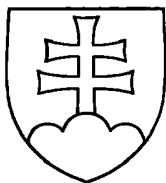


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania: 22.08.97
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 60/024 542, 60/ 024 693
(32) Dátum priority: 23.08.96, 06.09.96
(33) Krajina priority: US, US
(40) Dátum zverejnenia: 08.10.99
(86) Číslo PCT: PCT/US97/14855, 22.08.97

(21) Číslo dokumentu:

224-99

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl. 6 :

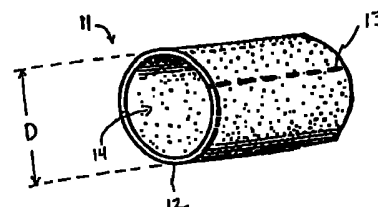
A 61L 27/00,
A 61F 2/00

(71) Prihlasovateľ: COOK BIOTECH, Inc., West Lafayette, IN, US;
MED INSTITUTE, Inc., West Lafayette, IN, US;
COOK Inc., Bloomington, IN, US;

(72) Pôvodca vynálezu: 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;

(54) Názov prihlášky vynálezu: Štepová protéza, materiály s ňou spojené a spôsoby jej výroby

(57) Anotácia:
Štepová protéza (11) zahŕňa očistenú maticovú štruktúru na báze kolagénu odobranú zo submukózneho tkanivového zdroja. Submukózný tkanivový zdroj sa očistí pomocou dezinfekcie a krokov na deaktiváciu a odstránenie nečistôt, čo spôsobuje, že očistená štruktúra je biokompatibilná a vhodná na transplantáciu na tele alebo vnútri tela pacienta.



Štepová protéza, materiály s ňou spojené a spôsoby jej výroby

Táto prihláška nárokuje prioritu amerických patentových prihlášok č. 60/024 542 a 60/024 693 podaných dňa 23. augusta 1996, respektíve 6. septembra 1996, pričom obidve sú tu jednotlivo začlenené ako súčasť popisu.

Oblasť techniky

Tento vynález sa týka štruktúr v lekárstve a hlavne štepovej protézy, materiálov s ňou spojených a spôsobu jej výroby.

Doterajší stav techniky

Tkanivové implantáty v čistej forme, ktoré sú odvodené od látok na základe kolagénu sa bežne vyrábajú a sú popísané v literatúre. Prostredníctvom molekúl kolagénu alebo materiálov na báze kolagénu sa vyrábajú kohezívne filmy s vysokými pevnosťami v ťahu. Na zosieťovanie molekúl kolagénu, ktoré tvoria filmy s vysokými pevnosťami v ťahu sa však využívajú aldehydy. Z materiálov tohoto typu je možné aldehydy z filmov vylúhovať napr. pomocou hydrolýzy. Keďže zvyšky týchto zlúčenín sú cytotoxické, nie sú tieto filmy ako tkanivové implantáty vhodné.

Iné spôsoby, ktoré boli vyvinuté na zhotovenie tkanivových implantátov na báze kolagénu sa snažia vyhnúť problémom spojeným so zosieťovaním molekúl kolagénu pomocou aldehydu. Jeden zo spôsobov objasňuje U.S. patent č. 5 141 747, v ktorom sa uvádza, že molekuly kolagénu sa zosieťujú alebo spájajú na svojich epsilon aminoskupinách lyzínu, potom nasleduje denaturácia spojených a výhodne modifikovaných molekúl kolagénu. Takto upravený kolagénový materiál sa používa pre preparáciu bubienkovej membrány. Zatiaľ čo sa zistilo, že tieto membrány vykazujú dobré fyzikálne vlastnosti a že je možné ich sterilizovať následnými postupmi, nie sú však schopné pretvárať alebo vytvárať podmienky pre rast buniek, alebo všeobecne podporovať opätovný rast a hojiť poškodené alebo choré tkanivové

štruktúry.

Všeobecne povedané, pracovníci výskumu v oblasti chirurgie sa veľa rokov snažia vyvinúť nové postupy a materiály, ktoré by sa dali použiť ako implantáty a transplantáty tkanív na nahradenie alebo preparáciu poškodených alebo chorých tkanivových štruktúr, napr. ciev, svalov, väzív, šliach a podobne. Dnes nie je neobvyklé, napr. v ortopedickej chirurgii získať jabĺčkovú šľachu autogénneho alebo alogénneho pôvodu, ktorá pôsobí ako náhrad a pri skrížene natrhnutom väzive. Chirurgické postupy pri použití týchto techník sú známe. Pre chirurgov je obvyklé používať implantovateľné protézy vytvorené z plastu, kovu a/alebo z keramického materiálu s cieľom obnovenia alebo náhrady fyziologických štruktúr. Avšak napriek ich širokému využitiu, predstavujú implantované protézy pre pacienta veľa s tým súvisiacich rizík.

Výskumní pracovníci sa tiež pokúšali vyvinúť uspokojivé polyméry alebo materiály z plastickej hmoty, ktoré by slúžili ako funkčné tkanivové štruktúry a/alebo iné spojivové tkanivá, napr. pokiaľ ide o tkanivá týkajúce sa prietrže a pri poranení kĺbov ich dislokáciou. Zistilo sa, že je obťažné poskytnúť pevný, odolný plastický materiál, ktorý by bol vhodný ako dlhodobá spojivová tkanivová náhrada. Tkanivá, ktoré obklopujú plastický materiál, sa môžu stať infekčnými a ťažkosti pri liečení týchto infekcií často vedú k zlyhaniu implantátov alebo protézy.

Ako už bolo uvedené vyššie, ako tkanivové náhrady sa využívajú rôzne materiály na báze kolagénu; avšak tieto materiály buď nevykazujú požadovanú pevnosť v ťahu, alebo sa pri ich použití vytvára infekcia či iné imunogénne reakcie, opuzdrenie, alebo sa vytvárajú iné problémy pri zaťažovaní organizmu antibiotikami, rastovými faktormi a podobne. Napr. patent U.S. č. 4 956 178 uvádza kolagénovú maticu submukózy, ktorá sa získa z intestinálneho traktu cicavcov; pričom sa uvádza, že kolagénová matica je zaťažovaná antibiotikami. S tým súvisiaci patent U.S. č. 5 372 821 uvádza, že kolagénovú maticu submukózy je možné

sterilizovať obvyklými spôsobmi, napr. morením pomocou aldehydu, propylénoxidom, gama žiarením a kyselinou peroctovou. Okrem toho, že vrstva submukózy sa najprv delaminuje z tkaniva, ktorého ho obvykle obklopuje, pred jej sterilizáciou, neuvádza patent žiadne špecifické kroky postupu.

Vzniká tu preto požiadavka z týchto zdrojov tkanív získať zlepšené očistené formy matric na báze kolagénu. Ďalej tu vzniká potreba poskytnúť postup, pomocou ktorého sa ľahko tieto matrice z tkanív odoberú tak, aby sa zvýšil výťažok očistených produktov. Tento vynález tak rieši tieto požiadavky.

Podstata vynálezu

V zhode s jednou výhodnou realizáciou tohoto vynálezu sa poskytuje štepová protéza, ktorá zahrnuje očistenú matricovú štruktúru na báze kolagénu odstránenú zo zdroja submukózneho tkaniva, pričom koncentrácia znečisťujúcej látky v očistenej štruktúre ju robí biokompatibilnou.

Iná výhodná realizácia podľa vynálezu poskytuje štepovú protézu, ktorá zahrnuje očistenú matricovú štruktúru na báze kolagénu odstránenú zo zdroja submukózneho tkaniva, kde očistená štruktúra má koncentráciu endotoxínu nižšiu ako 12 endotoxických jednotiek/g.

Iná výhodná realizácia podľa vynálezu poskytuje štepovú protézu, ktorý zahrnuje očistenú matricovú štruktúru na báze kolagénu odstránenú zo zdroja submukózneho tkaniva, kde očistená štruktúra obsahuje množstvo nukleovej kyseliny nižšie ako 2 ug/kg.

Iná výhodná realizácia podľa vynálezu poskytuje štepovú protézu, ktorá zahrnuje očistenú štepovú štruktúru odstránenú zo zdroja submukózneho tkaniva, kde koncentrácia vírusov očistenej štruktúry je nižšia ako 500 jednotiek vytvárajúcich ohraničenú škvrnu/g.

Tento vynález tiež poskytuje štepovú protézu, ktorá zahrnuje očistenú matricovú štruktúru na báze kolagénu odstránenú zo zdroja submukózneho tkaniva, kde očistená štruktúra má hladinu činiteľa pre uskutočňovanie postupu nižšiu ako 100 000 dielov/milión/kg.

Ďalšia realizácia podľa vynálezu sa týka spôsobu získania matrice na báze kolagénu zo zdroja submukózneho tkaniva. Spôsob zahrnuje pôsobenie dezinfekčného činiteľa na zdroj submukózneho tkaniva, pričom vytvára zdroj dezinfikovaného submukózneho tkaniva, z ktorého potom nasleduje odobratie matrice na báze kolagénu.

Iné výhodné realizácie podľa vynálezu poskytuje spôsob získania matrice na báze kolagénu zo zdroja submukózneho tkaniva, ktorý zahrnuje vytvorenie zdroja submukózneho tkaniva na ktoré sa pôsobí dezinfekčným činiteľom a potom sa odstráni matrica na báze kolagénu zo zdroja submukózneho tkaniva.

Tento vynález sa tiež týka spôsobu, ktorý zahrnuje štruktúru s obsahom kolagénu odobranú zo zdroja tkaniva, kde je spočiatku štruktúra a iné tkanivo, kde štruktúra s obsahom kolagénu nemá koncentráciu endotoxínu vyššiu ako 12 endotoxínových jednotiek/g.

Tento vynález tiež poskytuje očistenú kolagénovú maticu, pričom zdrojom pre získanie matrice je tkanivo cicavca, kde matrica zahrnuje submukózne tkanivo cicavcov a matrica sa získa postupom, ktorý zahrnuje dezinfekciu tkaniva cicavca a potom odobratie štruktúry z výsledného dezinfikovaného tkaniva cicavca.

