

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

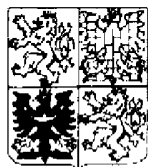
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

548-99

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **22. 08. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **23.08.96, 06.09.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/024542, 96/024693**

(33) Země priority: **US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11. 08. 99**
(Věstník č. 8/99)

(86) PCT číslo: **PCT/US97/14855**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/22158**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

A 61 L 27/00
A 61 F 2/00

(71) Přihlašovatel:

COOK BIOTECH, INCORPORATED, West
Lafayette, IN, US;
MED INSTITUTE, INCORPORATED, West
Lafayette, IN, US;
COOK INCORPORATED, Bloomington, IN,
US;

(72) Původce:

Cook William A., Bloomington, IN, US;
Hiles Michael C., Lafayette, IN, US;
Kozma Thomas G., West Lafayette, IN, US;
Patel Umesh H., West Lafayette, IN, US;

(74) Zástupce:

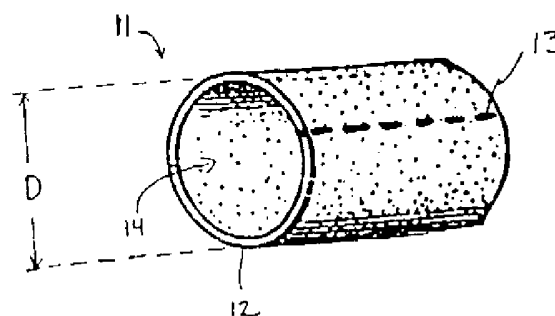
Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Štěpová protéza, materiály s ní spojené
a způsoby její výroby**

(57) Anotace:

Jedná se o štěpovou protézu /11/, materiály
a způsoby implantace, transplantace, náhra-
dy nebo reparace části těla pacienta. Štěpová
protéza zahrnuje očištěnou maticovou
strukturu na bázi kolagenu odejmutou ze
submukózního tkáňového zdroje. Submukózní
tkáňový zdroj se očistí pomocí desinfekce a
kroků k deaktivaci a k odstranění nečistot,
což způsobuje, že očištěná struktura je bi-
okompatibilní a vhodná pro transplantaci na
těle nebo uvnitř těla pacienta.



01-242-99-Če

Štěpová protéza, materiály s ní spojené a způsoby její výroby

Tato přihláška nárokuje prioritu amerických patentových přihlášek č. 60/024 542 a 60/024 693 podaných dne 23. srpna 1996, respektive 6. září 1996, přičemž obě dvě jsou zde jednotlivě začleněny jako součást popisu.

Oblast techniky

Tento vynález se obecně týká struktur v lékařství a zvláště štěpové protézy, materiálů s ní spojených a způsobů její výroby.

Dosavadní stav techniky

Tkáňové implantáty v čisté formě, které jsou odvozené z látek na základě kolagenu se běžně vyrábějí a jsou popsány v literatuře. Prostřednictvím molekul kolagenu nebo materiálů na bázi kolagenu se vyrábějí kohezivní filmy s vysokými pevnostmi v tahu. K zesíťování molekul kolagenu, jež tvoří filmy s vysokými pevnostmi v tahu se však využívají aldehydy. Z materiálů tohoto typu lze aldehydy z filmů vyloužit, např. pomocí hydrolýzy. Jelikož zbytky těchto sloučenin jsou cytotoxické, nejsou tyto filmy jako tkáňové implantáty vhodné.

Jiné způsoby, které byly vyvinuty ke zhotovení tkáňových implantátů na bázi kolagenu se snaží vyhnout problémům spojeným se zesíťováním molekul kolagenu pomocí aldehydu. Jeden ze způsobů objasňuje U.S. patent č. 5 141

747, v němž se uvádí, že molekuly kolagenu se zesíťují nebo spojují na svých epsilon aminoskupinách lyzinu, poté následuje denaturace spojených, a výhodně modifikovaných, molekul kolagenu. Takto upravený kolagenový materiál se používá k reparaci bubínkové membrány. Zatímco u těchto membrán se zjistilo, že vykazují dobré fyzikální vlastnosti a lze je sterilizovat následnými postupy, nejsou však schopné přetvářet nebo vytvářet podmínky pro růst buněk nebo, všeobecně podporovat opětný růst a hojit poškozené nebo nemocné tkáňové struktury.

Všeobecně řečeno, pracovníci výzkumu v oblasti chirurgie se po mnoho let snaží vyvinout nové postupy a materiály, jež by se daly použít jako implantáty a transplantáty tkání k nahrazení nebo k reparaci poškozených nebo nemocných tkáňových struktur, např. u cév, svalů, vaziv, šlach a podobně. Dnes není neobvyklé, např. v ortopedické chirurgii získat českou šlachou autogenního nebo allogenního původu, jež působí jako náhrada při zkráceném natrženém vazivu. Chirurgické postupy za pomoci těchto technik jsou známy. Pro chirurgy je obvyklé používat implantovatelné protézy vytvořené z plastu, kovu a/nebo z keramického materiálu k obnově nebo náhradě fyziologických struktur. Nicméně navzdory jejich širokému využití, představují implantované protézy pro pacienta mnoho s tím souvisejících rizik.

Výzkumní pracovníci se také pokoušejí vyvinout uspokojivý polymery nebo materiály z plastické hmoty, jež by sloužily jako funkční tkáňové struktury a/nebo jiné pojivové tkáně, např. u tkání týkající se kýly a při poranění kloubů jejich dislokací. Bylo zjištěno, že je obtížné poskytnout pevný, odolný plastický materiál, jež by

byl vhodný jako dlouhodobá pojivová tkáňová náhrada. Tkáně, které obklopují plastický materiál se mohou stát infekční a obtíže při léčení těchto infekcí často vedou k selhání implantátu nebo protézy.

Jak již bylo zmíněno výše pro tkáňové náhrady se využívají různé materiály na bázi kolagenu; avšak tyto materiály buď nevykazují požadovanou pevnost v tahu nebo se při nich vytváří infekce či jiné imunogenní reakce, opouzdření, nebo se u nich vytvářejí jiné problémy při zatěžování organismu antibiotiky, růstovými faktory a podobně. Např. patent U.S. č. 4 956 178 uvádí kolagenovou matici submukózy, která se získá z intestinálního traktu savců; přičemž se uvádí, že kolagenová matrice je zatížena antibiotiky. S tím související patent U.S. č. 5 372 821 uvádí, že kolagenovou matici submukózy lze sterilizovat obvyklými způsoby např. mořením pomocí aldehydu, propylenoxidem, gama zářením a kyselinou peroctovou. Kromě toho, že vrstva submukózy se nejprve delaminuje z tkáně, jež ji obklopuje, před její sterilizací, neuvádí patent žádné specifické kroky postupu.

Vzniká zde proto požadavek z těchto zdrojů tkání získat zlepšené očištěné formy matic na bázi kolagenu. Dále zde vzniká potřeba poskytnout postup, pomocí něhož se snadno tyto matrice z tkání odejmou tak, aby se zvýšil výtěžek očištěných produktů. Tento vynález tak řeší tyto požadavky.

Podstata vynálezu

Ve shodě s jedním výhodným provedením tohoto vynálezu se poskytuje štěpová protéza, která zahrnuje očištěnou maticovou strukturu na bázi kolagenu odstraněnou z zdroje

submukózní tkáně, přičemž koncentrace znečišťující látky v očištěné struktuře ji činí biokompatibilní.

Jiné výhodné provedení podle vynálezu poskytuje štěpovou protézu, která zahrnuje očištěnou maticovou strukturu na bázi kolagenu odstraněnou ze zdroje submukózní tkáně, kde očištěná struktura má koncentraci endotoxinu nižší než 12 endotoxických jednotek/g.

Jiné výhodné provedení podle vynálezu poskytuje štěpovou protézu, která zahrnuje očištěnou maticovou strukturu na bázi kolagenu odstraněnou ze zdroje submukózní tkáně, kde očištěná struktura obsahuje množství nukleové kyseliny nižší než 2 µg/mg.

Jiné výhodné provedení podle vynálezu poskytuje štěpovou protézu, která zahrnuje očištěnou štěpovou strukturu odstraněnou ze zdroje submukózní tkáně, kde koncentrace virů očištěné struktury je nižší než 500 jednotek vytvářejících ohraničnou skvrnu/g.

Tento vynález také poskytuje štěpovou protézu, která zahrnuje očištěnou maticovou strukturu na bázi kolagenu odstraněnou ze zdroje submukózní tkáně, kde očištěná struktura má hladinu činidla k provádění postupu nižší než 100 000 dílů/milion/kg.

Další provedení podle vynálezu se týká způsobu získání matrice na bázi kolagenu ze zdroje submukózní tkáně. Způsob zahrnuje působení dezinfekčního činidla na zdroj submukózní tkáně, přičemž se vytváří zdroj dezinfikované submukózní tkáně, z níž poté následuje odejmutí matrice na bázi kolagenu.

Jiné výhodné provedení podle vynálezu poskytuje způsob získání matrice na bázi kolagenu ze zdroje submukózní tkáně, který zahrnuje vytvoření zdroje submukózní tkáně na níž se působí dezinfekčním činidlem, a poté se odstraní matrice na bázi kolagenu ze zdroje submukózní tkáně.

Tento vynález se také týká kompozice, jež zahrnuje strukturu s obsahem kolagenu odejmutou ze zdroje tkáně, jenž zpočátku obsahuje strukturu a jinou tkáň, kde u struktury s obsahem kolagenu není koncentrace endotoxinu vyšší než 12 endotoxinových jednotek/g.

