

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) **BG** (11) **51337A**

5(51) A 61 B 19/00



ОПИСАНИЕ
НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
ПО ПАТЕНТ

ИНСТИТУТ ЗА ИЗОБРЕТЕНИЯ И РАЦИОНАЛИЗАЦИИ

(21) Регистров № 85721 (22) Заявено на 17.10.88 (23) Изложен приоритет	(73) Патентоприетел: Marrow-Tech. Incorp., Sacramento, California (US)
Приоритетни данни (31) 853569 (32) 18.04.86 (33) US (31) 36154 (32) 03.04.87 (33) US (31) 38110 (32) 14.04.87 (33) US	(72) Изобретател (и): Brian A. Naughton Gail K. Naughton, (US)
(45) Отпечатано на 30.04.93 (46) Публикувано в бюл.№ 4 на 15.04.93 (56) Информационни източници: US 4481946; US 4486188; US 4107937; US 4117881	(86) PCT/US 87/00869, 15.04.87 (87) WO 87/06120, 22.10.87
(61) Доп. към авт. № (62) Разд. от рег. №	(89) № на документа в страната-заявител:

(54) МЕТОД ЗА РЕПЛИЦИРАНЕ НА КОСТЕН МОЗЪК

(57) Методът е приложим при лечение на злокачествени новообразувания в костния мозък. С него се осигурява подходящ за трансплантация материал, вследствие на което се избягват реакцията при-сатка-гостоприемник и образуването на емболи и се повишава функционалната способност на кост-тен мозък, неблагоприятно повлиян от химиотерапия или от радиационна терапия. По метода аспи-риран от здрав пациент костен мозък се култивира в подходяща хранителна среда върху тридимен-сионална плочка, която позволява съхраняването на култивирания материал в условия на криокон-сервация.

18 претенции

BG 51337 A

(54) МЕТОД ЗА РЕПЛИЦИРАНЕ НА КОСТЕН МОЗЪК

Изобретението се отнася до метод за реплициране на костен мозък, приложим при лечение на злокачествени новообразувания в костния мозък.

Известно е, че в случаите на заболяване, разрушаващо здравите клетки на костния мозък или потискащо тяхната функционална пригодност, се прибегва до трансплантиране на костен мозък. Последното обаче е не винаги подходящо за лечение на заболяването, тъй като се проявяват допълнителни неблагоприятни ефекти като отхвърляне на присадката, съдозапущащо заболяване в резултат от образуване на костномозъчни емболи и др.

Недостатъците на известните методи се състоят в това, че в болшинството случаи за присаждане се използва вече заболял костен мозък, чиито клетки са носители на съответното заболяване, поради което и използването му е неефективно.

Задачата на изобретението е да създаде метод за реплициране на костен мозък, чрез който да се създаде подходящ за трансплантация материал, да се избегнат проявата на реакция присадка гостоприемник и образуването на емболи от костен мозък и да се повиши функционалната способност на костен мозък, неблагоприятно повлиян от химиотерапия или от радиационна терапия.

Задачата се решава с метод, съгласно който малко количество от костния мозък на здрав пациент се аспирира по подходящ начин и полученият материал се реплицира *ин витро* за получаване на такова количество клетки, при което да са възможни автоложната реинфузия и охлаждане и замразяването им, с цел последваща инфузия на заболял пациент. Методът се осъществява с помощта на тридименсионална плочка за култивиране на клетките в клетъчната култура. Растежът на клетките се осъществява в културална среда на протеини, гликопротеини, гликозоаминогликани, клетъчен матрикс и други, които да служат за тяхна опора или за покриване на плочката. Използването на тридименсионалната плочка позволява на клетките да растат в повече слоеве, като по този начин съгласно изобретението се създава триизмерна култура. Триизмерната плочка може да се използва за създаване на триизмерна культу-

ра от кожа, черен дроб и много други типове клетъчни култури.

За предпочитане тридименсионалната плочка се изготвя във форма на мрежа. Плочките могат да се съхраняват за по-нататъшна употреба във вид на тридименсионална, физиологична и клетъчно-културална система.

Мрежата съгласно изобретението е показана на приложената фигура, където е с позиция 10. Тя съдържа основни влакна 12 и вътъчни влакна 13. Клетките на стромата 14 растат върху влакната.