Vo výhodnej realizácii poskytuje vynález očistené formy submukózných kolagénových matric, ktoré pochádzajú zo zažívacieho, respiračného, močového alebo genitálneho traktu živočíchov, kde bioburdenová koncentrácia v maticiach je v podstate nulová a/alebo kde predovšetkým matrice neobsahujú

pyrogény. Uprednostňovaná je kolagénová matrica, ktorú je možné implantovať ľudskému alebo zvieraciemu pacientovi bez vyvolania cytotoxickej odpovede, infekcie, odmietnutia implantátu alebo akéhokoľvek škodlivého účinku na väčšinu pacientov. Zatiaľ čo výhodná implantovateľná kolagénová matrica podľa niektorých hľadísk tohoto vynálezu primárne obsahuje submukózne tkanivo, môže v tomto prípade kolagénová matrica tiež obsahovať časti vrstiev laminárnej muscularis mucosa, muscularis mucosa lamina propria, vrstvy stratum compactum a/alebo iného tohoto tkanivového materiálu, čo závisí od zdroja z ktorého materiál pochádza.

V zhode s predkladaným vynálezom sa poskytuje očistená delaminovaná kolagénová matrica submukózneho tkaniva, ktorá pochádza zo zažívacieho, respiračného, močového alebo genitálneho traktu zvierat a ľudí, kedy sa delamináciou z infikovaného zdroja submukózneho tkaniva vytvorí uvedená očistená delaminovaná submukózna kolagénová matrica. Túto matricu je možné výhodne získať napr. postupom, pri ktorom sa pôsobí dezinfekčným činidlom na doteraz žiadnym spôsobom nespracúvaný nedelaminovaný submukózny zdroj získaný zo zažívacieho, respiračného, močového alebo genitálneho traktu živočíchov, pričom potom nasleduje delaminácia submukóznej kolagénovej matrice z pripevnených tkanív. Výhodná kolagénová matrica má koncentráciu bioburdenu v podstate nulovú, pričom túto matricu je možné implantovať pacientovi, ktorým je človek alebo zviera bez vyvolania následnej cytotoxickej odpovede, infekcie, odmietnutia implantátu alebo akéhokoľvek iného škodlivého účinku pre väčšinu z týchto pacientov.

V zhode s predkladaným vynálezom sa poskytuje ešte ďalší spôsob získania vysokočistej delaminovanej submukóznej kolagénovej matrice, ktorá je v podstate v sterilnom stave, kde nastáva delaminácia dezinfikovaného zdroja submukózneho tkaniva, pričom sa získa delaminovaná submukózna kolagénová matrica. Výhodný spôsob obsahuje pôsobenie dezinfekčného činidla na nedelaminovaný submukózny zdroj, ktorý sa získa zo zažívacieho,

respiračného, močového a genitálneho traktu zvierat alebo človeka, potom nasleduje delaminácia submukózneho tkaniva z iného vlastného zdroja tkanív, ktoré sú pripevnené k submukóznemu tkanivu.

V zhode s predkladaným vynálezom sa poskytuje ešte ďalšia vysokočistá submukózna kolagénová matrica pochádzajúca zo zažívacieho, respiračného, močového alebo genitálneho traktu živočíchov, ktorá má koncentráciu bioburdenu v podstate nulovú a kde uvedená matrica neobsahuje na povrchu v podstate žiadne bunkové zvyšky, napr. v podstate neobsahuje žiadne svalové tkanivo, mukózne vrstvy, lipidy alebo bunkový odpad. Výhodnú kolagénovú matricu je možné implantovať pacientovi, ktorým je človek alebo zviera bez vyvolania následnej cytotoxickej odpovede, infekcie, odmietnutia implantátu alebo akéhokoľvek škodlivého účinku na pacienta.

V zhode s predkladaným vynálezom sa poskytuje ešte ďalšie vysokočisté submukózne tkanivo, ktoré pochádza zo zažívacieho, respiračného, močového alebo genitálneho traktu živočíchov, pričom submukózne tkanivo sa delaminuje pri v podstate sterilných podmienkach, ktoré obsahujú rastových činiteľov a submukózny zdroj sa obmýva rozpúšťadlom napr. vodou, potom nasleduje pôsobenie dezinfekčného činidla, výhodne pomocou kyseliny peroctovej pri pH asi 1,5 do asi 10 s následnou delamináciou submukózy z pripevnených vlákien. Pri pH vyššom ako 7 pôsobí kyselina peroctová ako pufer. Týmto spôsobom vhodne vyrobené matrice majú v podstate vysoký obsah jedného alebo viacerých rastových činiteľov.

V zhode s predkladaným vynálezom sa poskytuje ešte ďalšia tkanivová štepová kompozícia, ktorá zahrnuje submukóznu kolagénovú matricu, ktorá v podstate neobsahuje pyrogény. Výhodnejšie budú tieto kompozície zahrňovať submukóznu kolagénovú matricu, ktorá obsahuje látky spôsobujúce horúčku v množstve asi 1 endotoxínovej jednotky na 1 g (EU/g) alebo nižšie.

V zhode s predkladaným vynálezom bude ešte ďalšie vysokočisté submukózne tkanivo, ako je popísané vyššie, demonštrovať aktívnu angiogenézu *in vivo* pri implantácii ľudskému alebo zvieraciemu pacientovi.

Tento vynález sa týka očistených implantovateľných tkanivových útvarov, spôsobu vytvorenia týchto útvarov a ich použitia na podporu opätovného rastu a zahojenia poškodených alebo chorých tkanivových štruktúr. Hlavne sa vynález zameriava na očistené formy kolagénovej matrice submukózneho tkaniva, ktorá je vhodná pre použitie ako implantovateľné tkanivo a ďalej sa zameriava na spôsoby vytvárania týchto uvedených očistených foriem z implantovateľného tkaniva na báze kolagénu.

Tieto a iné hľadiská predkladaného vynálezu sú zrejmé osobám oboznámeným so stavom techniky, čo opätovne uvádza nasledujúci podrobný popis.

Prehľad obrázkov na výkrese

Obr. 1 zobrazuje v priestorovom zobrazení trubicovitú štepovú protéznu štruktúru v zmysle vynálezu.

Príklady realizácie

S cieľom ľahšieho pochopenia princípov vynálezu sa odkazuje na určité jeho výhodné realizácie a na ich popísanie bude zavedené špecifické terminologické vyjadrovanie. Jednako len, nemá to byť chápané ako obmedzenie rámca pôsobnosti vynálezu, čím sa myslí, že tu uvedené a zamýšľané úpravy, ďalšie modifikácie a aplikácie princípov podľa vynálezu sa pre odborníka v odbore môžu bežne vyskytovať.

Pri uvedenom rozbere riešení sa na tomto mieste používa množstvo termínov. Aby sa zaistilo jasné a konzistentné porozumenie popisu a patentovým nárokom, uvádzajú sa pre termíny nasledujúce definície.

Výraz bioburden sa vzťahuje na počet žijúcich mikroorganizmov, ktoré sa uvádzajú v jednotkách (CFU), ktoré sa vzťahujú na tvorbu ich kolónie a ktoré je možné zistiť na danom a/alebo v danom množstve materiálu. Príklady mikroorganizmov zahŕňujú baktérie, huby a ich spóry.

Výraz dezinfekcia sa vzťahuje na zníženie bioburdenu v materiáli.

Výraz sterilný sa týka podmienky, kedy obsah bioburdenu v skúšanom materiáli je taký, že pravdepodobnosť existencie jedného živého mikroorganizmu (CFU) na a/alebo v danej sekcii materiálu je 1 v 1 000 000 alebo nižšia.

Výraz pyrogénny sa vzťahuje na látku, ktorá vytvára horečnatú odpoveď po zavedení tejto látky do tela hostiteľa.

Výraz endotoxín sa vzťahuje predovšetkým na pyrogén, ktorý je súčasťou jedného gramu bunkovej steny bez prítomnosti baktérií. Endotoxíny sa nepretržite uvoľňujú z baktérií a kontaminujú materiály.

Výraz čistenie sa týka pôsobenia na materiál s cieľom odstránenia jedného alebo viacerých kontaminantov, ktoré sa vyskytujú spoločne s materiálom, napr. kontaminantov, ktoré sa vyskytujú s materiálom v prírode a/alebo mikroorganizmov alebo ich častí, ktoré sa vyskytujú na materiáli. Tieto kontaminanty pre objasnenie môžu byť známe tým, že sú príčinou toxicity, infekcie, horúčky, podráždenia, reaktivity, hemolytickej aktivity, karcinogenity a/alebo imunogenicity.

Výraz biokompatibilita sa týka schopnosti materiálu vyhovieť skúškam na biokompatibilitu, ktoré sú uverejnené v publikácii International Standard Organization (ISO) Standard č. 10993 a/alebo v publikácii U.S. Pharmacopeia (USP) 23 a/alebo v publikácii U.S. Food and Drug Administration (FDA) v memorande

modrej knihy č. G95-1 s názvom "Use of International Standard ISO-10993, Biological Evaluation of Medical Devices Part - 1: Evaluation and Testing". Typicky sa týmito skúškami stanovuje toxicita materiálu, jeho infekčnosť, pyrogenicita, dráždiaci potenciál, reaktivita, hemolytická aktivita, karcinogenicita a/alebo imunogenicita. Pod pojmom biokompatibilná štruktúra alebo materiál sa rozumie to, že ak je zavádzaný dovnútra tela väčšiny pacientov, nebude vyvolávať nepriaznivú reakciu alebo odpoveď. Okrem toho sa pozoruje, že efekt biokompatibility je možné uskutočniť pomocou iných kontaminantov, napr. pomocou priónov, povrchovo aktívnych činidiel, oligonukleotidov a iných činidiel s biokompatibilnými účinkami alebo s inými kontaminantmi.

Výraz kontaminant sa týka nežiadúcej zlúčeniny, ktorá je naviazaná na materiál alebo je v materiáli. Tie zahŕňujú, avšak nie sú tak obmedzené na ne. bioburden, endotoxíny, činidlá na uskutočňovanie postupu, ako napr. antimikrobiálne činidlá, krv, krvné komponenty, vírusy, DNK, RNK, spóry, zvyšky nežiadúcich tkanivových vrstiev, bunkový odpad a mukózu.

