

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

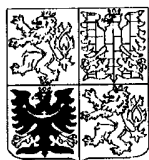
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

**1824-97**

(19)

ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **25. 10. 95**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **13.12.94**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **94/9425071**

(33) Země priority: **GB**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12. 11. 97**  
**(Věstník č. 11/97)**

(86) PCT číslo: **PCT/GB95/02497**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 96/18728**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

**C 12 N 5/10**  
**A 61 L 27/00**  
**G 01 N 33/00**

(71) Přihlášovatel:

STRINGER Bradley Michael John, Cyncoed,  
GB;

(72) Původce:

Stringer Bradley Michael John, Cyncoed,  
GB;

(74) Zástupce:

Koreček Ivan JUDr., Na baště sv. Jiří 9,  
Praha 6, 16000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Chondrocytární buněčné linie**

(57) Anotace:

Vynález se týká chondrocytů a chondrocytárních buněčných linií pro použití zejména při studiu artritidy a také pro vývoj tkáně skeletu pro použití v hojení a/nebo chirurgii náhrad. Je popsáno použití chondrocytárních buněčných linií, které mineralisují vápník pro určení potenciálně přínosných terapeutických agens. Dále jsou popsány prostředky pro produkci takových buněčných linií stejně jako charakteristiky takových buněčných linií. Použití buněčných linií hypertrofických chondrocytů pro produkci tkáně matrix je také popsáno. Dále jsou popsány prostředky pro produkci takových buněčných linií hypertrofických chondrocytů stejně jako charakteristiky takových linií.

CZ 1824-97 A3

**JUDr. Ivan KOREČEK**  
 Advokátní a patentová kancelář  
 160 00 Praha 6, Na baště sv. Jiří 9  
 P.O. BOX 275, 160 41 Praha 6  
 Česká republika

|                                     |              |
|-------------------------------------|--------------|
| č. j.                               | 5 9 6 3 0    |
| DOŠLO                               | 1 3. VIII 97 |
| URAD<br>PRŮMYSLového<br>VLASTNICTVÍ | Příl.        |

Chondrocytární buněčné linie

### Oblast techniky

Vynález se týká chondrocytů a chondrocytárních buněčných linií zejména, ale nejenom pro použití při studiu artritid.

Kromě toho se se vynález týká chondrocytů, které mohou být zejména užitečné při vývoji nových biomateriálů pro použití při náhradách tkání skeletu jako jsou kyčle a klouby.

### Dosavadní stav techniky

Arthritis je charakterizována zánětem kloubů a tak zánětem chrupavčité tkáně. Chrupavka je vyrobena z materiálů secernovaných buňkami, a zejména chondrocyty, do extracelulárního prostoru. Dva nejdůležitější materiály secernované buňkami jsou kolagen a mukopolysacharidy. Mukopolysacharidy jsou cukerné molekuly o vysoké molekulové hmotnosti, které obsahují uhlovođanové řetězce, které existují jako opakující se disacharidy. Jedním ze dvou cukrů je vždy amino cukr, buď N-acetyl glukosamin nebo N-acetyl-galaktosamin. Ve většině případů existují mukopolysacharidy v kombinaci s proteiny a tak vytvářejí proteoglykany.

Kolagen má vláknitou strukturu, zatímco mukopolysacharidy jsou amorfního vzhledu a jsou extrémně viskosní a tak mohou zaujímat velké objemy na danou hmotnost materiálu. V mnoha případech interagují kolagen a proteoglykany jeden s druhým

a tak vytvářejí škálu extracelulárních struktur. Tyto struktury se zdají být samoorganizované; nejsou důkazy enzymů nebo jiných materiálů, které by prováděly jejich polymerizaci, interakce nebo orientaci. Například, typický kolagenový proteoglykan nacházený v chrupavce se může skládat z centrálního vlákna hyaluronové kyseliny několik mikrometrů dlouhého, majícího na sebe navázané v pravidelných intervalech spojovací proteiny. Dlouhé dřevné proteiny navázané na spojovací proteiny a větvcí se z dřevných proteinů v pravidelných intervalech jsou mukopolysacharidy jako je chondroitin sulfát a keratan sulfát. Matrix extracelulárního materiálu se sama organizuje za tvorby chrupavky.

Tvorba kosti je charakterizována kalcifikací v oblasti hypertrofických chondrocytů. Zatímco cévní inavase je významná pro mineralizaci in vivo je jasné, že iniciace kalcifikace může být nezávislá na vaskularizaci, protože hypertrofické chondrocyty mohou spontánně mineralisovat svou matrix in vitro za absence exogeních fosfátů. Nicméně, dospělá kloubní chrupavka normálně nekalcifikuje, kromě spojení se subchondrální kostí, kde kalcifikace tvoří charakteristickou hraniční zonu. Je proto významné zaznamenat, že chondrokalcinosa, patologická kalcifikace kloubní chrupavky pyrofosfátem vápenatým, která se vyskytuje v různých oblastech kloubních a jiných chrupavek, zvyšuje svou prevalenci s věkem a může být asociována s osteoartritidou.

Z toho vyplývá, že pochopení mechanismu asociovaného s osteoartritidou bude vyžadovat pochopení mechanismu

asociovaného s kalcifikací kloubní chrupavky. Kromě toho, existující buněčné modely využívají růstu ploten chondrocytů, jinak řečeno chondrocytů, které mineralizují vápník tak, aby produkovaly kostní tkáň. Použitím ptačího buněčného modelu bylo možné ukázat, že ptačí na plotně rostlá chondrocytární buněčná monovrstva mineralizovala za přítomnosti askorbátu nebo beta-glycerolfosfátu (1). Účinky askorbátu jsou asociovány se zvýšením syntesy alkalické fosfatasy a typu X kolagenu, o kterých není jasné, jestli jsou oba esenciální pro výskyt kalcifikace. Beta glycerolfosfát působí nezávislou regulaci těchto dvou molekul, předpokládaně poskytnutím bohatého zdroje exogeních fosfátů pro nukleaci. Jiní pracovníci vyvinuli peletový kultivační systém pro králičí na plotně rostlé chondrocyty, ve kterém je syntesa alkalické fosfatasy a typu X kolagenu, stejně jako kalcifikace v kulturách s askorbátem (2). Separátní studie (3) naznačují, že účinek askorbátu může být druhově specifický, což poukazuje na potřebu lidského chondrocytárního modelového systému pro studium chorobných procesů u lidí.

Doposud žádné studie neukázaly kalcifikaci matrix in vitro kloubními chondrocyty. Výzkumníci srovnávali králičí kloubní a na plotně rostlé chondrocyty a shledali, že kultury na plotně rostlých chondrocytů o vysoké densitě produkovaly alkalickou fosfatasu a inkorporovaly vápník do buněčných vrstev, zatímco kloubní chondrocyty nikoliv (4). Nicméně, dvě studie demonstrovaly, že ptačí (5) nebo lidské (6) kloubní chondrocyty mohou exprimovat typ X kolagenu a alkalickou fosfatasu ve dlouhodobých kulturách, ale není zde žádný důkaz pro kalcifikaci matrix buněčné vrstvy v ani

jedné studii.

Jiní výzkumníci popsali v mezinárodní patentové přihlášce WO9409118, nejbližší dříve v oboru, jak mohou být produkovány lidské chondrocytární buněčné linie transfekcí juvenilních primárních chondrocytů za použití SV40 onkogenu. Chondrocyty exprimují typ II kolagenu a specifickou hmotu pro kloubní chondrocyty. Nicméně zde nejsou žádné zprávy o kalcifikaci matrix za použití těchto buněčných linií.