Tento vynález také poskytuje očištěnou kolagenovou matici, přičemž zdrojem k získání matrice je tkáň savce, kde matrice zahrnuje telasubmukózní tkáň savců a matrice získá se postupem, který zahrnuje dezinfekci tkáně savce a poté odejmutím struktury z výsledné dezinfikované tkáně savce.

Ve výhodném provedení poskytuje vynález očištěné formy telasubmukózních kolagenových matic, které pocházejí ze zažívacího, respiračního, močového nebo genitálního traktu živočichů, kde bioburdenová koncentrace v maticích je v podstatě nula a/nebo kde zejména matrice neobsahují pyrogeny. Upřednostňována je kolagenová matrice, kterou lze implantovat lidskému nebo zvířecímu pacientu bez vyvolání cytotoxické odezvy, infekce, odmítnutí implantátu nebo jakéhokoliv škodlivého účinku na většinu pacientů. Zatímco výhodná implantovatelná kolagenová matrice podle některých hledisek tohoto vynálezu primárně obsahuje telasubmukózní tkáň, může v tomto případě kolagenová matrice také obsahovat části vrstev laminární muscularis mucosa, muscularis mucosa,

lamina propria, vrstvy startum compactum a/nebo jiného tohoto tkáňového materiálu, což závisí na zdroji z něhož materiál pochází.

Ve shodě s předkládaným vynálezem se poskytuje očištěná delaminovaná kolagenová matrice telasubmukózní tkáně, která pochází ze zažívacího, respiračního, močového nebo genitálního traktu zvířat nebo lidí, kdy se delaminací dezinfikovaného zdroje telasubmukózní tkáně vytvoří uvedená očištěná delaminovaná submukózní kolagenová matrice. Tuto matici lze výhodně získat např. postupem při němž se působí dezinfekčním činidlem na dosud žádným způsobem nezpracovávaný nedelaminovaný telasubmukózní zdroj získaný ze zažívacího, respiračního, močového nebo genitálního traktu živočichů, přičemž poté následuje delaminace telasubmukózní kolagenové matrice z připevněných tkání. Výhodná kolagenová matrice má koncentraci bioburden v podstatě nula, přičemž tuto matici lze implantovat pacientovi, jímž je člověk nebo zvíře bez vyvolání následné cytotoxické odezvy, infekce, odmítnutí implantátu, nebo jakéhokoliv jiného škodlivého účinku pro většinu z těchto pacientů.

Ve shodě s předkládaným vynálezem se poskytuje ještě další způsob k získání vysoce čisté delaminované telasubmukózní kolagenové matrice, která je v podstatě ve sterilním stavu, jenž obsahuje delaminaci dezinfikovaného zdroje telasubmukózní tkáně, přičemž se získá delaminovaná telasubmukózní kolagenová matrice. Výhodný způsob obsahuje působení dezinfekčního činidla na nedelaminovaný telasubmukózní zdroj, jenž se získá ze zažívacího traktu, respiračního, močového a genitálního traktu zvířete nebo člověka, poté následuje delaminace telasubmukózní tkáně

z jiného vlastního zdroje tkání, jež jsou připevněny ke telasubmukózní tkáni.

Ve shodě s předkládaným vynálezem se poskytuje ještě další vysoce čistá telasubmukózní kolagenová matrice pocházející ze zažívacího traktu, respiračního, močového nebo genitálního traktu živočichů, která má koncentraci bioburdenu v podstatě nula, a kde uvedená matrice neobsahuje na povrchu v podstatě žádné buněčné zbytky, např. v podstatě neobsahuje žádnou svalovou tkáň, mukosální vrstvy, lipidy nebo buněčný odpad. Výhodnou kolagenovou maticí lze implantovat pacientovi, jímž je člověk nebo zvíře bez vyvolání následné cytotoxické odezvy, infekce, odmítnutí implantátu nebo jakéhokoliv škodlivého účinku na pacienta.

Ve shodě s předkládaným vynálezem se poskytuje ještě další vysoce čistá telasubmukózní tkáň, která pochází ze zažívacího, respiračního, močového nebo genitálního traktu živočichů, přičemž telasubmukózní tkáň se delaminuje za v podstatě sterilních podmínek, které obsahují růstové činitele, a telasubmukózní zdroj se omývá rozpouštědlem např. vodou, poté následuje působení dezinfekčního činidla, výhodně pomocí kyseliny peroctové při pH asi 1,5 do asi 10 s následnou delaminací telasubmukózy z připevněných vláken. Při pH vyšším jak 7 působí kyselina peroctová jako pufr. Tímto způsobem vhodně vyrobené matrice mají v podstatě vysoký obsah jednoho nebo více růstových činitelů.

Ve shodě s předkládaným vynálezem se poskytuje ještě další tkáňová štěpová kompozice, která zahrnuje telasubmukózní kolagenovou maticí, která v podstatě neobsahuje pyrogeny. Výhodněji budou tyto kompozice zahrnovat telasubmukózní kolagenovou maticí, která obsahuje

látky způsobující horečku v množství asi 1 endotoxinové jednotky na 1 g (EU/g) nebo nižší.

Ve shodě s předkládaným vynálezem bude ještě další vysoce čistá telasubmukózní tkáň, jak je popsána výše, demonstrovat aktivní angiogenezi *in vivo* při implantaci lidskému nebo zvířecímu pacientu.

Tento vynález se týká očištěných implantovatelných tkáňových útvarů, způsobu k vytvoření těchto útvarů a jejich použití k podpoře opětného růstu a ke zhojení poškozených nebo nemocných tkáňových struktur. Zvláště se vynález zaměřuje na očištěné formy kolagenové matrice telasubmukózní tkáně, která je vhodná pro použití jako implantovatelná tkáň, a dále se zaměřuje na způsoby vytváření těchto uvedených očištěných forem z implantovatelné tkáně na bázi kolagenu.

Tato a jiná hlediska předkládaného vynálezu jsou zřejmá osobám obeznámeným se stavem techniky, což opětovně uvádí následující podrobný popis.

Přehled obrázků na výkrese

Obr. 1 zobrazuje v prostorovém zobrazení trubicovitou štěpovou protézni strukturu ve smyslu vynálezu.

Příklady provedení

Za účelem snadnějšího pochopení principů vynálezu se odkazuje na určitá jeho výhodná provedení a k jejich popsání bude zavedeno specifické terminologické vyjádření. Nicméně to nemá být chápáno jako omezení rámce působnosti vynálezu,

čímž se míní, že zde uvedené a zamýšlené úpravy, další modifikace a aplikace principů podle vynálezu se pro odborníka v oboru mohou běžně vyskytovat.

Při uvedeném rozboru řešení se na tomto místě užívá množství termínů. Aby se zajistilo jasné a konzistentní porozumění popisu a patentovým nárokům, uvádějí se pro termíny následující definice.

Výraz bioburden se vztahuje k počtu žijících mikroorganismů, které se uvádějí v jednotkách (CFU), které se vztahují ke tvorbě jejich kolonie a které lze zjistit na daném a/nebo v daném množství materiálu. Příklady mikroorganismů zahrnují bakterie, houby a jejich spóry.

Výraz dezinfekce se vztahuje ke snížení bioburdenu v materiálu.

Výraz sterilní se týká podmínky, kdy obsah bioburdenu ve zkoumaném materiálu je takový, že pravděpodobnost existence jednoho živého mikroorganismu (CFU) na a/nebo v dané sekci materiálu je 1 v 1 000 000 nebo nižší.

Výraz pyrogeny se vztahuje k látce, která vytváří horečnatou odezvu po zavedení této látky do těla hostitele.

Výraz endotoxin se vztahuje zejména k pyrogenu, který je součástí jednoho gramu buněčné stěny bez přítomnosti bakterií. Endotoxiny se nepřetržitě uvolňují z bakterií a kontaminují materiály.

Výraz čistění se týká působení na materiál k odstranění jednoho nebo více kontaminantů, které se

18.05.99

vyskytují společně s materiálem, např. kontaminantů, které se vyskytují s materiálem v přírodě, a/nebo mikroorganismů nebo jejich částí, které se vyskytují na materiálu. Tyto kontaminanty pro objasnění mohou být známy tím, že jsou příčinou toxicity, infekce, horečky, podráždění, reaktivity, hemolytické aktivity, karcinogenity a/nebo imunogenicity.

Výraz biokompatibilita se týká schopnosti materiálu vyhovět zkouškám na biokompatibilitu, které jsou uveřejněny v publikaci International Standard Organization (ISO) Standard č. 10993 a/nebo v publikaci U.S. Pharmacopeia (USP) 23 a/nebo v publikaci U.S. Food and Drug Administration (FDA) v memorandu modré knihy č. G95-1, s názvem "Use of International Standard ISO-10993, Biological Evaluation of Medical Devices Part - 1: Evaluation and Testing". Typicky se těmito zkouškami stanovuje toxicita materiálu, jeho infekčnost, pyrogenicita, dráždivý potenciál, reaktivita, hemolytická aktivita, karcinogenicita a/nebo imunogenicita. Biokompatibilní strukturou nebo materiálem se míní to, že je-li zaváděn dovnitř těla většiny pacientů, nebude vyvolávat nepříznivou reakci nebo odezvu. Kromě toho, pozoruje se, že efekt biokompatibility lze uskutečnit pomocí jiných kontaminantů např. pomocí prionů, povrchově aktivních činidel, oligonukleotidů a jiných činidel s biokompatibilními účinky nebo s jinými kontaminanty.

Výraz kontaminant se týká nežádoucí sloučeniny, která je navázána na materiál nebo je v materiálu. Ty zahrnují, avšak nejsou omezeny na: bioburden, endotoxiny, činidla k provádění postupu jako např. antimikrobiální činidla, krev, krevní komponenty, viry, DNK, RNK, spóry, zbytky nežádoucích tkáňových vrstev, buněčný odpad, a mukózu.