Výraz submukózne tkanivo sa týka vrstvy spojivového tkaniva s obsahom kolagénu, ktorá sa vo väčšine častí tráviaceho, respiračného, močového a genitálneho traktu živočíchov vyskytuje pod mukózou.

Ako je uvedené vyššie, predkladaný vynález všeobecne poskytuje štepovú protézu a materiály zahrnujúce očistenú matricovú štruktúru na báze kolagénu a spôsoby jej získania a jej použitia. Štepové protézy, ktoré sú výhodné podľa vynálezu, sa získavajú zo zdroja submukózneho tkaniva, napr. tkaniva s obsahom živočíšneho tkaniva, ako je napríklad ľudské tkanivo alebo iné tkanivo cicavcov, napr. bravčové tkanivo, hovädzie tkanivo alebo ovčie tkanivo.

Submukózne tkanivo vo svojom prirodzenom stave, ako mnoho živočíšnych tkanív, všeobecne neobsahuje choroboplodné zárodky, čo zaisťuje, že človek alebo zviera nie je infekčné alebo nie je

choré. Tento faktor sa uplatňuje najmä v prípade submukózneho tkaniva, ktoré je vnútornou vrstvou zažívacieho, respiračného, močového alebo genitálneho traktu živočíchov. Nie je teda všeobecne vystavené vplyvu baktérií alebo iných bunkových zvyškov, ako je epitel tráviaceho traktu. Jedným zo znakov tohoto vynálezu je objav, že pri dezinfekcii submukózneho zdroja tkaniva ešte pred lamináciou, je možné aseptický stav submukóznej vrstvy chrániť alebo v podstate ochrániť najmä tak, že odstup pri delaminácii prebieha pri sterilných podmienkach.

Hlavné sa zistilo, že dezinfekcia submukózneho zdroja s následným odstránením očistenej matrice, s obsahom submukózy, ktorou je napr. delaminácia submukózy z tunica muscularis a z tunica mucosa, minimalizuje kontamináciu submukózy baktériami a inými kontaminantmi. Naopak, ak sa to požaduje, umožňuje tento spôsob minimalizovať vplyv dezinfekčných alebo sterilizačných prostriedkov na izolovanú submukóznú matricu, čím sa v podstate zabezpečuje samotná biochémia submukózneho tkaniva a tým aj jej blahodarný účinok.

Submukóznú implantovateľnú kolagénovú matricu podľa tohoto vynálezu, ako je uvedené vyššie, je možné získať zo zažívacieho, respiračného, močového alebo genitálneho traktu živočíchov. Výhodne submukózne tkanivá, ktoré sú na báze kolagénu, teda s prevládajúcim kolagénom, pochádzajú zo zažívacieho traktu cicavcov a výhodnejšie pochádzajú z črevného traktu ošipáných. Najvýhodnejším zdrojom je tenké črevo, získané z dospelých prasiat, pričom každé prasa váži viac ako asi 450 libier. Črevá získané zo zdravých zvierat obsahujú v zažívacom trakte cievy a prívody krvi, ako aj v lúmene čriev rôzne mikróby, ako napr. *E. coli*. Preto dezinfekcia celého čreva, ktorá predchádza delaminácii submukózy, v podstate tieto kontaminanty odstráni a výhodne poskytuje implantovateľné submukózne tkanivo, ktoré v podstate neobsahuje krv a krvné komponenty, ako aj akékoľvek iné mikrobiálne organizmy, pyrogény alebo iné patogény, ktoré by mohli byť prítomné. Verí sa, že pri tomto postupe sa v podstate zabezpečí aseptický stav samotného submukózneho tkaniva, aj keď

by sa malo takto chápať, že sa skutočnosti takto uvedenej netýkajú tohoto vynálezu v tom zmysle, že by vynález mal byť obmedzený akoukoľvek teóriou.

Je tiež žiadúce, aby kolagénová matrica podľa tohoto vynálezu v podstate neobsahovala akékoľvek antibiotiká, antivírusové činidlá alebo akékoľvek činidlá antimikrobiálneho typu, ktoré môžu ovplyvňovať samotnú biochémiu matrice a jej schopnosť implantácie. Doteraz používaným spôsobom spracovania tohoto tkanivového materiálu je obmývanie delaminovaného tkaniva fyziologickým roztokom, pričom materiál sa nechá nasiaknuť antimikrobiálnym činidlom, ako sa napr. uvádza v U.S. patente č. 4 956 178. Zatiaľ čo tieto techniky môžu byť voliteľne uskutočňované s izolovanou submukózou, výhodné postupy podľa tohoto vynálezu sa vyhýbajú použitiu antimikrobiálnych činidiel a podobne, čo má nielen vplyv na samotnú biochémiu kolagénovej matrice, ale matrica nemôže byť tiež zbytočne zavádzaná do tkanív pacienta.

Ako bolo diskutované vyššie, objavilo sa, že vysokočistú formu implantovateľnej submukóznej kolagénovej matrice je možné získať najprv dezinfekciou submukózneho zdroja, ktorá predchádza odobratie, napr. pomocou delaminácie submukózneho zdroja, očistenej kolagénovej matrice, s obsahom submukóznej vrstvy. Pri uvedenom postupe boli tiež objavené určité výhody, ako aj zlepšené vlastnosti výslednej submukóznej vrstvy, ktoré zahŕňujú ľahšie odstránenie pripojených tkanív z vrstvy submukózy a - typicky - nízky kontaminačný diagram.

Postupy podľa vynálezu vhodne zahŕňujú najprv jednonásobné alebo viacnásobné obmytie submukózneho zdroja rozpúšťadlom, výhodne vodou. Po obmytí nasleduje jeho dezinfekcia. Dezinfekčným činidlom je vhodné oxidačné činidlo. Uprednostňované činidlá sú peroxozlúčeniny, výhodne organické peroxozlúčeniny a výhodnejšie perkyseliny. Dezinfekčné činidlá sa vhodne používajú ako kvapaliny, výhodne ako roztoky s pH asi 1,5 až asi 10, výhodnejšie s pH asi 2 až asi 6 a najvýhodnejšie s pH asi 2 až

asi 4. V uvedených spôsoboch podľa tohoto vynálezu sa všeobecné použitie dezinfekčného činidla podmieňuje časovým obdobím, ktoré zaisťuje regeneráciu charakteristických očistených submukózných matric, ako sú popísané v tomto vynáleze, výhodne sa matrice prejavujú hlavne v tom, že neobsahujú bioburden a/alebo hlavne neobsahujú pyrogény. Z tohoto pohľadu sú vhodné podľa tohoto vynálezu tie postupy, ktoré zahŕňujú ponorenie tkanivového zdroja (napr. pomocou potopenia alebo postrekom) kvapalným prostriedkom s obsahom dezinfekčného činidla s dobou pôsobenia aspoň asi 5 min, charakteristicky v rozsahu od asi 5 min do asi 40 hod a charakteristickejšie v rozsahu od asi 0,5 hod do asi 5 hod.

Uprednostňovaným peroxodezinfekčným činidlom je peroxid vodíka. Koncentrácia peroxidu vodíka môže ležať v rozsahu od asi 0,05 % do 30 % objemovo. Výhodnejšia koncentrácia peroxidu vodíka leží v rozsahu od asi 1 % do 10 % a najvýhodnejšie od asi 2 % do 5 % objemovo. Roztok peroxidu môže byť upravený alebo nemusí byť upravený pomocou pufru na pH od asi 5 do 9. Výhodnejšie je pH od asi 6 do 7,5. Uvedené koncentrácie je možné zriediť vodou alebo vodným roztokom obsahujúcim od asi 2 % do asi 30 % objemovo alkoholu. Najvýhodnejším alkoholom je etanol. Teplota roztoku môže ležať v rozsahu od asi 15 do 50 °C. Výhodnejšia teplota roztoku leží v rozsahu od asi 20 do 40 °C, najvýhodnejšia teplota roztoku leží v rozsahu od asi 32 do 37 °C. Doba pôsobenia môže ležať v rozsahu od asi 10 do 400 min. Výhodne je doba pôsobenia od asi 120 do 240 min. Výhodnejšie leží doba pôsobenia v rozsahu od 180 do 210 min.

Výhodným organickým peroxodezinfekčným činidlom je perpropiónová kyselina. Koncentrácia perpropiónovej kyseliny môže ležať v rozsahu od asi 0,1 do 10 % objemovo. Výhodnejšie leží koncentrácia perpropiónovej kyseliny v rozsahu od asi 0,1 do 1,0 % objemovo a najvýhodnejšie od asi 0,2 do 0,5 % objemovo. Tieto koncentrácie perpropiónovej kyseliny je možné zriediť vodou alebo vodným roztokom s asi 2 až 30 % objemovo alkoholu. Najvýhodnejším alkoholom je etanol. Na submukózny tkanivový zdroj je možné pôsobiť roztokom organického peroxidu počas asi 15 min až asi 40

hod. a typicky počas asi 0,5 hod až asi 8 hod. Iné vhodné peroxidezinfekčné činidlá sú popísané v publikácii *Desinfection, Sterilization and Preservation*, S. Block, Editor, 4th Edition, Philadelphia, Lea & Febiger, pp. 167-181, 1991 v kapitole "Peroxygen Compounds", S. Block; a v publikácii *Industrial Biocides*, K. Payne, Editor, New York, John Wiley and Sons, pp. 91-116, 1988, v kapitole "Desinfection with peroxygens", M.G.C. Baldry and J.A.L. Fraser.

Iným oxidačným činidlom je chlórhexidín (1,6-di(4-chlór-fenyldiguanido)hexán) vo forme diglukonátu. Rozsah koncentrácie chlórhexidíndiglukonátu môže ležať v rozsahu od asi 0,1 do 15 % hmot. Výhodnejšie leží koncentrácia chlórhexidínglukonátu v rozsahu od asi 0,1 do 2 % hmotn. a najvýhodnejšie od asi 0,2 do 0,5 % hmotn. Uvedený roztok môže byť upravený, ale tiež nemusí, pufračným činidlom na pH od asi 5 do 8. Výhodnejšie leží pH v rozsahu od 5,5 do 7. Tieto koncentrácie je možné zriediť vodou alebo vodným roztokom obsahujúcim asi 2 až asi 20 % objemovo alkoholu. Najvýhodnejším alkoholom je etanol s koncentráciou asi 5 až 10 %. Teplota roztoku môže ležať v rozsahu od asi 15 do 30 °C. Činidlo môže pôsobiť počas asi 10 až 400 min. Najvýhodnejšie pôsobí činidlo počas asi 30 až 60 min. Iné činidlá na báze chlóru popisuje publikácia *Desinfection, Sterilization and Preservation*, S. Block, Editor, 4th Edition, Philadelphia, Lea & Febiger, pp. 274-289, 1991, v kapitole "Chlorhexidine", G.W. Denton.