Je proto zřejmé, že existující in vitro modely kalcifikace spoléhají na dlouhodobou kultivaci zvířecích na plotně rostlých chondrocytů. Momentálně neexistuje model kalcifikace lidských chondrocytů.

Překvapivě jsme zjistili, že zralé kloubní chondrocyty a imortalizované buněčné linie kloubních chondrocytů poskytují extracelulární matrix, která rychle kalcifikuje. Termínem zralé míníme chondrocyty od starších jedinců jako jsou jedinci ve věku, ve kterém je pravděpodobný rozvoj osteoartritidy jako jsou, ale nejen, jedinci starší 50 let, a lépe starší 65 let. Nebo, alternativně, chondrocyty kultivované in vitro funkčně ekvivalentního věku.

Náš objev proto reprezentuje cennou možnost pro studium mechanismu asociovaného s kalcifikací kloubní chrupavky a také pro studium regulace uvedené kalcifikace. Očekáváme, že naše kloubní chondrocytární buněčné linie budou mít jak akademickou, tak komerční hodnotu v tom, že nejen pouze usnadňují lepší pochopení kalcifikace, která může být asociována s osteoartritidou, ale také slouží jako cenný

prostředek pro vývoj terapeutických agens pro léčbu takových stavů.

Nejsme schopni vysvětlit náš objev, ale uvažujeme následovně. Během vývoje chondrocytů jsou typicky vytvořeny dvě linie. První se týká produkce kosti a tak diferencované chondrocyty mineralizují vápník. Druhá linie se týká produkce chrupavčité tkáně a tak diferencované chondrocyty nemineralizují vápník. Může být skutečností, že zde existuje určitá plasticita v určení linií a ta může například být ve vztahu s demethylací DNA s věkem.

Tak s věkem kloubních chondrocytů kontrolní mechanismy bránící mineralizaci operují méně efektivně a překvapivě chondrocyty linie kloubní chrupavky aktuálně mineralizují vápník.

Naše zjištění tak naznačuje že, oproti předchozím předpokladům, je možné poskytnout lidský buněčný model pro artritidu. Buněčný model může být poskytnut jak za použití zralých, tak imortalizovaných kloubních chondrocytů a ideálně buněčných linií k nim náležících.

#### Podstata vynálezu

Podle prvního aspektu vynálezu je zde proto poskytnut kloubní chondrocyt, který mineralizuje vápník.

Preferovaně je zde poskytnuto množství chondrocytů, které jsou upraveny do formy pelet.

Preferovaný uvedený chondrocyt nebo chondrocyty jsou odvozeny od zralých individuí, preferovaně od takových, které trpí nebo mají predispozice pro artritidu. Alternativně jsou uvedený chondrocyt a chondrocyty fetálního původu a preferovaně lidského fetálního původu. Lépe jsou ještě uvedený chondrocyt a chondrocyty zralé jak je zde definováno.

Preferovaně jsou zde dále poskytnuty buněčné linie takových chondrocytů.

V preferovaném provedení vynálezu jsou uvedené buněčné linie lidského původu a ideálně obsahují onkogen a ideálně teplotně senzitivní onkogen tak, aby při první permissivní teplotě byl exprivován produkt aktivního onkogenu a při druhé nepermissivní teplotě bylo bráněno expresi produktu aktivního onkogenu. Zjistili jsme, že použití takového onkogenového produktu poskytuje buněčnou linii, která při nepermissivní teplotě vykazuje zvýšenou expresi typu II kolagenu - markeru pro plně diferencovaný fenotyp.

Ideálním onkogenem je teplotně senzitivní mutant imortalizujícího onkogenu SV40-T.

V tomto stadiu si nejsme jistí, zda mineralizace kloubními chondrocyty je přímo odpovědná za osteoartritidu, nebo alternativně, zda vápníková mineralisace kloubními chondrocyty je indikátorem ještě neidentifikované podmínky nebo markeru odpovědného za osteoartritidu. V každém případě reprezentuje buněčná linie podle vynálezu vhodný model pro další výzkum.

Jak bylo zmíněno výše, v tomto stadiu si nejsme jistí o charakteru mechanismu vedoucího k vápníkové mineralisaci kloubními nebo hypertrofickými chondrocyty. Jiní pracovníci naznačují, že zde existuje s věkem spojená reaktivace genů (7). Ta jak jsme uvažovali výše je možné, že proces dediferenciace vede k osteoartritidě. Je možné, že geny, které jsou typicky inaktivovány během života jsou při stárnutí zapojeny a jsou tak zodpovědné za aberantní fenotyp zralých kloubních chondrocytů.

Výše uvedená spekulace je poskytnuta pouze za účelem poučení. Není zamýšleno, aby byla přihláška omezena jakoukoliv z výše uvedených spekulací, spíše jsou zde tyto spekulace poskytnuty za účelem porozumění.

Existují zřejmé výhody odvozené z použití in vitro buněčných modelů, které napodobují stavy artritidy. My jsme ale kromě toho vyprodukovali chondrocytární buněčné linie z fetální tkáně, které exprivují typ X kolagenu, marker hypertrofických chondrocytů. O takových chondrocytech je známo, že mineralizují vápník a proto pokud byl fenotyp těchto buněk určen, pak byla existence mineralizace méně překvapivá. Nicméně, je zaznamenání hodné, že doposud nikdo nevytvořil lidské hypertrofické chondrocytární buněčné linie, navzdory jejich zřejmým výhodám při pochopení mineralizačních procesů symptomatických pro tyto artritické stavy. Navíc, nikdo se nepokusil vytvořit takové buněčné linie pro studium a nebo produkci tkáně kloubní matrix pro použití při opravách skeletu a/nebo studiích náhrad a/nebo chirurgii. Proto zde také presentujeme znalosti a metody

týkající se produkce lidských buněčných linií hypertrofických chondrocytů.

Podle druhého aspektu vynálezu je zde poskytnuta lidská buněčná linie hypertrofických chondrocytů.

V ještě jiném preferovaném provedení vynálezu jsou uvedené buněčné linie fetálního původu a také ideálně obsahují onkogen a ideálně teplotně senzitivní onkogen tak, aby při první permissivní teplotě byl exprimován produkt aktivního onkogenu a při druhé nepermissivní teplotě bylo bráněno expresi produktu aktivního onkogenu. Zjistili jsme, že použití takového onkogenového produktu poskytuje buněčnou linii, která při nepermissivní teplotě vykazuje expresi typu X kolagenu - markeru pro hypertrofické chondrocyty. Tak může být poskytnuta alternativní buněčná linie odvozená od lidské fetální tkáně, která mineralizuje vápník.

Podle ještě jiného aspektu vynálezu je zde poskytnuta metoda pro produkci buněčné linie kloubních chondrocytů, kde tato metoda obsahuje:

a) imortalizaci alespoň jedné zralé lidské kloubní chondrocytární buňky za použití imortalizačního agens; a

b) kultivování uvedené imortalizované buňky tak, aby produkovala populaci lidských kloubních chondrocytárních buněk.

Preferovaně je imortalizačním agens onkogen a ještě lépe teplotně senzitivní onkogen, který při nepermissivní teplotě vede ke zvýšené expresi fenotypových charakteristik

vápenatým, elektroporace nebo mikroinjekce, ale retrovirová transdukce byla vybrána pro jednoduchost použití.

