčebných přípravků obsahující bioaktivní látky aktivně se účastnící hojivého procesu v podobě tzv. bioaktivních krytů ran. Nejčastěji se jedná o přípravky na bázi kolagenu, kyseliny hyaluronové, nebo elastinu apod.,

15 případně pro další zefektivnění léčby jejich kombinace například s výše uvedenými antibiotiky, antibakteriálními látkami a podobně. Přípravky s obsahem kolagenu nebo kyseliny hyaluronové se aktivně podílí na hojení ran, kde kromě absorpčního účinku stimulují také přirozenou aktivitu fibroblastů, keratinocytů a makrofágů, aktivují fibronectin a stimulují angiogenezi a podobně. Vzhledem k tomu, že tvoří základní složky mezibuněčné hmoty kožní tkáně, také pomáhají

20 augmentaci rány a podporují její epitelizaci. Kyselina hyaluronová se také díky svým unikátním vlastnostem aktivně podílí na samotné regeneraci tkání. Jód působí antimikrobiálně a současně brání rozkladu kyseliny hyaluronové přítomnými bakteriálními enzymy. Mezi další přípravky s hojivým účinkem patří například přípravky s obsahem panthenolu, propolisu a podobně.

25 V posledních letech je věnována také velká pozornost přípravkům s obsahem vybraných růstových faktorů, které se v organismu rovněž významně podílejí na všech fázích hojení a významným způsobem tak zvyšují terapeutický efekt přípravků pro léčbu ran. Růstové faktory aktivují migraci, proliferaci a diferenciaci buněk zapojených do procesu hojení a také regulují produkci extracelulární matrix. Jedná se zejména o růstové faktory z rodiny fibroblastových růstových

30 faktorů jako například růstové faktory FGF, EGF a TGF. Významnou roli hraje také destičkově-derivovaný růstový faktor PDGF, který stimuluje proliferaci buněk zapojených do zánětlivé fáze hojení, proliferaci a migraci fibroblastů a také buněk hladkého svalstva. Na trhu jsou již dostupné například přípravky s obsahem rekombinovaného destičkově-derivovaný růstový faktorů rhPGDF-BB.

35 Další skupinou léčivých přípravků na bázi biologicky aktivních látek jsou také přípravky s obsahem hydrolytických enzymů podporujících enzymatické procesy zapojené do hojení – například přípravky s aktivní složkou kolagenázy clostridiopeptidázy; nebo na bázi inhibitorů proteolytických enzymů, jejichž přítomnost naopak proces hojení ovlivňuje negativně. Mezi tyto

40 enzymy patří zejména právě proteináza, která poškozuje extracelulární proteinovou matrix a růstové faktory.

Speciální samostatnou kategorií určených pro léčbu rozsáhlých ran, spojených se ztrátou velkého objemu tkáně, jsou transplantáty v podobě autogenních i allogenních dermálních

45 a dermoepidermálních kožních štěpů a kožních transplantátů, nebo na bázi adekvátní buněčné složky zabudované ve vhodném nosiči. Použití těchto transplantátů dosahuje díky jejich vlastnostem samozřejmě nejlepších terapeutických výsledků, ale bohužel je značně limitováno velice omezenou dostupností, a v případě autologních štěpů také náročností zákroku a zásahem do zdravé tkáně pacienta. Využití allogenních štěpů, nebo transplantátů na bázi buněčných složek je

50 limitováno mimo jejich dostupnosti také dobou nezbytnou pro přípravu těchto transplantátů k jejich aplikaci, trvající až několik dní a znemožňujících tak ve většině případů jejich okamžité použití.

Z tohoto důvodu se v poslední době začala velká pozornost věnovat vývoji umělých kožních štěpů

55 připravených pomocí tkáňového inženýrství. Jedná se o léčivé přípravky moderní terapie v podobě

uměle připravených kožních štěpů na bázi biokompatibilních syntetických i bio – polymerů, často v kombinaci s buněčnou složkou nebo růstovými faktory.

Mezi tyto přípravky patří například přípravky na bázi allogenních fibroblastů nebo keratinocytů aplikovaných na vhodné nosiče, např. v podobě bovinního nebo prasečího kolagenu

Speciální podskupinu těchto přípravků pak tvoří různé přípravky na bázi decelularizované allogenní nebo xenogenní mezibuněčné hmoty. Mezi tyto přípravky patří například decelularizovaná kolagenová matrix s bazálně membránovým komplexem, nebo xenogenní přípravky na bázi decelularizované prasečí kožní tkáně.

