

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 942425 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **942425**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61F 2/04
A61L 27/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **25.11.1992**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **25.05.1994**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **25.05.1994**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **25.11.1992 PCT/US1992/010165**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority
26.11.1991 US 799517

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Research Development Foundation, 402 North Division Street, Carson City, NV 89703, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Shenaq, Saleh M., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •Gray, Kathy Jo, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Sikiökalvoista tehtyjä putkia hermo- ja verisuonisiirteitä varten
Rör gjorda av fosterhinnor för nerv- och blodkärstransplantationer

Sikiökalvoista tehtyjä putkia hermo- ja verisuonisiirteitä varten

Keksinnön ala

5 Keksintö kohdistuu sikiökalvoista tehtyihin putkiin hermo- ja verisuonisiirteitä varten.

Keksinnön tausta

Olemme valinneet lähtömateriaaliksemme sikiökalvot amnionin ja korionin useiden syiden perusteella. Ihmisestä
10 peräsin olevat sikiökalvot ovat edullisia, vaikka keksinnössä onkin mahdollista käyttää eläinten kalvoja. (1) Yhdessä tämän keksinnön kohteessa olemme osoittaneet, että humaaniamnionista ja -korionista tehtyjen johdinkanavien immunogeenisyys on vähäistä rotissa, mistä on saatu todisteita tutkittaessa niiden kalvoissa olevia erilaisia anti-
15 geenejä, pääasiassa kollageenityyppejä I, II ja III, fibronektiiniä ja laminiinia, täpläblottaus- ja ELISA-menetelmillä. (2) Ihmisen istukoita on saatavilla suhteellisen rajoittamattomia määriä ja pienin kustannuksin. (3) Amnionia ja korionia on käytetty lähes 90 vuotta useisiin erilaisiin lääketieteellisiin ja kirurgisiin hoitotarpeisiin. (4) Niillä on osoitettu olevan uudissuonittuvuutta. (5) Niitä on myös sijoitettu ihonalaisiin taskuihin ihmisessä, eikä näyttöä akuutista hylkimisestä ole saatu seurattaessa reaktiota jopa 7 viikon ajan. Sikiökalvot ovat monimutkainen biokemiallinen rakenne, jonka fysikaaliset ominaisuudet ovat ainutlaatuiset. Niitä voidaan modifioida fysikaalisesti tässä keksinnössä kuvattavalla valmistusmenetelmällä puolijäykiksi ja kimmoisiksi johdinkanaviksi,
20 joiden pituus, läpimitta ja paksuus vaihtelevat. Amnion- ja korionkalvojen biokemialliset komponentit ovat pääasiassa kollageenityyppejä I, II ja III, laminiinia ja fibronektiiniä sekä muita glykoproteiineja. Laminiinin on osoitettu edistävän aksonin pitenemistä sen perusteella, että
25 se on vuorovaikutussuhteessa niiden aksonin glykopro-

30
35

teiniin kanssa, jotka kuuluvat integriiniryhmän reseptoreihin. Suorittamamme immunosytokemialliset tutkimukset saivat meidät muuttamaan käyttämäämme amnion- ja korionkalvojen valmistusmenetelmää tässä keksinnössä tuonnempana kuvattavalla tavalla laminiinin säilyttämiseksi näiden johdinkanavien merkittävänä komponenttina.

Vaikkakin ihmisen amnion- ja korionkalvot ovat edullisia, muodostavat muista eläimistä peräisin olevat vastaavat kalvot, kuten naudan kalvot, toisen puolen tästä keksinnöstä.

On kliinisesti hyväksyttyä, että hermoautograaftin käyttö on juuri se oikea menetelmä, jota tulee käyttää puuttuvan hermonosan rekonstruoimiseen. Hermoautograafteilla on osoitettu olevan useita haittoja, toisin sanoen näissä tarvitaan uutta kirurgista toimenpidettä, luovutuskohdan arpeutuminen, johon liittyy tunnottomuutta tai lisääntyneitä tuntoherkkyyttä, voi muodostaa ongelman, ja luovutukseen käytettyjen siirteiden mittasuhteet tuovat usein rajoituksia. Vaikkakin hermoallograafteilla on välttytty useilta autograaftien haitoilta, muodostaa siirteiden hyljintä yhä suuren ongelman ja rajoittaa immunosuppressiivisten aineiden käytöstä huolimatta näiden kliinistä käyttöä.

