

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 2082

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 12 N 5/00

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29.01.2002**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **31.01.2001**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/00162**

(33) Země priority: **DK**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.11.2003**

(Věstník č. 11/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/DK02/00065**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/061052**

(71) Přihlašovatel:

INTERFACE BIOTECH A/S, Glostrup, DK;

(72) Původce:

Storgaard Peter, Valby, DK;

Osther Kurt, Scottsdale, AZ, US;

(74) Zástupce:

Jirotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Zlepšený způsob kultivace savčích buněk in vitro
pro autologní způsoby implantace a
transplantace**

(57) Anotace:

Způsob produkce jednotek vytvářejících buněčné kolonie in vitro ve výrobním měřítku z explantátů savčí tkáně zahrnující stupně a) pěstování kousku explantátu savčí tkáně v kultivačním médiu s cílem získat z nezralých buněk obsažených v kousku explantátu jednotky vytvářející buněčné kolonie a b) získávání buněk z jedné nebo více jednotek vytvářejících kolonie pro použití v autologních způsobech implantace a transplantace buněk. Explantát savčí tkáně se vybere ze skupiny, kterou tvoří chrupavka, kost jako například kostní dřev, pojivová tkáň, svalová tkáň jako například tkáň hladkého svalstva, srdeční tkáň, jaterní tkáň a tkáň kosterního svalstva, kožní tkáň jako například okostice, slizniční tkáň, mozková tkáň, tkáň pankreatu a krevní cévy. Explantát savčí tkáně představuje především chrupavka, jako například elastická, vazivová, hyalinní nebo artikulární hyalinní chrupavka. Získané buňky jsou vhodné pro použití v autologních implantačních a transplantačních metodách. Ve specifickém provedení jsou získané buňky chondrocyty použitelné zvláště pro autologní metody implantace chondrocytů (ACI).

30.07.03
7V/2003-2082

Zlepšený způsob kultivace savčích buněk in vitro pro autologní
způsoby implantace a transplantace

13999

Oblast techniky

Vynález se týká způsobů, přepravních terapeutických souprav a výrobní jednotky pro produkci jedné nebo více jednotek vytvářejících buněčné kolonie (CFU) z explantátů savčí tkáně a dále užití buněk z takových jednotek vytvářejících buněčné kolonie v terapii, zvláště pro autologní buněčnou léčbu savců trpících tkáňovými poruchami.

Různými tkáňovými poruchami nebo poruchami souvisejícími s tkáněmi trpí mnoho savců jako jsou lidé, domácí a/nebo dostihová zvířata. Těmito tkáněmi mohou být chrupavka, kost jako například kostní dřev, pojivová tkáň, svalová tkáň jako například tkáň hladkého svalstva, srdeční tkáň, jaterní tkáň a tkáň kosterního svalstva, kožní tkáň jako například okostice, slizniční tkáň, tkáň mozku a pankreatu.

Dosavadní stav techniky

Pokud jde například o tkáň chrupavky, ročně se v USA a v Evropě dohromady provádí milion artroskopických operací a celkových náhrad kloubů jenom na lidech. V tom je zahrnuto asi 90 tisíc totálních náhrad kolenních kloubů a kolem 50 tisíc operací korigujících poruchy samotných kolen jenom v USA za rok (Praemer, A., Furner, S., Rice, D.P.: Musculoskeletal Conditions in the United States, Park Ridge, Ill.: American Academy of Orthopaedic Surgeons, 1992, s. 125).

Sebeobnova kloubní chrupavky u lidí je pomalý proces, protože mnohé chondrocyty ztrácejí už v prvním roce života svou schopnost mitózy. Lze předvídat, že se poruchy kloubní chrupavky, zvláště u zatěžovaných kloubů, budou vyvíjet směrem k osteoartritidě. Tomuto negativnímu vývoji nemůže zabránit žádný z obvyklých léčebných způsobů.

Navrtání subchondrální kostní tkáně může vést ke vzniku vazivové chrupavky, jež není elastická a lze ji hodnotit jen jako dočasnou pomoc pozvolna degradující. Pokusy na zvířatech

prokázaly, že introdukce pomnožených chondrocytů jako jsou kloubní chondrocyty může spolehlivě vést k rekonstrukci kloubních poškození (Robinson, D. a další, Isr. Med. Assoc. J., 2000, č. 2, s. 250).

Mezi různými rasami koní v USA a v Evropě je registrováno kolem 5 milionů drahých plnokrevníků používaných při koňských dostizích, z čehož asi odhadovaných 60 % koní přímo nebo nepřímo patří vlastníkům v USA. Ze všech koňských ras jsou plnokrevníci nejčastěji postiženi degenerativními poruchami kloubů, většinou v podobě disekující osteochondrolýzy (OCD). Nejčastěji napadený kloub je tak zvaný femoropatelární kloub, kolenní kloub na zadní noze. Nejobvyklejší věk v němž se u koní a zvláště u závodních koní vyvíjí OCD je mezi 1 a 6 léty. Tato porucha se vyskytuje tím častěji, čím dříve (1 rok nebo méně) se začíná s tréninkem plnokrevníků.

Chirurgický artroskopický zásah se většinou používá v případech s klinickými symptomy. Asi 64 % léčených koní se vrací k dřívějšímu užití (závodění a podobně). Asi 35 % koní se nemůže vrátit k dřívějším dostihovým aktivitám nebo má sníženou schopnost dosáhnout dřívější výkonnosti.

Druhou pozorovanou poruchou označovanou jako OCD je fragmentace zadní části nártního kloubu proximálně nebo plantárně od prvního prstového článku nebo spěnkové kosti. Třetím častým traumatickým stavem dostihových koní je poškození chrupavky kloubního hrbolu hlezenní kosti koně, jež však není pravým OCD. OCD ramenních kloubů často zasahuje rozsáhlé oblasti povrchu kloubů a obvykle dochází k sekundární osteoartritidě.

Byly pokusy na pacientech s vyčištěním a zarovnáním povrchu struktury chrupavek pomocí subchondrálních vrtů, oděrů a podobně, přičemž se též odstraňovala nemocná chrupavka a dokonce i subchondrální kost (Insall, J., Clin. Ortop., 1974, 101: 61; Ficat, R.P. a další, Clin. Ortop. 1979, 144: 74; Johnson L., L., vydavatel McGinty, J.B., Operative Arthroscopy, New York, Raven Press, 1991, s. 341). Dosud však trvá potřeba způsobu regenerativní léčby nebo korekce poruch chrupavky,

který by bylo možno použít v časném stádiu poškození kloubu, čímž by se snížil počet lidských pacientů směřujících k budoucí chirurgické náhradě kloubu kloubem umělým. Kromě toho by bylo výhodné, kdyby se tento způsob hodil pro použití autologního materiálu, to znamená materiálu z téhož savce během celého léčebného procesu nebo alespoň během jeho kritických stupňů.

Oprava defektů kloubní chrupavky se též může provádět jinými způsoby než běžným chirurgickým zákrokem nebo medicínou. Poměrně nový způsob obnovy kloubní chrupavky byl pojmenován autologní implantace chondrocytů (ACI).

Implantace chondrocytů se projevila jako klinicky účinná při obnově hyalinní chrupavky v izolovaných patologických lézích chrupavčitého materiálu lidských kolen v jeho plné tloušťce. Implantaci chondrocytů lidským pacientům provedlo s vynikajícími výsledky několik autorů (Brittberg a další, 1994, New Engl. J. Med.; Minas, T., Am. J. Orthop., 1998, 11: 739), (Roberts, S. a další, Arthritis & Rheumatism, sv. 44, č. 11, listopad 2001, ss. 2586-2598).

Způsob jako našití neštěpeného transplantátu okostice (sejmutého například z holenní kosti) na poškození se v současnosti používá jednak jako léčebný postup sám o sobě, nebo v kombinaci s implantací kultivovaných autologních chondrocytů. Způsoby použití této kombinace vyvinul hlavně Brittberg a další. Buňky kultivované způsoby popsány Brittbergem a dalšími se používají při autologní implantaci v kolenních kloubech pacientů.

Podstata vynálezu

Cílem vynálezu je nabídnout způsoby a prostředky pro odebrání kousku explantátu savčí tkáně, z tohoto kousku savčí tkáně vyprodukovat jednu nebo více jednotek vytvářejících buněčné kolonie (CFU) a použít jednotky vytvářející buněčné kolonie v 1) autologní buněčné terapii, zvláště pro léčbu savce postiženého tkáňovými poruchami a 2) pro způsoby vedoucí k medicínou kompozicím nebo jako diagnostický nástroj.

V jednom aspektu se vynález týká způsobu autologní buněčné léčby savce postiženého tkáňovou poruchou nebo poruchou ve vztahu k tkáním, přičemž tento způsob zahrnuje podávání savci, který takovou léčbu potřebuje, dostatečného množství jedné nebo více jednotek vytvářejících buněčné kolonie nebo kompozice obsahující jednu nebo více jednotek vytvářejících buněčné kolonie.

Vynález se dále týká způsobů, pohotovostních souprav a výrobních jednotek použitelných při produkci jedné nebo více jednotek vytvářejících buněčné kolonie (CFU) ze savčí tkáně.

Proto se v prvním aspektu tento vynález týká způsobu produkce jednotek vytvářejících buněčné kolonie in vitro z explantátu savčí tkáně, který zahrnuje stupně stimulace a kultivace kousku explantátu savčí tkáně v kultivačním médiu s cílem produkovat jednotky vytvářející buněčné kolonie odvozené od nezralých buněk z kousku explantátu, a získání jedné nebo více jednotek vytvářejících buněčné kolonie pro autologní buněčnou implantaci.

V jiném aspektu se vynález týká jedné nebo více jednotek vytvářejících buněčné kolonie produkované uvedenými způsoby, přičemž jsou jednotky vytvářející buněčné kolonie užitečné v lékařství nebo se mohou použít jako diagnostický prostředek.

V dalším aspektu se vynález týká přepravní soupravy pro odběr explantátu savčí tkáně z organismu savce, přičemž souprava obsahuje nástroj pro odebrání explantátu savčí tkáně ze savčí tkáně a přepravní kontejner pro ochranu a dopravu explantátu savčí tkáně, a případně i návod pro použití nástroje pro odebrání tkáně.

V ještě dalším aspektu se vynález týká dodávkové pohotovostní soupravy obsahující kontejner obsahující suspenzi buněk získaných z jedné jednotky vytvářející buněčné kolonie nebo ze skupiny jednotek vytvářejících buněčné kolonie v nosiči. Kromě toho může dodávková souprava obsahovat chrupavku nebo styčnou membránu (viz například WO 01/06949 o podrobnostech těchto membrán).

V jiném aspektu se vynález týká diagnostické metody pro

stanovení biologických aktivit kousku explantátu savčí tkáně v kultivačním systému in vitro, přičemž tato metoda zahrnuje stupně kultivace kousku explantátu savčí tkáně obsahujícího matrix a buňky v kultivačním médiu v nádobě pro kultivaci tkání, a zkoumání a analýzu alespoň části obsahu nádoby pro kultivaci tkání s cílem získat informace o povaze explantátu savčí tkáně týkající se zvláště složení matrix a/nebo informace týkající se buněk získaných z explantátu a jednotek vytvářejících buněčné kolonie.

V posledním aspektu se vynález týká výrobní jednotky pro produkci jednotek vytvářejících buněčné kolonie in vitro z explantátu savčí tkáně, která zahrnuje prostředky pro 1) vnesení kousku explantátu savčí tkáně do nádoby pro kultivaci tkáně, 2) přidání kultivačního média do nádoby pro kultivaci tkáně, 3) stimulaci a kultivaci migrujících buněk z kousku explantátu savčí tkáně do kultivačního média a 4) užití uvolňovacího média v nádobě pro kultivaci tkání.

Vynález nabízí nové způsoby a prostředky pro izolaci buněk a produkci jedné nebo více jednotek vytvářejících buněčné kolonie z kousku tkáňového explantátu bez nutnosti používat degradující enzymy v počáteční operaci izolace buněk s užitím biopsie (odebrání a zkoumání tkáňového vzorku). Vynález poskytuje nové terapeutické způsoby autologní povahy pro savce pro léčbu tkáňových poruch.

Přehled obrázků na výkresech

Vynález se dále objasňuje odkazem na obrázky, mezi nimiž:

Obr. 1 je schematické znázornění nástroje použitelného podle vynálezu pro získání explantátu savčí tkáně definovaného rozměru,

Obr. 2 ukazuje nezralé buňky migrující z explantátů chrupavky a kosti, jež při společné kultivaci produkují jednotky vytvářející buněčné kolonie různých fenotypů. Horní kolonie napravo je osteogenní CFU (jednotka vytvářející kolonie). Dolní kolonie nalevo je chondrogenní CFU,

Obr. 3 ukazuje jednotky vytvářející kolonie získané ze sedmi

různých zdrojů typu explantátů lidských chrupavek,

Obr. 4 ukazuje explantát chrupavčité tkáně získaný nástrojem na obrázku 1. Migrující buňky jsou dobře vidět vně povrchu explantátu tkáně chrupavky,

Obr. 5a a b ukazuje explantáty chrupavky a jednotky vytvářející buněčné kolonie po 4 týdnech kultivace při použití zařízení výrobní jednotky,

Obr. 6 ukazuje chondrogenní buňky získané z chrupavky po aplikaci cholangenázy. Jednovrstevná kultura vykazuje fenotypové změny a fibroblastickou morfologii po 1 týdnu kultivace,

Obr. 7 ukazuje okrajovou část jednotky vytvářející buněčné kolonie nezralých chondrogenních buněk. Nezralé buňky z buněčné kolonie byly izolovány a selektovány systémem chrupavkového explantátu. Buňky ukazují chondrogenní fenotypy, z nich některé s extenzivní produkcí matrix,

Obr. 8 ukazuje snímek z elektronové mikroskopie nově vzniklé chrupavky vyvinuté v jednotce vytvářející kolonie v kultivační nádobě. Nově vytvořená tkáň se skládá z fibril získaných z kolagenů typu II, IX a XI a velkých shluků agrekanu složeného z hyaluronanu, vazebných proteinů a proteoglykanů. Řetězce proteoglykanů při fixaci zkolabovaly a jsou vidět jako černé sférické globulární struktury v těsné blízkosti molekul kolagenů II, IX a XI. Tento snímek z elektronové mikroskopie dokazuje, že buňky chrupavky z jednotek vytvářejících kolonie sekretují velké množství molekul hyalinní chrupavky, což dokazuje výraznou diferenciaci kultivovaného chondroblastu,

Obr. 9 se týká příkladu 9. Obrázek 9a ukazuje jednotku vytvářející kolonie z explantátu z menisku a obrázek 9b ukazuje záběr zblízka na nezralé buňky přítomné v jednotce vytvářející kolonie a získané z explantátu z menisku,

Obr 10 se týká obrázku 7. Obrázek 10a ukazuje jednotky vytvářející kolonie vytvořené z tkáně pacientů č. 21-30. Byly obarveny safraninem O. Obrázek 10 b ukazuje jednotky vytvářející kolonie získané z jedné biopsie (odebraného vzorku) chrupavky. Byly obarveny genciánovou violetí.

Z výše uvedeného je zřejmé, že tento vynález je použitelný

pro jakékoliv buňky, jež lze získat ze savčí tkáně. V následujícím textu se vynález dokumentuje hlavně na příkladu tkáně chrupavky a to jen pro ilustrační účely. Proto se vynález nemá na chrupavkové tkáně omezovat.

Hlavní roli v otázce úspěchu buněčné implantace hraje stav a homogenita buněk určených k implantaci. V případě implantace chondrocytů je nejdůležitější, aby chondrocytová kultura byla životaschopná a vhodná pro pomnožování a po implantaci schopná produkovat dostatečné množství matrix. Je důležité, aby chondrocyty určené k implantaci byly kultivovány v podmínkách nejohleduplnějších a nejpřísnějších kultivačních metod, jež by vylučovaly zbytečné enzymatické poškození buněčné membrány a současně umožňovaly získání optimální chondrocytové kultury pro produkci zdravé hyalinní kloubní chrupavky. Použití způsobů kultivace buněk co nejjemnějších vůči chondrocytům má prvořadou důležitost pro získání dostatečně zdravých buněk implantátu, schopných interakce s okolním prostředím chrupavky in vivo. Totéž platí i pro jiné buňky získané ze savčí tkáně a kultivované mimo organismus savce a potom autologně přenesené po buněčné kultivaci zpět do téhož savce.

