SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

(22) Dátum podania prihlášky: **12. 4. 2002**
(31) Číslo prioritnej prihlášky: **60/283 253**
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: **12. 4. 2001**
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: **US**
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **7. 7. 2004**
Vestník ÚPV SR č.: **7/2004**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **PCT/US02/11497**
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT: **WO02/083878**

(11), (21) Číslo dokumentu:

1389-2003

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7] :

C12N 5/00

(71) Prihlasovateľ: **Verigen Transplantation Service International (VTSI) AG, Leverkusen, DE;**

(72) Pôvodca: **Giannetti Bruno M, Bonn, DE;**
Asculai Samuel S, Toronto, Ontario, CA;
Idouraine Ahmed, Chandler, AZ, US;

(74) Zástupca: **Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;**

(54) Názov: **Spôsob autológnej transplantácie**

(57) Anotácia:
Sú opísané rôzne nosné lôžka, ku ktorým môžu priľnúť bunky a množiť sa. Také nosné lôžka sú užitočné ako implantáty do poraneného miesta a podporujú hojenie a regeneráciu poškodeného tkaniva. Ďalej je opísaný výrobok zahrnujúci membránu, ktorá má aspoň jednu vrstvu s pórovitým povrchom a tiež zahrnuje submukózne črevné tkanivo a bunky, ktoré k tejto vrstve priľnuli, predovšetkým zahrnujú chondrocytové bunky.

SK 1389-2003 A3

Prostriedok autológnej transplantácie

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka transplantácie chondrocytových buniek, štepov kosti a chrupky, hojenia, liečenia kĺbu a prevencie patologickej artritídy. Predložený vynález sa hlavne týka nových spôsobov a nástrojov pre transplantáciu chondrocytových buniek a regeneráciu chrupky.

Doterajší stav techniky

V USA sa ročne uskutoční viacej ako 500.000 artroplastických operácií a totálnych kĺbových náhrad. Približne rovnaký počet podobných operácií sa uskutoční v Európe. Do toho za zahrnuje asi 90.000 totálnych náhrad kolenného kĺbu a okolo 50.000 operácií chýb kolena (A. Praemer, S. Fumer, D. P. Rice: *Musculoskeletal conditions in the United States*, Park Ridge, III.: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1992, 125). Najprospešnejší by bol spôsob regeneračnej liečby chrupky a mohol by sa robiť v počiatočnom štádiu poškodenia kĺbu, a tým znížiť počet pacientov, ktorý potrebujú operáciu umelej kĺbovej náhrady. Pomocou takýchto preventívnych spôsobov liečby by sa tiež znížil počet pacientov s rozvinutou osteoartritídou.

Techniky používané pre vyhladenie povrchu štruktúry chrupky v kĺboch sa hlavne pokúšajú o vyvolanie reparácie chrupky s použitím subchondrálneho vŕtania, obrusovania a ďalších spôsobov, pomocou ktorých sa chorá chrupka a subchondrálna kosť odstráni a ponechá sa vaskularizovaná hubovitá kosť odkrytá (J. Insall: *Clin. Orhop.* 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) opísali techniku pre kultiváciu buniek, ktoré syntetizujú chrupku, z kuracích embryonálnych prvotných článkov. Neskoršie použili Cahn a Lasher (*PNAS USA*, 1967, **58**, 1131) tento systém pre analýzu účasti DNA syntézy ako nezbytného predpokladu pre chrupkovú diferenciáciu. Chondrocyty odpovedajú tak na EGF, ako aj FGF rastom (Gospodarowicz a Mescher: *J. Cell Physiology*, 1977, **93**, 117), ale nakoniec strácajú svoju diferenciačnú funkciu (Benya a spol.: *Cell*, 1978, **15**, 1313). Opísali sa spôsoby rastu chondrocytov a principiálne sa s menšími úpravami používajú tak, ako ich opísali M. Brittberg a spol. (M. Brittberg a spol.: *New Engl. J. Med.* 1994, **331**, 889). Bunky vypestované týmito spôsobmi sa použili ako autológne transplantáty do kolenových kĺbov pacientov. Kolettas a spol. naviac preskúmali expresiu pre chrupku špecifických molekúl, ako sú kolagény a proteoglykány, pri dlhodobej kultivácii buniek. Zistili, že napriek morfologickým zmenám počas kultivácie v kultúrach s jednou vrstvou (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), keď sa porovnali s kultúrami rastúcimi v suspenzii na géloch agarózy, alginátových lôžkach alebo ako spinérové kultúry (zachovávajúce si sférickú morfológiu bunky), sa exprimované markéry, napríklad kolagény typov II a IX a veľké agregujúce proteoglykány, agrekán, versikán a väzobný proteín nezmenili (E. Kolettas a spol.: *J. Cell Science*, 1995, **108**, 1991).

Artikulárne chondrocyty sú špecializované bunky odvodené z mezenchýmu, ktoré sa nachádzajú výlučne v chrupke. Chrupka je avaskulárné tkanivo, ktorého fyzikálne vlastnosti závisia na extracelulárnom matrixe produkovanom chondrocytmi. Behom

endochondrálnej osifikácie chondrocyty dozrievajú, čo vedie k bunkovej hypertrofii, charakterizovanej začiatkom expresie kolagénu typu X (W. B. Upholt a R. R. Olsen v: *Cartilage Molecular Aspects* (editori: 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).

Napriek pokrokom v kultivácii chondrocytov a v nápravách kosti a chrupky, nedosiahlo sa väčšieho úspechu pri pokusoch transplantovať chrupku alebo chondrocyty, aby sa opravili povrchy spojovacích kĺbov. Poznatky súčasného vynálezu zaisťujú faktické a účinné prostriedky zavedenia transplantácie chrupky a/alebo chondrocytov do poruchy v spojovacom kĺbe, pomocou ktorých sa chrupka regeneruje a porucha sa opraví.

Podstata vynálezu

Stručný súhrn vynálezu

Predmetom predloženého vynálezu je v jednom uskutočnení implantabilný výrobok, implantát, zahrnujúci podpornú živnú pôdu, alebo lôžko, ktoré dokáže podporovať rast buniek a ich väzbu k pôde alebo lôžku a spôsob implantácie takého implantabilného výrobku, aby sa bunky na implantovanom mieste regenerovali. Predmetom predloženého vynálezu je v jednom uskutočnení spôsob účinného liečenia povrchu chrupky kĺbového spojenia u zvierat pomocou transplantácie implantátu obsahujúceho chondrocytové bunky zadržané v podpornej živnej pôde, ktorá je schopná sa absorbovať.

V jednom uskutočnení sa chondrocytové bunky zadržujú len na okraji lôžka. V jednom uskutočnení je podpornou živnou

pôdou kryciehо lôžko pripravené z kolagénu a chondrocytové bunky sú autológne alebo homológne. V inom uskutočnení sa podporná živná pôda pripravuje z kolagénu a elastínu alebo z kolagénu a z jedného alebo viacerých ďalších materiálov schopných resorpcie. V ďalšom uskutočnení sa podporná živná pôda pripravuje zo submukózy tenkého čreva živočíšneho pôvodu.

V ďalšom uskutočnení sa podporné lôžko pripravuje z perikardu. V odlišnom uskutočnení sa podporné lôžko pripravuje z kolagénu a z jedného alebo viacerých ďalších materiálov na báze polyesterov.

Implantát sa na transplantovanom mieste výhodne upevňuje pomocou lepiacich alebo mechanických upevňovacích prostriedkov. Predmetom predloženého vynálezu je tiež nástroj pre umiestenie a manipuláciu s implantátom do miesta implantácie a príchytiek pre zaistenie implantátu k miestu implantácie.

Predmetom predloženého vynálezu je tiež implantabilný výrobok pre reparáciu chrupky u zvierat, ktorý obsahuje chondrocytové bunky zadržané na podpornej živnej pôde schopnej resorpcie a spôsob jeho výroby.

V ďalšom uskutočnení je predmetom predloženého vynálezu spôsob liečenia povrchu chrupky artikulárneho spojenia zahrnujúci umiestenie chondrocytov na povrch, ktorý sa má liečiť, a prikrytie povrchu, aby sa liečil pomocou krycieho lôžka. Krycie lôžko sa pripevní k oblasti chrupky obklopujúcej poruchu.

Podrobný opis vynálezu

Predmetom predloženého vynálezu je podľa jedného uskutočnenia použitie určitých produktov, ktoré inhibujú

tvorbu vaskulárnej tkaniny, napríklad takej, ako sú kapilárne vlásočnice vystupujúce do chrupky, ktorá sa vytvorila v priebehu procesu autológnej transplantácie chondrocytov do defektov v chrupke. Také produkty sú prospešné pri reparácii defektov chrupky v kostiach, kde sa defekty rozširujú do subchondrálnej vrstvy alebo pod ňu, občas nazývanými ako defekty cez celú hrúbku. Tvorba vaskulárneho tkaniva z kosti, ktorá leží pod chrupkou, bude mať tendenciu vystupovať do novej chrupky, ktorá sa má vytvoriť, čo vedie k objaveniu sa iných buniek, ako sú požadované mezenchymálne bunky špecializovaných chondrocytov.

Kontaminujúce bunky zavedené vaskularizáciou môžu spôsobiť zasahovanie a nadmerné prerastanie do chrupky, ktorá sa má vytvoriť pomocou implantovaných chondrocytov. Jeden z typov komerčných výrobkov, ktorý sa môže použiť v tomto vynáleze je Surgicel® (Ethicon Ltd, UK), ktorý sa absorbuje po 7 až 14 dňoch. Je to pravý opak k zvyčajnému použitiu hemostatického prostriedku, ako je Surgicel®, ako sa opisuje v priloženej inzercii výrobku firmou Ethicon Ltd.

Prekvapivo sme zistili, že v situácii, keď sa žiada potláčanie re-vaskularizácie chrupky, je možné použiť hemostatický materiál, a ten bude pôsobiť ako gélu podobný umelý koagulát. Obr. 1C znázorňuje takú hemostatickú bariéru 1, ktorá sa môže použiť k tomu, aby inhibovala re-vaskularizáciu poruchy chrupky. Pokiaľ by boli v defekte cez celú hrúbku prítomné červené krvinky v artikulárnej chrupke, ktorá je prikrytá takou hemostatickou bariérou, tieto červené krvinky by sa chemicky zmenili na hematín a preto nebudú schopné indukovať vaskulárny rast.

Hemostatický produkt použitý ako inhibujúca bariéra pre opätovnú vaskularizáciu, ako je napríklad Surgicel®, ktorý

obsahuje alebo neobsahuje fibrínové lepidlá, je preto účinný pre predpokladaný spôsob zamýšľaný týmto vynálezom. V inom aspekte tohto vynálezu sa živná pôda, napríklad živná pôda bez buniek alebo iná živná pôda, ktorá sa popisuje nižšie, používa ako náplasť prikrývajúca defektnú oblasť kĺbu alebo sa vkladá do tejto oblasti, do ktorej sa majú kultivované chondrocyty transplantovať s použitím napríklad autológnych chondrocytov pre transplantáciu. V predloženom vynáleze sa môžu pre hojenie defektu chrupky ďalej použiť alogénne alebo xenogénne chondrocyty. Obr. 2 znázorňuje podpornú živnú pôdu 2, ktorá sa môže použiť ako náplasť k prikrytiu defektnej oblasti a obr. 3B zobrazuje lokalizáciu defektu chrupky 18.

V jednom uskutočnení sú preto predmetom tohto vynálezu spôsoby účinnej reparácie alebo liečenia defektov chrupky na povrchoch artikulárneho spojenia kostí, ktoré zahrnuje dodanie činidla alebo prostriedku, aby sa zabránilo vaskulárnej invázii do miesta v chrupke, ktoré sa má reparovať, a tiež je predmetom živná pôda, ktorá izoluje reparované miesto a udržuje transplantované bunky na správnom mieste. Predmetom predloženého vynálezu je tiež súprava, ktorá obsahuje voliteľnú hemostatickú zložku pre vloženie do miesta, ktoré sa má reparovať, takú, ktorá je účinnou inhibíciou vaskularizácie do miesta, ktoré sa má reparovať; a akonáhle sa chondrocyty, ktoré sa majú transplantovať, vložia do miesta, ktoré sa má reparovať, živná pôda 2 prikryje reparované miesto tak, že sa chondrocyty držia na správnom mieste, ale majú stále zaistený prístup k živinám.

Konkrétne stránky vynálezu sa doložili príkladmi, v ktorých sa použil *in vitro* systém pre štúdium chovania chondrocytov pri kontakte s určitým výrobkom alebo kombináciou určitých výrobkov, ktoré budú inhibovať tvorbu vaskulárneho tkaniva. Toto testovanie *in vitro* predpovedá schopnosť

určitých testovaných materiálov, že v nich dôjde k podpore rastu chondrocytovej bunky, testuje živné pôdy pre použitie ako implantátov, v ktorých sa udržia chondrocyty, a testuje schopnosť každého lôžka inhibovať vaskularizácie, ako sa to stane *in vivo*, kde kapilárne slučky prečnievajúce do chrupky vzniknú v priebehu procesu autológnej transplantácie chondrocytov do defektu v chrupke.

Vhodné hemostatické výroby sa budú charakterizovať ich schopnosťou inhibovať rast alebo inváziu vaskulárnej tkaniny, osteocytov, fibroblastov atd. do novo vznikajúcej chrupky. Vhodný hemostatický materiál naplní ciele spôsobov predloženého vynálezu, keď sa zabráni vaskulárnej a bunkovej invázii do rozvíjajúcej sa chrupky, aby sa optimalizovala tvorba chrupky a dosiahlo sa reparácie cez celú hrúbku akýchkoľvek porúch v artikulárnej chrupke. Hemostatická bariéra bude pokiaľ možno stála po dosť dlhý čas, ktorý postačuje na to, aby sa umožnila celková reparácia chrupky a aby sa potom táto bariéra bola schopná časom absorbovať alebo ináč odbúrať. Jeden materiál, u ktorého sa našli tieto vlastnosti, sa nazýva Surgicel® W1912 (skupina GG3DH, Ethicon Ltd. UK), a má hemostatické vlastnosti, ako oxidovaná, regenerovaná, sterilná celulóza.

Predmet predloženého vynálezu tiež zahrnuje implantabilný výrobok pre reparáciu chrupky, spôsob a zariadenie pre takýto implantabilný výrobok. Implantabilný výrobok zahrnuje podpornú živnú pôdu a autológne alebo homológne chondrocytové bunky v nej uchovávané.

V jednom uskutočnení sú chondrocytové bunky zachytené len na jednom alebo viacerých okrajoch alebo vrstvách živného lôžka. Podporná živná pôda je všeobecne materiál, ktorý bude podporovať rast chondrocytových buniek a ktorý sa časom

absorbuje v tele pacienta, príjemcu implantátu. Transplantácia sa môže uskutočniť artroskopickou minimálne inváznou technikou alebo technikami otvorenej operácie. Spôsob vynálezu tiež počíta s použitím vhodných alogénnych a xenogénnych chondrocytových buniek pre reparáciu poruchy chrupky.

Taký implantabilný výrobok sa znázorňuje na obr. 4. Implantabilný výrobok 20 konkrétnejšie zahrnuje podpornú živnú pôdu 22, v ktorej sa uchovávajú chondrocytové bunky 24. Vhodnou podpornou živnou pôdou 22 je pevný alebo gélový skelet, ktorý charakterizuje schopnosť udržať si stabilný tvar v čase, v ktorom sa umožní, aby v ňom rástli chondrocytové bunky, tak pred transplantáciou, ako aj po nej, a ktorý poskytuje systém podobný prirodzenému prostrediu pre chondrocytové bunky, aby sa optimalizovala diferenciácia rastu chondrocytových buniek.

Podporná živná pôda 22 bude stabilná počas časového úseku postačujúceho k úplnej reparácii chrupky a potom ju časom, napríklad v priebehu troch mesiacov, telo absorbuje bez toho, aby po nej zostali akékoľvek významné stopy a bez toho, aby sa vytvorili toxické degradačné produkty. Výrazom „absorbovať" sa myslí, že zahrnuje procesy, pomocou ktorých sa podporná živná pôda rozpadne prirodzenými biologickými procesmi a rozpadlá podporná živná pôda a jej degradačné produkty sa vylúčia, napríklad lymfatickými alebo krvnými cievami.

Podporná živná pôda 22 je preto výhodne látka podobná neantigénnej membráne, ktorá je schopná sa fyziologicky absorbovať. V jednom uskutočnení má ďalej podporná živná pôda 22 výhodne formu podobnú fólii, ktorá má jednu relatívne hladkú stranu 21 a jednu relatívne drsnú stranu 23. Drsná strana 23 je obrátená k poruche chrupky 18 a podporuje rast chondrocytov dovnútra, zatiaľ čo hladká strana 21 je typicky

odvrátená od poruchy chrupky 18 a bráni zarastaniu tkaniva. V inom uskutočnení má podporná živná pôda 22 dve hladké strany s podobnou pórovitosťou.

V jednom uskutočnení sa podporná živná pôda 22 vytvára z polypeptidov alebo proteínov. Polypeptidy alebo proteíny sa výhodne získavajú z prírodných zdrojov, napr. z cicavcov. Pre vytvorenie podpornej živnej pôdy 22 sa však tiež môžu použiť umelé materiály, ktoré majú porovnateľné fyzikálne a chemické vlastnosti s polypeptidmi alebo proteínmi z prírodných zdrojov. Tiež je výhodné, aby sa podporná živná pôda 22 vratne tvarovala pritom ako s ňou užívateľ manipuluje tak, že s implantátom 20 sa môže manipulovať a potom sa vráti k svojmu pôvodnému tvaru, ako sa opisuje nižšie v jednom z aspektov predloženého vynálezu.

Výhodným materiálom, z ktorého sa vytvára podporná živná pôda je kolagén, napríklad získaný z koní, prasiat, hovädzieho dobytka, oviec alebo kurčiat.