Mielenkiinto ja tulevaisuuden suuntaviivat hermotutkimuksessa kohdistuvat kliiniseen käyttöön soveltuvan ihanteellisen hermon johdinkanavan kehittämiseen. Useat tutkijat ovat tutkineet eri materiaalien, joihin kuuluvat silikonikumi, PTFE, polyortoesteri, polyglaktiini, mesoteeliputket, lihaksen tyvikalvo ja verisuonisiirteet, käyttöä hermon johdinkanavina. Jokaisella näistä mainituista materiaaleista on omat haittansa eikä minkään niistä ole osoitettu varmuudella saavan aikaan ihanteellista ympäristöä regeneroituvalla hermolla. Ihanteellisen hermon johdinkanavan olisi oltava vaikeuksitta saatavilla, kustannuksiltaan alhainen, helposti valmistettavissa, saata-

villa eri kokoisina, ei-immunogeeninen, mikrohuokoinen, kokoonpainumaton, biologisesti hajoava ja valmistettavissa biokemiallisista komponenteista, jotka muodostavat suotuisan ympäristön regeneroituville aksoneille. Kuten tässä
 5 keksinnössä on tuonnempana kuvattu, olemme kehittäneet hermon johdinkanavan, jossa käytetään ihmisen amnionkalvoa, jolla on ehdotetun ihanteellisen hermon johdinkanavan useita ominaisuuksia.

Useat tutkijat selvittelevät nykyisin kollageenin
 10 käyttöä hermon johdinkanavia varten. Tämä kollageeni on pakostakin alkuperältään joko allogeenistä tai ksenogeenistä ja voi siten stimuloida immuunivastetta, mikä saattaa estää hermon regeneroitumista. Tämän keksinnön mukaisten amnion- ja korionhermojohdinkanavien immuno-
 15 logisessa tutkimuksessa osoittautui esiintyvän vähäinen ja merkityksetön immuunivaste, ja tällaisilla kanavilla vältytään siten joiltakin inhiboivilta tekijöiltä, jotka saattaisivat vaikuttaa regeneroituvaan hermoon. Vaikkakin amnion- ja korionjohdinkanavissa esiintyi paljain silmin
 20 ja elektronimikroskoopilla tarkasteltaessa merkkejä biologisesta hajoavuudesta ja rakenteen uudelleenorganisoitumisesta, paikallisten tulehdussolujen tunkeutuminen oli vähäistä ja se rajoittui johdinkanavan seinämää ympäröivään alueeseen eikä tämä aiheuttanut muutoksia, jotka olisivat
 25 muistuttaneet kroonisesta hermojen puristumisesta aiheutuvia muutoksia. Näiden viimeksi mainittujen muutosten kehittyminen on huomattava ongelma, joka on ilmaantunut käytettäessä silikonikumijohdinkanavia hermojen regeneroitumiseen.

30 Amnion- ja korionjohdinkanavia käyttäen suoritettua hermogeneraatiosta tehty toiminnallinen ja morfologinen arviointi osoitti tämän ylivoimaisuuden hermoautografteihin ja silikoniputkiin verrattuna.

35 On myös tarpeen saada käyttöön verisuonia, jotka voidaan yhdistää proksimaali- ja distaalipäistään veri-

suoniin niiden vahingoituttua, kuten silloin, kun näihin on tullut tromboosi ja osa verisuonesta poistetaan. Ohitusleikkauksissa voidaan välttää laskimoiden ottoa alaraajoista näihin tarkoituksiin, ja vastaavanlainen tilanne esiintyy myöhemmissä ohitusleikkauksissa, kun potilaalla ei ole vaatimukset täyttävää laskimoa korvaamaan poistettavia tromboottisia valtimoita. Laskimosiirteiden käyttöä rajoittavia merkittäviä ongelmia ovat myös luovutuskohtan sairastavuuden ohella siirteiden seinämän pettäminen ja ontelon umpeenkasvu. Yleisesti käytetyt verisuonijohdinkanavat ovat laskimosiirteitä, jotka on otettu potilaan ala- tai yläraajoista. Luovutuskohtan sairastavuus sekä se, ettei sepelvaltimon ohitusleikkaukseen ja periferaalisten verisuonten interpositio-ohitusleikkaukseen käytettävien laskimosiirteiden pysymistä avoimina voida varmuudella ennustaa, ovat tunnettuja tosiasioita. On tehty kokeiluja monilla verisuonijohdinkanavilla, jotka ovat yleisessä käytössä ja joihin kuuluvat naudan laskimosiirrepreparaatit, dacronproteesit, teflonproteesit ja napa-
valtimosiirteet. Näillä siirteillä on myös ongelmana tromboosin ja infektioiden korkea ilmaantuvuus. Ihanteellisen verisuonisiirteiden konstruoimiseksi siirteiden tulisi olla ei-trombogeneeninen, vaikeuksitta saatavilla, niitä tulisi olla läpimitaltaan ja pituudeltaan vaihtelevia, laajennettavissa olevia ja joustavia.

Tämän keksinnön mukaiset amnion- ja korionkollageeniputket tai -johdinkanavat ovat ei-immunogeenisiä ja niistä voidaan konstruoida suuremmitta vaikeuksitta eriläpimittaisia ja eripituisia putkia. Tämän keksinnön mukaiset amnion- ja korionputket soveltuvat hyvin käytettäväksi hermosiirteinä tai ohitusjohdinkanavina sepelvaltimoiden ohitusleikkaukseen tai verisuonien ohitusleikkaukseen.