#### Imortalizace lidské fetální tkáně

Fetální tkáň žeber nebo femuru byla odebrána 7-9 týden gestace a byly umístěny do tkáňových kultivačních nádob (Costar Ltd. UK) v Eaglovu minimálním esenciálním mediu (Gibco Ltd., UK) obsahujícím antibiotika a L-glutamin, stejně jako 10% tepelně inaktivované fetální hovězí sérum. Kultury byly udržovány ve zvlhčené atmosféře 5% CO<sub>2</sub> při 37 °C a medium bylo měněno v pravidelných intervalech (2 - 3 dny). Jak je obvyklé pro primární kultury resekované tkáně byly buňky ve vzorku odstraněny z tkáně, adherovány na povrch nádob a replikovány, potenciálně tak, aby pokryly celý povrch tkáňové kultivační plotny. Po počátečním období asi 2 týdnů v primární kultuře byla buněčná populace transfektována teplotně senzitivním mutantem od opičího viru 40 odvozeného velkého nádorového (T) antigenu za použití retrovirové transdukce.

Kultivování imortalizovaných buněk tak, aby produkovaly homogenní populaci buněk

Stručně, amfotrofně balené retrovirové částice obsahující tento konstrukt a marker resistance na geneticin, G418 (laskavě darován Dr. M O'Hare, Institute of Cancer Research, Royal Marsden Hospital, Lincoln's Inn, Sutton, Surrey, alternativně, v podstatě stejný konstrukt exprimující teplotně senzitivní mutant SV40-T onkogenu byl laskavě darován profesorem Phil Gaillimore, CRC Laboratories,

chondrocytu.

V preferovaném provedení vynálezu je imortalizace dosaženo za použití konvenčních transfekčních technik a preferovaným imortalizačním agens je imortalizační gen jako je onkogen a nejlépe teplotně senzitivní mutant imortalizujícího onkogenu SV40-T.

Ideální metoda dále obsahuje kultivaci uvedených imortalizovaných buněk při nepermisivní teplotě onkogenu.

Podle ještě dalšího aspektu vynálezu je zde poskytnuta metoda pro produkci buněčných linií hypertrofických chondrocytů, kde tato metoda obsahuje:

a) imortalizaci alespoň jedné lidské fetální chondrocytární buňky za použití imortalizačního agens; a

b) kultivování uvedené imortalizované buňky tak, aby produkovala populaci chondrocytárních buněk odvozených od lidského fétu.

Preferovaně je imortalizačním agens onkogen a ještě lépe teplotně senzitivní onkogen, který při nepermisivní teplotě vede ke zvýšené expresi fenotypových charakteristik chondrocytu.

V preferovaném provedení vynálezu je imortalizace dosaženo za použití konvenčních transfekčních technik a preferovaným imortalizačním agens je imortalizační gen jako je onkogen a nejlépe teplotně senzitivní mutant

imortalizujícího onkogenu SV40-T. Ještě lépe je uvedená transfekce provedena za použití transdukce retrovirovým teplotně senzitivním onkogenem.

Ideální metoda dále obsahuje kultivaci uvedených imortalizovaných buněk při nepermissivní teplotě onkogenu.

Podle ještě dalšího aspektu vynálezu jsou zde poskytnuty chondrocyty, nebo alespoň jedna chondrocytární buněčná linie, podle vynálezu pro použití ve vývoji terapeutických agens pro léčbu artritidy.

Podle ještě dalšího aspektu vynálezu je zde poskytnuta metoda pro vývoj terapeutických agens pro léčbu artritidy, která obsahuje:

a) vystavení chondrocytů, nebo alespoň jedné chondrocytární buněčné linie, podle vynálezu alespoň jednomu testovanému agens; a

b) pozorování charakteru odpovědi na uvedené testované agens.

V preferované metodě podle vynálezu obsahuje uvedené pozorování hodnocení množství vápníkové mineralizace asociované s uvedenými chondrocyty nebo uvedenou chondrocytární buněčnou linií.

Podle alternativního aspektu vynálezu jsou zde poskytnuty hypertrofické chondrocyty, nebo alespoň jedna hypertrofická chondrocytární buněčná linie, pro použití v poskytnutí tkáně

kloubní matrix.

Podle alternativního aspektu vynálezu je zde poskytnuta metoda pro produkci tkáně kloubní matrix pro použití v hojení a/nebo nahrazení poškozené tkáně, která obsahuje:

- a) poskytnutí hypertrofické chondrocytární buněčné linie;
- b) kultivaci uvedené buněčné linie za podmínek navozujících růst matrix; a
- c) získání uvedených buněk a/nebo uvedené tkáně matrix a/nebo jejich vybraných částí.

Vynález bude dále popsán prostřednictvím příkladů pouze s odkazem na následující příklady.

#### Popis obrázků na připojených výkresech

Obrázek 1 ukazuje zvýšení exprese typu II kolagenu v lidských kloubních chondrocytech.

Obrázek 2 ukazuje extracelulární kalcifikaci dosaženou těmito buňkami za použití standartních histologických postupů (Von Kassa barvení, 11) pro identifikaci kalcifikace v tkáni matrix.

Obrázek 3 znázorňuje imunohistochemicky lokalizovaný typ X kolagenu (12) v těchto buňkách naznačující expresi in vitro charakteristik očekávaných pro hypertrofické chondrocyty.

Obrázek 4 ukazuje femur odvozený od lidského fétu, který byl kultivován po 14 dní.

Obrázek 5 ukazuje tři chondrocytární buněčné linie klonované z fetálního femuru jak byly kultivovány buď za přítomnosti 1,25(OH)2D3 (horní řada) nebo za absence 1,25(OH)2D3.

Obrázek 6 ukazuje aktivně mineralizující monovrstevnou kulturu chondrocytární buněčné linie odvozené od lidských fetálních buněk.

#### Imortalizace kloubních chondrocytů

Odkaz 13 je poskytnut jako obecná metoda pro přípravu lidských kloubních chondrocytů pro primární kulturu, ale jakákoliv publikovaná metoda je dostatečná. Stručně, chondrocyty z řezu zralé lidské tibie a femorálních kondylů z biopsií pacientů byly enzymaticky tráveny (14) a umístěny do tkáňových kultivačních nádob (Costar Ltd. UK) v Eaglovu minimálním esenciálním mediu (Gibco Ltd., UK) obsahujícím antibiotika a L-glutamin, stejně jako 10% tepelně inaktivované fetální hovězí sérum. Kultury byly udržovány ve zvlhčené atmosféře 5% CO<sub>2</sub> při 37 °C a medium bylo měněno v pravidelných intervalech. Adherentní buněčná populace byla potom transfektována teplotně senzitivním mutantem od opičího viru 40 odvozeného velkého nádorového (T) antigenu za použití retrovirové transdukce. Jakákoliv standartní metoda transfekce této sekvence (spolu s vazbou vhodného promotoru pro řízení její exprese, např. LTR promotoru) bude dostatečná, jako například DNA precipitace fosforečnanem

University of Birmingham, UK) byly přidány do media spolu s polybrenem (Sigma Chemicals) do konečné koncentrace 0,8 mg/ml. Virový titr byl upraven tak, aby dával nízkou účinnost transdukce 0,0002% za produkce průměrně 20 imortalizovaných buněčných kolonií na nádobku, kde je každá kolonie odvozena od jednotlivé buňky. Dvě hodiny po přidání buněk bylo kultivační medium nahrazeno čerstvým médiem. Kultury byly udržovány při 33 °C, permissivní teplotě pro aktivní formu produktu SV40-T onkogenu. Pět dní po transdukci byl do media přidán geneticin (0,4 mg/ml) po dalších 10 dní pro eradikaci buněk, které neinkorporovaly retrovirový vektor.

#### Diferenciace uvedených buněk

Mezi 14 až 20 dny po transdukci byly jednotlivé kolonie replikujících se buněk identifikovatelné. Klony byly vybrány na základě dobré separace od jiných replikujících se kolonií, počet buněk v každé kolonii byl mezi 100 - 1000 buňkami. Tyto byly seškrábnuty kličkou a expandovány do konfluente v 75 cm<sup>2</sup> nádobkách (Costar, UK Ltd.), což se rovnalo přibližně 22 dělení jednotlivé buňky, před zmrazením v aliquotách. Vzorky byly také použity pro charakterizaci buněk a pro určení, zda vlastní schopnost exprivovat specifické markery kloubních chondrocytů. Exprese byla vykonána vystavením buněk nepermissivní teplotě pro onkogen (39 °C). Klony byly odvozeny rutinní metodou expanze jedné buňky.