Mezi přípravky na bázi decelularizovaných tkání s velkým terapeutickým potenciálem patří přípravky na bázi amniové membrány, která má díky svým unikátním biologickým a regeneračním vlastnostem v oblasti hojení ran velký potenciál a již řadu let se využívá v medicíně. Nativní lidská amniová membrána obsahuje řadu růstových faktorů, včetně epidermálního růstového faktoru (EGF), bazálního fibroblastového růstového faktoru (bFGF), růstového faktoru keratinocytů, transformačního růstového faktoru α (TGF α) a TGF β , nervový růstový faktor a růstový faktor hepatocytů, o kterých je známo, že hrají velmi důležitou roli při hojení ran a regeneraci tkání. Amniová membrána je neimunogenní, redukuje zánět, bolest a zjizvení a poskytuje také přirozenou biologickou bariéru. Mezibuněčná hmota amniové membrány je tvořena různými typy kolagenů a také elastinem, jejichž kombinace napomáhá pružnosti a menší jizevnatosti a přibližuje se svým vlastnostem zdravé kůže. Přípravky na bázi lidské allogenní decelularizované amniové membrány se již řadu let využívají například v očním lékařství, v chirurgii, nebo v posledních letech také právě k léčbě akutních i chronických ran.

Z výše uvedeného je patrné, že nejvyššího efektu při hojení rozsáhlých poranění kožní tkáně, dosahují kromě kožních transplantátů přípravky s obsahem biologicky aktivních látek, přímo se účastnících hojivého procesu. Jedná se o přípravky na bázi plně biokompatibilních a biodegradabilních materiálů, ideálně s obsahem kombinace vhodných růstových faktorů, kolagenu a kyseliny hyaluronové. Pro dosažení ještě většího terapeutického efektu by měly tyto přípravky být také ve formě matric, umožňujících augmentaci defektu a osídlení přítomnými buňkami.

Tak jak bylo uvedené výše, u kožních transplantátů je velkým problémem, vyplývajícím z podstaty těchto materiálů, jejich dostupnost a v případě autologních štěpů také náročnost léčby a zásah do zdravé tkáně pacienta. V případě allogenních štěpů nebo buněčné léčby je problémem kromě dostupnosti také doba potřebná k jejich přípravě, což znemožňuje jejich okamžité použití.

Umělé kožní štěpy disponují snadnou dostupností a možností jejich okamžitého použití. Nicméně vzhledem ke komplexnosti léčivého procesu a složení kožní tkáně, není díky složení těchto přípravků, které je ve většině případů tvořeno pouze jedním až dvěma biomateriály v kombinaci s jednou aktivní látkou, dosaženo takového terapeutického efektu, jako v případě kožních transplantátů.

Ideální řešení tak nabízí přípravky na bázi adekvátní humánní decelularizované tkáně, jako jsou například přípravky na bázi amniové membrány. Bohužel nevhodně zvoleným způsobem decelularizace dochází k eliminaci přítomných růstových faktorů a dalších cytokinů, pozitivně ovlivňujících hojení. Navíc vzhledem k tomu, že lidská amniová membrána, využívaná pro bioaktivní kryty ran, je blanka o tloušťce 10 μ m a velikosti zhruba 20 $\times$ 25 cm, je také velmi limitující nízká výtěžnost výroby těchto přípravků.

Podstata technického řešení

Výše uvedené nedostatky překonává biokompatibilní přípravek podle technického řešení, jehož podstata spočívá v tom, že zahrnuje decelularizovanou tkáň pupečníku, která obsahuje 1 až 99,5 hmotn. % kolagenní složky a 0,5 až 20 hmotn. % nekolagenní složky.

V podstatě se s výhodou jedná přípravek na bázi decelularizované tkáně lidského pupečníku, a to z kterékoliv jeho části.

Pod pojmem decelularizovaná tkáň pupečníku se rozumí s výhodou tkáň lidského pupečníku zbavená pomocí metody decelularizace buněčné složky a jejich intracelulárních komponent. Pod pojmem kolagenní složka se rozumí složka decelularizované tkáně pupečníku obsahující kolagen, a to všechny jeho přítomné typy. Nekolagenní složkou se rozumí zbylá část decelularizované tkáně pupečníku, která obsahuje přítomné proteiny vyjma kolagenu - tzn. nekolagenními proteiny například v podobě elastinu, růstových faktorů a dalších cytokinů na bázi proteinů, a dále glykosoaminoglykany a glykoproteiny nebo polysacharidy.