Предимствата на метода са че се предлага ефикасно средство за трансплантация при лечение на заболявания или състояния, които разрушават здравите клетки на костния мозък или потискат тяхната функционална пригодност, че изготвеният клетъчен материал е подходящ също и при третиране на хематологични злокачествени заболявания с метастази в костния мозък, а репликационният материал е подходящ и за третиране на пациенти, чийто костен мозък е неблагоприятно повлиян от химиотерапия и/или радиационна терапия, наложена поради заболяване, което не засяга непосредствено костния мозък.

Изобретението се пояснява със следващите примери.

Пример 1. От 10 до 15 см³ суспензия костен мозък /периферна кръв се аспирира от илиачната кост на донора. Резултатите са оптимални, ако по това време индивидът е на възраст под 40 год и не е болен. Аспирирането на костен мозък от донора се осъществява по известни методи /1,2/. Пробата може да се използва за реплициране веднага или да се съхранява чрез замразяване се подходящо криотехнологично съоръжение.

С цел съхраняване на пробата за бъдещо реплициране, суспензията костен мозък /кръв се разделя на еднакви количества в стерилни епруветки на Нунк и се поставя в чаша с начупен лед, докато криозащитната камера достигне подходящата температура /4⁰С/. Непосредствено преди вкарване в камерата към всяка епруветка на Нунк се добавя разтвор по стерилна методика, така, че криозащитните вещества диметилсулфоксид и глицерин да са в концентрация съответно от 7% и 5%. Програмата за замразяване се включва веднага след внасяне на пробния образец (използва се замразяваща програма №1 върху КриоМед Модел №1010

контролно устройство).

По тази методика клетъчната жизнеспособност след замразяване и бързо стопяване във водна баня при 80°C надхвърля 90% по метода на изпитване с трипан блу. Могат да бъдат образувани и повече от 80% колонии образувачи единици в изходната колония. Криооконсервацията на пробата също се осъществява по известни методи [3,4]. За предпочитане, клетките от костен мозък се съхраняват в среда на течен азот при температура -196°C , при която цялата метаболитна дейност е преустановена.

Съгласно изобретението се предвижда реплициране на клетки костен мозък *in vitro* в система, сравнима с физиологичното състояние. Клетките, реплицирани по тази система, включват всички налични клетки на нормалния костен мозък, като се приема, че всички типове клетки са били в наличност в оригиналния инокулум костен мозък.

Клетките на костния мозък, получени директно от донора или от съхранявания чрез криоконсервация запас, се разделят най-напред от техния ретикулум чрез физикални средства.

Отглеждат се в ко-култури с компоненти от стромата на нормален костен мозък, които включват фибробласти, макрофаги и ретикуларни и мастни клетки върху тридименсионална плочка. Към културата могат да бъдат добавени и фактори, получени от далачни и/или чернодробни макрофаги или други компоненти на стромата.

Въпреки че когато клетките от костен мозък се култивират самостоятелно са с ограничен растеж, продължителен растеж на тези култури е възможен само ако са налични секторни продукти от техните клетки на стромата или самите клетки на тази строма [5].

Чрез метода се максимализира пролиферацията на многопотенциалните кръвотворни базични клетки, които имат способността да репопулират костен мозък, когато последният е бил увреден чрез опосредствано от околната среда заболяване или чрез третиране на такова заболяване с химиотерапевти и/или радиотерапия. Базични клетки, които имат способността да се репопулират, се делят и съществуват в дълготрайни култури от костен мозък. Но базични клетки, кръвотворни изходни клетки и кръвотворни предхождащи изходните клетки се делят и реплицират съгласно метода. По-нататъшната диференциация се осъществява по фи-

зиологичен начин. Например еритроиди, миелоидни, лимфоидни, макрофаги и мегакариоцитни колонии могат да възникват непрекъснато в същата система за култивиране.

Репликацията на костномозъчните клетки започва чрез създаване на опоренослой от строма. За целта, суспензии от костен мозък се центрофугират при 3000 $\times g$ за 20 мин и се взима белият седимент от клетки, който съдържа макрофат, фибробласти, мастни клетки, мононуклеарни кръвни клетки, ендотелиални клетки и др. Клетките се суспендират в Среда "Roswell Park Memorial Institut Medium/ RPMI /6/, допълнена с 10 % фетален телешки серум /ФЕТ/ 10 % конски серум, хидрокортизонхемосукцинат и подходящи антибиотици.