Vo výhodných preparatívnych postupoch je možné rozpustiť perkyselinu alebo iné dezinfekčné činidlo v zriedenom vodnom roztoku alkoholu, pričom alkohol má výhodne od 1 do asi 6 atómov uhlíka a kde celkový obsah alkoholu môže ležať v rozsahu od asi 1 do asi 30 %, vzťahnuté na objem roztoku. Výhodnejšie alkoholy pre použitie podľa tohoto vynálezu sú vybrané zo skupiny zloženej z etanolu, z propanolov a butanolov. Pre tento cieľ je najvýhodnejším alkoholom etanol.

Ak sa použije perkyselina na dezinfekciu, vyberie sa výhodne zo skupiny zloženej z peroctovej kyseliny, perpropiónovej

kyseliny alebo perbenzoovej kyseliny.

Najvýhodnejším dezinfekčným činidlom je kyselina peroctová. Výhodne sa táto kyselina zriedi alkoholom, objemovo na asi 2% až 10% roztok. Koncentrácia kyseliny peroctovej môže ležať napr. v rozsahu od asi 0,1 do asi 0,5 objemových %. Najvýhodnejšie koncentrácia peroctovej kyseliny leží v rozsahu od asi 0,1 do asi 0,3 objemových %. Ako dezinfekčné činidlo je možné tiež použiť peroxid vodíka. Alternatívne, alebo okrem toho, je možné tkanivový zdroj submukózy, akým je napr. tenké črevo, dezinfikovať pomocou dezinfekčných činidiel, ako je glutaraldehyd, formalín a podobne, ktoré sú známe svojou schopnosťou v podstate zosieťovať kolagénové matrice, na rozdiel od účinkov iných dezinfekčných činidiel, ako sú napr. perkyseliny, ktoré túto schopnosť nemajú. Pre ciele dezinfekcie je možné okrem toho na submukózový zdroj pôsobiť radiáciou, napr. gama radiáciou.

Odlišnosti pri dezinfekčnom postupe môžu ďalej zahŕňať:

1. Na intestinálne tkanivo sa pôsobí 0,2% roztokom kyseliny peroctovej v 5% roztoku etanolu v hmotnostnom pomere roztok:tkanivo 10:1. pH roztoku je 2,6. Roztok a tkanivo sa spolu intenzívne miešajú 2 hod.
2. Na intestinálne tkanivo sa pôsobí 1% kyselinou peroctovou v 25% roztoku etanolu v hmotnostnom pomere roztok:tkanivo 5:1. pH roztoku je 2. Roztok a tkanivo sa spolu intenzívne miešajú 1 hod.
3. Na intestinálne tkanivo sa pôsobí 1% kyselinou peroctovou v 15% etanole a v 10% roztoku peroxidu vodíka v hmotnostnom pomere roztok:tkanivo 5:1. Roztok a tkanivo sa spolu intenzívne miešajú 1 hod.
4. Neporušené tkanivo tenkého čreva sa oplachuje 4x veľmi čistou vodou počas 15 min. Intestinálne tkanivo je potom podrobené radiácii elektrónovými lúčmi s intenzitou 1,5 MRAD.

5. Zdravé tkanivo tenkého červa sa obmýva 4x veľmi čistou vodou počas 15 min. V pozdĺžnom smere pohybujúci sa pás intestinálneho tkaniva sa s cieľom dezinfekcie podrobuje žiareniu pulzného svetla s vysokou intenzitou.

Potom nasleduje úprava submukóznej vrstvy popísaná vyššie, kedy sa vrstva od svojho zdroja delaminuje, pričom zdrojom je napr. neporušené intestinálne tkanivo, maternicové tkanivo kravy a podobne. Zistilo sa, že pri nasledujúcom obvyklom postupe podezinfekčného odlupovania sa ľahšie z upevnených tkanív, napr. aspoň z tkaniva tunica muscularis, oddelí submukózna vrstva, v porovnaní s submukóznou vrstvou odlúpnutou pred dezinfekciou. Okrem toho bolo objavené, že výsledná submukózna vrstva vo svojej najvýhodnejšej forme vykazuje skvelú histológiu, že na svojom povrchu obsahuje menšie množstvo upevnených tkanív a bunkových zvyškov v porovnaní s submukóznou vrstvou získanou najprv delamináciou submukóznej vrstvy z jej zdroja a potom dezinfekciou tejto vrstvy. Okrem toho je možné týmto postupom získať väčšie množstvo rovnomerného submukózneho tkaniva, pričom takto získané submukózne tkanivo má rovnaké alebo podobné fyzikálne alebo biochemické vlastnosti, ktoré sa pri každom pokuse pri oddeľovaní vrstvy vcelku nemenia. Dôležité je, že sa pri tomto postupe získa vysokočisté, v podstate sterilné submukózne tkanivo.

Odlupovanie submukózy z uvedeného zdroja sa výhodne uskutočňuje pomocou dezinfikujúceho alebo sterilného zariadenia na čistenie čriev, kde sa vytvára submukóza, ktorá je v podstate sterilná s minimálnym počtom krokov. Vhodným zariadením na čistenie čriev je Model 3-U-400 Stridhs Universla Machine for Hot Casing, komerčne dostupný od firmy AB Stridhs Maaskiner, Göteborg, Sweden. Preto sú merané koncentrácie bioburdenu minimálne alebo v podstate nulové. Samozrejme je možné použiť na delamináciu submukózneho zdroja aj iné prostriedky bez odchýlenia sa od podstaty tohoto vynálezu, čo zahŕňa napr. delamináciu rukou.

Nedávno bolo objavené, že výhodnejšie spôsoby podľa tohoto vynálezu nielen že eliminujú alebo výrazne redukovujú kontaminanty obsiahnuté v submukóznej kolagénovej matrici, ale tiež vytvárajú tkanivo, ktoré v podstate nepodlieha degradácii, pokiaľ ide o fyzikálne a mechanické vlastnosti, čo je napr. rozdielna pórovitosť (to znamená stav, kedy na jednej strane submukóznej vrstvy je väčšia pórovitosť ako na druhej strane), ďalej tkanivo vykazuje dobrú pevnosť, napr. pevnosť proti prasknutiu. Ďalej bolo objavené, že výhodnejšie postupy pre submukóznú kolagénovú maticu nemajú nepriaznivý vplyv na jej rozdielnú pórovitosť, ktorý rozhodujúcim spôsobom ovplyvňuje účinnosť tohoto tkanivového implantátu. Nie je nevyhnutné napr. na tkanivo pôsobiť zosieťovacím činidlom alebo pomocou materiálu, ktorý rozrušuje pórovitosť alebo základnú prirodzenú štruktúru kolagénovej matrice. Okrem toho, ak sa použije peroxid vodíka, má matica ako celok väčšiu pórovitosť, ako aj vyšší obsah kyslíka. To pomáha zabezpečiť, že nie sú prítomné kontaminanty, napr. endotoxíny, pyrogény a podobne.

Vo výhodnej realizácii matrice na báze kolagénu podľa tohoto vynálezu (napr. s obsahom submukózy) tiež prejavujú schopnosť privodiť aktívnu angiogézu, to znamená rast ciev vnútri tkanivovej matrice. V tomto ohľade tieto výhodné matrice podľa vynálezu obsahujú prospešné zložky vyskytujúce sa prirodzene v matrici, ktoré zahŕňajú napr. jeden alebo viac glykozaminoglykánov, glykoproteínov, proteoglykánov a/alebo rastové faktory (napr. pretvárajúci rastový faktor - α , pretvárajúci rastový faktor - α_1 a/alebo fibroblastický rastový faktor 2 (základ)).

Výhodné matrice na báze kolagénu podľa vynálezu, výhodne matrice s obsahom submukózy sa tiež vyznačujú nízkou koncentráciou nečistôt, ako uvádza ďalej Tabuľka 1, pričom koncentrácia každej nečistoty sa zisťuje individuálne alebo v akejkoľvek kombinácii s niektorou alebo so všetkými ostatnými popísanými nečistotami. Uvedené skratky v Tabuľke vyjadrujú nasledujúce: CFU/g = jednotky tvoriace kolóniu vzťahnuté na 1 g;

PFU/g = jednotky tvoriace ohraničenú škvrnu vzťahnuté na 1 g;
 µg/mg = mikrogramy vzťahnuté na 1 miligram; ppm/kg = dielov na
 milión na kilogram.

Tabuľka 1

Charakt. znak	Prvá výhodná koncentrácia	Druhá výhodná koncentrácia	Tretie výhodná koncentrácia
Endotoxín	< 12 EU/g	< 10 EU/g	< 5 EU/g
Bioburden	< 2 CFU/g	< 1 CFU/g	< 0,5 CFU/g
Huba	< 2 CFU/g	< 1 CFU/g	< 0,5 CFU/g
Nukleová kys.	< 10 µg/mg	< 5 µg/mg	< 2 µg/mg
Vírus	< 500 PFU/g	< 50 PFU/g	< 5 PFU/g
Upravujúce činiteľ	< 100000 ppm/kg	< 1000 ppm/kg	< 100 ppm/kg

Výhodnejšia koncentrácia endotoxínu pre matricu na báze kolagénu podľa vynálezu je nižšia ako 1 EU/g, pričom najvýhodnejšia je nižšia ako 1 EU/g.