Ve zprávě Brittberga a dalších (1994, New Engl.J.Med.; Minas,T., Am.J.Ortop., 1998, 11:739) popisující některé z prvních výsledků autologní implantace chondrocytů pacientům s poruchami chrupavky se konstatuje, že dva měsíce po implantaci kultivovaných chondrocytů se dominantní část obnovované tkáně přemění na vazivovou chrupavku, jež nemá stejné biochemické vlastnosti jako hyalinní chrupavka. Tento problém může být ve vztahu k pozorování, že se izolované chondrocyty kultivované na plastových površích dediferencují na buňky typu fibroblastů a ne na chondrocytový fenotyp. Tento problém se může týkat i jiných buněk kultivovaných v nádobách pro tkáňovou kultivaci, dokud se z buněk nevytvoří jednovrstevná kultura. V případě jednovrstevné kultury se tato kultura z plastového povrchu uvolňuje pomocí enzymu jako například trypsinu a buňky uvolněné z jednovrstevné kultury se přenesou do jiné nádoby pro tkáňovou kultivaci pro další kultivaci.

V místě poškození tkáně dochází po buněčné implantaci k diferenciačnímu procesu buněk. Kultivované buňky procházejí řadou buněčných proměn s konečnou diferenciací na původní fenotyp v místě implantace buněk. Reparace tkáně proto závisí na stupni a typu diferenciacie implantovaných buněk. Méně diferencované a nezralé buňky, například buňky izolované způsobem explantace chrupavky podle tohoto vynálezu, jsou schopny zúčastnit se lokálního opravného procesu, protože tyto typy buněk neztratily svou schopnost dále se v místě implantace diferencovat a zrán. Konečné zrání implantovaných buněk by se mělo řídit podle místního prostředí v místě implantace, aby se zajistila fenotypově správná syntéza matrix a správný vývoj buněk. V tomto případě budou buňky produkovat reparativní tkáň jako je hyalinní chrupavka s morfologickými vlastnostmi jako má poškozená tkáň. Ve srovnání s tím mají buňky v konečném stadiu diferenciacie jako jsou zralé chondrocyty přítomné v chondronech menší schopnost zúčastnit se po buněčné implantaci opravných procesů. Tyto typy buněk jsou často izolovány společně s kolagenem při obvyklých způsobech izolace kolagenázou popsaných jinde v tomto textu.

Systém explantace je založen na koncepci, která používá matrix chrupavky jako "vazebný a dodávkový" systém pro růstové a diferenciační faktory určené pro různé buňky v extracelulární matrix. Růstové a diferenciační faktory přítomné v telecím fetálním séru nebo zvláště přidané do média jako rekombinantní peptidy jsou schopny vázat se v chrupavce pomocí vazebných proteinů přítomných v matrix jako je například decorin, biglykan a fibromodulin. Tento vazebný a dodávkový systém může prodloužit poločas trvání různých růstových a diferenciačních faktorů přítomných v kultivačním médiu, což znamená, že tyto a jiné faktory jsou lépe chráněny před proteolýzou, když jsou nejdříve vázány na své přírodní přechodné molekuly v matrix, jež jsou "dopravními prostředky" k různým buněčným receptorům.

Kromě toho lze předpokládat vyšší stupeň stimulace buněk růstovými a diferenciačními faktory, protože v teritoriálních i v interteritoriálních kompartmentech dochází v okolí

pericelulárního lemu k většímu místnímu nahromadění faktorů ve srovnání s koncentrací těchto faktorů v kultivačním médiu. Vyšší místní koncentrace těchto faktorů vázaných na jejich přírodní ligandy v matrix a později dodávaných vazebným receptorům (například IGFI-R, TGF beta-R, bFGF-R) stimuluje receptory k tvorbě klustrů na membráně plazmy, dále indukuje nitrobuněčnou signalizaci (signal transduction) a stimulaci růstu.

Pro stimulaci a růst různých buněk v matrix je přirozenější a účinnější zahájit proces růstu a diferenciaci v jejich přirozené extracelulární matrix než oddělit buňky od přirozených složek matrix, z níž pocházejí, obvyklými způsoby digesce kolagenázou.

Schopnost chondroblastů nebo chondrocytů zachovat si životnost v chrupavkových explantátech i za nepřítomnosti telecího fetálního séra nebo jiných přidaných růstových faktorů dále naznačuje, že buňky jsou chráněny extracelulární matrix. Kromě toho bylo v nedávné době v naší laboratoři prokázáno, že obvyklá digeste matrix kolagenázou výrazně poškozuje mnoho izolovaných buněk a jiné usmrcuje buněčnou apoptózou. Tyto výsledky dále zdůrazňují důležitost co nejdůslednějšího zachovávání integrity prostředí buněk a matrix před tím, než se buňky kultivované v kultivační nádobě uvolní pro finální implantaci.

Druhým problémem představuje při kultivaci savčích buněk získání homogenní buněčné kultury obsahující buňky stejného původu a současně v dobrém stavu. Pro uvolnění buněk ze savčí tkáně se obvykle užívají proteolytické enzymy, které ničí normální strukturu tkáně takovým způsobem, že po enzymatickém ošetření neexistuje žádná integrální část tkáně. Přihlašující vynálezci však zjistili, že existuje obrovská rozmanitost v kvalitě a kvantitě uvolněných buněk v závislosti na citlivosti buněk nebo matrix vůči použitému proteolytickému enzymu a na umístění a typu buněk uvnitř savčí tkáně.

V současné době se buňky savčí chrupavky uvolňují s použitím přibližně 100 až 150 mg proteolytické kolagenázy na 1

mg tkáňového materiálu působících po určitou dobu. Během této doby se buňky a další komponenty matrix uvolňují z tkáně. Nedigerovaný a dezintegrováný tkáňový materiál se z uvolněných buněk odstraňuje například odstředěním nebo filtrací a buňky se kultivují v kultivačním médiu. Přihlašující vynálezci však zjistili, že použití podobných enzymatických způsobů má za následek izolaci buněk různých fenotypů a různého původu. Během další kultivace se nejživotnější buňky pomnoží a konečná kultura bude směsí buněk. Navíc bylo zjištěno, že tato počáteční enzymatická úprava buněk může mít za následek nežádoucí vlastnosti kultivovaných buněk implantovaných do savce.

Ve stručnosti lze říci, že výše uvedený systém kultivace buněk popsáný v textu na explantátech chrupavky jako jeden příklad pomnožení buněk z explantátů in vitro má mnoho dalších předností ve srovnání se známými způsoby izolace a kultivace chondrocytů. Jak bylo uvedeno výše, buňky z chrupavky si v explantátech udržují svůj stav diferencovaný v matrix zatímco probíhá proces "přírodní" stimulace a pomnožování buněk. Za druhé nejsou buňky vystaveny vysokým koncentracím škodlivé proteolytické aktivity například při digesci matrix kolagenázou. Za třetí se s tímto kultivačním systémem ve výrobní jednotce snáze pracuje a za čtvrté jsou výrobní náklady nižší ve srovnání s běžnými způsoby enzymatické digesce, protože explantátový systém vyžaduje v průběhu procesu izolace buněk i v celém procesu buněčné kultivace méně práce a pozornosti.

Předmětem vynálezu je nabídnout obecný způsob, v němž se savci odebere kousek savčí tkáně a v němž buňky v kousku savčí tkáně není třeba před kultivací uvolňovat. Kultivace kousku savčí tkáně vede ke vzniku jedné nebo více jednotek vytvářejících kolonie, jež se pouze v závěru uvolňují účinkem enzymů z povrchu nádoby pro kultivaci tkání a dále je tento způsob autologní.

Vynález se rovněž týká způsobu autologní léčby savce trpícího tkáňovou poruchou nebo poruchou tkáňového původu,

přičemž tento způsob zahrnuje podávání savci, který to potřebuje, buněk získaných výrobní aplikací vynálezu.

Příklady příslušných tkáňových poruch nebo poruch tkáňového původu představují případy vybrané ze skupiny, kterou tvoří reparace defektů artikulární hyalinní chrupavky v kloubech, nápravy poruch defektů hyalinní nebo vazivové chrupavky v meziobratlových ploténkách, opravy poruch defektů hyalinní nebo vazivové chrupavky hrtanu, modelování pojivové tkáně obsahující elastickou chrupavku používanou v plastické chirurgii, reparace poruch struktury kostí způsobených osteoartritidou, osteoartrózou, osteoporózou, defektních kostních struktur způsobených komplikovanými zlomeninami a atrofickou pseudoartrózou, oprava neuspokojivé struktury čelistní kosti způsobené například použitím titanového šroubu při stomatologickém zákroku, léčba a oprava kožních popálenin nebo jiných kožních poškození způsobených traumaty a kožními tumory jako například hemangiomy a zhoubnými nádory jako melanomy, obnova stěny srdeční komory po infarktu, náprava chorob ve vztahu k centrální nervové soustavě jako je Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, demence, roztroušená skleróza a další systémové mozkové choroby, reparace zánětu sítnice různého patologického původu, oprava pankreatické tkáně v souvislosti s diabetem typu I a/nebo II, reparace cirhózy jater, ztukovatěných jater a rekonstrukce jaterní tkáně po odstranění primárních jaterních karcinomů stejně jako jaterních metastáz, a zlepšení struktury jater u dětí s vrozenými defekty.

Definice

V kontextu této přihlášky a vynálezu se používají výrazy takto definované:

Termínem "autologní buněčná implantace nebo transplantace" se má rozumět způsob, při kterém se z organismu savce odebere biopsie (vzorek) nebo buňky a tyto buňky se kultivují a později vracejí do organismu téhož savce.

Termínem "jednotka vytvářející buněčné kolonie" se má

rozumět kolonie buněk téhož původu, to znamená odvozených od jediné buňky jako například od nezralé buňky, jež migrovala z kousku explantátu savčí tkáně a začala se dělit a vytvářet buněčnou kolonii stranou kousku explantátu savčí tkáně (Obr. 2). Jednotka vytvářející buněčné kolonie obsahuje buňky v několika vrstvách, z nichž první adhezuje na vnitřní povrch nádoby pro kultivaci tkáně, v níž se jednotka vytvářející buněčné kolonie kultivuje a pomnožuje. Jednotka vytvářející buněčné kolonie zvětšuje svůj objem jak ve svislém směru růstem průměru jednotky vytvářející buněčné kolonie, tak vodorovně. Proto se typicky jednotka vytvářející buněčné kolonie liší od jednoduché vrstvy buněk, protože jde o vícenásobnou vrstvu buněk vytvářející buněčný klon.

Termínem "explantát savčí tkáně" se má rozumět část savčí tkáně, jež se explantovala z organismu savce pomocí vhodného nástroje. Explantát může obsahovat více než jeden druh tkáně, například v případě explantace tkáně z kolena může explantát obsahovat chrupavkovou i kostní tkáň. V kontextu tohoto vynálezu se explantace tkáně vhodně provádí reprodukovatelným způsobem, to znamená pomocí dobře definovaného nástroje a dobře definovaného způsobu.

Termínem "kousek explantátu savčí tkáně" se má rozumět část explantátu savčí tkáně definovaného výše. Je výhodné když tato část má dobře definovaný rozměr a získá se z explantátu savčí tkáně seškrabováním nebo krájením na malé kousky. Pro některé účely může být žádoucí použít specifickou část explantátu. Obvykle se tato část odebere ze savčího organismu a použije pro vytvoření jedné nebo více jednotek vytvářejících buněčnou kolonii jak definováno výše. Za pomoci určitých faktorů jsou nezralé buňky schopny migrovat z kousku savčí tkáně do kultivačního média. V kultivačním médiu i v explantátech se nezralé buňky počnou pomnožovat do několika buněk a tím produkují jednotky vytvářející buněčné kolonie. Jedna nezralá buňka přitom založí jednu jednotku vytvářející buněčnou kolonii. Z kousku explantátu savčí tkáně však může migrovat několik nezralých buněk a založit v jedné a téže

nádobě pro kultivaci tkání několik jednotek vytvářejících buněčnou kolonii. V jednom kousku explantátu savčí tkáně může být přítomno několik druhů buněk, ale v tomto vynálezu jde o to, že z kousku explantátu savčí tkáně jsou schopny migrovat do kultivačního média nezralé buňky a začít s pomnožováním. Zralé buňky naproti tomu zůstávají v kousku explantátu savčí tkáně a tento kousek explantátu savčí tkáně takto slouží jako filtr zadržující určité buňky a selektující jiné druhy buněk. Proto se pomocí kousku explantátu savčí tkáně dosáhne buněčné selekce.

Použitý systém kultivace buněk explantátu je postaven na koncepci, jež používá matrix chrupavky jako první vazebný a dodávkový systém pro růstové faktory a cytokiny určené nezralým buňkám obsaženým v extracelulární matrix. Růstové faktory a cytokiny přítomné v kultivačním médiu počnou difundovat do explantátů a po určité době se v matrix ustavují různé koncentrační gradienty růstových faktorů a cytokinů. Soudí se, že v důsledku toho nezralé buňky počnou migrovat proti těmto gradientům. Po přibližně 1-2 týdnech kultivace jsou nezralé buňky na povrchu explantátů a nakonec zakládají stranou tkáně jednotky vytvářející buněčné kolonie.

Termín "nezralá buňka" má znamenat buňku shodnou s kmenovou buňkou nebo buňku patřící do generace předků jako je například prechondroblast nebo dokonce chondroblast. Nezralé buňky jsou schopny migrovat uvnitř kousku explantátu savčí tkáně směrem k okolnímu kultivačnímu médiu a tyto buňky jsou též schopny migrovat v samotném kultivačním médiu. V případě chrupavkového explantátového systému se migrace v matrix omezuje na obvodové oblasti chrupavkové biopsie, protože stimulované buňky jsou uvnitř matrix chrupavky vychytávány hustě konstruovanou kolagenovou sítí. Migrace může být ovlivněna několika faktory. Poté co migrovaly ven z kousku explantátu savčí tkáně jsou nezralé buňky schopny pomnožování a založení jedné nebo více jednotek vytvářejících kolonii, jak uvedeno výše.

Termínu "migrace" se má rozumět tak, že nezralé buňky jsou

mobilní. Tyto buňky jsou schopny omezené migrace uvnitř kousku explantátu savčí tkáně, ven z kousku explantátu savčí tkáně do kultivačního média a uvnitř kultivačního média.

Termín "produkovat, zakládat" má znamenat rozsáhlé pomnožování nezralých buněk na malé nebo velké jednotky vytvářející buněčné kolonie. Produkované buňky pocházejí z téže rodičovské buňky a též se diferencují do téhož typu buňky.

Termín "matrix" má znamenat extracelulární bílkoviny tkáně.

Termín "opláchnutí" má znamenat vystavit kousek explantátu savčí tkáně působení kapaliny takovým způsobem, aby se odstranila krev, nežádoucí materiál savčí tkáně a/nebo jiné nežádoucí složky. Tyto složky se mohly přichytit na kousek explantátu savčí tkáně a lze je odstranit s použitím například vodného média.

Termín "vodné médium" má znamenat médium obsahující vodu a/nebo kapalinu rozpustnou ve vodě. Je výhodné, když toto médium obsahuje vodu. Obsah vody může být 1 až 100 % hmotn./hmotn., obvykle bývá v rozmezí od asi 60 do asi 100 %. hmotn./hmotn. Doporučené vodné médium je fyziologický roztok s pH od asi 5 do asi 9. Vodné médium však má být zvoleno tak, aby se minimalizovalo riziko poškození kousku explantátu savčí tkáně, přičemž na druhé straně musí být schopno odstranit nežádoucí látky nebo snížit jejich množství. Toto médium může navíc obsahovat sérum nebo jiné složky zlepšující oplachový účinek. Příkladem vhodného média je PBS nebo DMEM/F12.

Termín "nástroj" má znamenat nástroj s ostrou koncovou partií pro vsunutí nástroje do tkáně a má mít dobře definovaný lumen pro vynesení explantátu tkáně. Nástroj může mít tvar jehly jaká se ukazuje například na obrázku 1. Velikost nástroje není důležitá a může kolísat v závislosti na velikosti kousku explantátu savčí tkáně potřebné pro získání buněčné kultury.

