

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

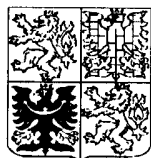
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

163-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20. 07. 95**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **20.07.94, 09.05.95**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94/279773, 96/432698**

(33) Země priority: **US, US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18. 03. 98**
(Věstník č. 3/98)

(86) PCT číslo: **PCT/US95/09281**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/02646**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/12
C 12 N 5/10
A 61 K 35/12

(71) Přihlašovatel:

CYTOTHERAPEUTICS, INC., Providence, RI, US;

(72) Původce:

Schinstine Malcolm, Ben Salem, PA, US;

Shoichet Mooly S., Toronto, CA;

Gentile Frank T., Warwick, RI, US;

Hammang Joseph P., Barrington, RI, US;

Holland Laura M., Horsham, PA, US;

Cain Brian M., Everett, MA, US;

Doherty Edward J., Mansfield, MA, US;

Winn Shelley R., Smithfield, RI, US;

Aebischer Patrick, Lutry, CH;

Messing Albee, Madison, WI, US;

(74) Zástupce:

Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

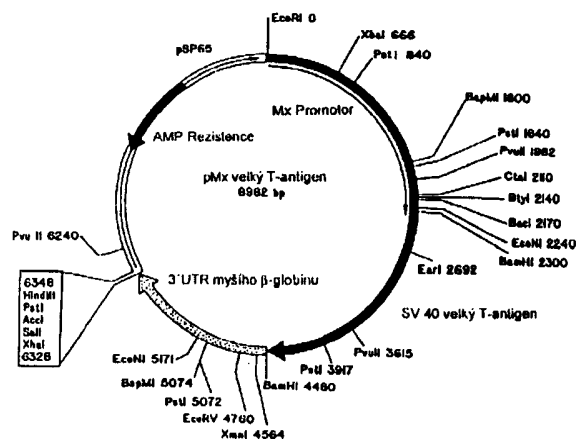
nou adhezi nebo proliferaci a nebo vložením inertní vnitřní výztuhy, nebo jejich kombinaci. Všechny tyto způsoby lze použít v kombinaci.

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob kontroly distribuce buněk v bioarteficiálním orgánu

(57) Anotace:

Způsoby a kompozice určené ke kontrole buněčné distribuce v bioarteficiálním orgánu pomocí takového ošetření buněk, které inhibuje buněčnou proliferaci a indukuje buněčnou diferenciaci, nebo ovlivňuje buněčnou adhezi k růstovému povrchu v bioarteficiálním orgánu. Toto ošetření zahrnuje (1) genetickou manipulaci buněk, (2) vystavení buněk účinkům proliferaci inhibující látky nebo látky, která indukuje buněčnou diferenciaci, nebo vyjmutí buněk z prostředí s proliferaci stimulující látkou nebo s látkou, která inhibuje diferenciaci, nebo vystavení buněk účinkům záření, a dále pak modifikaci růstového povrchu bioarteficiálního orgánu molekulami extracelulární matrix, molekulami ovlivňujícími buněč-



PV 163-97

PŘÍL. -1	VLASTNICTVÍ PŘEDM. SLOVĚHO URAD	CURRENT TEXT	
		004360	Č. I.
		DOŠLO	197

Způsob kontroly distribuce buněk v bioarteficiálním orgánu

Oblast techniky

Vynález popisuje postupy a kompozice sloužící ke kontrole distribuce a růstu buněk zapouzdřených v bioarteficiálním orgánu.

Dosavadní stav techniky

Bioarteficiální orgány ("BAO") jsou zařízení obsahující živé buňky a sloužící v organismu hostitele k výkonu požadovaných metabolických funkcí.

Buňky zapouzdřené uvnitř BAO dodávají do organismu hostitele jednu nebo více biologicky aktivních molekul, které mohou být využity při prevenci nebo při léčbě mnoha klinických stavů, deficiencí a nemocí.

K léčbě diabetes mohou být například použity BAO obsahující buňky sekretující inzulin. Podobně mohou být k léčbě jiných nemocí jako například hypoparathyreózy a anémie použity buňky, které sekretují parathormon (léčba hypoparathyreózy) nebo erythropoietin (léčba anémie).

Bioarteficiální orgány mohou být rovněž použity jako zdroj biologicky aktivních molekul při léčbě nebo při prevenci neurodegenerativních stavů jakými jsou například Huntingtonova nemoc, Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc a demence spojené se syndromem získané imunodeficiency. Navíc mohou být prostřednictvím BAO dodávány do organismu hostitele lymfokiny a cytokiny sloužící k ovlivnění imunitního systému hostitele. Příkladem jiných biologicky aktivních molekul, které mohou být dodávány prostřednictvím BAO do organismu hostitele jsou katecholaminy, endorfiny, enkefaliny a další opiátové a neopiátové peptidy používané ke tlumení bolesti.

BAO mohou být rovněž použity při léčbě nejrůznějších deficiencí enzymů. Jinou možností je, že biologicky aktivní molekuly mohou z organismu hostitele odstraňovat nebo v organismu hostitele eliminovat molekuly škodlivé pro tento organismus. BAO mohou například obsahovat biologicky aktivní molekuly, které mohou být v organismu hostitele použity při "vychytávání" cholesterolu (scavengery).

Jsou známy nejrůznější BAO ve formě "makrokapsulí"; viz. například Aebischer (Patent Spojených států amerických 5,158,881), Dione a další, (WO 92/03327), Mandel a další, (WO 91/00119), Aebischer (WO 93/00128). Mezi BAO rovněž patří extravaskulární difúzní komory, intravaskulární difúzní komory, intravaskulární ultrafiltrační komory a mikrokapsule; viz. například Lim a další, Science, 210, strana 908 až 910 (1980); Sun, A. M., Methods in Enzymology, 137, strana 575 až 579 (1988); Dunleavy a další, (WO 93/03901) a Chick a další, (Patent Spojených států amerických 5,002,661).

Buňky zapouzdřené v bioarteficiálním orgánu vykonávají v organismu hostitele potřebné metabolické funkce, a je tudíž žádoucí, aby tyto buňky byly optimálním zdrojem biologicky aktivní molekuly, která ovlivňuje zmiňované metabolické funkce. Obvykle jsou pro použití uvnitř BAO upřednostňovány diferencované, nedělící se buňky, před buňkami dělícími se, protože tyto buňky umožňují optimální produkci požadované biologicky aktivní molekuly. Například většina diferencovaných, nedělících se buněk produkuje větší množství požadovaného proteinu využívaného k léčbě než dělící se buňky, protože exprese genů specifických pro diferenciaci a exprese genů specifických pro buněčné dělení jsou považovány za antagonistické procesy, viz Wollheim, "Establishment and Culture of Insulin-Secreting β Cell Lines," (Založení a kultivace linií β -buněk sekretujících inzulin), Methods in

Enzymology, 192, strana 223 až 235 (1990). Při diferenciaci buněk dochází u těchto buněk ke snížení kapacity replikace. V mnoha případech se proliferace a diferenciaci navzájem vylučují, viz Gonos, "Oncogenes in Cellular Immortalisation and Differentiation," (Onkogeny hrající úlohu při imortalizaci a diferenciaci buněk), Anticancer Research, 13, strana 1117 (1993).

Velmi výhodné je použití diferencovaných tkání, protože funkční vlastnosti tkáně použité k inkorporaci do BAO jsou většinou shodné s vlastnostmi diferencované tkáně in vivo. Další výhodou při použití diferencovaných, nedělících se buněk je skutečnost, že počet těchto buněk zůstává uvnitř BAO relativně konstantní. Tento fakt umožňuje lépe předvídat výsledky experimentu a je tak umožněn i přísun stále stejného množství aktivních látek do organismu hostitele. Diferencované buňky jsou navíc daleko vhodnější pro použití uvnitř BAO, ve kterém je zapouzdřen více než jeden druh buněk sekretujících biologicky aktivní molekuly. Jestliže jsou v takovýchto BAO použity dělící se buňky, mohou různé druhy buněk růst rozdílnou rychlostí a výsledkem je pak přerůstání jednoho druhu buněk. Při použití diferencovaných, nedělících se buněk může být relativní zastoupení dvou nebo více synergických druhů buněk lépe regulováno.

Ačkoliv je použití diferencovaných buněk v mnoha případech výhodné, vyskytují se při použití diferencovaných buněk přímo izolovaných z organismu savců nejrozličnější problémy.

Za prvé: existuje nebezpečí potenciální kontaminace izolované tkáně. Je tedy nutné, aby tkáň odebraná z organismů jednotlivých jedinců byla podrobena jak časově tak finančně náročnému testování, jestli neobsahuje nějaké patogeny.

Za druhé: tkáň může být během izolace poškozena. Toto poškození může být mechanické nebo může dojít k poškození tkáně při použití enzymatických procedur při vlastní izolaci. Proces mechanické manipulace nelze vždy jednoduše standardizovat a výsledkem může být pak rozdíl mezi jednotlivými izoláty.

Za třetí: během izolace může dojít k ischemii, která má za následek poškození tkáně.

Za čtvrté: vzhledem k rozdílům mezi dárce tkáně může být obtížné získat reprodukovatelné výsledky. Výtěžek a kvalita požadované tkáně mohou být například ovlivněny věkem, pohlavím, zdravotním stavem a hladinou hormonů u živočicha, který je zdrojem příslušné tkáně.

Za páté: někdy není možné získat tkáň v množství odpovídajícím požadavkům pro tvorbu BAO. K tomuto jevu například dochází v případech, kdy jako zdroj tkáně slouží orgán malých rozměrů nebo tam, kde je třeba použít velmi velké množství této tkáně. Jestliže jako zdroj tkáně slouží člověk, je velmi často patrný nedostatek vhodných tkání.

Za šesté: v některých případech je žádoucí buňky použité uvnitř BAO geneticky modifikovat. V současné době je obtížné in vitro geneticky modifikovat nedělicí se tkáně a výsledek genetické modifikace a vlastnosti takto modifikovaných buněk nelze s určitostí předem stanovit. Vzhledem k výše zmíněným problémům a ke skutečnosti, že je výhodné používat diferencované, nedělicí se buňky, existuje potřeba vytvořit způsob sloužící produkci a zachování diferencovaných, nedělicích se buněk vhodných k zapouzdření uvnitř BAO.

Vzhledem k těmto problémům byly pro použití při konstrukci BAO upřednostňovány dělicí se buňky a buněčné

linie, které vykonávají požadované biologické funkce. Jednou z důležitých výhod při použití dělicích se buněk je skutečnost, že tyto buňky mohou být ve velkém množství pěstovány in vitro, může u nich být lehce zjištěna přítomnost či nepřítomnost patogenů a mohou být úspěšně skladovány. To umožňuje téměř neomezený přísun tkáně při nízkých nákladech na její produkci. Za účelem tvorby subpopulací buněk se zlepšenými charakteristikami mohou být na banku buněk aplikovány selekční postupy, jako například třídění buněk nebo jejich klonování. Dělicí se buňky a buněčné linie jsou navíc přístupnější genetickým manipulacím než diferencované, nedělicí se buňky. Skutečnost, že je možné introdukovat do buněk cizorodou rekombinantní DNA vytváří mnoho nových možností ke změně funkce nebo fenotypu těchto buněk využívaných k zapouzdření uvnitř BAO. Tato skutečnost umožňuje větší diverzitu použití BAO k léčebným účelům.

Jak bylo uvedeno výše, mezi nevýhody při zapouzdření kontinuálně se dělicích buněk do BAO patří nedostatečná regulace počtu buněk v tomto zařízení, která může mít za následek sníženou schopnost předvídat produkované množství požadované biologicky aktivní molekuly.

Zatímco ve velké většině případů je žádoucí limitovat nebo minimalizovat růst buněk uvnitř BAO, v ojedinělých případech například když je BAO implantován do "nepřátelského" prostředí, může být žádoucí, aby byla buňkám za účelem zachování konstantního počtu buněk uvnitř BAO umožněna pozvolná proliferace.

Existuje ještě jeden obecný problém spojený se zapouzdřením buněk. Množství druhů buněk má "mezibuněčné" adhezivní vlastnosti, což znamená, že buňky mají sklon adherovat jedna ke druhé a vytvářet tak, hustá nahromadění a seskupení (klastry). Tato tendence je zvláště patrná při

nepřítomnosti vhodného dostupného substrátu. V takových buněčných agregátech může docházet ke vzniku centrálních nekrotických oblastí v důsledku toho, že buňky "uvězněné" v centru takového seskupení mají znesnadněný přístup k živinám a kyslíku, anebo že v centru takového seskupení buněk dochází ke hromadění toxických produktů. Nekrotická tkáň může rovněž uvolňovat velké množství buněčných proteinů (xenoproteinů nebo jiných faktorů), které zaplavují organismus hostitele a které jsou škodlivé pro přežití buněk, například faktory, které vyvolávají imunitní odpověď makrofágů nebo jiný typ imunitní odpovědi. Tento problém může být ještě umocněn, když jsou buňky zapouzdřeny uvnitř BAO, který má obal zhotovený ze semipermeabilní membrány, protože tato membrána tvoří bariéru znesnadňující difúzi. Velmi často je uvnitř BAO k dispozici méně kyslíku a také méně živin dodávaných hostitelem. Navíc se uvnitř BAO mohou akumulovat odpadní produkty.

Tato hustá buněčná seskupení se mohou vytvářet pozvolna při růstu buněk, nebo se mohou tvořit velmi rychle. K rychlé tvorbě seskupení buněk dochází při reasociaci čerstvě dispergovaných buněk nebo tkání a tento proces je zprostředkován adhezivními proteiny přítomnými na povrchu buněk. Buňky nebo tkáně s vysokou metabolickou aktivitou mohou obzvláště citlivě reagovat na snížený přísun kyslíku a živin a hynou krátce poté, co byly "uvězněny" uvnitř velkého shluku buněk. Mnoho tkání s endokrinní aktivitou, které jsou obvykle v organismu prostoupeny hustou sítí kapilár, vykazují právě takové chování; zdá se, že právě Langerhansovy ostrůvky jsou v zapouzdřeném stavu zvláště citlivé.

Je velmi výhodné disponovat způsobem a kompozicí k regulaci růstu zapouzdřených buněk, které využívají výhod jak dělicích se buněk, tak diferencovaných, nedělicích se buněk. Vynález se týká způsobů a kompozic s jejichž pomocí může být

in vitro zajištěna neomezená proliferace a expanze buněk, a které umožňují regulovat proliferaci a diferenciaci buněk zapouzdřených uvnitř BAO tak, aby bylo dosaženo rovnováhy mezi proliferací a diferenciací, a aby tedy mohl BAO vykonávat svou funkci požadovaným způsobem. Vynález tedy umožňuje regulaci počtu buněk zapouzdřených uvnitř BAO a může tedy umožnit dokonalejší regulaci hladiny produkce biologicky aktivních látek v kapsuli. Vynález dále popisuje způsoby sloužící k regulaci růstu buněk, přičemž regulace růstu buněk je dosaženo prostřednictvím kontrolovaného umístění buněk uvnitř BAO, a tudíž je snížena možnost tvorby nežádoucích nekrotických buněčných oblastí uvnitř BAO. Regulace počtu buněk a jejich umístění uvnitř BAO rovněž usnadňuje optimalizaci vlastností membrány na povrchu BAO a dalších parametrů tohoto zařízení vzhledem k druhu zapouzdřených buněk. Příčinou snadnější optimalizace je skutečnost, že požadované charakteristiky příslušného zařízení se mnohem lépe stanovují pro stabilní populaci buněk uvnitř BAO než pro populaci dělících se buněk uvnitř BAO. Navíc může být dosaženo dlouhodobého přísunu biologicky aktivních látek.

Podstata vynálezu

Vynález popisuje způsoby a kompozice sloužící k regulaci distribuce buněk (tzn. počtu buněk nebo umístění buněk v BAO nebo jak počtu tak i umístění buněk uvnitř bioarteficiálního orgánu), které jsou zapouzdřené v BAO. Mezi způsoby a kompozice podle vynálezu patří (1) způsoby a kompozice sloužící k modifikaci buněk, které jsou zapouzdřené v BAO a (2) způsoby a kompozice sloužící k modifikaci povrchů, na kterých rostou buňky zapouzdřené v BAO.

Mezi způsoby a kompozice sloužící k buněčným manipulacím patří změna genetické informace buněk pomocí

genu, který kóduje produkt ovlivňující proliferaci a diferenciaci buněk. Tento způsob může zahrnovat podání chemické sloučeniny nebo růstového faktoru, které inhibují proliferaci nebo naopak indukují diferenciaci buněk. Jinou možností je odebrání chemické sloučeniny nebo růstového faktoru, které inhibují proliferaci nebo naopak indukují diferenciaci buněk, z růstového média. Způsob může být použit před nebo až po vlastním zapouzdření buněk do BAO, výhodně však před zapouzdřením. Proliferace buněk může být rovněž regulována pomocí radiace.

Mezi způsoby a kompozice sloužící k modifikaci povrchů na kterých rostou buňky ("růstové povrchy") patří povlečení alespoň jednoho povrchu uvnitř BAO jednou nebo více molekulami extracelulární matrix ("ECM"- extracellular matrix molecule). ECM mohou být povlečeny přímo na lumenální povrch BAO nebo na jakoukoliv nosnou plochu uvnitř BAO nebo na nosiče ve formě mikrokuliček ("mikronosiče"). Buňky nebo mikronosiče s buňkami na svém povrchu mohou být navíc suspendovány v matrici tvořené materiálem, který fyzicky inhibuje buněčnou proliferaci. Materiál tvořící matrici může být dále pozměněn chemickými nebo peptidovými deriváty.

Růstové povrchy uvnitř BAO mohou být kromě toho modifikovány pomocí chemických postupů, které inhibují nebo naopak usnadňují připojení buněk k lumenálnímu povrchu BAO. Růstové povrchy mohou být před vlastní umístěním buněk dále upraveny přidáním inertního "lešení" k těmto povrchům. Toto lešení fyzicky inhibuje přerůstání buněk a vytváří dodatečná místa sloužící k připojení buněk. Je třeba si uvědomit, že je možné kombinovat různé způsoby a kompozice sloužící k modifikaci buněk a k modifikaci růstových povrchů.

Stručný popis obrázků

Obrázek 1: znázorňuje plazmidovou mapu konstruktů skládajícího se z fragmentu myšního promotoru Mx1 o velikosti 2.3 kb připojeného k časné oblasti viru SV40 následované fragmentem BamH1-XbaI pocházejícím z 3' nepřekládané oblasti myšního β -globinu.

Obrázek 2: znázorňuje v časových intervalech 4 (I), 11 (II) a 25 (III) dní sekreci NGF (svislá osa, kalibrováno v ng/ml/24 h) buňkami BHK. Legenda: způsob modifikace membrán v procentech PEO-PDMS a hmota použité matrice: A - 0 %, Vitrogen™; B - 1 %, Vitrogen™; C - 5 %, Vitrogen™; D - 0 %, bez matrice; E - 1 %, bez matrice; F - 5 %, bez matrice; G - 0 %, agaróza; H - 1 %, agaróza; I - 5 %, agaróza.

Obrázek 3: znázorňuje sekreci NGF (svislá osa, kalibrováno v ng/ml) buňkami BHK rostoucími na mikronosičích Cultispheres™ bez přítomnosti agarózové matrice (legenda: A (008), D (0709)) nebo za přítomnosti agarózové matrice (legenda: B (008), C (0709)).

Obrázek 4: znázorňuje v časových intervalech 1 (I), 14 (II) a 28 (III) dní sekreci katecholaminů (buňkami PC12A, které byly zapouzdřeny uvnitř BAO nesoucím inertní "lešení" připravené z PHEMA. Sekrece je vyznačena na svislé ose kalibrované v pmol/ml/15

min. Část A znázorňuje bazální sekreci katecholaminů; část B znázorňuje sekreci katecholaminů vyvolanou přítomností iontů K^+ . Byly sledovány hodnoty sekrece těchto katecholaminů L-dopa (A), norepinephrin, noradrenalin (B), epinephrin, adrenalin (C), dopac (D), dopamin (E) a homovanilové kyseliny (F).

Obrázek 5: znázorňuje v časových intervalech 1 (I), 14 (II) a 28 (III) dní sekreci katecholaminů buňkami PC 12A, které byly zapouzdřeny uvnitř BAO nesoucím inertní "lešení" připravené z PHEMA/MMA. Sekrece je vyznačena na svislé ose kalibrované v pmol/ml/15 min. Část A znázorňuje bazální sekreci katecholaminů; část B znázorňuje sekreci katecholaminů indukovanou přítomností iontů K^+ . Byly sledovány hodnoty sekrece těchto katecholaminů L-dopa (A), norepinephrin, noradrenalin (B), epinephrin, adrenalin (C), dopac (D), dopamin (E) a homovanilové kyseliny (F).

Obrázek 6: znázorňuje v časových intervalech 2 (I), 20 (II), 40 (III) a 80 (IV) dní sekreci L-dopa buňkami SV40/D β 4-NGF rostoucích na mikronosičích Cultispheres™ za přítomnosti alginátové matrice (A) nebo za přítomnosti agarózové matrice (B).