Očistené matrice na báze kolagénu podľa tohoto vynálezu je možné pripraviť množstvom spôsobov, pričom je možné vytvoriť kolagénne matrice vhodné pre použitie ako *in vivo*, tak aj *in vitro*. Je možné napríklad vytvoriť submukóznú matricu na zaistenie tkanivových štepov vhodných pre vaskulárne aplikácie, ako napríklad všeobecne popisuje U.S. patent 2 127 903 a 4 902 508. S odvolaním na Obr. 1 sa obvykle pre vaskulárne transplantácie použije trubicovité štiepenie protézovej štruktúry

11, ktorá je vytvorená z matrice alebo ktorá zahrnuje maticu na báze kolagénu 12, ktorej priemer "D" sa prispôsobuje cieve, ktorá vedie krv príjemcu. Pri jednom zo spôsobov je to možné dosiahnuť uchopením trubicovej časti alebo pásu submukóznej matrice pre definovanie valca, ktorý má priemer "D" približne rovnaký ako je priemer cievy príjemcu, pričom zošitím, zviazaním alebo inak zabezpečujúcim pozdĺžnym švom 13 sa vytvára vhodná veľkosť trubicového vaskulárneho štepu, s priesvitom 14, kadiaľ prechádza krv. Pri názorných prípravných postupoch sa štep vytvára z sterilnej tyčinky alebo trňa s vonkajším priemerom približne zhodným s uvedenou cievou, ktorá sa má transplantovať. Napr. sa tyčinka zavádza dovnútra priesvitu submukóznej časti, ktorá zostáva vo svojom prirodzenom trubicovitom tvare. Potom sa odoberie prebytočné tkanivo a požadovaný priemer priesvitu sa dosiahne zošitím štepu v pozdĺžnom smere (napr. použitím dvoch nepretržitých zošívacích nití alebo jednoducho prerušovanou zošívacou niťou) alebo použitím iných zo stavu techniky známych techník na podviazanie ciev. Inou možnosťou je, že pás submukózneho tkaniva sa ovinie okolo tyčinky, pričom sa vytvorí prečnievajúci šev, ktorý je možné zošiť, zlepiť alebo inak podviazať a vytvára sa tak trubicovitý štepový útvar. V uprednostňovaných tvaroch môže byť vnútorný luminálny povrch štepu tvorený mukóznou stranou submukózneho tkaniva.

Mechanické vlastnosti submukózneho tkaniva podľa vynálezu sú veľmi vhodné ako materiály tkanivových štepov vo vaskulárnych liečebných prostriedkoch, pričom tkanivo má nízky index pórovitosti, vysokú poddajnosť a vysokú pevnosť proti prasknutiu. Odborník oboznámený so stavom techniky si bude vedomý toho, že výhodný tkanivový štepový materiál bude mať dostatočne nízku pórovitosť, ktorá zabraňuje pri operácii vnútornému krvácaniu a pritom ešte dostatočne vysokú pórovitosť, ktorá dovoľuje natiiahnutie novo pripravených vasa vasorum po celom štepovom materiáli, pričom sa vyživuje nová vnútorná vrstva steny cievy a jej luminálny povrch.

Submukózne tkanivo tohoto vynálezu je možné tiež pripraviť

ako tekuté kompozície, napr. pri použití techník uvedených v U.S. patente č. 5 275 826. V tomto prípade je možné pripraviť roztoky a suspenzie submukózneho tkaniva rozmelením a/alebo vylúhovaním s proteázou (napr. s trypsínom alebo s pepsínom) počas nevyhnutnej doby pre solubilizáciu tkaniva za tvorby v podstate homogénneho roztoku. Východiskový submukózny materiál sa vhodne rozmelí natrhávaním, narezaním, rozdrvením, rozstrihaním a podobne. Výhodné je drviť submukózne tkanivo v zmrazenom alebo mrazom vysušenom stave, aj keď dobré výsledky je možné získať rovnako tak aj spracovaním kúskov submukózy v suspenzii v rýchlobežnom miešači spolu s odvodnením a ak je to nevyhnutné, odstredením a oddekantovaním nadbytočného odpadu. Rozmelené submukózne tkanivo je možné vysušiť na prášok napr. sušením pomocou vymrazovania. Ak je to potrebné, je možné potom tento prášok hydratovať, teda ho zmiešať s vodou alebo s pufračným fyziologickým roztokom alebo ho voliteľne zmiešať s ďalšími farmaceuticky prijateľnými vehikulami, aby sa vytvorila tekutá tkanivová štepová kompozícia, ktorá má napr. viskozitu asi 2 až 300000 cps pri teplote 25 °C. Štepové kompozície s vyššou viskozitou môžu mať gélovitú alebo pastovitú konzistenciu.

Tekuté submukózne tkanivo podľa tohoto vynálezu nachádza použitie ako injekčný tkanivový xenoimplantát, napr. pri nutnej korekcii alebo pre nárast kostného alebo mäkkého tkaniva, najcharakteristickejšie pri náprave poranení alebo chýb vyvolaných chorobami tkanív. Tieto tekuté submukózne kompozície sa tiež s výhodou použijú ako plnivo pre implantované útvary, ktoré zahŕňujú napr. jeden alebo viac submukóznych pásov vytvorených ako uzatvorené (zošité) púzdra s použitím v kozmetike alebo pri chirurgických operáciách pre nápravu úrazov.

V ilustratívnom postupe prípravy submukózneho tkaniva podľa tohoto vynálezu sa submukózne tkanivo zmenšuje na malé kúsky (napr. pomocou trhania), ktoré sa vložia na ploché dno nádoby z nehrdzavejúcej ocele. S cieľom zmrazenia vzoriek sa do nádoby privedie kvapalný dusík, vzorky sa potom rozmelú, zatiaľ čo pri zmrazení sa tvorí hrubý submukózny prášok. Tento postup je možné

uskutočňovať napr. pri použití hrebeňového lisu s valcovitým mosadzným ingotom priliehajúcim zhora k povrchu zmrazených vzoriek. Ingot slúži ako medziplocha medzi vzorky a zdrojom tlaku, trňom. Aby boli vzorky stále zmrazené, môže sa kvapalný dusík k vzorkám submukózneho tkaniva pridávať v pravidelných intervaloch.

Na rozmelenie vzoriek submukózneho tkaniva na vhodné práškovité submukózne tkanivo v zhode s týmto vynálezom je možné využiť aj iné spôsoby. Je možné napr. vzorky submukózneho tkaniva sušiť zmrazením a potom rozdrviť použitím ručného hrebeňového lisu alebo pomocou iných drviacich prostriedkov. Alebo inak, práškovú submukózu je možné získať postupom v miešači pôsobiacom veľkým šmykovým napätím, pričom sa odvodňuje a suší.

Ďalším drvením submukózneho prášku pomocou dopredu vymrazenej trecej misky a tĺčika je možné vytvoriť konzistentný, veľmi jemne rozdelený produkt. Počas konečného drvenia, s cieľom udržania pevných zmrazených častíc, ako je potrebné, sa opäť použije kvapalný dusík. Prášok je možné ľahko hydratovať napr. pomocou pufrovaného fyziologického roztoku, pričom dôjde k vytvoreniu tekutého tkanivového materiálu podľa tohoto vynálezu, ktorý má požadovanú viskozitu.

Pri príprave iného výhodného tekutého materiálu je možné prášok submukózneho tkaniva preosiať cez drôtené sito, brať a podrobiť proteolytickému vylúhovaniu, pričom sa v podstate vytvorí homogénny roztok. Napríklad je možné prášok vylúhovať počas 48 hod pri izbovej teplote pepsínom v množstve 1 mg/ml (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo.) a 0,1 M roztokom kyseliny octovej, pričom sa upraví pH na 2,5 pomocou HCl. Po tejto úprave je možné reakčné prostredie neutralizovať hydroxidom sodným, aby sa inaktivovala peptická aktivita. Rozpustenú submukózu je možné potom skoncentrovať zrážaním vo forme soli a oddeliť ju pre ďalšie čistenie a/alebo vymrazovacie sušenie, čím sa získa prášok intestinálneho submukózneho tkaniva s rozpustenou proteázou.

Tekuté submukózne kompozície podľa tohoto vynálezu nachádzajú široké použitie pri tkanivových náhradách, pri narastaní a/alebo pri reparácii tkaniva. Tekuté submukózne kompozície je možné využiť na vyvolanie opätovného rastu prirodzeného spojivového tkaniva alebo kosti v mieste existujúcej poruchy. Pri injekčnom podaní účinného množstva tekutej submukóznej kompozície do miesta s poruchou tkaniva alebo do otvorenej rany, ktorú je nutné vyliečiť, môže ktokoľvek hneď využiť výhodné biotropné vlastnosti submukózy.

Zo submukózneho tkaniva je tiež možné vytvárať útvary s veľkým merným povrchom spojením dvoch alebo viacerých častí submukózneho tkaniva podľa vynálezu, napr. pri použití spôsobov popísaných v U.S. patente 2 127 903 a/alebo uverejnených v medzinárodnej prihláške č. WO 96/32146 zverejnenej 17.10.1996, v zverejnenej medzinárodnej prihláške č. PCT/US96/04271, podanej 5. apríla 1996. Teda napríklad je možné veľké množstvo prúžkov submukózy vzájomne spojiť jeden k druhému, napr. stlačením prečnievajúcich plošiek prúžkov, pri podmienke, že dôjde k dehydratácii a vytvorí sa tak celoplošný útvar s merným povrchom väčším ako bol povrch ktoréhokoľvek jednotlivého prúžku použitého na vytvorenie útvaru.

Submukózne tkanivo podľa vynálezu je možné tiež využiť pri príprave tkanivových štepových útvarov vhodných ako liečebné ortopedické prostriedky pre mäkké tkanivá, napr. pri preparácii šliach alebo väzív pomocou spôsobov známych zo stavu techniky, ktoré sa využívajú v praxi aj u iných materiálov odvodených od prírodných alebo syntetických štepových materiálov. Napr. reparačné spôsoby všeobecne popisujú U.S. patent č. 2 127 903 a U.S. 5 281 422, pomocou ktorých je možné použiť submukózne tkanivo podľa tohoto vynálezu.