Pokusy pro ukázání funkčních charakteristik  
diferencovaných buněčných linií kloubních chondrocytů.

Specifickým markerem kloubních chondrocytů je schopnost exprivovat typ II kolagenu (8). Buňky podle našeho vynálezu byly proto vyšetřovány na to, zda vykazují expresi kolagenu typu II. Imortalizované lidské chondrocyty byly vystaveny 39 °C, nepermisivní teplotě pro onkogen, po peletování kultury (9, 10) po šest týdnů. Obrázek 1 ukazuje průměr 6 pelet inkubovaných jak při permisivní teplotě 33 °C, tak při nepermisivní 39 °C. Sloupce chyb reprezentují standardní odchylku. Obrázek 1 jasně ukazuje zvýšení exprese typu II kolagenu při nepermisivní teplotě 39 °C. Tato data naznačují, že naše buněčná linie obsahuje diferencované funkční kloubní chondrocyty.

#### Extracelulární kalcifikace

Obrázky 2 a 3 ukazují extracelulární kalcifikaci dosaženou za použití buněk podle vynálezu. Přesněji, obrázek 2 ukazuje standardní histologický postup (Von Kossa barvení, 11) pro identifikaci kalcifikací v tkáňové matrix. Tmavé oblasti (Von Kossa pozitivní barvení) reprezentují kalcifikovanou matrix produkovanou těmito kloubními chondrocyty, která je separována vhodně barvenými nebo nebarvenými chondrocytárními buňkami v kultuře. Obrázek 3 je zde obsažen pro ukázání imunohistochemické lokalizace typu X kolagenu (12) v těchto buňkách, což naznačuje expresi in vitro charakteristik očekávaných pro hypertrofické chondrocyty. Tato data naznačují, že buňky podle vynálezu mohou být dediferencované tak, aby vykazovaly

charakteristiky hypertrofických chondrocytů.

Dlouhověkost lidské buněčné linie kloubních chondrocytů

Za použití metody podle vynálezu jsme překvapivě zjistili, že naše lidské buněčné linie kloubních chondrocytů se úspěšně diferencují za produkce funkčních buněk s charakteristikami kloubních chondrocytů. Buňky přežívaly a byly pasážovány po více než 60 dělení v průběhu 2 let za produkce  $10^{18}$  buněk z různých klonů. Buněčné linie pokračovaly v přežívání a navíc buňky linie stále vykazovaly funkční charakteristiky tkáňového typu diferencovaných buněk. Navíc jsme byli schopni produkovat imortalizované lidské buněčné linie kloubních chondrocytů obsahující diferencované buňky, které překvapivě mineralizovaly vápník.

Pokusy pro ukázání funkčních charakteristik diferencovaných buněčných linií hypertrofických chondrocytů odvozených od fétu

Specifickým markerem hypertrofických chondrocytů je schopnost exprimovat typ X kolagenu. Buňky podle našeho vynálezu byly proto vyšetřovány na to, zda vykazují expresi kolagenu typu X. Všechny naše z fétu odvozené chondrocyty exprimovaly tento buněčný marker a další testy byly provedeny a bylo uzavřeno, že typ I kolagenu nebyl exprimován v těchto buňkách, což jasně ukazuje, že nejsou osteoprogenitorového původu.

Obrázek 4 ukazuje femur odvozený od lidského fétu 7 - 9 týden gestace a přibližně 600 mikrometrů délky. Femur byl

kultivován ve výše popsaném kultivačním mediu po dobu 14 dní tak, aby se umožnil růst a expanse replikujících se buněčných populací jak by to mělo být pro jakoukoliv primární kulturu. V tomto případě není vyžadováno žádné předchozí ošetření enzymy, nicméně, pro pomoc uvolňování buněk. Byla provedena expanse buněk před transdukcí retrovirového teplotně senzitivního onkogenu.

#### Extracelulární kalcifikace

Imortalizované hypertrofické chondrocyty odvozené od fétu také odpovídaly na  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  a exprivovaly vysoké hladiny aktivity alkalické fosfatasy, což jsou dva další markery fenotypu podobného hypertrofickým chondrocytům. Pokud byly buňky ponechány v monovrstevné kultuře po 10 - 14 dní při  $39^\circ\text{C}$ , nepermissivní teplotě pro onkogen, a za absence přidání  $\beta$ -glycerofosfátu, pak kultury mineralizovaly. Toto je jasně vidět na obrázku 5 a ukazují to tři chondrocytární buněčné linie klonované z fetálního femuru po retrovirové transdukcii teplotně senzitivním onkogenem. Každá buněčná linie má bazální hladinu aktivity alkalické fosfatasy a nějaký typ exprese X kolagenu. Pokud jsou buňky umístěny a inkubovány při teplotě nepermissivní pro onkogen a za přítomnosti  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , horní řada, mineralizuje každý klon aktivně vápník jak je ilustrováno standardním histologickým postupem Von Kossa barvení jak bylo popsáno výše. Buňky umístěné a inkubované při teplotě nepermissivní pro onkogen a za nepřítomnosti  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , dolní řada, nemineralizují aktivně vápník.

Konečně, obrázek 6 ukazuje, znovu za použití Von Kossa

barvení, aktivně mineralizující monovrstevnou kulturu chondrocytární buněčné linie odvozené od lidských fetálních buněk. Tmavé oblasti reprezentují mineralizovanou matrix, které je vyvíjena a překrývá kultivované buňky, které adherují na povrch kultivační plotny.

Proto jsme jasně demonstrovali, že je možné produkovat kloubní chondrocytární buněčné linie - jak odvozené od zralé dospělé tkáně, tak alternativně imortalizované mladé lidské tkáně - které mineralizují vápník. Naše buněčné linie tak mají použití v identifikaci agens, které ovlivňují mineralizaci vápníku těmito tkáněmi. Také jsme demonstrovali, že je možné poskytnout lidské buněčné linie hypertrofických chondrocytů pro stejné použití jaké je uvedeno výše a také pro použití ve vývoji biomateriálů pro použití v kterémkoliv z množství aplikací, ale zejména pro použití ve vývoji materiálů pro použití v kloubních náhradách.

## Odkazy:

1. Leboy P. S., L. Vaia, B. Uschmann, E. Golub, S. L. Adams and M. Pacifici 1989. Ascorbic acid induces alkaline phosphatase, type X collagen, and calcium deposition in cultured chick chondrocytes. *J. Biol. chem.* 264:17281-17286.
2. Kato Y., M. Iwamoto, T. Koike, F. Suzuki, and Y. Takano. 1988. Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: Regulation by transforming growth factor  $\beta$  and serum factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9552-9556
3. Sandell L. J., and J. C. Daniel. 1988. Effects of ascorbic acid on collagen mRNA levels in shortterm chondrocyte cultures. *Tiss. Res.* 17:11-22.
4. Jikko A., T. Aoba, H. Murakami, Y. Takano, M. Iwamoto and Y. Kato. 1993. Characterisation of the mineralisation process in cultures of rabbit growth plate chondrocytes. *Dev. Biol.* 156:372-380.
5. Pacifici M., E. B. Golden, S. L. Adams and I. M. Shapiro. 1991. Cell Hypertrophy and type X collagen synthesis in cultured articular chondrocytes. *Exp. Cell Res.* 912:266-270.
6. Stephens M., A. P. L. Kwan, M. T. Bayliss and C. W. Archer. 1992. Human articular surface chondrocytes initiate alkaline phosphatase and type X collagen synthesis in suspension culture. *J. Cell. Sci.* 103:1111-1116.