Výraz telasubmukózní tkáň se týká vrstvy pojivové tkáně s obsahem kolagenu, která se ve většině částí trávicího, respiračního, močového a genitálního traktu živočichů vyskytuje pod mukózou.

Jak je uvedeno výše, předkládaný vynález všeobecně poskytuje štěpovou protézu a materiály zahrnující očištěnou matricovou strukturu na bázi kolagenu, a způsoby jejího získání a její použití. Štěpové protézy, jež jsou výhodné podle vynálezu, se získávají ze zdroje submukózní tkáně, např. tkáně s obsahem živočišné tkáně jako je lidská tkáň nebo jiné tkáně savců, např. vepřová tkáň, hovězí nebo ovčí tkáň.

Telasubmukózní tkáň ve svém přirozeném stavu, jako mnoho živočišných tkání všeobecně neobsahuje choroboplodné zárodky, což zajišťuje, že člověk nebo zvíře není infekční nebo není nemocné. Tento faktor se uplatňuje zvláště v případě telasubmukózní tkáně, která je vnitřní vrstvou zažívacího, respiračního, močového nebo genitálního traktu živočichů. Není tedy všeobecně vystavena vlivu bakterií nebo jiných buněčných zbytků jako je epitel trávicího traktu. Jedním ze znaků tohoto vynálezu je objev, že při dezinfekci telasubmukózního zdroje tkáně ještě před laminací, lze aseptický stav telasubmukózní vrstvy chránit nebo v podstatě ochránit zvláště tak, že postup při delaminaci probíhá za sterilních podmínek.

Zvláště bylo zjištěno, že dezinfekce telasubmukózního zdroje s následným odstraněním očištěné matrice, jež zahrnuje telasubmukózu, kterou je např. delaminace telasubmukózy z tunica muscularis a z tunica mucosa minimalizuje kontaminaci telasubmukózy bakteriemi a jinými

kontaminanty. Obráceně, požaduje-li se to, umožňuje tento způsob minimalizovat vliv dezinfekčních nebo sterilizačních prostředků na izolovanou telasubmukózní matrici, čímž se v podstatě zabezpečuje samotná biochemie telasubmukózní tkáně a s tím i její blahodárny účinek.

Telasubmukózní implantovatelnou kolagenovou matrici podle tohoto vynálezu, jak je uvedeno výše, lze získat z zažívacího, respiračního, močového, nebo genitálního traktu živočichů. Výhodně telasubmukózní tkáně pocházejí, jež jsou na bázi kolagenu, tedy s převládajícím kolagenem, ze zažívacího traktu savců, a výhodněji pocházejí ze střevního traktu vepřů. Nejvýhodnějším zdrojem je tenké střevo, získané z dospělých prasat, přičemž každé prase váží více jak asi 450 liber. Střeva získaná ze zdravých zvířat obsahují v zažívacím traktu cévy a přívody krve, jakož i v lumen střev různé mikroby jako např. *E. coli*. Proto dezinfekce celého střeva, která předchází delaminaci telasubmukózy v podstatě tyto kontaminanty odstraní a výhodně poskytuje implantovatelnou telasubmukózní tkáň, která v podstatě neobsahuje krev a krevní komponenty, jakož i jakékoliv jiné mikrobiální organizmy, pyrogeny nebo jiné patogeny, jež by mohly být přítomné. Věřící se, že při tomto postupu se v podstatě zabezpečí aseptický stav samotné telasubmukózní tkáně, ačkoliv by mělo být takto chápáno, že se skutečností takto uvedené netýkají tohoto vynálezu v tom smyslu, že by vynález měl být omezen jakoukoliv teorií.

Je také žádoucí, aby kolagenová matrice podle tohoto vynálezu v podstatě neobsahovala jakákoliv antibiotika, antivirová činidla nebo jakákoliv činidla antimikrobiálního typu, jež mohou ovlivňovat samotnou biochemii matrice a její schopnost implantace. Doposud používaným způsobem zpracování

tohoto tkáňového materiálu je omývání delaminované tkáně fyziologickým roztokem, přičemž materiál se nechá nasáknout antimikrobiálním činidlem, jak se např. uvádí v U.S. patentu č. 4 956 178. Zatímco tyto techniky mohou být volitelně prováděny s izolovanou submukózou, výhodné postupy podle tohoto vynálezu se vyhýbají použití antimikrobiálních činidel a podobně, což má nejenom vliv na samotnou biochemii kolagenové matrice, ale matrice nemůže být také zbytečně zavedena do tkání pacienta.

Jak bylo diskutováno výše, bylo objeveno, že vysoce čistou formu implantovatelné telasubmukózní kolagenové matrice lze získat nejprve dezinfekcí telasubmukózního zdroje, jenž předchází před odejmutím, např. pomocí delaminace telasubmukózního zdroje, očištěné kolagenové matrice, jež zahrnuje telasubmukózní vrstvu. Při uvedeném postupu byly také objeveny určité výhody, jakož i zlepšené vlastnosti výsledné telasubmukózní vrstvy, které zahrnují snadnější odstranění připojených tkání z vrstvy submukózy, a typicky, nízký kontaminační diagram.

Postupy podle vynálezu vhodně zahrnují nejprve jednonásobné nebo vícenásobné omytí telasubmukózního zdroje rozpouštědlem, výhodně vodou. Po omytí následuje jeho dezinfekce. Dezinfekčním činidlem je vhodně oxidační činidlo. Upřednostňovaná činidla jsou peroxysloučeniny, výhodně organické peroxysloučeniny, a výhodněji perkyseliny. Dezinfekční činidla se vhodně používají jako kapaliny, výhodně jako roztoky s pH asi 1,5 až asi 10, výhodněji s pH asi 2 až asi 6 a nejvýhodněji s pH asi 2 až asi 4. V uvedených způsobech podle tohoto vynálezu se všeobecné použití dezinfekčního činidla podmiňuje časovým obdobím, které zajišťuje regeneraci charakteristických očištěných

submukózních matric, jak jsou popsány v tomto vynálezu, výhodně se matrice projevují hlavně v tom, že neobsahují bioburden a/nebo hlavně neobsahují pyrogeny. Z tohoto pohledu jsou vhodné podle tohoto vynálezu ty postupy, které zahrnují ponoření tkáňového zdroje (např. pomocí potopení nebo postřikem) kapalným prostředkem s obsahem dezinfekčního činidla s dobou působení alespoň asi 5 min, charakteristicky v rozsahu od asi 5 min do asi 40 hod, a charakterističtěji v rozsahu od asi 0,5 hod do asi 5 hod.

Upřednostňovaným peroxy dezinfekčním činidlem je peroxid vodíku. Koncentrace peroxidu vodíku může být v rozsahu od asi 0,05 % do 30 % objemově. Výhodnější koncentrace peroxidu vodíku je od asi 1 % do 10 %, a nejvýhodnější je od asi 2 % do 5 % objemově. Roztok peroxidu může být upraven nebo nemusí být upraven pomocí pufru na pH od asi 5 až 9. Výhodněji je pH od asi 6 do 7,5. Uvedené koncentrace lze zředit vodou nebo vodným roztokem obsahujícím od asi 2 % do asi 30 % objemově alkoholu. Nejvýhodnějším alkoholem je ethanol. Teplota roztoku může být v rozsahu od asi 15 do 50 °C. Výhodnější teplota roztoku je od asi 20 do 40 °C, nejvýhodnější teplota roztoku je od asi 32 do 37 °C. Doba působení může být v rozsahu od asi 10 do 400 min. Výhodně je doba působení od asi 120 do 240 min. Výhodněji je doba působení od 180 do 210 min.

Výhodným organickým peroxy dezinfekčním činidlem je perpropionová kyselina. Koncentrace perpropionové kyseliny může být v rozsahu od asi 0,1 do 10 % objemově. Výhodněji je koncentrace perpropionové kyseliny od asi 0,1 do 1,0 % objemově a nejvýhodněji od asi 0,2 do 0,5 objemově. Tyto koncentrace perpropionové kyseliny lze zředit vodou nebo vodným roztokem s asi 2 do asi 30 % objemově alkoholu.

Nejvýhodnějším alkoholem je ethanol. Na telasubmukózní tkáňový zdroj lze působit roztokem organického peroxidu po dobu od asi 15 min do asi 40 hod., a typicky po dobu v rozsahu od asi 0,5 hod do asi 8 hod. Jiná vhodná peroxy dezinfekční činidla jsou popsána v publikaci *Disinfection, Sterilization and Preservation*, S. Block, Editor, 4th Edition, Philadelphia, Lea & Febiger, pp. 167-181, 1991 ve stati "Peroxygen Compounds", S. Block; a v publikaci *Industrial Biocides* K. Payne, Editor, New York, John Wiley and Sons, pp. 91-116, 1988, ve stati "Disinfection with peroxygens", M.G.C. Baldry and J.A.L. Fraser.

Jiným oxidačním činidlem je chlorhexidin (1,6-di(4-chlorofenyldiguanido)hexan) ve formě diglukonátu. Rozsah koncentrace chlorhexidindiglukonátu může být od asi 0,1 do 15 % hmotn. Výhodněji je koncentrace chlorhexidindiglukonátu od asi 0,1 do 2 % hmotn. a nejvýhodněji od asi 0,2 do 5 % hmotn. Uvedený roztok může být upraven, ale také nemusí pufracním činidlem na pH od asi 5 do 8. Výhodněji je pH od 5,5 do 7. Tyto koncentrace lze zředit vodou, nebo vodným roztokem obsahujícím asi 2 do asi 20 % objemově alkoholu. Nejvýhodnějším alkoholem je ethanol s koncentrací asi 5 až 10 %. Teplota roztoku může být v rozsahu od asi 15 do 30 °C. Činidlo může působit po dobu v rozsahu od asi 10 do 400 min. Výhodněji působí činidlo po dobu od asi 30 do 60 min. Jiná činidla na bázi chloru popisuje publikace *Disinfection, Sterilization and Preservation*, S. Block, Editor, 4th Edition, Philadelphia, Lea & Febiger, pp. 274-289, 1991, ve stati "Chlorhexidine", G. W. Denton.