Pre aplikáciu náhrad šliach a väzív je možné segment submukózneho tkaniva dopredu upraviť predĺžením jeho napínaním v pozdĺžnom smere. Napr. segment submukózy je možné predĺžiť pri dlhotrvajúcej aplikácii jeho zaťažením v smere jeho pozdĺžnej osi

(napr. zaveseným závažím) počas doby, ktorá je nevyhnutná pre predĺženie od asi 10 % do asi 20 % segmentu tkaniva. Štepový materiál je možné tiež dopredu upraviť laterálne. Samotný submukózny segment je možné potom vytvarovať alebo v kombinácii s ostatnými segmentmi na množstvo rôznych tvarov, ktoré slúžia ako náhrady väzív alebo šliach, alebo ako náhrady na zosadenie zlomeného alebo pretrhnuté väziva alebo šľachy.

Pre tieto spojivové tkanivové štepové liečebné prostriedky sa segment vhodne utvára tak, aby mal jednovrstvové alebo viacvrstvové usporiadanie, pričom viacvrstvový štep materiálu má vytvorené aspoň protilahlé koncové časti a/alebo protilahlé laterálne časti na zaistenie vystuženia na upnutie k fyziologickým štruktúram, ako je kosť, šľacha, väz, chrupka a sval. Pri aplikácii náhrady väzu sa protilahlé konce náhrady upevnia k prvej a k druhej kosti, respektíve kosti sa typicky spoja do kĺbu, ako je to v prípade kolenného kĺbu. Pri nahradení šľachy sa jeden koniec štepového útvaru upevňuje ku kosti a druhý koniec k svalu.

Ako sa uvádza vyššie, pri aplikáciách spojivových tkanív bude výhodné vytvárať alebo tvarovať koncové časti štepového útvaru, ktorý má byť upevnený, napr. ku kostnej štruktúre tak, že útvár bude znižovať možnosť roztrhnutia štepu v mieste upnutia. Pre tieto ciele je možné submukózny štepový materiál zriasiť alebo čiastočne obrátiť von, čím sa zaistí viac vrstiev vzhľadom na zovretia, ktorými sú napr. svorkové upínače alebo zošívacie svorky. Alebo inak, submukózny segment je možné prehnúť na seba, spoja sa koncové časti a vytvorí sa tak prvá spojivová časť, ktorá sa má upevniť napr. k prvej kosti a oblúkom v prostrednej časti sa zaistí druhá spojivová časť, ktorá sa pripevní k druhej kosti kĺbom vzhľadom na prvú kosť.

Prispôbiť je možné napr. jednu z koncových častí submukózneho štepu tak, aby ho bolo možné pretiahnuť vnútrojškým tunelom stehennej kosti a upevní sa k nej, zatiaľ čo inú koncovú časť je možné prispôbiť pre pretiahnutie cez tunel holennej

kosti a upevní sa k nej, čo zaisťuje náhradu prirodzene skríženému väzivu, pričom segment sa prispôsobí tak, aby ho bolo možné umiestiť pri napätí pôsobiacom medzi tunelmi kostí a zaisťovala sa tak funkcia väziva, to znamená napínanie a funkcia v rôznych polohách, ktoré umožňuje normálne väzivo.

Keďže sa tieto štepy využívajú v ortopédii a ťoperujú sa v napnutom stave, je teda výhodné zlučovať dva alebo dokonca viac tkanivových segmentov, čím sa vytvorí viacpočetný (viacvrstvový) štepový útvar. Iným predmetom tohoto vynálezu je preto zaistiť tieto štepy, v ktorých sú usporiadané dva alebo viac submukózných segmentov tak, že majú svoje koncové časti spojené dokopy a laterálne časti prispôsobené tak, aby ich bolo možné upevniť na kosť, šľachu, väz alebo inú fyziologickú štruktúru. Jedným zo spôsobov zaisťujúcich vytvorenie dvojitého segmentu môže byť vytiahnutie jedného trubicovitého segmentu z vnútrajšku ďalšieho segmentu, pričom sa vytvorí trubica s dvojitou stenou a s pripínacími koncami, ktoré je možné upnúť napr. na kosť, šľachu alebo na väzivo. Tieto dvojité segmenty zaisťujú vyššiu pevnosť v ťahu a retela submucosatance k pružnosti pri napätí. Pri iných viacpočetných formách submukózných segmentov alebo prúžkov je možné zostaviť segmenty do tvaru spletených šnúr, napr. šnúr s tvarom kosoštvorcov alebo laniek, alebo s tvarom sieťoviny, ktorá zahrnuje viacpočetné slučky v pároch so susednými slučkami, ktoré sú užitočné pri reparácii väzív alebo šliach.

Submukózne tkanivo podľa tohoto vynálezu je možné tiež použiť na zaistenie ortopedického štepu ako spojivového tkaniva, ktoré pridružuje dokopy kusy zlomenej kosti a je vhodne smerovaná voči telu, pričom tkanivový segment je vytvorený tak, aby zaobaloval časti frakturovanej kosti, pričom je upevnený ku kosti.

Ešte pri ďalšej ortopedickej aplikácii je možné submukózne tkanivo podľa vynálezu použiť na reparáciu kostného tkaniva, napr. pri použití postupov popísaných v patente U.S. 5 641 518. Submukózne tkanivo vo forme prášku je možné implantovať do

poškodených alebo chorých častí kostí. Prášok submukózneho tkaniva je možné použiť samotný alebo v kombinácii s jedným alebo ďalšími bioaktívnymi činidlami, ako sú fyziologicky zlučiteľné materiály, rastové faktory, antibiotiká, chemoterapeutické činidlá, antigény, protilátky, enzýmy a hormóny. Uprednostňuje sa implantát vo forme prášku, ktorý je zlisovaný do dopredu určeného tvaru, ktorý sa potom implantuje do časti kosti a bude si v podstate zachovávať svoj tvar počas náhrady kosti štepom s obsahom endogénnych tkanív.

Submukózne tkanivo podľa vynálezu je možné tiež využiť ako substrát rastu buniek, kedy v ilustratívnej realizácii ide o substrát vo forme pásu, pasty alebo gélu v spojení s živinami, ktoré podporujú rast od nich závislých buniek, napr. eukaryotických buniek, napr. plodových buniek, fibroblastických buniek, fetálnej kože, osteosarkómu a buniek adenokarcinómu (čo uvádza napr. medzinárodná zverejnená prihláška č. WO 96/24661 s dátumom 15. augusta 1996, zverejnená medzinárodná prihláška č. PCT/US96/01842 podaná 9. februára 1996). V uprednostňovaných formách budú kompozície submukózneho materiálu podporovať vznik novo sa tvoriacich tkanív a/alebo podporovať delenie buniek cicavcov, ktoré zahŕňujú aj ľudské bunky.

Vynájdené submukózne tkanivo môže tiež slúžiť ako kolagénna matrica v kompozíciách s produkciou premenených buniek (čo uvádza napr. zverejnená medzinárodná prihláška č. WO 96/25179 s dátumom 22. augusta 1996, medzinárodná prihláška č. PCT/US/01136 podaná 16. februára 1996; a zverejnená medzinárodná prihláška č. WO 95/22611 s dátumom 24. augusta 1995, medzinárodná prihláška č. PCT/US95/02251 podaná 21. februára 1995). Všeobecne budú obsahovať tieto kompozície na pretváranie buniek očistené submukózne tkanivo podľa tohoto vynálezu, napr. v tekutej alebo pastovitej forme v spojení s rekombinačným vektorom (napr. plazmidom), s obsahom sekvencie nukleovej kyseliny, s ktorou sa geneticky premieňajú terčovité bunky *in vitro* alebo *in vivo*. Pred premenou terčovitých buniek môžu bunky obsahovať napr. pôvodné bunky.

Submukózne tkanivo podľa vynálezu je možné tiež využiť na preparáciu telovej steny, čo zahŕňa napr. reparáciu pri abdominálnych defektoch steny, ako sú prietrže, pri použití spôsobov, ktoré sú analogické s postupmi uvedenými v publikácii *Ann. Plast. Surg.*, 1995, 35:3740380; *J. Surg. Res.*, 1996, 60:107-114. Pri týchto aplikáciách sa uprednostňujú štepý submukózneho tkaniva podľa vynálezu, ktoré priaznivo pôsobia na organizmus, na jeho cievne zásobenie a vytvárajú pevné pretvorené tkanivo. Pri kožných aplikáciách je možné submukózne tkanivo podľa vynálezu využiť na reparáciu pri ľahkom alebo ťažkom zranení kože a pri náraste kože pri použití všeobecných transplantčných postupov, známych zo stavu techniky a z literatúry (ako napr. uvádza publikácia: *Annals of Plastic Surgery* 1995, 35:381-388). Okrem toho je všeobecne známe v mieste liečenia spáleniny zaistiť vytvorenie kožných náhradok, na ktoré sa epidermálne kožné štepý (výhodne kultivované epidermálne autoštepý alebo CEA štepý) transplantujú. Tieto kultivované štepý typicky zahŕňujú na kožnej náhrade transplantčné keratinocyty a/alebo fibroblasty. Podľa tohoto vynálezu je možné očistené submukózne tkanivo využiť ako kožnú náhradku napr. vo forme pásika a následne CEA štep transplantovať na submukózne tkanivo. Podľa praktickej stránky jedného zo spôsobov tohoto vynálezu je možné keratinocyty transplantovať napr. naočkovaním alebo premenou keratinocytu na mukozálnej strane submukózneho tkaniva. Tiež fibroblasty je možné transplantovať na mukozálnej a/alebo na protiľahlej (abluminálnej) strane submukózneho tkaniva.

Submukózne tkanivá podľa vynálezu je možné tiež využiť pri urogenitálnych tkanivových transplantáciách. Submukózne tkanivo je možné napr. využiť pri reparácii močového mechúra na vytvorenie skeletu močového mechúra pri jeho regenerácii pri použití spôsobov zodpovedajúcich riešeniam všeobecne popísaným v U.S. patente 5 645 860; v publikácii *Urology*, 1995, 46:396-400; a v publikácii *J. Urology*, 1996, 155:2098. Ak je submukózne tkanivo vo forme tekutiny, je možné ho tiež využiť pri endoskopickom injekčnom postupe pri náprave vazikureterálneho spätného toku.

Pri týchto aplikáciách sa injekcia so submukóznym tkanivom použije napr. v mieste pod ureterálnym otvorom pacienta, aby sa navodil rast hladkého svala a tvorba kolagénu.