Definice termínů používaných ve vynálezu

"Bioarteficiální orgán" nebo "BAO" podle vynálezu je zařízení, která může být určeno k implantaci do organismu hostitele nebo které může fungovat mimo organismus hostitele a může být k organismu hostitele připojeno buď trvale nebo na přechodnou dobu. BAO obsahují buňky nebo živé tkáně, které produkují biologicky aktivní molekuly, které mají v organismu hostitele terapeutický efekt. BAO by po implantaci do hostitelského organismu recipienta měl být biokompatibilní. BAO by tedy neměl v organismu hostitele vyvolávat nežádoucí reakce, které by mohly zapříčinit nefunkčnost BAO, nebo jeho neschopnost dalšího použití k terapeutickým účelům. BAO se může například stát nefunkčním, jestliže kolem kapsule dojde k vytvoření fibrózního obalu, který zapříčiní snížení rychlosti difúze živin k buňkám uvnitř této kapsule. Mezi nežádoucí efekty rovněž patří odvržení kapsule organismem hostitele nebo uvolňování toxických nebo pyrogenních sloučenin (například syntetických polymerních vedlejších produktů) z BAO do okolní tkáně hostitele.

BAO obsahující zapouzdřené buňky mohou být konstruovány tak, aby měly imunoizolační vlastnosti, které znemožní elementům imunitního systému hostitele vniknout dovnitř orgánu, a tím vlastně chrání buňky zapouzdřené uvnitř BAO před zničením způsobeným imunitní reakcí hostitele. Využití BAO zvyšuje počet druhů buněk, které mohou být použity v procesu léčby. Uvnitř implantovaných BAO, které mohou ale nemusí mít imunoizolační vlastnosti, jsou obvykle přítomny buňky nebo tkáně produkující vybraný produkt spolu se semipermeabilní fyzickou bariérou, která umožňuje difúzi živin, odpadních produktů a sekretovaných látek do okolní tkáně hostitele a současně uvnitř BAO zadržuje příslušné buňky. Tato semipermeabilní fyzická bariéra rovněž

minimalizuje zhoubné účinky buněčných a molekulárních efektorů imunitní reakce vedoucí k odvržení BAO. Imunoizolační vlastnosti nejsou nicméně nezbytné ve všech případech (například, jsou-li použité buňky autologní nebo syngenní k buňkám hostitele).

Termín "biologicky aktivní molekula" označuje látku, která (a) může vykonávat funkci uvnitř buňky, která tuto molekulu produkuje nebo (b) může být exprimována na buněčném povrchu a může ovlivňovat interakce buňky s ostatními buňkami nebo s biologicky aktivními molekulami (například receptor pro neurotransmitery nebo buněčná adhezivní molekula) nebo (c) může být uvolňována nebo sekretována z buňky, která tuto molekulu produkuje, a může nějakým způsobem interagovat s jinou cílovou buňku nebo cílovou molekulu v organismu hostitele (například neurotransmitter, hormon, růstový faktor nebo cytokin).

Termín "buňky" podle vynálezu, není-li specifikováno jinak, označuje buňky v jakékoliv formě, včetně, ale nejenom, buněk tvořících tkáň, shluků buněk a jednotlivých izolovaných buněk. Buňky podle vynálezu produkují alespoň jednu biologicky aktivní molekulu.

Regulace distribuce buněk uvnitř BAO označuje regulaci počtu buněk uvnitř BAO, regulaci jejich umístění v prostoru uvnitř BAO nebo současnou regulaci obou zmíněných charakteristik buněk.

Ve vynálezu může být použita široká škála buněk. Patří sem jak ze stavu techniky známé, obecně dostupné linie imortalizovaných buněk tak i dělící se primární buněčné kultury. Jako příklad obecně dostupných buněčných linií vhodných pro provedení vynálezu mohou sloužit buňky L-6, buňky MDCK, buňky LLC-PK, buňky β -CH3, buňky C2, buňky ledvin mláďat křečků (BHK), buňky vaječníků čínského křečka

(CHO), myší fibroblasty (L-M), myší embryonální buňky NIH Swiss (NIH/3T3), buněčné linie pocházející z organismu kočkodana zeleného (včetně buněk COS-a, COS-1, COS-6, COS-7, BSC-1, BSC-40, BMT-10 a buněk Vero), buňky adrenálního pheochromocytomu potkanů (PC 12), gliové nádorové buňky potkanů (C6), buňky RAJI (lidský lymfom), buňky plazmacytomu myší MOPC-31 C, buňky MN9D, buňky MN9H, buňky izolované z transgenních myší ripTag, buňky SCT-1, buňky β -TC, buňky Hep-G2, buňky AT-T20, linie beta-buněk jako například buňky NIT nebo buňky RIN, buňky Ntera-2 (Pleasure a další, Journ. Neuroscience, 12, strana 1802 až 1815 (1992)) a buněčné linie lidských astrocytů jako například buňky U-373 a U-937.

Mezi primární buňky, které mohou být použity, patří kmenové nervové buňky nebo progenitory nervových buněk reagující na přítomnost bFGF izolované z CNS savců (Richards a další, PNAS, 89, strana 8591 až 8595 (1992); Ray a další, PNAS, 90, strana 3602 až 3606 (1993)), primární fibroblasty, Schwannovy buňky (WO/03536), astrocyty, oligodendrocyty a jejich prekurzory, myoblasty a adrenální chromatinové buňky. Jednou z takových buněčných linií myoblastů je například buněčná linie C_2C_{12} .

Buňky mohou být rovněž vybrány na základě postupu použitého k regulaci růstu a diferenciaci buněk. Kmenové buňky mohou být například jednoduše použity ve způsobech, při nichž je diferenciaci buněk indukována pomocí přidavku chemické látky. Obecně jsou za kmenové buňky považovány nediferencované buňky, které jsou in vivo obvykle v klidovém stavu, ale jsou nicméně schopny proliferace, jejímž výsledkem je vznik většího počtu kmenových buněk, které mají schopnost produkovat velké množství buněk-progenitorů, ze kterých následně vznikají diferencované nebo diferenciaci schopné dceřinné buňky. Kmenové buňky reprezentují třídu buněk, které

mohou být lehce množeny v kultuře a jejichž potomstvo může být diferencováno přidáním specifických růstových faktorů; viz. například Weiss a další, (PCT/CA 92/00283).

Myoblasty jsou jedním z typů buněk, které mohou být podle vynálezu zapouzdřeny uvnitř BAO. Myoblasty jsou prekursor svaluových buněk původně odvozené z populací mezodermálních kmenových buněk. Je dostupné velké množství buněčných linií myoblastů, které mohou být diferencovány v buněčné kultuře; například buňky L-6 a buňky β -CH3. Primární myoblasty mohou být snadno izolovány ze tkáně získané při autopsii nebo biopsii a mohou být purifikovány a zmnoženy. Myoblasty proliferují a fúzí za vzniku diferencovaných, polyjaderných myotubulů. Myotubuly se již dále nedělí, ale pokračují v produkci svalových proteinů. Během proliferace mohou být myoblasty jednoduše geneticky pozměněny tak, aby produkovaly molekuly používané k terapeutickým účelům. Existují způsoby sloužící k zavedení jednoho nebo více genů do myoblastů tak, aby tyto myoblasty produkovaly biologicky aktivní molekuly. Myoblasty jsou schopny migrovat, fúzovat s již vytvořenými vlákny a mohou sloužit jako nosiče introdukovaného(ných) genu(ů). Verma a další, (WO 94/01 129); Blau a další, TIG, 9, strana 269 až 74 (1993); WO 93/03768; WO 90/15863. Geneticky upravené buňky mohou být zapouzdřeny uvnitř BAO a může jim být ponechána možnost diferencovat uvnitř BAO nebo mohou být uvnitř BAO zapouzdřeny již diferencované buňky.

Výběr buněk závisí rovněž na požadované aplikaci. Buňky zapouzdřené uvnitř BAO mohou být například vybrány za účelem sekrece neurotransmiterů. Mezi takové neurotransmitery patří dopamin, kyselina gama-aminobutanová (GABA), serotonin, acetylcholin, noradrenalin, adrenalin, kyselina glutamová a jiné neurotransmitery peptidové povahy. Buňky mohou být

rovněž použity k syntéze a sekreci fyziologicky aktivních agonistů, analog, derivátů nebo fragmentů neurotransmiterů. Sem patří například buňky sekretující bromokriptin, který je agonistou dopaminu, nebo buňky sekretující L-dopa, který je prekurzorem dopaminu.

Může být proveden výběr buněk za účelem sekrece hormonů, cytokinů, růstových faktorů, trofických faktorů, angiogenních faktorů, protilátek, faktorů hrajících úlohu při koagulaci krve, lymfokinů, enzymů a jiných terapeutických agens nebo jejich antagonistů, prekurzorů, aktivních analog nebo aktivních fragmentů. Mezi tyto látky patří enkefaliny, katecholaminy, endorfiny, dynorfin, inzulin, faktor VIII, erythropoietin, Substance P, růstový faktor nervových buněk (NGF), neurotrofní faktor produkovaný linií gliových buněk (GDNF- glial cell line-derived Neurotrophic Factor), růstový faktor produkovaný krevními destičkami (PDGF), epidermální růstový faktor (EGF), neurotrofní faktor produkovaný v mozku (BDNF- brain-derived neurotrophic factor), neurotrofin-3 (NT-3), neurotrofin-4/5, CDF/LIF, β -FGF, α -FGF, spektrum dalších růstových faktorů produkovaných fibroblasty, ciliární neurotrofní faktor (CNTF) a interleukiny.

Z toho vyplývá, že mezi buňky použitelné ve způsobech podle vynálezu patří netransformované buňky, které sekretují požadovanou(é) biologicky aktivní molekulu(y) nebo buňky transformované za účelem sekrece biologicky aktivní(ch) molekuly(molekul).

Byly klonovány geny kódující množství biologicky aktivních molekul a jsou rovněž publikovány nukleotidové sekvence těchto genů. Mnohé z těchto genů jsou všeobecně dostupné ve sbírkách kultur jakou je například American Type Culture Collection (ATCC) nebo z různých komerčních zdrojů. Geny kódující biologicky aktivní molekuly použitelné ve

vynálezu, které nejsou všeobecně dostupné, mohou být získány za použití standardních metod rekombinace DNA, jakými jsou například amplifikace pomocí PCR nebo screening genomových a cDNA knihoven za použití jakýchkoliv oligonukleotidových sond, jejichž sekvence byla publikována. Ve způsobech podle vynálezu mohou být použity jakékoliv známé geny kódující biologicky aktivní molekuly; viz. například Patent Spojených států amerických 5,049,493; Gage a další, Patent Spojených států amerických 5,082,670; a Patent Spojených států amerických 5,167,762

"Využitelné" geny (tzn. geny, které kódují vhodnou biologicky aktivní molekulu) mohou být pomocí standardních technik vloženy do klonovacího místa vhodného expresivního vektoru. Takové standardní techniky jsou odborníkům dobře známy.

Expresivní vektor nesoucí "využitelný" gen může být pak použit k transfekci buněčné linie použitelné dále ve způsobech podle vynálezu. Mohou být využity standardní techniky transfekce, jakými jsou například koprecipitace s fosforečnanem vápenatým, transfekce pomocí DEAE-dextranu, postupy zprostředkované molekulami lipidů nebo elektroporace.

Ve vynálezu jsou popsány způsoby sloužící k regulaci růstu dělicích se buněk, s jejichž pomocí může být regulován vzájemný poměr mezi proliferací a diferenciací buněk. Výsledkem je pak množství diferencovaných, nedělicích se buněk zapouzdřených v BAO. Vynález dále popisuje způsoby sloužící k regulaci růstu jak dělicích se buněk tak nedělicích se buněk, s jejichž pomocí může být regulován počet a prostorové uspořádání buněk uvnitř BAO. Výsledkem je zpomalení tvorby nekrotických buněčných oblastí a snížení rychlosti tvorby buněčných fragmentů.

Regulace proliferace a diferenciace s využitím metod genového inženýrství

Vynález popisuje způsoby a kompozice sloužící k regulaci buněčného růstu. Této regulace je dosaženo změnou genetické informace buněk prostřednictvím genu, který kóduje produkt ovlivňující proliferaci a diferenciaci buněk.

V jednom provedení vynálezu jsou za účelem dosažení regulace růstu buněk v BAO použity podmíněně imortalizované buněčné linie. Primární buňky jsou transformovány genem kódujícím produkt podporující proliferaci. Tento gen podporující proliferaci je funkčně připojen k regulovatelnému promotoru. Techniky popsané v Land a další, Nature, 304, strana 596 až 602 (1983) nebo Cepko, Neuron, 1, strana 345 až 53 (1988) sloužící k produkci imortalizovaných buněk mohou být modifikovány za účelem produkce podmíněně imortalizovaných buněk.

Ve způsobu podle vynálezu může být buněčná proliferace (tzn. mitóza) inhibována nebo zastavena pomocí snížení hladiny exprese genu podporujícího proliferaci, jakým je například onkogen (například c-myc, v-mos, v-Ha-ras, T-antigen viru SV40, El-A z adenovirů). Snížené rychlosti exprese onkogenu je dosaženo negativní regulací, represí nebo inaktivací promotoru řídícího expresi onkogenu, poté co je BAO implantován in vivo do organismu hostitele. Pozitivní regulace, aktivace nebo dereprese regulovatelného promotoru provedená in vitro má za následek expresi genu podporujícího proliferaci, a tudíž in vitro umožňuje proliferaci buněk. Vhodnými promotory jsou takové promotory, které mohou být in vivo negativně regulovány. Mezi takové promotory patří například promotory reagující na přítomnost glukokortikoidů, jako například PNMT (Hammag a další, Neuroprotocols, 3, strana 176 až 83 (1993) a promotory reagující na přítomnost

interferonů, jako například Mx1 (Hug a další, Mol. Cell. Biol., 8, strana 3065 až 79 (1988); Arnheiter a další, Cell, 52, strana 51 až 61 (1990)), promotory přítomné v retrovirálních LTR úsecích, promotory reagující na přítomnost tetracyklinu, například lac promotor a promotory reagující na přítomnost inzulinu; viz. rovněž McDonnell a další, WO 93/23431. Je třeba si uvědomit, že výběr promotoru bude záviset na plánovaném místě implantace. Pro implantaci do mozku podle tohoto způsobu jsou tedy vhodné například promotory reagující na přítomnost glukokortikoidů nebo promotory reagující na přítomnost interferonů, protože hladina glukokortikoidů a/nebo IFN v mozku je velmi nízká. Nepředpokládá se tudíž, že by exprese onkogenu řízená těmito promotory po implantaci BAO do mozku dosahovala významné úrovně.

V jednom provedení vynálezu jsou podmíněně imortalizované buňky vytvořeny způsobem, při němž je onkogen funkčně připojen k regulovatelnému promotoru. Tento promotor je aktivován nebo pozitivně regulován za přítomnosti vazebného proteinu. Produkce vazebného proteinu může být regulována tak, že gen kódující vazebný protein je funkčně připojen k promotoru reagujícímu na přítomnost tetracyklinu.

Jedno provedení vynálezu využívá transformované buňky obsahující konstitutivní promotor řídící expresi tet represoru. Buňky navíc obsahují cizorodý gen funkčně připojený k promotoru CMV-IE. Jestliže je promotor CMV-IE ohraničen sekvencemi tet operátoru, exprese řízená tímto promotorem může být pomocí tet represoru zastavena. Za přítomnosti tetracyklinu dochází k transkripci, protože tet se váže na tet represor a umožňuje tím vlastně vazbu ostatních transkripčních faktorů na promotor CMV-IE. Podle tohoto provedení vynálezu je tedy onkogen exprimován pouze za

přítomnosti tetracyklinu. Za přítomnosti tetracyklinu může tedy in vitro docházet k proliferaci buněk.

Několik dní před vlastní implantací může být tetracyklin odstraněn, což má za následek sníženou rychlost exprese cizorodého genu a tudíž odpovídající zpomalení nebo zastavení proliferace buněk uvnitř BAO.

Ve specifickém provedení vynálezu je regulace růstu u podmíněně imortalizovaných buněk dosaženo pomocí promotoru Mx1. Gen Mx1 kóduje protein, který propůjčuje organismu rezistenci vůči chřipce typu A a B. Gen Mx1 je dokonale regulován svým promotorem. Za nepřítomnosti interferonu ("IFN") není tento gen exprimován jeho expresi je možné indukovat pomocí IFN- α a IFN- β . Arnheiter a další, Cell, 52, strana 51 až 61 (1990) popsal vytvoření transgenních myši Mx1, u kterých je možné pomocí interferonu indukovat v některých tkáních expresi cizorodého genu. Buňky získané z nejrůznějších tkání mohou být transformovány a imortalizovány prostřednictvím velkého T-antigenu viru SV40.

V jednom provedení vynálezu může být myši promotor Mx1 spojen s časnou oblastí viru SV40 a vzniklý chimérický produkt pak může sloužit k vytvoření transgenní myši. Dokonalá regulace exprese zapříčiněná přítomností promotoru Mx1 umožňuje ve tkáních nebo v buněčných kulturách připravených z transgenního zvířete regulovat hladinu exprese onkogenu, a tím vlastně umožňuje vytvoření podmíněně imortalizovaných buněčných linií.

Buněčné linie vytvořené popsáním způsobem mohou být, tak jako většina ostatních buněčných linií, množeny za přítomnosti IFN- α nebo IFN- β . Odstaněním IFN- α nebo IFN- β může být dělení buněk zastaveno buď před nebo až po zapouzdření buněk. Ve výhodném provedení vynálezu mohou být z transgenní myši nesoucí konstrukt Mx1-T-antigen viru SV40 za použití

postupu podle Weisse (PCT/CA 92/00283) získány kmenové nervové buňky (neurosféry) Takto získaná linie podmíněně imortalizovaných kmenových nervových buněk může být následně zapouzdřena a implantována in vivo do organismu hostitele.

Podmíněně imortalizované kmenové nervové buňky mohou být navíc, je-li to žádoucí, dále geneticky modifikovány pomocí standardních technik. Výsledkem této modifikace skutečnost, že kmenové nervové buňky uvolňují některý z velkého počtu růstových faktorů nebo neurotransmiterů. V tomto provedení vynálezu je možné s výhodou použít i jiné promotory reagující na přítomnost interferonů. Mezi tyto promotory patří promotor metalothioneinu, H-2K^b, H-2D^d, H-2L^d, HLA-A3, HLA-DR α a gen HLA třídy I, 202, 56K, 6-16, IP-10, ISG15, ISG54 a 2', 5'-oligo(A) syntetázy; viz. Hug a další, Mol. Cell. Biol., 8, strana 3065 až 3079 (1988).

Toto provedení vynálezu je zvláště výhodné pro buňky, které mají být zapouzdřené uvnitř BAO, který je určený k implantaci do mozku. Hladina IFN- α a IFN- β v mozku je dostatečně nízká a tak transkripční aktivita řízená promotorem Mx1 nedostačuje k tomu, aby byly buňky schopny proliferovat. V organismu transgenního zvířete může být exprese T-antigeny indukována v několika tkáních, ale přirozená exprese tohoto onkogenu byla pozorována pouze v thymu. U transgenních zvířat exprimujících časnou oblast viru SV40 je exprese tohoto onkogenu v thymu nicméně relativně běžným fenoménem. Při absenci významné exprese onkogenu mohou být tudíž buňky in vivo udržovány ve stavu téměř identickém s klidovým stavem.

Jiné provedení vynálezu využívá zjištění, že ke změně genetické informace buněk, které jsou dále používány in vivo, pomocí způsobů využívajících infekci těchto buněk retroviry, jsou využívány retrovirální promotory, například promotor

dlouhé koncové repetice ("LTR"-long terminal repeat); viz. například Gage a další, (Patent Spojených států amerických 5,082,670). Exprese genů řízená těmito promotory je in vivo obvykle negativně regulována. Předpokládá se, že tato negativní regulace je zapříčiněna přítomností cytokinů ve krevním oběhu. Vynález využívá tuto negativní regulaci retrovirálních genů k zastavení nebo ke zpomalení proliferace buněk v případech, kdy jsou tyto buňky zapouzdřeny uvnitř BAO a implantovány in vivo. V tomto příkladu je gen odpovědný za imortalizaci buňky (onkogen) řízen LTR promotorem. Tento gen bude "imortalizovat" buňky při jejich kultivaci a množení in vitro. Za přítomnosti cytokinů po implantaci dojde k negativní regulaci tohoto genu odpovědného za "imortalizaci" a výsledkem je zpomalení nebo úplnému zastavení proliferace a buňky tedy mohou uvnitř BAO přejít do klidového stavu.

Podle tohoto provedení vynálezu může být k vytvoření podmíněně imortalizovaných buněk použit způsob retrovirální infekce nebo transfekce buněk pomocí cDNA obsahující onkogen (například cmyc, v-mos, v-Ha-ras, T-antigen viru SV40, El-A z adenovirů) funkčně připojené k retrovirálnímu promotoru, například LTR promotoru. Upřednotňujeme promotorové sekvence Moloneyho viru myši leukémie (MLV), Rousova viru sarkomu (RSV) a viru způsobujícího nádory mléčných žláz myši (MMTV-mouse mammary tumor virus).

Tyto transformované buňky budou in vitro normálně exprimovat příslušný onkogen. Úspěšně transformované buňky budou kultivovány za použití zavedených technik kultivace. Za účelem zkrácení doby potřebné ke kultivaci transformovaných buněk může být exprese cizorodého genu řízeného LTR promotorem stimulována přidavkem dexamethazonu nebo epidermálního růstového faktoru. Jestliže budou buňky vystaveny působení cytokinů, například interferonu gama

(IFN- γ), TNF- α a transformujícímu růstovému faktoru beta (TGF β), dojde v důsledku snížení hladiny exprese cizorodého genu řízeného LTR promotorem ke snížení rychlosti mitózy. Schinstine a Gage, *Molecular a Cellular Approaches to the Treatment of Neurological Disease*, 71, ed. Waxman, S. G (1993); Seliger a další, *J. Immunol.* 141, strana 2138 až 44 (1988); Seliger a další, *J. Virology*, 61, strana 2567 až 72 (1987); Seliger a další, *J. Virology*, 62, strana 619 až 21 (1988) Výhodné je, jestliže jsou buňky vystaveny působení cytokinů několik dní před vlastním zapouzdření a implantací.