Termín "dílčí úprava" má znamenat úpravu kousku explantátu savčí tkáně s cílem získat otevřenou strukturu explantátu. Úprava je tak jemná, že se tkáň neporušuje a tkáňový explantát se podstatně nezneškodňuje, to znamená že nedochází k

uvolňování buněk nebo jiných částí buněčného explantátu. Dílčí úprava usnadňuje difúzi a/nebo migraci růstových faktorů, metabolitů a nezralých buněk do tkáňového explantátu nebo z něho ven.

Termín "kultivační médium" má znamenat médium schopné vyvolat a zajistit migraci nezralých buněk z tkáňového materiálu do okolního média, jeho zachycení na vnitřním povrchu nádoby pro tkáňovou kultivaci obsahující kousek explantátu savčí tkáně a kultivační médium, a dále pomnožování a diferenciaci nezralých buněk do jednotek vytvářejících kolonie.

Termínem "nádoba pro kultivaci tkání" se má rozumět jakákoliv běžná nádoba pro kultivaci tkání dobře známá odborníkům. Nádoba pro kultivaci tkání může mít různé tvary a velikosti. Tato nádoba na kultivaci tkání však musí umožňovat buňkám adherovat na stěně a tam se vyvíjet a musí mít alespoň jeden konec, který lze otevírat a zavírat.

Termín "chrupavka" má znamenat pojivovou tkáň obsahující kmenové buňky, prechondroblasty, chondroblasty a chondrocyty uložené v extracelulární matrix. Chrupavka zahrnuje hyalinní, hyalinní kloubní, elastickou a vazivovou chrupavku.

Termín "uvolňovat" má znamenat uvolňování buněk z povrchu nádoby pro kultivaci tkání, k němuž buňky adherují při kultivaci, a dále znamená uvolňování buněk adherujících jedna ke druhé. Uvolnění buněk dává možnost získat buňky z buněčné kultury. Příkladem činidla, jehož je možno užít pro uvolňování buněk, je trypsin nebo chelatační pufový systém obsahující EDTA. Uvolnění jednotek vytvářejících buněčné kolonie se může provést i stíráním buněk.

Termín "elektromagnetická indukce" má znamenat elektromagnetickou indukci, jejímž výsledkem je nitrobuněčná signalizace (signal transduction) například v buňkách obsažených v kousku explantátu savčí tkáně, čímž se buňky obsažené v kousku explantátu savčí tkáně aktivují. Elektromagnetická indukce se výhodně může provádět pomocí přerušovaného nebo spojitého pulzního pole v rozmezí od asi 0,1 do asi 0,8 mT. Jediné omezení velikosti elektromagnetického

indukčního pole představuje požadavek, aby buňky zůstaly životaschopné a schopné pomnožování i po aplikaci elektromagnetické indukce.

Termín "nosič" má znamenat kapalný, tekutý, polopevný nebo pevný nosič. Pro farmaceutické účely musí být nosič farmaceuticky přijatelný, což je norma dobře známá odborníkům. Farmaceuticky přijatelný nosič má tedy označovat jakýkoliv materiál, který je inertní v tom smyslu, že sám o sobě nemá žádný podstatný terapeutický a/nebo profylaktický účinek.

Termín "biologický materiál" má znamenat jakoukoliv buněčnou složku, kterou mohou produkovat buňky obsažené v jednotce vytvářející buněčnou kolonii v množství, jež dovoluje výrobu této složky ve velkém měřítku. Touto složkou může být například jakýkoliv užitečný protein jako jsou například enzymy, kolageny, proteoglykany, glykosaminglykany a hyaluronová kyselina.

Termín "biochemická analýza" má znamenat jakoukoliv biochemickou analýzu, kterou lze provádět s kouskem explantátu savčí tkáně. Analýza se může provádět s cílem hodnotit obsah DNA, RNA a/nebo určité bílkoviny nebo aktivitu určitého genového vývoje v buňkách získaných z kousku explantátu savčí tkáně. Zjistí se tím stav explantátu savčí tkáně. Ze stavu kousku chrupavky získané ze savčího organismu lze například předvídat budoucí defekty chrupavky, například osteoartritidu a tím i indikovat nutnost preventivní léčby předcházející vývoji této poruchy.

Termín "porucha tkáně" má znamenat tkáňové poruchy ve tkáních jako jsou defekty chrupavky, kosti, pojivové tkáně, svalové tkáně, kožní tkáně, slizniční tkáně, mozkové tkáně, srdeční tkáně, tkáně ledvin, tkáně pankreatu a jaterní tkáně u savců. Chrupavka: - artikulární defekty hyalinní chrupavky v kloubech a opravy defektů v hyalinní a/nebo vazivové chrupavce v meziobratlových ploténkách. Dále defekty hrtanu v souvislosti s poruchami pojiv v hyalinní a/nebo vazivové chrupavce. Kost: - defektní kostní struktury vyvolané osteoartritidou, osteoartrózou, osteoporózou a defektní kostní struktury

způsobené složitými zlomeninami a atrofickou pseudoartrózou. Dále v případě vadné struktury čelistní kosti. Poruchy pojivové tkáně: - způsobené kožními spáleninami nebo jinými kožními defekty v důsledku traumat a kožních tumorů jako například hemangiomy a zhoubných nádorů jako jsou melanomy. Sval: - poruchy stěny srdeční komory v důsledku infarktu. Kůže: - kožní spáleniny nebo jiné kožní defekty v důsledku traumat a kožních tumorů jako například hemangiomy a zhoubných nádorů jako jsou melanomy. Mozek: - choroby centrální nervové soustavy jako například Parkinsonova nemoc, Alzheimerova nemoc, demence, rozptýlená skleróza a další systémové mozkové choroby. Oko: - zánět sítnice různého patologického původu. Srdce: - infarkt stěny srdeční komory. Pankreas: - tkáň pankreatu po cukrovce prvního a druhého typu. Játra: - reparace cirhózy jater, ztukovatěných jater a rekonstrukce defektů jaterní tkáně po odstranění primárních karcinomů jater a jaterních metastáz. Kromě toho strukturní poruchy jater dětí s vrozenými defekty.

Způsoby produkce jednotek vytvářejících buněčné kolonie in vitro ve výrobní jednotce

V jednom aspektu se vynález týká způsobu produkce jednotek vytvářejících buněčné kolonie in vitro za použití stupňů a) kultivace kousku explantátu savčí tkáně v kultivačním médiu s cílem získat jednotky vytvářející buněčné kolonie z nezralých buněk pocházejících z kousku explantátu savčí tkáně a b) získání jedné nebo více jednotky vytvářející buněčné kolonie pro použití v autologních způsobech implantace nebo transplantace buněk.

Při použití neporušeného kousku explantátu savčí tkáně (to znamená kousku v němž nedošlo k působení enzymů při uvolňování buněk) se nezralé buňky udržují po celou počáteční fázi kultivačního procesu uvnitř struktury matrix. Tím se chrání měnící se prostředí buňky s jeho makromolekulami včetně proteinů vážících buňky i organizace chondronů ve fibrilární síti v teritoriální matrix kolem jednotlivé buňky, což má za následek řízenou kultivaci buněk z hlediska fenotypové

stability.

Tento způsob může zahrnovat stupeň migrace nezralých buněk z explantátu savčí tkáně do kultivačního média. Migrující buňky se kultivují v trojrozměrném systému jako malé i velké kolonie buněk na plastových površích. Jednotky vytvářející kolonie vznikající z migrujících buněk mají po určité době kultivace značnou tendenci splývat. Během produkční doby však nejsou jednotky vytvářející kolonie z plastového povrchu uvolňovány žádným uvolňujícím médiem. Proto nedochází k poškození buněk a další diferenciaci buněk probíhá během celého kultivačního procesu. Již dříve bylo pozorováno, že když se buňky jako chondrocyty rozvrství na povrchu nádoby pro kultivaci tkání v nízkohustotní jednoduché vrstvě, potom se tyto buňky kultivované v jednoduché vrstvě podobají fibroblastům a zjevně nejsou chondrocyty (viz obr. 6). Nakonec jsou jednotky vytvářející kolonie před užitím v autologní implantaci buněk uvolněny z nádoby pro kultivaci tkání.

Explantát savčí tkáně a manipulace s ním

Explantát savčí tkáně použitý podle vynálezu se zvolí mezi tkáněmi vytvořenými buňkami ze skupiny, kterou tvoří mezenchymální buňky, ektodermální buňky a endodermální buňky, výhodně ze skupiny kterou tvoří chrupavka, kost jako například kostní dřeň, pojivová tkáň, svalová tkáň jako například tkáň hladkého svalstva, tkáň srdce, tkáň jater a tkáň kosterního svalstva, dále kožní tkáň jako například okostice, slizniční tkáň, mozková tkáň, tkáň ledvin, tkáň pankreatu a pankreatické ostrůvky, výhodně chrupavka jako je elastická, vazivová, hyalinní nebo artikulární hyalinní chrupavka.

Explantát savčí tkáně se může odebrat výše definovaným nástrojem. Tento nástroj je konstruován tak, aby optimálně odebral kousek savčí tkáně aniž by došlo k poškození okolní tkáně. Dobře definovaný lumen (světlost) nástroje může mít různé rozměry a tvary v závislosti na odebírané tkáni. Průřez tedy může být kruhový nebo polygonální a průměr kruhu nebo mnohoúhelníku může být v rozmezí od asi 0,3 do asi 100 mm, tedy

například od asi 2 mm do asi 10 mm. Vhodný celkový tvar nástroje je válec. Délka nástroje není důležitá, pokud má délku vhodnou pro odebrání specifického explantátu savčí tkáně a pro manipulaci s tímto nástrojem. Jeden konec tohoto cylindrického nástroje je zaostřen, aby snadněji pronikal do specifické tkáně a má kónický tvar. Nástroj se může vyrobit z jakéhokoliv vhodného materiálu za předpokladu že má potřebnou pevnost, aby vnikl do tkáně a pronikl jí. V případě chrupavky musí být nástroj vyroben z příslušně zpevněného materiálu jako je například kov nebo ocel. Z tohoto nástroje se explantát může vyjmout různými způsoby, výhodně vyříznutím nebo vyražením, výhodněji vyražením. Obrázek 1 ukazuje jeden příklad nástroje vhodného pro odebrání explantátu savčí tkáně (viz též obrázek 4, na němž se nástroj použil pro získání kousku explantátu savčí tkáně, například kousku chrupavky). Kousek chrupavky se může získat z kloubu jako je například koleno savce jako je člověk, domácí nebo dostihové zvíře včetně koní nebo velbloudů. V tomto speciálním případě se nástroj konstruuje jako jehla ze zpevněného materiálu schopná proniknout chrupavkou a odebrat explantát. Jehla může mít různé průměry zaostřeného konce umožňující odebírat explantáty různých rozměrů. Nástroj může být na jedno použití nebo pro vícenásobné používání.

Před provedením stupně a) se explantát savčí tkáně může skladovat. Explantát savčí tkáně se může skladovat buď jako celý explantát nebo alespoň jako část původního explantátu savčí tkáně. Skladování může probíhat při teplotě od asi -180 °C do asi 37 °C, výhodně od asi -180 °C do asi -70 °C nebo od asi -70 °C do asi 10 °C, výhodně při teplotě asi -180, asi -70, asi 4 °C nebo asi 8 °C, přičemž výhodnější je asi -70 °C a ještě výhodnější asi -180 °C. Skladování se může provádět ve studené místnosti, běžném mrazáku, laboratorním mrazáku při teplotě od asi -70 °C do asi -80 °C, v kapalném dusíku nebo jako lyofilizovaná tkáň případně společně s vhodným pevným nosičem. Před stupněm a) se skladovaný kousek explantátu savčí tkáně odstraní z místa skladování a v určitých případech se při tomto způsobu před stupněm a) teplota postupně zvyšuje ze

skladovací teploty na vyšší teplotu.

Úprava explantátu savčí tkáně před kultivací

Způsob tvorby jednotek vytvářejících buněčné kolonie obvykle dále zahrnuje doplňkové stupně jako je stupeň oplachování explantátu savčí tkáně před stupněm a). Oplach se provádí za účelem odstranění nežádoucích složek přichycených na explantátu savčí tkáně, jež by mohly inhibovat a/nebo ovlivnit migraci a pomnožování nezralých buněk a tím inhibovat vznik jednotek vytvářejících kolonie buněk. Oplachování se může provádět vodným médiem s pH od asi 5 do asi 9, výhodně blízko pH 7,4. Příklady vodných médií představuje jakákoliv forma roztoků fyziologických solí nebo PBS, jak se popisuje v příkladu 1.

Jiné doplňkové stupně mohou zahrnovat úpravy prováděné před stupněm a) jako je dílčí úprava s použitím jednoho nebo více proteolytických enzymů samotných nebo v kombinaci s předúpravou vodným médiem. Dílčí úprava kousku explantátu savčí tkáně jedním nebo více proteolytickými enzymy se provádí v takových podmínkách, které umožňují otevření struktury explantátu savčí tkáně a tím usnadňují difúzi růstových faktorů a migraci nezralých buněk do a/nebo z explantátů savčí tkáně před stupněm a). Proto zůstává kousek explantátu savčí tkáně do té míry neporušený, že se z kousku explantátu savčí tkáně neuvolňují před kultivací žádné buňky nebo jiné složky. Dílčí úprava kousku explantátu savčí tkáně se může provádět s použitím jednoho nebo více proteolytických enzymů v koncentraci v rozmezí od asi 1 do asi 90 U/mg explantátu savčí tkáně, v praxi například od asi 1 do 10 U/mg, od asi 1 do 5 U/mg nebo asi 2,5 U/mg. Dílčí úprava kousku explantátu savčí tkáně se může provádět s použitím proteolytických enzymů jako jsou proteinázy a/nebo trypsin, výhodně proteinázy vybrané ze skupiny, kterou tvoří aspartátové proteinázy jako katepsin D, cysteinoové proteinázy jako katepsin B, L, S, K a kalpainy I a II, serinové proteinázy jako neutrofilní elastáza, katepsin G a proteináza 3 a metaloproteinázy jako MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-

4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-18, MMP-18, MMP-19, MMP-20 a/nebo trypsin. Předběžná úprava kousku explantátu savčí tkáně vodným médiem se může provádět vodným médiem s pH ležícím nejméně $\pm 0,5$ od pH 7,4 (fysiologické pH), jako pH v rozmezí od asi 4 do asi 6,9, jako například od asi 5 do asi 6,9, od asi 6 do asi 6,9, jako například asi pH 6,5, nebo pH v rozmezí od asi 7,9 do asi 10 jako například od asi 7,9 do asi 9, od asi 7,9 do asi 8,5 jako například pH 8,0.

Kultivace kousku explantátu savčí tkáně

Kousek explantátu savčí tkáně se případně ponechá v nádobě během kultivace až do odebrání jedné nebo více jednotek vytvářejících buněčné kolonie. V případě ponechání tkáně v celém procesu kultivace jsou nezralé buňky produkující jednotky vytvářející buněčné kolonie touto metodou méně zatěžovány a proto lze očekávat lepší výsledky.

Kromě toho, když se vyřadí stupeň odstranění kousku explantátu savčí tkáně z nádoby, jsou tkáňové kultury méně vystaveny působení okolních mikrobiálních faktorů, jež by mohly proniknout do nádoby s tkáňovou kulturou v tom stupni, kdy je nutno otevřít nádobu pro kultivaci tkáně a vložit nebo vyjmout složky.

Kultivační médium

Kousek explantátu savčí tkáně se kultivuje v nádobě pro kultivaci tkáně za použití vhodného kultivačního média, nebo alternativně dvou nebo více vhodných kultivačních médií. V průběhu celého přihlašovaného způsobu lze podle vynálezu použít jedno médium nebo se alternativně mohou při tomto způsobu kultivace použít dvě nebo více různých kultivačních médií. V případě že se při způsobu kultivace použijí dvě nebo více různých kultivačních médií, může kultivační médium (média) obsahovat různé složky. Kultivační médium (média) obsahují jednu nebo více složek vybraných ze skupiny, kterou tvoří metabolity jako například sacharidy, lipidy a aminokyseliny,

vitaminy, růstové faktory, cytokiny, minerály a bakteriostatika, výhodně kultivační médium obsahuje savčí sérum jako je lidské sérum, sérum z domácího a/nebo dostihového zvířete (například koně nebo velblouda), výhodně je savčí sérum autologní vůči explantátům savčí tkáně použitým v průběhu výše uvedených způsobů. Příkladem vhodného kultivačního média je DMEM/F12 s 10 až 20 % telecího fetálního séra.