Keksinnön yhteenveto

Tämä keksintö kohdistuu siihen, että siitä saadaan käyttöön siirteiden tekoon soveltuvia hermo- ja verisuoniputkia tai -johdinkanavia hermoissa ja verisuonissa esiintyvien katkosten yhdistämiseksi. Kalvon muodossa olevien kollageenityyppien I, II ja III, jotka ovat peräisin istukoiden amnionista ja korionista, fysikaalisia ominaisuuksia on modifioitu ja putket on konstruoitu pysymään avoimina ja joustavina, jotta veri pääsee kulkemaan ontelon läpi ja jotta niiden seinämät kestäisivät interstitiaalista painetta, ja joissa sisäpuolen muodostaa kalvon sikiön puoleinen eli kiiltävä puoli, joka hermosiirteiden ollessa kyseessä edistää aksonin kasvua.

Yhdessä tämän keksinnön kohteessa tällaisen siirteen aikaansaamiseksi amnion ja korion otetaan varastoitamattomista istukoista, jotka ovat edullisesti ihmisestä, amnion- ja korionkerrokset erotetaan istukasta ja toisistaan, kalvon sikiönpuoleisen tyvikalvon päällä sijaitseva yksisolukerros materiaali poistetaan, mikä tapahtuu trypsiini- tai pepsiinikäsittelyllä, amnion ja korion huuhtelun useita kertoja fosfaattipuskuriliuoksella tai tislattulla vedellä kunnes ne on saatu puhtaiksi, minkä jälkeen amnion tai korion silloitetaan joko gamma säteilyttämällä tai käyttäen kemiallisia silloitusaineita, kuten glutaari-aldehydiä, jollainen käsittely steriloi kudoksen, antaa suojan virustautien leviämistä vastaan, vahvistaa rakennetta ja mahdollistaa materiaalin muokkauksen uudelleen ohuesta kalvosta johdinkanavan muotoon. Ohuet amnion- ja korionkalvot kääritään itsensä ympärille kerroksiksi siten, että kiiltävä sikiön puoleinen pinta suuntautuu lopullisen putken sisäpintaa kohti. Käärittävien kerrosten lukumäärä on riippuvainen putken pituudesta ja läpimitasta. Tämän jälkeen putket kuivataan ja pannaan pulloihin, jotka suljetaan, joihin kiinnitetään nimilaput ja jotka haluttaessa käsitellään 2,5 Mradin suuruisella gamma-

säteilyannoksella johdinkanavan kollageenin silloittamisen jatkamiseksi ja sen steriloimiseksi uudelleen. Kerrokset voidaan haluttaessa liimata yhteen sopivalla liimalla, kuten fibriiniliimalla, kerrosten irtoamisen estämiseksi erityisesti suurehkoissa johdinkanavissa, kuten verisuonisiirteisiin käytettävissä kanavissa.

Putket tai johdinkanavat voidaan sitten ennen niiden käyttöönottoa varastoida esimerkiksi -20 °C:ssa.

Hermosiirteiden ollessa kyseessä voidaan amnion- ja korionputkissa käyttää implantaatiota tehtäessä hermon kasvua edistäviä tekijöitä, esimerkiksi tyvikalvopartikkeleita, fibronektiiniä, kollageenuutetta, hermokasvutekijöitä ja muita näitä muistuttavia kasvutekijöitä.

Edellä olevan esityksen mukaisesti tämän keksinnön kohteena on saattaa käyttöön vahingoittuneen ääreishermon proksimaalisten ja distaalisten päiden tai verisuonen proksimaalisten ja distaalisten päiden yhdistämiseen soveltuva putkimainen siirre, jolla vältetään edellä mainituilta tekniikan tason mukaisten ratkaisujen haittatekijöiltä ja josta saatavat edut on mainittu edellä.

Tämän keksinnön kohteena on lisäksi saattaa käyttöön siirre, joka soveltuu vahingoittuneen ääreishermon proksimaalisten ja distaalisten tynkien yhdistämiseen tai verisuonen proksimaalisten ja distaalisten päiden yhdistämiseen ja joka käsittää sylinterimäisen seinämän, joka on muodostettu tyyppin I, II ja III kollageenista muodostuvan ja ihmisen istukasta peräisin olevan steriloidun ohuen kalvon kerroksista, josta solumateriaali on olennaisesti poistettu ja jonka sikiönpuoleinen puoli suuntautuu sisäänpäin ja sen kollageeni on silloitettu säteilyttämällä tai kemiallisesti, jossa sylinterissä on riittävä määrä kerroksia sylinterin pitämiseksi vapaana tai avoimena, ja sylinteri on pitempi kuin proksimaalisten ja distaalisten tynkien tai päiden välinen etäisyys ja sen läpimitta vas-

taa ainakin distaalisten tynkien tai päiden sidekudosten läpimittaa.

Tämän keksinnön kohteena on lisäksi saattaa käyttöön sellainen siirre, jossa amnion- ja/tai korionkalvojen kerrokset on liimattu sillä tavoin yhteen, että kerrokset eivät pääse erottumaan.

Vielä yhtenä tämän keksinnön kohteena on saattaa käyttöön sellainen sylinterimäinen siirre, jossa interstitiaalinesteen kulkeutuminen seinämän läpi on mahdollista, mikä edistää siirteen ravinnonsaantia varhaisessa kehitysvaiheessa ja hermosiirteiden ollessa kyseessä mahdollistaa Schwannin solujen kasvuun tarvittavan ravinnonsaannin.