Pomocí výše uvedených způsobů může být podmíněně immortalizována jakákoliv vhodná buňka. Odborník může pomocí screeningových způsobů dobře v současnosti známých (včetně způsobů popsaných ve vynálezu) určit, je-li daný druh buněk vhodný k podmíněné immortalizaci.

Vynález popisuje způsoby sloužící k regulaci růstu linií immortalizovaných buněk nebo jiných kontinuálně proliferujících buněk. Zmíněné regulace růstu je dosaženo transformací buněk tumorsupresorovými geny, například genem p53 nebo genem RB, které jsou schopny zastavit nebo zpomalit proliferaci. Předpokládá se, že tumor-supresorové geny neboli anti-onkogeny, jsou geny, které brzdí proliferaci buněk; viz. například Weinberg, *Neuron*, 11, strana 191 až 96, (1993). Například přirozeně se vyskytující fragment 1 aktivovaný produktem genu p53 (WAF 1-wild-type p53-activated fragment 1) může potlačit růst nádorových buněk v buněčné kultuře. Předpokládá se, že biologická funkce genů indukovatelných produktem genu p53 spočívá v jejich tumor-supresorových vlastnostech. El-Deiry a další, "WAF 1, a role as a tumor suppressor", (WAF 1 a jeho tumor-supresorová funkce), *Cell*, 75, strana 817 až 825 (1993). Pro gen WAF1 se rovněž používá označení CIP1. Mezi další geny brzdící růst buněk

indukovatelné produktem genu p53 patří GADD4S a GADD1 S3 (neboli CHOP); viz. Ron, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, strana 1985 až 86 (1994). Ve způsobech sloužících k transformaci buněk pomocí výše zmíněné cizorodé DNA může být použito standardních technik molekulární biologie.

V jiném provedení vynálezu jsou imortalizované buňky nebo kontinuálně proliferující buňky transformovány tumor-supresorovým genem funkčně připojeným k regulovatelnému promotoru. Použití vhodného regulovatelného nebo inducibilního promotoru umožňuje, aby byla v období, kdy jsou transformované buňky kultivovány in vitro, negativně regulována nebo "vypnuta" exprese cizorodého genu. Tato negativní regulace nebo "vypnutí" exprese cizorodého genu umožňuje buňkám proliferaci. Po zapouzdření a implantaci je promotor "indukován" nebo pozitivně regulován a dochází tedy k expresi tumor-supresorového genu, výsledkem které je zpomalení nebo úplné zastavení proliferace.

Z tohoto hlediska je ve vynálezu výhodné využít promotory hydroxylázy tyrosinu a erythropoietinu. Tyto promotory jsou obvykle "negativně regulovány" za podmínek vyznačujících se vyšší koncentrací O_2 (takové podmínky jsou běžné in vitro), ale jsou naopak "pozitivně regulovány," za podmínek vyznačujících se nižší koncentrací O_2 , kterým jsou buňky vystaveny po zapouzdření uvnitř BAO a následné implantaci do organismu hostitele.

Za účelem dosažení požadované regulace genu potlačujícího proliferaci je možné navíc využít vhodné systémy spřažených promotorů nebo derepresibilních promotorů. Jedním z vhodných systémů je například systém využívající promotor AP 1 spolu s konstruktem lac operátor/promotor PGK1 popsáný v Hannan a další, Gene, 130, strana 233 až 39 (1993). Promotor AP 1 je funkčně připojeny ke genu lac

represoru. lacO (lac operátor) a promotor 3-fosfoglycerát kinázy (PGK 1) jsou funkčně připojeny ke genu potlačujícímu proliferaci. Po přidání exogenního esteru forbolu in vitro dojde k indukci promotoru AP 1, což má za následek expresi proteinu kódovaného lac represorem. Za přítomnosti represorového proteinu dochází k represí konstruktu lacO-promotor PGK1 a tudíž nedochází k žádné expresi genu potlačujícího proliferaci. Jestliže je nicméně in vivo ester forbolu nepřítomen, není exprimován žádný represorový protein a tudíž dojde k derepresi konstruktu lacO promotor PGK1, což má za následek expresi genu potlačujícího proliferaci.

Vynález dále popisuje způsob, ve kterém je vhodná buňka transformována genem kódujícím produkt podporující diferenciaci. Tento gen podporující diferenciaci je funkčně připojen k regulovatelnému promotoru. Podle tohoto způsobu by byl gen podporující diferenciaci exprimován po zapouzdření a implantaci in vivo do organismu hostitele. Pomocí vhodné negativní regulace, represe nebo inaktivace regulovatelného promotoru může být nicméně in vitro přerušena nebo inhibována exprese tohoto genu, čímž je vlastně in vitro umožněna proliferace požadované buňky nebo buněčné linie. V tomto způsobu mohou být použity dělicí se buňky nebo imortalizované primární buňky. Jedním z příkladů genů účastnících se procesu regulace diferenciaci buněk je skupina chromozomálních proteinů s vysokou pohyblivostí označená pořadovým číslem 14 ("HMG"). V tomto provedení vynálezu může být, tak jak bylo zmíněno výše v souvislosti s použitím genů potlačujících proliferaci, využit jakýkoliv vhodný promotor, který je pozitivně regulován in vivo, ale který může být negativně regulován nebo "vypnut" in vitro. Navíc může být k regulaci exprese tumor-supresorového genu použit jakýkoliv vhodný systém derepresibilních promotorů zmíněný v předchozím textu.

Jiným způsobem sloužícím k regulaci růstu je využití antisense RNA nebo DNA nebo jejich derivátů. Antisense RNA nebo DNA je jednovláknová nukleová kyselina, která je komplementární ke kódujícímu řetězci daného genu nebo ke "kódující" mRNA, která je produktem transkripce takového genu. Jestliže je antisense RNA přítomná v buňce ve stejnou dobu jako mRNA, může antisense RNA hybridizovat s mRNA a výsledkem této hybridizace je vznik dvouřetězcové molekuly, která nemůže být překládána na ribozomech a nemůže tak docházet k produkci odpovídajícího proteinu. Antisense RNA může být do buněk zavedena buď pomocí mikroinjekcí nebo jednoduše přidáním přebytku této antisense RNA do kultivačního média. Výhodnějším způsobem podle vynálezu je transfekce cílových buněk pomocí eukaryotických expresivních vektorů. Neckers a další, "Antisense Technology: Biological Utility And Practical Considerations", (Technologie využívající antisense molekuly: biologické využití a praktický význam), Am. J. Physiol., 265 (Lung Cell. Mol. Physiol., 9), strana L 1 až L12 (1993).

Podle tohoto provedení vynálezu může být antisense gen kódující antisense RNA ke genu podporujícímu proliferaci nebo k tumor-supresorovému genu funkčně připojen k indukovatelnému promotoru. Výsledkem indukce promotoru je produkce antisense RNA. Nesou-li transformované buňky gen podporující proliferaci podle tohoto provedení vynálezu, může být in vitro zastavena nebo negativně regulována produkce antisense RNA a tím vlastně umožněna proliferace buněk nebo může bvt in vivo produkce antisense RNA regulována pozitivně, což má za následek zastavení nebo zpomalení proliferace.

Obsahují-li transformované buňky tumor-supresorový gen, je jinou alternativou k dosažení požadované regulace růstu

pozitivní regulace produkce antisense RNA in vitro a negativní regulace produkce antisense RNA in vivo.

Technologie využívající antisense molekuly může být dále použita při konstrukci jakéhokoliv antisense genu ke genu kódujícímu produkt nezbytný pro proliferaci nebo diferenciaci. Vhodná indukce exprese takového antisense genu by odborníkovi umožnila dosáhnout požadované regulace růstu zapouzdřených buněk podle tohoto vynálezu.

Je výhodnější používat konstrukt tvořený dvojicí regulovatelný promotor/gen, se kterým je možné manipulovat rovněž in vivo, a to, jestliže se zdá nezbytné nebo je žádoucí indukovat in vivo další buněčnou proliferaci. Například v případě použití konstruktů Mx1/SV40 zmiňovaného v předchozím textu může být za účelem indukce exprese onkogenu aplikován buď lokálně nebo systémově IFN. Zrychlení proliferace buněk in vivo uvnitř BAO může být žádoucí, jestliže má zvýšený počet buněk nahradit uvnitř BAO mrtvé buňky nebo jestliže požadujeme zvýšení produkce dané biologicky aktivní molekuly uvnitř BAO.

Regulace růstu a diferenciacie pomocí chemických sloučenin

Vynález dále popisuje způsob, ve kterém mohou být buňky vystaveny působení, které inhibuje proliferaci nebo indukuje diferenciaci. V některých způsobech je toto působení zprostředkováno přidáním nějaké chemické sloučeniny nebo růstového faktoru do kultivačního média. V jiných způsobech je naopak toto působení zprostředkováno odejmutím nějaké chemické sloučeniny nebo růstového faktoru z kultivačního média. Toto působení může být provedeno před nebo až po zapouzdření uvnitř BAO, výhodněji však před vlastním zapouzdřením.

Druh použitého proteinu nebo chemické sloučeniny závisí na druhu buňky a na požadovaném účinku. Odborník může za použití běžných technik provést screening daného druhu buněk za účelem zjištění, reagují-li tyto buňky odpovídajícím způsobem na přítomnost zvolené sloučeniny nebo proteinu.

V jednom způsobu podle vynálezu je regulace distribuce buněk dosaženo odejmutím chemické sloučeniny podporující proliferaci nebo růstového faktoru z buněčného kultivačního média. V jednom provedení vynálezu mohou být za účelem indukce proliferace kmenových buněk nebo progenitorů buněk, včetně buněk z embryonálního sympatetického ganglia a imortalizovaných progenitorů buněk, výhodněji pak kmenových nervových buněk (Weiss, PCT/CA 92/00283) použity růstové faktory, jako například epidermální růstový faktor ("EGF"), transformující růstový faktor α ("TGFA"), amfiregulin nebo jakékoliv jiné vhodné agens. Toto umožňuje zachování a zmnožení prekursorů neuronů in vitro. Jestliže jsou prekursor neuronů zapouzdřeny za nepřítomnosti těchto růstových faktorů podporujících proliferaci, dojde k zastavení jejich proliferace a diferenciaci.

Diferenciace prekursorů neuronů může být dále indukována, jestliže na buňky působíme například estery forbolu nebo jsou-li buňky pěstovány na nějakém pevném substrátu. Mezi takové substráty patří iontově nabitě povrchy jako například poly-L-lysin, poly-L-ornithin a podobně. Diferenciace může být rovněž indukována působením některého ze zástupců rodiny FGF v kombinaci s alespoň jedním zástupcem rodiny ciliárních neurotrofických faktorů (CNTF-ciliary neurotrophic factor) nebo v kombinaci s alespoň jedním zástupcem rodiny růstových faktorů nervových buněk (NGF) jak je popsáno v Ip a další, (WO 94/03199).

V jiném provedení vynálezu může být k indukci proliferace u hematopoietických kmenových buněk použit pluripotentní růstový faktor produkovaný v kostní dřeni, nazývaný rovněž "růstový faktor žírných buněk", "faktor kmenových buněk (stem cell factor)", "c-kit-ligand" nebo "Steel faktor". Za účelem udržení dostatečného počtu dělících se buněk in vitro jsou hematopoietické kmenové buňky kultivovány za přítomnosti růstového faktoru žírných buněk. Zastavení nebo zpomalení proliferace je dosaženo odstraněním růstového faktoru žírných buněk z kultivačního média. Toto může být provedeno před nebo až po vlastním zapouzdrění, výhodněji však před zapouzdrěním.

Příkladem jiných pluripotentních růstových faktorů, které podporují proliferaci, je interleukin-3 a faktor stimulující tvorbu kolonií granulocytů a makrofágů. Růstový faktor žírných buněk může rovněž ovlivňovat buněčný růst v kombinaci s jinými pluripotentními růstovými faktory nebo růstovými faktory specifickými pro jednotlivé buněčné linie, mezi něž patří například erythropoietin. Předpokládá se například, že při indukci proliferace a diferenciaci vysoce obohacené frakce myších hematopoietických kmenových buněk má růstový faktor žírných buněk synergické účinky s molekulou IL-3. Galli a další, "The Biology of Stem Cell Factor, a New Hematopoietic Growth Factor Involved in Stem Cell Regulation", ("Biologické účinky faktoru kmenových buněk; nový hematopoietický růstový faktor účastní se regulace kmenových buněk"), Int. J. Clin. Lab. Res., 23, strana 70 až 77 (1993).

V jiném způsobu podle vynálezu může být regulace distribuce buněk uvnitř BAO dosaženo přidáním chemické sloučeniny nebo růstového faktoru, který inhibuje proliferaci nebo indukuje diferenciaci. Podle tohoto způsobu může být

použita jakákoliv vhodná sloučenina, která inhibuje proliferaci nebo indukuje diferenciaci.

Je třeba si uvědomit, že různé druhy buněk mohou reagovat na přítomnost rozmanitých chemických sloučenin nejrůznějším způsobem. Odborník může snadno provést screening příslušné sloučeniny za účelem zjištění, zda má tato sloučenina u daného typu buněk vliv na jejich proliferaci nebo diferenciaci.

V jiném provedení vynálezu mohou být k zastavení nebo inhibici proliferace buněk nebo k indukci diferenciaci buněk použity cytokiny, mezi něž patří například transformující růstový faktor β 1 ($\text{TGF}\beta$ 1). Například u buněk BHK může být zpomalení proliferace a zvýšení rychlosti diferenciaci dosaženo vystavením těchto buněk působení $\text{TGF}\beta$ 1 a kyseliny askorbové. Obdobně může být $\text{TGF}\beta$ 1 použit k indukci diferenciaci u fibroblastů a také jako růstový inhibitor pro keratinocyty a endoteliální buňky. Phillips a další, "Ascorbic Acid and Transforming Growth Factor β 1 Increase Collagen Biosynthesis via Different Mechanisms: Coordinate Regulation of $\text{Pro}\alpha$ 1 (I) and $\text{Pro}\alpha$ 1 (III) Collagens," ("Kyselina askorbová a transformující růstový faktor β 1 zvyšují rychlost biosyntézy kolagenu prostřednictvím rozdílných mechanismů: koordinovaná regulace biosyntézy kolagenů typu $\text{Pro}\alpha$ 1 (I) a $\text{Pro}\alpha$ 1 (III)"), Archives of Biochemistry and Biophysics, 295, strana 397 až 403 (1992).

V jiném provedení vynálezu mohou být k regulaci růstu neuroendokrinních buněk využity $\text{TGF}\beta$ 1, serotonin nebo FGF. Růst neuroendokrinních buněk může být regulován pomocí vlastních produktů, což vlastně odpovídá autokrinní regulaci. Pro buňky lidského karcinomu pankreasu (BON) funguje $\text{TGF}\beta$ 1 jako autokrinní faktor inhibující jejich růst, zatímco FGF a serotonin fungují jako autokrinní faktory stimulující jejich

růst. Inhibiční účinky TGF β 1 na růst buněk BON mohou být zrušeny přidavkem serotoninu. Townsend Jr. a další, "Studies of Growth Regulation in a Neuroendocrine Cell Line," ("Studium regulace růstu u linie neuroendokrinních buněk, Acta Oncologica, 32, strana 125 až 130, 1993.

V způsobech podle vynálezu může být k zastavení nebo inhibici proliferace nebo k indukci diferenciaci buněk využito množství jiných chemických sloučenin. Mezi tyto chemické sloučeniny patří mytomycin C, 5-brom-deoxyuridin (BrdU), prostaglandin E₁ (PGE₁), dibutyryl cAMP, 1- β -D-arabinofuranosyl cytosinu (Ara-C), nikotinamid a heparin. Mytomycin může být zvláště vhodný k regulaci proliferace zapouzdřených buněčných linií β HC; viz. například Radvanyi a další, Mol. Cell Biol., 13, strana 4223 až 4227 (1993).

Někdy je možné použít různé kombinace chemických sloučenin. In vitro diferenciaci u buněk lidského neuroblastomu (IMR-32) může být indukována, jestliže buňky vystavíme působení mytomycinu C a BrdU nebo PGE, a dibutyryl cAMP (dbcAMP). Gash a další, "Amitotic Neuroblastoma Cells Used for Neural Implants in Monkeys," ("Nedělící se buňky neuroblastomu použité k implantaci do organismu opic"), Science, 233, strana 1420 až 1426 (1986). Působení Ara-C na buněčnou linii lidského embryonálního rhabdomyosarkomu má in vitro za následek významnou inhibici růstu těchto buněk, in vivo pak ztrátu schopnosti tvořit nádory a rovněž více diferencovaný fenotyp, a to i po odstranění této sloučeniny. Crouch a další, "Ara-C Treatment Leads to Differentiation and Reverses the Transformed Phenotype in a Human Rhabdomyosarcoma Cell Line," ("Působení Ara-C na buněčnou linii lidského rhabdomyosarkomu vede k diferenciaci buněk a ke změně fenotypu transformovaných buněk"), Experimental Cell

Research, 204, strana 210 až 216 (1993). Předpokládá se, že nikotinamid (NIC) indukuje diferenciaci a maturaci fetálních buněk lidských pankreatických ostrůvků. Otonkoski a další, "Nicotinamid Is a Potent Inducer of Endocrine Differentiation in Cultured Human Pancreatic Cells," ("Nikotinamid je silným induktorem endokrinní diferenciace u kultivovaných lidských pankreatických buněk"), J. Clin. Invest., 92, strana 1459 až 1466 (1993).

Bylo publikováno, že diferenciace vyvíjejících se tkání může být rovněž ovlivněna přidavkem dbcAMP. Předpokládá se například, že dbcAMP moduluje diferenciaci prekursorů astrocytů, indukuje tvorbu neuritů u buněk PC 12 a stimuluje proliferaci Schwannových buněk. Baron-Van Evercooren a další, "Schwann Cell Differentiation in vitro: Extracellular Matrix Deposition and Interaction," ("Diferenciace Schwannových buněk in vitro: Ukládání a interakce extracelulární matrix"), Dev. Neurosci., 8, strana 182 až 196 (1986). Obdobně může být diferenciace Schwannových buněk indukována prostřednictvím kyseliny askorbové.

K inhibici nebo zastavení proliferace buněk mohou být dále využity molekuly sialoglykopeptidů ("SGP"). Například sialoglykopeptid o velikosti 18 kDa izolovaný z povrchu intaktních buněk cerebrálního kortexu skotu byl schopen zastavit proliferaci exponenciálně rostoucích buněk Swiss 3T3; viz. například Toole-Simms a další, Jour. Cell. Physiol., 147, strana 292 až 297 (1991); Fattaey a další, Exp. Cell. Res., 194, strana 62 až 68 (1991). Bylo prokázáno, že na přítomnost některých SGP citlivě reaguje velké množství druhů transformovaných i netransformovaných buněk. Mezi tyto buňky patří buňky podobné epitheliálním buňkám a fibroblasty získané z širokého spektra druhů obratlovců a bezobratlých;

viz. například Fattaey a další, Jour. Cell. Physiol., 139, strana 269 až 274 (1989)

Je třeba si uvědomit, že některé z výše zmíněných působení může mít na proliferaci a diferenciaci pouze přechodný účinek. V takových případech může být žádoucí, aby byl zapouzdřeným buňkám po jejich in vivo implantaci do organismu hostitele umožněn neustálý přísun příslušné chemické sloučeniny nebo růstového faktoru. Toho může být dosaženo použitím polymeru, u kterého dochází v organismu k pozvolnému rozkladu a který tedy slouží jako nebuněčný zdroj růstového faktoru nebo chemické sloučeniny. Jinou možností je spolu s buňkami produkujícími požadovanou biologicky aktivní molekulu zapouzdřit rovněž buněčný zdroj růstového faktoru nebo chemické sloučeniny. Samozřejmě je možné využít i jiné vhodné způsoby; viz. například Patent Spojených států amerických 5,106,627 a 5,156,844.

Regulace růstu pomocí iradiace

Proliferace buněk může být rovněž regulována, vystavíme-li buňky vhodným dávkám záření, například rentgenové záření, ultrafialové (UV) záření a podobně. Jsou-li buňky vystaveny účinkům záření, může dojít k přerušení jejich buněčného cyklu. Kritická radiační dávka nebo minimální radiační dávka mohou být pro daný druh buněk stanoveny prostřednictvím v současnosti známých způsobů; viz. například Stanley a Lee, Radiat. Res., 133, strana 163 až 169 (1993); Mitchell a další, Radiat. Res., 79, strana 537 až 551 (1979). Například normální lidské epidermální keratocyty ozářené ultrafialovým zářením typu B (UVB) o intenzitě 5 a 10 mJ/cm² vykazují po 3 až 5 dnech po ozáření významný pokles rychlosti (až 78%) proliferace. Prystowski a další, J. Invest. Dermat., 101, strana 54 až 58 (1993). Yi a další,

Radiation Research, 133, strana 163 až 169 (1993) popisuje způsob sloužící k výpočtu nejnižší dávky rentgenového záření nutné k zastavení proliferace buněk.

Regulace růstu a diferenciace prostřednictvím molekul extracelulární matrix

Vynález popisuje způsoby sloužící k regulaci distribuce buněk v BAO prostřednictvím modifikace růstových povrchů pomocí samotné extracelulární matrix ("ECM") regulující růst (nebo pomocí složek této matrix) nebo pomocí extracelulární matrix regulující růst v kombinaci s fyzickou maticí regulující růst nebo v kombinaci s nějakou jinou substancí regulující růst.