7. Wareham K.A., M. F. Lyon, H. Glenister and E. D. Williams. 1987. Age related reactivation of an X-linked gene. *Nature* 327:725-727.
8. Hollander A.P., Heathfield T.F., Webber C, Iwata Y, Bourne R, Rorabeck C and Poole A.R., 1994. Increased damage to type II collagen in osteoarthritic articular cartilage detected by a new immunoassay. *J Clin. Invest.* 93:1722-1732.
9. Kato Y, Iwamoto M, Koike T, Suzuki F and Takano Y 1988. Terminal differentiation and calcification in rabbit chondrocyte cultures grown in centrifuge tubes: Regulation by transforming growth factor- $\beta$  and serum factors. *Proc. Nat. Acad. Sci (USA)* 85:9552-9556.
10. Jikko A, Aoba T, Murakami H, Takano Y, Iwamoto M and Kato Y, 1993. Characterisation of the mineralisation process in cultures of rabbit growth plate chondrocytes. *Dev. Biol.* 156:372-380.
11. Clark G, 1981. Miscellaneous Stains in Staining Procedures Eds. Williams and Wilkins. publ Baltimore, New York.
12. Stephens M, Kwan A.P.L., Bayliss M.T., and Archer C.W., 1992. Human articular surface chondrocytes initiate alkaline phosphatase and type X collagen synthesis in suspension culture. *J. Cell. Sci.* 103:1111-1116.
13. Frazer A, Bunning R, Thavarajah M, Seid J and Russell R.G.G., 1994. Studies on type II collagen and aggrecan production in human articular chondrocytes *in vitro* and effects of transforming growth factor- $\beta$  and interleukin-1 $\beta$ . *Osteoarthritis and Cartilage* 2:235-245.

14. Gowen M, Wood D.D., Ihrle E.J., Meats E.J., and Russell R.G.G., 1984. Stimulation by human interleukin-1 of cartilage breakdown and production of collagenase and proteoglycanase by human chondrocytes but not human osteoblasts in-vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 797: 186-193.

**JUDr. Ivan KOREČEK**

Advokátní a patentová kancelář  
160 00 Praha 6, Na baště sv. Jiří 9  
P.O. BOX 275, 160 41 Praha 6  
Česká republika

**P a t e n t o v é   n á r o k y**

1. Kloubní chondrocyt, který se vyznačuje tím, že mineralizuje vápník.
2. Kloubní chondrocyt podle nároku 1, kde je velký počet takových chondrocytů upraven do formy pelet.
3. Kloubní chondrocyt podle nároku 1 nebo 2, kde uvedené chondrocyt(y) jsou zralé nebo jsou odvozené od zralého jednotlivce a preferovaně od jednotlivce trpícího nebo majícího predispozici pro artritidu.
4. Kloubní chondrocyt podle nároku 1 nebo 2, kde jsou uvedené chondrocyt(y) fetálního původu.
5. Kloubní chondrocyt podle nároků 1 až 4, kde je uvedený chondrocyt poskytnut jako buněčná linie.
6. Kloubní chondrocyt podle nároku 5, kde je uvedená buněčná linie lidského původu.
7. Kloubní chondrocyt podle jakéhokoliv z předchozích nároků, kde uvedený chondrocyt obsahuje onkogen.
8. Kloubní chondrocyt podle nároku 7, kde je uvedený onkogen teplotně senzitivní.

9. Kloubní chondrocyt podle nároku 8, kde je uvedený onkogen SV40T antigen.

10. Způsob pro produkci buněčné linie kloubních chondrocytů, která mineralizuje vápník v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

a) imortalizaci alespoň jedné zralé lidské kloubní chondrocytární buňky za použití imortalizačního agens; a

b) kultivování uvedené imortalizované buňky tak, aby produkovala populaci lidských kloubních chondrocytárních buněk.

11. Způsob podle nároku 10 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným imortalizačním agens je onkogen.

12. Způsob podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený onkogen je teplotně senzitivní.

13. Způsob podle nároku 12 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený onkogen je SV40T antigen.

14. Způsob podle nároku 12 nebo 13 v y z n a č u j í c í s e t í m, že způsob dále vyžaduje kultivování uvedených imortalizovaných buněk při nepermisivní teplotě pro onkogen.

15. Použití alespoň jednoho kloubního chondrocytu, který mineralizuje vápník, pro identifikaci terapeutických agens pro léčbu artritidy.

16. Způsob pro vývoj terapeutických agens pro léčbu artritidy, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

a) vystavení chondrocytů, nebo alespoň jedné chondrocytární buněčné linie, obsahující kloubní chondrocyty, které mineralizují vápník, alespoň jednomu testovanému agens; a

b) pozorování charakteru odpovědi na uvedené testované agens.

17. Způsob podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené pozorování zahrnuje hodnocení množství mineralizovaného vápníku asociovaného s uvedenými chondrocyty nebo s uvedenou chondrocytární buněčnou linií.

18. Lidská buněčná linie hypertrofických chondrocytů.

19. Buněčná linie podle nároku 18, kde je uvedená buněčná linie fetálního původu.

20. Buněčná linie podle nároku 18 nebo 19, kde uvedená buněčná linie obsahuje onkogen.

21. Buněčná linie podle nároku 20, kde je uvedený onkogen teplotně senzitivní.

22. Buněčná linie podle nároku 20 nebo 21, kde je uvedený onkogen SV40T antigen.

23. Způsob pro produkci lidské buněčné linie hypertrofických

chondrocytů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

a) imortalizaci alespoň jedné fetální chondrocytární buňky za použití imortalizačního agens; a

b) kultivování uvedené imortalizované buňky tak, aby produkovala populaci lidských chondrocytárních buněk odvozených od fétu.

24. Způsob podle nároku 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným imortalizačním agens je onkogen.

25. Způsob podle nároku 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený onkogen je teplotně senzitivní.

26. Způsob podle nároku 24 nebo 25 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený onkogen je SV40T antigen.

27. Způsob podle nároku 25 nebo 26 v y z n a č u j í c í s e t í m, že způsob dále vyžaduje kultivování uvedených imortalizovaných buněk při nepermissivní teplotě pro onkogen.

28. Použití hypertrofických chondrocytů, nebo alespoň jedné buněčné linie hypertrofických chondrocytů, pro použití při poskytování tkáně kloubní matrix.

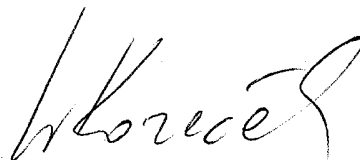
29. Způsob pro produkci tkáně kloubní matrix pro použití v hojení a/nebo náhradách poškozené tkáně v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

a) poskytnutí hypertrofické chondrocytární buněčné linie;

b) kultivaci uvedené buněčné linie za podmínek navozujících růst matrix; a

c) získání uvedených buněk a/nebo uvedené tkáně matrix a/nebo jejich vybraných částí.

30. Hypertrofické chondrocyty, nebo alespoň jednu buněčnou linii hypertrofických chondrocytů, pro použití při identifikaci terapeutických agens pro léčbu artritidy.