Количество, равняващо се на 10^6 от тези клетки, се разстила върху найлонова мрежа Tetko Corp. в блюда на Петри. Тя е предварително нарязана, за да отговаря на вътрешните размери на пластмасови колби за култури от по 25 мл. Мрежите са с отвор $400\text{ }\mu\text{m}^2$ и диаметър на влакната от 100 μm . След това инокулираната мрежа се навива и поставя в колбата за култура, съдържаща 5 мл от средата. Мрежата се развива в колбата и покрива напълно дъното ѝ. Културите се инкубират при 37°C при съдържание на CO_2 5% и при относителна влажност повече от 90%. Клетките от стромата, които предимно са фибробласти, растат първи и напълно заобикалят всички найлонови влакна преди да започнат да навлизат в отворите на мрежата. Този процес обхваща 14 до 18 дни. Степента на сливане на клетките на стромата трябва да отговаря на това, което е показано на фигурата преди да протече инокулираното с хемопоеични клетки.

Суспендирани клетки на стромата могат да се съхраняват по описания начин. За да се съхрани мрежата с напълно закрилите я клетки от стромата, трябва да се навие и постави в епруветки на Нунк, съдържаща среда RPMI 1640, със средства, осигуряващи криопротекция като диметилсулфоксид и глицерин, съответно в концентрация 5% и 15%. Замразяването на културата със строма се осъществява при начални скорости на охлаждане $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ от $+1$ до -40°C . Скоростта на охлаждане от -2 до $-3^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ е оптимална и се използва до достигане на стадийната температура -34°C . Приблизително 20 - 25% от клетките на стромата се откъсват от найлоновата мрежа.

Инокулирането на кръвотворни клетки се осъществява по следния начин. Клетки от костен мозък се суспендират в модифицирана среда на Хишер и на МакКой 5А, допълнена с 5 до 10% фетален телешки серум и 5-10% конски серум, витамини, хормони, хидрокортизон, глутамин и антибиотици. Клетките могат да бъдат или пресни, или получени от предварително съхранявани проби. Инокулират се 2 до $5 \cdot 10^6$ клетки върху мрежата, покрита изцяло с клетки на стромата в колби от по 25 mm^2 и се инкубират при 33 до 34°C във въздушна среда със съдържание на CO_2 5%. Относителната влажност на културите е около 90%. След три дни температурата се повишава до $35\text{--}37^\circ\text{C}$.

Хемопоеичните клетки растат в естествено образуваните джобове на стромалните клетки, покрили мрежата и прогениторните (предшествашите) клетки остават в адхерентния слой от клетки. Адхерентният слой клетки се образува от клетките, намиращи се непосредствено върху мрежата, или от тези, прикачени към клетки, прикрепени директно върху мрежата. След 4-5 дни се появяват зрели гранулоцити, мононуклеарни клетки и еритроцити в неполепналия слой, което се вижда на цитологични препарати. След 7 до 10 дни могат да бъдат забелязани голям брой хемопоеични колонии в междините на мрежата, които са еднакви морфологично с образуващите колонии единици, смесените колонии и лимфоидните колонии. Мегакариоцитният растеж е ограничен, но също може да бъде наблюдаван в този матрикс. Една средна култура дава около 450 до 950 образуващи колонии единици за седмица.

Култури от клетки на стромата и от кръвотворни клетки, произхождащи от същия индивид /автоложни клетки/, трябва да се хранят два пъти седмично. Култури от костен мозък на пациент, който е бил инокулиран върху мрежа от стромални клетки на друг индивид /и /алогени/, трябва да се хранят три пъти седмично за осигуряване на достатъчна депопулация на зрели имунокомпетентни клетки от неполепения слой.

Първичният лимитиращ фактор за скоростта на растеж на клетките от стромата на костния мозък е ниският митотичен индекс на фибробластите, присъщ на клетките от стромата на костния мозък. Растежът на тези клетки и тяхното отлагане по компонентите на екстрацелуларния матрикс може да бъде ускорен чрез

добавяне първо на хидрокортизон хемисукцинат и/или второ саморегулиращи растежни фактори, произхождащи от средата на култивираните фетални фибробласти от човек с висока скорост на клетъчно продуциране.