Vhodné materiály, z ktorých sa môže podporná živná pôda 22 vytvoriť, zahrnujú ChondroCell® (komerčne dostupná živná pôda kolagénu typu II, Ed. Geistlich Sohne, Švajčiarsko) a Chondro-Gide® (komerčne dostupná živná pôda kolagénu typu I, Ed. Geistlich Sohne, Švajčiarsko). Podporná živná pôda 22 vytvorená z kolagénu typu I je trochu tuhšia ako podporná živná pôda vytvorená z kolagénu typu II, hoci živné pôdy s kolagénom typu II sa môžu tiež používať. Ďalším výhodným materiálom, z ktorého sa podporná živná pôda vytvára, je zosieťovaná a nezosieťovaná forma Permakolu™ (Tissue Science Laboratories, UK).

Kolagén sa ináč získava z morskej huby, ako sa opisuje v práci Swatschek a spol.: *Eur. J. of Pharmaceutics and*

Biopharmaceutics, 2002, **53**, 107-113 a v austrálskej patentovej prihláške č. AU 3741701. Stručne povedané sa kolagén izoluje z morskej huby niekoľkým premytím huby vodou, rozdrvením a homogenizáciou hubového tkaniva, spracovaním roztoku s vysokými koncentráciami močoviny, odstredením vzniklého roztoku a vyzrážaním kolagénu zo supernatantu.

Vyššie opísaný implantabilný výrobok sa napríklad môže pripraviť pomocou kultivácie chondrocytových buniek v tejto živnej pôde, ako sa detailnejšie opisuje nižšie.

Pre prípravu autológneho implantátu sa najskôr chrupková biopsia odoberie artroskopickou technikou z nezaťažovanej oblasti kĺbu pacienta a prenesie sa do laboratória v živnom roztoku obsahujúcom 20 % fetálneho teľacieho séra.

Chrupková biopsia sa potom zmieša s enzýmom, napríklad trypsínetyléndiamíntetraoctovou kyselinou (EDTA), proteolytickým enzýmom a spojivovým činidlom, aby sa izolovali a extrahovali chondrocytové bunky chrupky. Extrahované chondrocytové bunky sa potom kultivujú v živnom roztoku z počiatočného počtu buniek okolo 50.000 do konečného počtu asi 20 miliónov chondrocytových buniek alebo viacej.

Tri (3) dni pred re-implantáciou sa živný roztok zamení za transplantačný roztok, ktorý obsahuje 10 % autológne sérum (to je sérum extrahované z pacientovej krvi, ako sa opisuje nižšie). Kultivované chondrocytové bunky v transplantačnom roztoku sa nechajú vsiaknuť a prenikajú do jednej alebo viacerých vrstiev podpornej živnej pôdy 22 a ich množenie pokračuje, aby sa vytvoril implantát 20. Chondrocytové bunky výhodne priľnú len k jednému okraju vonkajšej vrstvy podpornej živnej pôdy 22. Implantát 20 sa potom implantuje pacientovi na miesto poruchy chrupky 18.

Je pochopiteľné, že poruchu alebo poranenie 18 sa môže priamo ošetriť, malinko zväčšiť alebo odstrániť operačným postupom pred implantáciou tak, ako sa opisuje v US patentovej prihláške č. 09/320,246, aby sa prispôsobila implantátu 20. Spôsob kultivácie, ako aj živné a transplantačné roztoky sa detailne opisujú nižšie vo forme príkladov uskutočnenia vynálezu, počínajúc najskôr opisom laboratórneho postupu spracovania odobratej chrupkovej biopsie a kultiváciou chondrocytových buniek, v súlade s predloženým vynálezom.

Kultivačné roztoky (ďalej „živné roztoky"), použité pre zachádzanie s chrupkovou biopsiou behom kultivačného procesu a pre rast chondrocytových buniek chrupky, sa pripravia zmiešaním 2,5 mL sulfátu gentomycínu (koncentrácia 70 mikromolov/liter), 4,0 mL amfotericínu (koncentrácia 2,2 mikromolu/liter; obchodná značka Fungizone®, fungicíd dostupný od fy Squibb), 15 mL kyseliny *L*-askorbovej (300 mikromolov/liter), 100 mL fetálneho teľacieho séra (konečná koncentrácia 20 %) a doplní sa roztokom DMEM/F13, aby sa pripravilo 400 mL živného roztoku. (Rovnaký živný roztok sa tiež používa k prenosu chrupkovej biopsie z nemocnice do laboratória, kde sa chondrocyty extrahujú a množia.)

Krv získaná od pacienta sa odstredí pri približne 3000 otáčkach za minútu, aby sa oddelilo krvné sérum od iných zložiek krvi. Oddelené krvné sérum sa uloží a použije sa v neskoršom štádiu kultivačného postupu a pri transplantácii.

Biopsia chrupky, ktorá sa skôr získala od pacienta pre autológnu transplantáciu, sa pošle vo vyššie opísanom živnom roztoku do laboratória, kde sa bude kultivovať. V laboratóriu sa oddelí biopsia chrupky dekantáciou od živného roztoku a ten sa vyleje. Biopsia chrupky sa potom aspoň trikrát premyje čistým DMEM/F12, aby sa odstránil film fetálneho teľacieho

séra z povrchu chrupkovej biopsie.

Biopsia chrupky sa potom premyje vo zmesi, ktorá obsahuje vyššie opísaný živný roztok, do ktorého sa pridalo 28 mL trypsínovej EDTA (koncentrácia 0,06 %). V tejto zmesi sa inkubuje päť až desať minút pri 37 °C a v atmosfére s 5 % CO_2. Po inkubácii sa biopsia chrupky premyje dvakrát až trikrát v živnom roztoku, aby sa biopsia omyla od enzýmu trypsínu. Chrupka sa potom zváži. Minimálne množstvo chrupky, typicky požadované pre rast chondrocytov, je asi 80-100 mg. Výhodnejšie je trochu väčšie množstvo, tak asi 200 až 300 mg. Po zvážení sa chrupka vloží do zmesi 2 mL kolagenázy (ktorá trávi enzým; koncentrácia 5000 enzýmových jednotiek) s približne 50 mL čistého roztoku DMEM/F12, a rozdrví sa, aby enzým čiastočne natrávil chrupku. Po rozdrvení sa chrupka prevedie lievikom do banky a pridá sa k nej asi 50 mL kolagenázy a čistej zmesi DMEM/F12. Rozdrvená chrupka sa potom 17 až 21 hodín inkubuje pri 37 °C a v atmosfére s 5 % CO_2.

V jednom uskutočnení sa potom rozdrvená inkubovaná chrupka scedí cez 40 µm sito, odstredí sa (pri 1054 otáčkach za minútu, alebo 200 násobku g) behom 10 minút a premyje sa dvakrát živným roztokom. Potom sa chondrocytové bunky spočítajú, aby sa určila ich schopnosť rastu, po čom sa chondrocytové bunky inkubujú v živnom roztoku aspoň dva týždne pri 37 °C a v atmosfére s 5 % CO_2, pričom sa v priebehu tohto času živný roztok vymení tri až štyrikrát.

Najmenej tri dni pred re-implantáciou pacientovi sa chondrocytové bunky odstránia zo živného roztoku pomocou trypsinizácie a odstreďovania a prevedú sa do transplantačného roztoku obsahujúceho 1,25 mL gentamycín-sulfátu (koncentrácia 70 mikromolov/liter), 2,0 mL amfotericínu (koncentrácia 2,2 mikromoly/liter; obchodná značka Fungizone®, fungicíd dostupný

od fy Squibb), 7,5 mL kyseliny *L*-askorbovej (300 mikromolov/liter), 25 mL autológneho krvného séra (konečná koncentrácia 10 %) a doplní sa roztokom DMEM/F12, aby sa pripravilo asi 300 mL transplantačného roztoku.

Podporná živná pôda 22 sa potom oreže na vhodný rozmer pre dno jamky platničky NUNCLON™ pre kultiváciu buniek a potom sa za aseptických podmienok položí na dno jamky s 1-2 mL transplantačného roztoku. Dostatočný počet kultivovaných chondrocytových buniek chrupky (napr. 3-10 miliónov chondrocytových buniek) v približne 5-10 mL transplantačného roztoku sa potom nasiakne do podpornej živnej pôdy 22 a inkubáciou počas približne 72 hodín pri 37 °C a v atmosfére s 5 % CO_2 sa bunky chondrocytov nechajú ďalej rásť. V priebehu tejto inkubácie sa chondrocytové bunky poskladajú do chumľov a priľnú k podpornej živnej pôde 22. V jednom uskutočnení chondrocytové bunky priľnú len k jednej vonkajšej vrstve jednej strany podpornej živnej pôdy 22. Použitím tohoto spôsobu sa zistilo, že podporná živná pôda 22 podporuje rast a zadržuje v sebe dostatočný počet chondrocytových buniek, aby vytvorila implantát 20, bez významnej straty biomechanických vlastností podpornej živnej pôdy 22. Podporná živná pôda 22 tiež poskytuje prostredie pre podporu nepretržitého rastu chndrocytových buniek po implantácii implantátu 20 na miesto defektu chrupky 18.

V inom uskutočnení sa po 17 až 21 hodinovej inkubácii a po určeniu počtu buniek a ich životaschopnosti, ako sa diskutuje vyššie, chondrocytové bunky prevedú do transplantačného roztoku a potom aspoň dva týždne rastú priamo na podpornej živnej pôde 22, ako sa opisuje vyššie.

Zistilo sa, že implantát 20 sa môže prechodne deformovať bez mechanického poškodenia alebo bez straty chondrocytových

buniek, ktoré priľnuli k podpornej živnej pôde 22. Táto deformácia je vonkoncom reverzibílna akonáhle sa implantát 20 raz zavedie do kĺbu alebo sa položí na povrch, ktorý sa má ošetriť, ako sa opisuje nižšie.

Podľa toho a v súlade s ďalším aspektom predloženého vynálezu, sa môže podporná živná pôda 22, na ktorej chondrocytové bunky rastú alebo na ktorú sa vložili v dostatočnom počte, prechodne deformovať spôsobom, ktorý dovoľuje jej zavedenie do pracovného zariadenia artroskopu, bez toho, aby sa mechanicky zničila alebo bez toho, aby došlo k strate chondrocytových buniek na ňu vložených.

Súčasne sa zistilo, že sa táto podporná živná pôda môže upevniť k miestu poruchy chrupky priľnavými alebo mechanickými upevňovacími prostriedkami bez toho, aby sa narušila ďalšia diferenciácia chondrocytov *in situ* a regenerácia prirodzeného materiálu chrupkového lôžka.

Ďalšie aspekty predloženého vynálezu zahrnujú nástroje pre vloženie implantátu 20 na implantačné miesto a mechanický upevňovací prostriedok, aby sa implantát 20 udržal na mieste implantácie.

V jednom uskutočnení predloženého vynálezu sa implantačný postup robí pomocou artroskopickej techniky. Obr. 5 ukazuje, ako sa môže implantát 20 zvinúť po celej dĺžke jeho priemeru, aby sa vytvoril špirálový valcový transplantát tak, že sa implantát 20 môže dopraviť na miesto implantácie cez pracovný kanálik 32 artroskopického zavádzacieho zariadenie 30. Vhodné artroskopické zavádzacie zariadenie sa znázorňuje na obr. 6.

Artroskopické zavádzacie zariadenie 30 na obr. 6 zahrnuje pracovný kanálček 32, ktorý má vhodnú dĺžku 35 a priemer 31

pre preniknutie do daného kĺbu a pre dopravenie implantátu 20 s požadovaným rozmerom. Pre väčšinu postupov je napríklad priemer 31 pracovného kanálčeka 32 približne 8 až 20 mm a dĺžka 35 je približne 30 až 60 cm. Vo vnútri je pozdĺž, vzhľadom k pracovnému kanálčeku 32, pohyblivý injekčný kanálček 34 s vyťahovacou a vymeniteľnou ihlou 36. Injekčný kanálček 34 sa pripojuje k rúčke 38, ktorá je teleskopicky vyťahovacia, aspoň sčasti, do pracovného kanálčeka 32. Ihla 36 predlžuje dĺžku injekčného kanálčeka 34 a umožňuje, aby sa cez ňu pretlačili kvapaliny do miesta implantácie. Injekčný kanálček 34 sa pohybuje vo vnútri pracovného kanálčeka 32 pomocou teleskopicky sa pohybujúcej rúčky 38 k implantačnému miestu alebo od neho.

Zavádzacie zariadenie 30 tiež zahrnuje čiapočku, zvon 40 z gumy alebo z iného vhodného materiálu, ktorá sa klzne nasádza na zavádzacie zariadenie 30. Pri použití obklopí zvon 40 miesto poruchy chrupky a nevpustí kvapaliny, napríklad krv a ďalšie prirodzené tekutiny, aby pritekali do miesta poruchy chrupky. Zavádzacie zariadenie 30 má tiež dva alebo viacej smerom von vychýlených prídržných prvkov 42, pripojených k rúčke 38, pre držanie, zavedenie a vloženie implantátu 20 do implantačného miesta. Ako sa pri použití rúčka 38 teleskopicky pohybuje smerom k užívateľovi alebo od neho, prídržné prvky 42 sa zaťahujú dovnútra pracovného kanálčeka 32 a pohybujú sa jeden k druhému prídržným spôsobom (zatiaľ čo sa rúčka 38 pohybuje smerom k užívateľovi) a smerom jeden od druhého uvoľňujú zovretie (zatiaľ čo sa rúčka 38 pohybuje smerom od užívateľa). Taký teleskopický pohyb sa môže ovládať šikmým prvkom (ktorý nie je znázornený na obrázku) umiesteným vo vnútri rúčky 38, ktorý umožňuje injekčnému kanálčeku 34 a prídržným prvkom 42, aby sa klzne vysúvali a zaťahovali vo vnútri pracovného kanálčeka 32.

Obrázky 7 až 9 znázorňujú typický artroskopický postup implantácie implantátu 22 na takom mieste implantácie, akým je kĺb kolena 10. Defektná chrupka 18 sa z miesta poruchy odstráni, výhodne do hĺbky nad subchondrálnu vrstvu 44, čím vznikne jamka 46 (viď obr. 8 a 9). Po odstránení defektnej chrupky 18 je miesto poruchy pripravené pre vloženie implantátu 22. Pokiaľ je subchondrálna vrstva natoľko narušená, že dochádza ku krvácaniu v mieste implantácie, môže sa miesto najskôr voliteľne prikryť akýmkoľvek materiálom, ktorý je schopný absorpcie a ktorý slúži ako hemostatická bariéra.

Príprava miesta môže ináč zahrnovať injekciu lepidla zlúčiteľného so živým tkanivom cez ihlu 36 do jamky 46. Také zlúčiteľné lepidlo s živým tkanivom, označené na obr. 8 ako lepidlo 48, môže obsahovať organické fibrínové lepidlo (napr. Tissel®, lepidlo na fibrínovom základe, Baxter, Rakúsko, alebo fibrínové lepidlo pripravené na operačnom sále s použitím vzorky autológnej krvi).

Implantát 20 sa najskôr oreže na požadovaný rozmer a zvinie do špirálovo valcovitého tvaru, ako sa znázorňuje na obr. 7, potom sa chytí do prídržných prvkov 42 a drží sa na konci artroskopického zavádzacieho zariadenia 30. Artroskopické zavádzacie zariadenie 30, ktoré pridržuje implantát 20 na svojom konci, sa potom vsunie k miestu implantácie cez prístupový kanálček 33, implantát sa uvoľní z prídržných prvkov 42 a rozvinie sa pomocou prídržných prvkov 42 alebo sa nechá rozvinúť, keď opúšťa pracovný kanálček 32. Prístupový kanálček 33 zahrnuje jeden alebo viacej kanálčekov 60, ktoré dovoľujú, aby inštrumenty, napríklad zavádzacie zariadenie 30 a pozorovacie zariadenie, mali prístup k miestu transplantácie. S použitím prídržných prvkov 42 sa s implantátom 20 manipuluje tak, že strana, ktorá nesie chondrocyty, v tomto

uskutočnení hrubá strana 23 implantátu 20, smeruje do jamky 46 a jemne sa pridržiava na mieste v jamke 46, aby umožnila lepidlu 48 stuhnúť a držať implantát 20 v jamke 46.

Ako sa ukazuje na obr. 7, je možné použiť druhý prístupový kanálček 60, ktorý má jeden alebo viacej kanálčekov, aby sa umožnil prístup inštrumentov k miestu, nápomocných pri ukladaní implanátu, lepidla a/alebo upevňovacích mechanických prostriedkov, alebo aby sa umožnil prístup pozorovacích zariadení k miestu implantácie. Taký oddelený prístupový kanálček 60 sa môže tiež použiť tak, aby splňoval jednu alebo viaceré funkcie opisované vo vzťahu k artroskopickému zavádzaciemu zariadeniu 30 alebo ďalším artroskopickým inštrumentom.

V inom uskutočnení (obr. 9) sa k upevneniu implantátu 20 v jamke 46 používajú mechanické upevňovacie prostriedky, napríklad svorky, háčky, skrutky alebo stehy, ktoré sú schopné absorpcie. Vhodné svorky 50 zahrnujú Ortho-Pin™ (komerčne dostupnú svorku z laktidového kopolyméru, Ed. Geistlich Sohne, Švajčiarsko). Obr. 10 znázorňuje jedno uskutočnenie svorky 50, ktorá je schopná absorpcie. V tomto uskutočnení svorku 50 tvorí hlava 52, intramedulárny kanál 54 vnútri osičky 56 a jeden alebo viac upevňovacích krúžkov 58. Rozmery svorky 50 sa budú meniť podľa konkrétneho použitia, ale typicky je svorka 50 asi 10-15 mm dlhá, hlava 52 má priemer asi 4 mm, intramedulárny kanálček 54 má priemer asi 1,2 mm, osička 56 má priemer približne 2 mm a upevňovacie krúžky 58 majú priemer asi 2,5 mm. Upevňovacie krúžky 58 slúžia k ukotveniu svorky 50 v zdravej chrupke, ktorá obklopuje poruchu chrupky. Svorka 50 sa vyrába z akéhokoľvek materiálu, ktorý telu nebude škodiť a je schopný sa po určitom čase absorbovať alebo sa telom ináč odbúra. Svorku 50 je napríklad možné vyrobiť z polylaktidu.