Podle výhodného provedení technického řešení je kolagenní složka vybrána ze skupiny obsahující kolagen typu I, III, IV, V, VI, VII, XII a/nebo jejich směs a s výhodou obsahuje kolagen typu I a/nebo kolagen typu III.

Podle ještě dalšího výhodného provedení technického řešení je nekolagenní složka vybrána ze skupiny obsahující elastin, růstové faktory z rodiny inzulinu podobných růstových faktorů (IGF), s výhodou typ IGF2, růstové faktory z rodiny fibroblastových růstových faktorů (FGF), s výhodou typ FGF2, dále glykosaminoglykany nebo jejich směs, dále fibrinogen, fibronectin nebo jejich směs.

S výhodou jsou glykosaminoglykany vybrané ze skupiny obsahující chondroitin sulfát, keratansulfát, heparansulfát, kyselinu hyaluronovou nebo jejich směs.

Podle ještě dalšího výhodného provedení technického řešení přípravek obsahuje glykosaminoglykany v rozsahu 0,1 hmotn. % až 10 hmotn. %.

Podle ještě dalšího výhodného provedení technického řešení je obsah kyseliny hyaluronové v přípravku alespoň 0,01 hmotn. %.

Povrch tkáně lidského pupečníku obsahuje epitel tvořený amnionem vyplněným Whartonovým rosolem. Z hlediska složení mezibuněčné hmoty, tkáň pupečníku obsahuje především kolagen typu I, III, IV, V, a VI, elastin, fibronectin a také zejména díky Whartonova rosolu kyselinou hyaluronovou. Lidský pupečník má v průměru asi 1 až 2 cm a dosahuje délky přibližně 50 až 55 centimetrů. Díky tomuto je umožněna mnohem vyšší výtěžnost v rámci výroby a zpracování této tkáně v porovnání s přípravky například na bázi amniové membrány.

V pupečníku je také, stejně jako například v amniové membráně, obsažena řada velice důležitých růstových faktorů a cytokinů, které se pozitivně účastní regenerace tkání. Vhodně zvolený způsob decelularizace a celkového zpracování této tkáně pak umožňuje částečné zachování složení nativní tkáně, včetně přítomnosti některých růstových faktorů. Zpracování této tkáně do podoby lyofilizátu navíc umožňuje také výrobu biomateriálů, které vykazují hydrokoloidní a hydrogelovou povahu, díky čemuž má také vynikající vlastnosti z hlediska krytů ran. Vzhledem k tomu, že se jedná o decelularizovanou tkáň, je také zabezpečena plná biokompatibilita těchto přípravků a v případě využití tohoto biomateriálu ve formě 3D rozměrných materiálů je zabezpečena také možnost augmentace defektu vzniklého ztrátou tkáně a osídlení přítomnými buňkami.

Využití pupečníku pro přípravu biomateriálů určených pro aplikace v medicíně také představuje průlomové řešení, neboť tímto způsobem dojde k využití velmi cenného biologického materiálu,

5 který je v současné době považován za biologický odpad, a umožní využití této tkáně pro vznik celé škály léčivých přípravků a biomateriálů. Vzhledem k tomu, že se jedná o biologický odpad, není získávání tohoto materiálu spojené s žádnými komplikacemi spojenými s jeho odběrem a zpracováním, a využití tohoto materiálu rovněž také nenaráží na žádné problémy etického rázu, jak je tomu v případě většiny ostatních biomateriálů humánního původu. Další výhodou je jeho široká dostupnost v relativně velkém množství, například v porovnání s amniovou membránou.

10 Hmotn. % jsou vztažena na celkovou hmotnost sušiny v přípravku podle technického řešení. Sušiny je dosaženo po lyofilizaci přípravku podle technického řešení. Přípravek podle technického řešení může být v lyofilizované formě nebo nelyofilizované formě. Lyofilizovaná forma přípravku podle technického řešení je forma částic nebo forma celistvé vrstvy (sheetu).

15 Přípravek podle technického řešení je tedy na bázi decelularizované tkáně pupečníku, s výhodou lidského pupečníku, který je určen pro aplikace v oblasti hojení a léčby akutních i chronických ran s výhodou v humánní medicíně, kde přípravek představuje vhodnou alternativu k autologním i allogenním kožním štěpům a přípravkům na bázi buněčné terapie. A dále pro aplikace v regenerativní medicíně.

20 Přípravek podle technického řešení díky komplexnosti svého složení vykazuje oproti běžně využívaným materiálům na bázi syntetických polymerů, materiálů xenogenního nebo rostlinného původu, případně jedno, dvou a vícesložkovým bioaktivním krytům na bázi biopolymerů, a/nebo cytokinů, využívaných v této oblasti v klinické praxi, vyšší terapeutický efekt při hojení akutních i chronických ran. Toto vede k účinnější a rychlejší léčbě a regeneraci poškozené kožní tkáně.