Растежът и отлагането на клетките може да се повиши също чрез предварително покриване на мрежата със солубилизиран колаген тип I-III, IV или с използването на мрежа, която е покрита или застлана с колаген, секретирани от фетални човешки фибробласти или чрез зрели фибробласти /посочвани по-нататък като стимулиращи растежа фибробласти/, които са били типизирани по тяхната способност да синтезират някои типове колаген. Стимулиращите растежа фибробласти се повдигат от мрежата чрез слабо трипсинизиране при достигане етапа на пълно покриване на мрежата (от 5 до 7 дни за фетални фибробласти от човек и 14 до 18 дни за зрели фибробласти/, след което могат да бъдат инокулирани с клетки от стромата на костен мозък, за да се съхранят с цел бъдещо използване.

Методите за култивиране, разпределяне и съхраняване чрез криоконсервация на стимулиращи растежа фибробласти са следните:

а/ Култивиране на стимулиращи растежа фибробласти, като фибробластите се култивират в среда RPMI 1640, допълнена с 5 до 10% фетален телешки серум, или 2 до 10% конски серум, която допълнително съдържа 1 мкг/мл хидрокортизон хемисукцинат и 2 мкг/мл гентамицин, пеницилин, стрептомицин и фунгизон. Културите се инкубират във въздушна среда, съдържаща 5% CO_2 при 37°C и при относителна влажност на въздуха, по-висока от 90%.

б/ Типизиране на стимулиращи растежа фибробласти, като количество от $5,0 \cdot 10^6$ фибробласти, получени от белия слой на суспензията костен мозък, кожни фибробласти или фибробласти, получени от черен дроб на труповете, се разстилат върху микротитрационни кладенчета $/1 \text{ mm}^2/$ и се култивират до пълното им сливане. Теди клетки се отстраняват от кладенчетата чрез повтарящи се промивания, обикновено 4-5 пъти, с балансиран разтвор на Ханк без Ca^{2+} и Mg^{2+} . Матриксът, останал върху плочката, се изследва чрез индиректна имуофлуоресценция, като се използват моноклонални антитела за различните компоненти на матрикса чрез белязване с флуоросцеин изотиоцианат зайчи антимиси имуноглобулин G, за определяне на

наличните типове колаген. Суспендираните клетки се обработват с моноклонални антитела, насочени срещу колаген типове I-IV, еластин, тропоеластин и фибронектин за изолиране на субпопулации, способни да продуцират всеки продукт. Клетките се обработват с комплект от морско свинче, който ще увреди или разруши клетките, към които е прикачено моноклоналното антитяло. Жизнеспособните клетки се разстилат отново върху микротитрационни кладенчета, както е описано, култивират се до сливане и се отстраняват. Ефективността на методиката за изолиране се потвърждава чрез изследване на останалия от тези клетки матрикс посредством моноклонални антитела и индиректна имуофлуоресценция. За оптимален растеж на хемопоетични клетки матриксът трябва да съдържа колаген от типове II, IV и I в съотношение приблизително 6:3:1.

в/ Кριοконсервация на стимулиращи растежа фибробласти. Стимулиращите растежа фибробласти могат да бъдат съхранявани чрез кριοконсервация при използването на същите матрикси, описани за клетките на стромата. Подобно на клетките от стромата, някои от клетките също се откачват от мрежата по време на кριοконсервацията. Този матрикс обаче все още допринася за полепване на клетки от стромата на костния мозък и поради това намалява времето, необходимо за създаване на матрикс, подходящ за растежа на хемопоетични клетки.

Инокулиране с мононуклеарни клетки.

За повишаване дълготрайността на растежа на култури от костен мозък мононуклеарни клетки от периферна кръв се получават от хепаринизирана суспензия при използване на Фикол-хипак или Перкол. Клетки от периферна кръв и кръвообразуващи клетки от костен мозък се получават от един и същ индивид /аутоложни/ чрез пункция на вената и трябва да се съхраняват чрез кριοконсервация по времето, когато се взема материал от костен мозък. Допълнителни клетки от периферна кръв могат да бъдат получени от заболялия пациент, ако това се налага, по време на процедурата по култивирането. Но ако се предполага заболяване с онкологичен характер, материалът трябва първо да бъде подложен на пречистване, както е описано. $5 \cdot 10^6$ Мононуклеарни клетки /предпочитана е моноцитна субпопулация / се инокулират върху мрежата четири до пет дни след

началното инокулиране с кръвотворни клетки от костен мозък и всеки три седмици след това. Тази процедура повишава кръвообразуването с 10 до 13 % седмично.

Продължително запазване на културите и складиране на прародителски клетки.