Ve výhodných preparativních postupech lze rozpustit perkyselinu nebo jiné dezinfekční činidlo ve zředěném vodném

roztoku alkoholu, přičemž alkohol má výhodně od 1 do asi 6 atomů uhlíku a kde celkový obsah alkoholu může být od asi 1 do asi 30 % vztaženo na objem roztoku. Výhodnější alkoholy pro pužití podle tohoto vynálezu jsou vybrány ze skupiny sestávající z ethanolu, z propanolů a butanolů. K tomuto účelu je nejvýhodnějším alkoholem ethanol.

Použije-li se perkyselina k dezinfekci, vybere se výhodně ze skupiny sestávající z peroctové kyseliny, perpropionové kyseliny nebo perbenzoové kyseliny.

Nejvýhodnějším dezinfekčním činidlem je kyselina peroctová. Výhodně se tato kyselina zředí alkoholem objemově na asi 2% až 10% roztok. Koncentrace kyseliny peroctové může být např. v rozsahu od asi 1,0 do asi 0,5 objemových %. Nejvýhodnější koncentrace peroctové kyseliny je od asi 0,1 do asi 0,3 objemových %. Jako dezinfekční činidlo lze také použít peroxid vodíku. Alternativně nebo kromě toho lze tkáňový zdroj telasubmukózy, jímž je např. tenké střevo, dezinfikovat za pomoci dezinfekčních činidel jako je glutaraldehyd, formalín a podobných, které jsou známe svou schopností v podstatě zesíťovat kolagenové matrice, na rozdíl vůči účinkům jiných dezinfekčních činidel jako jsou např. perkyseliny, které tuto schopnost nemají. Pro účely dezinfekce lze kromě toho na telasubmukózový zdroj působit radiací, např. gama radiací.

Odlišnosti při dezinfekčním postupu mohou dále zahrnovat:

1. Na intestinální tkáň se působí 0,2% roztokem kyseliny peroctové v 5% roztoku ethanolu v hmotnostním poměru roztok:tkáň 10:1. pH roztoku je 2,6. Roztok a tkáň se spolu intenzivně míchají 2 hod.

13.05.99

2. Na intestinální tkáň se působí 1% kyselinou peroctovou v 25% roztoku ethanolu v hmotnostním poměru roztok:tkáň 5:1. pH roztoku je 2. Roztok a tkáň se spolu intenzivně míchají 1 hod.
3. Na intestinální tkáň se působí 1% kyselinou peroctovou v 15% ethanolu a v 10% roztoku peroxidu vodíku v hmotnostním poměru roztok:tkáň 5:1. Roztok a tkáň se spolu intenzivně míchají 1 hod.
4. Neporušená tkáň tenkého střeva se oplachuje 4x velmi čistou vodou po dobu 15 min. Intestinální tkáň je poté podrobena radiaci elektronovými paprsky o intenzitě 1,5 MRAD.
5. Zdravá tkáň tenkého střeva se omývá 4x velmi čistou vodou po dobu 15 min. V podélném směru se pohybující pás intestinální tkáně se za účelem dezinfekce podrobuje záření pulzního světla o vysoké intenzitě.

Poté následuje úprava telasubmukózní vrstvy popsaná výše, kdy se vrstva od svého zdroje delaminuje, přičemž zdrojem je např. neporušená intestinální tkáň, děložní tkáň krávy a podobně. Bylo zjištěno, že při následujícím obvyklém postupu po-dezinfekčního odlupování se snadněji z upevněných tkání např. alespoň z tkáně tunica muscularis, oddělí telasubmukózní vrstva, ve srovnání s telasubmukózní vrstvou odloupnutou před dezinfekcí. Mimoto bylo objeveno, že výsledná telasubmukózní vrstva ve své nejvýhodnější formě vykazuje skvělou histologii, že na svém povrchu obsahuje menší množství upevněných tkání a buněčných zbytků ve srovnání s telasubmukózní vrstvou získanou nejprve delaminací telasubmukózní vrstvy z jejího zdroje a poté dezinfekcí této vrstvy. Mimoto lze tímto postupem získat větší množství stejnoměrné telasubmukózní tkáně, přičemž takto získaná telasubmukózní tkáň má stejné nebo podobné

18.05.99

fyzikální nebo biochemické vlastnosti, které se při každém pokusu při oddělování vrstvy vcelku nemění. Důležité je, že se při tomto postupu získá vysoce čistá, v podstatě sterilní telasubmukózní tkáň.

Odlupování telasubmukózy z uvedeného zdroje se výhodně provádí pomocí dezinfikujícího nebo sterilního zařízení k čistění střev, kde se vytváří telasubmukóza, která je v podstatě sterilní s minimálním počtu kroků. Vhodným zařízením k čistění střev je Model 3-U-400 Stridhs Universal Machine for Hot Casing, komerčně dostupný od firmy AB Stridhs Maskiner, Göteborg, Sweden. Proto jsou měřené koncentrace bioburdeny minimální nebo v podstatě 0. Zajisté lze použít k delaminaci telasubmukózního zdroje i jiné prostředky bez odchýlení se od podstaty tohoto vynálezu, což zahrnuje např. delaminaci rukou.

Bylo dále objeveno, že výhodnější způsoby podle tohoto vynálezu nejenže eliminují nebo výrazně redukují kontaminanty obsažené v telasubmukózní kolagenové matrici, ale také vytvářejí tkáň, jež v podstatě nepodléhá degradaci pokud se týká fyzikálních a mechanických vlastností, což je např. rozdílná porozita (t.j. stav kdy na jedné straně submukózní vrstvy je větší porozita než na druhé straně), dále tkáň vykazuje dobrou pevnost, např. pevnost proti prasknutí. Dále bylo objeveno, že výhodnější postupy u telasubmukózní kolagenové matrice nemají nepříznivý vliv na její rozdílnou porozitu, která rozhodujícím způsobem ovlivňuje účinnost tohoto tkáňového implantátu. Není nezbytné např. na tkáň působit zesíťovacím činidlem nebo pomocí materiálu, který rozrušuje porozitu, nebo základní přirozenou strukturu kolagenové matrice. Mimoto, použije-li se peroxid vodíku, má matrice jako celek větší porozitu,

jakož i vyšší obsah kyslíku. To pomáhá zabezpečit, že nejsou přítomny kontaminanty, např. endotoxiny, pyrogeny a podobně.

Ve výhodném provedení matrice na bázi kolagenu podle tohoto vynálezu (např. obsahující telasubmukózu) také projevují schopnost přivodit aktivní angiogenezi, t.j. růst cév uvnitř tkáňové matrice. V tomto ohledu tyto výhodné matrice podle vynálezu obsahují prospěšné složky vyskytující se přirozeně v matrici, které zahrnují např. jeden nebo více glykosaminoglykanů, glykoproteinů, proteoglykanů, a/nebo růstové faktory (např. přetvářející růstový faktor - α , přetvářející růstový faktor - β , a/nebo fibroblastický růstový faktor 2 (základ)).

Výhodné matrice na bázi kolagenu podle vynálezu, výhodné matrice s obsahem submukózy se také vyznačují nízkou koncentrací nečistot, jak uvádí dále Tabulka 1, přičemž koncentrace každé nečistoty se zjišťuje individuálně nebo v jakékoliv kombinaci s některou nebo se všemi ostatními popsányými nečistotami. Uvedené zkratky v Tabulce vyjadřují následující: CFU/g = jednotky tvořící kolonii vztaženo na 1 g; PFU/g = jednotky tvořící ohraničenou skvrnu vztaženo na 1 g; μ /mg = mikrogramy vztaženy na 1 miligram; ppm/kg = dílů na milion na kilogram.

Tabulka 1

Charakt. znak	První výhodná koncentrace	Druhá výhodná koncentrace	Třetí výhodná koncentrace
Endotoxin	< 12 EU/g	< 10 EU/g	< 5 EU/g
Bioburden	< 2 CFU/g	< 1 CFU/g	< 0,5 CFU/g
Houba	< 2 CFU/g	< 1 CFU/g	< 0,5 CFU/g
Nukleová k.	< 10 µg/mg	< 5 µg/mg	< 2 µg/mg
Virus	< 500 PFU/g	< 50 PFU/g	< 5 PFU/g
Upravující čínidlo	< 100000 ppm/kg	< 1000 ppm/kg	< 100 ppm/kg

Výhodnější koncentrace endotoxinu pro matrici na bázi kolagenu podle vynálezu je nižší než 1 EU/g, přičemž nejvýhodnější koncentrace je nižší jak 1 EU/g.