Vielä yhtenä tämän keksinnön kohteena on saattaa käyttöön sylinterimäinen siirre, joka toimii tutkimusmallina ja johon on tarkoitus lisätä materiaalia, joka kuuluu hermojen regeneraation lääkehoidon tutkimukseen neurologian alalla.

Vielä yhtenä tämän keksinnön kohteena on saattaa käyttöön hermosiirre, joka käsittää amnion- ja/tai korionputken, joka sisältää asiaankuuluvia kasvutekijöitä.

Vielä yhtenä tämän keksinnön kohteena on saattaa käyttöön hermosiirre, joka käsittää tyvikalvopartikkeleita sisältävän amnion- ja/tai korionputken.

Vielä yhtenä tämän keksinnön kohteena on saattaa käyttöön siirre, joka voidaan tehdä suhteellisen pitkäksi, joka ei mene mutkalle, joka säilyttää muotonsa ja jossa oleva kanava pysyy vapaana tai avoimena.

Tämän keksinnön muut ja edellä mainitsemattomat kohteet, piirteet ja edut käyvät ilmi muualla tässä keksinnössä.

Edullisten sovellutusmuotojen selitys

A. Amnionin talteenotto ja käsitteleminen

Tässä tämän keksinnön kohteessa amnion hankitaan käyttöön ihmisen istukoista, jotka eivät ole ehtineet vie-

lä vanhentua. Istukat saadaan sairaalaan synnyttämään tul-
leilta synnytyspolttojen ja synnytyksen jälkeen 24 tunnin
kuluessa synnytyksestä. Valmistukseen käytetään istukoita,
5 jotka on saatu ainoastaan niiltä äideiltä, joille on suo-
ritettu AIDS- ja hepatiittivirusseulonta ja jotka eivät
kuulu korkean riskin ryhmiin, kuten suonensisäisten huu-
meiden käyttäjiin. Valmistuksessa huolehditaan siitä, että
ihokosketusta veren ja kudoksen kanssa vältetään ja että
työskentelytilojen kontaminoituminen näillä materiaaleilla
10 jää mahdollisimman vähäiseksi.

Amnionkerros erotetaan istukasta esimerkiksi irrot-
tamalla se sormin. Kaikesta talteenotetusta amnionista
valikoidaan sellaisia mahdollisimman suuria amnionkappa-
leita, jotka ovat tasapaksuisia. Valitut kalvokappaleet
15 pestään veren ja kaikkien kudospääteiden poistamiseksi
käyttäen runsaasti pesunestettä, joka on edullisesti fos-
faatilla puskuroitua fysiologista suolaliuosta tai tislai-
tua vedettä. Kalvojen pesua jatketaan, kunnes nämä ovat
valkeita ja läpinäkyviä.

20 Kalvon sikiötä vastaan olevalla puolella sijaitse-
van tyvikalvon pinnan yksisolukerros poistetaan, mihin
käytetään trypsiinikäsittelyä. Kalvoja käsitellään kahden
tunnin ajan huoneenlämmössä tislattua vedestä ja trypsii-
nistä suhteessa 1:1 valmistetussa liuoksessa. Käytetty
25 trypsiini on edullisesti peräisin sian haimasta, sen kon-
sentraatio on 25-prosenttinen eikä siinä käytetä kalsiumia
eikä magnesiumia. Trypsiinikäsittelyn jälkeen amnion huu-
dellaan useita kertoja, mihin käytetään edullisesti fos-
faatilla puskuroitua fysiologista suolaliuosta tai tislai-
tua vettä, kunnes saadaan puhtaita valkeita kalvoja, jois-
30 sa ei ole enää jäljellä yhtään vaaleanpunaista trypsiiniä.

Huuhdotut ohuet amnionkalvot pannaan pulloihin tis-
lattuun veteen ja niitä säteilytetään 500 000 radin annok-
sella gammasäteilyä. Amnionin säteilytys silloittaa kolla-
geenin, steriloi kudoksen, antaa eläimille suojan virus-
35

tautien leviämistä vastaan ja mahdollistaa materiaalin uudelleenmuotoilun ohuesta kalvosta kanavan tai putken muotoon. Pullot varastoidaan sitten pakastimessa -80 °C:ssa. Amnionkalvot voidaan haluttaessa silloittaa kemiallisesti käyttäen esimerkiksi glutaarialdehydiä.

B. Johdinkanavan valmistus

Pakastettu amnion noudetaan varastosta ja se sulatetaan sitten 3 - 4 tuntia huoneenlämmössä. Ohuet amnionkalvot tutkitaan preparointimikroskoopissa niissä esiintyvien virheellisyyksien havaitsemiseksi ja kalvon sikiönpuoleisen eli kiiltävän puolen määrittämiseksi. Sellaiset amnionkalvot, jotka ovat riittävän leveitä halutunpituista ja -levyistä johdinkanavaa varten, kootaan varovasti talteen rullauslaitetta käyttäen. Amnionkalvot asetetaan niin, että sikiön puoleinen kiiltävä pinta suuntautuu valmiin putken sisäpintaan päin.