Ako predmet predloženého vynálezu sa tiež zamýšľa použitie kombinácie lepidla 48 a mechanického upevňovacieho prostriedku, napríklad svorky 50, k upevneniu implantátu 20 do jamky 46.

Ako sa naznačilo vyššie, v prípadoch, keď sa porucha chrupky 18 rozširuje do subchondrálnej vrstvy 44 alebo pod ňu, či vyžaduje odstránenie chrupky do subchondrálnej vrstvy 44 alebo pod ňu, ako znázorňujú obr. 11 a obr. 12, je možné vyššie uvedený postup modifikovať tak, aby zahrnoval vloženie hemostatickej bariéry 62 do jamky 46 pred vložením implantátu 20. U takých defektov môže lekár voliteľne použiť hemostatickú bariéru 62, aby sa inhiboval rast alebo invázia vaskulárného tkaniva, osteocytov, fibroblastov atd. do rozvíjajúcej sa chrupky. Predpokladá sa, že toto umožní vytvorenie hladkej chrupky v mieste transplantácie. Vhodné hemostatické bariéry budú inhibovať vaskularizáciu a inváziu buniek do rozvíjajúcej sa chrupky, aby sa optimalizovala tvorba chrupky a docielil sa v mieste poruchy rast chrupky cez celú hrúbku. Hemostatická bariéra je výhodne stála po dostatočne dlhý časový úsek, aby sa umožnila úplná reparácia chrupky a po tomto čase sa časom absorbuje alebo sa ináč rozloží v organizme. Vhodnou hemostatickou bariérou je Surgicel® W1912 (Ethicon, Ltd, Spojené kráľovstvo), absorbovateľný hemostat vytvorený z oxidovanej, regenerovanej, sterilnej celulózy.

Vyššie opísané chirurgické nástroje sa vyrábajú z akéhokoľvek materiálu, napríklad z kovu a/alebo plastu alebo silikónu, vhodného pre výrobu chirurgických nástrojov pre jedno alebo viacnásobné použitie.

Podporná živná pôda 22 alebo krycie lôžko 2 predloženého vynálezu sa vytvára z kolagénovej membrány, ako sa vyrába postupom opísaným v US patente č. 5,028,695 (udelenom

spoločnosti Chemokol Gesellschaft zur Entwicklung von Kollagenprodukten), ktorý sa tu zahrnuje ako odkaz. Kolagénovú membránu je možné pripraviť zo surového hovädzieho alebo bravčového kolagénového materiálu podľa tohto postupu: kolagénová surovina sa zbaví zvyškov mastných kyselín, premyje sa vodou, nechá sa reagovať v alkalickom prostredí, premyje sa vodou, nechá sa reagovať s kyselinou, premyje sa vodou, opäť sa nechá reagovať so silnou alkáliou, potom s kyselinou, čo spôsobí napučanie, nechá sa reagovať s anorganickou soľou, aby došlo k zmrašteniu, z materiálu sa vytlačí voda na suchú hmotnosť 40-50 % hmotnostných, zadržaná voda v tomto materiále sa odstráni prídavkom rozpúšťadla, keď je potrebné, tak sa materiál môže zosieťovať, a potom sa v napnutej forme suší.

Podporná živná pôda 22 alebo krycie lôžko 2 sa môžu tiež vytvoriť z membrány obsahujúcej kolagén, napríklad kolagén typu I alebo typu II a elastínu, napríklad z membrány, ktorá sa opisuje v US patente č. 5,397,353 (udelenom Oliveru a spol. z University of Dundee), ktorý sa tu zahrnuje ako odkaz. Kolagén kolagénovej/elastínovej membrány sa môže získať z koňského, bravčového, hovädzieho, ovčieho a kuracieho zdroja. V jednom uskutočnení je podporná živná pôda 22 alebo krycie lôžko 2 kolagénová/elastinová bravčová koža, ktorá prešla radom organických extrakcií, aby sa z nej odstránil tukový obsah. Len čo sa odstráni tuk, podrobia sa rezy radu enzýmových extrakcií, aby sa odstránil všetok bunkový materiál. O takom výrobku, ktorý sa pripraví v súlade s US patentom 5,397,353, sa predpokladá, že sa jedná o Permacol™ a rôzne zosieťované verzie Permacolu™.

V predloženom vynáleze sa môžu použiť ďalšie membrány podobné Permacolu™, napríklad Rapi-Seal Patch (Fusion Medical Technologies, Inc., Fremont, CA) a Tissue Repair Patch (Glycar Vascular Inc., Dallas, TX).

Kolagén/elastínová membrána môže byť až do 20 % zosieťovaná s polyizokyanátmi, výhodne s hexametyléndiizokyanátom (HMDI). Kolagén/elastínová membrána použitá ako podporná živná pôda 22 alebo ako krycie lôžko 2 môže byť vo forme fólie, ktorá má dve hladké strany a póry s rovnakou veľkosťou a textúrou.

Kolagén/elastínová membrána má výhodne nasledujúcu špecifikáciu: hrúbka 0,75 mm, dĺžka 4,8 až 5,2 cm, šírka 4,8 až 5,2 cm, obsah kolagénu väčší ako 79 % a obsah tuku 0,4 %. Na tomto lôžku sa môžu kultivovať chondrocytové bunky, aby vytvorili implantabilný výrobok, ako sa vyššie skôr opísalo. Implantabilný výrobok sa môže vložiť do miesta poruchy chrupky alebo prikryť toto miesto.

V inom uskutočnení sa podporná živná pôda 22 môže zhotoviť zo submukózy tenkého čreva (SIS - Small Intestine Submucose). Spôsob prípravy SIS zo segmentu tenkého čreva sa detailne opisuje v US patente č. 4,902,508, ktorý sa tu zahrnuje ako odkaz. Segment čreva, výhodne sa užíva črevo bravčové, ovčie alebo hovädzie, sa najskôr oškriabe pomocou pozdĺžnych stieracích pohybov, aby sa odstránili obidve vonkajšie vrstvy (obzvlášť *tunica serosa a tunica muscularis*) a vnútorné vrstvy (aspoň luminálne podiely *tunica mucosa*). Sliznica tenkého čreva sa typicky máča v soľanke a voliteľne sa skladuje v hydratovanom alebo dehydratovanom stave pred nižšie opísaným použitím. Veľké množstvo na seba položených vrstiev tkaniva sliznice tenkého čreva sa potom zlisuje, pritlačia sa jedna na druhú a vytvarujú sa, aby poskytli mnohovrstvovú prerobenú štruktúru, ako sa opisuje v US patentoch č. 5,788,625, 5,922,028 a 6,176,880 (všetky udelené DePuy Orthopaedics (Warshaw, IN)), ktoré sa tu zahrnujú ako odkaz. Mnohovrstvová štruktúra je vybavená dostatočným množstvom submukóznych vrstiev, aby vytvorila štruktúru

rekonštrukčného tkanivového implantátu s požadovanou hrúbkou pre náhradu endogénnej štruktúry chrupky.

Ďalšie SIS membrány, ktoré sú užitočné v predloženom vynáleze zahrnujú Suspend Sling™ od Mentor Corporation (Santa Barbara, CA), Staple Strips™ od Glycar Vascular, Inc. (Dallas, TX), Surgical Fabrics od Boston Scientific (Natick, MA), SurgiSIS™ Sling a SurgiSIS™ Mesh od Cook Biotech, Inc. (West Lafayette, IN), SIS Hernia Repair Device od Sentron Medical, Inc. (Cincinnati, OH) a Restor® Soft Tissue Implant od DePuy Orthopaedics.

Ďalšia membrána, ktorú je možné využiť pre podpornú živnú pôdu 22 alebo krycie lôžko 2 v súlade s predloženým vynálezom, je kolagénová membrána, ktorá je schopná resorpcie a ktorá sa opisuje v US patente č. 5,837,278 (udelenom Ed. Geistlich Sohne AG), ktorý sa tu zahrnuje ako odkaz. Táto membrána schopná resorpcie sa môže získať z prirodzene sa vyskytujúcich membrán, napríklad vrstiev kože s lícovou stranou, šliach a rozličných zvieracích membrán. Táto kolagénová membrána má vláknitú stranu, v ktorej dochádza k podpore rastu buniek, a hladkú stranu, ktorá inhibuje priľnutie buniek k nej. Membrána sa pripraví reakciou s alkáliou, aby sa zmydelnili tuky a degradovali látky citlivé na alkáliu, reakciou s kyselinou, aby sa degradovali látky citlivé na kyselinu, premytím, sušením, zbavením tukov a ak je potrebné, tak sa zosieťuje.

Ďalšie kolagénové membrány, ktoré sa môžu použiť ako podporná živná pôdu 22 alebo krycie lôžko 2 v súlade s predloženým vynálezom, zahrnujú FortaFlex™ (pripravený z kolagénu typu I) a GraftPatch® (pripravený zo zosieťovaného kolagénu) od firmy Organogenesis, Inc. (Canton, MA). V predloženom vynáleze je naviac tiež užitočný prípravok koňského kolagénu typu I Antema® od Opicrin S.p.A. (Corlo,

Itálie).

Ďalšie membrány vhodné pre použití ako podporná živná pôda 22 alebo krycie lôžko 2 zahrnujú CollaTec membránu od Colla-Tec, Inc. (Plainsboro, NJ), Collagraft od NeuColl (Campbell, CA), BioMend od Integra Life Sciences Corporation (Plansboro, 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), ktorá sa pripravuje z bravčovej kože (v podstate čistý kolagén) a BIOBAR™ od Col-Bar, Ltd. (Ramat-Hasharon, Izrael) sú tiež užitočnými materiálmi pre podpornú živnú pôdu 22 alebo krycie lôžko 2 v predloženom vynáleze.

Kolagénové membrány s usporiadanými vláknami na makromolekulárnej úrovni sú ešte naviac tiež vhodné pre použitie ako podpornej živnej pôdy 22 alebo ako krycieho lôžka 2. Také membrány sa opisujú napríklad v medzinárodnom patente s publikačným č. WO 02/09790 firiem Mediolanum Farmaceutici S.P.A. a Opocrin S.P.A..

V inom uskutočnení sa môže podporná živná pôdu 22 a/alebo krycie lôžko 2 vytvoriť z kolagénových vlákien, ktoré sa vzájomne zosieťujú cez redukujúci cukor alebo jeho derivát, ako sa napríklad zverejňuje v US patente č. 5,955,438 (udelenom ColBer R&D Ltd., Ramat-Hasharon, Izrael), ktorý sa tu vo svojej úplnosti zahrnuje ako odkaz. Také cukry môžu zahrnovať, ale nie sú tým obmedzené, ketóny alebo aldehydy monosacharidov, ribózu, glycerózu, treózu, erytrózu, lyxózu, xylózu, arabinózu, alózu, altrózu, glukózu, manózu, gulózu, idózu, galaktózu, talózu alebo akékoľvek ďalšie diózy, triózy, tetrózy, pentózy, hexózy, septózy, októzy, nanózy či dokózy a kombinácie jedného alebo viacerých týchto sacharidov. Podporná živná pôda 22 a/alebo krycie lôžko 2 môže tiež zahrnovať

antimikrobiálne látky, ktoré majú terapeutický účinok v priebehu regenerácie chrupky. Také antimikrobiálne látky zahrnujú penicilín, cefalosporíny, tetracyklíny, streptomycín, gentamicín, sulfónamidy, fungicídy, napríklad mykonazol, protizápalové látky, napríklad kortizón, a kombinácie jednej alebo viacerých týchto látok. V podpornej živnej pôde 22 sú tiež obsiahnuté faktory s tkanivovo induktívnymi vlastnosťami, napríklad fibroblastový rastový faktor, rastové faktory získané z krvných platničiek, transformačné rastové faktory, diferenciačne rastové faktory a podobne.

Ďalšie kolagénové materiály, užitočné v predloženom vynáleze, sa zverejňujú v US patentoch č. 5,256,418 a č. 5,993,844 (udelených Organogenesis, Inc.), v US patente č. 6,206,931 (udelenom Cook Biotech, Inc.) a v US patente č. 5,026,381 (udelenom Colla-Tec Inc.), ktoré sa tu všetky zahrnujú ako odkaz a ktoré môžu patriť jednému alebo viacerým tu diskutovaným produktom.

Produkty, ktoré sa doposiaľ nepredávajú v USA a ktoré sa môžu použiť ako podporná živná pôdu 22 alebo krycie lôžko 2 zahrnujú MACI-MaixR (Matricel, Herzogenrath, Nemecko), Bio-Seed C (Biotissue, Miami, FL) a VivesCart a PLA/PGA kopolyméry (IsoTis, Bilthoven, Holandsko).

V ďalšom uskutočnení sa môže podporná živná pôda 22 alebo krycie lôžko 2 vytvárať z pórovitého materiálu kolagénových vlákien obsahujúcich antibakteriálne látky taurolidín a/alebo taurultam, ako sa opisuje v EP 446,262 (udelenom Geistlich Soehne AG, Wolhusen, Švajčiarsko), ktorý sa tu zahrnuje ako odkaz. Kolagénová pórovitá hmota sa môže získať z komerčných zdrojov, napríklad od Pentapharm AG z Bazileja, Švajčiarsko, od Dr. Otto Suwelak Gmg Hof Billerbeck, Nemecko alebo od Ed. Geistlich Sohne A.G. Wolhusen, Švajčiarsko. Kolagénovú

pórovitú hmotu je možné tiež vyrobiť obvyklými spôsobmi. Napríklad sa môže hovädzia koža spracovať chemicky a mechanicky tak, aby sa oddelila *epidermis* od spodného pridruženého tuku. Vrstva sa potom môže spracovať so stredne silnou alkáliou, následne s kyselinou a potom premyť. K separácii kolagénu od ostatných proteínov sa môže použiť proteolytický enzým a k oddeleniu zvyškového tuku sa môže použiť lipáza. Kolagénový produkt sa potom môže nechať reagovať s oxidačným činidlom, homogenizuje sa a lyofilizuje. Včlenenie taurolidínu alebo taurultamu sa môže urobiť pred lyofilizáciou alebo opätovným rozpustením lyofilizovaného kolagénu v roztoku taurolidínu alebo taurultamu a opätovnou lyofilizáciou.

V ďalšom uskutočnení sa môže podporná živná pôda 22 alebo krycie lôžko 2 utvoriť v súlade so spôsobom pre výrobu pórovitých štruktúr opísaných vo WO 99/27315 (Dip. Ing. Ingo Heshcel, Nemecko), ktorý sa tu zahrnuje ako odkaz. Pórovité štruktúry sa tvoria z kvapalnej alebo pastovej zmesi látok, ktoré aspoň čiastočne stuhnú ochladením zmesi medzi dvomi ponorenými povrchmi, ktoré sa môžu temperovať a majú odlišné teploty. Počas tuhnutia sa tvorí usporiadaná štruktúra. Čiastočne stuhlý produkt sa potom suší vymrazením a poskytne homogénnu pórovitú štruktúru.

Podporná živná pôda 22 alebo krycie lôžko 2 sa môžu tiež vytvoriť z jedného alebo viacerých polymérov, ktoré sa môžu biologicky absorbovať, napríklad z kolagénu, fibrínu, lamilínu a fibronektínu, ktoré majú veľké, vzájomne prepojené póry, v súlade so spôsobom opísaným v US patente č. 5,869,080 (udelenom Johnson & Johnson Medical Inc., NJ), ktorý sa tu zahrnuje ako odkaz. Tento polymér, schopný biologickej absorpcie, sa môže pred zmrazením zosieťovať, napríklad s hexametyléndiizokyanátom (HMDI).

Podporná živná pôda 22 alebo krycie lôžko 2 sa môžu vytvoriť z kolagénovej pórovitej hmoty, napríklad Instat™ (Johnson & Johnson), ako sa opisuje v brožúre Johnson & Johnson nazvanej "Instat Collagen Absorbable Hemostat", september 1985, ktorá sa tu zahrnuje ako odkaz.

V ďalšom uskutočnení sa môže podporná živná pôda 22 alebo krycie lôžko 2 vyrobiť z pórovitej hmoty schopnej biologickej absorpcie v súlade so spôsobom opísaným v US patente č. 5,700,476 (Johnson & Johnson Medical Inc., NJ), ktorý sa tu zahrnuje ako odkaz. Pórovitá hmota zahrnuje štruktúru lôžka a aspoň jednu subštruktúru a aspoň jedno farmakologicky aktívne činidlo. Lôžko a subštruktúra sa, medzi inými, môže vyrobiť z materiálov schopných biologickej absorpcie, napríklad kolagénu, laminínu, elastínu a fibronektínu. Pórovité lôžko môže tiež obsahovať jeden alebo viacero proteínov alebo jeden alebo viacej polysacharidov či ich zmesi. Farmakologické činidlo môže, medzi inými, zahrnovať antimikrobiálnu látku, cytokín, rastový faktor alebo protilátku.

V ďalšom uskutočnení sa podporná živná pôda 22 alebo krycie lôžko 2 utvára z kolagénových vlákien, ako sa opisuje v patente WO 96/25961 (Geistlich Soehne AG), ktorý sa tu zahrnuje ako odkaz. Lôžko môže ďalej obsahovať látku podobnú hydrogélu, ktorá obsahuje glykozamínglykány, napríklad chondroitín-sulfát, keratan-sulfát, dermatan-sulfát a kyselinu hyalurónovú a rastové faktory. Príklad takého lôžka sa opisuje v US patente č. 5,489,304 (Orgill a spol.), ktorý sa tu vo svojej úplnosti zahrnuje ako odkaz.