Očistěné matrice na bázi kolagenu podle tohoto vynálezu lze připravit množstvím způsobů, přičemž lze vytvořit kolagenní matrice vhodné pro použití jak *in vivo* tak *in vitro*. Lze např. vytvořit submukózní matrici k zajištění tkáňových štěpů vhodných pro vaskulární aplikace, jak např. všeobecně popisuje U. S. patent 2 127 903 a 4 902 508. S odvoláním na Obr. 1 se obvykle pro vaskulární transplantaci použije trubicovitě štěpové protézové struktury 11, která je vytvořena z matrice nebo která zahrnuje matrici na bázi kolagenu 12, jejíž průměr "D"

se přizpůsobuje cévě, která vede krev příjemce. Při jednom ze způsobů toho lze dosáhnout uchopením trubicové části nebo pásu telasubmukózní matrice k definování válce, jenž má průměr "D" přibližně stejný jako je průměr cévy příjemce, přičemž sešitím, svázáním nebo jinak zabezpečujícím podélným švem 13 se vytváří vhodná velikost trubicového vaskulárního štěpu, s průsvitem 14, kudy prochází krev. Při názorných přípravných postupech se štěp vytváří ze sterilní tyčinky nebo trnu s vnějším průměrem přibližně shodným s uvedenou cévou, jež se má transplantovat. Např. se tyčinka zavádí dovnitř průsvitu telasubmukózní části, která zůstává ve svém přirozeném trubcovitém tvaru. Poté se odebere přebytečná tkáň a požadovaný průměr průsvitu se dosáhne sešitím štěpu v podélném směru (např. použitím dvou nepřetržitých sešívacích nití nebo jednoduše přerušovanou sešívací nití) nebo použitím jiných ze stavu techniky známých technik k podvázání cév. Jinou možností je, že pás telasubmukózní tkáně se ovine okolo tyčinky, přičemž se vytvoří přečnávající šev, který lze sešít, slepit nebo jinak podvázat a vytváří se tak trubcovitý štěpový útvar. V upřednostňovaných tvarech může být vnitřní luminální povrch štěpu tvořen mukózní stranou telasubmukózní tkáně.

Mechanické vlastnosti telasubmukózní tkáně podle vynálezu jsou velice vhodné jako materiály tkáňových štěpů ve vaskulárních léčebných prostředcích, přičemž tkáň má nízký index porozity, vysokou poddajnost a vysokou pevnost proti prasknutí. Odborník obeznámený se stavem techniky si bude vědom, že výhodný tkáňový štěpový materiál bude mít dostatečně nízkou porozitu, která zabraňuje při operaci vnitřnímu krvácení a přitom ještě dostatečně vysokou porozitu, jenž dovoluje natažení nově připravených vasa vasorum po celém štěpovém materiálu, přičemž se vyživuje

nová vnitřní vrstva stěny cévy a její lumenální povrch.

Telasubmukózní tkáň podle tohoto vynálezu lze také připravit jako tekuté kompozice, např. za použití technik uvedených v U.S. patentu č. 5 275 826. V tomto případě lze připravit roztoky a suspenze telasubmukózní tkáně rozmělněním a/nebo vyluhováním s proteázou (např. s trypsinem nebo s pepsinem) po dobu nezbytnou k solubilizaci tkáně za tvorby v podstatě homogenního roztoku. Výchozí submukózní materiál se vhodně rozmělní natrháním, nařezáním, rozdrčením, rozstřiháním a podobně. Výhodné je drtit telasubmukózní tkáň ve zmrazeném nebo mrazem vysušeném stavu, ačkoliv dobré výsledky lze získat stejně tak zpracováním kousků submukózy v suspenzi ve rychloběžném mlýně spolu s odvodněním a je-li to nezbytné odstředěním a oddekantováním nadbytečného odpadu. Rozmělněnou telasubmukózní tkáň lze vysušit na prášek např. sušením pomocí vymrazování. Je-li potřeba, lze poté tento prášek hydratovat, tedy jej smísit s vodou nebo s pufrčním fyziologickým roztokem nebo jej volitelně smísit s dalšími farmaceuticky přijatelnými vehikuly, aby se vytvořila tekutá tkáňová štěpová kompozice, jež má např. viskozitu asi 2 až 300000 cps při teplotě 25 °C. Štěpové kompozice s vyšší viskozitou mohou mít gelovitou nebo pastovitou konzistenci.

Tekutá telasubmukózní tkáň podle tohoto vynálezu nachází použití jako injekční tkáňový xenoimplantát např. při nutné korekci nebo pro nárůst kostní nebo měkké tkáně, nejcharakterističtěji při nápravě poranění nebo vad vyvolaných nemocemi tkání. Tyto tekuté submukózní kompozice se také s výhodou použijí jako plnivo k implantovaným útvarům, jež zahrnují např. jeden nebo více telasubmukózních pásů vytvořených jako uzavřená (sešitá) pouzdra s použitím

v kosmetice nebo při chirurgických operacích pro nápravu úrazů.

V ilustrativním postupu přípravy telasubmukózní tkáně podle tohoto vynálezu se telasubmukózní tkáň zmenšuje na malé kousky (např. pomocí trhání), které se vloží na ploché dno nerezové ocelové nádoby. Za účelem zmrazení vzorků se do nádoby přivede kapalný dusík, vzorky se poté rozmělní, zatímco při zmrazení se tvoří hrubý telasubmukózní prášek. Tento postup lze provádět např. za použití hřebenopvého lisu s válcovitým mosazným ingotem přiléhajícím shora k povrchu zmrazených vzorků. Ingot slouží jako meziplocha mezi vzorky a zdrojem tlaku, trnem. Aby byly vzorky stále zmrazené, může se kapalný dusík ke vzorkům telasubmukózní tkáně přidávat v pravidelných intervalech.

Pro rozmělnění vzorků telasubmukózní tkáně na vhodnou práškovitou telasubmukózní tkáň ve shodě s tímto vynálezem lze využít i jiné způsoby. Lze např. vzorky telasubmukózní tkáně sušit zmrazením a poté rozdrtit za použití ručního hřebenového lisu nebo pomocí jiných drticích prostředků. Nebo jinak, práškovou telasubmukózu lze získat postupem v mísiči působícím velkým smykovým napětím, přičemž se odvodňuje a suší.

Dalším drcením telasubmukózního prášku pomocí předem vymrazené třecí misky a tloučku lze vytvořit konzistentní velmi jemně rozdělený produkt. Během konečného drcení, k udržení pevných zmrazených částic, jak je potřeba, se opět použije kapalný dusík. Prášek lze snadno hydratovat např. pomocí pufrovaného fyziologického roztoku, přičemž dojde k vytvoření tekutého tkáňového materiálu podle tohoto vynálezu, jenž má požadovanou viskozitou.

18.05.99

Při přípravě jiného výhodného tekutého materiálu lze prášek telasubmukózní tkáně prosít přes drátěné síto, jímat a podrobit proteolytickému vyluhování, přičemž se v podstatě vytvoří homogenní roztok. Například lze prášek vyluhovat po dobu 48 hod při pokojové teplotě pepsinem v množství 1 mg/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo.) a 0,1 M roztokem kyseliny octové, přičemž se upraví pH na 2,5 pomocí HCl. Po této úpravě lze reakční prostředí neutralizovat hydroxidem sodným, aby se inaktivovala peptická aktivita. Rozpuštěnou submukózu lze potom zkoncentrovat srážením ve formě soli a oddělit ji k dalšímu čištění a/nebo vymrazovacímu sušení, čímž se získá prášek intestinální submukózní tkáně s rozpuštěnnou proteázou.

Tekuté telasubmukózní kompozice podle tohoto vynálezu nalézají široké použití při tkáňových náhradách, při narůstání a/nebo při reparaci tkáně. Tekutých submukózních kompozic lze využít k vyvolání opětného růstu přirozené pojivové tkáně nebo kosti v místě existující poruchy. Při injekčním podání účinného množství tekuté submukózní kompozice do místa s poruchou tkáně nebo do otevřené rány, kterou je nutno vyléčit, může kdokoliv ihned využít výhodných biotropních vlastností telasubmukózy.

Z telasubmukózní tkáně je také možné vytvářet útvary s velkým měrným povrchem spojením dvou nebo více částí submukózní tkáně podle vynálezu, např. za použití způsobů popsaných v U.S. patentu 2 127 903 a/nebo uveřejněných v mezinárodní přihlášce č. WO 96/32146 zveřejněné 17.10.1996, ve zveřejněné mezinárodní přihlášce č. PCT/US96/04271, podané 5. dubna 1996. Tedy například lze velké množství prožků telasubmukózy vzájemně spojit jeden ke

18.05.99

druhému např. stlačením přečnickajících plošek proužků, za podmínky, že dojde k dehydrataci a vytvoří se tak celoplošný útvar s měrným povrchem větším než byl povrch u kteréhokoliv jednotlivého proužku použitého k vytvoření útvaru.

Telasubmukózní tkáň podle vynálezu lze také využít k přípravě tkáňových štěpových útvarů vhodných jako léčebné ortopedické prostředky pro měkké tkáně, např. při reparaci šlach nebo vaziv pomocí způsobů známých ze stavu techniky, které se využívají v praxi i u jiných materiálů odvozených od přírodních nebo syntetických štěpových materiálů. Např. reparační způsoby všeobecně popisují U.S. patent č. 2 127 903 a U.S. 5 281 422, pomocí nichž lze použít telasubmukózní tkáň podle tohoto vynálezu.

K aplikaci náhrad šlach a vaziv, lze segment telasubmukózní tkáně předem upravit prodloužením jeho napínáním v podélném směru. Např. segment telasubmukózy lze prodloužit při dlouhotrvající aplikaci jeho zatížením ve směru jeho podélné osy (např. zavěšeným závažím) po dobu, která je nezbytná pro prodloužení o asi 10 % do asi 20 % segmentu tkáně. Štěpový materiál lze také předem upravit laterálně. Samotný telasubmukózní segment lze potom vytvarovat nebo v kombinaci s ostatními segmenty na množství různých tvarů, které slouží jako náhrady vaziv nebo šlach, nebo jako náhrady k sesazení zlomeného nebo přetrženého vaziva nebo šlachy.