Amnionkalvot kääritään edullisesti kerroksiksi erittäin hyvin kiillotetulla ruostumattomasta teräksestä valmistetulla telalla, jonka halkaisija on sopivan suuruinen, vaikkakin amnionkalvot voidaan kääriä millä tahansa halutulla tavalla.

Se amnionkalvojen kierrosten tai kerrosten lukumäärä, joka tarvitaan amnionsylinterin muodon säilyttämiseksi, mutkalle menemisen välttämiseksi ja pitämään se vapaina tai avoimena, on riippuvainen putken tai sylinterin pituudesta ja läpimitasta. Esimerkiksi 4,1 - 4,16 cm:n (1,6 - 1,8 tuuman) läpimittaisiin johdinkanaviin tarvitaan noin 10 kierrosta amnionia ja läpimitan ollessa 6,35 cm (2,5 tuumaa) saadaan tyydyttävä tulos käyttämällä 15 kierrosta. Johdinkanavat voivat olla niin pitkiä kuin niiden halutaan olevan. Teloilla olevat putket kuivataan sitten 40 - 60 °C:ssa lämpökaapissa noin 30 minuutin ajan. Kuivaaminen helpottaa putkien poistamista teloilta. Kerrosten irtoamisen estämiseksi voidaan haluttaessa käyttää sopivaa liimaa, kuten fibriiniliimaa, liimaamaan amnionkalvojen

kerrokset tai kierrokset yhteen. Putket pannaan sitten pulloihin, jotka suljetaan, varustetaan nimilapuilla ja säteilytetään 2 000 000 radin annoksella gammasäteilyä johdinkanavien kollageenin steriloimiseksi uudelleen ja tämän silloittamisen jatkamiseksi. Tämän jälkeen johdinkanavat varastoidaan ennen käyttöönottoa -20 °C:ssa.

Esimerkki 1

Tässä esimerkissä arvioitiin humaaniamnionin tyvikalvon eheys ja tyvikalvon pitoisuus immunosytokemiallisilla menetelmillä ennen johdinkanavien konstruointia ja tämän jälkeen. Tämän keksinnön mukaisten humaaniamnionijohdinkanavien immunogeenisyys on vähäistä, mistä saatiin todisteita tutkimalla täpläblottaus- ja ELISA-menetelmillä amnionkalvossa olevia eri antigeenejä, jotka ovat pääasiassa tyyppin 1 kollageenia, fibronektiiniä ja laminiinia. Amnionia on käytetty lähes 90 vuotta hyvin moniin erilaisiin lääketieteellisiin ja kirurgisiin hoitotarpeisiin ja sillä on osoitettu olevan uudissuonittuvuutta. Sitä on myös asetettu ihonalaisiin taskuihin ihmisellä eikä näyttöä akuuttista hyljinnästä kyetty saamaan seurattaessa reaktiota jopa 7 viikon ajan.

Sikiökalvot ovat monimutkainen biokemiallinen rakenne, jonka fysikaaliset ominaisuudet ovat ainutlaatuiset. Ne modifioidaan fysikaalisesti tässä keksinnössä kuvatulla valmistusmenetelmällä johdinkanaviksi, jotka ovat puolijäykkiä, kimmoisia ja pituudeltaan, läpimitaltaan ja paksuudeltaan eri suuruisia. Amnionkalvojen biokemialliset komponentit ovat pääasiassa tyyppin I ja tyyppin III kollageenia, laminiinia, fibronektiiniä ja muita glykoproteiineja. Laminiinin on osoitettu edistävän aksonin pitemistä sen perusteella, että se on vuorovaikutussuhteessa niiden aksonin glykoproteiinien kanssa, jotka kuuluvat integriiniryhmän reseptoreihin. Tämän keksinnön mukaisen amnionkalvon valmistusmenetelmät säilyttävät laminiinin merkittävänä komponenttina näiden komponenttien joukossa.

Tämän keksinnön mukaisella menetelmällä, jossa käytetään gamma säteilytystä, on useita etuja. On osoitettu, että kaikki bakteerit, sienet ja virukset (mukaan lukien AIDS) tuhoutuvat 0,20 Mradin annoksella. Edullisesti käytetään
 5 2,5 Mradin annosta, jotta voidaan varmistua lopullisen materiaalin täydellisestä steriiliydestä. Tämä annos myös lisää amnionkollageenin silloittumista, mikä lujittaa sitä ja mahdollistaa siten sen, että amnionjohdinkanavat ovat valmistettavissa puolijäykkään muotoon ja ne säilyvät samalla jonkin verran kimmoisina pysyäkseen avoimina implantaation jälkeen. Kuten aiemmin mainittiin, kemiallinen silloitus tunnetuilla menetelmillä, kuten glutaarialdehydikäsitteilyllä, on kuitenkin tehokas ja tyydyttävään tulokseen johtava keino.