Podporná živná pôda 22 alebo krycie lôžko 2 sa môžu tiež utvoriť z mnohovrstevnej membrány obsahujúcej pórovitú lôžkovú vrstvu prevážne z kolagénu II a aspoň jednu hustú bariérovú

vrstvu, ako sa opisuje v patente WO 99/19005 (Geistlich Soehne AG) a US patente s publikačným č. 2002/0013627 (Geistlich a spol.), ktoré sa tu zahrnujú ako odkaz. Lôžková vrstva má otvorenú hubovitú textúru a bariérová vrstva má uzavretú relatívne nepriepustnú textúru. Lôžková vrstva môže naviac obsahovať glykozamínglykány, medzi inými napríklad kyselinu hyalurónovú, chondroitín-sulfát, keratan-sulfát a dermatan-sulfát. Lôžková vrstva môže tiež obsahovať laminín, fibronektín-kalcium-alginát alebo anchorín II a rastové faktory. Bariéra sa môže vyrobiť z kolagénu I a III alebo zo syntetických materiálov, napríklad polyesterov, homopolymérov a kopolymérov kyseliny polyglykolovej a polymliečnej, kopolymérov glykolidu a laktidu, polyortoesterov a polykaprolaktónov.

Príklady membrán, v ktorých sú začlenené syntetické látky, napríklad polystery, sa zahrnujú do predloženého vynálezu a ich príklady sú Parietex® Mesh a Parietex® Composite Mesh od Sofradim Production (Trevoux, Francie), SepraMesh™ od Genzýme Corporation (Framingham MA) a Composix™ Mesh od C. R. Bard, Inc. (Murray Hill, NJ).

V ďalšom uskutočnení vynálezu sa podporná živná pôda 22 a/alebo krycie lôžko 2 vytvorí z perikardia. Príklady membrán utvorených z perikardia, ktoré sú užitočné v predloženom vynáleze, zahrnujú Tutopatch® od Tutogen Medical, Inc. (Parsipanny, NJ), Peri-Guard línie membrán a Bio Vascular Sling od Bio Vascular (St. Paul, MN).

Určité aspekty vynálezu sa dokladajú na príkladoch pomocou použitia systému *in vitro* k štúdiu chovania chondrocytových buniek, ktoré sú v kontakte s rozdielnymi nosnými lôžkami. Tieto *in vitro* testy predpovedajú spôsobilosť určitých materiálov, aby mechanicky vydržali artroskopický

postup, a tiež poskytujú informáciu o chovaní rastu chondrocytových buniek.

Tieto a ďalšie aspekty predloženého vynálezu je možné lepšie pochopiť z nasledujúcich príkladov, zmyslom ktorých je predložený vynález ilustrovať a nie obmedzovať.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Obr. 1A je nákres zobrazujúci typické kĺbové ukončenie kosti 3. Kostný materiál je charakteristicky pokrytý na povrchu kĺbu chrupkovou čiapočkou 4. Keď dôjde k poškodeniu alebo k poraneniu chrupkovej čiapočky (jamka v chrupkovej čiapočke 18 na obr. 1B), môže sa poškodené miesto 18 liečiť priamo alebo sa môže malinko rozšíriť operačnými výkonmi. Do poškodeného miesta chrupkovej čiapočky sa voliteľne môže vložiť hemostatická bariéra 1, aby ihibovala alebo predchádzala vaskularizácii do obnovujúcej sa chrupky z kosti, ktorá leží pod ňou (obr. 1C), keď je to nutné, napríklad pri poruchách, ktoré sa rozširujú do subchondrálnej vrstvy alebo pod ňu. Chondrocyty, ktoré sa majú implantovať do dutiny poruchy sa potom vrstvia na vršok tejto hemostatickej bariéry 1 alebo priamo na vršok poškodenia.

Obr. 2 je nákres zobrazujúci liečenú poruchu (medzera v bodkovanej časti) v chrupkovej čiapočke (bodkovaná časť) prikrytá lôžkom, ktoré sa používa pre vytvorenie veka či náplasti alebo bandáže (krycie lôžko - 2) na poškodenom mieste. Toto lôžko sa na mieste fixuje buď šitím alebo lepením k okraju dutiny ku zdravej chrupke alebo sa upevňuje ináč. Lôžko zakrýva poškodenú oblasť kĺbu, do ktorej sa transplantovali kultivované chorondrocyty.

Obr. 3A ukazuje typický artikulárny koniec kosti kolenného kĺbu, ktorý má na kĺbovom povrchu chrupkovú čiapočku 16.

Obr. 3B ukazuje defekt chrupky alebo poranenie chrupkovej čiapočky artikulárneho konca kosti 18.

Obr. 4 ukazuje jedno uskutočnenie implantabilného výrobku (implantátu) 20 v súlade s predloženým vynálezom.

Obr. 5 ukazuje, ako sa môže implantát 20 z obr. 4 použiť k implantácii pomocou artroskopického zavádzajúceho zariadenia 30, aké je napríklad znázornené na obr. 6.

Obr. 6 ukazuje artroskopické zavádzacie zariadenie 30 pre implantáciu implantátu 20 na miesto implantácie 18 v súlade s predloženým vynálezom.

Obr. 7 je nákres schematicky zobrazujúci vloženie implantabilného výrobku (implantátu) 20 z obr. 5 na miesto defektu alebo poranenia 18 v chrupkovej čiapočke 16 pomocou dvoch prístupových kanálčekov 33 a 60, ktoré môžu pojať artroskopické inštrumenty.

Obr. 8 je schematický prierez chrupkou 16 s poškodením alebo poranením, ktoré nezasahuje do subchondrálnej vrstvy 44, a implantátom 20 v súlade s predloženým vynálezom, ktorý sa upevňuje k miestu poruchy lepidlom 48.

Obr. 9 je schematický prierez chrupkou 16 s poškodením alebo poranením, ktoré nezasahuje do subchondrálnej vrstvy 44, a implantátom 20, ktorý sa upevňuje k miestu poruchy mechanickým upevňovacím prostriedkom 50.

Obr. 10 zobrazuje jedno uskutočnenie mechanického upevňovacieho prostriedku 50, ktoré sa používa k uchyteniu implantátu do miesta defektu alebo poranenia.

Obr. 11 je schematický prierez chrupkou 16 s poškodením alebo poranením, ktoré zasahuje do subchondrálnej vrstvy 44, a implantátom 20 v súlade s predloženým vynálezom, ktorý sa upevňuje do miesta poruchy lepidlom 48.

Obr. 12 je schematický prierez chrupkou 16 s poškodením alebo poranením, ktoré zasahuje do subchondrálnej vrstvy 44, a implantátom 20, ktorý sa upevňuje do miesta poruchy mechanickým upevňovacím prostriedkom 50.

Obr. 13A je čiernobiela kópia farebnej mikrofotografie histologického preparátu na začiatku rastu chondrocytových buniek na pevnej podpornej živnej pôde.

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

Obr. 13B je čiernobiela kópie farebnej mikrofotografie histologického preparátu podpornej živnej pôdy z obr. 13A s nasadenými chondrocytovými bunkami po trojtýždňovom raste na tomto pevnom nosnom lôžku.

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

Obr. 13C je fotografie ukazujúca podpornú živnú pôdu vytvorenú z kolagénu, v ktorej rastú chondrocytové bunky, zviditeľnené imunohistochemickým vyfarbením.

Obr. 13D je fotografie ukazujúca podpornú živnú pôdu vytvorenú z kolagénu, v ktorej rastú chondrocytové bunky v bioreaktorovom systéme, zviditeľnené imunohistochemickým

vyfarbením.

Obr. 14 je fotomikrograf ukazujúci chondrocytové bunky na podpornej živnej pôde DePuy.

Obr. 15 je graf znázorňujúci celkový počet buniek v kontrolnej vzorke (čierne políčka), na membráne skupiny Chondro-Gide (bodkované políčka) a na membráne skupiny DePuy (šedivé políčka) po troch dňoch, po dvoch týždňoch a po šiestych týždňoch. Pre uvedené časy sú hodnoty v kontrolnej vzorke: 72.000, 575.167 a 528.333 buniek. Na membráne Chondro-Gide: 109.167, 427.500 a 153.333. Na membráne DePuy: 169.583, 494.167 a 100.833 buniek.

Obr. 16 je graf znázorňujúci životaschopnosť buniek (v percentách) v kontrolnom vzorku (čierne políčka), na membráne skupiny Chondro-Gide (bodkované políčka) a na membráne skupiny DePuy (šedivé políčka) po troch dňoch, po dvoch týždňoch a po šiestych týždňoch.

Príklady uskutočnenia vynálezu

PRÍKLAD 1

Preto, aby sa Surgicel® použil v súlade s naším vynálezom pre prevenciu rozvoja krvných ciev do autológne implantovanej chrupky alebo chondrocytov, sme nechali Surgicel® reagovať s fixačným činidlom, napríklad glutaraldehydom; zvolili sme reakciu 0,6 % glutaraldehydu so Surgicelem® počas jednej minúty, nasledovanou premytím k odstráneniu zvyškov glutaraldehydu, ktorý by ináč mohol byť pre tkanivo toxický. Alternatívne sa Surgicel® pred reakciou s glutaraldehydom spracoval s fibrínovým lepidlom zvaným Tisseel® (Immuno AG, Viedeň, Rakúsko), ako sa opisuje v príklade 2. Zistili sme, že

Surgicel® fixovaný napríklad takýmto fixačným činidlom, ako je glutaraldehyd, premytý sterilnou fyziologickou soľankou (0,9 %) a uložený v chladničke sa nerozpúšťa počas jedného až dvoch mesiacov.

Surgicel® sa všeobecne resorbuje v období medzi 7 až 14 dňami. Tento čas by bol príliš krátky, pretože pre prevenciu rozvoja krvných ciev alebo vaskularizácie ako takej z kostnej štruktúry do implantovanej chrupky je potrebný dlhší čas pred tým, ako implantované chondrocyty vrastené do pevnej chrupkovej vrstvy získavajú svoju potrebnú výživu z okolitej chrupky. Inými slovami pre dostatočnú inhibíciu vaskularizácie sa potrebuje dlhší časový úsek, akým je napríklad jeden mesiac. Preto by sa produkt nemal absorbovať významne skôr pred týmto časom. Na druhej strane je resorpcia nakoniec potrebná.

Organický materiál použitý ako inhibujúca bariéra musí takto mať tieto schopnosti a my sme zistili, že Surgicel® spracovaný týmto spôsobom túto funkciu poskytuje.

PRÍKLAD 2

Surgicel® sa tiež potiahol organickým lepidlom a my sme v tomto prípade použili ako lepidlo Tisseel®. Tento produkt spolu so Surgicelom® vytvára užitočnú bariéru pre náš konkrétny účel. Tisseel® sa miešal, ako sa opisuje nižšie. Surgicel® sa potom potiahol Tisseelom® použitým ako sprej po obidvoch stranách Surgicelu®, dokiaľ sa nepremočil. Tisseel® (fibrínové lepidlo) sa potom nechal pri laboratórnej teplote stuhnúť. Bezprostredne pred úplným stuhnutím sa potom Surgicel® vložil do 0,6 % glutaraldehydu na jednu minútu a potom sa premyl 0,9 % sterilnou fyziologickou soľankou. Hodnota pH sa potom nastavila pomocou PBS a/alebo NaOH dokiaľ

sa nestabilizovala na hodnote 7,2 až 7,4. Takto spracovaný Surgicel® sa neskôr premyl v tkanivovom kultivačnom roztoku, napríklad minimálnom základnom roztoku/HAM F12 s 15 mM Hepes pufra.

Ako sme sa zmienili, v tomto príklade sme použili Tisseel® ako fibrínové lepiace činidlo na zmočenie Surgicelu®. Fibrínové lepiace činidlo alebo lepidlo sa môže ďalej tiež použiť priamo na dne lézie smerom ku kosti, na ktorú sa Surgicel® prilepuje. Použitý systém *in vitro*, namiesto testovania *in vivo*, sa skladá z NUCLEON™ Delta 6-jamkovej sterilnej jednoúčelovej platničky pre výskum buniek (NUNC (InterMed) Roskilde, Dánsko). Každá jamka má priemer približne 4 cm.

V tomto vynáleze môže byť fibrínovým lepiacim činidlom akékoľvek lepiace činidlo, ktoré spolu s fibrínovou zložkou poskytne lepidlo, ktoré sa môže pripustiť pre použitie u ľudí (N. Ihara a spol.: *Burns Incl. Therm. Inj.*, 1984, **10**, 396). Vynález tiež predvída akúkoľvek ďalšiu lepiacu zložku, ktorá sa môže použiť miesto fibrínového lepiaceho činidla. V tomto príklade sem použili Tisseel® alebo Tissucol® (Immuno AG, Viedeň, Rakúsko). Súprava Tisseel® pozostáva z nasledujúcich zložiek:

Tisseel®, lyofilizovaný, vírusovo inaktivovaná tesniaca hmota obsahujúca proteinum coagulabilis, z toho: fibrinogenum, plasmafibronectinum (CIG), factor coagulationis XIII a plasminogenum

roztok aprotinínu (hovädzí)

trombín 4 (hovädzí)

trombín 500 (hovädzí) a

roztok kalcium-chloridu.

Súprava Tisseel® obsahuje aplikačný systém DUPLOJECT®.

Fibrínové lepidlové činidlo alebo dvojzložkový tmel používajúci Tisseel® súpravu sa zmieša spôsobom podľa priloženého návodu Immune AG.

PRÍKLAD 3

Chondrocyty sa kultivovali v minimálnom základnom kultivačnom roztoku obsahujúcom HAM F12 a 15 mM Hepes pufra a 5 až 7,5 % autológneho séra v CO_2 inkubátore pri 37 °C a spracovali sa v laboratóriu Class 100 vo Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Kodaň, Dánsko. Pre kultiváciu chondrocytov sa môže použiť iné zloženie kultivačného roztoku. Bunky sa trypsinizovali pomocou trypsínovej EDTA počas 5 až 10 minút a počítali sa s pomocou vyfarbenia životaschopných buniek trypánovou modrou v Bürker-Türk komôrke. Počet buniek sa nastavil na 7,5 x 10^5 buniek v jednom mL. Jedna NUNCLON™ platnička nebola v laboratóriu Class 100 zmenená.

Hemostatická bariéra Surgicelu® sa orezala na vhodný rozmer, ktorý sa hodí na dno jamky v NUNCLON™ platničke pre kultiváciu tkaniva. V tomto prípade kruh s priemerom približne 4 cm (ale mohla by mať akýkoľvek rozmer) a vložil sa za aseptických podmienok na dno jamky NUNCLON™ platničky pre kultiváciu tkaniva. Delta 6-jamková platnička na jedno použitie pre výskum buniek (NUNC (InterMed) Roskilde, Dánsko). Hemostatická bariéra, ktorá sa má vložiť na dno jamky sa dopredu spracovala, ako sa opisuje v príklade 1. Toto spracovanie významne oneskoruje absorpciu Surgicelu®. Hemostatická bariéra sa potom niekoľkokrát premyla destilovanou vodou a potom ešte niekoľkokrát, dokiaľ sa nevypláchol nezreagovaný glutaraldehyd. Použilo sa malé množstvo bunkového kultivačného roztoku obsahujúceho sérum, aby sa absorbovalo do hemostatickej bariéry a súčasne udržovalo hemostatickú bariéru na dne jamky vlhkú.

Priamo na vršok hemostatickej bariéry sa vložilo približne 10^6 buniek v 1 mL kultivačného roztoku, rozprestrelo sa na povrchu hemostatickej bariéry, ktorá sa predspracovala 0,4 % glutaraldehydom, ako sa opisuje vyššie. Platnička sa potom inkubovala v CO_2 inkubátore pri 37 °C počas 60 minút. Množstvo 2 až 5 mL tkanivového kultivačného roztoku obsahujúceho 5 až 7,5 % séra sa opatrne pridalo do jamky obsahujúcej bunky tak, že sa špička pipety držala tangenciálne k stene jamky pri výtoku roztoku, aby sa bunky sérom nevyplachovali. Ukázalo sa, že pH roztoku je príliš nízke (pH asi 6,8). Hodnota pH sa potom upravila na 7,4 až 7,5. Nasledujúci deň začali niektoré chondrocyty na hemostatickej bariére rásť a vytvárali chumle. Niektoré bunky uhynuli vzhľadom k tomu, že boli vystavené nízkemu pH pred jeho úpravou. Platnička sa inkubovala 3 až 7 dní s výmenou roztoku na tretí deň.

Na konci inkubačného času sa roztok zlial a platnička sa ochladením zmrazila po prídavku 2,5 % glutaraldehydu obsahujúceho 0,1 M sodnej soli kyseliny dimetylarzínovej, zvanej tiež sodium-kakodylát, s pH nastaveným HCl na 7,4, ako fixačný prostriedok pre preparát bunky a ako nosič (hemostatická bariéra) pre pozdnejšiu prípravu pre elektrónovú mikroskopiu.

PRÍKLAD 4

Chondrocyty sa kultivovali v minimálnom základnom kultivačnom roztoku obsahujúcom HAM F12 a 15 mM Hepes pufra a 5 až 7,5 % autológneho séra v CO_2 inkubátore pri 37 °C a spracovali sa v laboratóriu Class 100 vo Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Kodaň, Dánsko. Pre kultiváciu chondrocytov sa môže použiť iné zloženie kultivačného roztoku. Bunky sa trypsinizovali pomocou trypsínovej EDTA počas 5 až 10

minút a počítali sa s pomocou vyfarbenia životaschopných buniek trypánovou modrou v Bürker-Türk komôrke. Počet buniek sa nastavil na 7,5 x 10^5 buniek v 1 mL. Jedna NUNCLON™ platnička nebola v laboratóriu Class 100 zmenená.