Pro tyto pojivé tkáňové štěpové léčebné prostředky se segment vhodně utváří tak, aby měl jednovrstvé nebo vícevrstvé uspořádání, přičemž vícevrstvý štěp materiálu má vytvořené alespoň protilehlé koncové části a/nebo protilehlé laterální části pro zajištění vyztužení k upnutí

18.05.99

k fyziologickým strukturám jako je kost, šlacha, vaz, chrupavka a sval. Při aplikaci náhrady vazů, se protilehlé konce náhrady upevní k první a ke druhé kosti, respektive kosti se typicky spojí do kloubu jako je v případě kolenního kloubu. Při nahrazení šlachy se jeden konec štěpového útvaru upevňuje ke kosti a druhý konec ke svalů.

Jak se uvádí výše, při aplikacích pojivových tkání bude výhodné, vytvářet, nebo tvarovat koncové části štěpového útvaru, jenž má být upevněn, např. ke kostní struktuře tak, že útvar bude snižovat možnost roztržení štěpu v místě upnutí. Pro tyto účely lze telasubmukózní štěpový materiál zřasit nebo částečně obrátit ven, čímž se zajistí více vrstev vzhledem k sevření, jimiž jsou např. svorkové upínače nebo sešívací svorky. Nebo jinak, telasubmukózní segment lze přehnout na sebe, spojí se koncové části a vytvoří se tak první pojivová část, která se má upevnit např. k první kosti a obloukem v prostřední části se zajistí druhá pojivá část, která se připevní ke druhé kosti kloubem vzhledem k první kosti.

Přizpůsobit lze např. jednu z koncových částí telasubmukózního štěpu tak, aby šel protáhnout vnitřkem tunelu stehenní kosti, a upevní se k ní, zatímco jinou koncovou část lze přizpůsobit k protažení tunelem holenní kosti, a upevní se k ní, což zajišťuje náhradu přirozeně zkříženému vazivu, přičemž segment se přizpůsobí tak, aby jej šlo umístit při napětí působícím mezi tunely kostí a zajistila se tak funkce vaziva, t.j. napínání a funkce v různých polohách, kterou umožňuje normální vazivo.

Jelikož se tyto štěpy využívají v ortopedii, a voperovávají se v napjatém stavu, je tedy výhodné slučovat

dva nebo dokonce více tkáňových segmentů, čímž se vytvoří vícečetný (vícevrstvý) štěpový útvar. Jiným předmětem tohoto vynálezu je proto zajistit tyto štěpy v nichž jsou uspořádány dva nebo více submukózních segmentů tak, že mají své koncové části spojeny dohromady a laterální části přizpůsobeny tak, aby šly upevnit na kost, šlachy, vaz nebo jinou fyziologickou strukturu. Jedním ze způsobů zajišťujícím vytvoření dvojitého segmentu může být vytažení jednoho trubcovitého segmentu z vnitřku dalšího segmentu, přičemž se vytvoří trubice s dvojitou stěnou a s připínacími konci, které lze upnout např. na kost, šlachy nebo na vazivo. Tyto dvojité segmenty zajišťují vyšší pevnosti v tahu a retela submucosance k pružnosti při napětí. Při jiných vícečetných formách telasubmukózních segmentů nebo proužků lze sestavit segmenty do tvaru spletených šňůr, např. šňůr s tvarem kosočtverců nebo lanek, nebo s tvarem síťoviny, která zahrnuje vícečetné smyčky v párech se sousedními smyčkami, které jsou užitečné při reparaci vaziv nebo šlach.

Telasubmukózní tkáň podle tohoto vynálezu lze také použít k zajištění ortopedického štěpu jako pojivě tkáň, jenž přidržuje pohromadě kusy zlomené kosti a je vhodně směřovaná vůči tělu, přičemž tkáňový segment je vytvořen tak, že aby zaobaloval zlomené části frakturované kosti, přičemž je upevněn ke kosti.

Ještě při další ortopedické aplikaci, lze telasubmukózní tkáň podle vynálezu použít k reparaci kostní tkáň, např. za použití postupů popsaných v patentu U.S. 5 641 518. Telasubmukózní tkáň ve formě prášku lze implantovat do poškozených nebo nemocných částí kostí. Prášek telasubmukózní tkáň lze použít samotný nebo v kombinaci

s jedním nebo dalšími bioaktivními činidly jako jsou fyziologicky slučitelné minerály, růstové faktory, antibiotika, chemoterapeutická činidla, antigeny, protilátky, enzymy a hormony. Upřednostňuje se implantát ve formě prášku, který je slisován do předem určeného tvaru, který se následně implantuje do části kosti a bude si v podstatě zachovávat svůj tvar během náhrady kosti štěpem s obsahem endogenních tkání.

Telasubmukózní tkáň podle vynálezu lze také využít jako substrát růstu buněk kdy v ilustrativním provedení jde o substrát ve formě pásu, pasty nebo gelu ve spojení s živinami, jež podporují růst na nich závislých buněk, např. eukaryotických buněk např. plodových buněk, fibroblastických buněk, fetální kůže, osteosarkomu a buněk adenokarcinomu (což uvádí např. mezinárodní zveřejněná přihláška č. WO 96/24661 s datem 15. srpna 1996, zveřejněná mezinárodní přihláška č. PCT/US96/01842 podané 9. února 1996. V upřednostňovaných formách budou kompozice telasubmukózního substrátu podporovat vznik nově se tvořící tkáně a/nebo podporovat dělení buněk savců, jež zahrnují i lidské buňky.

Vynalezená telasubmukózní tkáň může také sloužit jako kolagenní matrice v kompozicích s produkcí přeměněných buněk (což uvádí např. zveřejněná mezinárodní přihláška č. WO 96/25179 s datem 22. srpna 1996, mezinárodní přihláška č. PCT/US/02136 podaná 16. února 1996; a zveřejněná mezinárodní přihláška č. WO 95/22611 s datem 24. srpna 1995, mezinárodní přihláška č. PCT/US95/02251 podaná 21. února 1995). Obecně budou obsahovat tyto kompozice k přetváření buněk očištěnou telasubmukózní tkáň podle tohoto vynálezu, např. v tekuté nebo pastovité formě ve spojení s rekombinačním vektorem

(např. plazmidem), jenž obsahuje sekvenci nukleové kyseliny, s níž se geneticky přeměňují terčovitě buňky *in vitro* nebo *in vivo*. Před přeměnou terčovitých buněk mohou buňky obsahovat např. původní kostní buňky.

Telasubmukózní tkáň podle vynálezu lze také využít k reparaci tělní stěny což zahrnuje např. reparaci při abdominálních defektech stěny jako jsou kýly za použití způsobů, které jsou analogické k postupům uvedeným v publikacích *Ann. Plast. Surg.*, 1995, 35:3740380; *J. Surg. Res.*, 1996, 60:107-114. Při těchto aplikacích se upřednostňují štěpy telasubmukózní tkáně podle vynálezu, které příznivě působí na organismus, na jeho cévní zásobení a a vytvářejí pevnou přetvořenou tkáň. Při kožních aplikacích lze telasubmukózní tkáň podle vynálezu využít na reparaci při lehkém nebo těžkém zranění kůže a při nárůstu kůže s použitím obecných transplantačních postupů, známých ze stavu techniky a z literatury (jak např. uvádí publikace: *Annals of Plastic Surgery* 1995, 35:381-388). Mimoto, je všeobecně známé v místě léčení spáleniny zajistit vytvoření kožních náhražek, na nichž se epidermální kožní štěpy (výhodně kultivované epidermální autoštěpy nebo CEA štěpy) transplantují. Tyto kultivované štěpy typicky zahrnují na kožní náhradě transplantační keratinocyty a/nebo fibroblasty. Podle tohoto vynálezu lze očištěnou telasubmukózní tkáň využít jako kožní náhražky např. ve formě pásku a následně CEA štěp transplantovat na telasubmukózní tkáň. Podle praktické stránky jednoho ze způsobů tohoto vynálezu, lze keratinocyty transplantovat např. naočkováním nebo přeměnou keratinocytu na mukozální straně telasubmukózní tkáně. Také fibroblasty lze transplantovat na mukozální a/nebo na protilehlé (abuminální) straně telasubmukózní tkáně.

Telasubmukózní tkáň podle vynálezu lze také využít při urogenitální tkáňových transplantacích. Telasubmukózní tkáň lze např. využít při reparaci močového měchýře k vytvoření skeletu močového měchýře pro jeho regeneraci za použití způsobů odpovídajících řešením obecně popsaným v U. S. patentu 5 645 860; v publikaci *Urology*, 1995, 46:396-400; a v publikaci *J. Urology*, 1996, 155:2098. Je-li telasubmukózní tkáň ve formě tekutiny, lze ji také využít při endoskopickém injekčním postupu při nápravě vezikureterálního zpětného toku. Při těchto aplikacích se injekce se submukózní tkání použije např. v místě pod ureterálním otvorem pacienta, aby se navodil růst hladkého svalů a tvorba kolagenu.

Při léčení jiných chorob lze využít útvarů tkáňových štěpů tvořených telasubmukózní tkání podle vynálezu při neurologických aplikacích např. při postupech s reparací defektů zaviněných úrazy, kde je potřebná duralová náhrada, nebo při nádorové resekci nebo při operacích pro uvolnění tlaku.

K většímu porozumění tomuto vynálezu, jeho specifických znaků a výhod jsou uvedeny následující charakteristické příklady. Rozumí se, že tyto příklady jsou ilustrativní, a nijak nelimitují uvedený vynález.