15 Immunologisessa tutkimuksessa ilmeni, että amnionhermojohdinkanavasta aiheutui vähäinen ja merkityksetön immuunivaste, mikä siten merkitsee sitä, että näillä voidaan välttää joitakin inhibitorisia tekijöitä, jotka saattaisivat vaikuttaa regeneroituvaan hermoon. Vaikkakin
 20 amnionjohdinkanavissa osoittautui esiintyvän merkkejä biologisesta pilkkoutuvuudesta ja rakenteen uudelleenorganisoinnista paljain silmin ja elektronimikroskopisesti tutkittaessa, oli paikallisten tulehdussolujen tunkeutuminen kudokseen vähäistä ja se rajoittui johdinkanavan seinämää ympäröivään alueeseen eikä saanut aikaan krooniseen hermojen puristumiseen johtavia muutoksia. Tämän viimeksi mainitun ilmiön kehittyminen on merkittävä ongelma, joka on ilmaantunut käytettäessä hermojen regeneroitumista varten tarkoitettuja silikonikumisia johdinkanavia, joiden on viime aikoina ehdotettu soveltuvan
 30 kliiniseen käyttöön.

Amnionjohdinkanavien pitkäaikaistutkimuksissa on saatu näyttöä huomattavista rakenteellisista muutoksista, mistä ovat todisteina Schwannin solujen tyyppisten solujen
 35 tunkeutuminen kudokseen johdinkanavan kerrosten läpi sekä

kollageenin uudelleenorganisaatio, mikä viittaa biologiseen pilkkoutuvuuteen ja uudelleenorganisoitumiseen, mikä on amnionjohdinkanavan ainutlaatuinen ominaisuus.

Kuten aiemmin mainittiin, voidaan tämän keksinnön
 5 mukaista amnionputkea käyttää kantajamateriaalina hermojen regeneraatiota edistäville monille materiaaleille, kuten tyvikalvo, fibronektiini, kollageenuute, hermokasvutekijät ja muut näitä muistuttavat tekijät. Kollageenuute on
 10 humaanisikiökalvoista uutettua kollageenia, kuten esimerkiksi US-patenttijulkaisussa nro 5 002 071 kuvattua uutetta. Tyvikalvoa voidaan esimerkiksi käyttää amnionputkessa implantaatiota tehtäessä kylmäkuivattuna, jauhettuna, polaroituna tai säilöttynä mihin tahansa säilyteaineliuokseen.

15 **Esimerkki 2**

Tässä esimerkissä määritettiin hermojen regeneraatio tämän keksinnön mukaisen johdinkanavan läpi morfologisia ja toiminnallisia piirteitä seuraten vertaamalla niitä autografeihin ja muuntyyppisiin hermoputkiin koe-eläinmallissa.
 20

Yksitoista kissaa jaettiin viiteen ryhmään säärihermoon tehdyn 4 cm mittaisen katkoksen läpi tapahtuvan hermojen regeneraation arvioimiseksi.

Ryhmä 1 (3 eläintä) amnionputki.

25 Ryhmä 2 (3 eläintä) amnionputki ja tyvikalvo lihaksesta eristettynä neurotrofisenä tekijänä.

Ryhmä 3 (3 eläintä) hermoautografti.

Ryhmä 4 (1 eläin) valeleikkaus kontrollina.

Ryhmä 5 (1 eläin) ei korjausta.

30 Eläimiä seurattiin kuusi kuukautta, jonka jälkeen ne otettiin tutkittaviksi ja hermosteinit tutkittiin morfologisesti ja histologisesti.

Kissat nukutettiin käyttäen Demerolia ja fenobarbitaalia lihaksensisäisesti ja halotaania ja NO₂:ta in-

halaationa. Säärihermo paljastettiin ja siitä irrotettiin 4 cm:n pituinen segmentti, joka korjattiin seuraavasti:

Ryhmässä 1 (amnion) ommeltiin amnionputki distaali-
seen ja proksimaaliseen tynkään, millä varmistettiin
5 4 cm:n pituisen katkoksen syntyminen. Tehtiin kaksi ommel-
ta, jotka sijoitettiin kummallekin puolelle 180° kulmaan
toisiinsa nähden ja ne lävistivät pelkästään hermon tyngän
epineuriumin sisältävän putken koko sen paksuudelta.

Ryhmässä 2 (amnionputki - tyvikalvo) - menetellen
10 edellä olevan kohdan mukaisesti hermosta irrotettiin
4 cm:n pituinen segmentti ja aukko sillattiin amnion-
putkella, johon oli lisätty tyvikalvoa.

Ryhmässä 3 (hermoautografti) irrotettiin 4 cm:n pi-
tuinen segmentti, joka sitten kiinnitettiin takaisin käyt-
15 täen epineuraalimenetelmää.

Ryhmässä 4 (valeleikkaus) tutkittiin säärihermo,
johon ei koskettu.

Ryhmässä 5 (ei korjausta) irrotettiin säärihermosta
4 cm:n pituinen segmentti ja sen jääminen korjaamattomaksi
20 varmistettiin ompelemalla hermontyngät alla olevaan lihak-
seen.