Surgicel® (pre použitie ako hemostatická bariéra) sa nechal reagovať 1 minútu s 0,6 % glutaraldehydom, ako sa opisuje v príklade 1, a premyl sa 0,9 % sterilným roztokom chloridu sodného alebo výhodne pufrom, napríklad pufrom PBS alebo kultivačným roztokom, napríklad MEM/F12, pretože pH po reakcii s glutaraldehydom je 6,8 a výhodne by malo byť 7,0 až 7,5. Na obidve strany Surgicelu® sa aplikoval Tisseel® pomocou systému DUPLOJECT®, čím sa pokryli fibrínovým lepidlom obidve strany Surgicelu®, zamýšľanej náplasti. Lepidlo sa nechá schnúť za aseptických podmienok aspoň 3 až 5 minút. „Pokrytá" hemostatická bariéra sa vložila na dno jamky v NUNCLON™ Delta 6-jamkovej sterilnej platničke na jedno použitie pre výskum buniek (NUNC (InterMed) Roskilde, Dánsko). Použilo sa malé množstvo tkanivového kultivačného roztoku obsahujúceho sérum, aby sa absorbovalo do hemostatickej bariéry. Približne 10^6 buniek v 1 mL tkanivového kultivačného roztoku obsahujúceho sérum sa vložilo priamo na vršok hemostatickej bariéry, rozptýlené na povrchu hemostatickej bariéry. Platnička sa potom inkubovala v CO_2 inkubátore pri 37 °C počas 60 minút. Množstvo 2 až 5 mL tkanivového kultivačného roztoku obsahujúceho 5 až 7,5 % séra sa opatrne pridalo do jamky obsahujúcej bunky tak, že sa špička pipety držala tangenciálne k stene jamky pri výtoku roztoku, aby sa bunky sérom nevyplachovali. Po 3 až 6 dňoch ukázalo mikroskopické skúmanie, že bunky uspokojivo priľnuli k Surgicelu® a vrástli do neho, z čoho sa môže usudzovať, že Surgicel® nevykazuje voči chondrocytom toxicitu a že chondrocyty uspokojivo zarastajú do Surgicelu®.

Platnička sa inkubovala 3 až 7 dní s výmenou roztoku na tretí deň. Na konci inkubácie sa roztok zlial a platnička sa ochladením zmrazila po prídavku 2,5 % glutaraldehydu obsahujúceho 0,1 M sodnej soli kyseliny dimetylarzínovej, zvanej tiež sodium-kakodylát, s pH nastaveným HCl na 7,4, ako fixačný prostriedok pre preparát bunky a ako nosič (hemostatická bariéra) pre pozdnejšú prípravu pre elektrónovú mikroskopiu.

PRÍKLAD 5

Chondrocyty sa kultivovali v minimálnom základnom kultivačnom roztoku obsahujúcom HAM F12 a 15 mM Hepes pufra a 5 až 7,5 % autológneho séra v CO_2 inkubátore pri 37 °C a spracovali sa v laboratóriu Class 100 vo Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Kodaň, Dánsko. Bunky sa trypsinizovali pomocou trypsínovej EDTA počas 5 až 10 minút a počítali sa s pomocou vyfarbenia životaschopných buniek trypánovou modrou v Bürker-Türk komôrke. Počet buniek sa nastavil na $7,5 \times 10^5$ až 2×10^6 buniek v 1 mL. Jedna NUNCLON™ platnička nebola v laboratóriu Class 100 zmenená.

Bio-Gide® je resorbujúca sa dvojvrstevná membrána, ktorá sa používa ako náplasť alebo bandáž kryjúca oblasť poruchy kĺbu, do ktorej sa majú kultivované chondrocyty transplantovať pomocou autológnej transplantácie. Bio-Gide® je čistá kolagénová membrána získaná štandardizovaným, riadeným priemyslovým postupom firmou E. D. Geistlich Sohne AG, CH-61 10 Wolhusen. Kolagén sa extrahuje z veterinárne certifikovaných prasiat a starostlivo sa očistí, aby sa predišlo antigénnej reakcii a sterilizuje sa dvojitou gama-radiáciou. Dvojvrstvá membrána má pórovitý povrch a hutný povrch. Membrána sa zhotovuje z kolagénu typu I a typu III bez ďalšieho zosieťovania alebo chemického spracovania. Kolagén sa

resorbuje v priebehu 24 týždňov. Membrána si uchová svoju vlastnú štruktúrnu integritu dokonca aj keď je vlhká a môže sa fixovať stehami alebo klinčekmi. Membrána sa tiež môže „lepiť" pomocou fibrínového lepidla, napríklad Tisseel®, k okolitej chrupke alebo tkanivu buď miesto stehu alebo spolu so stehom.

Bio-Gide® nebol v laboratóriu Class 100 zmenený a vložil sa za aseptických podmienok na dno jamiek NUNCLON™ tkanivovej kultivačnej 6-jamkovej Delta sterilnej platničky na jedno použitie pre výskum buniek (NUNC (InterMed)Roskilde, Dánsko), buď s pórovitým povrchom dvojvrstvej membrány otočeným navrch alebo s hutným povrchom membrány otočeným navrch. Približne 10^6 buniek v 1 mL tkanivového kultivačného roztoku obsahujúceho sérum, sa vložilo priamo na vršok Bio-Gide®, rozptýlené buď na pórovitom alebo na hutnom povrchu Bio-Gide®. Platnička sa potom inkubovala v CO_2 inkubátore pri 37 °C počas 60 minút. Množstvo 2 až 5 mL tkanivového kultivačného roztoku obsahujúceho 5 až 7,5 % séra sa opatrne pridalo do jamky obsahujúcej bunky tak, že sa špička pipety držala tangenciálne k stene jamky pri výtoku roztoku, aby sa bunky sérom nevyplachovali.

Na druhý deň potom, čo sa chondrocyty vložili do jamky obsahujúcej Bio-Gide®, sa bunky prezreli mikroskopom Nikon Invert. Zistilo sa, že niektoré chondrocyty priľnuli k okraju Bio-Gide®. Nebolo samozrejme možné sa týmto mikroskopom pozrieť cez samotný Bio-Gide®.

Platnička sa inkubovala 3 až 7 dní s výmenou roztoku na tretí deň. Na konci inkubácie sa roztok zlial a platnička sa ochladením zmrazila po prídavku 2,5 % glutaraldehydu obsahujúceho 0,1 M sodnej soli kyseliny dimetylarzínovej, zvanej tiež sodium-kakodylát, s pH nastaveným HCl na 7,4, ako fixačný prostriedok pre preparát bunky a ako nosič pre Bio-

Gide® s bunkami kultivovanými buď na pórovitom alebo na hutnom povrchu. Náplasti Bio-Gide® sa potom poslali na elektrónovú mikroskopiu na Department of Pathology, Herlev Hospital, Dánsko.

Elektrónová mikroskopia ukázala, že chondrocyty kultivované na hutnom povrchu Bio-Gide® nevrástli do kolagénovej štruktúry Bio-Gide®, zatiaľ čo bunky kultivované na pórovitom povrchu do kolagénovej štruktúry vrástli a ďalej ukázala prítomnosť proteoglykánov a žiadne známky fibroblastových štruktúr. Tento výsledok nám ukázal, že keď sa kolagénová náplasť, ako napríklad náplasť Bio-Gide®, prišíva ako náplasť prikrývajúca poruchu chrupky, mal by byť pórovitý povrch kolagénového lôžka otočený dolu smerom k poruche, do ktorej sa majú chondrocyty injektovať. Chondrocyty potom budú schopné prenikať kolagénom a vytvárať hladký povrch chrupky v línii s neporušeným povrchom a v tejto oblasti sa vytvorí hladká vrstva proteoglykánov. Zatiaľ čo, keď smeruje hutný povrch kolagénovej náplasti dolu k poruche, chondrocyty, ktoré sa majú implantovať, sa nebudú spojovať s kolagénom a bunky nebudú vytvárať rovnako hladký povrch, ako sa opisuje vyššie.

PRÍKLAD 6

Chondrocyty sa kultivovali v minimálnom základnom kultivačnom roztoku obsahujúcom HAM F12 a 15 mM Hepes pufra a 5 až 7,5 % autológneho séra v CO_2 inkubátore pri 37 °C a spracovali sa v laboratóriu Class 100 vo Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Kodaň, Dánsko. Bunky sa trypsinizovali pomocou trypsínovej EDTA počas 5 až 10 minút a počítali sa s pomocou vyfarbenia životaschopných buniek trypánovou modrou v Bürker-Türk komôrke. Počet buniek sa nastavil na $7,5 \times 10^5$ až 2×10^6 buniek v 1 mL. Jedna NUNCLON™ platnička nebola v laboratóriu Class 100 zmenená.

Membránu Bio-Gide® používanú ako dvojvrstvovú membránu schopnú resorpcie možno tiež použiť spoločne s organickým lepidlom, ako je Tisseel®, s ďalším významne vyšším obsahom aprotinínu, ako sa obvykle nachádza v Tisseele®, ako sa opisuje v inzerovanom produkte. Zvýšením obsahu aprotinínu na asi 25.000 KIU/mL, sa resorpcia materiálu pozdrží o týždne miesto obvyklého trvania vo dňoch.

Pre testovanie tohto rysu *in vitro* sa Tisseel® naniesol na dno jamky NUNCLON™ platničky a nechal sa neúplne stuhnúť. Na Tisseel® sa potom naniesla kolagénová náplasť, napríklad Bio-Gide®, a prilepila sa na dno jamky. Toto spojenie Bio-Gide® a Tisseel® sa navrhuje, aby tvorilo hemostatickú bariéru, ktorá bude inhibovať alebo brániť rozvoju či infiltrácii krvných ciev do oblasti transplantácie chondrocytov. Túto hybridnú kolagénovú náplasť je dnes možné použiť tak ako hemostatickú bariéru na spodku poruchy (najbližšie povrchu, ktorý sa má reparovať), ale tiež ako nosné lôžko pre tvorbu chrupky, pretože distálnym povrchom môže byť pórovitá strana kolagénovej náplasti, a tak podporovať infiltráciu chondrocytov a chrupkového lôžka. Túto hybridnú kolagénovú náplasť možno teda tiež použiť k zakrytiu vrchnej strany implantátu s pórovitým kolagénovým povrchom smerujúcim k implantovaným chondrocytom a ako bariéru vytvárajúcu vršok. Hybridná kolagénová náplasť so zvýšenou zložkou aprotinínu sa môže tiež použiť bez akéhokoľvek organického lepidla, ako je Tisseel®, a vložiť priamo do poruchy s priľnutím pomocou prirodzených síl. Kolagénová náplasť sa preto môže použiť tak ako hemostatická bariéra, ako aj bezbunkové zakrytie reparovaného či transplantačného miesta, s pórovitým povrchom náplasti orientovaným k transplantovaným chondrocytom alebo k chrupke. Ďalší variant by využíval kolagénovú náplasť, ktorá pozostáva z kolagénu typu II (Geistlich Sohne AG, CH-61 10 Wolhusen).

Predmetom tohoto vynálezu je preto hybridná kolagénová náplasť, kde zmienenou náplasťou je kolagénové lôžko so zvýšenými hladinami zložky aprotinínu, výhodne asi 25.000 KIU/mL, v spojení s lepidlom organického lôžka, kde je kolagénová zložka podobná Bio-Gide® dvojvrstvovému materiálu, ktorý je schopný absorpcie, alebo kolagénu typu II a organické lepidlo je podobné materiálu Tisseel®. V ďalšom uskutočnení sa u hybridnej kolagénovej náplasti nepoužíva na priľnutie k reparovanému miestu žiadne organické lepidlo.

PRÍKLAD 7

Súprava, ako sa predvída, umožní vhodnú prax pre spôsob predloženého vynálezu. Vo výhodnom uskutočnení súprava podľa vynálezu poskytne sterilné zložky vhodné pre bezproblémové použitie v operačnom prostredí a poskytne vhodnú hemostatickú bariéru, vhodnú kryciu náplasť a ak bude treba vhodné organické lepidlo. Súprava tohto vynálezu môže tiež poskytnúť sterilný materiál lôžka bez buniek ako nosný základ autológnych chondrocytov, ktoré sa majú implantovať do poruchy na povrchu kĺbového spojenia. V jednom uskutočnení súprava vynálezu obsahuje hemostatickú bariéru Surgicel® a kryciu náplasť Bio-Gide® spolu s vhodným organickým lepidlom na potiahnutie hemostatickej bariéry Tisseel®, kde Surgicel® a Bio-Gide® sa spracovali v súlade s poznaním tohto vynálezu z hľadiska predĺženia času, než dôjde k resorpcii. V prípadoch, kedy sa Tisseel® dopredu pokryje, sa v jednom uskutočnení Tisseel® doplní ďalším aprotinínom, aby sa zvýšil čas resorpcie.

V ďalšom výhodnom uskutočnení sú hemostatická bariéra a krycia náplasť z polopriepustnej kolagénovej matrice, ktorá sa spracovala tak, aby sa predĺžil čas resorpcie materiálu. Je tiež možné poskytovať lepidlo Tisseel® vo zvýšenom množstve,

ako zvláštnu zložku, aby sa nanášala podľa potreby, vzhľadom k neodmysliteľnej premenlivosti a jedinečnosti okolností, s ktorými sa každá reparačná či transplantačná operácia bude stretávať.

Odborníci v technike ocenia, že sa môžu urobiť mnohé obmeny a/alebo modifikácie vynálezu, ako sa ukazuje vo zvláštnych uskutočneniach, bez toho, aby sa odchýlili od ducha alebo rámca vynálezu, ako sa vcelku opisuje. Predložené uskutočnenia a príklady sa preto majú chápať vo všetkých ohľadoch ako ilustratívne a nie ako obmedzujúce.

PRÍKLAD 8

Chondrocytové bunky sa kultivovali tri týždne vo vyššie opísanom kultivačnom roztoku v CO_2 inkubátore pri 37 °C a spracovali sa v laboratóriu Class 100 vo Verigen Transplatation Service A/S, Kodaň, Dánsko alebo na univerzite v Lübecku, Nemecko. (Všimnite si, že pre kultiváciu chondrocytových buniek sa môžu použiť tiež ďalšie zmesi kultivačných roztokov.) Bunky sa trypsinizovali pomocou trypsínovej EDTA počas 5 až 10 minút a počítali sa s pomocou vyfarbenia životaschopných buniek trypánovou modrou v Bürker-Türk komôrke. Počet buniek sa nastavil na 7,5 x 10^5 buniek na mililiter. Jedna NUNCLON™ platnička nebola v laboratóriu Class 100 zmenená.

Materiál podpornej živnej pôdy, konkrétne kolagénová membrána Chondro-Gide® (identická s Bio-Gide® s výnimkou toho, že Chondro-Gide® má väčšiu šírku a dĺžku ako Bio-Gide®; obidve dostupné od Ed Geistlich Sohne, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Švajčiarsko), sa orezala na vhodný rozmer, aby zapadala na dno jamky na NUNCLON™ platničke pre kultiváciu buniek. V tomto prípade sa za aseptických podmienok vložil na dno jamky kruh s

priemerom asi 4 cm.

Po troch týždňoch sa chondrocytové bunky previedli z kultivačného roztoku do vyššie opísaného transplantačného roztoku a asi 5 x 10^6 chondrocytových buniek v 5 mL transplantačného roztoku sa vložilo priamo na vršok podpornej živnej pôdy a rozptýlilo sa na jej povrchu. Platnička sa tri dni inkubovala v CO_2 inkubátore pri 37 °C. Po tomto čase sa chondrocytové bunky usporiadali do chumľov a začali rásť na podpornej živnej pôde a nebolo možné je z podporného lôžka odstrániť pomocou jeho oplachovania roztokom alebo dokonca mechanicky za použitia mierneho pritlačenia na lôžko.

Na konci inkubácie sa transplantačný roztok zlial a podporná živná pôda s chondrocytovými bunkami do nej vrastenými sa chladom zmrazila v 2,5 % glutaraldehyde obsahujúceho 0,1 M sodnú soľ dimetylarzínovej kyseliny, pridanom ako fixačné činidlo. Podporná živná pôda sa farbila safraninom O pre histologické vyhodnotenie. Čiernobiela kópia farebnej mikrofotografie sa uvádza na obr. 13A. Pre lepšiu ilustráciu rysov mikrofotografie sa tiež uvádza jej digitalizovaná forma na obr. 13AA.

PRÍKLAD 9

Chondrocyty sa kultivovali tri týždne vo vyššie opísanom kultivačnom roztoku v CO_2 inkubátore pri 37 °C a spracovali sa v laboratóriu Class 100 vo Verigen Transplantation Service A/S, Kodaň, Dánsko, alebo na univerzite v Lübecku, Nemecko. Bunky sa trypsinizovali pomocou trypsínovej EDTA počas 5 až 10 minút a počítali sa s pomocou vyfarbenia životaschopných buniek trypánovou modrou v Bürker-Türk komôrke. Počet chondrocytových buniek sa nastavil na 5 x 10^5 buniek na mililiter. Jedna NUNCLON™ platnička nebola v laboratóriu Class

100 zmenená.

Podporná živná pôda Chodnro-Gide®, ako v príklade 1, sa orezala na vhodný rozmer, aby zapadla na dno jamky na NUNCLON™ platničke pre kultiváciu buniek. V tomto prípade sa za aseptických podmienok vložil na dno jamky kruh s priemerom asi 4 cm.

Po troch týždňoch sa chondrocytové bunky previedli z kultivačného roztoku do vyššie opísaného transplantačného roztoku a asi 5 x 10^5 chondrocytových buniek v 5 ml transplantačného roztoku sa vložilo priamo na vršok podpornej živnej pôdy a rozptýlilo sa na jej povrchu. Platnička sa inkubovala tri týždne v CO_2 inkubátore pri 37 °C.

Na konci inkubácie sa transplantačný roztok zlial a podporná živná pôda s chondrocytovými bunkami, ktoré do nej vrástli, sa chladom zmrazila v 2,5 % glutaraldehyde obsahujúcom 0,1 M sodnú soľ dimetylarzínovej kyseliny, pridanom ako fixačné činidlo. Podporná živná pôda sa ofarbila safranínom O pre histologické vyhodnotenie. Pre imunohistochemické vyhodnotenie sa kolagénové membrány fixovali v zmesi metanol-acetón a ofarbili sa pre agrekán a kolagén typu II pomocou králičieho anti-ľudského kolagénu typu II a myšieho anti-ľudského agrekánu. Primárne protilátky sa zviditeľnili pomocou fluórescenčných sekundárnych protilátok. Čiernobiela kópia farebnej mikrofotografie na obr. 13B ukazuje chondrocytové bunky 24. Pre lepšiu ilustráciu rysov mikrofotografie je tiež uvedená jej digitalizovaná forma na obr. 13BB.