V živých tkáních je ECM tvořena množstvím proteinů a polysacharidů sekretovaných buňkami, které vytvářejí v blízkosti těchto buněk síť. Mezi molekuly tvořící ECM patří glykosaminoglykany a proteoglykany jako například chondroitin sulfát, fibronectin, heparin sulfát, hyaluron, dermatan sulfát, keratin sulfát, laminin, kolagen, proteoglykan, jehož sacharidovou složkou je heparan sulfát (HSPG) a elastin. Hlavní komponentou ECM in vivo je kolagen. O molekulách ECM je známo, že způsobují snížení rychlosti proliferace buněk a naopak zvýšení rychlosti diferenciace buněk. ECM bez přítomnosti buněk může navíc, je-li použita ve způsobech podle vynálezu, ovlivňovat prostorové rozložení buněk zapouzdřených uvnitř BAO.

ECM může být získána při kultivaci buněk, které produkují komponenty ECM, mezi něž patří buňky původem mezenchymální nebo astrocytální. Působením kyselinou askorbovou nebo cAMP na Schwannovy buňky, můžeme u těchto buněk indukovat syntézu ECM. Tyto komponenty ECM se podobají prekurzorům tvořícím bazální membránu ("basement membrane"),

• která podporuje proliferaci Schwannových buněk. Růst a
• diferenciace nejrůznějších endotheliálních a epitheliálních
• buněk jsou navíc podporovány ECM přirozeně produkovanou
• endotheliálními buňkami a gelem z rekonstituovaných bazálních
• membrán produkováných buňkami Engelbrethova Holm-Swarmova
• nádoru (EHS) Baron-Van Evercooren a další, "Schwann Cell
• Differentiation in vitro: Extracellular Matrix Deposition and
• Interaction," ("Diferenciace Schwannových buněk in vitro:
• Ukládání a interakce extracelulární matrix"), Dev. Neurosci.,
8, strana 182 až 196 (1986).

V jednom provedení vynálezu je regulace růstu dosaženo
povlečením růstového povrchu uvnitř BAO pomocí ECM (nebo
jejích komponent regulujících růst). My upřednostňujeme
vysazení buněk produkujících ECM na růstový povrch uvnitř BAO
a jejich následnou kultivaci do stavu konfluence. Na buňky se
potom působí detergentem a NH_4OH . Vzniklý BAO, který má
růstový povrch povlečen ECM bez přítomnosti buněk, může být
poté použit k zapouzdření buněk produkujících požadovanou
biologicky aktivní molekulu.

V jiném provedení vynálezu ECM připravena obdobným
způsobem in vitro, lyofilizována, fragmentována a smíšena s
buňkami za vzniku suspenze. Buňky jsou poté spolu s fragmenty
vtalčeny do BAO.

Buňky, které rostou v přítomnosti některých molekul z
extracelulární matrix (ECM) vykazují sníženou proliferaci a
naopak zvýšenou diferenciaci ve srovnání s buňkami, které
rostou ve standardní kultuře v monovrstvách. Například
adrenokortikoidní buňky, známé produkcí některých steroidních
hormonů jako například aldosteronu, vykazují sníženou
proliferaci, jsou-li pěstovány in vitro v přítomnosti
kolagenového gelu, viz Fujiyama a další, Influence of
Extracellular Matrix on the Proliferation and the

Differentiation of Adrenocortical Cells in Culture, (Vliv extracelulární matrix na proliferaci a diferenciaci adrenokortikoidních buněk v kultuře), Path. Res. Pract. 189, strana 12051 až 12114 (1993).

Rovněž u Schwannových buněk může dojít ke snížení proliferace a zvýšení diferenciaci v přítomnosti kolagenu.

Je rovněž známo, že endokrinní buňky se diferencují v in vitro podmínkách, je-li kultivační povrch potažen kombinací kolagenu typu IV a HSPG. Kolagen typu IV je nutný k dosažení buněčné adheze a HSPG indukuje diferenciaci, viz de Bruine a další, Extracellular Matrix Components Induces Endocrine Differentiation in vitro v buňkách NCI-H716, (Komponenty extracelulární matrix idukují diferenciaci NCI-H176 in vitro, American J. of Pathology, 142, strana 773 až 782 (1993).

Za účelem dále kontrolovat růst a diferenciaci buněk mohou být ke komponentám ECM přidány různé další růstové faktory včetně výše zmíněných. Růstové faktory mohou být administrovány in vitro ještě před implantací nebo in vivo, nebo oběma způsoby, viz patenty Spojených států Amerických 5,156,844 a 5,106,627, které popisují způsoby distribuce růstových faktorů pomocí společného zapouzdření buněčného nebo nebuněčného zdroje těchto růstových faktorů. Navíc i molekuly ECM mohou být substituovány peptidy, které mohou ovlivňovat buněčný růst a to za využití známých technik.

Například transformující růstový faktor- β , který reguluje buněčný růst, a který se reversibilně váže k určitým molekulám ECM (například k dekorinu), může být přidán k ECM. Díky tomu je dosaženo vyššího inhibičního účinku extracelulární matrix na buněčný růst.

Rovněž tak heparin zabraňuje růstu jak transformovaných, tak i netransformovaných buněčných linií, viz Matuoka a další, Cell Structure and Function, 9, strana 357, (1984).

Růstový faktor bazických fibroblastů (bFGF) je rovněž znám svoji schopností podporřit buněčnou diferenciaci při společné aplikaci s komponenty ECM, viz Bruine a další, Extracellular Matrix Components Induce Endocrine Differentiation In vitro in NCI-H716 cells, (Komponenty extracelulární matrix indukují endokrinní diferenciaci in vitro u buněk NCI-H716), American Journal of Pathology, 142, strana 773 až 782, (1993).

Růstové faktory mohou mít různé účinky na buňky při jejich společné aplikaci s různými složkami ECM. Například růstový faktor fibroblastů (FGF) je účinným diferenciačním faktorem a slabým mitogenem pro chromafinní buňky kultivované na lamininu. Nicméně, je-li FGF přidán k chromafinním buňkám kultivovaným na kolagenu, je slabým diferenciačním faktorem a naopak silným mitogenem. Podobné chování bylo popsáno rovněž u analogu cAMP 8-(4-chlorfenylthio)-cAMP, viz Chu a další, Neuroscience 95, strana 43 až 45, (1994).

V tabulce 1 je uveden částečný seznam molekul extracelulární matrix, růstových faktorů a chemických látek, které ovlivňují proliferaci a diferenciaci určitých druhů buněk.

Tabulka 1: MOLEKULY ECM, RŮSTOVÉ FAKTORY A CHEMICKÉ LÁTKY OVLIVŇUJÍCÍ

PROLIFERACI A DIFERENCIACI

Buněčný typ	Induktor diferenciace/inhibitor růstu	Promotor proliferace
Schwannova b.	k. askorbová, kolagen (Vitrogen™), CultiSphers™/agaróza	TGF-β, dbcAMP
PC12	NGF, dbcAMP, SGP	Vitrogen™
Fibroblast	TGF-β-1, CultiSphers™/ agaróza, SGP, k. askorbová	
Myoblast	kolagen, k. askorbová	
Kmenová nervová b.	laminin, PepTite 2000, CultiSphers™/PepTite 2000, ester forbolu, heparin, FGF a (CNTF nebo NGF	EGF, bFGF, TGF-α, amfiregulin
Lidská embryonální rhabdomyosarkomová b. linie	Ara-C	
Lidské fetální b. pankreatických ostrůvků	nikotinamid (NIC)	
Astroblasty	dbcAMP	
Swiss 3T3	SGP	
Adrenocortikální b.	kolagen	
Endokrinní b.	kolagen typu IV + HSPG, bFGF + složky ECM	
Chromafinní b.	FGF + laminin, 8-(4-chlorfenylthio)-cAMP + laminin	FGF + kolagen, 8-(4-chlorfenylthio)-cAMP + kolagen
Kmenové hematopoietické		růstový faktor žírných b.
BHK	TGF-β-1 + k. askorbová, ECM z krysích b. E15	
Keratinocyty	TGF-β-1	
Endotheliální b.	TGF-β-1	
Neuroendokrinní (lidské karanoidní pankreatické b. (BON))	TGF-β-1	TGF-β-1 + k. askorbová, serotonin, FGF
Lidská neuroblastomová b. linie		
SCT-1	kolagen, k. askorbová	

Růstovými povrchy v bioartificiálním orgánu se rozumí povrchy lumen bioartificiálního orgánu a dále pak další

růstové povrchy, jako je například vnitřní výztuha, která může být zapouzdřena v BAO.

Rovněž mikronosiče mohou poskytovat povrch pro růst buněk. Použití mikronosičů umožňuje dosáhnout vyššího počtu zapouzdřených a rovnoměrně distribuovaných buněk v bioarteficiálním orgánu. To platí zvláště pro buňky, u kterých dochází k inhibici růstu v důsledku kontaktu se sousedními buňkami. Komerčně je dostupných několik typů mikronosičů včetně dextranových mikronosičů Cytodex (Sigma, St. Louis, MO), želatinových mikronosičů s makroskopickými póry Cultispher™ (HyClone Labs, Logan, UT) a skleněných mikronosičů. Tyto mikronosiče se často používají při kultivaci buněk, které vyžadují ukotvení na pevné fázi. Buněčné linie které rostou na želatinových mikronosičích s makroskopickými póry zahrnují OBHK, BHK-21, L-929, CHO-K1, rCHO, MDCK, V79, F9, HeLa a MBDK. Mikronosiče mohou být rovněž vytvořeny z jiných molekul extracelulární matix, nebo jímý mohou být potaženy. Příkladem takového nosiče je FACT™ potažený kolagenem (Solo Hill Labs, Ann Arbor, MI).

Ve výhodném provedení vynálezu jsou buňky produkující biologicky aktivní látku vysety na povrch mikronosiče potažený komponenty ECM. Na tomto mikronosiči jsou buňky kultivovány ještě před zapouzdřením a implantací. Dokument Cherksey WO 93/14790 se týká kultivace buněk na skleněných nebo plastických mikrokuličkách a následné implantace těchto mikrokuliček do mozku recipienta.

V jiném provedení vynálezu jsou buňky vysety na mikronosič a suspendovány v přítomnosti vhodné matrice, která inhibuje buněčný růst. Poté jsou zapouzdřeny do bioarteficiálního orgánu. Vhodnou matricí, která inhibuje buněčný růst je například agaróza nebo agar pro kultivaci fibroblastů nebo kolagen pro adrenokortikoidní buňky.

Materiál matrice fyzicky zabraňuje buňkám v dalším růstu, další hydrofiní gelové matrice viz například Dionne WO 92/19195.

V jiném provedení vynálezu může být při substituování peptidovými sekvencemi ovlivňujícími buněčnou adhezi k matrici použita agaróza místo ECM. Například agarózový hydrofilní gel může být substituován peptidovými sekvencemi lamininu nebo fibronektinu.

Při tomto způsobu jsou buňky suspendovány v trojrozměrné matrici složené z agarózy substituované peptidovými sekvencemi, které rozeznávají buněčný povrchový receptor podílející se na buněčné adhezi. Bylo prokázáno (ve dvojrozměrné matrici), že některé peptidy zesilují buněčnou adhezi, viz například Pierschbacher a další, Science 309, strana 30 až 33, (1984), Graf a další, Biochemistry 26, strana 6896 až 6900 (1987), Smallheiser a další, Dev. Brain Res. 12, strana 136 až 140, (1984), Jucker a další, J. Neurosci. Res. 28, strana 507 až 517, (1991). Substituované agarózové matrice podle vynálezu uměňují prezentaci vhodných molekulárních "úchyťů" pro buněčnou adhezi ve 3D. Výhodná koncentrace agarózy je 1,25 % w/v nebo menší, velmi výhodně okolo jednoho procenta. Výhodné jsou sekvence obsahující RGD (to jest ArgGlyAsp, AA₂-AA₄ podle Sekvence id. č. 2), sekvence obsahující YIGSR (TyrIleGlySerArg, AA₅-AA₉ podle Sekvence id. č. 1) a sekvence obsahující IKVAV (IleLysValAlaVal, AA₁₁-AA₁₅ podle Sekvence id. č. 3) a sekvence jim podobné. Substituce může být provedena za pomoci bifunkčního konjugačního činidla jako je například 1'1 karbonyldiimidazol nebo libovolným jiným vhodným způsobem.

Významnou výhodou použití agarózy místo složek ECM je, že přirozené komponenty ECM mohou být enzymaticky degradovány po určitém čase in vivo, zatímco k degradaci agarózy

nedochází snadno. Další výhodou použití agarózy je to, že jde o definovaný produkt narozdíl od materiálů jako je Matrigel®, který je odvozen od tumorové buněčné linie a proto jde o nedefinovanou směs. Bylo prokázáno, že Matrigel® obsahuje bFGF, což je účinný mitogen pro mnoho buněčných typů. Agaróza je naproti tomu jasně definovaným, termoreversibilním hydrofilním gelem tvořeným výhradně polysacharidy. Kromě fyzického omezení buněčného růstu může agaróza sama o sobě inhibovat proliferaci a indukovat diferenciaci, viz například Aulthouse, Expression of the Human Chondrocyte Phenotype In Vitro, Express fenotypy lidských chondrocytů in vitro, In Vitro Cellular and Developmental Biology 25, stran 659 až 668, (1989).

Agaróza může být dále chemicky modifikována, například pomocí PEO-PDMS, tak, aby bylo dosaženo ještě větší inhibice buněčného růstu, výhodně bez toxických účinků na buňky.

Různé buněčné typy mohou vykazovat rozdílné odpovědi na danou molekulu ECM, nebo na nebuněčnou extracelulární matrix z určitého zdroje, viz například End a Engel, Multidomain proteins of the Extracellular Matrix and Cellular Growth, Vícedoménové proteiny extracelulární matrix a buněčný růst. strana 79 až 129, v knize Receptor for Extracellular Matrix, editoři McDonald a Mecham, Academic Press, New York, (1991). Odborník dokáže snadno zjistit typ buněčné odpovědi na danou molekulu ECM, nebo na nebuněčnou extracelulární matrix z určitého zdroje za účelem stanovit efektivitu takové molekuly pro kontrolu buněčné distribuce.

Kontrola růstu pomocí modifikace růstového povrchu BAO

Vynález popisuje způsoby kontroly buněčného růstu v BAO pomocí chemické modifikace růstového povrchu tak, aby byla

umožněna kontrola počtu a umístění buněk v bioarteficiálním orgánu. Růstový povrch bioarteficiálního orgánu může být modifikován za účelem kontroly buněčné adheze k růstovému povrchu. Růstovým povrchem BAO může být luminální povrch BAO, interní membrána, mikronosič nebo vnitřní výstuha umístěná uvnitř BAO. V případě mikronosičů nebo vnitřní výstuhy mohou být buňky kultivovány na těchto strukturách in vitro ještě před svým zapouzdřením do bioarteficiálního orgánu a před implantací.

Membrána BAO může být modifikována mnoha různými známými způsoby včetně chemické modifikace a to tak, že se na povrch BAO dostanou volné karboxylové, hydroxylové nebo aminoskupiny nebo jiné reaktivní funkční skupiny, nebo může být povrch BAO modifikován adsorbci. Tyto reaktivní funkční skupiny, které nejsou přítomné v základní polymerní struktuře materiálu použitého pro přípravu BAO, mohou být použity jako výchozí místa pro další modifikaci.

V jednom provedení vynálezu je modifikován luminální povrch BAO tak, aby se zvýšila buněčná adheze k tomuto povrchu. Kontrolovaná buněčná adheze k luminálnímu povrchu je výhodná pro zvýšení hladiny přežívajících buněk. Přednostní adhezi buněk k membráně může být dosaženo rovnoměrné distribuce buněk uvnitř kapsule za použití méně buněk než je tomu u technik používajících k imobilizaci suspendování v hydrofilním gelu. Použití menšího množství buněk má za následek snížení koncentrace buněčných zbytků. Dalším pozitivním efektem je usnadněná difúze živin k buňkám, protože tyto jsou v těsném kontaktu s vnější membránou. Je-li použita modifikovaná membrána bez polymerní matrice tvořící vnitřek kapsule, lze se rovněž vyhnout komplikacím s transportem skrz gel a adsorbci proteinů nebo buněčných produktů na polymerní materiál matrice. Buněčná adheze může

být zesílena ošetřením lumenálního povrchu BAO poly-D-lysinem o různých molárních hmotnostech. Poly-D-lysin se může adsorbovat na lumenální povrch BAO při inkubaci v pufovaném roztoku pH 11. Výhodné je použití poly-D-lysinu o přibližné molární hmotnosti 67.000 g/mol.

Peptidové deriváty, například sekvence obsahující RGD (to jest ArgGlyAsp, AA₂-AA₄ podle Sekvence id. č. 2), sekvence obsahující YIGSR (TyrIleGlySerArg, AA₅-AA₉ podle Sekvence id. č. 1) včetně CDPGYIGSR (CysAspProGlyTyrIleGlySerArg, Sekvence id. č. 1) jakož i sekvence obsahující IKVAV (IleLysValAlaVal, AA₁₁-AA₁₅ podle Sekvence id. č. 3) výhodně pak CysSerArgAlaArgLysGlnAlaAla (Sekvence id. č. 3), se ukazují jako velmi vhodné pro zvýšení buněčné adheze. Například nejobvyklejší z výše uvedených peptidů sekvence RGD (ArgGlyAsp, AA₂-AA₄ podle Sekvence id. č. 2) může být chemicky navázána na membránu BAO pomocí známých způsobů. Některé molekuly obsahující sekvenci RGD (ArgGlyAsp, AA₂-AA₄ podle Sekvence id. č. 2) jsou komerčně dostupné, například PepTite™ (Telios).

V jiném provedení vynálezu je membrána BAO modifikována tak, že zabraňuje buněčné adhezi. Takovéto modifikace je dosaženo adsorbci například PEO-PDMS nebo poly-D-lysin alginátu. Výhodná je modifikace pomocí PEO-PDMS zvláště pak v případě, že růstový povrch je porézní. To je dáno tendencí PEO-PDMS difundovat póry a adsorbovat se přitom pomocí hydrofóbně-hydrofóbní interakce na povrch póru. Ve výhodném provedení vynálezu je použito nízkomolekulárního (603 až 3000 g/mol) PEO-PDMS.

Toto provedení vynálezu je výhodné zejména v případě, že jsou buňky vypěstovány na mikronosičích a poté zapouzdřeny do BAO. Tímto způsobem může být dosaženo rovnoměrné

distribuce buněk, může být kontrolován počet buněk a buněčná adheze může být omezena pouze na mikronosič.

V jiném provedení vynálezu mohou být použity jak látky podporující buněčnou adhezi tak i látky buněčné adhezi zabraňující. Například lumenální povrch BAO může být ošetřen látkou, která zabraňuje buněčné adhezi, zatímco buňkami potažené mikroskopické kuličky, nebo polymerní matrice obklopující buňky (je-li použita) mohou být naopak ošetřeny látkou zvyšující buněčnou adhezi.

V jiném provedení vynálezu může být vnitřek BAO modifikován vložením inertní nosné výztuhy ještě před vlastním přidáním buněk. Tato nosná výztuha je strukturou vhodnou pro buněčnou adhezi a rovnoměrnou distribuci buněk v rámci kapsule. Sloučeniny vhodné pro přípravu takového inertní nosné výztuhy zahrnují polyhydroxyethyl-methakrylát (PHEMA) a poly(hydroxyethyl methakrylát-ko-methyl-methakrylát) (PHEMA/MMA). Nosná výztuha může být dále modifikována různými chemickými látkami nebo proteiny, včetně výše zmíněných, za účelem kontroly růstu a diferenciaci buněk. Ve způsobu podle vynálezu je roztok vhodného materiálu precipitován v BAO za vzniku požadované nosné výztuhy.

V jiném provedení vynálezu jsou buňky kultivovány na nosiči, který bude použit jako vnitřní výztuha. Tato vnitřní výztuha může být z libovolného biokompatibilního materiálu jako je například titan nebo vhodný polymerní materiál. Tato výztuha může mít formu vzpěry nebo může rovněž sloužit jako nosná konstrukce poskytující velký povrch pro růst buněk. Příkladem vhodného materiálu pro takovou nosnou konstrukci je netkaná polyesterová tkanina (NWPF- non woven polyester fabric) (Reemay, Tennessee). Existuje mnoho druhů NWPF, které se liší v hustotě tkaniny a tloušťce rovin. Tyto techniky umožňují přesnou kontrolu počtu buněk v BAO, jakož i možnost

kvalifikovat jak buňky, tak i nosnou výztuhu ještě před vložením do BAO. Navíc může být dosaženo diferenciaci buněk kultivovaných na takovém materiálu ještě před vložením tohoto materiálu do bioarteficiálního orgánu. Tato nosná výztuha může být modifikována například peptidy ovlivňujícími buněčnou adhezi, čímž dojde k indukci buněčné diferenciaci. Navíc tento materiál zvyšuje tuhost BAO. Příprava bioarteficiálních orgánů obsahujících vnitřní výztuhu je popsána v související přihlášce SN 08/105,728.

BAO podle vynálezu mají typicky alespoň jednu vnější semipermeabilní membránu nebo obálku, která obklopuje jádro obsahující buňky. Obálka umožňuje difúzi živin, biologicky aktivních látek a jiných vybraných produktů z a do BAO. BAO je biokompatibilní a výhodně i imunoisolační. Jádro obsahuje izolované buňky buď suspendované v kapalném médiu nebo imobilizované v hydrofilní gelové matrici.

Je třeba si uvědomit, že výše popsané způsoby a kompozice určené ke kontrole distribuce buněk v BAO se navzájem nevylučují. Je výhodné použít kombinaci několika výše uvedených způsobů a kompozic k dosažení optimální kontroly buněčného růstu.