Podle jednoho provedení vynálezu obsahuje první kultivační médium nejméně jedno neautologní sérum, které se použije na počátku procesu. Před získáváním a uvolňováním buněk se první kultivační médium zamění za druhé kultivační médium obsahující nejméně jedno autologní sérum, což umožní redukovat a/nebo odstranit nežádoucí imunogenní složky z neautologního séra použitého v prvním kultivačním médiu.

Alternativně může být kultivační médium založeno na syntetickém nebo semisyntetickém médiu, to znamená médiu bez nebo v podstatě bez savčího biologického materiálu. K takovému médiu lze přidat jiné faktory jako výše zmíněné. Patent USA 6,150.163 podává příklad vhodného kultivačního média.

V případě potřeby způsob podle vynálezu též zahrnuje stupeň obohacení kultivačního média růstovými faktory dodanými buď do explantátu savčí tkáně a/nebo do kultivačního média v nádobě pro kultivaci tkání.

Navíc může způsob podle vynálezu uvedený výše použit kontinuální nebo přerušované dodávky kultivačního média, složek kultivačního média nebo jiných činidel do nádoby pro kultivaci tkání, čímž se docílí řízeného přívodu výše uvedených složek nebo činidel. V takovém případě je nádoba pro kultivaci tkání opatřena vstupní a výstupní částí (otvory) pro kontinuální a/nebo přerušovanou dodávku. V některých případech může být výhodné, aby se kontinuální a/nebo přerušovaný přívod ustavil při takových podmínkách, při nichž vznikne mezi vstupním a výstupním koncem nádoby tlakový rozdíl.

Jak uvedeno výše, způsob podle vynálezu se provádí v běžné nádobě pro kultivaci tkání. Objem a tvar nádoby pro kultivaci tkání však není důležitý, pokud je pro daný účel vhodný a může

se přizpůsobit množství produkovaných jednotek vytvářejících buněčné kolonie pomocí výše uvedených způsobů.

Uvolňování jednotek vytvářejících buněčné kolonie

Jednotky vytvářející buněčné kolonie lze uvolňovat uvolňovacím médiem. Tento stupeň zahrnuje styk jednotek vytvářejících buněčné kolonie s uvolňovacím médiem, což umožňuje uvolnění buněk jednotek vytvářejících buněčné kolonie z nádoby pro kultivaci tkání a od sebe navzájem, přičemž je uvolňovací médium vodné médium případně obsahující jeden nebo více enzymů vybraných mezi trypsinem a dalšími enzymy. Alternativně může uvolňovací médium být pufr jako pufr PBS bez iontů dvojmocných kovů. Uvolňování jednotek vytvářejících kolonie se provádí s cílem odstranit jednotky vytvářející buněčné kolonie z nádoby pro kultivaci tkání, čímž vznikne možnost přenést jednotky vytvářející buněčné kolonie do nové nádoby pro kultivaci tkání, kde lze jednotky vytvářející buněčné kolonie dále kultivovat.

Alternativně se v kombinaci s tímto výrobním způsobem může zařadit stupeň expozice explantátu savčí tkáně elektromagnetické indukci. Stupeň elektromagnetické indukce se může provádět pro usnadnění pomnožování a migrace nezralých buněk z kousku explantátu savčí tkáně.

Za určitých podmínek se mohou jednotky vytvářející buněčné kolonie přenést do jiné nádoby pro kultivaci tkání za účelem další kultivace.

Jednotky vytvářející buněčné kolonie (CFU)

Jednotky vytvářející buněčné kolonie produkované tímto způsobem pocházejí z nezralých buněk získaných ze tří vrstev tkání jako je vrstva mezenchymální, ektodermální a endodermální, přednostně jde o mezenchymální buňky odvozené od kmenových buněk, prechondroblasty, chondroblasty, chondrocyty, preosteoblasty, osteoblasty, osteocyty, premyoblasty, myoblasty, myocyty, cementoblasty, cementocyty, odontoblasty, odontocyty, ameloblasty, amelocyty, fibroblasty nebo fibrocyty.

Při kultivaci kousku explantátu savčí tkáně lze po startu proliferace nezralých buněk za vzniku jednotek vytvářejících buněčné kolonie provést analýzu, což umožní ověřit identitu buněk uvnitř jednotky vytvářející buněčné kolonie. Je výhodné když kousek explantátu savčí tkáně je chrupavka, například elastická, vazivová, hyalinní nebo artikulárně hyalinní a nezralé buňky v explantátu proliferují na prechondroblasty, chondroblasty nebo chondrocyty. Je-li kousek explantátu savčí tkáně kost, nezralé buňky proliferují na preosteoblasty, osteoblasty nebo osteocyty. Chondrocyty nebo chondroblasty se mohou analyzovat morfogenní analýzou světelnou mikroskopií nebo detekcí syntézy kolagenu typu II nebo hyalinu a sekrece způsoby, jež zahrnují analýzu RNA nebo proteinu jako je PCR nebo westernový přenos proteinů.

Způsob podle vynálezu se normálně provádí při teplotě asi $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Jak se však ukazuje v příkladech, lze užít i nižších teplot v případech kdy se požaduje pomalejší proliferace.

Je třeba zmínit, že způsob kultivace chrupavkových buněk je předmětem patentové přihlášky PCT/EPO0/07111 od těchž vynálezců jako jsou přihlašovatelé tohoto vynálezu. V případě relevance a pouze pro identický předmět lze zavést disclaimer.

Kompozice s jednou nebo více jednotkou vytvářející buněčné kolonie.

Vynález se dále týká jednotky vytvářející buněčné kolonie nebo skupiny jednotek vytvářejících buněčné kolonie nebo jejich suspenzí vyrobených způsobem podle vynálezu popsány v kapitole "Způsoby produkce jednotek vytvářejících buněčné kolonie in vitro..".

Kromě toho se vynález týká kompozice obsahující jednu nebo více jednotek vytvářejících buněčné kolonie produkovaných způsobem podle vynálezu a nosič. Je výhodné, když jedna nebo více jednotek vytvářejících buněčné kolonie a nejméně část nosiče jsou autologní jako například autologní sérum. Nosič byl definován v kapitole Definice.

Buňky jedné nebo více jednotek vytvářejících buněčné kolonie jsou v nosiči normálně přítomny v suspendované nebo dispergované formě.

Nosič může také obsahovat činidla upravující pH, solubilizační činidla, smáčedla a pufry. Rovněž může nosič obsahovat přísady jako například vhodné soli jako soli s alkalickými kovy nebo s kovy alkalických zemin jako sodík, draslík, vápník a hořčík i například zinečnaté soli. Jiné příklady představují stabilizátory, konzervační prostředky, činidla pro úpravu osmózy a isotonicity, neionogenní tenzidy, antioxidanty i sérum jako například autologní sérum. Nosič také může obsahovat metabolity jako například aminokyseliny, lipidy a/nebo sacharidy, živiny a/nebo minerály a také může obsahovat látky aktivní terapeuticky nebo profylakticky jako léky nebo imunosupresivní činidla.

Příklady polotuhých nosičů představují polyethylenglykoly, glykofuroly a podobně.

Výše zmíněná kompozice se též může používat jako farmaceutická nebo diagnostická kompozice nebo pro izolaci, purifikaci nebo pro produkci biologického materiálu. Farmaceutická kompozice se může použít samotná nebo spolu s nosičem jak je výše popsáno. Je výhodné, když je alespoň část nosiče autologní, například sérum získané z téhož savce, z jakého pochází savčí tkáň, již se používá ve způsobu podle vynálezu. Farmaceutická kompozice může dále obsahovat složky získané z matrix včetně kolagenových proteinů jako jsou například kolageny typu II, IV, IX a XI, proteoglykany jako například agregany, dekorin, fibromodulin a biglykan i nekolagenové proteiny jako je kryoprecipitát, fibronectin, vitronektin, fibronogen, fibrilin, kistrin, echistatin, von Willebrandův faktor, tenascin a anchorin CII, včetně dalších stimulačních faktorů popsaných v patentové přihlášce PCT/EP00/07111.

Farmaceutická kompozice podle vynálezu se může použít při léčbě savců trpících tkáňovými chorobami, jako jsou například poruchy chrupavky a/nebo kosti. Savci zahrnují lidi nebo domácí

nebo dostihová zvířata včetně koní a velbloudů.

Diagnostická kompozice podle vynálezu se může použít v diagnostických způsobech pro výzkum problémů týkajících se tkáňových poruch jako je diagnostická metoda zmíněná v dalším.

Předmětem izolace, čištění nebo produkce biologických materiálů může být jakýkoliv materiál jako DNA, RNA nebo protein, který lze získat z jedné nebo více jednotek vytvářejících buněčné kolonie, jako jsou tyto jednotky vytvářející buněčné kolonie produkované způsoby podle vynálezu.

Kromě toho výše zmíněné jednotky vytvářející buněčné kolonie, skupiny jednotek vytvářejících buněčné kolonie nebo kompozice mohou být použity v lékařství například pro léčbu tkáňových poruch jako jsou poruchy chrupavek nebo kostí.

Nadto výše zmíněné jednotky vytvářející buněčné kolonie a skupiny jednotek vytvářejících buněčné kolonie se mohou použít pro výrobu farmaceutické kompozice pro léčbu tkáňových poruch, výhodně pro léčbu poruch chrupavky a/nebo kostí savců, výhodněji pro léčbu poruch chrupavky a/nebo kostí u lidí nebo u domácích nebo dostihových zvířat včetně koní a velbloudů.

Přepavní souprava pro odebírání explantátu savčí tkáně ze savce

Vynález se dále týká přepavní pohotovostní soupravy. Přepavní souprava je určena pro odebrání explantátu savčí tkáně ze savčího organismu a obsahuje zde popsany nástroj pro odebrání explantátu savčí tkáně ze savčí tkáně a přepavní nádobu pro uchovávání explantátu savčí tkáně a případně návodu pro užívání výše definovaného nástroje.

Tento nástroj je konstruován tak, aby optimálně odebral kousek savčí tkáně aniž by došlo k poškození okolní tkáně. Dobře definovaný lumen nástroje může mít různé rozměry a tvary v závislosti na odebírané tkáni. Explantát se může vyjmout ze savčí tkáně různými způsoby, výhodně vyříznutím nebo vyražením, výhodněji vyražením. Obrázek 1 ukazuje jeden příklad vhodného nástroje, jímž se odebírá kousek chrupavky. Kousek chrupavky se může získat z kloubu savce jako je například člověk, domácí

nebo dostihové zvíře včetně koní nebo velbloudů. V tomto speciálním případě se nástroj konstruuje jako jehla ze zpevněného materiálu schopná proniknout chrupavkou a odebrat explantát. Jehla může mít různé průměry zabroušeného konce umožňující pronikat do tkání a odebírat explantáty různých rozměrů. Nástroj může být na jedno použití nebo pro vícenásobné používání.

Souprava případně obsahuje návod pro použití nástroje v zájmu reprodukovatelnosti, například aby bylo možno získat totéž množství explantátu savčí tkáně z téhož místa savčí tkáně.

Přepravní souprava může dále obsahovat vzorkovnici na krev pro odebrání autologního vzorku krve ze savce, čímž vznikne možnost použít kultivační médium obsahující autologní sérum uvedeným způsobem buď v celém průběhu provedení nebo jen v závěrečné části tohoto způsobu, jak je popsáno výše v kapitole "Způsoby produkce jednotek vytvářejících buněčné kolonie in vitro..".

Přenosná souprava se též může použít pro odebrání savčího explantátu pro použití v biochemickém testu pro stanovení DNA, RNA a/nebo proteinu.

Dodávková souprava obsahující jednu nebo více jednotek vytvářejících buněčné kolonie pro autologní buněčnou implantaci.

Vynález se dále týká dodávkové soupravy obsahující alespoň první a druhý kontejner, přičemž první kontejner obsahuje buňky získané způsobem podle vynálezu a nosič, zatímco druhý kontejner obsahuje chrupavku a/nebo styčnou (interfaciální) membránu. Příklad použitelné chrupavky a/nebo styčné membrány se popisuje v patentové přihlášce PCT/EP00/07111.

Dodávková souprava je vhodná pro použití při léčbě savců trpících výše definovanými tkáňovými poruchami jako jsou poruchy chrupavky a/nebo kosti. Savci se rozumí lidé nebo domácí a/nebo dostihová zvířata jako koně nebo velbloudi.

Výrobní jednotka pro produkci jedné nebo více jednotek vytvářejících buněčné kolonie určených pro způsoby autologní implantace buněk.

Výrobní jednotka pro in vitro produkci jednotek vytvářejících buněčné kolonie z explantátu savčí tkáně zahrnující prostředky pro vnesení kousku explantátu savčí tkáně do nádoby pro kultivaci tkání, přidání kultivačního média do nádoby pro kultivaci tkání, pěstování buněk migrujících z kousku explantátu savčí tkáně do kultivačního média a přidání uvolňovacího média do nádoby pro kultivaci tkání jak je výše popsáno a definováno. Výrobní jednotka může dále obsahovat prostředky pro kontinuální nebo přerušovanou dodávku kultivačního média, uvolňovacího média a/nebo jednoho nebo více faktorů vybraných ze skupiny kterou tvoří metabolity jako například sacharidy, lipidy a aminokyseliny, vitaminy, růstové faktory, cytokiny, minerální látky a bakteriostatika. Příklad výrobní jednotky určené pro autologní implantační/transplantační způsoby se popisuje v příkladu 1 a ve výrobním schématu na obrázku 5.

Farmaceutické použití a příslušné formulace

V jednom aspektu se buňky nebo kompozice podle vynálezu používají pro výrobu farmaceutické kompozice pro léčbu chorob, zvláště chorob jako jsou tkáňové poruchy týkající se chrupavky, kosti, pojivových tkání, svalové tkáně, kožní tkáně, slizniční tkáně, mozkové tkáně, srdeční tkáně, ledvinové tkáně, defektů tkáně pankreatu a jaterní tkáně savců a dále definovaných v kapitole Definice, přednostně defektů chrupavky a/nebo kosti.

V jiném aspektu se buňky nebo kompozice podle vynálezu používají při způsobu léčby savců trpících chorobami tkání a tkání se týkajících, přičemž tato metoda zahrnuje podávání savci, který to potřebuje, dostatečného množství jednotky vytvářející buněčné kolonie nebo skupiny jednotek vytvářejících buněčné kolonie nebo kompozice.

V ještě dalším aspektu se buňky nebo kompozice podle vynálezu používají v autologním způsobu léčby savců trpících

chorobami tkání nebo ve vztahu k tkáním, přičemž tato metoda zahrnuje podávání savci který to potřebuje dostatečného množství jednotky vytvářející buněčné kolonie nebo skupiny jednotek vytvářejících buněčné kolonie nebo kompozice. Tento způsob zařazuje v případě potřeby při produkci jednotky vytvářející buněčnou kolonii nebo skupiny jednotek vytvářejících buněčnou kolonii nebo kompozice stupeň použití autologního materiálu z téhož savce jako například autologní sérum.

Diagnostický způsob pro určení biologických aktivit

Kromě toho se vynález týká diagnostického způsobu stanovení biologických aktivit v kousku explantátu savčí tkáně z kultury in vitro, přičemž tento způsob zahrnuje stupně pěstování kousku explantátu savčí tkáně obsahujícího matrix a nezralé buňky v kultivačním médiu v nádobě pro kultivaci tkání a zkoumání alespoň části obsahu nádoby pro kultivaci tkání s cílem získat informace o povaze explantátu savčí tkáně a/nebo nezralých buněk, jako je schopnost explantátu chrupavky produkovat jednotky vytvářející buněčné kolonie (obrázek 3). Diagnostická metoda může mít povahu histochemického a/nebo cytopatologického výzkumu. Dále může mít tato diagnostická metoda charakter výzkumu, například biochemické analýzy pro stanovení DNA, RNA a/nebo proteinu.

Materiály a způsoby

Kultivační médium nebo sterilní kultivační médium:

DMEM/F12 obsahující 20 % telecího fetálního séra. DMEM/F12 (katalogové číslo 31331-028) získané od Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA a telecí fetální sérum od Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA.