25 Vzhledem k původu tkáně, přípravek podle technického řešení rovněž vykazuje mnohem vyšší biokompatibilitu oproti přípravkům na bázi materiálů ne humánního původu, zejména v podobě syntetických polymerů nebo xenogenního materiálu.

30 Přípravek podle technického řešení vykazuje díky své podstatě a původu také mnohem vyšší výtěžnost při jeho zpracování a výrobě například v porovnání s přípravky na bázi amniové membrány.

35 Možné využití přípravku podle technického řešení je především jako surovina v podobě léčivé složky pro výrobu léčivých přípravků určených do oblasti hojení akutních i chronických ran, a/nebo jako aditivum v podobě bioaktivní složky pro zvýšení terapeutického účinku léčivých přípravků pro aplikace v této oblasti. Dále je možné přípravek podle technického řešení využít jako scaffold/matrici pro zabudování a následnou kultivaci různého typu buněk, nebo jako aditivum v podobě bioaktivní složky pro zvýšení terapeutického účinku při výrobě léčivých přípravků určených obecně pro využití v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství.

40 Přípravek je podle technického řešení získáván cílenou decelularizací tkáně lidského pupečníku pomocí 0,1 hmotn. % vodného roztoku SDS a roztoku benzonázy nukleázy v kyselině trischlorovodíkové (20 až 50 U/ml); a to při zachování 30 až 50 % původních složek tvořících mezibuněčnou hmotu nativní tkáně, zejména kolagenní složky, nekolagenních proteinů.

45 Dále je popsán celý způsob přípravy přípravku podle technického řešení – tedy způsob decelularizace tkáně pupečníku a s výhodou jeho následného zpracování lyofilizací.

50 Nejprve je na základě souhlasu pacienta v autorizovaném odběrovém místě odebrána tkáň pupečníku, která je uložena na led a přepravena do místa zpracování.

Poté se tkáň několikrát důkladně omyje destilovanou vodou pro odstranění krve a dalších tělních tekutin a následně se omyje roztokem s obsahem antibiotik. Pak se tkáň buď zpracuje ihned, nebo se uskladní v -80 °C.

55

V rámci zpracování tkáně se tkáň nejprve nakrájí, případně rozmělní na kousky o velikosti cca 1 x 1 až 1 x 2 cm a poté opět důkladně promyje destilovanou vodou v 5 cyklech, kdy se tkáň vloží do odpovídající skleněné nádoby a za stálého intenzivního míchání se promývá velkým přebytkem destilované vody; a to první 2 až 3 cykly po dobu 30 min, a následně zbylé cykly po dobu asi 60 až 120 min. Po ukončení každého cyklu se destilovaná voda vždy vymění za čerstvou. Takto promyté vzorky tkáně se slíjí a vloží do 0,1 hmotn. % vodného roztoku dodecylsulfátu sodného (SDS) o objemu v závislosti na množství tkáně 2 až 3 l, a ponechají se v něm za stálého míchání při pokojové teplotě po dobu 18 až 24 h. Následně je vodný roztok dodecylsulfátu sodného slit a vzorky tkáně se důkladně opět promyjí destilovanou vodou. Takto promyté vzorky jsou následně vloženy do roztoku benzonázy nukleázy v kyselině trischlorovodíkové (20 až 50 U/ml), v závislosti na množství tkáně o objemu 1 až 2 l a za stálého míchání se ponechají při pokojové teplotě opět po dobu 12 h. Poté se vzorky opět slíjí a po dobu 24 h promývají při pokojové teplotě ve 3 až 5 cyklech destilovanou vodou. Po každém cyklu se voda vždy mění za čerstvou. Poté následuje po dobu 60 až 120 min při pokojové teplotě konečné promytí pomocí sterilního fosfátového pufru (PBS). Poté se vzorky důkladně slíjí a zamrazí postupně při -20 °C a následně -80 °C. S výhodou následuje lyofilizace vzorků po dobu 72 hodin při teplotě v rozmezí -40 až -50 °C a tlaku v rozmezí 0,1 až 10 hPa a zpracování na požadovanou velikost a formu. Nakonec se vzorky sterilizují pomocí etylenoxidu a uskladní za sterilních podmínek při -80 °C.