Eläimiä seurattiin kuusi kuukautta eikä missään
kokeeseen osallistuneessa ryhmässä valeleikkausta lukuun
ottamatta havaittu tapahtuneen toimintojen parantumista.

Kissat tapettiin kuuden kuukauden kuluttua ja niis-
tä tehtiin morfologiset ja histologiset tutkimukset. Tu-
lostien mukaan on suositeltavaa käyttää amnion-tyvikalvo-
yhdistelmää vahvana ehdokkaana hermojen regeneraatioon ja
ne osoittivat, että lihaksen tyvikalvon lisäys amnion-
30 kollageeniputkeen tehostaa hermojen regeneraatiota.

Aksonien läpimitoista valmistetuissa histogrammeis-
sa amnion-tyvikalvoyhdistelmän sisältävässä ryhmässä
osoittautui esiintyvän jakautuma, joka oli verrattavissa
valeleikkaukseen, ja tämän aksoneit olivat jopa suurempia
35 ja huomattavan suuri osa aksoneista (9 %) osui 1,5 - 2,25

mikrometrin alueelle. Hermoautografitin ollessa kyseessä histogrammi oli verrattavissa valeleikkaukseen, mutta suurempi osuus aksoneista (37 %) osui 0,5 - 0,75 mikrometrin alueelle. Amnionputkiryhmässä aksonien läpimitat ulottuivat 0,1 - 1 mikrometrin alueelle ja suurin osa aksoneista (58 %) osui 0,25 - 0,5 mikrometrin alueelle. Aksonien läpimittaa kuvaavat histogrammit osoittivat, että tyvikalvo myötävaikutti suurempien aksoneiden muodostumiseen ja niistä saatiin lähinnä normaaleja olevia aksoneita.

Johtopäätökset tästä esimerkistä ovat, että humaaniamnionjohdinkanavat ovat vahvoja ehdokkaita käytettäväksi vaihtoehtoisten materiaalien tilalla hermosiirteiden tekoon, ja että lihaksen tyvikalvo osoittautuu olevan hyvä neurotrofinen materiaali amnionkollageeniputkeen lisättyinä. Amnionjohdinkanavat, joihin on lisätty tyvikalvoa, ovat ylivoimaisesti hermoautogرافteja parempia. Humaaniamnionkollageeniputket ovat hyviä johdinkanavia hermojen regeneraatioon ja niitä voidaan käyttää minkä tahansa neurotrofisen materiaalin varastona.

20 Esimerkki 3

Tässä esimerkissä käytettiin humaaniamnionin tilalla humaanikorionia. Korionkalvo erotettiin amnionkalvosta, minkä jälkeen se otettiin talteen ja käsiteltiin kappaleessa A esitetyllä tavalla ja kappaleessa B esitetyllä tavalla muodostetut johdinkanavat olivat ominaisuuksiltaan esimerkeissä 1 ja 2 kuvattuja ominaisuuksia vastaavat ja niillä saatiin tyydyttävät tulokset sekä hermojen kasvun että verisuoniputkien ollessa kyseessä. Mikäli korion on erotettu amnionista, voidaan trypsiini- tai pepsini-käsittelyn sisältävä vaihe jättää pois.

30 Esimerkki 4

Tässä esimerkissä käytettiin humaanikalvojen tilalla naudan amnion- ja korionkalvoista peräisin olevia kollageenityyppejä I, II ja II ja näiden yhdistelmiä, jotka esikäsiteltiin ja joista muodostettiin johdinkanavia

tai putkia edellä kuvatulla tavalla ja joista saatiin sekä hermojen kasvun että verisuoniputkien osalta samanlaisia ja asetetut vaatimukset tyydyttäviä tuloksia kuin mitä edellä on kuvattu humaanikalvojen kyseessä ollessa.

5 Tämän keksinnön mukaiset menetelmät käsittävät sen, että vahingoittuneen hermon proksimaaliset ja distaaliset tyngät tai päät tai proksimaaliset ja distaaliset verisuonen päät yhdistetään putkella, joka käsittää ainakin yhden kerroksen steriloitua silloitettua kalvoa, jossa ei
10 ole solu- tai epiteelimateriaalia, joka käsittää tyyppin I, II tai III kollageenia tai näiden seoksia, laminiinia, fibronektiiniä ja muita glykoproteiineja ja jonka sikiönpuoleinen puoli suuntautuu sisäänpäin. Kalvo steriloidaan ja silloitetaan säteilyttämällä tai kemiallisesti ja siinä
15 on riittävä määrä kerroksia niiden pitämiseksi avoimena paikoillaan. Putken pituus on vähintään yhtä suuri kuin proksimaalisten ja distaalisten tynkien tai päiden etäisyys ja sen läpimitta on ainakin yhtä suuri kuin ja edullisesti hieman suurempi kuin proksimaalisten ja distaalisten tynkien tai päiden sidekudoksen läpimitta. Kuten aiemmin jo mainittiin, voi putki hermosiirteiden ollessa kyseessä sisältää hermokasvutekijöitä, kuten tyvikalvoa, fibronektiiniä tai kollageenuutetta tai näiden yhdistelmiä. Putki ommellaan tai kiinnitetään jollakin muulla tavalla hermon tynkien tai verisuonen päiden viereiseen
25 sidekudokseen.