Pri liečení iných chorôb je možné využiť útvary tkanivových štepov tvorených submukóznym tkanivom podľa vynálezu pri neurologických aplikáciách, napr. pri postupoch s reparáciou defektov zavinených úrazmi, kde je potrebná duralová náhrada, alebo pri nádorovej resekcii alebo pri operáciách na uvoľnenie tlaku.

Na lepšie pochopenie tohoto vynálezu, jeho špecifických znakov a výhod sú uvedené nasledujúce charakteristické príklady. Rozumie sa, že tieto príklady sú ilustratívne a nijako nelimitujú uvedený vynález.

Príklad 1

Zdravé intestinálne tkanivo s veľkosťou 30 stôp odobrané zo zdravej dospelaj ošípanej sa obmyje vodou. Na tento materiál sa potom pôsobí 0,2 % obj. peroctovej kyseliny v 5 % obj. roztoku etanolu vo vode pri stálom miešaní počas 2 hod. Z tohto intestinálneho tkaniva sa potom delaminuje vrstva submukózneho tkaniva v dopredu dezinfikovanom zariadení na čistenie čriev. Delaminované submukózne tkanivo sa potom obmyje 4% vodou bez choroboplodných zárodkov, pričom sa zisťujú nečistoty alebo kontaminanty, ako napr. endotoxíny, mikrobiálne mikroorganizmy a pyrogény. Koncentrácia bioburdenu výsledného tkaniva bola zistená v podstate nulová. V súlade s tým sa vrstva submukózneho tkaniva ľahko oddelí od uvedeného intestinálneho tkaniva, pričom sa na jej povrchu zistila minimálna prítomnosť bunkových zvyškov.

Príklad 2

Odrezaná časť zdravého intestinálneho tkaniva ošípanej s veľkosťou 10 stôp sa obmyje vodou. Po obmytí sa na túto časť, čo je zdroj submukózneho intestinálneho kolagénového materiálu,

pôsobí pri stálo miešaní počas asi 2,5 hod roztokom 0,2 % obj. kyseliny peroctovej v 5 % obj. etanole vo vode. Kyselina peroctová pritom z intestinálneho tkaniva delaminuje vrstvu submukózneho tkaniva. Výsledné submukózne tkanivo sa potom 4x obmyje vodou bez choroboplodných zárodkov. Množstvo bioburdenu bolo v podstate nulové.

Príklad 3

Malá časť submukózneho intestinálneho materiálu na báze kolagénu bola subkutánne implantovaná na potkana. Počas 72 hod sa objavila angiogenéza.

Príklad 4

Dve odobrané časti tenkého čreva sa spracúvajú rôznymi spôsobmi. Prvý kus sa obmyje vodovodnou vodou, počas 2 hod dezinfikuje 5 obj. % roztoku etanolu vo vode, s obsahom 0,2 % obj. peroctovej kyseliny s pH približne 2,6, pričom sa delaminuje submukózne tkanivo, potom sa obmýva v čistej vode, rozdelí na 2 vzorky a rýchlo zmrazí. Druhý kus sa obmyje vodovodnou vodou, delaminuje sa submukózne tkanivo, obmyje sa v čistej vode a umiesti na 20 min do 10% roztoku neomycínsulfátu (ako popisuje U.S. patent č. 4 902 508), obmyje sa čistou vodou a rozdelí sa na dve vzorky, ktoré a rýchlo zmrazia. Zisťujú sa koncentrácie bioburdenu a endotoxínu štyroch vyššie pripravených vzoriek. Každá z prvých dvoch vzoriek má koncentráciu bioburdenu nižšiu ako 0,1 CFU/g a koncentráciu endotoxínu nižšiu ako 0,1 EU/g. Druhé dve vzorky majú koncentráciu bioburdenu 1,7 CFU/g a 2,7 CFU/g, respektíve koncentráciu endotoxínu 23,9 EU/g a 15,7 EU/g.

Príklad 5

Tri odobrané časti tenkého čreva sa spracúvajú rôznymi spôsobmi. Prvá časť sa obmyje vodovodnou vodou, dezinfikuje sa 2 hod roztokom 5% obj. etanolu s obsahom 0,2 % obj. kyseliny peroctovej s pH asi 2,6, delaminuje sa submukózne tkanivo, obmýva

sa v čistej vode a rýchlo sa zmrazí. Druhý diel sa obmyje vodovodnou vodou, delaminuje sa submukózne tkanivo, obmyje sa čistou vodou, dezinfikuje rovnakým spôsobom, ako uvádza Príklad 1 v U.S. patente č. 5 460 962 (podrobí sa pôsobeniu počas asi 40 hod v 0,1% obj. vodného roztoku kyseliny peroctovej, pufrované na pH 7,2) a rýchlo sa zmrazí. Tretí diel sa obmyje vodovodnou vodou, delaminuje sa submukózne tkanivo, obmyje sa čistou vodou, potom sa dezinfikuje rovnakým spôsobom ako, uvádza Príklad 2 U.S. patentu č. 5 460 962 (podrobí sa pôsobeniu 0,1% obj. roztoku kyseliny peroctovej v silnom roztoku soli, pufrované na pH 7,2) a rýchlo sa zmrazí. Všetky 3 vzorky sa skúšajú na endotoxíny. Koncentrácia endotoxínu pre 1. vzorku bola <0,14 EU/g, pre 2. vzorku bola >24 EU/g a pre 3. vzorku bola >28 EU/g.

Príklad 6

Dve odobrané časti bravčového tenkého čreva boli infikované množstvom vírusu 7×10^6 jednotiek tvoriacim ohraničenú škvrnu (PFU). Na obidve časti sa potom pôsobí 0,18% kyselinou peroctovou 4,8% roztoku etanolu vo vode s hmotnostným pomerom roztok:materiál 9:1. Prvá vzorka bola na 5 min ponorená do tohoto roztoku; druhá vzorka bola do toho istého roztoku ponorená na 2 hod. Materiál vzorky s dobou pôsobenia roztoku 5 min vykázal hodnotu 400 PFU na 1 g materiálu. Materiál vzorky s dobou pôsobenia roztoku 2 hod nevykazoval žiadnu hodnotu PFU na 1 g materiálu a bol 0.

Príklad 7

Očistené submukózne tkanivo pripravené postupom podľa tohoto vynálezu sa podrobí skúške na stanovenie obsahu nukleových kyselín. Štyri vzorky skúšaného materiálu, každý s hmotnosťou 5 mg sa podrobí DNK/RNK extrakcii, ako dopodrobna uvádza publikácia Amersham Lifescience Inc., Arlington Heights, Illinois v kapitole DNA/RNA Isolation Kit. Množstvo nukleových kyselín sa stanoví pre roztok spektrofotometricky pri optických hustotách 260 a 280 nm. Priemerný obsah nukleových kyselín bol $1,9 \pm 0,2$ µg/mg materiálu.

Submukózne tkanivo tenkého čreva pripravené spôsobom popísaným v patente U.S. 4 902 508 sa podrobí skúške na stanovenie obsahu nukleových kyselín. Štyri vzorky skúmaného materiálu, každá s hmotnosťou 5 mg sa podrobia DNK/RNK extrakcii, ako podrobne uvádza kapitola DNA/RNA Isolation Kit v publikácii Amersham. Množstvo nukleových kyselín sa zisťuje spektrofotometricky stanovením optických hustôt roztoku pri vlnovej dĺžke 260 nm a pri 280 nm. Priemerný obsah nukleových kyselín bol $2,4 \pm 0,2 \mu\text{g/mg}$ materiálu.

Príklad 8

Odobrané časti submukózneho tkaniva pripravené podľa spôsobov popísaných v tomto vynáleze boli zaslané do nezávisleho skúšobného laboratória (NamSA, Inc., Northwood, Ohio) na skúšku biokompatibility, ktorú popisuje štandard ISO 10993. Uskutočňovala sa skúška na USP akútnu systémovú toxicitu, USP intrakutánnu toxicitu, cytotoxicitu, LAL endotoxín, strednú pyrogenicitu materiálu, priamy kontakt s hemolýzou a prvotné dráždenie kože. Vzorky vyhovovali všetkým skúškam, ktoré potvrdzujú, že materiál je biokompatibilný.

Je zrejmé, že obmeny týkajúce sa vyššie uvedeného postupu sú mienené tak, že patria do rámca tohoto vynálezu. Napr. zdroj tkaniva pre submukózne tkanivo, ako je napr. žalúdok, neporušené črevo, kravská maternica a podobne, je možné čiastočne delaminovať, alebo pomocou činidiel dezinfikovať alebo sterilizovať a potom úplne delaminovať submukózne tkanivo. Napríklad, upevnené mezenterne vrstvy a/alebo vrstvy serózných blán zdravého intestinálneho tkaniva je možné s výhodou odobrať pred pôsobením dezinfekčného činidla a potom nasleduje delaminácia zvyšných upnutých tkanív submukózneho tkaniva. Po týchto krokoch môžu nasledovať, ale nemusia, ďalšie dezinfekčné kroky, napr. enzymatické čistenie a/alebo odstránenie nukleových kyselín. Alternatívne je možné na zdroj submukózneho tkaniva pôsobiť v minimálnom množstve dezinfekčným alebo iným činidlom,

pričom sa submukózne tkanivo delaminuje z tunica muscularis a z tunica mucosa, potom nasleduje celková dezinfekcia, aby sa dosiahla požadovaná koncentrácia nečistôt. Všetky tieto obmeny a modifikácie sú zamýšľané ako súčasť postupu popísaného v tomto vynáleze a patria do rámca tohoto vynálezu.

Okrem toho je zrejmé, že citované publikácie v tomto vynáleze sú vodidlom pre odborníka v odbore, ktorý sa v tejto problematike vyzná a každá z uvedených publikácií sa tu začleňuje ako celok.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Štepová protéza obsahujúca:

očistenú matricovú štruktúru na báze kolagénu odobranú zo zdroja submukózneho tkaniva, pričom uvedená očistená štruktúra má koncentráciu nečistôt takú, ktorá ju robí biokompatibilnou.

2. Štepová protéza podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená očistená štruktúra má koncentráciu endotoxínu nižšiu ako 12 endotoxínových jednotiek na gram.