**JUDr. Ivan KOREČEK**

Advokátní a patentová kancelář

160 00 Praha 6. Na baště sv. Jiří 9

P.O. BOX 275, 160 41 Praha 6

Česká republika

**JUDr. Ivan KOREČEK**

Advokátní a patentová kancelář  
160 00 Praha 6, Na baště sv. Jiří 9  
P.O. BOX 275, 160 41 Praha 6  
Česká republika

**P a t e n t o v é   n á r o k y**

1. Použití kloubního chondrocytu jako modelu kalcifikace matrix.
2. Použití kloubního chondrocytu podle nároku 1, kde je velký počet takových chondrocytů upraveno do formy pelet.
3. Použití kloubního chondrocytu podle nároku 1 nebo 2, kde uvedené chondrocyt(y) jsou zralé nebo jsou odvozené od zralého jednotlivce a preferovaně od jednotlivce trpícího nebo majícího predispozici pro artritidu.
4. Použití kloubního chondrocytu podle nároku 1 nebo 2, kde jsou uvedené chondrocyt(y) fetálního původu.
5. Použití kloubního chondrocytu podle nároků 1 až 4, kde je uvedený chondrocyt poskytnut jako buněčná linie.
6. Použití kloubního chondrocytu podle nároku 5, kde je uvedená buněčná linie lidského původu.
7. Použití kloubního chondrocytu podle jakéhokoliv z předchozích nároků, kde uvedený chondrocyt obsahuje onkogen.
8. Použití kloubního chondrocytu podle nároku 7, kde je uvedený onkogen teplotně senzitivní.

9. Použití kloubního chondrocytu podle nároku 8, kde je uvedený onkogen SV40T antigen.

10. Způsob pro produkci buněčné linie kloubních chondrocytů, která mineralizuje vápník v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

a) imortalizaci alespoň jedné prekursorové lidské kloubní chondrocytární buňky za použití imortalizačního agens; a

b) kultivování uvedené imortalizované buňky tak, aby produkovala populaci lidských kloubních chondrocytárních buněk.

11. Způsob podle nároku 10 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným imortalizačním agens je onkogen.

12. Způsob podle nároku 11 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený onkogen je teplotně senzitivní.

13. Způsob podle nároku 12 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený onkogen je SV40T antigen.

14. Způsob podle nároku 12 nebo 13 v y z n a č u j í c í s e t í m, že způsob dále vyžaduje kultivování uvedených imortalizovaných buněk při nepermissivní teplotě pro onkogen.

15. Použití alespoň jednoho kloubního chondrocytu, který mineralizuje vápník, pro identifikaci terapeutických agens pro léčbu artritidy.

16. Způsob pro vývoj terapeutických agens pro léčbu artritidy, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

a) vystavení chondrocytů, nebo alespoň jedné chondrocytární buněčné linie, obsahující kloubní chondrocyty, které mineralizují vápník, alespoň jednomu testovanému agens; a

b) pozorování charakteru odpovědi na uvedené testované agens.

17. Způsob podle nároku 16 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené pozorování zahrnuje hodnocení množství mineralizovaného vápníku asociovaného s uvedenými chondrocyty nebo s uvedenou chondrocytární buněčnou linií.

18. Lidská buněčná linie hypertrofických chondrocytů, kde uvedená buněčná linie je fetálního původu.

19. Buněčná linie podle nároku 18, kde uvedená buněčná linie obsahuje onkogen.

20. Buněčná linie podle nároku 19, kde je uvedený onkogen teplotně senzitivní.

21. Buněčná linie podle nároku 19 nebo 20, kde je uvedený onkogen SV40T antigen.

22. Způsob pro produkci lidské buněčné linie hypertrofických chondrocytů, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

a) imortalizaci alespoň jedné fetální chondrocytární buňky za použití imortalizačního agens; a

b) kultivování uvedené imortalizované buňky tak, aby produkovala populaci lidských chondrocytárních buněk odvozených od fétu.

23. Způsob podle nároku 22 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným imortalizačním agens je onkogen.

24. Způsob podle nároku 23 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený onkogen je teplotně senzitivní.

25. Způsob podle nároku 23 nebo 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený onkogen je SV40T antigen.

26. Způsob podle nároku 24 nebo 25 v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený způsob dále vyžaduje kultivování uvedených imortalizovaných buněk při nepermissivní teplotě pro onkogen.

27. Použití hypertrofických chondrocytů, nebo alespoň jedné buněčné linie hypertrofických chondrocytů, pro použití při poskytování tkáně kloubní matrix.

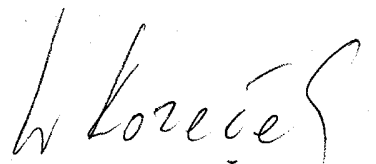
28. Způsob pro produkci tkáně kloubní matrix pro použití v hojení a/nebo náhradách poškozené tkáně v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje:

a) poskytnutí hypertrofické chondrocytární buněčné linie;

b) kultivaci uvedené buněčné linie za podmínek navozujících růst matrix; a

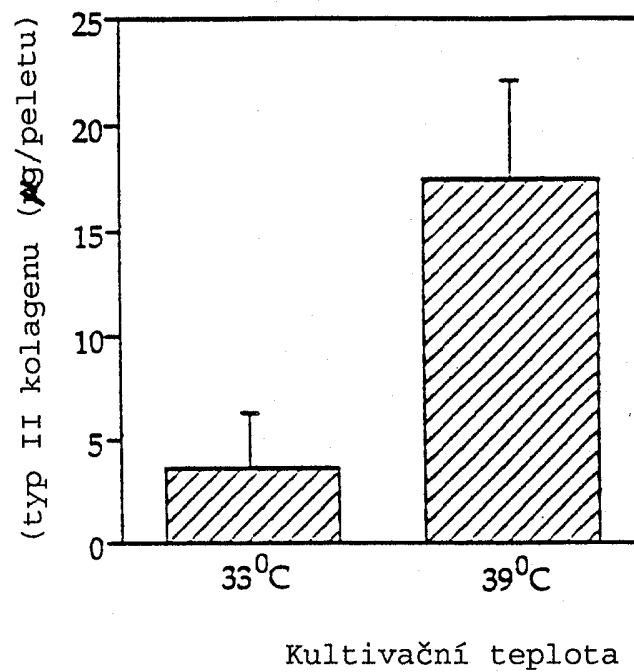
c) získání uvedených buněk a/nebo uvedené tkáně matrix a/nebo jejich vybraných částí.

29. Hypertrofické chondrocyty, nebo alespoň jednu buněčnou linii hypertrofických chondrocytů, pro použití při identifikaci terapeutických agens pro léčbu artritidy.