V priebehu trojtýždňovej inkubácie na podpornej živnej pôde Chondro-Gide® sa pozorovalo, že chondrocytové bunky rástli a rozmnožovali sa na nosnom lôžku a vytvárali chumle

v prostriedku nosného lôžka a vyrovnávali sa pozdĺž povrchu.

PRÍKLAD 10

Chondrocyty sa kultivovali tri týždne vo vyššie opísanom kultivačnom roztoku v CO_2 inkubátore pri 37 °C a spracovali sa v laboratóriu Class 100 vo Verigen Transplantation Service A/S, Kodaň, Dánsko, alebo na univerzite v Lübecku, Nemecko. Bunky sa trypsinizovali pomocou trypsínovej EDTA počas 5 až 10 minút a počítali sa s pomocou vyfarbenia životaschopných buniek trypánovou modrou v Bürker-Türk komôrke. Počet chondrocytových buniek sa nastavil na 5 x 10^5 buniek na mililiter. Jedna NUNCLON™ platnička nebola v laboratóriu Class 100 zmenená.

Podporná živná pôda Chodnro-Gide®, ako v príklade 1, sa orezala na vhodný rozmer, aby zapadla na dno jamky na NUNCLON™ platničke pre kultiváciu buniek. V tomto prípade sa za aseptických podmienok vložil na dno jamky kruh s priemerom asi 4 cm.

Po troch týždňoch sa chondrocytové bunky previedli z kultivačného roztoku do vyššie opísaného transplantačného roztoku a asi 5 x 10^5 chondrocytových buniek v 5 ml transplantačného roztoku sa vložilo priamo na vršok podpornej živnej pôdy a rozptýlilo sa na jej povrchu. Platnička sa inkubovala tri týždne v CO_2 inkubátore pri 37 °C.

Podporná živná pôda s vypestovanými chondrocytovými bunkami sa potom inkubovala 16 hodín. Podporná živná pôda s chondrocytovými bunkami sa potom odstredila. Bunky sa vysiali na NUNCLON™ platničku a spočítal sa alikvotný podiel pomocou vyfarbenia životaschopných buniek trypánovou modrou v Bürker-Türk komôrke. Na obr. 11C je ukázaná jej mikrofotografia.

Zistilo sa, že celkový vypočítaný počet buniek bol 6 x 10^6 a životaschopnosť bola väčšia ako 95 %.

PRÍKLAD 11

Tento príklad opisuje test toxicity a biokompatibility membrány pripravenej podľa US patentu č. 4,902,508 (udelenom DePuy, dcérinmu podniku Ethicon, Inc.; membrána DePuy alebo „Ethicon") a membrány Chondro-Gide® (Ed Geistlich Sohne, Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Švajčiarsko). Životaschopnosť a počet chondrocytových buniek, ktoré priľnuli na membránach DePuy a Chondro-Gide®, po troch dňoch, po dvoch a po šiestych týždňoch sa stanovil vizuálnym spočítaním počtu buniek, ktoré priľnuli k membránam.

DePuy membrána sa testovala s membránou Chondro-Gide® ako pozitívnou kontrolou a negatívna kontrola použitím rovnakého spôsobu, ale bez akejkoľvek membrány.

Skôr zmrazené ľudské chondrocytové bunky (14 miliónov buniek) sa rozmrazili, premyli a stanovil sa počet buniek a životaschopnosť. Po rozmrazení sa získalo naspäť 3,2 milióna buniek pri 87 % životaschopnosti. Do každej zo dvoch fľašiek pre tkanivové kultúry sa pridalo 1,6 milióna buniek s koncentráciou 5,3 x 10^4 buniek na mililiter a tri dni sa inkubovali pri 37 °C. Výsledný počet buniek a životaschopnosť vo fľaškách bola 3,5 milióna buniek s 98 % životaschopnosťou resp. 3,6 milióna buniek s 93 % životaschopnosťou.

Počet buniek a životaschopnosť sa analyzovali pre šesť vzoriek od každej membrány a pre šesť vzoriek kontrolnej skupiny bez membrány. Membrány sa analyzovali po troch dňoch, po dvoch a po šiestych týždňoch. Vzorky membrán DePuy a Chondro-Gide® sa orezali na veľkosť štvorčeka s plochou jeden

štvorcový palec (t.j. 6,4516 cm^2). Kvôli suchej konzistencii membrány DePuy bolo orezanie membrány akosi ťažšie.

Chondrocyty sa trypsinizovali a stanovila sa životaschopnosť buniek a ich počet, ako sa naznačilo vyššie. Bunky sa odstredili a opäť suspendovali na koncentráciu jeden milión buniek na mililiter.

Membrány DePuy a Chondro-Gide® sa dvakrát premyli soľankou tlmenou fosfátom (PBS) na pH 7,17. Každá membrána sa vložila do jamky kultivačnej platničky. Jedno sto mikrolitrov suspenzie chondrocytových buniek s koncentráciou jeden milión buniek na mililiter sa nanieslo na každú membránu a na dno šiestych jamiek bez membrány. Do každej jamky sa pridal ďalší kultivačný roztok (3 mL). Kultivačné platničky sa inkubovali aspoň tri dni pri 37 °C.

Obr. 14 ilustruje chondrocytové bunky, ktoré priľnuli k membráne DePuy. Bunky sa izolovali a počítali po troch dňoch, po dvoch týždňoch a po šiestych týždňoch.

Membrány DePuy a Chondro-Gide® sa spracovali s roztokom enzýmu, ktorý obsahoval zmes dvoch mililitrov 0,25 % trypsínu a jedného mililitra kolagénázy (celkom 5000 jednotiek), aby sa membrány rozpustili a mohol sa stanoviť počet buniek a ich životaschopnosť. Len čo sa membrána rozpustila, chondrocytové bunky sa izolovali odstredením a spočítali sa. Čas pôsobenia roztoku enzýmu sa mení v závislosti na type membrány. Pre membránu DePuy trvala reakcia s kolagénázou omnoho dlhšie ako pre membránu Chondro-Gide®. Membrána DePuy sa úplne nerozpustila po dvoch hodinách, zatiaľ čo membrána Chondro-Gide® sa úplne rozpustila po asi jednej až jednej a pol hodine. Preto, aby nedochádzalo k stresu buniek, by nemalo trávenie kolagénázou trvať dlhšie ako dve hodiny.

Kontrolná skupina chondrocytov sa trypsinizovala, premyla a peletovala odstredením. Bunky sa potom opäť suspendovali v roztoku DMEM a zistil sa konečný počet buniek.

Ďalej sa uvádzajú výsledky pokusu. V životaschopnosti kontrolných buniek pri porovnávaní s bunkami, ktoré vyrástli na nosných lôžkach DePuy a Chondro-Gide® neboli podstatné rozdiely. Životaschopnosť v kontrolnej skupine, nosnom lôžku Chondro-Gide® a nosnom lôžku DePuy bola, ako sa ukazuje na obr. 16, vysoká, asi 87 % pre kontrolnú skupinu, asi 94 % pre nosné lôžko Chondro-Gide® a 93 % pre nosné lôžko DePuy. Po dvojtýždennom intervale bola životaschopnosť v kontrolnej skupine asi 90 %, pre skupinu Chondro-Gide® asi 91 % a asi 83 % pre skupinu DePuy. Po šiestych týždňoch bolo asi 80 % buniek schopných života v kontrolnej skupine, zatiaľ čo asi 74 % bolo životaschopných na membráne Chondro-Gide a asi 74 % bolo životaschopných za podmienok na nosnom lôžku DePuy. V životaschopnosti buniek takto neexistuje širšie rozpätie pri rôznych podmienkach rastu.

Konkrétny počet buniek sa významne neovplyvnil nosným lôžkom DePuy a Chondro-Gides® až do pozdnej kultivácie. Ako sa ukazuje na obr. 15, po troch dňoch mala kontrolná skupina asi 72.000 buniek, zatiaľ čo na nosnom lôžku Chondro-Gide® ich bolo asi 109.167 a na nosnom lôžku DePuy bolo asi 169.583 buniek. Po dvoch týždňoch sa kontrolné bunky rozmnožili asi osemkrát na hodnotu 575.167 buniek, zatiaľ čo bunky na Chondro-Gide® takmer štyrikrát na číslo 427.500 a bunky na DePuy takmer trikrát na hodnotu 494.167. Konečne po šiestych týždňoch sa počet buniek v kontrolnej skupine trošku znížil na hodnotu 528.333, počet buniek na Chondro-Gide® a na DePuy poklesol dramaticky na hodnotu 153.333, resp. 100.833.

Zatiaľ čo sa tento vynález opísal s odkazom na

charakteristické uskutočnenia, je zrejmé, že odborníci v technike možná navrhnú ďalšie uskutočnenia a obmeny tohto vynálezu bez toho, aby sa odchýlili od skutočného ducha a rámca vynálezu. Pripojené patentové nároky sa zamýšľajú tak, aby ich interpretácia zahrnovala všetky takéto uskutočnenia a rovnocenné obmeny.

Zoznam vzťahových značiek

1 - hemostatická bariéra
2 - krycie lôžko, náplasť
3 - kosť
4 - čiapočka chrupky
10 - kolenný kĺb
12 - stehenná kosť
14 - holenná kosť
16 - zdravá chrupka
18 - porucha, defekt alebo poranenie chrupky
20 - implantabilný výrobok, implantát
21 - relatívne hladká časť podpornej živnej pôdy
22 - podporná živná pôda, nosné lôžko
23 - hrubá časť podpornej živnej pôdy
24 - chondrocytové bunky
25 - stočenie implantátu, aby sa vytvoril špirálový valec
28 - artroskopické zavádzacie zariadenie
32 - pracovný kanálček artroskopického zavádzacieho zariadenia
33 - prístupový kanálček artroskopického zavádzacieho zariadenia
34 - injekčný kanálček artroskopického zavádzacieho zariadenia
36 - vyťahovacia a vymeniteľná ihla artroskopického zavádzacieho zariadenia
38 - teleskopicky sa pohybujúca rúčka artroskopického zavádzacieho zariadenia
40 - čiapočka (zvon) z gumy alebo iného vhodného materiálu artroskopického zavádzacieho zariadenia
42 - smerom von vychýlený prídržný prvok artroskopického zavádzacieho zariadenia
44 - subchodrálna vrstva
46 - jamka po odstránení defektnej chrupky
48 - lepidlo
50 - svorka pre fixáciu implantátu

52 - hlava svorky pre fixáciu implantátu

54 - intramedulárny kanálček svorky pre fixáciu implantátu

56 - osa, nosná tyčka svorky pre fixáciu implantátu

58 - upevňovací krúžok svorky pre fixáciu implantátu

60 - oddelený prístupový kanálček k miestu implantácie

62 - hemostatická bariéra v subchondrálnej vrstve alebo pod ňou

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Výrobok zahrnujúci membránu vyznačujúcu sa tým, že má aspoň jednu vrstvu s pórovitým povrchom a zahrnuje submukózne črevné tkanivo a bunky, ktoré priľnuli k uvedenej vrstve.

2. Výrobok podľa nároku 1 vyznačujúci sa tým, že uvedené bunky sú chondrocytové bunky.

3. Výrobok podľa nároku 1 vyznačujúci sa tým, že uvedená membrána neobsahuje bunky.

4. Výrobok podľa nároku 1 vyznačujúci sa tým, že uvedená membrána je kolagén.

5. Výrobok podľa nároku 1 vyznačujúci sa tým, že uvedená membrána je kolagén typu I a kolagén typu III.

6. Výrobok podľa nároku 1 vyznačujúci sa tým, že uvedená membrána je schopná sa opäť resorbovať.

7. Výrobok podľa nároku 1 vyznačujúci sa tým, že uvedené chondrocytové bunky sú autológne.

8. Výrobok podľa nároku 1 vyznačujúci sa tým, že ďalej zahrnuje biologicky zlúčiteľné lepidlo priliehajúce k uvedenej membráne.

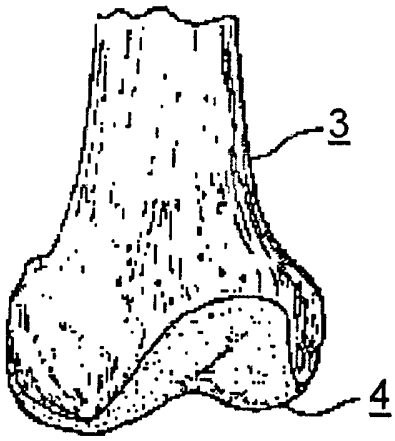
9. Výrobok podľa nároku 1 vyznačujúci sa tým, že uvedená membrána sa prispôsobí tak, aby prekryla miesto defektu artikulárnej chrupky.

10. Výrobok podľa nároku 1 vyznačujúci sa tým, že uvedená membrána sa prispôsobí tak, aby sa mohla vložiť do defektu artikulárnej chrupky.

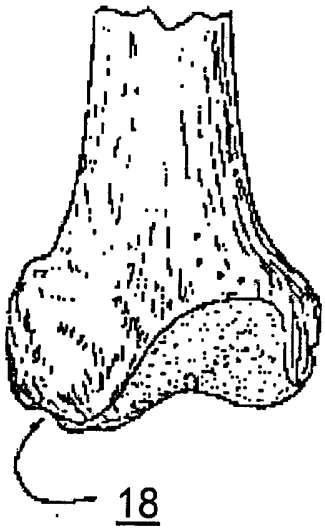
11. Výrobok podľa nároku 1 vyznačujúci sa tým, že uvedená membrána sa položí cez defekt artikulárnej chrupky.