Může být například výhodné produkovat buňky, které byly geneticky upraveny genem kontrolujícím růst způsobem podle vynálezu, kultivovat tyto buňky na mikronosičích ECM a poté zapouzdřit tyto mikronosiče potažené buňkami do bioarteficiálního orgánu, jehož jeden nebo více růstových povrchů bylo modifikováno tak, aby to umožnilo kontrolu buněčné distribuce.

Vnější membrána BAO může být ze stejného materiálu, ze kterého je jádro BAO, nebo může být připravena z jiného materiálu. V obou případech je vytvořena perms selektivní

vnější nebo periferní membránová část BAO. Tato membrána může být, je-li to požadováno, imunoisolační.

Výběr materiálu použitého pro přípravu BAO je určován množstvím faktorů a je detailně popsán v Dionne WO 92/. Pro přípravu obálky kapsule mohou být použity různé polymery nebo směsi polymerů. Polymerní membrány tvořící BAO a růstové povrchy v jeho nitru mohou být tvořeny polyakryláty (včetně akrylových kopolymerů), polyvinylideny, kopolymery polyvinylchloridu, polyuretany, polystyreny, polyamidy, acetáty celulózy, nitráty celulózy, polysulfony, polyfosfazen, polyakrylonitrily (polyakrylonitril-ko- vinyl chloridem) jakož i jejich deriváty, kopolymery a směsmi.

Bioarteficiální orgány mohou být připraveny libovolným vhodným způsobem známým ze stavu techniky. Jedním takovým způsobem je společné průtlačné lisování polymer tvořícího materiálu a spolu se srážedlem, které může obsahovat fragmenty biologických tkání organely nebo buněčnou suspenzi a/nebo jiné terapeutické agens, viz Dionne WO 92/19195 a patenty Spojených států 5,158,881, 5,283,187 a 5,284,761.

Obálka BAO může být jednoplášťová (typ 1 nebo 2) nebo dvojplášťová (typ 4). Jednoplášťové duté vlákno může být připraveno rychlým srážením pouze jednoho povrchu polymeračního roztoku v průběhu jeho společného vytlačování s buněčnou suspenzí. Dvoupplášťové duté vlákno může být připraveno chlazením dvou povrchů polymeračního roztoku v průběhu jeho vytlačování. Typicky je u vláken typu 1 větší část povrchu obsazena makropóry ve srovnání s dutými vlákny typu 4. Dutá vlákna typu 2 obsahují střední množství makropórů.

Kapsule podle vynálezu mohou mít různé tvary například válcový, diskový nebo kulový.

Velikost pórů v obálce BAO určuje nominální molární hmotnost molekuly, která ještě semipermeabilní membránou může projít (nMWCO- nominal Molecular Weight Cut Off). Molekuly s větší relativní molekulovou hmotností než je hodnota nMWCO nemohou z fyzikálních důvodů membránou procházet. nMWCO je definována 90% neprostupností při konvektivních podmínkách. V případech, kdy je výhodné, aby BAO byl imunoisolační je velikost pórů v membráně vybrána tak, aby dané faktory produkované zapouzdřenými buňkami mohly difundovat ven z kapsule, ale aby zároveň nebyl možný opačný pohyb faktorů imunitní odpovědi hostitele do bioarteficiálního orgánu. Typicky je hodnota nMWCO mezi 50 až 200 kDa, výhodně pak mezi 90 až 150 kDa. Ve velmi výhodném provedení vynálezu minimalizuje rovněž složení membrány nežádoucí reakce mezi efektorovými molekulami imunitní reakce hostitele ve vybraném implantačním místě a složkami vnější membrány BAO.

Jádro bioarteficiálního orgánu podle vynálezu je vytvořeno tak, aby vytvářelo vhodné podmínky pro konkrétní, uvnitř izolované buňky. Jádro může obsahovat kapalně medium schopné zabezpečit buněčný růst. Kapalná jádra jsou vhodná pro kultivaci transformovaných buněk jako jsou například buňky PC12. V jiném provedení vynálezu může jádro obsahovat gelovou matici. Tato gelová matrice může být tvořena hydrofilním gelem (alginát, "Vitrogen" a tak dále), nebo složkami extracelulární matrix, viz Dionne WO 92/19195.

Sloučeniny, které tvoří hydrofilní gely můžeme rozdělit do tří skupin. V první skupině jsou gely nesoucí čistý negativní náboj (například alginát). Druhou skupinu tvoří gely nesoucí pozitivní náboj (například kolagen a laminin). Komerčně dostupné složky extracelulární matrix nesoucí pozitivní náboj jsou například Matrigel™ a Vitrogen™. Do třetí skupiny můžeme zařadit takové gely, které nenesou

žádný náboj (například vysoce zesítený polyethylen oxid nebo polyvinylalkohol).

K uzavření obálky BAO může být použito libovolného vhodného způsobu, včetně využití polymerních adhesiv a/nebo obrubování, zavazování nebo teplotního uzavírání. Všechny tyto způsoby jsou známy v dosavadním stavu techniky. Dále může být použito libovolného "suchého" způsobu uzavírání. V takovýchto způsobech je použit neporézní instalační bod, kterým je do bioarteficiálního orgánu vpraven roztok obsahující vybrané buňky. Po naplnění je kapsule neprodleně uzavřena. Takový způsob je popsán v současně podané patentové přihlášce Spojených států č. 08/082,407.

Před implantací BAO do hostitelského organismu je ve výhodném provedení vynálezu nejprve provedena jedna alespoň jedna zkouška funkčnosti v podmínkách in vitro. Pro tyto účely mohou být použity běžné zkoušky nebo diagnostické testy, známé z dosavadního stavu techniky (viz například *Methods in Enzymology*, editor Abelson, Academic Press, 1993). Například mohou být použity ELISA (enzyme-linked imunosorbent assay, imunosorbční enzymatická technika stanovení), chromatografická nebo enzymatická zkouška, nebo biologická zkouška specifická pro konkrétní produkt. V případě potřeby je možné sledovat sekreční funkci některého z implantátů v průběhu určité periody tím, že jsou odebírány vhodné vzorky (například serum) z těla recipienta a ty jsou poté podrobeny analýze. V případě, že recipientem je primát, může být použito mikrodialýzy.

Počet BAO a jejich velikost by měly být dostatečné k dosažení terapeutického účinku po implantaci BAO. Tato kvantita se stanovuje z množství biologické aktivity potřebné pro konkrétní aplikaci. V případě sekrečních buněk uvolňujících terapeutické substance jsou ke stanovení

požadovaného množství sekretované látky použita standardní dávkovací kritéria a předpoklady. Uvažované faktory viz Dionne WO 92/19195.

Implantace bioarteficiálních orgánů je provedena za sterilních podmínek. BAO je obecně implantován na místo, které umožní vhodnou distribuci sekretovaného produktu a transport živin k implantovaným buňkám či tkáni a dále rovněž umožní snadný přístup k BAO pro případ jeho vyjmutí a/nebo náhrady. Výhodným hostitelským organismem je primát, velmi výhodným hostitelem je pak člověk.

Místa pro implantaci podle vynálezu zahrnují centrální nervový systém, včetně mozku, míchy, komorové vody a sklivce. Výhodnými místy v mozku jsou striatum, cerebrální kortex, jádra subthalamu a bazální Meynertovo jádro. Dalším výhodným místem je mozkomíšní mok, nejlépe v subarachnoidálním prostoru a v oblastech laterálních ventrikulů. Dále vynález popisuje implantaci do subkapsulárních oblastí ledvin a dále intraperitoneálně, subkutánně nebo libovolným jiným terapeuticky užitečným způsobem.

Vynález bude podrobněji popsán v následujících příkladech, které však nelze v žádném případě považovat za omezující pro provedení vynálezu.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Kontrola růstu pomocí promotoru Mx1

Myší promotor Mx1 byl zfúzován s rannými geny viru SV40 a vzniklý chimerický gen byl použit k přípravě transgenní myši. Vzhledem k tomu, že promotor Mx1 je indukovatelný přítomností IFN α a IFN β , lze expresi onkogenu ve tkáních nebo v buněčných kulturách, připravených z transgenních zvířat,

kontrolovat. Tímto způsobem lze tedy připravit podmíněně imortalizované buňky.

Příprava transgenních myší

Byl použit konstrukt Mx1-Tag, který se skládal z přibližně 2 kb dlouhé části promotoru Mx1 (to jest z fragmentu Xba1-EcoRI) a z cDNA vytvořené podle intaktní ranné oblasti viru SV40, kódující jak velké tak i malé T antigeny, která byla k tomuto fragmentu připojena. Tento konstrukt byl fúzován proti směru transkripce s 3' nepřekládanou oblastí myšího β -globinu a poly-A signálem (BamHI-Xba1 fragment). β -globinový fragment byl vložen proto, aby poskytl místa pro sestřih a aby se zesílila exprese cDNA v transgenních zvířatech. Na obrázku 1 je znázorněna plazmidová mapa konstruktů Mx1.

Transgenní myši obsahující konstrukt Mx1-Tag byly připraveny standardní technikou jaderné mikroinjekce do oplovněného myšího vajíčka ve stadiu jediné buňky, viz Brinster a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, strana 4438 až 4442, (1985). Analýza pomocí Southernova blotu tkání myší prokázala, že intaktní kopie transgenu byly integrovány do genomu.

Pomocí PCR amplifikace, která specificky rozeznávala ranné oblasti viru SV40 bylo prokázáno, že potomstvo těchto myší je DNA pozitivní.

Podmíněně imortalizované kmenové buňky

Z embryí DNA pozitivních transgenních myší E15 byla vyjmuta striata. Striata byla umístěna do primárních (individuálních) buněčných kultur do neurosferového média obsahujícího EGF (50 ml DDH₂O, 10 ml 10xDMEM/F12, 2,0 ml 30% glukózy, 1,5 ml NaHCO₃, 0,5 ml 1M HEPES, 1,0 ml L-glutaminu,

10 ml 10x hormonové směsi (na 100 ml) a 25 ml DDH_2O na promytí filtru). Neurosféry byly připraveny způsobem podle Weisse, PCT CA 92/00283 a Reynoldse a Weisse, J. Neuroscience 12, strana 4565 až 4574, (1992). Buňky byly sedmkrát jednou týdně pasážovány a poté rozděleny do dvou skupin: s a bez exogenního interferonu (IFN). Buňky byly převedeny do kultivačních lahví T25a jejich hustota byla upravena na 500,000 buněk na 5 ml neurosferovém médiu obsahujícím EGF. K polovině buněk byl poté přidán interferon (1000 jednotek na ml). Kontrolní buňky neobdržely žádný interferon. Buňky byly inkubovány při teplotě 37°C v 5% CO_2 a byly jednou týdně pasážovány.

Po 30 pasážováních (po 23 s interferonem) byly buňky umístěny do média s obsahem séra (DMEM, 5% fetální hovězí sérum a 1x L-glutamin) s 1000 jednotkami IFN. Buněčná hustota před přidávkou IFN byla 1,25 milionu buněk na 15 ml. Čerstvý interferon byl přidáván každého druhého dne.

Po sedmi dnech bylo médium odstraněno, buňky byly promyty vyváženým solným roztokem HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) a lahve byly lehce ošřeny trypsinem. Buňky byly resuspendovány v 10 ml média se sérem, zcentrifugovány při 2 minutovou centrifugací při 1000 g a médium bylo odasáto. Buňky byly poté resuspendovány rozetřením ohněm očištěnou pipetou ve 2 ml média se sérem.

Přibližně 25,000 buněk bylo přeneseno v médiu DMEM s 5% fetálním telecím sérem na krycí sklička ošetřená poly-ornitinem. IFN byl přidáván k polovině z těchto krycích sklíček (100 jednotek na ml) každého druhého dne. Buňky byly specificky obarveny při detekci T-antigenu SV40 (Tag) a gliového fibrilárního kyselého proteinu (GFAP). GFAP je intermediární filamentární protein specificky exprimovaný

astrocyty. Detekce byla prováděna v různých intervalech podle následujícího protokolu.

Krycí sklíčka byla při pokojové teplotě na dobu 20 minut ponořena do 4% paraformaldehydu v 0,1M PBS. Poté byla dvakrát 5 minut promývána v PBS. Buňky byly permeabilizovány 100 % ethanolem (2 minuty) a poté ještě dvakrát 5 minut promývány v 0,1 M PBS. Buňky byly blokovány 5% normálním kozím sérem (NGS) rozpuštěným v 0,1 M PBS. Blokování probíhalo při pokojové teplotě po dobu alespoň 30 minut. Poté byly primární protilátky resuspendovány v 1% NGS. Tyto protilátky byly poté 2 hodiny aplikovány na krycí sklíčka při pokojové teplotě, přičemž myší protilátka anti-Tag byla ředěna 1:10 a králičí protilátka anti-GFAP byla ředěna 1:500. Po dvouhodinové inkubaci byly primární protilátky odstraněny a krycí sklíčka byla dvakrát 5 minut promyta PBS pufrem.

Sekundární protilátky byly naředěny v 1% NGS a poté byly aplikovány na 30 minut na krycí sklíčka. Inkubace probíhala v temnotě a při pokojové teplotě. Použité protilátky byly naředěny kozí-anti-myší/FITC 1:128 a kozí-anti-králičí/Texaská červěň 1:100. Poté byly sekundární protilátky odstraněny a krycí sklíčka promyta dvakrát 5 minut v PBS (ve tmě).

Krycí sklíčka byla poté fixována pomocí Citiflour™ na slidy a byla uskladněna při teplotě 4°C až do prohlížení na fluorescenčním mikroskopu vybaveném rhodaminovou a fluoresceinovou optikou.

V této sadě experimentů bylo stanoveno jak rychle dochází k poklesu koncentrace T-antigenů po ukončení přidavků interferonu. Dále byl stanovován efekt koncentrace T-antigenů na buněčnou proliferaci a diferenciaci. Diferenciace byla stanovována monitorováním koncentrací GFAP. GFAP je intermediární filamentární protein specificky exprimovaný

dospělými astrocyty. Byly pozorovány následující fluorescenční výsledky:

Den	IFN (1000 jedn./ml)		Kontrola (bez IFN)	
	<u>Tag</u>	<u>GFAP</u>	<u>Tag</u>	<u>GFAP</u>
1	+++	-	+++	-
4	+++	-	+	+/-
7	+++	-	+/-	+/-
10	+++	-	-	+

Imunobarvení Tag a GFAP ukázalo, že po určité době v médiu se sérem pokračovaly interferonem ošetřené buňky v expresi T-antigenu, pokračovaly v proliferaci a nebyly pozorovány žádné stopy exprese GFAP, zatímco u kontrolních buněk (bez interferonu) došlo k diferenciaci (nárůstu exprese GFAP) a k ukončení dělení. To bylo potvrzeno rovněž vizuální kontrolou krycích sklíček - čtvrtého dne byl jasně patrný rozdíl v počtu buněk. Desátého dne bylo buněk ošetřovaných interferonem mnohem více než kontrolních.

Exprese T-antigenu viru SV40 v tomto konstruktu je regulována v závislosti na množství přidané regulační látky. V buněčných liniích podle vynálezu bylo dosaženo nejvyšší hladiny exprese T-antogenu (imunoflourescenčně měřeno) po přídavku 500 až 1000 jednotek interferonu na ml media. Po přídavku 10 jednotek na ml média byla pozorována minimální nebo žádná exprese. Podle očekávání proliferační rychlost byla v korelaci s dávkou použitého IFN. Při přídavku 100 jednotek IFN bylo pozorováno minimální nebo téměř žádné buněčné dělení.

V dalších experimentech s touto buněčnou linií Mx1 Tag na EDF citlivých nervových kmenových buněk bylo prokázáno, že jejich proliferaci a diferenciaci lze kontrolovat. Populace těchto buněk byla přinucena k diferenciaci poté, co byla

převedena z média obsahujícího EGF do média s fetálním hovězím sérem. S přidavkem 1000 jednotek/ml α/β interferonu začaly proliferovat klastry plochých buněk podobných astrocytům a popřípadě vyplnily kultivační misky. Kontinuálně jsme tyto buňky udržovaly v médiu s IFN po 70 pasážování, přičemž perioda zdvojení buněčné populace činila 24 až 36 hodin. Při testování pomocí skupiny protilátek specifických ke gliovým a nervovým buňkám, byly tyto interferonem ošetřené buňky téměř všechny nestin a T-antigen pozitivní, slabě pozitivní na přítomnost glutamin syntetázy a negativní při zkoušce na GFAP.

Po odstranění IFN z kultivačního media rychle klesla rychlost dělení těchto plochých buněk, vytratila se imunoreaktivita s protilátkami proti T-antigenu a pozvolně rostla imunoreaktivita s protilátkami proti glutamin syntetáze a proti GFAP. Tyto buňky přežívaly několik měsíců in vitro a v pokračující absenci IFN v kultivačním médiu nebyla pozorována žádná proliferace. Je zajímavé, že jak imunoreaktivita s protilátkami proti T-antigenu tak i buněčná proliferace může být opětovně indukována přidavkem IFN. Tím byla vytvořena buněčná linie se schopností konrolované proliferace a diferenciaci.

Příklad 2: Zapouzdření a implantace buněk podle příkladu 1 do lidského hostitele

Příprava PAN/PVC vláken:

Semipermeabilní dutá vlákna byla připravena pomocí zvlákňování proudem vlhkého vzduchu (dry jet-wet spinning) (Cabasso, Hollow Fiber Membranes - Membrány dutých vláken, svazek 12, Kirk-Othmerova Encyklopedie chemické technologie, Wiley, New York, 3.vydání, strana 492 až 517, 1980, Dionne,

WO 92/19195). Asymetrická dutá vlákna byla odlévána z 12,5% roztoku kopolymeru polyakrylonitrilu a polyvinylchloridu (PAN/PVC) v dimethyl sulfoxidu (w/w). Výsledná dvouplášťová a jednoplášťová vlákna byla sbírána do vodní lázně bez rozpouštědel, glycerinována a sušena. Vlákna byla naplněna buňkami tak, aby výsledná buněčná hustota činila 25,000 buněk na μl a poté byla vlákna na konci zatavena.

Implantace do hostitelského organismu

Zapouzdřené buňky byly implantované do lidského hostitelského organismu. Implantační místa zahrnovala laterální komory a striatum mozku. Postup implantace bioarteficiálních orgánů do mozku viz Aebischer a další, WO 93/00127.

Příklad 3: Podmíněná imortalizace neonatálních astrocytů

Fragment obsahující části promotoru viru myšího prsního tumoru (MMTV) je fúzován s cDNA genů ranné oblasti viru SV40. Buňky buněčné linie E15 odvozené z neonatálních astrocytů z mozku krysy byly elektroporačně transfikovány a transformanti byli vybráni díky schopnosti proliferace. Dělicí se buňky byly izolovány, namnoženy a testovány na expresi velkého T-antigenu. Při testování byly použity protilátky proti velkému T-antigenu. Transformované buňky byly zapouzdřeny do BAO a implantovány do hostitelského organismu, viz příklad 2. BAO byly ponechány v podmínkách in vivo po dobu jednoho měsíce. Poté byly bioarteficiální orgány vyjmuty a byla porovnána distribuce buněk v BAO s kontrolou kultivovanou po stejné období in vitro

Příklad 4: Kolagenem redukována proliferace a kyselinou askorbovou indukovaná diferenciaci buněk SCT-1

Buňky SCT-1 byly klonovány z ischiatického nervového tumoru transgenní myši Po-SV40 (Messing a další, J. Neuroscience 14, strana 3533 až 3539 (1994)). Tyto buňky byly imunoreaktivní s protilátkami proti markerům Schwanových buněk S100 a Po, jakož i s protilátkami proti T-antigenu viru SV40. SCT-1 buňky byly kultivovány ve třech různých vnějších podmínkách: (1) tkáňová kultura v plastické hmotě bez kyseliny askorbové, (2) tkáňová kultura v plastické hmotě s přídavkem 50 $\mu\text{g/ml}$ kyseliny askorbové pro indukci diferenciaci, (3) suspendované v kolagenu typu 1.

Na plastickém substrátu bez kyseliny askorbové vykazovala většina buněk morfologické znaky podobné fibroblastům. Nicméně byly zde přítomny i bipolární buňky. Perioda zdvojení buněčné populace byla 18 až 20 hodin a buňky nevykazovaly žádné znaky kontaktní inhibice.

SCT-1 buňky kultivované v přítomnosti kyseliny askorbové vykazovaly pomalejší růst a silnější specifické barvení na fibronectin a kolagen typu IV. Imunoreaktivita s protilátkami proti lamininu byla podobná kontrole.

SCT-1 buňky suspendované v kolagenu typu I vyazovaly bipolární morfologii a dramaticky sníženou mitotickou aktivitu (perioda zdvojení byla větší než 30 dní).

Příklad 5: Inhibice proliferace buněk BHK pomocí kyseliny askorbové a TGF- β

Buňky ledvin mláďat křečků (BHK- baby hamster kidney) sekretující CNTF byly kultivovány na médiu DMEM s vysokým obsahem glukózy. Ošetření synchronních (confluent) kultur BHK buněk TGF- β 1 (2,5 ng/ml) a 100 μM kyselinou askorbovou

redukovalo mitózu. Navíc se zdálo, že se buňky protahují a některé se dokonce vyrovnávají vedle sebe. Tyto výsledky dokazují, že TGF- β 1 a kyselina askorbová inhibují proliferaci a indukují diferenciaci BHK buněk.