S výhodou přípravek podle technického řešení obsahuje méně než 0,00001 hmotn. % SDS. Dále s výhodou přípravek podle technického řešení obsahuje méně než méně než 20,0 ng buněčné DNA/mg přípravku podle technického řešení.

Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1

Přípravek podle technického řešení byl vyroben následujícím způsobem: Nejprve byla na základě souhlasu pacienta v autorizovaném odběrovém místě odebrána tkáň pupečníku, která byla následně uložena na led a přepravena do místa zpracování.

Poté byla tkáň několikrát důkladně omyta destilovanou vodou pro odstranění krve a dalších tělních tekutin a následně omyta roztokem s obsahem antibiotik. Následně byla tkáň zpracována ihned, nebo v případě pozdějšího zpracování tkáně, byla tkáň uskladněna v -80 °C.

V rámci zpracování tkáně byla tkáň nejprve nakrájena/rozmělněna na kousky o velikosti cca 1 x 1 až 1 x 2 cm a poté opět důkladně promyta destilovanou vodou v 5 cyklech, kdy byla tkáň vložena do odpovídající skleněné nádoby a za stálého intenzivního míchání promývá velkým přebytkem destilované vody; a to první 3 cykly po dobu 30 min, a následně zbylé cykly po dobu cca 120 min. Po ukončení každého cyklu byla destilovaná voda vždy vyměněna za čerstvou. Takto promyté vzorky tkáně byly slity a vloženy do 0,1 hmotn. % vodného roztoku dodecylsulfátu sodného o objemu 2 l, a ponechána v něm za stálého míchání při pokojové teplotě po dobu 24 h. Následně byly vzorky tkáně slity, promyty 2x destilovanou vodou a vloženy do roztoku benzonázy nukleázy v trisHCl o koncentraci 50 U/ml a objemu 1 l a za stálého míchání ponechány při pokojové teplotě po dobu 12 h. Poté byly vzorky opět slity a po dobu 24 h promývány při pokojové teplotě ve 5 cyklech destilovanou vodou. Po každém cyklu byla voda vždy měněna za čerstvou. Poté následovalo po dobu 120 min při pokojové teplotě konečné promytí pomocí sterilního fosfátového pufru (PBS). Poté byly vzorky důkladně slity a zamrazeny postupně při -20 °C a následně -80 °C. Následovala lyofilizace vzorků při -45 °C a 5 hPa a následné zpracování do podoby prášku o velikosti částic v rozmezí 0,1 až 1 mm. Finálním zpracováním vzorků byla jejich sterilizace pomocí etylenoxidu a uskladnění za sterilních podmínek při -80 °C.

Příklad 2

Pro výrobu přípravku byl podle technického řešení použita zůstatková tkáň lidského pupečníku, která byla nejprve využita pro izolaci buněk. U tohoto materiálu bylo nejprve slito všechno
5 kultivační médium a materiál byl přemístěn z kultivačních lahví do vhodné nádoby a důkladně
promyt pomocí velkého přebytku destilované vody. Poté následovali další 3 cykly promývání
destilovanou vodou za stálého míchání po dobu cca 120 min. Po ukončení každého cyklu byla
destilovaná voda vyměněna vždy za čerstvou. Po ukončení promývání destilovanou vodou byl
následný postup decelularizace a finálního zpracování shodný s postupem v Příkladu 1.

10

NÁROKY NA OCHRANU

1. Biokompatibilní přípravek, **vyznačující se tím**, že zahrnuje decelularizovanou tkáň pupečníku, která obsahuje 1 až 99,5 hmotn. % kolagenní složky a 0,5 až 20 hmotn. % nekolagenní složky.
- 5 2. Přípravek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že kolagenní složka je vybrána ze skupiny obsahující kolagen typu I, III, IV, V, VI, VII, XII a/nebo jejich směs, s výhodou obsahuje kolagen typu I a/nebo kolagen typu III.
3. Přípravek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že nekolagenní složka je vybrána ze skupiny obsahující elastin, růstové faktory z rodiny inzulinu podobných růstových faktorů, růstové faktory z rodiny fibroblastových růstových faktorů, glykosaminoglykany nebo jejich směs, fibrinogen, fibronectin nebo jejich směs.
- 10 4. Přípravek podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že glykosaminoglykany jsou vybrány ze skupiny obsahující chondroitin sulfát, keratansulfát, heparansulfát, kyselinu hyaluronovou a/nebo jejich směs.
- 15 5. Přípravek podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že obsah glykosaminoglykanů je v rozsahu 0,1 hmotn. % až 10 hmotn. %.
6. Přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že obsah kyseliny hyaluronové je alespoň 0,01 hmotn. %.