Od firmy Life Technologies Inc., Rockville, MD, USA byly získány následující materiály:

Trypsin 0,25%: kat. č. 25200-056

Telecí fetální sérum: kat. č. 10084-168, vsádka č. 302528 1A

Fungizon: kat. č. 15290-026

Gentamycin: kat. č. 15710-031

Nádoba pro kultivaci tkání: Easy flask: 25 cm², kat. č. 156367A

Nádoba pro kultivaci tkání: Easy flask: 75 cm², kat. č. 156499A

PBS bez Mg, Ca: kat. č. 14190-094

PBS s 1 mM Mg a 1 mM Ca

2-fosfát L-askorbové kyseliny od firmy Sigma, kat. č. A8960

Příklady provedení vynálezu

PŘÍKLAD 1

Způsob kultivace explantátů chrupavky a produkce jednotky nebo jednotek pro vytváření buněčných kolonií in vitro pro použití při autologní implantaci chondrocytu (ACI)

V současné době se chrupavkový explantátový systém používá ve firemní jednotce pro produkci buněk v rámci klinického pokusu IBO-ACI-02, který zkoumá reparační účinnost kultivovaných autologních chondrocytů implantovaných do defektní kloubní chrupavky kolena. Do prosince 2001 se odebíraly chrupavkové biopsie sedmi pacientům trpícím problémy s koleny. Všechny tyto explantáty ze sedmi biopsií se potom pomnožily na asi 11 milionů buněk a úspěšně implantovaly pacientům ve dvou dánských nemocnicích v okolí Kodaně. První výsledky klinického výzkumu budou k dispozici během let 2003/2004.

Stručně řečeno, chrupavková biopsie se odebrala z kolen pacientů a ihned přenesla do sterilního kultivačního média doplněného 2-fosfátem kyseliny L-askorbové [50 µg/ml(300 µmol/l)] a síranem gentamycinu [50 µg/ml(10 mmol/l)], fungizone [2 µg/ml(2,2 µmol/l)] v nádobách pro kultivaci tkání. Potom se chrupavková biopsie opatrně promyla PBS s hořčíkem a vápníkem. Po umístění v kultuře to chrupavkovým explantátům v závislosti na materiálu donora několik dní trvá než dosáhnou konstantního metabolického stavu. Po dosažení tohoto stabilního stavu (rovnovážný stav mezi syntézou a katabolismem) se nezralé buňky - prechondroblasty a chondroblasty - stimulovaly růstovými faktory přítomnými v

kultivačním médiu, které difundovaly skrze matrix chrupavky, a vázaly se na různé vazebné proteiny obsažené v matrix i přímo na selektivní receptory buněk.

Stimulované a proliferující buňky zůstávají v explantátech obvykle jeden až dva týdny (v závislosti na materiálu donora) a potom opouštějí explantát migrací buněk i chemotaxí do kultivačního média pro následné přilnutí na povrch nádoby pro kultivaci tkání a produkci jednotek vytvářejících buněčné kolonie.

Po 3 až 5 týdnech kultivace se vyvinuly menší i větší jednotky vytvářející buněčné kolonie (viz obr. 5A a 5B) a buňky se z nádoby odstranily pomocí trypsinu.

Do nádoby pro kultivaci tkání se po výplachu přidalo autologní kultivační médium obsahující 10 % savčího séra místo 20 % telecího fetálního séra a následovaly další 2 až 3 dny kultivace, pak uvolnění buněk z kultivační nádoby a jejich dodání v podobě suspenze buněk v nosiči do klinik a nemocnic.

PŘÍKLAD 2

Diferenciální izolace chondrogenních buněčných linií v chrupavkovém explantátovém systému

Chrupavková biopsie se odebrala z kolen pacientů pomocí jehly nebo skalpelu a přenesla se do sterilního kultivačního média jak je výše popsáno. Kousek chrupavky se odřízl vodorovně (tangenciálně na povrch chrupavky) pomocí ostrého sterilního skalpelu v různých zónách. Tyto řezy se prováděly pod mikroskopem při laminárním proudění vzduchu s cílem zajistit správné oddělení a selekci. Kousek chrupavky se může několikrát vodorovně seřezávat do různých zón nebo se biopsie chrupavky seřízne jen jednou ve dvou vrstvách. Po rozdělení různých vrstev chrupavky do sterilních zkumavek v případě několikanásobného řezu se kousky chrupavky posléze několikrát promyly pufrem PBS s hořečnatými a vápenatými ionty před přenesením kousků chrupavky do nádob pro kultivaci tkání. Další proces buněčné kultivace probíhal stejně jak se popisuje v popisu provedení v příkladu 1.

PŘÍKLAD 3

Dílčí enzymatická úprava explantátů chrupavky surovou kolagenázou s cílem získat CFU podle vynálezu.

Z pacientova kolena se odebrala chrupavková biopsie hmotnosti 100 mg a přenesla se do sterilního kultivačního média s antibiotikem a fungizone podle popisu v příkladu 1. Chrupavková biopsie se promyla PBS s hořčíkovým a vápníkovým pufrem a ostrým sterilním skalpelem se rozřezala vertikálně a horizontálně na kousky chrupavky velikosti 2 až 4 mm (explantáty). Chrupavkové explantáty ve 25 ml kultivačního média se přidaly do nádoby pro kultivaci tkání s povrchem 75 cm² společně s 10 U/ml (10 U/ml x 25 ml = 250 jednotek) surové kolagenázy z *Clostridium Histolyticum* typu 1A (C9891) nebo typu 1 (C0130), nebo typu VIII (C2139), typu II (C6885) nebo typu IV (C5138) nebo typu V (C9283) (všechny od firmy Sigma Chemicals). Nádoba pro kultivaci tkání se potom 18 hodin inkubovala při 37 °C s 5 % CO₂ za mírného třepání.

Po 18 hodinách inkubace se surovou kolagenázou se explantáty chrupavky promyly v 40 µm čističi buněk se 100 ml PBS bez hořčíku a vápníku a s 50 ml kultivačního média v tomtéž čističi buněk. Rozmanité procedury promývání explantátů jsou důležité pro odstranění kolagenázy přítomné v explantátech chrupavky.

Po poslední promývací proceduře se upravené (předběžně digerované) explantáty chrupavky (a případně uvolněné buňky) nyní přidaly do nové nádoby pro kultivaci tkání (75 cm²) s novým kultivačním médiem. Poslední část procesu pěstování buněk z explantátů chrupavky nyní probíhala jak je popsáno v příkladu 1.

PŘÍKLAD 4

Úprava explantátů chrupavky pomocí kultivačního média upraveného na pH 6,5

Chrupavková biopsie hmotnosti asi 100 mg se odebrala ze stehenního kondylu pacienta a přenesla se do sterilního

kultivačního média obsahujícího antibiotikum a fungizon jak je popsáno v příkladu 1. Chrupavková biopsie se promývala v pufru PBS s hořčíkem a vápníkem s pH 6,5 a ostrým sterilním skalpelem se rozřezala vertikálně a horizontálně na kousky chrupavky velikosti 2 až 4 mm (explantáty). Chrupavkové explantáty se vnesly do nádoby pro kultivaci tkání obsahující 25 ml kultivačního média upraveného sterilní HCl na pH 6,5 a 18 hodin inkubovaly za teploty 37 °C při mírném třepání. Po inkubaci v kultivačním médiu s pH 6,5 se explantáty chrupavky promyly v čističi buněk s 50 ml normálního fyziologického pufru PBS s hořčíkem a vápníkem (pH 7,4) a s 50 ml kultivačního média použitého v příkladu 1. Promyté chrupavkové explantáty se potom přidaly do nové nádoby pro kultivaci tkání (75 cm²) s novým kultivačním médiem (25 ml) a dále se pěstovaly jak se popisuje v příkladu 1.

Získané CFU byly v souladu s vynálezem.

PŘÍKLAD 5

Časový posun migrace buněk a pomnožování chondrogenních buněk v chrupavkovém explantátu při změně teploty inkubace a koncentrace séra v kultivačním médiu

Chrupavková biopsie se odebrala ze stehenního kondylu pacienta a přenesla od sterilního média jak se popisuje v příkladu 1. Chrupavková biopsie se pečlivě promyla novým kultivačním médiem jak se popisuje v příkladu 1. Kultivační médium se v tomto okamžiku skládalo z 5 % FCS, což znamená nižší koncentraci například růstových faktorů v tomto médiu. Chrupavková biopsie (100 mg) se rozřezala horizontálně a vertikálně ostrým skalpelem a explantáty se přidaly k 5% kultivačnímu médiu v množství 25 ml, načež následovala inkubace nádoby pro kultivaci tkání (75 cm²) s explantáty při 37 °C a 5 % CO₂ po dobu 72 hodin a občasné protřepání kultivační nádoby (v úhlu 5 stupňů). Po skladování explantátů v klidovém stavu po dobu 72 hodin v inkubátoru s CO₂ lze explantáty chrupavky přenést do nové nádoby pro kultivaci tkání s novým kultivačním médiem obsahujícím 20 % FCS a inkubovat při 37 °C s 5 % CO₂ jak

se popisuje v příkladu 1. Další kultivace buněk explantátu pokračuje stejným postupem jak se popisuje v příkladu 1.

Získané CFU byly v souladu s vynálezem.

PŘÍKLAD 6

Kultivace explantátů okostice odebraných z proximální mediální tibie

Neštěpený transplantát okostice se odebral z tkáně proximální mediální tibie nástrojem "elevator" a přidal se k pufru PBS obsahujícím hořčík a vápník ve sterilní zkumavce. Transplantát se pravoúhle rozřezal ostrým skalpelem na několik kousků tkáně. Malé kousky tkáně okostice se v jinou dobu promyly v pufru PBS před přidáním explantátů okostice do kultivačního média jak se popisuje v příkladu 1.

Po vložení nezralých mezenchymálních buněk z okostice do kultivačního média a jejich stimulaci růstovými faktory to těmto buňkám trvá 1 až 2 týdny než se migrací uvolní z explantátu a usadí se na plastovém povrchu, čímž vzniknou jednotky vytvářející buněčné kolonie. Mezenchymální progenitorové buňky s multipotencilárními vlastnostmi zakládají na plastových površích jednotky vytvářející buněčné kolonie fibroblastického vzhledu. Tyto kolonie se vzájemně liší rozměry (průměrem) i počtem buněk a vykazují tutéž fenotypovou morfologii, jaká se popisuje u buněk prekursorů trámčiny kostní dřeně.

Jednotlivé kolonie se dále mohou množit, zvyšovat množství buněk a být použity pro autologní způsoby implantace buněk a reparační procesy.

Zde se při izolační a selekční proceduře nezralých mezenchymálních buněk - v tomto případě nezralých mezenchymálních buněk obsažených v neštěpeném transplantátu okostice (ve vrstvě kambia) odebraném z holeně, opět uplatnila a použila znalost migrace buněk ovlivněné chemotaktickými faktory, k níž dochází u vybrané skupiny buněk mezenchymálního, ektodermálního a endodermálního původu v explantátech pěstovaných v kultivačním prostředí.

Získané CFU byly v souladu s vynálezem.

PŘÍKLAD 7

Použití chrupavkového explantátového systému pro účely analýzy chrupavky

Název projektu: studie životnosti týkající se kultivace lidských chondrocytů získaných z pacientů podstupujících artroskopii pro optimalizaci autologní implantace chondrocytů (ACI).

Následující výzkum popsany v tomto příkladu byl schválen Vidskabsetiske Komite for Københavns Amt pod registrací č. KA 99148m(190201).

Postup:

Stručně řečeno, z proximální oblasti stehenního kondylu se ocelovou jehlou o průměru 2 mm odebraly dvě malé chrupavkové biopsie hmotnosti 1 až 3 mg. Standardizované bioptické vzorky chrupavky se získávají od pacientů například při artroskopické prohlídce a během 24 hodin se při teplotě místnosti dodávají do laboratoře v přepravním médiu (DMEM/F12, sulfát gentamicinu [50 µg/ml (10 mmol/l)], fungizon [2 µg/ml (2,2 µmol/l)]).

V cytologické laboratoři se oba vzorky chrupavky nejprve promyjí v pufru PBS s vápenatými a hořečnatými ionty aby se zajistilo, že vzorky nebudou kontaminovány krevními buňkami nebo osteogenními buněčnými liniemi a podobně. Biopsie se zvaží na mikrováze a navíc se zaznamená délka každé biopsie. Před stimulací a kultivací jednoho z obou vzorků explantátu chrupavky v kultivačním médiu se obě chrupavkové biopsie nejprve odříznou ostrým skalpelem pod tkáňovým rozhraním aby se z analýzy vyloučily kostní buňky a osteoidní materiál v matrix. Jedna z obou chrupavkových biopsií se použije jako reference pro stanovení cytologického a histopatologického stavu obou vzorků odebraných z téhož místa. Referenční vzorek se po posledním promytí fixuje na 48 hodin v PBS s 10 % formalinu, načež následuje histologická preparace zahrnující zalití, řez a barvení barvivy jako je safranin O, toluidinová modř, hematoxolin & eosin a genciánová violet (dobře známé

odborníkům).

Druhý chrupavkový vzorek se kultivuje 30 dní (kultivační médium se vyměňuje každých 3 až 4 dní) v kultivačním médiu DMEM/F12 s 20 % telecího fetálního séra, gentamycinem, askorbovou kyselinou a fungizonem jak se popisuje v příkladu 1.

Při každé výměně média se supernatanty shromažďují a skladují v mraznici při -80°C pro pozdější biochemickou analýzu.

Po 30 dnech kultivace se jak jednotky vytvářející buněčné kolonie přítomné v kultivační nádobě (25 cm^2), tak vzorek explantátu chrupavky promyjí jednou v PBS s 1 mM Mg a 1 mM Ca a fixují se 48 hodin v PBS s 10 % formalinu před barvením safraninem 0, genciánovou violetí nebo jinými barvivými (dobře známými odborníkům).

Všechny jednotky vytvářející buněčné kolonie přítomné v kultivační nádobě (25 cm^2) se měří a jednotky vytvářející buněčné kolonie se spočítají a zaznamenají. Aktuální počty přítomných kolonií chondrogenních buněk a velikost jejich průměrů (určitý průměr kolonie odpovídá přibližným počtům buněk a generací buněk) se porovnají s histologickým a cytopatologickým stavem referenčního vzorku a s kultivovaným chrupavkovým explantátem.

Všechny výsledky biochemických studií supernatantu, buněčných testů a histologických preparátů biopsií se v současné době analyzují a zkoumají a budou porovnány s klinickými daty pacientů jako jsou: pohlaví, věk, fyzické aktivity, celkový zdravotní stav, výživa, traumata, choroby a podobně s cílem získat další informace o příčině nebo příčinách pacientových problémů s kolenem nebo koleno a o celkové kvalitě kloubní chrupavky v kolenu.

Pro tento klinický výzkumný projekt poskytlo chrupavkové biopsie celkem 51 pacientů.

Konečný výsledek klinických výzkumů bude k dispozici během let 2002/2003.

PŘÍKLAD 8

Srovnávací měření růstových faktorů a cytokinů v telecím fetálním séru a lidském autologním séru

Autologní kultivační médium obohacené rekombinantními růstovými faktory a cytokiny:

Základní médium DMEM/F12 s 5 % lidského autologního séra (připraveného z krve pacienta) se obohatí lidskými rekombinantními růstovými faktory a cytokiny jako je TGF-beta 1 (0,1 až 20 $\mu\text{g/ml}$), IGF-1 (0,1 až 20 $\mu\text{g/ml}$), IGF-2 (0,1 až 20 $\mu\text{g/ml}$), inzulin (1 až 100 $\mu\text{g/ml}$), EGF (0,1 až 20 $\mu\text{g/ml}$), FGF-B (0,1 až 10 $\mu\text{g/ml}$), PDGF (0,1 až 20 $\mu\text{g/ml}$), GM-CSF (0,1 až 20 $\mu\text{g/ml}$), IL-6 (0,1 až 20 $\mu\text{g/ml}$), IL-8 (0,1 až 20 $\mu\text{g/ml}$) spolu s vitaminem D3 (0,1 až 10 $\mu\text{g/ml}$), askorbová kyselina (50 $\mu\text{g/ml}$, Sigma), fungizon (2 $\mu\text{g/ml}$, Gibco) a sulfát gentamycinu (100 U/ml, Gibco). Titrací a obohacením rekombinantními růstovými faktory a cytokiny se relativní koncentrace těchto faktorů v autologním kultivačním médiu upraví na jejich relativní koncentraci v kultivačním médiu s 20 % telecího fetálního séra jak popsáno v dalším.