Siirteitä voidaan varastoida pitkiä aikoja ja niistä saadaan käyttöön helposti saatavilla olevaa lähtömateriaalia siirteitä varten. Siirteet voidaan valmistaa tarpeen mukaan halkaisijaltaan tai pituudeltaan minkä tahansa suuruiseksi ja siirteiden kerrokset voidaan liimata yhteen, etteivät ne irtoa toisistaan käytössä.

30 Edellä esitetyn perusteella tässä keksinnössä käytettäviksi soveltuvia ja siinä tyydyttävät tulokset antavia ovat siirteet, jotka on tarkoitettu vahingoittuneen
35

hermon tai verisuonen proksimaali- ja distaalipäiden välisen katkoksen siltaukseen ja jotka käsittävät sylinterin, jonka seinämä on muodostettu ainakin yhdestä kerroksesta steriloitua ja silloitettua kalvoa, joka on peräisin istukasta saadusta tyyppin I, II tai III kollageenista tai näiden yhdistelmästä.

Edellä esitetyn perusteella tämä keksintö soveltuu hyvin sille asetettuihin tavoitteisiin ja tarkoituksiin ja sitä voidaan muokata näiden mukaiseksi ja sillä on mainittu ominaisuudet ja edut sekä muut niihin sisältyvät ominaisuudet ja edut.

Vaikkakin tämän keksinnön nykyiset edulliset sovellutusmuodot on esitetty sen selittämiseksi, voidaan tätä keksintöä muuttaa ja muokata poikkeamatta keksinnön hengestä, joka on oheen liitettyjen patenttivaatimusten suojapiirin rajoittama.

Patenttivaatimukset:

1. Siirre vahingoittuneen hermon proksimaali- ja distaalipäiden välisen katkoksen tai verisuonen proksimaali- ja distaalipäiden välisen katkoksen yhdistämiseen, t u n n e t t u siitä, että se käsittää

5 sylinterin, jonka pituus vastaa ainakin vaurioituneen hermon tai verisuonen proksimaalisten ja distaalisten päiden välistä etäisyyttä ja jonka läpimitta vastaa ainakin vaurioituneen hermon tai verisuonen proksimaalisten ja distaalisten päiden läpimittoja, ja

10 mainitussa sylinterissä on seinämä, joka on muodostettu ainakin yhdestä kerroksesta steriloitua ja silloitettua kalvoa, ja mainittu kalvo koostuu kollageenista, joka on tyyppiä I, tyyppiä II, tyyppiä III tai näiden seoksia, ja

15 mainittu kollageeni on peräisin istukan amnionista, istukan korionista tai näiden yhdistelmistä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen siirre, t u n n e t t u siitä, että mainittu seinämä käsittää ainakin kaksi kerrosta ohuen kalvon muodossa olevaa mainittua kalvoa, jotka on liimattu yhteen niin, että tämän tuloksena estetään kerrosten irtoaminen käytössä.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen siirre, t u n n e t t u siitä, että siirre mahdollistaa interstitiaalinesteen kulkeutumisen sylinterimäisen seinämän läpi.

4. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen siirre, t u n n e t t u siitä, että siirre on hermosiirre ja että se sisältää ainakin yhtä hermokasvutekijää.

5. Patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukainen siirre, t u n n e t t u siitä, että siirre on hermosiirre ja että se sisältää tyvikalvoa, fibronektiiniä, amnionkollageeni-uutetta tai näiden yhdistelmiä.

6. Menetelmä vahingoittuneen hermon hermotoiminnan palauttamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää

sen, että liitetään vahingoittuneen hermon proksimaali- ja distaalipäät patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukaiseen siirteeseen.

5 7. Menetelmä vahingoittuneen hermon hermotoiminnan palauttamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää sen, että

liitetään vahingoittuneen hermon proksimaali- ja distaalipäät patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukaiseen siirteeseen, ja

10 hermosiirre sisältää ainakin yhtä hermokasvutekijää.

8. Menetelmä vahingoittuneen hermon hermotoiminnan palauttamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää sen, että liitetään vahingoittuneen hermon proksimaali- ja distaalipäät patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukaiseen tyvikalvoa sisältävään siirteeseen.

9. Menetelmä korvaavan osan sijoittamiseksi verisuoneen, t u n n e t t u siitä, että se käsittää sen, että liitetään verisuonen proksimaali- ja distaalipäät patenttivaatimuksen 1, 2 tai 3 mukaiseen siirteeseen.

20 10. Patenttivaatimuksen 1, 2, 3, 4 tai 5 mukainen siirre, t u n n e t t u siitä, että amnion- tai korionkalvo on peräisin ihmisen istukasta.

25 11. Patenttivaatimusten 6, 7, 8 tai 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että siirre on peräisin ihmisen istukasta.