3. Štepová protéza podľa nároku 2, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená koncentrácia endotoxínu je nižšia ako 10 endotoxínových jednotiek na gram.

4. Štepová protéza podľa nároku 3, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená koncentrácia endotoxínu je nižšia ako 5 endotoxínových jednotiek na gram.

5. Štepová protéza podľa nároku 4, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená koncentrácia endotoxínu je nižšia ako 1 endotoxínových jednotiek na gram.

6. Štepová protéza podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená očistená štruktúra má koncentráciu bioburdenu nižšiu ako 2 jednotky tvoriace kolóniu na gram.

7. Štepová protéza podľa nároku 6, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená koncentrácia bioburdenu je nižšia ako 1 jednotka tvoriaca kolóniu na gram.

8. Štepová protéza podľa nároku 7, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že koncentrácia bioburdenu je nižšia ako 0,5 jednotky tvoriacej kolóniu na gram.

9. Štepová protéza podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená očistená štruktúra má obsah nukleovej kyseliny nižší ako 10 mikrogramov na miligram.

10. Štepová protéza podľa nároku 9, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že obsah uvedenej nukleovej kyseliny je nižší ako 2 mikrogramy na miligram.

11. Štepová protéza podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená očistená štruktúra má koncentráciu vírusu nižšiu ako 500 jednotiek tvoriacich ohraničenú škvrnu na gram.

12. Štepová protéza podľa nároku 11, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená koncentrácia vírusu je nižšia ako 100 jednotiek tvoriacich ohraničenú škvrnu na gram.

13. Štepová protéza podľa nároku 12, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená koncentrácia vírusov je nižšia ako 1 jednotka tvoriaca ohraničenú škvrnu na gram.

14. Štepová protéza podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená očistená štruktúra má koncentráciu činidla na uskutočňovanie postupu nižšiu ako 100 000 dielov na milión na kilogram.

15. Štepová protéza podľa nároku 14, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že koncentrácia uvedeného činidla na uskutočňovanie postupu je nižšia ako 1000 dielov na milión na kilogram.

16. Štepová protéza podľa nároku 15, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že koncentrácia uvedeného činidla na uskutočňovanie postupu je nižšia ako 100 dielov na milión na kilogram.

17. Štepová protéza podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená očistená štruktúra má koncentráciu húb nižšiu ako 2 jednotky tvoriace kolóniu na gram.

18. Štepová protéza podľa nároku 17, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená koncentrácie huby je nižšia ako 1 jednotka tvoriaca kolóniu na gram.

19. Štepová protéza podľa nároku 18, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená koncentrácie huby je nižšia ako 0,5 jednotky tvoriacej kolóniu na gram.

20. Štepová protéza podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená očistená štruktúra obsahuje delaminovaný zdroj submukózneho tkaniva.

21. Štepová protéza podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená očistená štruktúra obsahuje dezinfikovaný a delaminovaný zdroj submukózneho tkaniva.

22. Štepová protéza podľa nároku 1, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená očistená štruktúra obsahuje dezinfikovaný a potom delaminovaný zdroj submukózneho tkaniva.

23. Štepová protéza obsahujúca:

očistenú matricovú štruktúru na báze kolagénu odobranú zo zdroja submukózneho tkaniva, pričom uvedená očistená štruktúra má koncentráciu endotoxínu nižšiu ako 12 endotoxínových jednotiek na gram.

24. Štepová protéza obsahujúca:

očistenú matricovú štruktúru na báze kolagénu odobranú zo zdroja submukózneho tkaniva, pričom obsah nukleovej kyseliny v uvedenej očistenej štruktúre je nižší ako 2 mikrogramy na miligram.

25. Štepová protéza obsahujúca:

očistenú matricovú štruktúru na báze kolagénu odobranú zo zdroja submukózneho tkaniva, pričom koncentrácia vírusov v očistenej štruktúre je nižšia ako 500 jednotiek tvoriacich ohraničenú škvrnu na gram.

26. Štepová protéza obsahujúca:

očistenú matricovú štruktúru na báze kolagénu odobranú zo zdroja submukózneho tkaniva, pričom koncentrácia činidla na uskutočňovanie postupu v uvedenej očistenej štruktúre je nižšia ako 100 000 dielov na milión na kilogram.

27. Spôsob získania matrice na báze kolagénu zo submukózneho tkanivového zdroja, ktorý obsahuje:

pôsobenie dezinfekčného činidla na submukózny tkanivový zdroj zaistujúce vytvorenie dezinfikovaného submukózneho tkanivového zdroja; a

odobranie matrice na báze kolagénu z dezinfikovaného submukózneho tkanivového zdroja,

28. Spôsob podľa nároku 27, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že submukóznym tkanivovým zdrojom je zažívací trakt cicavca.

29. Spôsob podľa nároku 28, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že cicavcom je ošípaná.

30. Spôsob podľa nároku 29, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že zdrojom submukózneho tkaniva je tenké črevo ošípanej.

31. Spôsob podľa nároku 27, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že dezinfekčným činidlom je oxidačné činidlo.

32. Spôsob podľa nároku 27, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že dezinfekčným činidlom je peroxozlúčenina.

33. Spôsob podľa nároku 32, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že dezinfekčným činidlom je organická peroxozlúčenina.

34. Spôsob podľa nároku 33, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že dezinfekčným činidlom je perkyselina.

35. Spôsob podľa nároku 34, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že perkyselina sa vyberie zo skupiny zloženej z perocto-vej kyseliny, perpropiónovej kyseliny a z perbenzoovej kyseliny.

36. Spôsob podľa nároku 35, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že perkyselina je peroctová kyselina.

37. Spôsob podľa nároku 34, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedené pôsobenie na zdroj submukózneho tkanivového zdroja zahŕňa pôsobenie prostriedku obsahujúceho alkohol a perkyselinu.

38. Spôsob podľa nároku 34, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že alkohol má asi 1 až 6 atómov uhlíka.

39. Spôsob podľa nároku 34, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že alkohol sa vyberie zo skupiny zloženej z etanolu, propanolov a butanolov.

40. Spôsob podľa nároku 39, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že alkoholom je etanol.

41. Spôsob podľa nároku 40, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že prostriedkom je vodný roztok etanolu obsahujúci od asi 0,1 % do asi 0,3 % objm. peroctovej kyseliny.

42. Spôsob podľa nároku 34, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený postup zahŕňa pôsobenie prostriedku obsahujúceho perkyselinu s pH asi 2 až asi 6 na tkanivový submukózný zdroj.

43. Spôsob podľa nároku 42, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že pH prostriedku je od asi 2 do asi 4.

44. Spôsob podľa nároku 43, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že perkyselinou je kyselina octová a prostriedok obsahuje asi 0,1 % až asi 0,3 % obj. peroctovej kyseliny.

45. Spôsob získania matrice na báze kolagénu z tkanivového submukózneho zdroja, ktorý obsahuje:

poskytnutie submukózneho tkanivového zdroja, na ktorý sa pôsobilo dezinfekčným činidlom; a

odobranie matrice na báze kolagénu z uvedeného zdroja submukózneho tkaniva.

46. Spôsob podľa nároku 45, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedený submukózny zdroj je z tenkého čreva.

47. Spôsob podľa nároku 47, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedená dezinfekcia zahrnuje pôsobenie oxidačného činidla na submukózny tkanivový zdroj.

48. Spôsob podľa nároku 47, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedené pôsobenie zahrnuje kontakt submukózneho tkanivového zdroja s vodným prostriedkom, ktorý obsahuje oxidačné činidlo.

49. Spôsob podľa nároku 47, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že uvedené pôsobenie zahrnuje kontakt submukózneho tkanivového zdroja s vodným prostriedkom, ktorý obsahuje peroxozlúčeninu.

50. Spôsob podľa nároku 49, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že peroxozlúčeninou je perkyselina.

51. Spôsob podľa nároku 50, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že perkyselinou je peroctová kyselina.

52. Postup podľa nároku 51, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že prostriedok obsahuje alkohol.

53. Postup podľa nároku 52, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že alkoholom je etanol.

54. Spôsob podľa nároku 51, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že tenké črevo je z ošípanej.

55. Kompozícia obsahujúca:

štruktúru obsahujúcu kolagén najprv odobranú z tkanivového zdroja, ktorý obsahuje uvedené štruktúru a iné tkanivo, pričom uvedená štruktúra obsahujúca kolagén nemá endotoxínovú koncentráciu vyššiu ako 12 endotoxínových jednotiek na gram.

56. Kompozícia podľa nároku 55, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedenou vrstvou obsahujúcou kolagén je submukóza a uvedeným tkanivovým zdrojom je tenké črevo.

57. Kompozícia podľa nároku 56, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedeným tkanivovým zdrojom je tenké črevo ošípanej.

58. Kompozícia podľa nároku 55, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená koncentrácia endotoxínu je nižšia ako 10 endotoxínových jednotiek na gram.

59. Kompozícia podľa nároku 58, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená koncentrácia endotoxínu je nižšia ako 5 endotoxínových jednotiek na gram.

60. Kompozícia podľa nároku 58, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená koncentrácia endotoxínu je nižšia ako 1 endotoxínová jednotka na gram.

61. Kompozícia podľa nároku 60, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená koncentrácia endotoxínu je nižšia ako 0,5 endotoxínovej jednotky na gram.

62. Očistená matrica obsahujúca kolagén, získaná z tkanivového zdroja cicavca, pričom uvedená matrica obsahuje submukózne tkanivo cicavca a zvyškové nečistoty z uvedeného zdroja a uvedená štruktúra sa získa postupom, ktorý obsahuje dezinfekciu uvedeného tkanivového zdroja cicavca a potom odobranie štruktúry z tohto dezinfikovaného tkaniva.

63. Kompozícia podľa nároku 62, v y z n a č u j ú c a s a t ý m, že uvedená dezinfekcia zahŕňa kontakt zdroja tkaniva cicavca s vodným roztokom obsahujúcim perkyselinu.

64. Spôsob podľa nároku 63, v y z n a č u j ú c i s a t ý m, že perkyselinou je peroctová kyselina.

1/1

~~Fig. 1~~