Pro detekci relativních koncentrací růstových faktorů a cytokinů v telecím fetálním séru proti lidskému séru se použil test s imun sorbentem vázaným na enzym (ELISA). Vzorke lidského séra se získaly od různých pacientů podstupujících autologní implantaci chondrocytů.

Relativní kvantifikace faktorů TGF-beta 1, IGF-1, IGF-II, inzulinu, EGF, FGF-B, PDGF, IL-6, IL-8, GM-CSF v telecím fetálním séru a lidském séru se provedly sendvičovou formou ELISA za použití monoklonálních protilátek specifických pro detekci receptivních růstových faktorů a cytokinů. Všechny monoklonální protilátky se získaly od BIODSIGN International (Saco, Maine, USA).

Monoklonální protilátky pěstované proti růstovým faktorům a cytokinům se zředily v médiu DMEM/F12 v 96 jamkách plotny ELISA (NUNC imunoplotna) a inkubovaly při 4 °C 24 hodin. Po 24 hodinách inkubace se plotny ELISA omyly a blokovaly v DMEM/F12

s 0,1 % Tween 20.

Vzorky lidského séra, kultivační médium (připravené podle popisu v příkladu 1) a nezředěné telecí fetální sérum od firmy Life Technology se v dalším postupně ředily a přidaly k monoklonálním protilátkám v systému ELISA. Vzorky se inkubovaly v jamkách 2 hodiny a potom následovala další promývací procedura s médiem DMEM/F12 obsahujícím 0,1 % Tween 20. Různé růstové faktory a cytokiny vázané na "primární" protilátky v jamkách se dále přidaly k "druhé" monoklonální protilátce v poslední části sendvičového systému ELISA jak je popsáno výše a nakonec se vyvíjely s "třetí" monoklonální protilátkou vázanou na enzym (alkalická fosfatáza od firmy BIODSIGN) pěstovanou proti sekundárním protilátkám.

Plotny ELISA se snímaly čtečkou ELISA a výsledky se vyjádřily v různých titračních křivkách pro porovnání relativních koncentrací růstových faktorů a cytokinů ve vzorcích lidského séra, telecího fetálního séra a kultivačního média s 20 % telecího fetálního séra.

Kultivační médium s 20 % telecího fetálního séra (dříve testovaného proti 30 vzorkům explantátů lidské chrupavky) se použilo jako koncový bod titrace při zjišťování optimální koncentrace růstových faktorů a cytokinů v autologně obohaceném 5% kultivačním médiu. Jinými slovy, když koncentrace faktoru TGF-betal stanovená ve výše uvedeném systému ELISA je nižší ve vzorku lidského séra než v telecím fetálním séru, potom je třeba rekombinantní lidský TGF-betal přidat (pro obohacení) do autologního kultivačního média s 5 % lidského séra. Naopak když koncentrace například IGF-1 je vyšší ve vzorku lidského vzorku než ve 20% telecím fetálním séru, potom se tímto faktorem autologní kultivační médium už neobohacuje.

Takto lze relativní koncentraci uvedených růstových faktorů a cytokinů stanovit pro všechny vzorky lidského séra použité pro kultivaci buněk a posléze, po úpravě například rekombinantními proteiny s cílem dosáhnout optimální koncentrace těchto faktorů v autologním kultivačním médiu, i pro správnou a bezpečnou kultivaci savčích buněk.

PŘÍKLAD 9

Od pacientů podstupujících operaci kolena byl získán kousek menisku a tato biopsie se vložila do pufru PBS s hořčíkem a vápníkem ve sterilní zkumavce. Tato tkáň byla pod laminárním prouděním vzduchu rozdělena vertikálními a horizontálními řezy pomocí ostrého a sterilního nože do několika kousků tkáně. Jindy se malé kousky tkáně promyly několikrát v pufru PBS ještě před přidáním explantátů do kultivačního média jak je popsáno v návodu pro příklad 1.

Po umístění v kultivačním médiu a stimulaci pomocí růstových faktorů trvalo nezralým mezenchymálním buňkám z menisku asi 2 týdny uvolnit se migrací z explantátu a usadit se na plastovém povrchu, a začít zakládat jednotky vytvářející kolonie.

Mezenchymální předci založily v tomto příkladě na plastových površích jednotky vytvářející buněčné kolonie se vzhledem fibroblastů. Kolonie se lišily rozměry (průměrem) a počtem buněk a vykazovaly fenotypové morfologie podobající se fibroblastům. Jednotlivé kolonie se dále mohly pomnožovat do početnějších buněčných kolonií, jestliže se jako jednotlivé jednotky vytvářející kolonie klonovaly do větších nádob pro kultivaci tkání.

Dalším cílem v tomto projektu je použít jednotky vytvářející kolonie získané z explantátu chrupavky z menisku autologními způsoby implantace buněk pro reparace poškozených menisků v koleně.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

B999

1. Způsob produkce jednotek vytvářejících buněčné kolonie in vitro ve výrobním měřítku z explantátů savčí tkáně, vyznačující se tím, že zahrnuje stupně:

a) pěstování kousku explantátu savčí tkáně v kultivačním médiu s cílem získat jednotky vytvářející buněčné kolonie z nezralých buněk obsažených v kousku explantátu a

b) získávání buněk z jedné nebo více jednotek vytvářejících kolonie pro použití v autologních způsobech implantace a transplantace buněk.

2. Způsob podle nároku 1, vyznačující se tím, že dále zahrnuje stupeň migrace a selekce nezralých buněk z explantátu savčí tkáně do kultivačního média.

3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, vyznačující se tím, že se explantát savčí tkáně selektuje z tkáně pocházející z buněk odvozených ze skupiny, kterou tvoří mezenchymální, ektodermální a endodermální vrstvy.

4. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že explantát savčí tkáně se vybere ze skupiny, kterou tvoří chrupavka, kost jako například kostní dřeň, pojivová tkáň, svalová tkáň jako například tkáň hladkého svalstva, srdeční tkáň, jaterní tkáň a tkáň kosterního svalstva, kožní tkáň jako například okostice, slizniční tkáň, mozková tkáň, tkáň pankreatu a krevní cévy.

5. Způsob podle nároku 4, vyznačující se tím, že savčí tkáň je chrupavka jako například elastická, vazivová, hyalinní nebo artikulární hyalinní chrupavka.

6. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že dále zahrnuje stupeň opláchnutí kousku explantátu savčí tkáně před provedením stupně a) nároku

1.

7. Způsob podle nároku 6, vyznačující se tím, že se toto opláchnutí provede oplachovým médiem jako je vodné médium s pH od asi 5 do asi 9.

8. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že se celý nebo alespoň část explantátu savčí tkáně před provedením stupně a) nároku 1 skladuje při teplotě od asi -180 °C do asi 37 °C, jako například od asi -180 °C do asi -70 °C nebo od asi -70 °C do asi 10 °C.

9. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že se explantát savčí tkáně získá pomocí nástroje, který má ostrou koncovou část umožňující vsunutí nástroje do tkáně, a dobře definovaný lumen umožňující odebrání explantátu z tkáně.

10. Způsob podle nároku 9, vyznačující se tím, že se kousek explantátu savčí tkáně odřízne nebo vyrazí z explantátu savčí tkáně.

11. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že se explantát savčí tkáně před provedením stupně a) nároku 1 částečně ošetří jedním nebo více proteolytickými enzymy.

12. Způsob podle nároku 11, vyznačující se tím, že se toto částečné ošetření provede v podmínkách, jež umožňují otevření struktury explantátu savčí tkáně a tím usnadňují difúzi růstových faktorů, metabolitů a nezralých buněk uvnitř explantátu savčí tkáně a/nebo ven z něho.

13. Způsob podle nároku 11 nebo 12, vyznačující se tím, že se částečné ošetření jedním nebo více proteolytickými

enzymy provádí při koncentracích od asi 1 do asi 90 U/mg explantátu savčí tkáně.

14. Způsob podle nároku 13, vyznačující se tím, že se částečné ošetření jedním nebo více proteolytickými enzymy provádí při koncentracích od asi 1 do 10 U/mg explantátu savčí tkáně.

15. Způsob podle nároku 14, vyznačující se tím, že se částečné ošetření jedním nebo více proteolytickými enzymy provádí při koncentracích od asi 1 do asi 5 U/mg, jako například 2,5 U/mg, explantátu savčí tkáně.

16. Způsob podle kteréhokoli z nároků 11 až 15, vyznačující se tím, že proteolytický enzym je proteináza.

17. Způsob podle nároku 16, vyznačující se tím, že se proteinázy zvolí ze skupiny, kterou tvoří aspartátové proteinázy jako katepsin D, cysteinové proteinázy jako katepsin B, L, S, K a kalpainsy I a II, serinové proteázy jako neutrofilní elastáza, katepsin G, proteináza 3 a metaloproteinázy jako MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-4, MMP-5, MMP-6, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-18, MMP-18, MMP-19, MMP-20 a trypsin.

18. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že se explantát savčí tkáně předběžně ošetří vodným médiem s pH nejméně $\pm 0,5$ od pH 7,4 (fyziologické pH) jako například pH v rozmezí od asi 4 do asi 6,9 nebo pH v rozmezí od asi 7,9 do asi 10.

19. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že kultivační médium obsahuje jednu nebo více složek vybraných ze skupiny, kterou tvoří metabolity jako například sacharidy, lipidy, aminokyseliny, vitaminy,

růstové faktory, cytokiny, minerály a bakteriostatika.

20. Způsob podle nároku 19, vyznačující se tím, že kultivační médium obsahuje savčí sérum jako například sérum z člověka, domácího nebo dostihového zvířete včetně koně nebo velblouda.

21. Způsob podle nároku 20, vyznačující se tím, že lidské sérum je autologní k explantátu savčí tkáně použitému při způsobu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 19.

22. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 19 až 21, vyznačující se tím, že kultivační médium zahrnuje DMEM/F12 a jeden nebo více růstových faktorů v množství od asi 1 pikogramů/ml až asi 100 mikrogram/ml.

23. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že se kousek explantátu savčí tkáně při kultivaci zachová až například do doby získání jedné nebo více jednotek vytvářejících buněčné kolonie.

24. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že se jednotky vytvářející buněčné kolonie získávají z nezralých buněk vybraných ze skupiny, kterou tvoří buňky mezenchymálního, ektodermálního a endodermálního původu.

25. Způsob podle nároku 24, vyznačující se tím, že jednotky vytvářející buněčné kolonie jsou jednotky vytvářející buněčné kolonie zahrnující buňky zvolené ze skupiny kterou tvoří nezralé buňky, kmenové buňky, prechondroblasty, chondroblasty, chondrocyty, preosteoblasty, osteoblasty, osteocyty, myoblasty, myocyty, cementoblasty, cementocyty, odontoblasty, odontocyty, ameloblasty, amelocyty, fibroblasty a fibrocyty.

26. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že dále zahrnuje stupeň analýzy a identifikace buněk jednotek vytvářejících kolonie.

27. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že dále zahrnuje stupeň kontaktování jednotek vytvářejících buněčné kolonie s uvolňovacím médiem, jež umožňuje uvolnění buněk jednotek vytvářejících buněčné kolonie z nádoby na kultivaci tkání.

28. Způsob podle nároku 27, vyznačující se tím, že uvolňovací médium je vodné médium případně obsahující jeden nebo více enzymů vybraných ze skupiny, kterou tvoří proteinázy jako je trypsin.

29. Způsob podle nároku 27 nebo 28, vyznačující se tím, že uvolňovací médium je pufr jako pufr PBS bez iontů dvojmocných kovů.

30. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že dále zahrnuje stupeň působení elektromagnetické indukce na kousek explantátu savčí tkáně.

31. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že dále zahrnuje stupeň obohacení explantátu savčí tkáně a/nebo kultivačního média v nádobě pro kultivaci tkáně růstovými faktory a/nebo cytokiny.

32. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že dále zahrnuje zajištění nepřetržitého a/nebo přerušovaného přívodu kultivačního média, složek kultivačního média nebo jiných činidel do nádoby pro kultivaci tkání.

33. Způsob podle nároku 32, vyznačující se tím, že nádoba pro kultivaci tkání má koncový díl se vstupním a

výstupním otvorem pro nepřetržitý a/nebo přerušovaný přívod, a tím, že nepřetržitý a/nebo přerušovaný přívod je zajištěn takovým způsobem, aby vznikl tlakový rozdíl mezi vstupním a výstupním koncovým dílem.

34. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků, vyznačující se tím, že zahrnuje stupeň oplachu a/nebo kultivace získaných jednotek vytvářejících buněčné kolonie médiem obsahujícím alespoň jisté množství tekutiny získané ze savce.

35. Způsob podle nároku 34, vyznačující se tím, že tato tekutina savčího původu je autologní ke kousku explantátu savčí tkáně kultivovanému podle kteréhokoliv z předchozích nároků.

36. Způsob podle kteréhokoliv z předchozích nároků pro produkci jednotek vytvářejících buněčné kolonie in vitro z explantátu savčí tkáně, vyznačující se tím, že zahrnuje prostředky pro 1) vnesení kousku explantátu savčí tkáně do nádoby pro kultivaci tkání, 2) aplikaci kultivačního média do nádoby pro kultivaci tkání, 3) kultivaci buněk migrujících z kousku explantátu savčí tkáně do kultivačního média a 4) vnesení uvolňovacího média do nádoby pro kultivaci tkání.

37. Způsob podle nároku 36, vyznačující se tím, že dále zahrnuje prostředky pro nepřetržitý nebo přerušovaný přívod kultivačního média, uvolňovacího média a/nebo jednoho nebo více faktorů vybraných ze skupiny, kterou tvoří metabolity jako jsou sacharidy, lipidy a aminokyseliny, vitaminy, růstové faktory, cytokiny, minerály a bakteriostatika.

38. Buňky, získatelné způsobem podle kteréhokoliv z předchozích nároků.

39. Kompozice, vyznačující se tím, že zahrnuje buňky

podle nároku 38 a nosič.

40. Kompozice podle nároku 39, vyznačující se tím, že buňky a nosič jsou autologní vůči danému savci.

41. Kompozice podle nároku 39 nebo 40, vyznačující se tím, že buňky a nosič jsou autologní vůči danému savci a nosičem je sérum.

42. Kompozice podle nároků 39 až 41, vyznačující se tím, že nosič dále obsahuje složky matrix.

43. Použití buněk podle nároku 38 nebo kompozice podle nároků 39 až 42 pro lékařské účely.

44. Použití buněk podle nároku 38 pro výrobu farmaceutické kompozice pro léčbu tkáňových poruch.

45. Použití podle nároku 44 pro léčbu poruch chrupavky a/nebo kosti u savců.

46. Použití podle nároku 44 nebo 45 pro léčbu poruch chrupavky a/nebo kosti u lidí nebo u domácích nebo dostihových zvířat včetně koní a velbloudů.

47. Přeprovací souprava pro odběr explantátu savčí tkáně savce z organismu savce, vyznačující se tím, že zahrnuje nástroj definovaný v nároku 9 pro odběr explantátu savčí tkáně ze savčí tkáně a přeprovací kontejner pro úschovu explantátu savčí tkáně a případně návod pro používání nástroje.

48. Přeprovací souprava podle nároku 47, vyznačující se tím, že se odebraný explantát savčí tkáně použije při způsobu podle kteréhokoliv z nároků 1 až 37.

49. Přeprovací souprava podle nároku 47 nebo 48,

vyznačující se tím, že souprava dále zahrnuje vzorkovnici na krev pro odběr vzorku autologní krve z organismu savce.

50. Přepravní souprava podle kteréhokoliv z nároků 47 až 50 pro odběr savčího explantátu pro jeho užití v biochemickém studiu při stanovení DNA, RNA a/nebo proteinu.

51. Dodávková souprava obsahující nejméně první a druhý kontejner, vyznačující se tím, že první kontejner obsahuje buňky podle nároku 38 a nosič a druhý kontejner obsahuje chrupavku a/nebo styčnou membránu.

52. Způsob autologní léčby savce trpícího tkáňovou poruchou nebo poruchou tkáňového původu, vyznačující se tím, že zahrnuje podávání buněk podle nároku 38 nebo kompozice podle kteréhokoliv z nároků 39 až 42 savci, který to potřebuje.

53. Způsob podle nároku 52, savci, který to potřebuje, podávaná kompozice zahrnuje autologní materiál včetně autologního séra z téhož savce.