12. Výrobok podľa nároku 1 vyznačujúci sa tým, že uvedená membrána sa vloží do defektu artikulárnej chrupky.

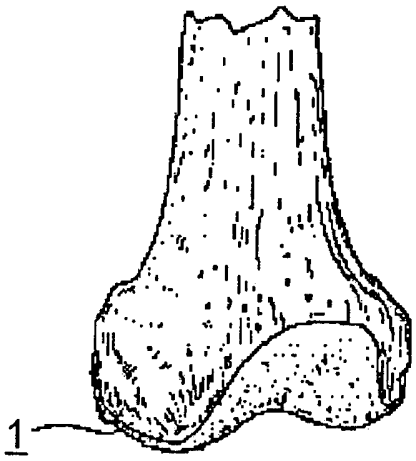
Obr. 1A

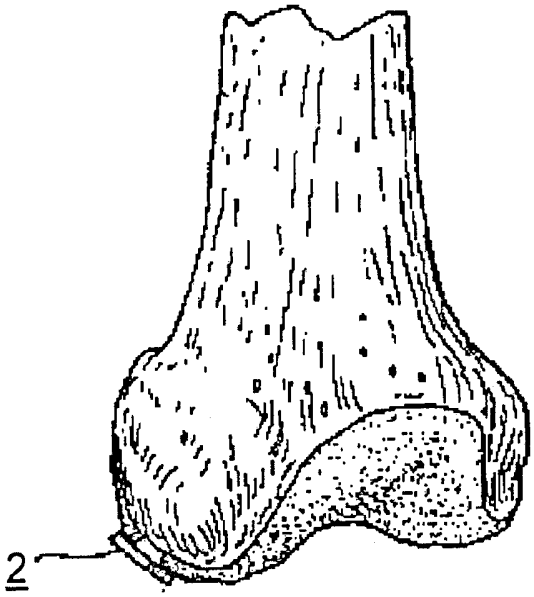


Obr. 1B

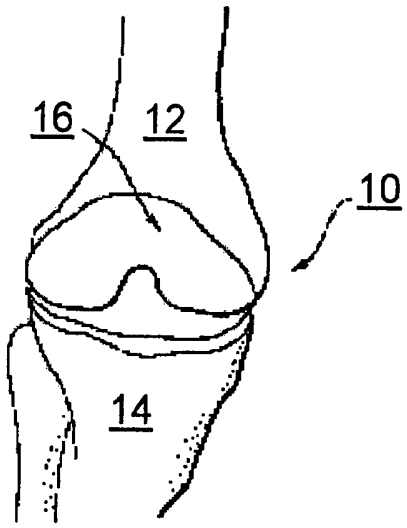


Obr. 1C

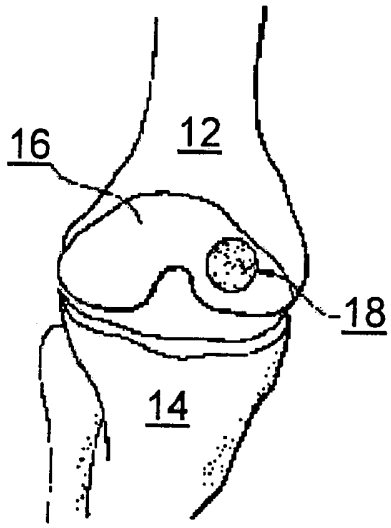




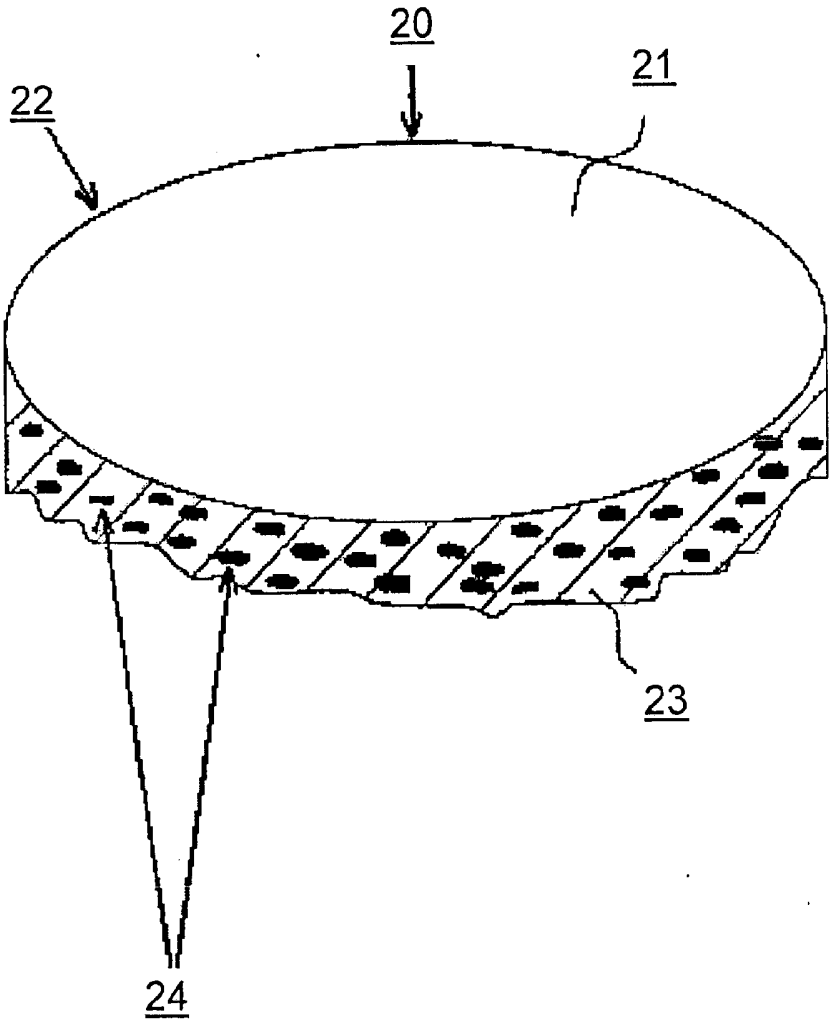
Obr. 2



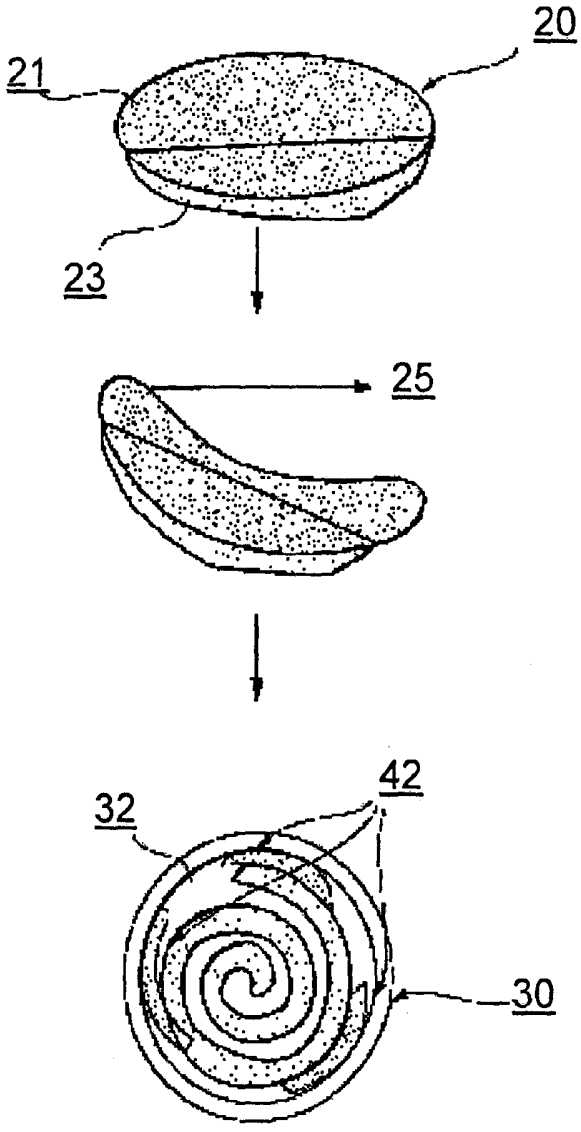
Obr. 3A



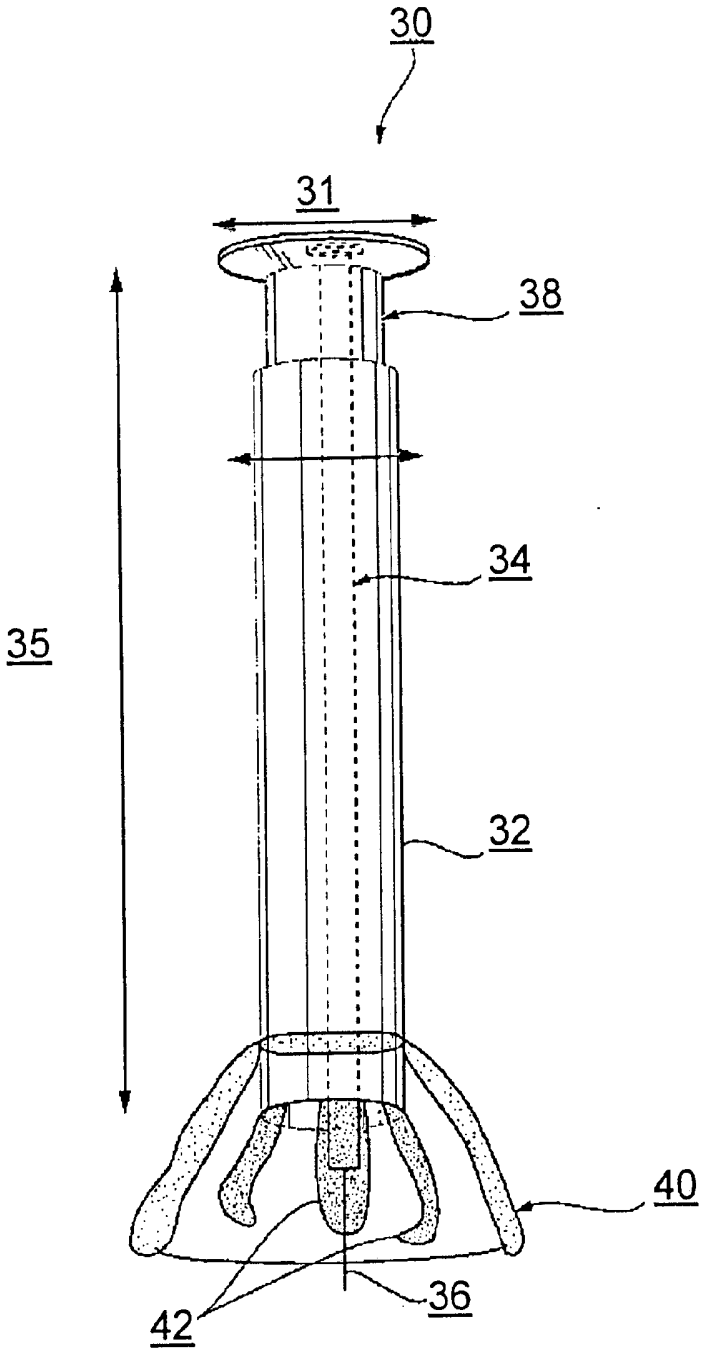
Obr. 3B



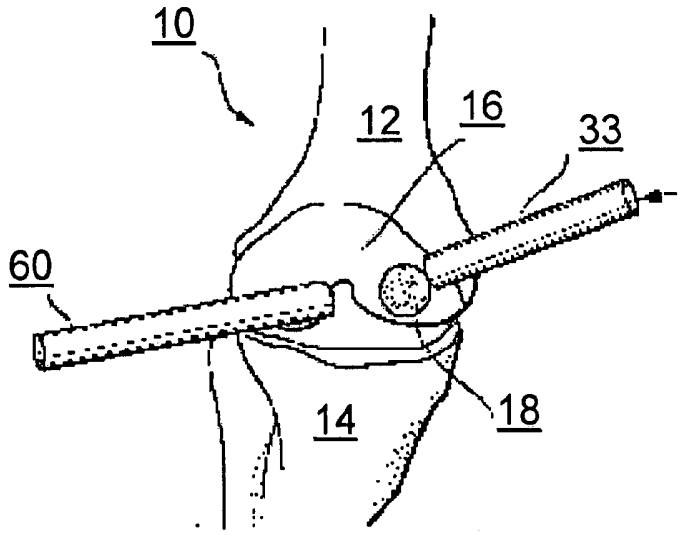
Obr. 4

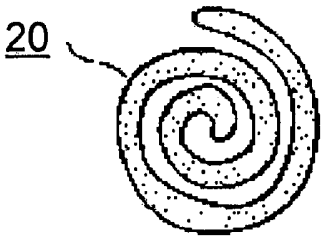


Obr. 5

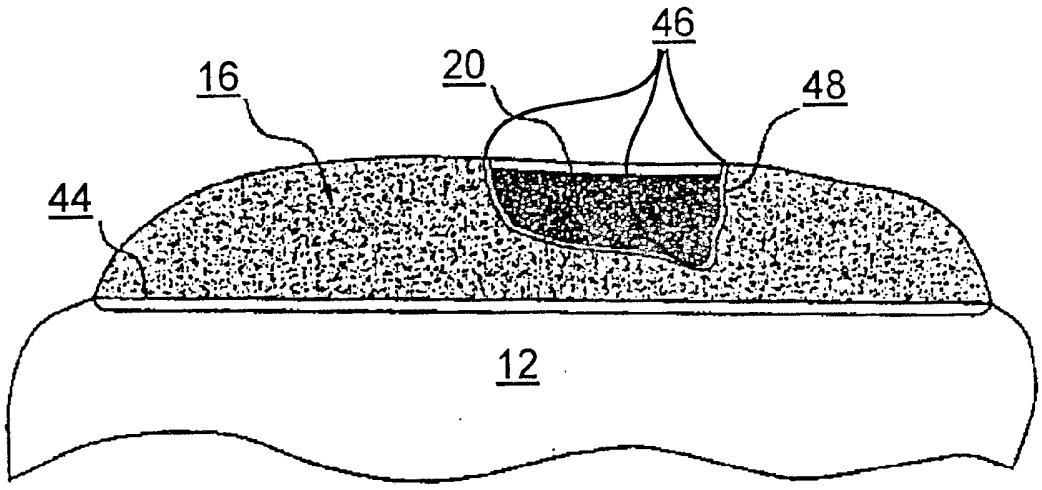


Obr. 6

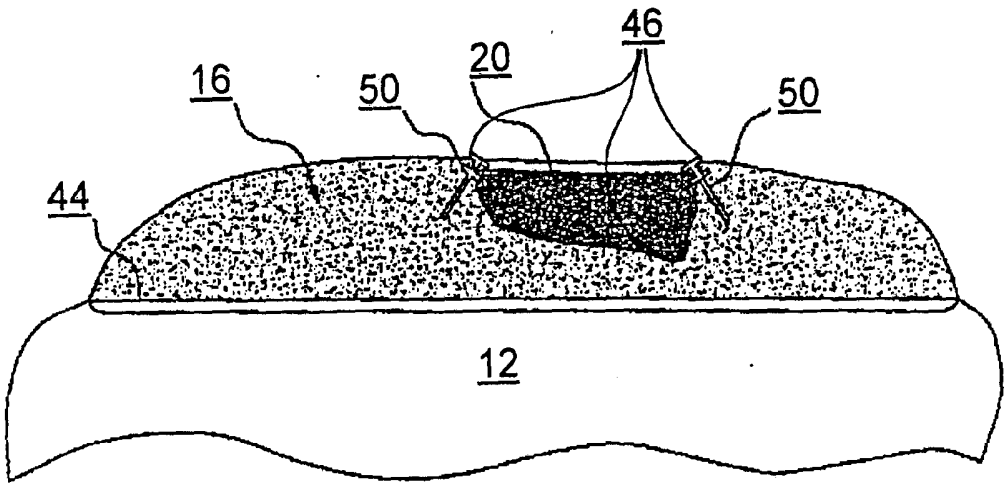




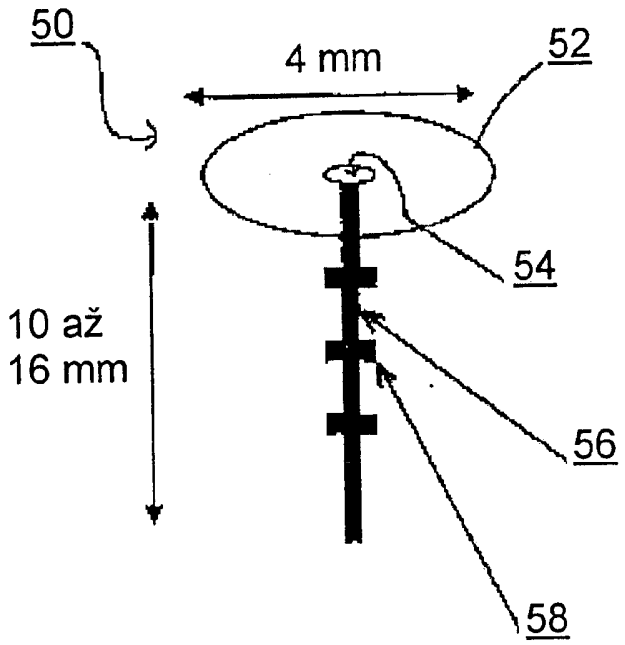