V dalších experimentech byly buňky BHK sekretující hNGF ošetřeny 2,5 ng/ml TGF- β a 100 μ M kyseliny askorbové před svým zapouzdřením do BAO a implantací. Jako kontrola posloužily neošetřené buňky. Specifické proměnné byly následující: a) TGF- β /kyselina askorbová, žádný Vitrogen™, b) TGF- β /kyselina askorbová, Vitrogen™, c) žádný TGF- β /kyselina askorbová, Vitrogen™, d) žádný TGF- β /kyselina askorbová, žádný Vitrogen™. Navíc bylo použito několik různých polymerů. Kapsule byly implantovány do striata dospělých krys. Krysy byly usmrceny po 3 měsících.

Příklad 6: Nervové kmenové buňky proliferují v přítomnosti EGF a diferencují se v jeho nepřítomnosti.

Neurosféry byly připraveny způsobem podle Weisse, PCT CA 92/00283. Neurosféry 68 byly shromážděny a rozděleny. Polovina neurosfér byla rozetřena na suspenzi jednotlivých buněk a druhá polovina byla ponechána v klastrech. U suspenze jednotlivých buněk byl stanoven počet buněk. Pro buňky v klastrech byla předpokládána stejná koncentrace. Jednotlivé buňky a buňky v klastrech byly suspendovány zvlášť ve stejných množstvích Vitrogeneru™ a média pro kultivaci neurosfér s přídavkem 20 ng/ml EGF nebo média PC-1.

Buňkami o hustotě 25,000 buněk na μ l byly naplněny jednoplášťové bioarteficiální orgány z dutých vláken PAN/PVC připravený podle příkladu 2. Poté byla dutá vlákna uzavřena. byly kultivovány buď v médiu pro kultivaci neurosfér s přídavkem EGF-1 nebo v médiu PC-1 (bez EGF-1).

BAO byly odebrány po 3 a 7 dnech a byly specificky imunocytochemicky barveny na obsah gliového fibrilárního kyselého proteinu (GFAP). GFAP je intermediární filamentární protein specificky exprimovaný astrocyty. Přítomnost GFAP dokazuje, že se nervové kmenové buňky diferenciovaly na astrocyty. Byly naměřeny následující výsledky:

	Dny	Reaktivita GFAP
jednotlivé buňky, bez EGF	3	nízké %, GFAP
jednotlivé buňky, EGF	3	negativní
shluky buněk, bez EGF	3	nízké %, GFAP
shluky buněk, EGF	3	negativní
jednotlivé buňky, bez EGF	7	intenzivní + GFAP
jednotlivé buňky, EGF	7	negativní
shluky buněk, bez EGF	7	intenzivní + GFAP
shluky buněk, EGF	7	negativní

Po 7 dni kultivace v nepřítomnosti EGF se zapouzdržené nervové kmenové buňky diferenciovaly na astrocyty .

Příklad 7: Účinek extracelulární matrix na BHK buňky

Příprava nebuněčné extracelulární matrix (ECM)

Kryší meningeální buňky E15 získané z 15 dní starých myších embryí byly vysety na vícejamkové kultivační desky a byla jim umožněna synchronizace. Po dvou týdnech byla stažena monovrstva těchto buněk, která byla přepasážována.

Nebuněčná ECM byla extrahována 30 minutovou inkubací s 0,1 % Tritonem X-100 a poté 3 minutovou inkubací 5 mM NH_4OH .

Buňky BHK-hGNF

Linie buněk BHK , které sekretují NGF, byla produkována následujícím způsobem. 2,51 kb dlouhý fragment obsahující

přibližně 37 párů bází z 3' konce prvního intronu, zdvojená ATG sekvenci považovaná za začátek translace proteinu pre-pro-NGF a kompletní kodující sekvenci a celá 3'nepřekládanou oblast lidského genu (Hoyle a další, Neuron, 10, strana 1019 až 34, 1993) byla subklonována do expresivního vektoru pNUT založeného na DHFR těsně vedle promotoru pro myši metallothionein-1 proti směru transkripce (-650 až +7) a první intron genu krysího insulinu II (Baetge a další, Proc. Natl. Acad. Sci., 83, strana 5454 až 58 (1986)).

Buňky z ledvin mláďat křečků (BHK buňky) byly transfikovány konstruktem pNUT- β -NGF za použití kalcium-fosfátové metody. BHK buňky rostly v DMEM obsahujícím 10% fetální hovězí sérum, 1x penicilin/ streptomycin/ ampicilin B (0.8 g/l) a L-glutamin (GIBCO), v 5% oxidu uhličitém a 37°C. Transfikované BHK buňky byly selektovány v mediu obsahujícím 200 μ M methotrexát (Sigma) po dobu 3 až 4 týdnů a rezistentní buňky byly dále udržovány jako polyklonální populace v mediu buď s nebo bez 200 μ M methotrexátu.

Transformované BHK-hNGF buňky byly při hustotě $1,0 \times 10^4$ buněk/jamka vysety na desky s obsahem ECM extrahované z meningeálních buněk. BHK-hNGF o stejné hustotě byly vysety také na kontrolní desky bez ECM. Buňky byly spočítány hematocytometrem po 6 DIV.

Průměrné počty buněk v kontrolních jamkách byly $4,5 \times 10^6 \pm 4,5 \times 10^5$. Průměrné počty buněk na deskách s extrahovanou ECM činily $9,9 \times 10^5 \pm 4,9 \times 10^5$. Z těchto výsledků je patrné 4,5-násobné snížení buněčného růstu u ošetřených buněk.

Příklad 8: Adheze buněk a bezbuněčné extracelulární matrix na vnitřní výztuže

V dalších experimentech byly nejprve vyšetřeny primární meningeální buňky na polyuretanová vlákna TECO™. Tato vlákna se používají jako vnitřní výztuha bioarteficiálního orgánu podle vynálezu. Jako kultivační médium bylo použito médium DMEM obohacené 10 % FBS. Po dvou týdnech byla vlákna 30 minut extrahována 0,1% Tritonem X-100 a poté 3 minuty 25mM NH₄OH. Některá vlákna byla imunologicky obarvena pomocí protilátky proti fibronektinu, aby se potvrdila přítomnost nebuněčné ECM na povrchu vláken. Jiná vlákna byla použita na testování buněčné adheze s buňkami BHK.

Příklad 9: Kultivace buněk BHK na mikronosičích zapouzdřených do BAO a modifikovaných pomocí PEO-PDMS

Příprava bioarteficiálních orgánů substituovaných PEO-PDMS

Jednoplášťové BAO z dutých vláken PAN/PVC byly připraveny podle příkladu 2. Tyto BAO měly vnitřní průměr $642,6 \pm 36,7 \mu\text{m}$ a vnější průměr $787,8 \pm 32,2 \mu\text{m}$, přičemž tloušťka stěny činila $67,8 \pm 16,2 \mu\text{m}$, koeficient neprostupnosti BSA byl 100 % a hydraulická permeabilita byla přibližně $21,8 \text{ ml/min/m}^2/\text{mmHg}$.

Tyto PAN/PVC bioarteficiální orgány byly substituovány PEO-PDMS za sterilních podmínek. 1% nebo 5% (v/v) roztok PEO-PDMS (Huls, PS073, mol.hm. = 3126 g/mol, 82 hm. % PEO) byl připraven rozpuštěním 1 nebo 5 ml PEO-PDMS v deionizované vodě tak, aby celkový objem byl 100 ml. Roztok byl sterilně přefiltrován (póry $0,2 \mu\text{m}$) a poté byl injikován do vlhké PAN/PVC membrány. Mebrána byla zatavena a ponořena do vodného

roztoku. Vlákná byla propláchnuta vyváženým solným roztokem HBSS po 72 hodinách a před použitím s buňkami.

NGF sekretující BHK buňky podle příkladu 7 byly injikovány do těchto vláken substituovaných PEO-PDMS podle následujícího postupu.

Postup plnění a uzavírání vláken

Suspenze jednotlivých buněk BHK produkujících NGF, které rostly s 90% synchronizací, byly vypláchnuty PBS (bez vápníku a hořčíku), štěpeny trypsinem po dobu přibližně 1 minuty a peletovány centrifugací při 1000 otáčkách za minutu po dobu 3 minut. Buňky byly resuspendovány v mediu na konečnou koncentraci 2×10^7 buněk/ml.

Buňky byly buď přímo injikovány do vláken substituovaných PEO-PDMS nebo byly smíšeny s 0,15% matričním roztokem Vitrogenu® nebo s 0,5% roztokem agarózy a poté injikovány.

Vlákná pak byla plněna 2.5 μ l bunčného roztoku nebo koagulační matriční hmoty obsahující buňky a matici (10,000 buněk/ μ l) za použití zešikmené špičky katetru a Hamiltonovy stříkačky.

Kapsule byly uzavírány upevněním 1 až 1.1 cm dlouhého úseku suchého dutého vlákna na dutý hřídel s příčně uzavřeným proximálním koncem. Z hřídele bylo možné injikování buněk do nitra zařízení. Poté, co byla vlákna naplněna 2.5 μ l buněčné suspenze, septum bylo odlomeno a přístupový otvor uzavřen pomocí světlem polymerujícího akrylátu (Luxtrak™ LCM 24, ICI Resins US, Wilmington, MA). Následně byly kapsule opatřeny manipulačním očkem. Na každou kapsuli byla připevněna 1.5 cm dlouhá silikonové trubice (hadička) o průměru 0.020" na akrylátové hrdlo.

Následující bioarteficiální orgány byly připraveny tímto způsobem:

1. kontrola s nemodifikovanou obálkou, bez matrice
2. kontrola s nemodifikovanou obálkou, Vitrogen™
3. kontrola s nemodifikovanou obálkou, agaróza
4. obálka modifikována 1% PEO-PDMS, bez matrice
5. obálka modifikována 1% PEO-PDMS, Vitrogen™
6. obálka modifikována 1% PEO-PDMS, agaróza
7. obálka modifikována 5% PEO-PDMS, bez matrice
8. obálka modifikována 5% PEO-PDMS, Vitrogen™
9. obálka modifikována 5% PEO-PDMS, agaróza

BAO byly aklimatizovány po dobu čtyř dnů po zapouzdření za atmosférického tlaku kyslíku, a poté po dobu trvání experimentu za nízkého tlaku kyslíku (6650 Pa). Obrázek 2 ukazuje sekreci NGF (měřeno ELISOU) po 4, 11 a 25 dnech.

Údaje o uvolňování NGF dokazují, že samotná matrix má velmi malý efekt na buněčnou produkci. Nicméně v přítomnosti PEO-PDMS je produkce NGF podstatně nižší při použití agarózy a bez matrix, ale zůstává nezměněna při použití Vitrogenu™. Percentuální množství PEO-PDMS použité pro modifikaci také zřejmě nemá výrazný vliv na produkci NGF. Z histologických dat vyplývá, že BHK buňky zapouzdřené do agarózy mají protáhlou morfolologii a pokrývají stěny zařízení (vlákna), zatímco ve vlastní agaróze žije jen velmi málo buněk. BHK buňky injikované společně s agarózou do dutých vláken modifikovaných PEO-PDMS rovněž pokrývaly stěny vlákna, ale vykazovaly kulovou morfolologii. V PAN/PVC vláknech modifikovaných PEO-PDMS bylo méně buněk než v nemodifikovaných vláknech plněných agarózou, což dokazuje, že buněčný růst byl kontrolován. Buňky ve vláknech naplněných Vitrogenem™ a ve vláknech naplněných pouze buněčnou suspenzí bez matrice nebyly nijak ovlivněny modifikací vlákna.

BHK buňky v nemodifikovaných vláknech s matricí tvořenou Vitrogenem[™] byly rovnoměrně distribuovány a frakce živých buněk činila 75 %. Bylo možno pozorovat nekrotické buňky v centrální části vlákna. Modifikace pomocí PEO-PDMS neovlivnila buněčnou distribuci, životaschopnost nebo morfologii. Při použití agarózy jakožto matrice byla buněčná distribuce vynikající, přičemž životaschopnost buněk byla přibližně 90%. Buněčná morfologie BHK buněk byla při použití agarózy jakožto matrice ovlivněna modifikací membrány pomocí 1% a 5% PEO-PDMS. Buňky byly protažené při použití nemodifikovaných PAN/PVC vláken a více zakulacené při použití modifikovaných vláken. Buňky se nenacházely uvnitř agarózy matrice, ale v prostoru mezi stěnou vlákna a agarózovým jádrem. Bez použití matrice byla buněčná distribuce méně uspokojivá, a buňky vytvářely velké klastry rovněž i životaschopnost buněk byla nižší (okolo 60 %).

Příklad 10: Buňky BHK kultivované na kuličkách Cultisphers[™]

NGF- sekretující BHK buňky (viz příklad 7) byly kultivovány na kolagenem potažených kuličkách Cultisphers[™]. Kuličky Cultisphers[™] (1g) byly rehydratovány v 50 ml PBS (CMF). 15×10^6 buněk bylo suspendováno v 1 ml rehydratovaných kuliček Cultisphers[™]. Tato suspenze byla přímo injikována do jadnoplášťových dutých vláken PAN/PVC. Vlákná byla připravena postupem popsaným v příkladu 2 a naplněna a zatavena tak, jak bylo popsáno v příkladu 9. Zapouzdržené buňky byly testovány na sekreci NGF pomocí ELISA testu, a to ve dnech 2, 15 a 56. Médium bylo doplňováno třikrát týdně. Na obrázku 3 jsou znázorněny výsledky. Z výsledné produkce NGF je patrné, že BHK buňky mohou být kultivovány na mikronosičích Cultisphers[™] po zapouzdržení do BAO. (legenda k obrázku 3: A, D). Dále tyto údaje dokazují, že BHK buňky/Cultisphers[™] mohou být dále

suspendovány v agarózové matrici při malém nebo žádném dopadu na sekreci NGF (legenda k obrázku 3: B, C).

Příklad 11: Použití peptidových derivátů pro kontrolu buněčných populací a buněčné distribuce.

V tomto příkladě byl luminální povrch bioarteficiálního orgánu modifikován PEO-PDMS, poly-D-lysinem nebo PepTite 2000™ což je komerčně dostupný protein zvyšující buněčnou adhezi.

V této sadě experimentů byly použity buňky ledvin mláďat křečků (BHK- baby hamster kidney) proto, že jsou závislé na ukotvení na pevné fázi a proto, že bylo již předem prokázáno, že se vážou na membránu dutých vláken.

Vlákna

Jednoplášťové BAO z dutých vláken PAN/PVC byly připraveny podle příkladu 2. Tyto BAO měly vnitřní průměr 625 μm a tloušťka stěny činila 50 μm . Tato vlákna byla sterilizována ponořením do 70 % ethenolu přes noc a poté byla opakovaně propláchnuta pufrem HBSS.

Modifikace

1. PEO-PDMS: bioarteficiální orgány byly modifikovány PEO-PDMS následujícím způsobem: 1% (v/v) roztok PEO-PDMS (Huls, PS073, mol.hm. = 3126 g/mol, 82 hm. % PEO) byl připraven rozpuštěním 1 PEO-PDMS v deionizované vodě tak, aby celkový objem byl 100 ml. Roztok byl sterilně přefiltrován (póry 0,2 μm) a poté byl injikován do sterilní PAN/PVC membrány. Membrána byla poté na 24 hodin ponořena do 1% vodného roztoku PEO-PDMS při pokojové teplotě. Vlákna

byla třikrát propláchnuta vodou a poté vyváženým solným roztokem HBSS před použitím s buňkami.

2. PDL: bioarteficiální orgány byly modifikovány poly-D-lysinem následujícím způsobem: vlákna byla ponořena do vodného roztoku poly-D-lysinu (mol. hm.=67,000) o koncentraci 2 mg/ml na 24 hodin při pokojové teplotě. Vlákna byla třikrát propláchnuta vodou a poté třikrát vyváženým solným roztokem HBSS před použitím s buňkami.

3. PepTite2000™: bioarteficiální orgány byly modifikovány pomocí PepTite2000™ následujícím způsobem: vlákna byla ponořena do roztoku PBS obsahujícího PepTite2000™ o koncentraci 100 mg/ml. PepTite2000™ je nutno nejprve rozpustit v ethanolu. Vlákna byla v tomto roztoku ponořena 24 hodin při pokojové teplotě a poté byla třikrát propláchnuta PBS před injekcí buněk.

4, PAN/PVC: Kontrolní vlákna byla ponořena do vyváženého solného roztoku HBSS na 24 hodin při pokojové teplotě a poté byla třikrát propláchnuta PBS před injekcí buněk.

Buňky

BHK buňky o koncentraci 5000 buněk/ μ l byly injikovány do modifikovaných dutých vláken. Vlákna byla zatavena a umístěna do zkumavek se šroubovacím závěrem. V těchto zkumavkách byla vlákna inkubována v bezsérovém médiu (médiu PC1) na otočném bubnu po dobu dvou týdnů. Inkubační teplota byla 37°C, rychlost otáčení bubnu byla 2 otáčky za minutu. Ve vhodný okamžik byla vlákna fixována 4% formaldehydem, dehydratována v absolutním ethanolu a obarvena hematoxylinem a eosinem (H&E) pro účelu histologické analýzy buněčné distribuce, která byla provedena oxidem osmičelým.

PAN/PVC membrány modifikované poly-D-lysinem vykazovaly dobrou distribuci buněk a ještě rovnoměrnější distribuci vykazovala vlákna modifikovaná PepTite2000™.

Modifikace PAN/PVC vláken pomocí PepTite2000™ byla provedena dvěma způsoby. Při prvním způsobu modifikace byl modifikován pouze vnitřní lumenální povrch, zatímco při druhém způsobu modifikace byl modifikován jak vnitřní tak i vnější povrch membrány. Prázdné BAO (bez buněk) byly testovány na celkový obsah aminokyselin, aby se zjistila schopnost vazby poly-D-lysinu a PepTite2000™ na membránu. Celkové množství aminokyselin navázaných na kontrolní nemodifikovaná vlákna činilo přibližně 0,2 µg na jeden bioarteficiální orgán. Celkové množství aminokyselin navázaných na vlákna modifikovaná poly-D-lysinem činilo přibližně 0,8 µg na jeden bioarteficiální orgán s vnitřním modifikovaným povrchem a přibližně 2,6 µg/BAO pro oboustranně modifikované membrány. Podobné bioarteficiální orgány byly naplněny BHK buňkami a kultivovány 14 dní. Poté byly zkoumány histologicky. U kontrolních, nemodifikovaných BAO byly buňky distribuovány nerovnoměrně ve velkých klastrech po celé délce vlákna. Naproti tomu oba typy modifikovaných vláken vykazovala rovnoměrnou buněčnou distribuci podél vnitřního povrch membrány.

Z těchto výsledků vyplývá, že poly-D-lysin a PepTite2000™ jsou účinnými látkami pro zvýšení buněčné adheze k lumenálnímu povrchu a jsou proto efektivní pro kontrolu buněčné distribuce v BAO.

Příklad 12: Použití molekul ECM ke kontrole růstu neurosfér

Myší neurosféry pasáže 71 byly přiřaveny tak, jak je popsáno v příkladu 1. Vícejamkové desky byly předem potaženy

05% agarózou (Sea-Prep™), aby se zabránilo přilepení neurosfér na plastický povrch desky. Buňky byly nanášeny při hustotě přibližně 50,000 buněk na jamku do jednotlivých matric podle experimentu. Pro každé složení matrice byly použity 3 jamky, dvě z jamek obsahovaly médium PC-1 (kontrolní) a jedna obsahovala neurosféry s médiem EGF.

Hodnocena byla efektivita kontroly buněčného růstu u kolagenu typu 1 odvozeného z pokožky (Zydast™, Collagen Biomedical, Palo Alto), kolagenu typu 1 ze šlach (Organogenesis™), kolagenu typu 1 (Vitrogen™, Celtrix, Santa Clara) a agarózy. Každá z látek byla testována sama o sobě nebo v kombinaci s lamininem nebo s PepTite2000™ nebo s oběma.

Čtrvrtého a čtrnáctého dne byly buňky barveny fluorescein diacetátem/propidium iodidem (FDA/PI) a byla vyhodnocena jejich životaschopnost, růst a diferenciace. Buňky kultivované na kolagenu Organogenesis™, PepTite200™, a lamininu vykazovaly nejvyšší diferenciaci, přičemž asi 90 % buněk bylo diferenciovaných. Asi 80 % buněk kultivovaných na kombinaci agarózy, Peptite2000™ a lamininu bylo diferenciovaných.

Příklad 13: Použití inertní vnitřní výztuhy ke kontrole množství BHK buněk a jejich distribuce v BAO

Byla použita dutá vlákna dvou různých typu (viz příklad 2) : jednoplášťová dutá vlákna s permselektivní membránou na vnějším povrchu a jednoplášťová dutá vlákna s permselektivní membránou na vnitřním povrchu.

Nejprve byla PAN/PVC vlákna zbavena glycerinu a sterilizována ponořením do 70% sterilně přefiltrovaného

roztoku (inkubace přes noc). Poté byla v průběhu 1 až 2 hodin vlákna třikrát promyta sterilní vodou.

Matrix vnitřní výztuhy tvořená 15% polyhydroxyethyl-methakrylátem (PHEMA) byla připravena rozpuštěním 1,5 g PHEMA v 10 ml 95% ethanolu (Quantum). Dále byla připravena matrix vnitřní výztuhy tvořená 10% poly(hydroxyethyl-methakrylátem-ko-methyl-methakrylátem) (PHEMA/MMA) rozpištěním 1,0 g PHEMA/MMA v 10 ml 95% ethanolu. Pro snadné rozpuštění polymerů byly roztoky míchány a zahřívány.