54. Způsob podle nároku 52 nebo 53 pro autologní léčbu savce trpícího tkáňovou poruchou nebo poruchou tkáňového původu vybranou ze skupiny, kterou tvoří reparace defektů artikulární hyalinní chrupavky v kloubech, nápravy poruch defektů hyalinní nebo vazivové chrupavky v meziobratlových ploténkách, opravy poruch defektů hyalinní nebo vazivové chrupavky hrtanu, modelování elastické pojivové tkáně obsahující elastické chrupavky používané v plastické chirurgii, reparace poruch struktury kostí způsobených osteoartritidou, osteoartrózou a osteoporózou, defektních kostních struktur způsobených komplikovanými zlomeninami a atrofickou pseudoartrózou, oprava neuspokojivé struktury čelistní kosti způsobené například použitím titanového šroubu při stomatologickém zákroku, léčba a oprava kožních popálenin nebo jiných kožních poškození

způsobených traumaty a kožními tumory jako například hemangiomy a zhoubnými nádory jako melanomy, obnova stěny srdeční komory po infarktu, náprava chorob ve vztahu k centrální nervové soustavě jako je Parkinsonova choroba, Alzheimerova choroba, demence, roztroušená skleróza a další systémové mozkové choroby, reparace zánětu sítnice různého patologického původu, oprava pankreatické tkáně v souvislosti s diabetem typu I a/nebo II, reparace cirhózy jater, ztukovatěných jater a rekonstrukce jaterní tkáně po odstranění primárních jaterních karcinomů stejně jako jaterních metastáz a rekonstrukce struktury jater u dětí s vrozenými defekty.

55. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 52 až 54 pro autologní léčbu savců trpících poruchou chrupavky a/nebo kostí nebo poruch od nich odvozených.

56. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 52 až 55 pro autologní léčbu savců patřících do skupiny, kterou tvoří lidé a domácí a/nebo dostihová zvířata včetně koně a velblouda.

57. Diagnostický způsob stanovení biologických aktivit kousku explantátu savčí tkáně v kultuře in vitro, vyznačující se tím, že zahrnuje stupně

a) kultivace kousku explantátu savčí tkáně obsahujícího matrix a nezralých buněk v kultivačním médiu v nádobě pro kultivaci tkání a

b) zkoumání alespoň části obsahu nádoby pro kultivaci tkání s cílem získat informace o povaze explantátu savčí tkáně a/nebo nezralých buněk.

58. Diagnostický způsob podle nároku 57, vyznačující se tím, že tímto výzkumem je morfologický, histochemický a/nebo cytopatologický výzkum.

59. Diagnostický způsob podle nároku 57, vyznačující se tím, že se obsah ve stupni b) analyzuje biochemickou

analýzou pro stanovení DNA, RNA a/nebo proteinů.

30.07.03

FV 2003-2082

13999

1/10

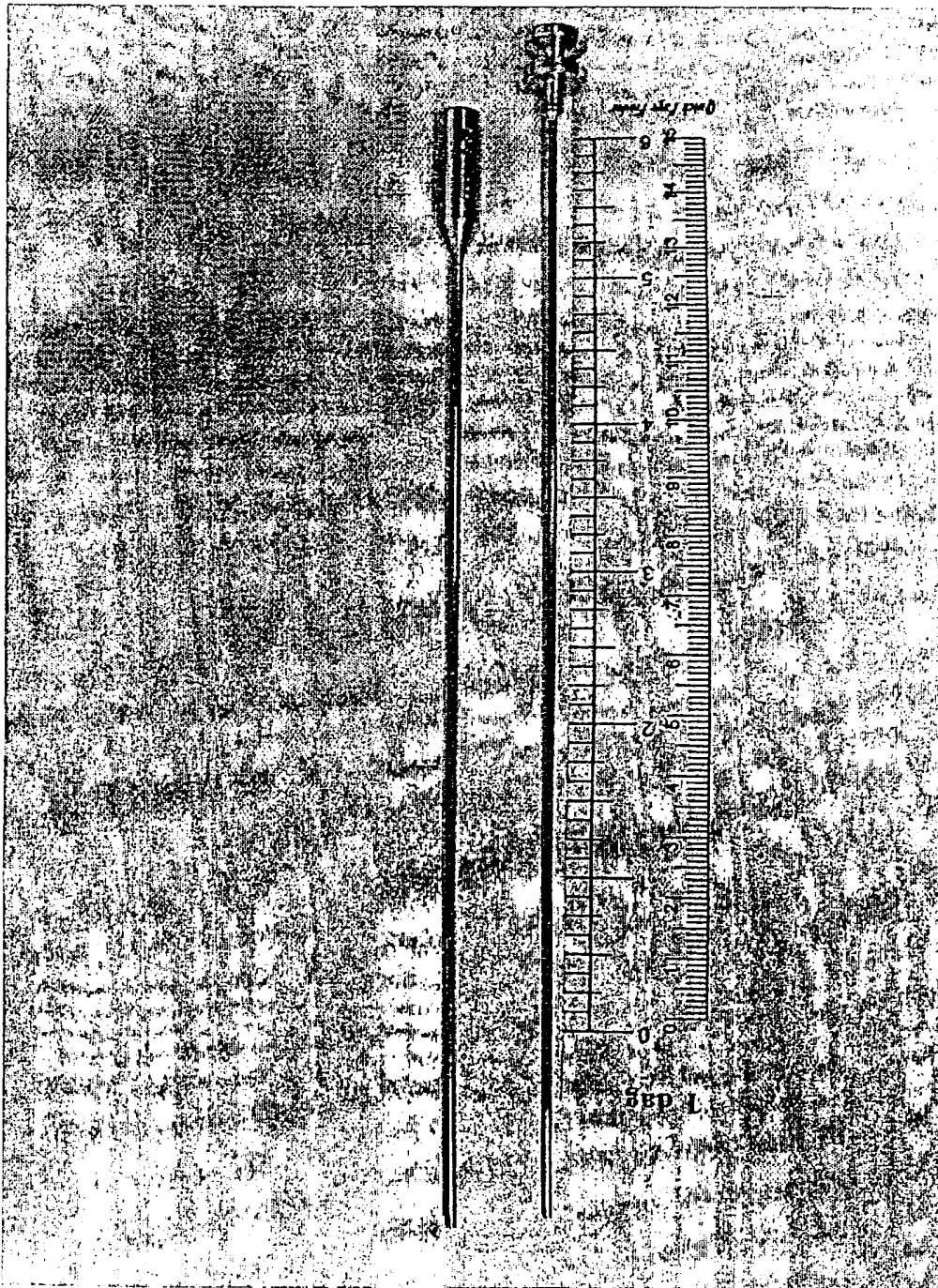


Fig 1.

2/10

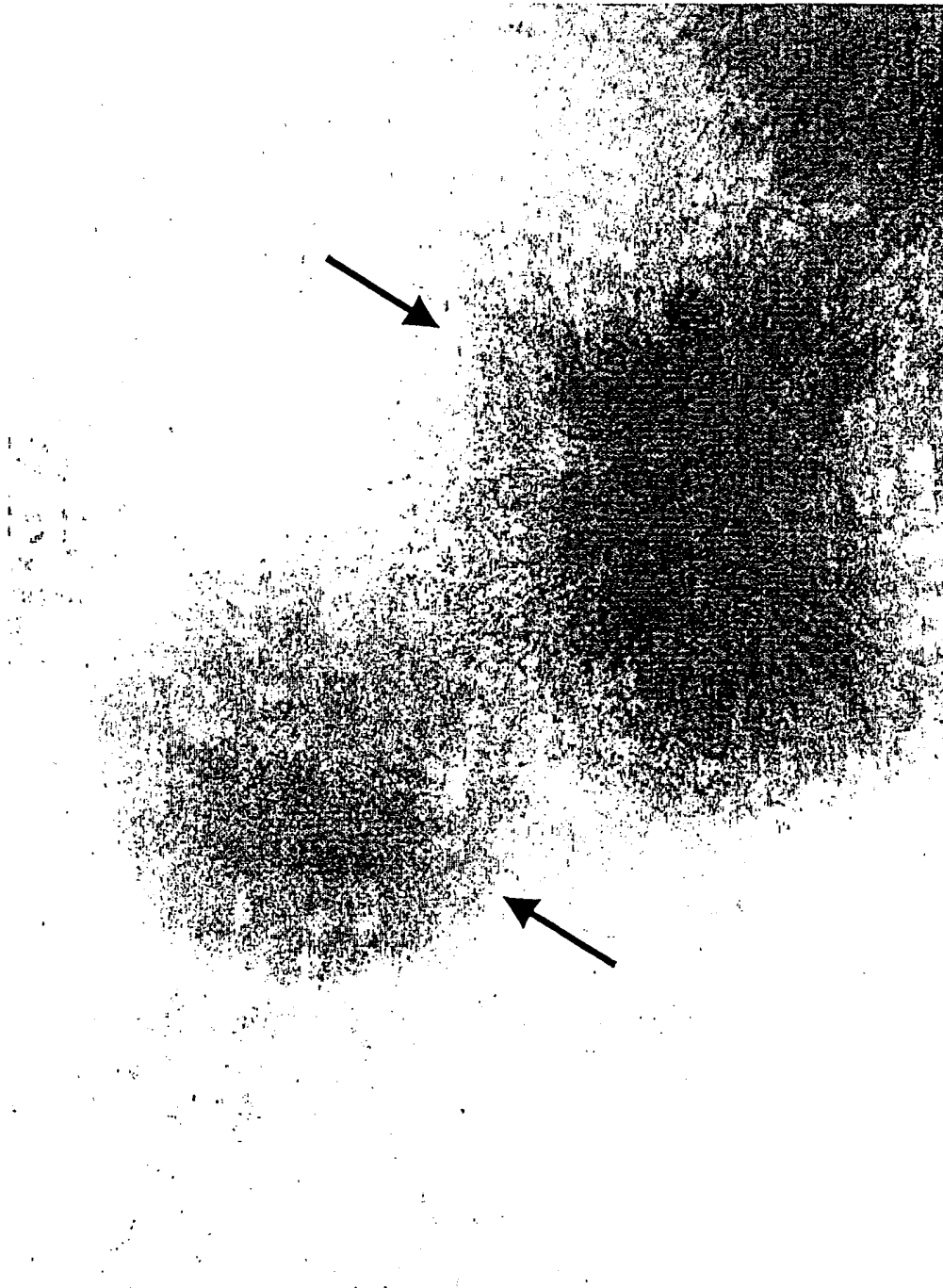


Fig 2.

30-07-03

3/10

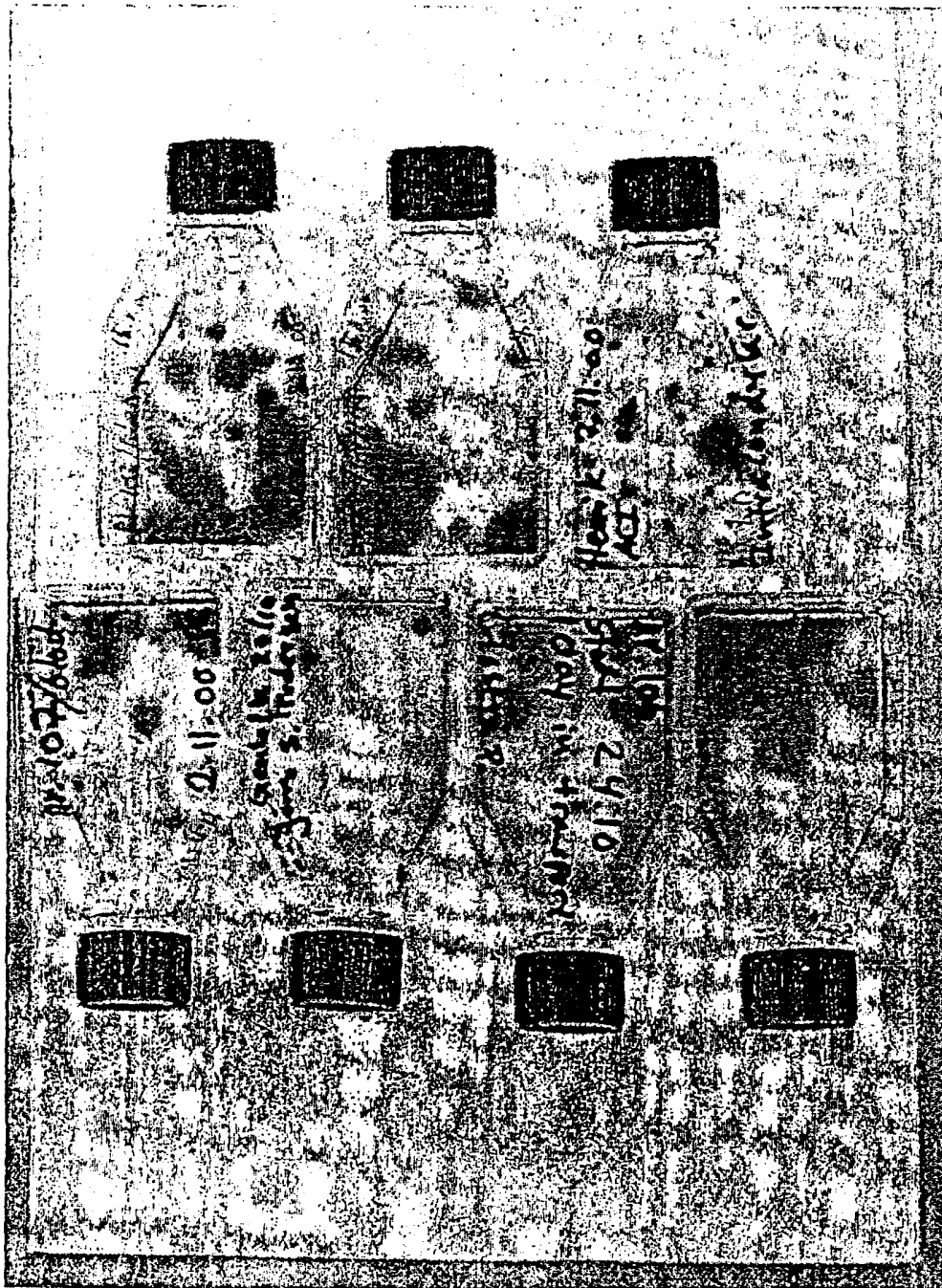


Fig 3.