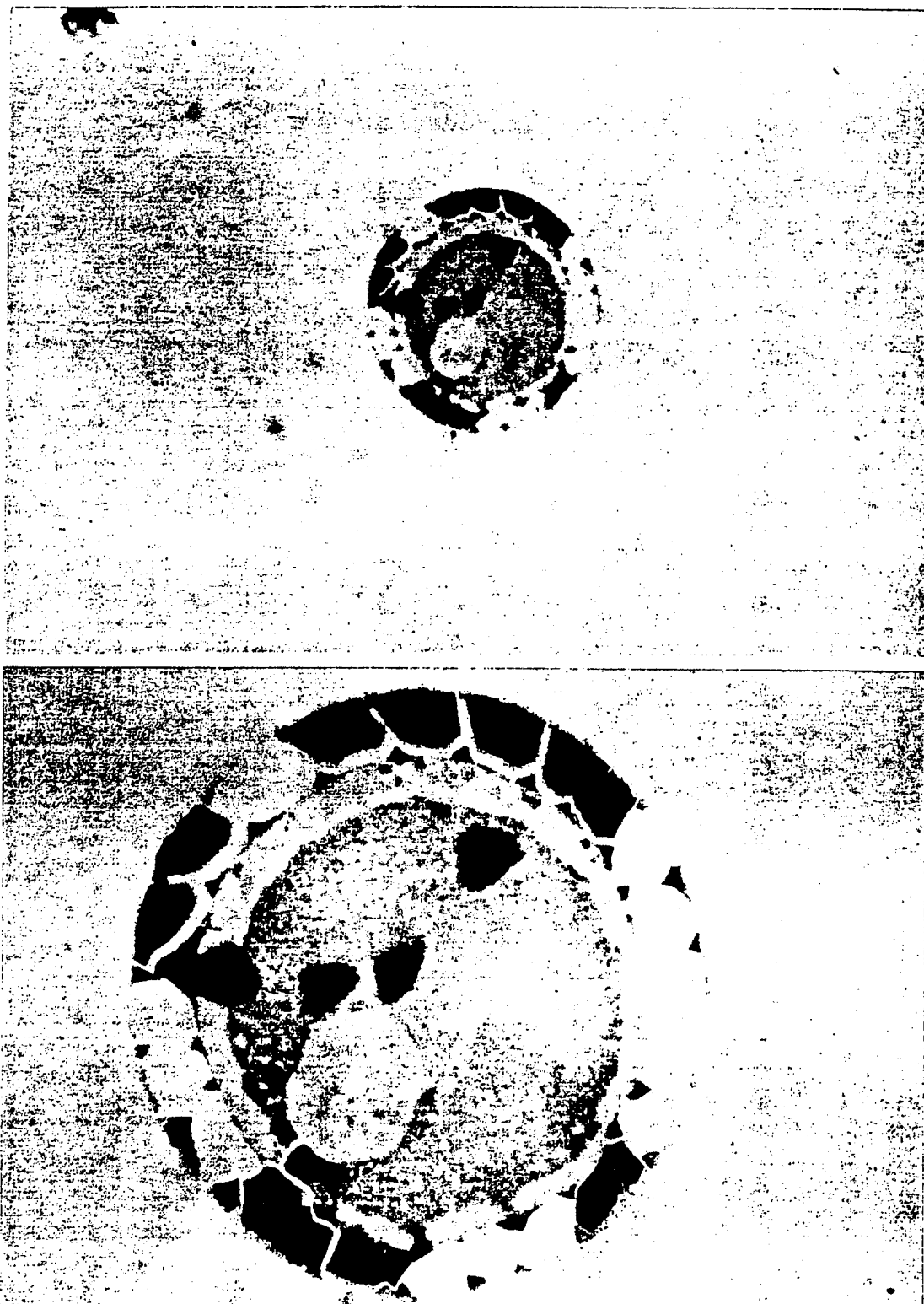
**JUDr. Ivan KOREČEK**  
Advokátní a patentová kancelář  
160 00 Praha 6. Na baště sv. Jiří 9  
P.O. BOX 275, 160 41 Praha 6  
Česká republika