Obr. 7



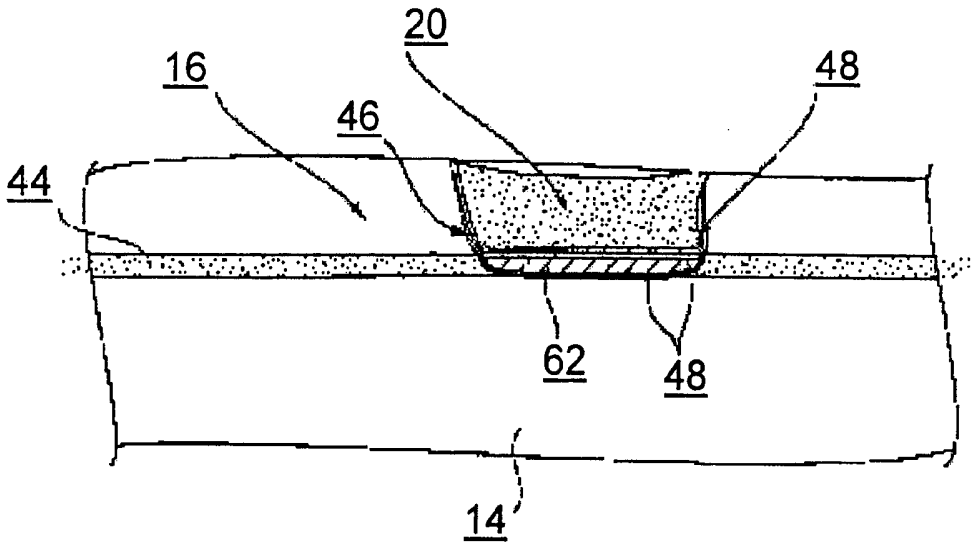
Obr. 8



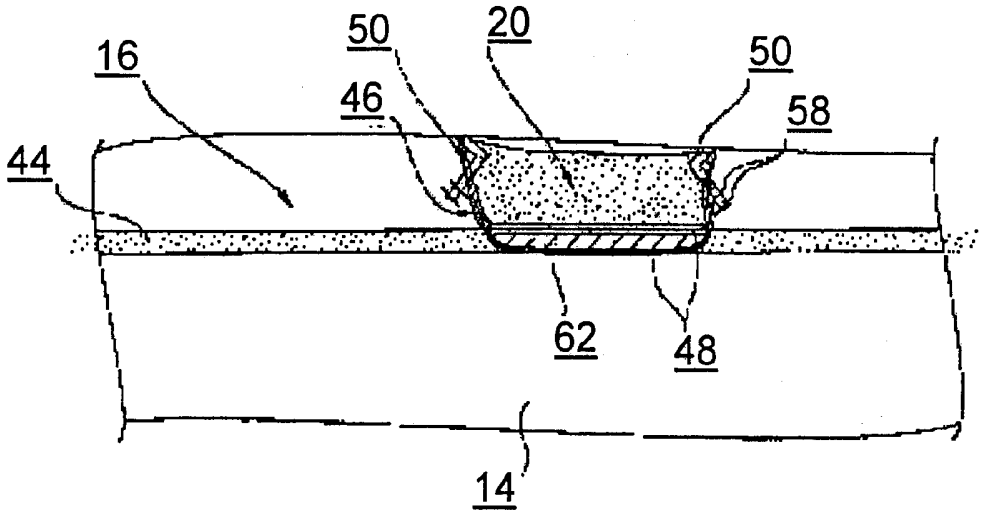
Obr. 9



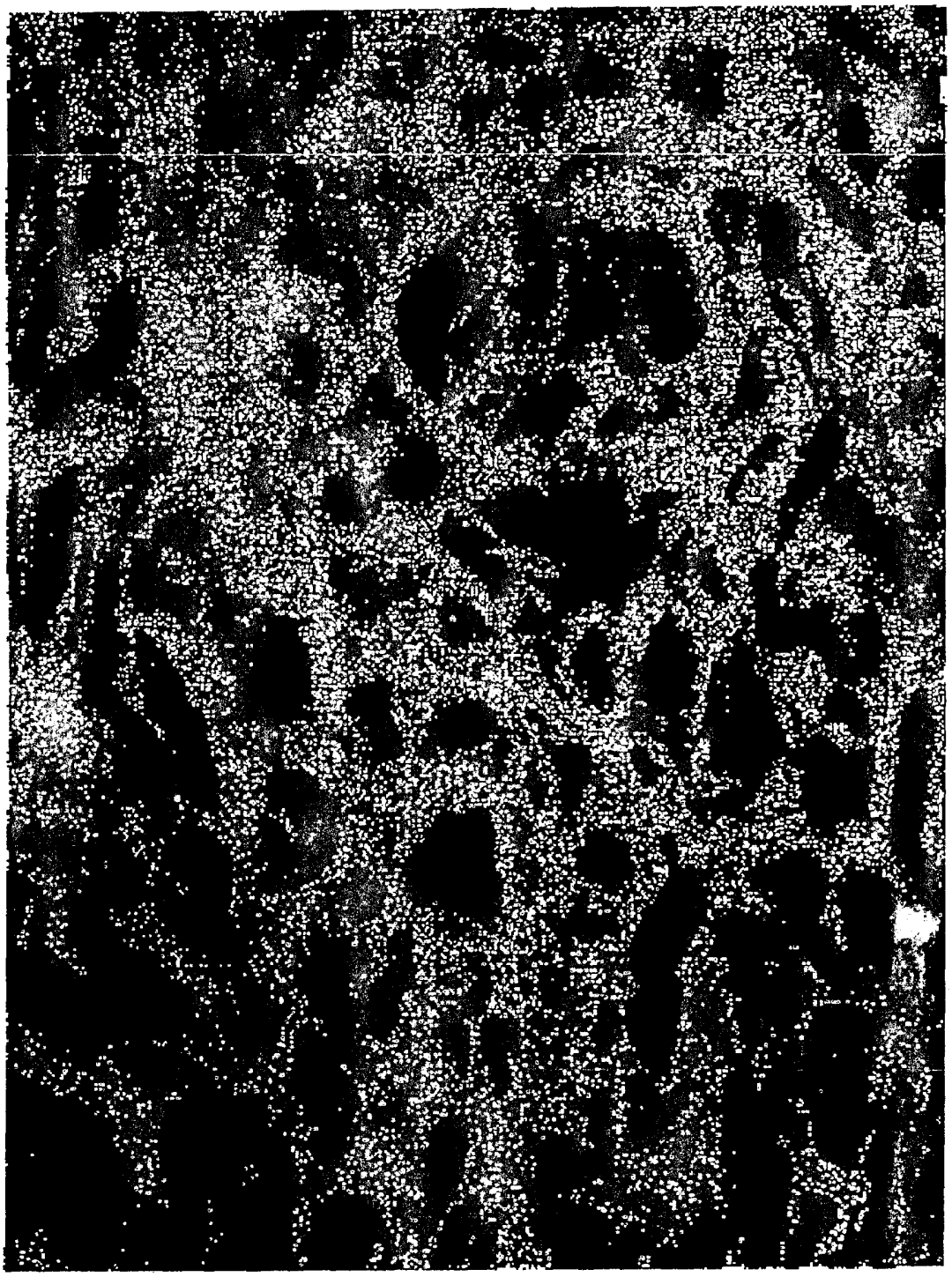
Obr. 10



Obr. 11

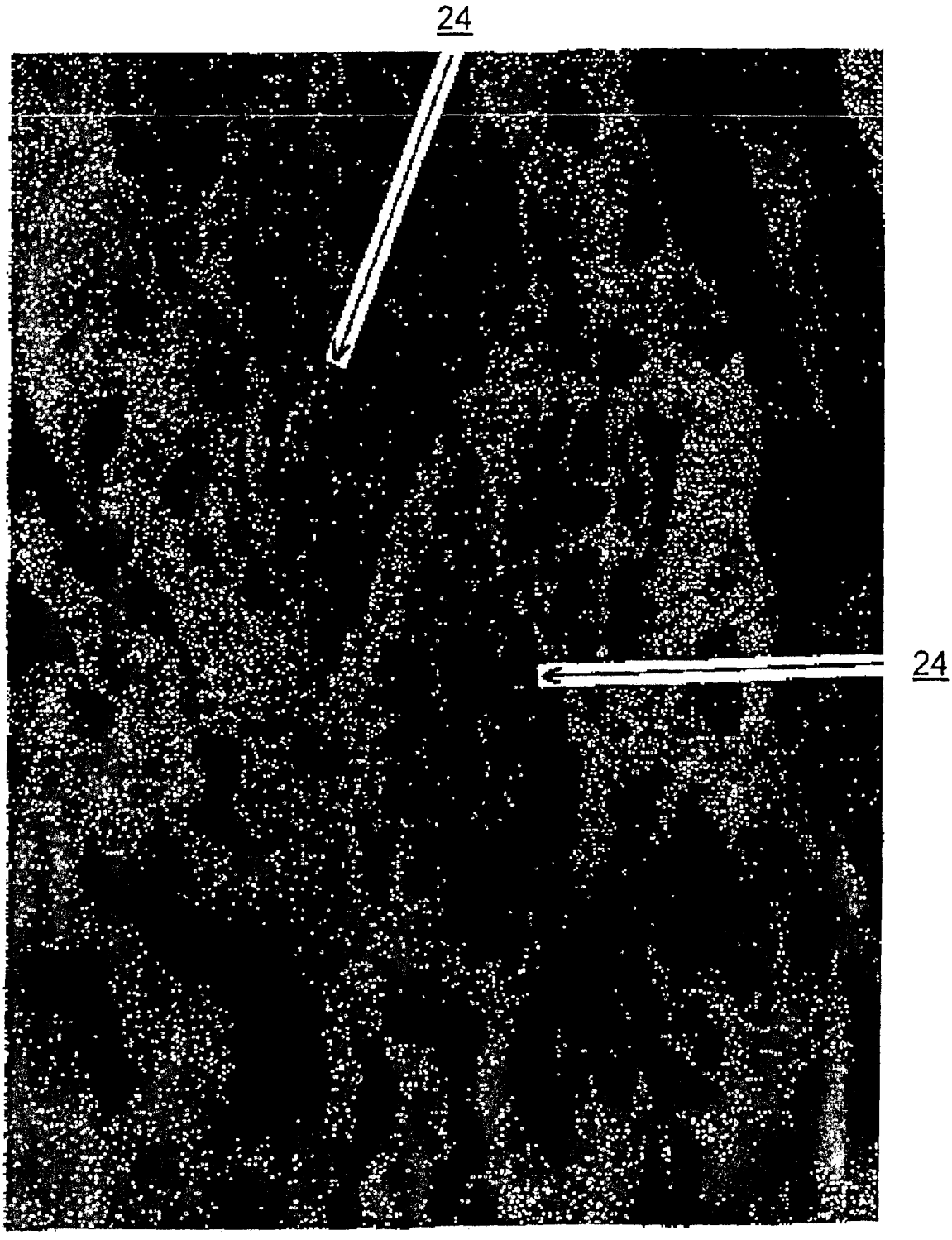


Obr. 12

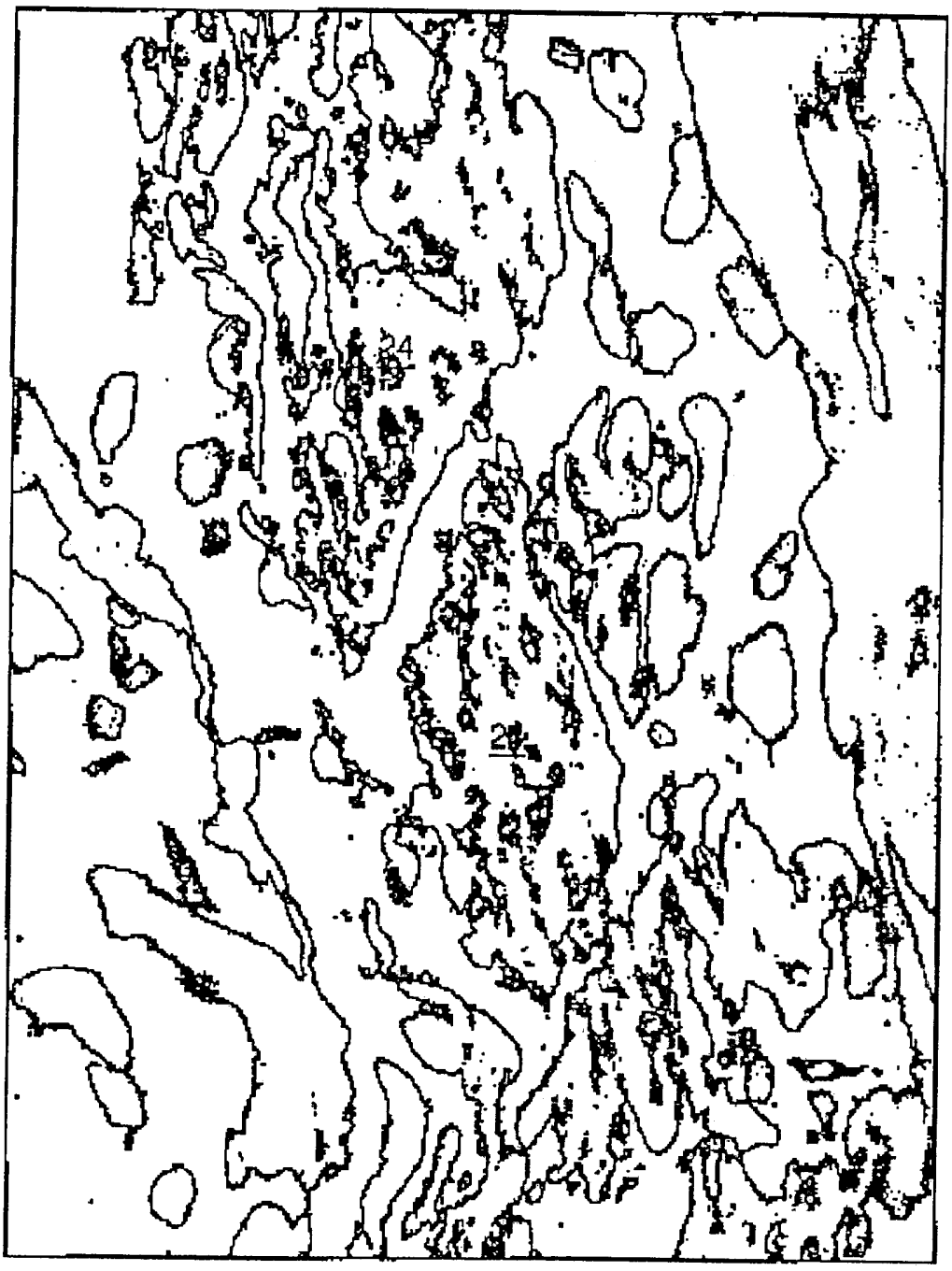


Obr. 13A

Obr. 13AA



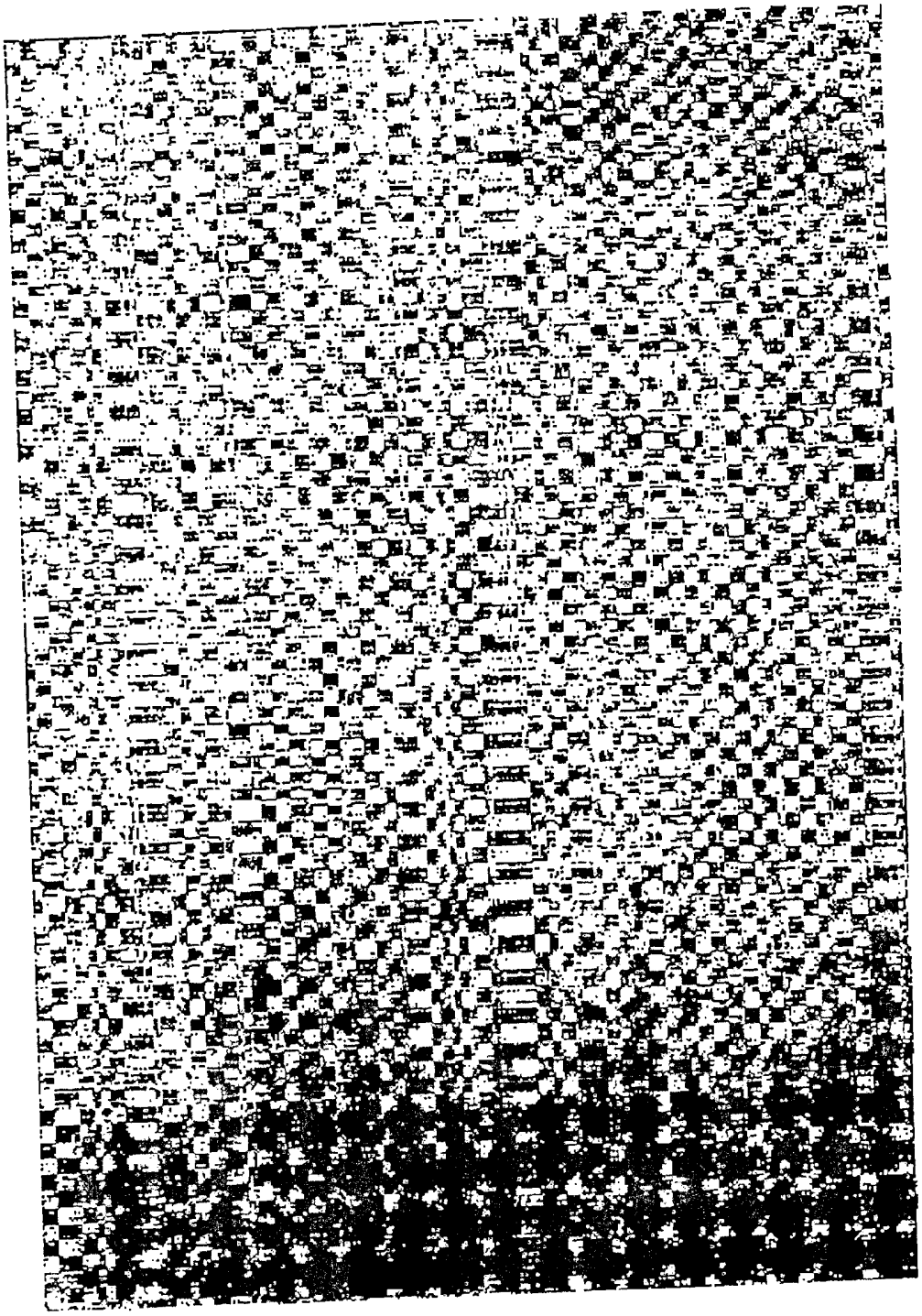
Obr. 13B



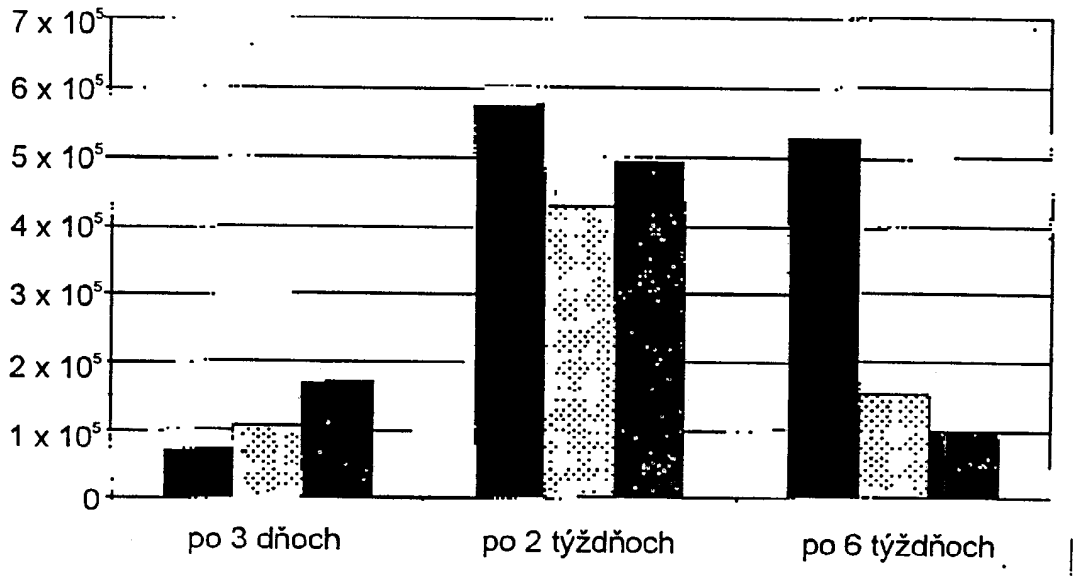
Obr. 13BB

Obr. 13C

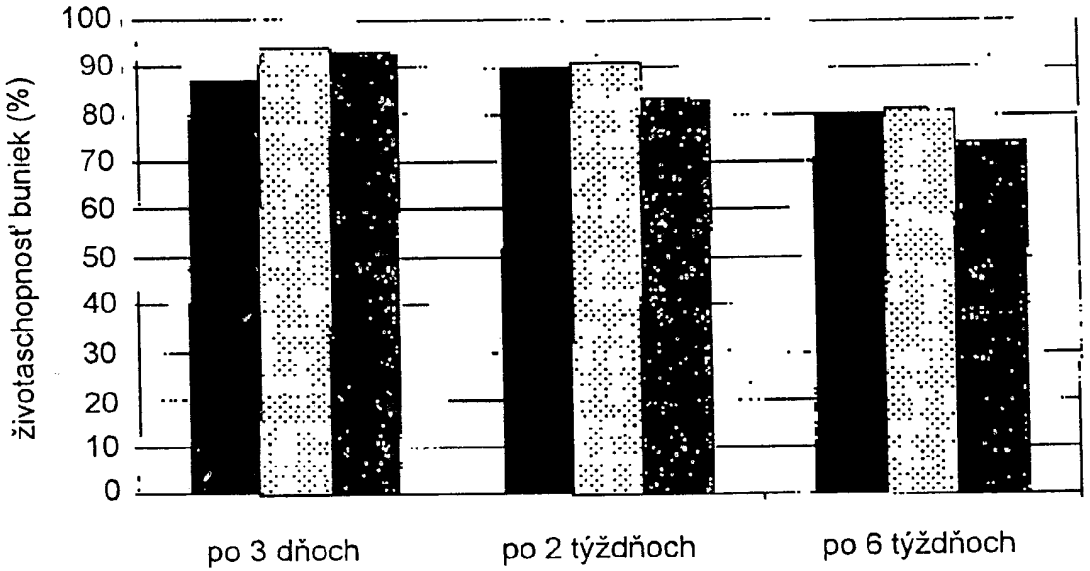
Obr. 13D



Obr. 14


7 x 10^5
6 x 10^5
5 x 10^5
4 x 10^5
3 x 10^5
2 x 10^5
1 x 10^5
0
po 3 dňoch
po 2 týždňoch
po 6 týždňoch

Obr. 15


životaschopnosť buniek (%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
po 3 dňoch
po 2 týždňoch
po 6 týždňoch

Obr. 16