4/10

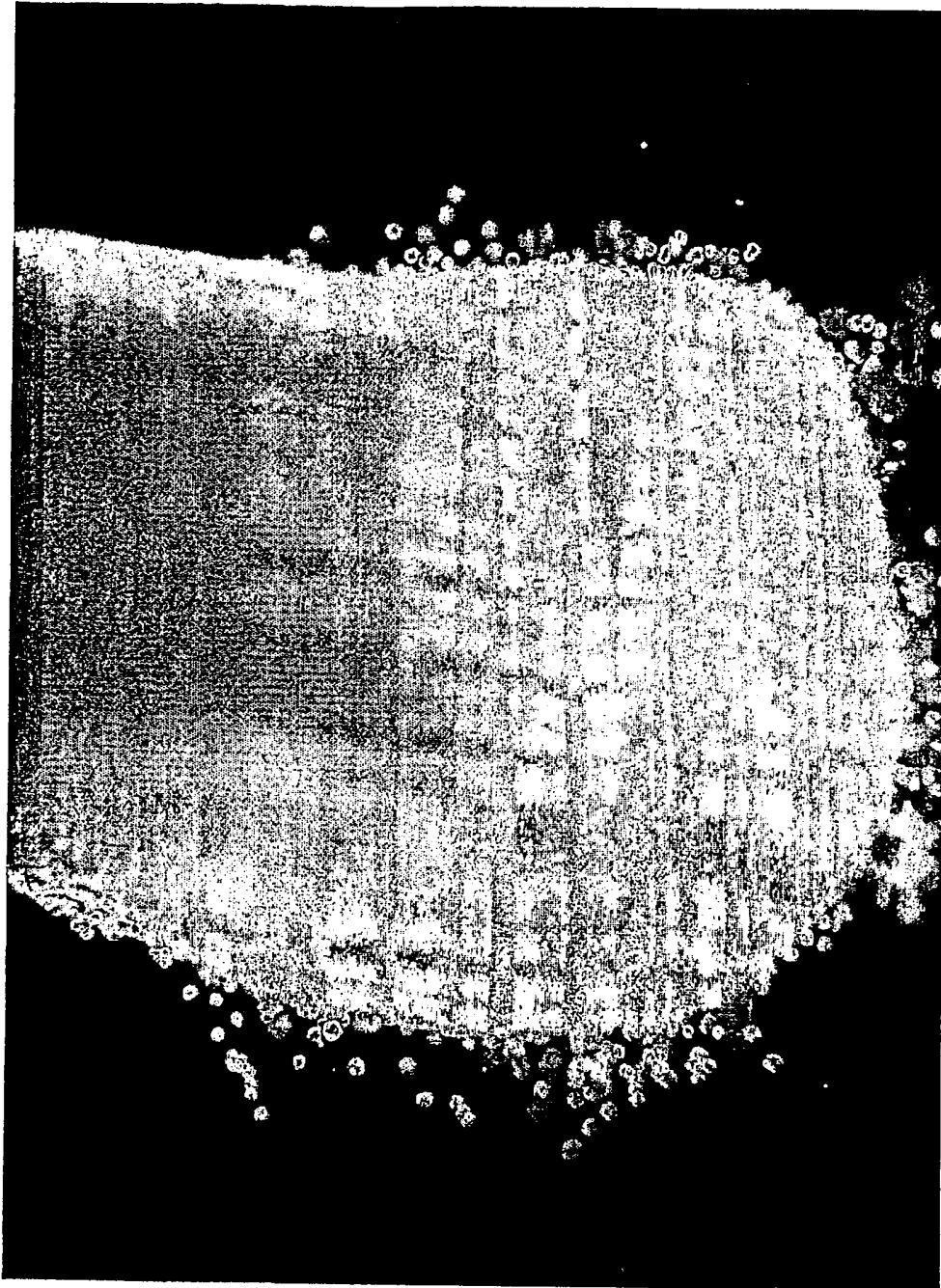
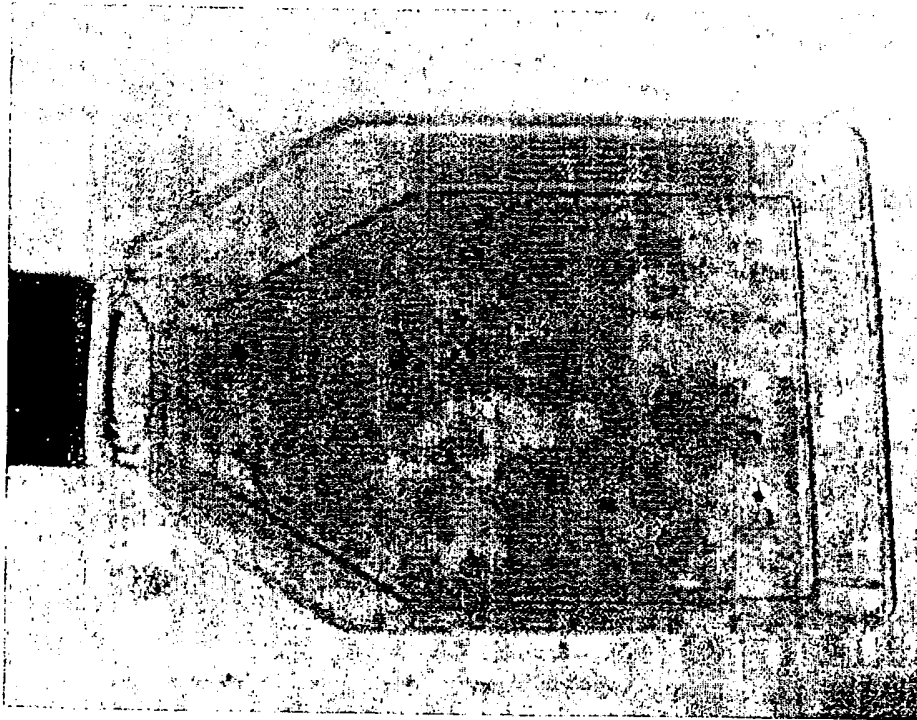
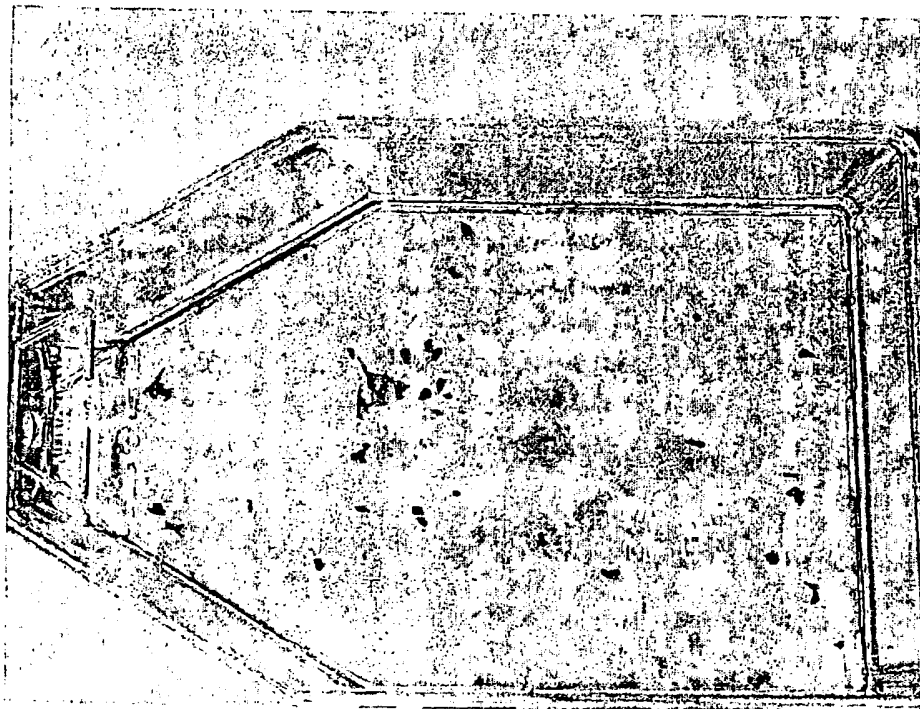


Fig 4.

5/10



A



B

Fig 5.

6/10



Fig 6.

7/10



Fig 7.

8/10

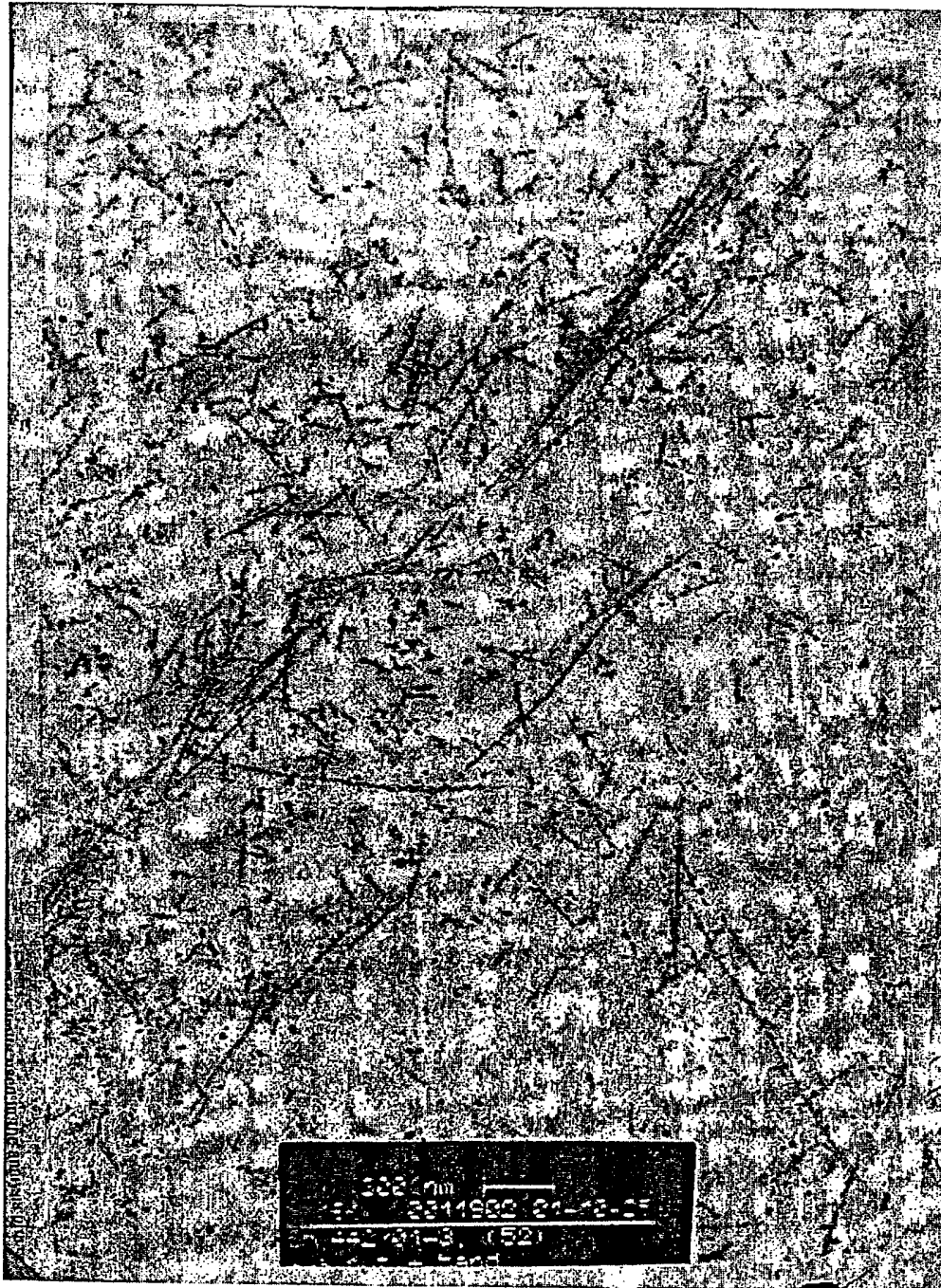
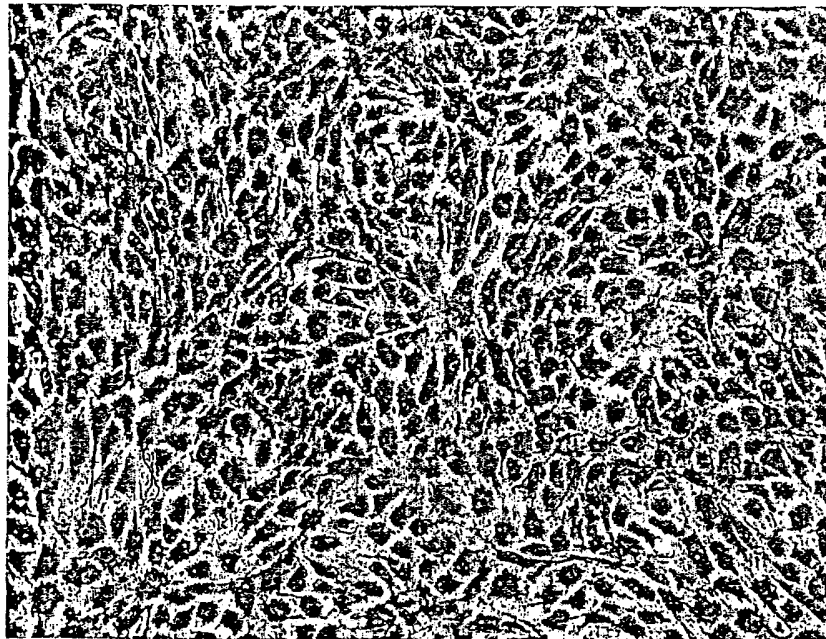


Fig 8.

9/10



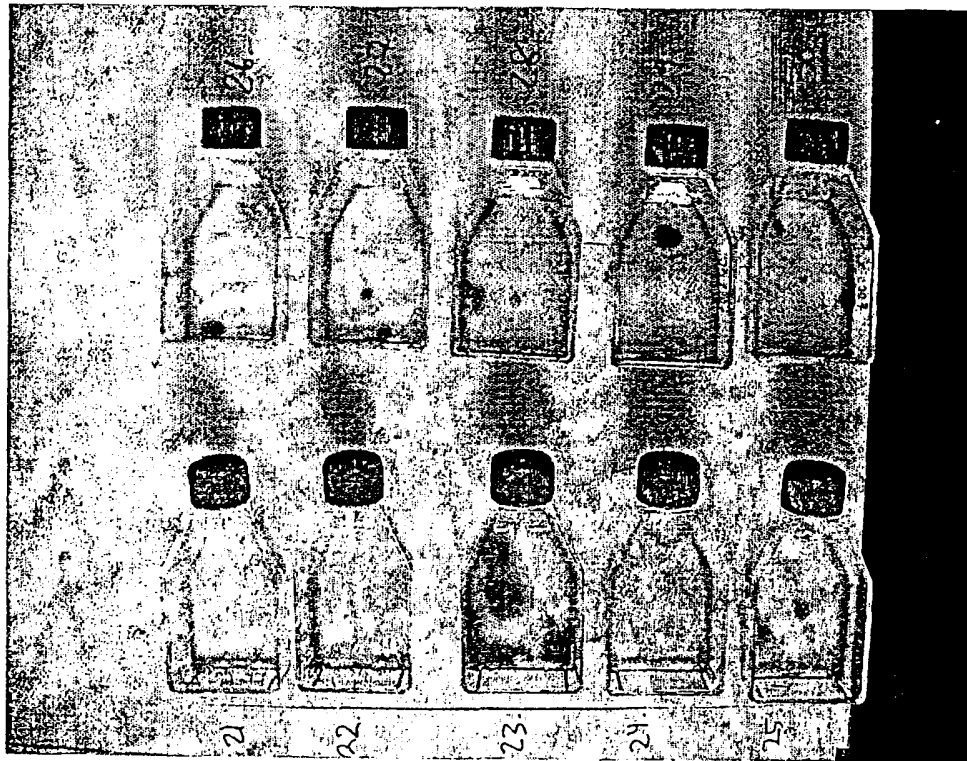
A



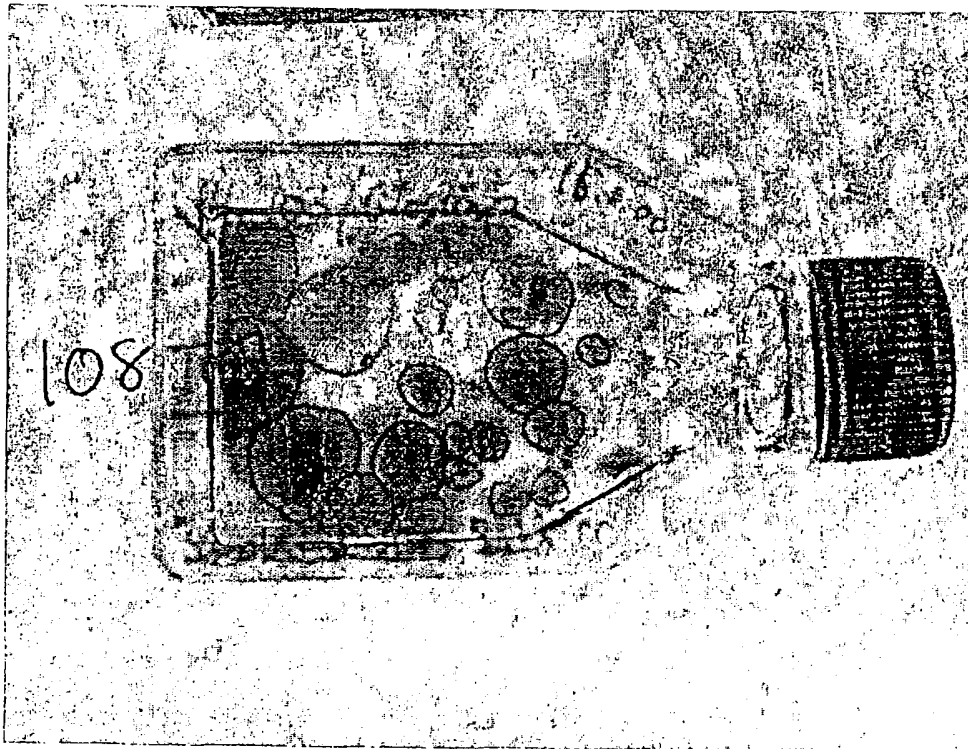
B

Fig 9.

10/10



A



B

Fig 10.