Typ II kolagenu v peletách prostřednictvím CB11B testu



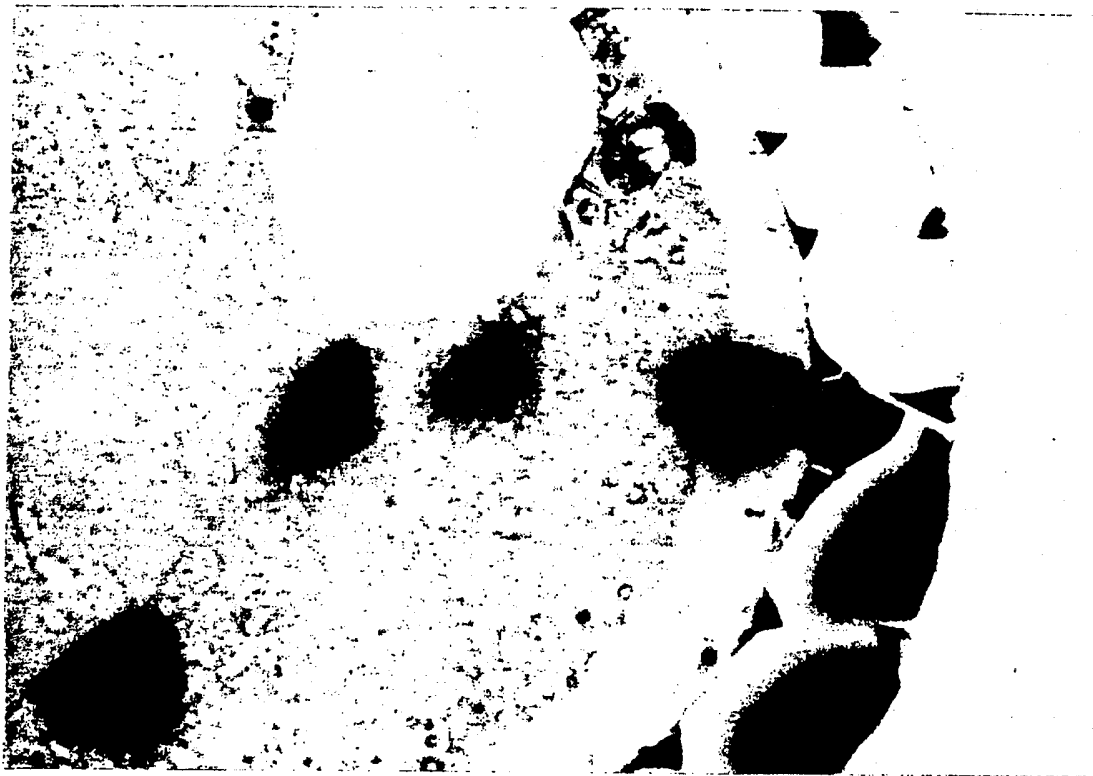
Obrázek 1

2/8



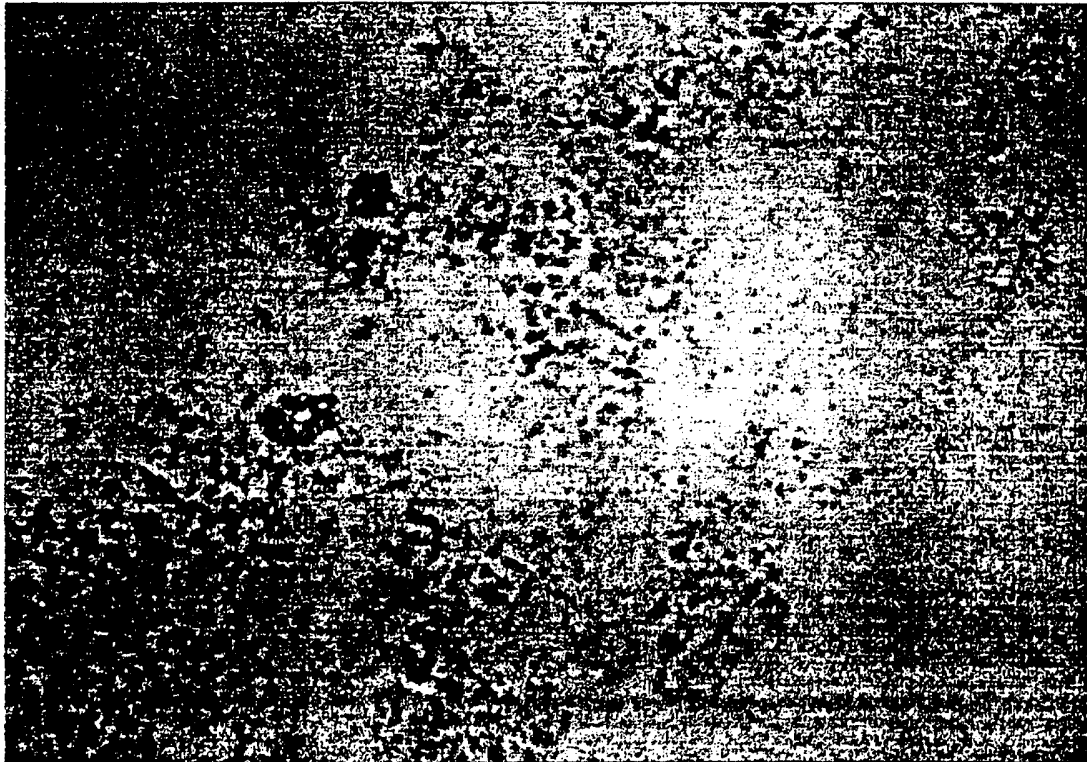
Obrázek 2

3/8

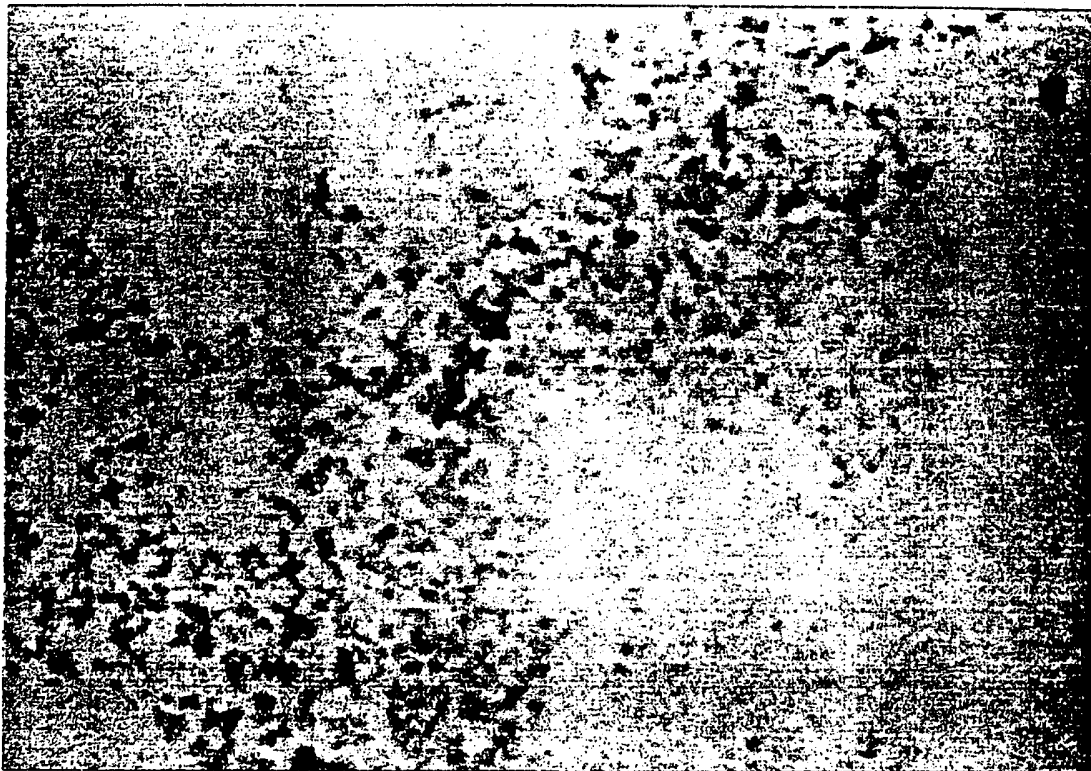


Obrázek 2

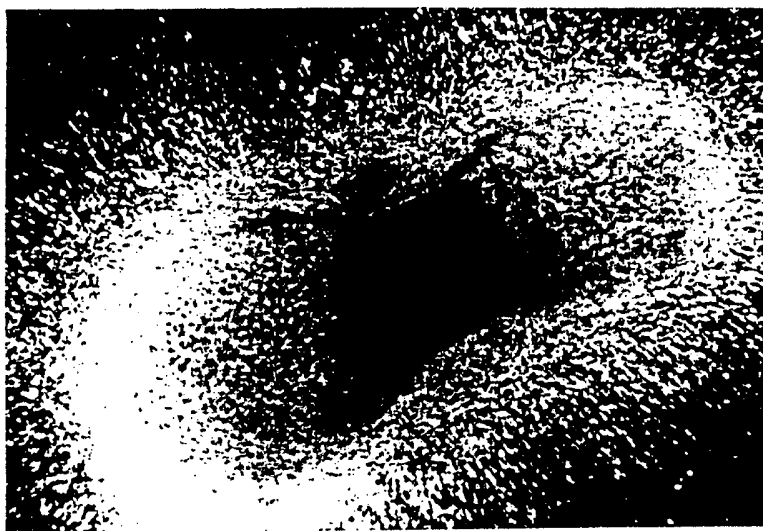
4/8



Obrázek 3

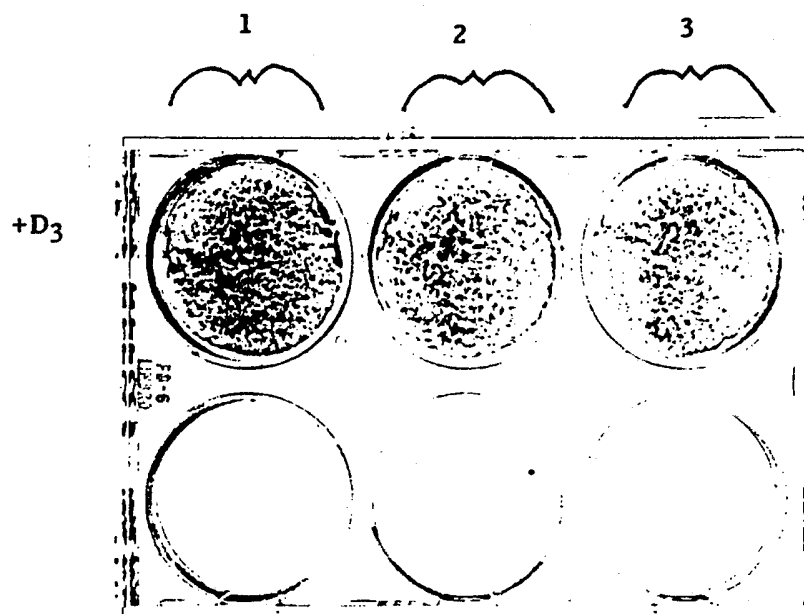


Obrázek 3

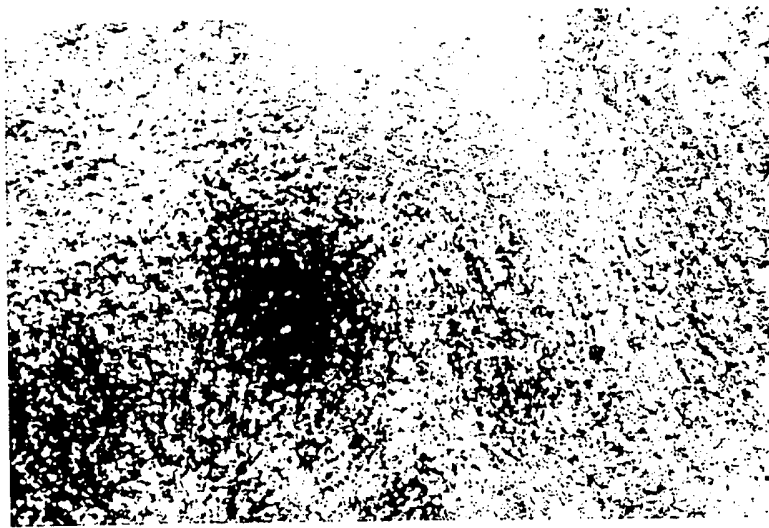


Obrázek 4

3 chondrocytární klony



Obrázek 5



Obrázek 6