Příklad 1

Zdravá intestinální tkáň s velikostí 30 stop odejmutá ze zdravého dospělého vepře se omyje vodou. Na tento materiál se poté působí 0,2 % obj. peroctové kyseliny v 5 % obj. roztoku ethanolu ve vodě za stálého míchání po

dobu 2 hod. Ze této intestinální tkáně se poté delaminuje vrstva telasubmukózní tkáně v předem dezinfikovaném zařízení k čištění střev. Delaminovaná telasubmukózní tkáň se poté omyje 4x vodou bez choroboplodných zárodků, přičemž se zjišťují nečistoty nebo kontaminanty jako např. endotoxiny, mikrobiální mikroorganismy a pyrogeny. Koncentrace bioburden u výsledné tkáně byla zjištěna v podstatě 0. V souladu s tím se vrstva telasubmukózní tkáně snadno oddělí z uvedené intestinální tkáně, přičemž se na jejím povrchu zjistila minimální přítomnost buněčných zbytků.

Příklad 2

Odříznutá část zdravé intestinální tkáně prasete která s velikostí 10 stop se omyje vodou. Po omytí, se na tuto část, což je zdroj telasubmukózního intestinálního kolagenového materiálu, působí za stálého míchání po dobu asi 2,5 hod roztokem 0,2 % obj. kyseliny peroctové v 5 % obj. u ethanolu ve vodě. Kyselina peroctová přitom z intestinální tkáně delaminuje vrstvu telasubmukózní tkáně. Výsledná telasubmukózní tkáň se poté 4x omyje vodou bez choroboplodných zárodků. Množství bioburden bylo v podstatě 0.

Příklad 3

Malá část telasubmukózního intestinálního materiálu na bázi kolagenu byla subkutánně implantována na krysu. Během 72 hod se objevila angiogeneze.

Příklad 4

Dvě odebrané části tenkého střeva se zpracovávají

různými způsoby. První kus se omyje vodovodní vodou, po dobu 2 hod dezinfikuje 5 obj.% roztoku ethanolu ve vodě, jenž obsahuje 0,2 % obj. peroctové kyseliny s pH přibližně 2,6, přičemž se delaminuje telasubmukózní tkáň, poté se omývá v čisté vodě, rozdělí na 2 vzorky a rychle zmrazí. Druhý kus se omyje vodovodní vodou delaminuje se telasubmukózní tkáň, omyje se v čisté vodě a umístí se po dobu 20 min do 10% roztoku neomycinsulfátu (jak popisuje U.S. patent č. 4 902 508), omyje se čistou vodou a rozdělí se na dva vzorky, které se rychle zmrazí. U čtyř výše připravených vzorků se zjišťují koncentrace bioburdenu a endotoxinu. U každého z prvních dvou vzorků je koncentrace bioburdenu nižší než 0,1 CFU/g a koncentrace endotoxinu nižší než 0,1 EU/g. U druhých dvou vzorků jsou koncentrace bioburdenu 1,7 CFU/g a 2,7 CFU/g, respektive koncentrace endotoxinu 23,9 EU/g a 15,7 EU/g.

Příklad 5

Tři odebrané části tenkého střeva se zpracovávají různými způsoby. První část se omyje vodovodní vodou, dezinfikuje se 2 hod roztokem 5% obj. ethanolu s obsahem 0,2 % obj. kyseliny peroctové s pH asi 2,6, delaminuje se telasubmukózní tkáň, omývá se v čisté vodě a rychle se zmrazí. Druhý díl se omyje vodovodní vodou delaminuje se telasubmukózní tkáň, omyje se čistou vodou, dezinfikuje stejným způsobem, jak uvádí Příklad 1 v U.S. patentu č. 5 460 962 (podrobí se působení po dobu 40 hod v 0,1% obj. vodného roztoku kyseliny peroctové, pufrováno na pH 7,2), a rychle se zmrazí. Třetí díl se omyje vodovodní vodou, delaminuje se telasubmukózní tkáň, omyje se čistou vodou, poté dezinfikuje stejným způsobem, jak uvádí Příklad 2 U.S. patentu č. 5 460 962 (podrobí se působení 0,1% obj. roztoku

18.05.99

kyseliny peroctové v silném roztoku soli, pufováno na pH 7,2) a rychle zmrazí. Všechny 3 vzorky se zkouší na endotoxiny. Koncentrace endotoxinu pro 1. vzorek byla $<0,14$ EU/g, pro 2. vzorek byla >24 EU/g, a pro 3. vzorek byla >28 EU/g.

Příklad 6

Dvě odebrané části vepřového tenkého střeva byly infikovány množstvím viru 7×10^6 jednotek tvořícím ohraničenou skvrnu (PFU). Na obě části se pak působí 0,18% kyselinou peroctovou ve 4,8% roztoku ethanolu ve vodě s hmotnostním poměrem roztok : materiál 9:1. První vzorek byl na 5 min ponořen do tohoto roztoku; druhý vzorek byl do téhož roztoku ponořen na 2 hod. Materiál vzorku s dobou působení roztoku 5 min vykázal hodnotu 400 PFU na 1 g materiálu. Materiál vzorku s dobou působení roztoku 2 hod nevykazoval žádnou hodnotu PFU na 1 g materiálu a byl 0.

Příklad 7

Očistěná telasubmukózní tkáň připravená postupem podle tohoto vynálezu se podrobí zkoušce ke stanovení obsahu nukleových kyselin. Čtyři vzorky zkoumaného materiálu, každý o hmotnosti 5 mg se podrobí DNK/RNK extrakci, jak do podrobnosti uvádí publikace Amersham Lifescience Inc., Arlington Heights, Illinois ve statí DNA/RNA Isolation Kit. Množství nukleových kyselin se stanoví u roztoku spektrofotometricky při optických hustotách 260 a 280 nm. Průměrný obsah nukleových kyselin byl $1,9 \pm 0,2$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ materiálu.

Submukózní tkáň tenkého střeva připravená způsobem

popsaným v patentu U.S.4 902 508 se podrobí zkoušce na stanovení obsahu nukleových kyselin. Čtyři vzorky zkoumaného materiálu, každý o hmotnosti 5 mg se podrobí DNK/RNK extrakci, jak podrobně uvádí stať DNA/RNA Isolation Kit v publikaci Amersham. Množství nukleových kyselin se zjišťuje spektrofotometrickým stanovením optických hustot roztoku při vlnové délce 260 nm a při 280 nm. Průměrný obsah nukleových kyselin byl $2,4 \pm 0,2$ µg/mg materiálu.

Příklad 8

Odebrané části telasubmukózní tkáně připravené podle způsobů popsaných v tomto vynálezu byly zaslány do nezávislé zkušební laboratoře (NamSA, Inc., Northwood, Ohio) na zkoušku biokompatibility, kterou popisuje standard ISO 10993. Prováděla se zkouška na USP akutní systémovou toxicitu, USP intrakutánní toxicitu, cytotoxicitu, LAL endotoxin, střední pyrogenicitu materiálu, přímý kontakt s hemolýzou a prvotní dráždění kůže. Vzorky vyhověly všem zkouškám, které potvrzují, že materiál je biokompatibilní.

Je zřejmé, že obměny týkající se výše uvedeného postupu jsou míněny tak, že spadají do rámce tohoto vynálezu. Např. zdroj tkáně pro telasubmukózní tkáň jako je např. žaludek, neporušené střevo, kravská děloha a podobně lze částečně delaminovat, nebo pomocí činidel dezinfikovat nebo sterilizovat a následně zcela delaminovat telasubmukózní tkáň. Příkladně, upevněné mezenterní vrstvy a/nebo vrstvy serózních blan zdravé intestinální tkáně lze s výhodou odejmout před působením dezinfekčního činidla a poté následuje delaminace zbylých upnutých tkání telasubmukózní tkáně. Po těchto krocích mohou následovat, ale nemusejí další dezinfekční kroky, např. enzymatické

18.05.99

čistění a/nebo odstranění nukleových kyselin. Alternativně lze na zdroj telasubmukózní tkáně působit v minimálním množství dezinfekčním nebo jiným činidlem, přičemž se telasubmukózní tkáň delaminuje z tunica muscularis a z tunica mucosa, poté následuje celková dezinfekce, aby se dosáhlo požadované koncentrace nečistot. Všechny tyto obměny a modifikace jsou zamýšleny jako součást postupu popsaného v tomto vynálezu a spadají do rámce tohoto vynálezu.

Mimoto je zřejmé, že citované publikace v tomto vynálezu jsou vodítkem pro odborníka oboru, který je v této problematice zběhlý a každá z uvedených publikací se zde začleňuje jako celek.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Štěpová protéza obsahující:
očistěnou maticovou strukturu na bázi kolagenu odejmutou ze zdroje submukózní tkáně, přičemž uvedená očistěná struktura má koncentraci nečistot takovou, která ji činí biokompatibilní.
2. Štěpová protéza podle nároku 1, vyznačující se tím, že uvedená očistěná struktura má koncentraci endotoxinu nižší než 12 endotoxinových jednotek na gram.
3. Štěpová protéza podle nároku 2, vyznačující se tím, že uvedená koncentrace endotoxinu je nižší než 10 endotoxinových jednotek na gram.
4. Štěpová protéza podle nároku 3, vyznačující se tím, že uvedená koncentrace endotoxinu je nižší než 5 endotoxinových jednotek na gram.
5. Štěpová protéza podle nároku 4, vyznačující se tím, že uvedená koncentrace endotoxinu je nižší než 1 endotoxinová jednotka na gram.
6. Štěpová protéza podle nároku 1, vyznačující se tím, že uvedená očistěná struktura má koncentraci bioburdeny nižší než 2 jednotky tvořící kolonii na gram.
7. Štěpová protéza podle nároku 6, vyznačující se tím, že uvedená koncentrace bioburdeny je nižší než 1 jednotka tvořící kolonii na gram.