Roztoky PHEMA a PHEMA/MMA byly pomocí stříkačky injikovány do PAN/PVC vláken, která byla poté ponořena do sterilní vody. Naplněná vlákna byla ve vodě ponechána déle než jednu hodinu, aby se zajistila precipitace vnitřní výztuhy a difúze ethanolu ven z jádra BAO. Konce vláken byly ustřiženy, protože jsou často znečištěny PHEMA nebo PHEMA/MMA. Vlákna byla poté přenesena na Petriho misky se sterilním pufrem HBSS. Tímto způsobem byly připraveny bioarteficiální orgány s vnitřní výztuhou tvořenou PHEMA, PHEMA/MMA a kontrolní.

NGF sekretující BHK buňky (viz příklad 7) byly kultivovány v 10% DMEM médiu s přidavkem glutaminu a antibiotik. Buňky byly z kultivačních nádob jemně vyjmuty pomocí 0,25% trypsinu, promyty a resuspendovány v médiu PC1 tak, aby výsledná buněčná hustota činila 1×10^7 buněk/ml.

Poté byly BHK-NGF buňky injikovány do dutých vláken při koncentraci 10,000 buněk/ μ l za pomoci teflonového katetru velikosti 22. BAO byly poté zataveny.

Bylo připraveno 5 bioarteficiálních orgánů každého typu. Čtyři byly umístěny do jamek na 24-jamkové kultivační desce s 1 ml média PC1. Pátý byl uložen do 3 až 4 ml média PC1 do vertikální zkumavky. Po 24 hodinách byl

bioarteficiální orgán umístěný ve vertikální zkumavce podélně rozříznut a po 24 hodinách analyzován barvením fluorescein diacetátem/propidium iodidem (FDA/PI). Tímto barvením byla stanovena buněčná distribuce uvnitř vlákna. Při prohlížení pod fluorescenčním mikroskopem barví FDA živé buňky zeleně, zatímco PI barví mrtvé buňky červeně.

Zbývající BAO byly kultivovány po dobu dvou týdnů. Čtyři dny po zapouzdrění byly bioarteficiální orgány kultivovány za vnějšího tlaku kyslíku, a poté jim byl tlak kyslíku snížen na 6650 Pa po dobu trvání studie.

Funkčnost buněk BHK-NGF byla testována měřením sekretovaného NGF pomocí ELISA testu po 4, 7 a 14 dnech. Buňky v BAO obsahujících vnitřní výztuhu PHEMA nebo PHEMA/MMA pokračovaly v sekreci NGF po celou dobu trvání studie. Jak histologické údaje tak i data získaná ze sekrece NGF ukazují, že vnitřní výztuha tvořená PHEMA nebo PHEMA/MMA umožňuje udržení funkčních živých buněk s rovnoměrnou distribucí po celé délce BAO. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s 10% PHEMA/MMA vnitřní výztuhou.

Příklad 14: Použití inertní vnitřní výztuhy ke kontrole množství buněk PC12 a jejich distribuce v BAO

Byla vyhodnocena efektivita vnitřních výztuh tvořených PHEMA nebo PHEMA/MMA pro kontrolu množství a distribuce buněk PC12 v bioarteficiálním orgánu.

Jenoplášťová dutá vlákna byla připravena podle příkladu 2. Tato vlákna měla vnitřní průměr 642 μm a vnější průměr 787 μm , přičemž tloušťka stěny činila 68 μm , koeficient nepropustnosti BSA byl 100 % a hydraulická permeabilita byla přibližně 22 ml/min/m²/mmHg.

Do těchto vláken byly injikovány inertní vnitřní výztuhy z PHEMA nebo PHEMA/MMA (viz příklad 13).

Buňky PC-12 (1×10^7 buněk/ml) v médiu HL-1 byly injikovány do nitra těchto vláken. Vláknina byla poté zatavena, vzniklé BAO byly asi 1 cm dlouhé. Bioarteficiální orgány byly kultivovány při teplotě 37°C a atmosférickém tlaku v médiu HL-1. Funkčnost BAO byla testována stanovením bazálních a draselnými ionty indukovaných koncentrací sekrečních katecholaminů po 1, 14 a 28 dnech.

Výsledky ukazují obrázky 4A a 5A (bazální sekrece) a 4B a 5B (sekrece indukovaná K^+). Tyto výsledky dokazují, že buňky PC12 zapouzdřené do bioarteficiálních orgánů s inertní vnitřní výztuhou z PHEMA nebo PHEMA/MMA si zachovávají svoji funkčnost.

Buněčná distribuce byla vyhodnocena po 5 hodinách a po 4 dnech. Vláknina byla vertikálně rozříznuta a buňky byly obarveny FDA/PI. Z výsledků vyplývá, že vnitřní výztuhy z PHEMA nebo PHEMA/MMA jsou netoxické a podporují životaschopnost a funkčnost buněk PC12.

Příklad 15: Použití NWPF k zesílení buněčné adheze a diferenciaci v BAO

Bylo vyzkoušeno šest různých druhů NWPF (Reemay, Tennessee): #2470, #2295, #2024, #2055, #2033, #2250, (čísla viz Reemay). Tkanina byla dodána ve formě listů, ze kterých byly vyraženy kotouče tak, aby se vešly do jamky v 24-jamkových deskách. Tyto NWPF disky byly na 6 hodin ponořeny do 1% (w/v) dodecylsulfátu sodného (SDS) a poté třikrát propláchnuty vodou. Poté byly disky na 13 hodin ponořeny do 1% kyseliny sírové (v/v vodný roztok) a poté opět

tříkrát promyty vodou. Disky byly poté vysušeny na papírových filtrech a sterilizovány autoklávem.

Poté byly disky inkubovány s buňkami tří různých druhů, přičemž se stanovovala buněčná adheze: BHK, AT-3 a TSA buněk. Bylo přidáno přibližně 100,000 buněk na 24 jamkovou desku obsahující jeden z 6 druhů NWPF spolu s médiem PC1. Bezserové médium byly použito, aby se dala stanovit adheze buněk a zabránilo se přitom klamných interferencím se sérem (s výjimkou buněk TSA). Po 4 dnech byly buňky BHK a AT-3 testovány na adhezi pomocí PDA/PI. Morfologie buněk byla protáhlá a zdálo se, že adherují Reemay NWPF #2250 a #2055. Po deseti dnech rostly buňky BHK nejlépe na NWPF #2250. Buňky AT-3 nejlépe adherovaly k #2024 a #2295. Buňky AT-3 rostly nejlépe po 10 dnech na vláknech #2024. Buňky TSA (v médiu s 10% FCS) měly po 1 dni protáhlou morfologii na vláknech #2250 a #2055 a nejlépe rostly na vláknech #2024. Po sedmi dnech rostly tyto buňky nejlépe na #2055.

Příklad 16: Transgenní buňky SV40/D β H-NGF na mikronosičích suspendovaných matričním materiálu

Regulační elementy genu pro dopamin- β -hydroxylázu (D β H) (Hoyle a další, J.Neurosci. 14, strana 2455 až 2563, (1994) byly použity pro kontrolu společné exprese T-antigenu viru SV40 (tsa58) (D β H-SV) a lidského růstového faktoru (D β H-hNGF) v transgeních myších. Výsledkem společné exprese chimerických genů byly novotvary v adrenální medule a noradrenergických sympatetických gangliích. Nádory z břišní oblasti jedné z myší byly rozkrájeny a nádorová tkáň byla mechanicky disociována a převedena do buněčné kultury (DMEM, 10% FBS, 37°C, 5% CO₂). Od začátku kultivace byly přítomny dva různé typy buněk. Jedním druhem buněk byly velké ploché buňky podobné fibroblastům a druhým typem byly malé jasné

buňky s nervovými výběžky. Malé buňky vykazovaly znaky katecholaminergních neuronů včetně imunoreaktivity s protilátkami proti neurofilamentům-L a -M a tyrosin hydroxyláze. Tyto buňky rovněž reagovaly s protilátkami proti T-antigenu viru SV40, narozdíl od buněk podobných fibroblastům, které byly na tyto markery negativní. Buňky byly jednou týdně pasážovány.

Buňky byly kultivovány na mikronosičích Cultispheres™, viz příklad 10. Buňky byly suspendovány buď v alginátové (1,5%) nebo agarózové (1%) matrici. Alginátová matrice byla zesíťována ponořením vláken do 1% roztoku chloridu vápenatého na dobu 5 minut po zapouzdrění. Matrice obsahující buňky a nosič Cultispheres™ byla injikována do PAN/PVC dutých vláken, viz příklad 10.

BAO naplněné buňkami byly kultivovány v bezsérovém médiu. Ve vybraných intervalech byla vlákna promyta vodou a poté 30 minut inkubována v pufru HBSS. Bazální médium bylo shromážděno a testováno pomocí HPLC-ED na přítomnost L-dopa. Ještě po 80 dnech in vitro pokračovaly buňky v sekreci L-dopa.

Příklad 17: Geneticky modifikované myoblasty sekretují po diferenciaci NGF

Myší C₂C₁₂ myoblasty jsou výhodné tím, že se rychle dělí, mohou být in vitro pěstovány ve velkém objemu, transformovány na expresi proteinů a vybrané klony lze snadno izolovat. Myší buňky C₂C₁₂ mohou být diferencovány do post-mitotického stavu kultivací v médiu s nízkým obsahem séra. Tyto jsou proto výhodné pro zapouzdrění ve srovnání s buňkami, jejichž proliferaci nelze kontrolovat. Takové buňky

pokračují v dělení dokud nanaplní kapsuli a po několika měsících lze pozorovat akumulaci buněčných zbytků.

Byla testována schopnost transfikované buněčné linie C_2C_{12} podobné myoblastům pokračovat v sekreci hNGF i po fúzi do myotubů.

C_2C_{12} myoblastová buněčná linie (ATCC) byla transfikována genem pro hNGF pomocí Lipofektaminového reagens podle protokolu výrobce (Gibco). Buňky byly selektovány na selekčním médiu s přídavkem G148 po dobu 2 týdnů a poté byly testovány na sekreci NGF. Buňky o hustotě 260 buněk na cm^2 byly umístěny do kultivačních nádob T75 a na 24 jamkové desky s nebo bez krycích víček. Buňky byly dvakrát týdně přikrmovány přídavkem média DMEM s 10% FBS. Buňky byly odebrány 1., 5., 8. a 13-tého dne a byla změřena sekrece NGF. Výsledky viz tabulka 2.

Z výsledků vyplývá, že transfikované myoblasty pokračují v sekreci požadovaného heterologního produktu (NGF) ještě i po konené diferenciaci do myotubulů.

Tabulka 2: časový průběh selekce buněk C_2C_{12} na sekreci NGF

sekrece b. linie	kultivační doba	% konfluence	% fúze	NGF
rodič. b linie	den 1 23.3.95	25	0	nezk.
+NGF	den 1 23.3.95	25	0	nezk.
rodič. b linie	den 5	40	0	nezk.
+NGF	den 5	30	0	nezk.
rodič. b linie	den 8	98	5	***
+NGF	den 8	90	1	0,0018
rodič. b linie	den 13	1000	80	nedekovatelný
+NGF	den 13	100	50	0,014

% fúze = % myoblastů přeměňivších se na myotubuly

+NGF - znamená buňky C_2C_{12} transformované genem hNGF

rodič. b linie - znamená netransformovanou b. linii

nezk. - znamená nezkoušeno

nedetekovatelný znamená, že koncentrace byla pod prahem detekce

*** osmého dne buňky narostly do velikosti, příprava na fúzi, více fúzujících buněk na miskách než v T nádobkách (průtoková cytometrie prováděna s nádobkami)

Příklad 18: Geneticky upravené myoblasty sekretují CNTF po své diferenciaci

Myší myoblasty C_2C_{12} byly transfikovány expresivním vektorem pNUT (Baetge a další, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, strana 5454 až 5458, (1986), který obsahoval gen pro lidský CNTF. Úroveň exprese genu hCNTF a bioaktivita tohoto produktu byla analyzována Northern blotem, ELISOU a ChAT aktivitou na embryonických míchách kultur motorických neuronů. Byl nalezen jeden klon C_2C_{12} sekretující přibližně 0,2 g CNTF/ 10 buněk/den. Rychlost sekrece hCNTF se po diferenciaci těchto myoblastů C_2C_{12} nezměnila. Buňky C_2C_{12} -hCNTF dokázaly odvrátit motorické neurony od axotomií indukované buněčné smrti. Morfologické studie faciálních jader novorozených myší po 1 týdenní axotomii prokázaly, že u kontrolních zvířat přežilo pouze 13,4 % faciálních motorických neuronů, zatímco

kontinuální produkce hCNTF měla za následek 22,7 % přežití motorických neuronů.

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 9 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: petid

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) ANTI-SENSE: NE

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 1:

Cys Asp Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg

1

5

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 6 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: petid

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) ANTI-SENSE: NE

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 2:

Gly Arg Gly Asp Ser Pro

1

5

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 19 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: petid

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) ANTI-SENSE: NE

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 3:

Cys	Ser	Arg	Ala	Arg	Lys	Gln	Ala	Ala	Ser	Ile	Lys	Val	Ala
1				5					10				
Val	Ser	Ala	Asp	Arg									
15													

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 5 aminokyselin
- (B) TYP: aminokyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: petid

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) ANTI-SENSE: NE

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 4:

Gly Gly Gly Gly Gly

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Způsob kontroly distribuce buněk v bioartificiálním orgánu v y z n a č u j í c í s e t í m , že buňky jsou ošetřeny takovým způsobem, který inhibuje buněčnou proliferaci a podporuje buněčnou diferenciaci, přičemž toto ošetření je účinné po in vivo implantaci do hostitelského organismu.
2. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že ošetření zahrnuje transformaci buněk genem podporujícím proliferaci, který je funkčně spojen s regulovatelným promotorem tak, že exprese genu podporujícího proliferaci může být inhibována po implantaci do hostitelského organismu in vivo.
3. Způsob podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m , že gen podporující proliferaci je onkogen.
4. Způsob podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m , že onkogen je vybrán ze skupiny tvořené onkogeny c-myc, v-mos, v-Ha-ras, rannými geny viru SV40 a El-A.
5. Způsob podle nároku 2 v y z n a č u j í c í s e t í m , že regulovatelný promotor~~je~~ je vybrán ze skupiny tvořené promotory regulovatelnými tetracyklinem, interferony, glukokortikoidy a promotory, které jsou regulovány dlouhou terminální repeticí retrovirů.
6. Způsob podle nároku 5 v y z n a č u j í c í s e t í m , že promotorem je promotor Mx1 a gen podporující proliferaci je ranný gen viru SV40.

7. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že ošetření zahrnuje transformaci buněk genem potlačujícím proliferaci, který je funkčně spojen s regulovatelným promotorem tak, že může dojít k expresi genu potlačujícího proliferaci po implantaci do hostitelského organismu in vivo, ale přitom může být tato exprese v podmínkách in vitro inhibována.
8. Způsob podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m , že genem potlačujícím proliferaci je tumor-supresivní gen vybraný ze skupiny tvořené geny p53 a RB.
9. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že ošetření zahrnuje transformaci buněk genem indukujícím diferenciaci, který je funkčně spojen s regulovatelným promotorem tak, že může dojít k expresi genu indukujícího diferenciaci po implantaci do hostitelského organismu in vivo, ale přitom může být tato exprese v podmínkách in vitro inhibována.
10. Způsob podle nároku 9 v y z n a č u j í c í s e t í m , že genem indukujícím proliferaci je gen HMG proteinu 14.
11. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že ošetření zahrnuje vystavení buněk působení sloučeniny, která inhibuje proliferaci nebo indukuje diferenciaci.
12. Způsob podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m , že sloučenina inhibující proliferaci je nebo indukující diferenciaci je vybrána ze skupiny tvořené esterem forbolu, heparinem, TGF-b, kyselinou askorbovou,

mitomycinem, BrdU, PGE₁, dbcAMP, Ara-C, nikotinamidem a SGP.

13. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že ošetření zahrnuje ukončení expozice buněk proliferaci indukujícím sloučeninám nebo sloučeninám inhibujícím diferenciaci.
14. Způsob podle nároku 13 v y z n a č u j í c í s e t í m , že proliferaci stimulující sloučeninou nebo diferenciaci inhibující sloučeninou je látka vybraná ze skupiny tvořené EGF, TGF- α a amfiregulinem, přičemž buňkami jsou kmenové nervové buňky.
15. Způsob podle nároku 13 v y z n a č u j í c í s e t í m , že proliferaci stimulující sloučeninou nebo diferenciaci inhibující sloučeninou je směs látek z rodiny FGF růstových faktorů a alespoň jedna látka z rodiny růstových faktorů CNTF nebo NGF, přičemž buňkami jsou kmenové nervové buňky.
16. Způsob podle nároku 13 v y z n a č u j í c í s e t í m , že proliferaci stimulující sloučeninou nebo diferenciaci inhibující sloučeninou je přičemž buňkami jsou hematopoetické kmenové buňky.
17. Způsob kontroly distribuce buněk v bioartificiálním orgánu v y z n a č u j í c í s e t í m , že je alespoň jeden růstový povrch bioartificiálního orgánu vystaven takovému ošetření, které inhibuje buněčnou proliferaci a podporuje buněčnou diferenciaci, přičemž toto ošetření je účinné po in vivo implantaci do hostitelského organismu.

18. Způsob podle nároku 17 v y z n a č u j í c í s e t í m , že ošetřením je potažení růstového povrchu bioartificiálního orgánu účinným množstvím alespoň jedné molekuly z extracelulární matrix.
19. Způsob podle nároku 18 v y z n a č u j í c í s e t í m , že růstový povrch potažený molekulou z extracelulární matrix je vnitřní dutý povrch bioartificiálního orgánu.
20. Způsob podle nároku 18 v y z n a č u j í c í s e t í m , že růstový povrch potažený molekulou z extracelulární matrix obsahuje mikronosiče zapouzdřené v bioartificiálním orgánu.
21. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že ošetření zahrnuje suspendování buněk v matrici z hydrofilního gelu uvnitř bioartificiálního orgánu, přičemž matrice je substituována proliferaci inhibujícími nebo diferenciaci indukujícími peptidy nebo peptidovými sekvencemi.
22. Způsob podle nároku 21 v y z n a č u j í c í s e t í m , že hydrofilní gelová matrice je složena z agarózy substituované peptidovými sekvencemi vybranými ze skupiny tvořené sekvencemi obsahujícími RGD (ArgGlyAsp, AA₂-AA₄ podle Sekvence id. č. 2), sekvencemi obsahujícími YIGSR (TyrIleGlySerArg, AA₅-AA₉ podle Sekvence id. č. 1) a sekvencemi obsahujícími IKVAV (IleLysValAlaVal, AA₁₁-AA₁₅ podle Sekvence id. č. 3).
23. Způsob podle nároku 20 v y z n a č u j í c í s e t í m , že mikronosiče jsou suspendovány v hydrofilní gelové matrici podle libovolného z nároků 21 až 22.

24. Způsob kontroly distribuce buněk v bioartificiálním orgánu v y z n a č u j í c í s e t í m , že je alespoň jeden růstový povrch bioartificiálního orgánu vystaven ošetření takovým způsobem, který zesílí buněčnou přilnavost k tomuto povrchu.
25. Způsob podle nároku 24 v y z n a č u j í c í s e t í m , že ošetření zahrnuje substituci nebo adsorpci sloučeniny na růstový povrch, přičemž tato sloučenina je vybrána ze skupiny tvořené poly(D-lysinem), sekvencemi obsahujícími RGD (ArgGlyAsp, AA₂-AA₄ podle Sekvence id. č. 2), sekvencemi obsahujícími YIGSR (TyrIleGlySerArg, AA₅-AA₉ podle Sekvence id. č. 1) a sekvencemi obsahujícími IKVAV (IleLysValAlaVal, AA₁₁-AA₁₅ podle Sekvence id. č. 3).
26. Způsob podle nároku 24 v y z n a č u j í c í s e t í m , že ošetření zahrnuje vytvoření inertní nosné mřížky v bioartificiálním orgánu.
27. Způsob podle nároku 26 v y z n a č u j í c í s e t í m , že inertní nosná mřížka je vytvořena z látky vybrané ze skupiny tvořené polyhydroxyethyl-methakrylátem a poly(hydroxyethyl-methakrylátem-ko-methyl-methakrylátem).
28. Způsob kontroly distribuce buněk v bioartificiálním orgánu v y z n a č u j í c í s e t í m , že je alespoň jeden růstový povrch bioartificiálního orgánu vystaven ošetření takovým způsobem, který zabraňuje buňkám v přilnutí k tomuto povrchu.

29. Způsob podle nároku 28 v y z n a č u j í c í s e t í m , že ošetření zahrnuje substituci nebo adsorbci PEO-PDMS na růstový povrch.
30. Způsob podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že ošetření zahrnuje expozici buněk takové dávce UV záření, která inhibuje proliferaci.
31. Bioartificiální orgán v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje
- a) biokompatibilní, permselektivní obálku a
 - b) jádro tvořené živými buňkami, přičemž tyto buňky jsou ošetřeny způsobem podle libovolného z nároků 1 až 30 tak, že je možné kontrolovat distribuci buněk v bioartificiálním orgánu po implantaci do hostitelského organismu in vivo.
32. Buňka transformovaná rekombinantí molekulou DNA v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje
- a) proliferaci podporující gen, který je-li exprimován, je schopen indukovat buněčné dělení
 - b) Mx-1 promotor operativně spojený s genem podporujícím proliferaci, přičemž taková buňka může být přinucena k proliferaci po expozici takovému množství interferonu, které je schopné indukovat expresi genu podporujícího proliferaci.
33. Buňka podle nároku 32 v y z n a č u j í c í s e t í m , že gen podporující proliferaci je velký T-antigen viru SV 40.
34. Buňka podle nároku 32 v y z n a č u j í c í s e t í m , že je odvozena od kmenových nervových buněk.