18.05.99

8. Štěpová protéza podle nároku 7, vyznačující se tím, že koncentrace bioburdenu je nižší než 0,5 jednotek tvořících kolonii na gram.
9. Štěpová protéza podle nároku 1, vyznačující se tím, že uvedená očištěná struktura má obsah nukleové kyseliny nižší než 10 mikrogramů na miligram.
10. Štěpová protéza podle nároku 9, vyznačující se tím, že obsah uvedené nukleové kyseliny je nižší než 2 mikrogramy na miligram.
11. Štěpová protéza podle nároku 1, vyznačující se tím, že uvedená očištěná struktura má koncentraci viru nižší než 500 jednotek tvořících ohraničenou skvrnu na gram.
12. Štěpová protéza podle nároku 11, vyznačující se tím, že uvedená koncentrace viru je nižší než 100 jednotek tvořících ohraničenou skvrnu na gram.
13. Štěpová protéza podle nároku 12, vyznačující se tím, že uvedená koncentrace virů je nižší než 1 jednotka tvořící ohraničenou skvrnu na gram.
14. Štěpová protéza podle nároku 1 vyznačující se tím, že uvedená očištěná struktura má koncentraci činidla k provádění postupu nižší než 100 000 dílů na milion na kilogram.
15. Štěpová protéza podle nároku 14, vyznačující se tím, že koncentrace uvedeného činidla k provádění postupu je nižší než 1000 dílů na milion na kilogram.

18.05.99

16. Štěpová protéza podle nároku 15, vyznačující se tím, že koncentrace uvedeného činidla k provádění postupu je nižší než 100 dílů na milion na kilogram.

17. Štěpová protéza podle nároku 1, vyznačující se tím, že uvedená očištěná struktura má koncentraci hub nižší než 2 jednotky tvořící kolonii na gram.

18. Štěpová protéza podle nároku 17, vyznačující se tím, že uvedená koncentrace houby je nižší než 1 jednotka tvořící kolonii na gram.

19. Štěpová protéza podle nároku 18, vyznačující se tím, že uvedená koncentrace houby je nižší než 0,5 jednotek tvořících kolonii na gram.

20. Štěpová protéza podle nároku 1, vyznačující se tím, že uvedená očištěná struktura obsahuje delaminovaný zdroj submukózní tkáně.

21. Štěpová protéza podle nároku 1, vyznačující se tím, že uvedená očištěná struktura obsahuje dezinfikovaný a delaminovaný zdroj submukózní tkáně.

22. Štěpová protéza podle nároku 1, vyznačující se tím, že uvedená očištěná struktura obsahuje dezinfikovaný a poté delaminovaný zdroj submukózní tkáně.

23. Štěpová protéza obsahující:

očištěnou maticovou strukturu na bázi kolagenu odejmutou ze zdroje submukózní tkáně, přičemž uvedená očištěná struktura má koncentraci endotoxinu nižší než 12 endotoxinových jednotek na gram.

18.05.99

24. Štěpová protéza obsahující:

očistěnou matricovou strukturu na bázi kolagenu odejmutou ze zdroje submukózní tkáně, přičemž obsah nukleové kyseliny v uvedené očistěné struktuře je nižší než 2 mikrogramy na miligram.

25. Štěpová protéza obsahující:

očistěnou matricovou strukturu na bázi kolagenu odejmutou ze zdroje submukózní tkáně, přičemž koncentrace virů v očistěné struktuře je nižší než 500 jednotek tvořících ohraničenou skvrnu na gram.

26. Štěpová protéza obsahující:

očistěnou matricovou strukturu na bázi kolagenu odejmutou ze zdroje submukózní tkáně, přičemž koncentrace činidla k provádění postupu v uvedené očistěné struktuře je nižší než 100 000 dílů na milion na kilogram.

27. Způsob získání matrice na bázi kolagenu ze submukózního tkáňového zdroje, jenž obsahuje:

působení dezinfekčního činidla na submukózní tkáňový zdroj zajišťující vytvoření dezinfikovaného submukózního tkáňového zdroje; a

odejmutí matrice na bázi kolagenu z dezinfikovaného submukózního tkáňového zdroje.

28. Způsob podle nároku 27, vyznačující se tím, že submukózním tkáňovým zdrojem je zažívací trakt savce.

29. Způsob podle nároku 28, vyznačující se tím, savcem je vepř.

18.05.99

30. Způsob podle nároku 29, vyznačující se tím, že zdrojem submukózní tkáně je tenké střevo vepře.
31. Způsob podle nároku 27, vyznačující se tím, že dezinfekčním činidlem je oxidační činidlo.
32. Způsob podle nároku 27, vyznačující se tím, že dezinfekčním činidlem je peroxysloučenina.
33. Způsob podle nároku 32, vyznačující se tím, že dezinfekčním činidlem je organická peroxysloučenina.
34. Způsob podle nároku 33, vyznačující se tím, že dezinfekčním činidlem je perkyselina.
35. Způsob podle nároku 34, vyznačující se tím, že perkyselina se vybere ze skupiny sestávající z peroctové kyseliny, perpropionové kyseliny a z perbenzoové kyseliny.
36. Způsob podle nároku 35, vyznačující se tím, že perkyselinou je peroctová kyselina.
37. Způsob podle nároku 34, vyznačující se tím, že uvedené působení na zdroj submukózního tkáňového zdroje zahrnuje působení prostředku obsahujícího alkohol a perkyselinu.
38. Způsob podle nároku 37, vyznačující se tím, že alkohol má 1 až asi 6 atomů uhlíku.
39. Způsob podle nároku 38, vyznačující se tím, že alkohol se vybere ze skupiny sestávající z ethanolu, propanolů a butanolů.

40. Způsob podle nároku 39, vyznačující se tím, že alkoholem je ethanol.

41. Způsob podle nároku 40, vyznačující se tím, že prostředkem je vodný roztok ethanolu obsahující od asi 0,1 % do asi 0,3 % obj. peroctové kyseliny.

42. Způsob podle nároku 34, vyznačující se tím, že uvedený postup zahrnuje působení prostředku obsahujícího perkyselinu s pH asi 2 až asi 6 na tkáňový submukózní zdroj.

43. Způsob podle nároku 42, vyznačující se tím, že pH prostředku je od asi 2 do asi 4.

44. Způsob podle nároku 43, vyznačující se tím, že perkyselinou je kyselina octová a prostředek obsahuje asi 0,1 % až asi 0,3 % obj. peroctové kyseliny.

45. Způsob získání matrice na bázi kolagenu z tkáňového submukózního zdroje jenž obsahuje:

poskytnutí submukózního tkáňového zdroje, na něhož se působilo dezinfekčním činidlem; a

odejmutí matrice na bázi kolagenu z uvedeného zdroje submukózní tkáně.

46. Způsob podle nároku 45, vyznačující se tím, že uvedený submukózní tkáňový zdroj je z tenkého střeva.

47. Způsob podle nároku 46, vyznačující se tím, že uvedená dezinfekce zahrnuje působení oxidačního činidla na submukózní tkáňový zdroj.

48. Způsob podle nároku 47, vyznačující se tím, že uvedené působení zahrnuje kontakt submukózního tkáňového zdroje s vodným prostředkem, jež obsahuje oxidační činidlo.

49. Způsob podle nároku 47, vyznačující se tím, že uvedené působení zahrnuje kontakt submukózního tkáňového zdroje s vodným prostředkem obsahujícím peroxysloučeninu.

50. Způsob podle nároku 49, vyznačující se tím, že peroxysloučeninou je perkyselina.

51. Způsob podle nároku 50, vyznačující se tím, že perkyselinou je peroctová kyselina.

52. Postup podle nároku 51, vyznačující se tím, že prostředek obsahuje alkohol.

53. Postup podle nároku 52, vyznačující se tím, že alkoholem je ethanol.

54. Způsob podle nároku 51, vyznačující se tím, že tenké střevo je z vepře.

55. Kompozice obsahující:

strukturu obsahující kolagen nejprve odejmutou z tkáňového zdroje, jenž obsahuje uvedenou strukturu a jinou tkáň, přičemž uvedená struktura obsahující kolagen nemá endotoxinovou koncentraci vyšší než 12 endotoxinových jednotek na gram.

56. Kompozice podle nároku 55, vyznačující se tím, že uvedenou vrstvou obsahující kolagen je submukóza a uvedeným tkáňovým zdrojem je tenké střevo.

13.05.99

57. Kompozice podle nároku 56, vyznačující se tím, že uvedeným tkáňovým zdrojem je tenké střevo vepře.

58. Kompozice podle nároku 55, vyznačující se tím, že uvedená koncentrace endotoxinu je nižší než 10 endotoxinových jednotek na gram.

59. Kompozice podle nároku 58, vyznačující se tím, že uvedená koncentrace endotoxinu je nižší než 5 endotoxinových jednotek na gram.

60. Kompozice podle nároku 50, vyznačující se tím, že uvedená koncentrace endotoxinu je nižší než 1 endotoxinová jednotka na gram.

61. Kompozice podle nároku 60, vyznačující se tím, že uvedená koncentrace endotoxinu je nižší než 0,5 endotoxinových jednotek na gram.

62. Očistěná matrice obsahující kolagen získaná z tkáňového zdroje savce, přičemž uvedená matrice obsahuje telasubmukózní tkáň savce a zbytkové nečistoty z uvedeného zdroje, a uvedená struktura se získá postupem, jenž obsahuje dezinfekci uvedeného tkáňového zdroje savce a poté odejmutí uvedené struktury z této dezinfikované tkáně.

63. Kompozice podle nároku 62, vyznačující se tím, že uvedená dezinfekce zahrnuje kontakt zdroje tkáně savce s vodným roztokem obsahujícím perkyselinu.

64. Způsob podle nároku 63, vyznačující se tím, perkyselinou je peroctová kyselina.

1/1

Fig. 1.