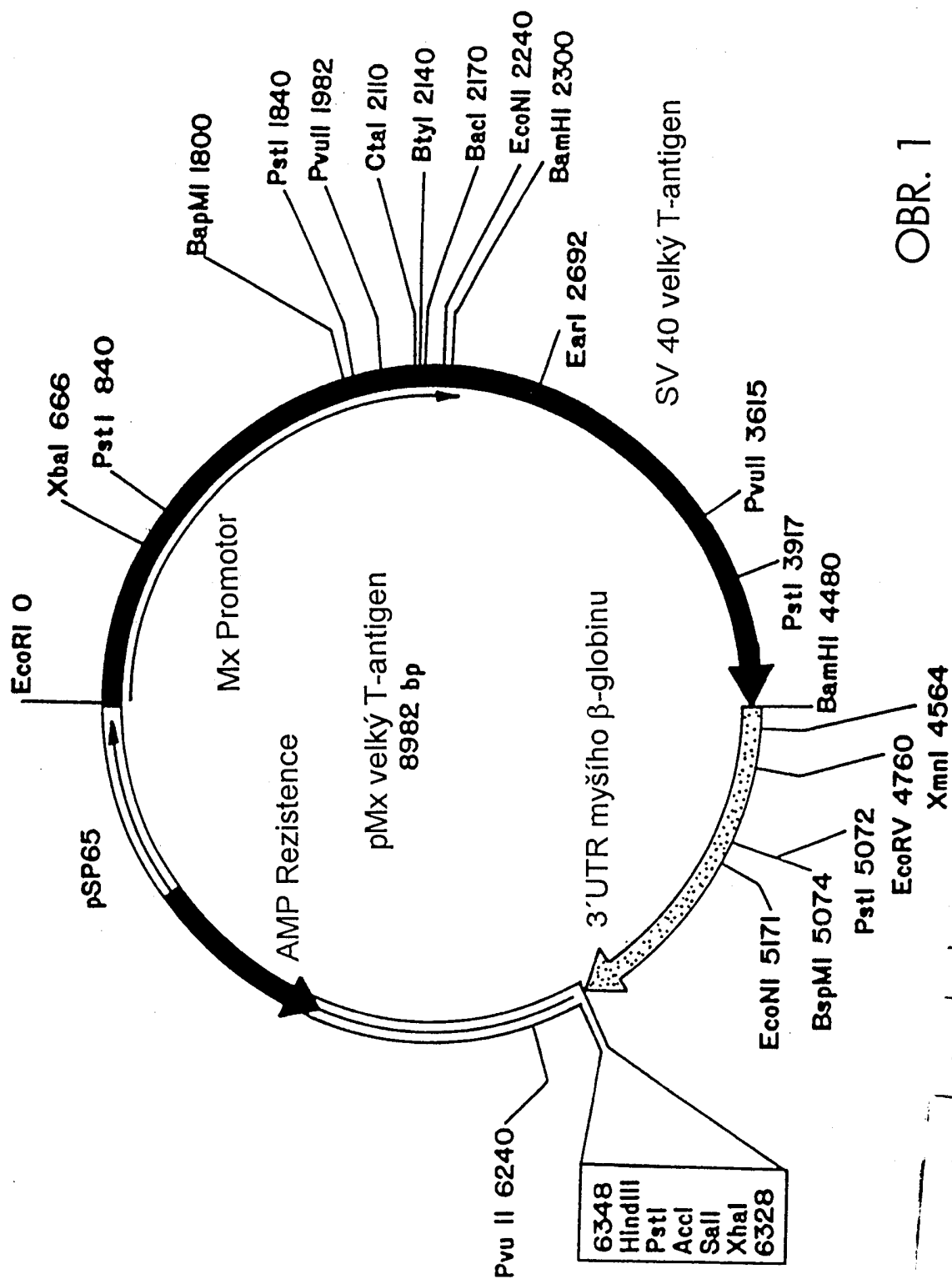
SUBSTITUTE SHEET

35. Buňka podle nároku 32 v y z n a č u j í c í s e t í m , že sekretuje biologicky aktivní látku.
36. Buňka podle nároku 35 v y z n a č u j í c í s e t í m , že je geneticky transformována expresivním vektorem obsahujícím gen, který kóduje biologicky aktivní látku.
37. Buňka podle nároku 35 nebo 36 v y z n a č u j í c í s e t í m , že biologicky aktivní látka je vybrána ze skupiny tvořené neurotransmitery, hormony, cytokiny, růstovými faktory, protilátkami, krevními koagulačními faktory a enzymy.
38. Transgenní savec v y z n a č u j í c í s e t í m , že byl transformován rekombinantní DNA molekulou obsahující
- a) gen podporující proliferaci, který je-li exprimován, je schopen indukovat buněčné dělení
 - b) Mx-1 promotor operativně spojený s genem podporujícím proliferaci.
39. Transgenní savec podle nároku 38 v y z n a č u j í c í s e t í m , že gen podporující proliferaci je velký T-antigen viru SV 40.
40. Potomstvo transgenního savce podle nároku 38
41. Buňky izolované z transgenního savce podle libovolného z nároků 38 nebo 40.
42. Buňka podle nároku 41 v y z n a č u j í c í s e t í m , že je to kmenová nervová buňka.

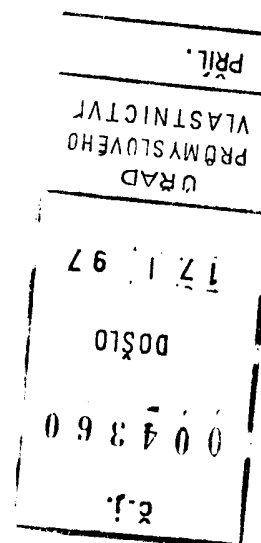
43. Způsob přípravy podmíněně imortalizovaných buněk
v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje kroky

- a) transformaci buněk rekombinantní molekulou DNA, která obsahuje gen podporující proliferaci, který je-li exprimován, je schopen indukovat buněčné dělení a Mx-1 promotor operativně spojený s genem podporujícím proliferaci, přičemž transformace je provedena takovým způsobem, že buňka může být přinucena k proliferaci po expozici takovému množství interferonu, které je schopné indukovat expresi genu podporujícího proliferaci
- b) kultivaci takto transformovaných buněk.

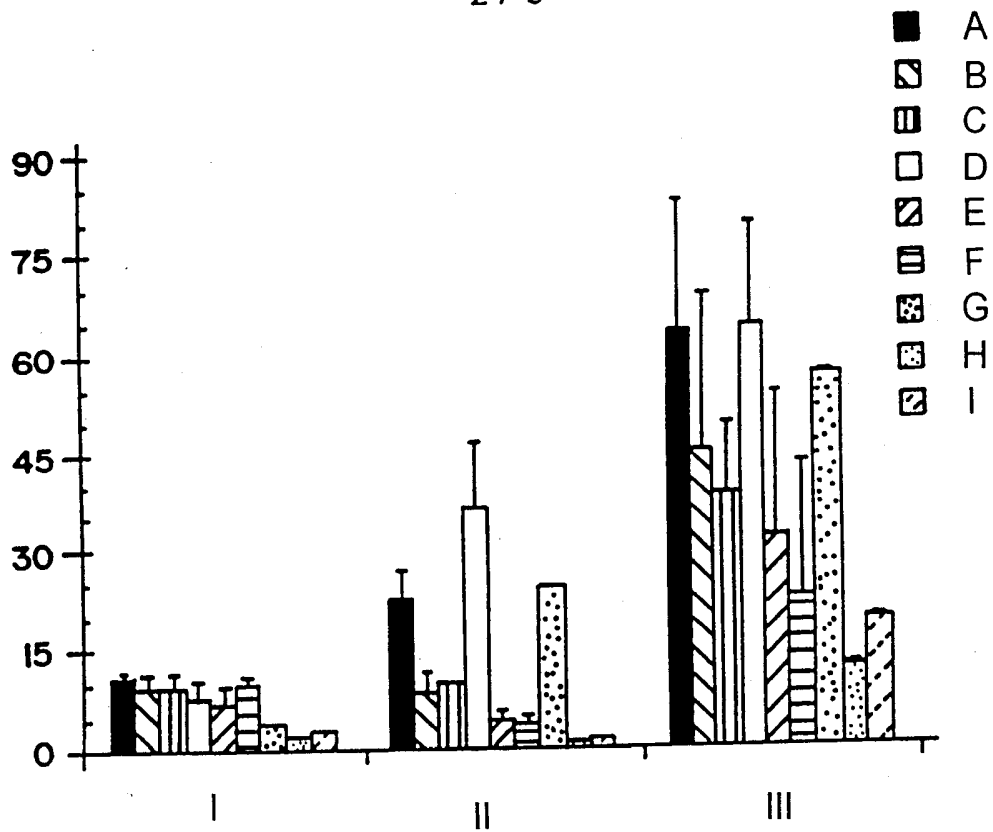
SUBSTITUTE SHEET



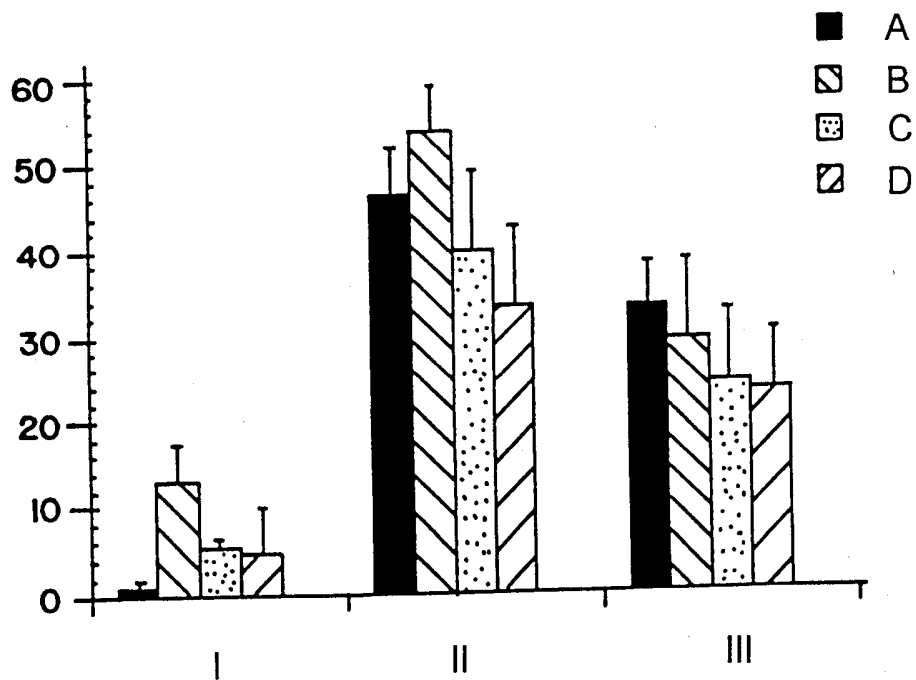
OBR. 1



2 / 5

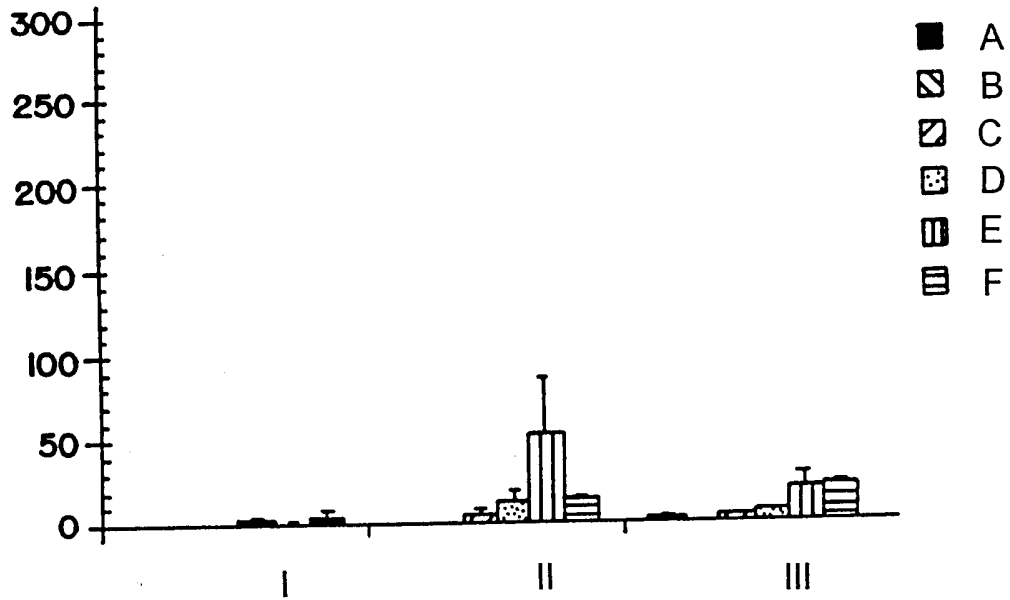


OBR. 2

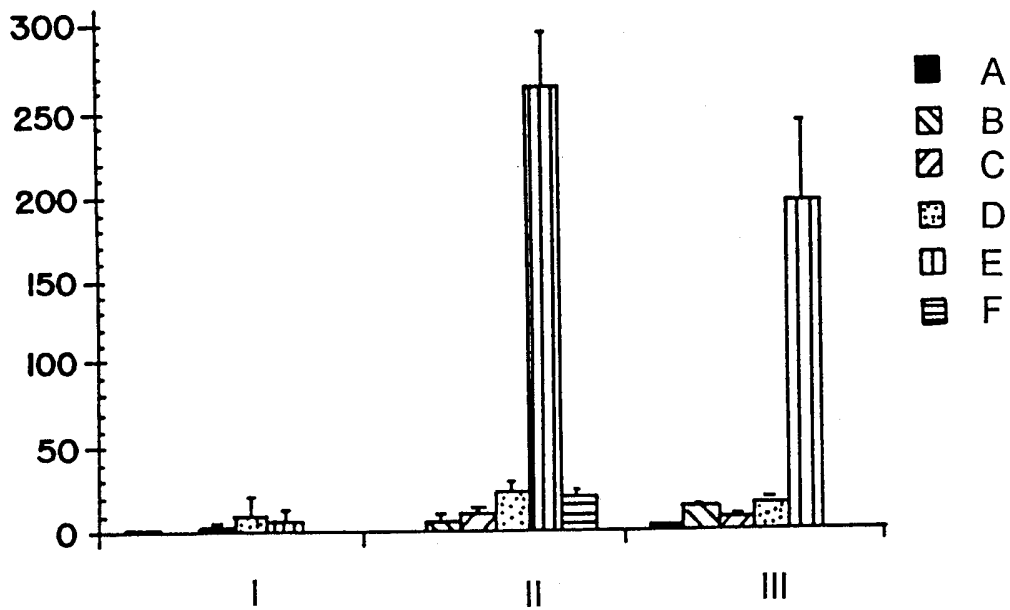


OBR. 3

3/5

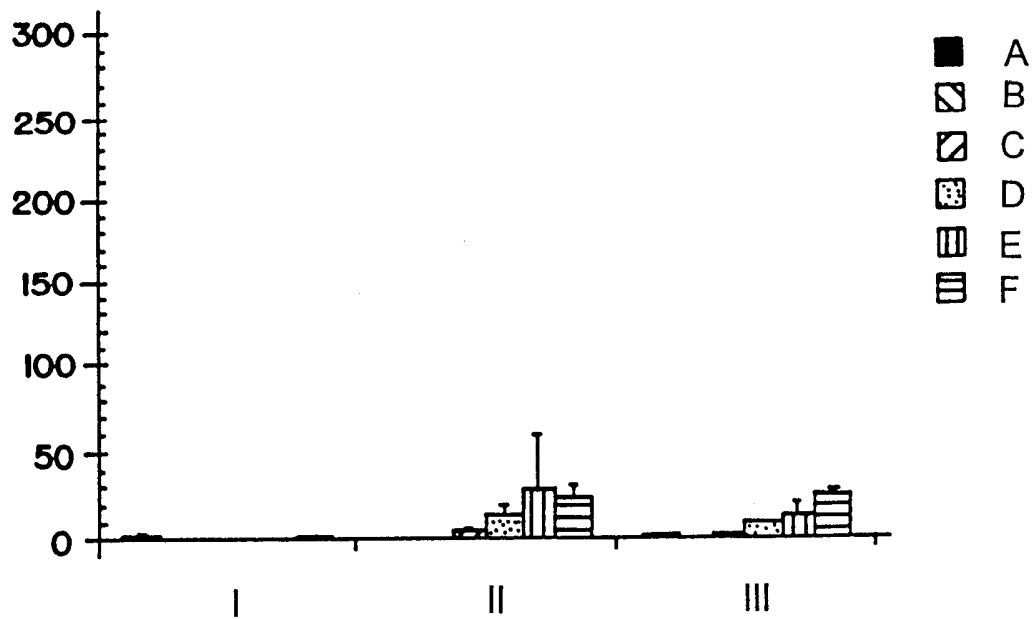


OBR. 4A

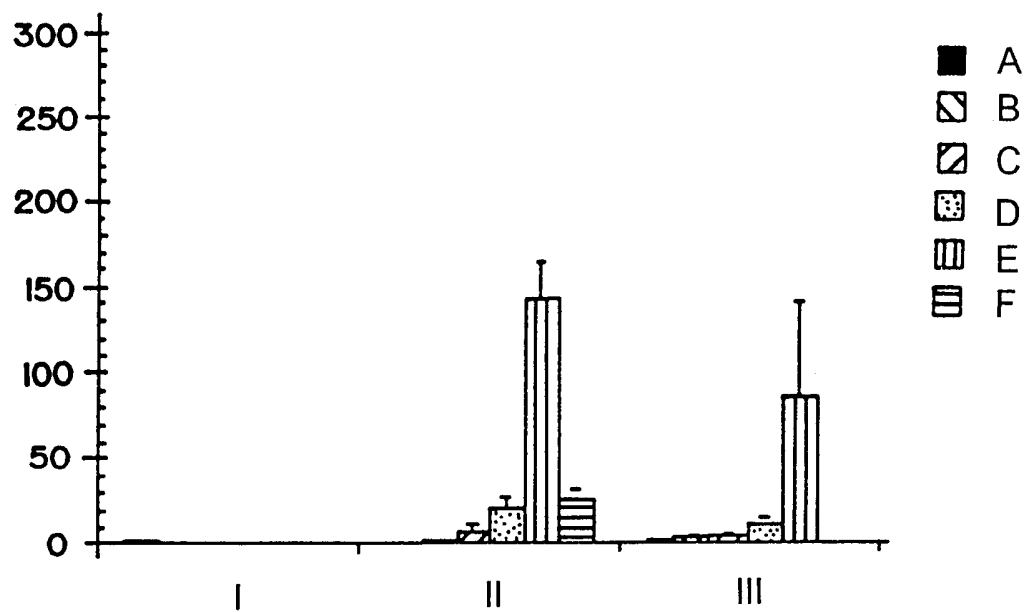


OBR. 4B

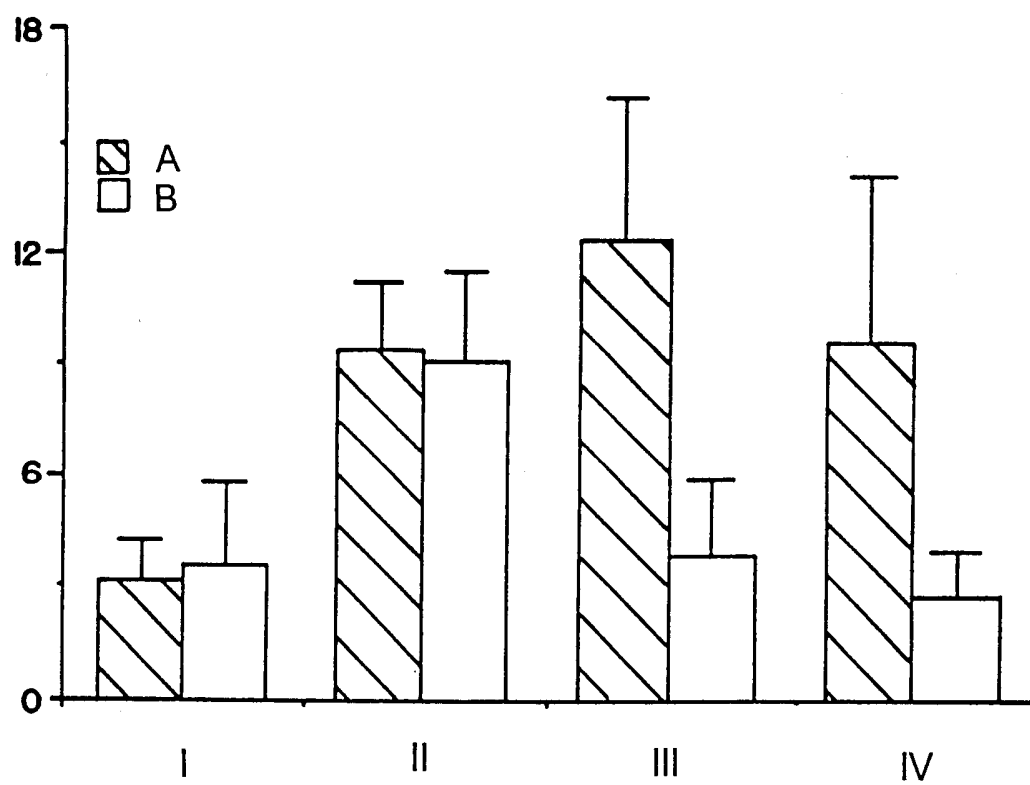
4 / 5



OBR. 5A



OBR. 5B



OBR. 6