Културите от слети клетки от стромата не подкрепят или в най-добрия случай слабо подкрепят кръвообразуването. Продължителен растеж на човешки прародителски клетки е възможен, ако те са снабдени с необходимите произхождащи от стромата растежни регулатори. Например, изходният материал от костен мозък се разделя на известен брой еднакви части, съдържащи приблизително 10^6 кръвотворни клетки. Всяка от тези части се инокулира в предварително изготвената плочка от клетки на стромата, прораствали върху найлоновата мрежа. Културите се проследяват чрез директно наблюдение с имерсионен микроскоп и чрез диференциално изброяване на неполепени клетки върху препарат след всяка захранване. Преди достигане на фазата сливане на колоните културите се обработват с колагеназа и се поставят за обработване с ултразвук за около 6 до 10 минути. Кръвотворните и стромални клетки се сепарират по методите за плътностен градиент. Кръвотворните клетки се изброяват с хемоцитометър и приблизително около 50% се съхраняват чрез кριοконсервация по описания начин. Останалите 50% се разделят на еднакви части, състоящи се от по около 10^6 клетки, и се инокулират върху култури, развити върху плочката от мрежа и стромални клетки. Когато последните достигнат етапа сливане на колоните, процедурата започва отначало.

Модулиране на растежа на кръвотворни клетки с клетъчни продукти.

Съгласно съществуващата технология за субкултивиране на различни клетъчни комплекси от костен мозък макрофаги, ретикуларни клетки, мастни клетки и фибробласти могат да бъдат култивирани поотделно и тяхната секреторна активност да бъде модифицирана чрез обработване с различни агенти.

Кръвообразуването в дълготрайни култури от костен мозък на хора върху тридименсионална мрежа може също да бъде модулирано чрез секрети от екстремедуларни макрофаги /Купферови клетки/, когато бъдат отглеждани по следния начин. Клетките се сепарират от тяхната органна строма след разграждане с

протеаза. Проби от тъкан се инкубират за един час в разтвор на проназа /0,2% проназа /Калби-хем/ и балансиран солев разтвор на Гей /BSS/, като се разклащат леко. рН на разтвора се поддържа на 7,3 до 7,5 с 1-нормална натриева основа. Добавя се дезоксирибонуклеаза /0,5 мг/ на интервали от 30 мин по горната процедура и суспензията от резистентни клетки се филтрира и центрофугира при 350 хо за 10 мин. Сбитата маса се ресуспендира върху BSS на Гей и периферните клетки /макрофаги и ендотелни клетки/ се сепарират от клетъчния отпадък и от зрелите кръвни клетки при използване на Перкол градиент. Резултиращата клетъчна фракция се промива 3x3 мин с модифицирана среда на Дулбекс, обогатена с 10% фетален телешки сывум, и се разстила върху пластмасови блюда за култура в обем, съдържащ 3 до 4 x 10⁶ клетки.

След 24-часово инкубиране неполепени клетки се отстраняват чрез промиване със средата за култура, а полепените клетки се поддържат при 33⁰С в газова смес от 5% СО₂ в стаен въздух при повече от 80% относителна влажност. Растежната и/или екскреторната активност на тези клетки може да се стимулира: 1. Чрез променяне на съотношението СО₂:О₂; 2. Обработване на културите с легла от латекс; 3. Обработване на културите със силиций.; 4. Добавяне на простагландин Е₂, Е₁ или Е₂ към средата, допълване на средата с интерлевкин 2. Чрез тези агенти могат да се модулират секреторните продукти на макрофага.

Кондиционалната среда със секреторните продукти може да се използва за допълване на отношението еритропоеза /гранулопоеза в дълготрайната култура костен мозък по почти същия начин, както се наблюдава in vivo.

Методът съгласно изобретението намира приложение за проследяване състоянието на пациентите с рак или с други заболявания чрез аспириране на част от неговия костен мозък и изследване на пробата. По този начин може да бъде открита метастаза или възвръщане на процеса, преди това да стане клинично установимо. Методът е приложим и за изследване на пациенти в други състояния, които могат да се проследят чрез вземане на проба от костния им мозък.

Продължителният растеж на клетки от аспирираната проба от костен мозък при използване на систематичния ход на етапите съгласно изобретението повишава вероятността от от-

криване на клонални метастазни и на кръвотворни клетки с хромозомни недостатъци. Тези клетки може да не се забележат в обикновена намазка от прясно аспириран костен мозък.

Методът съгласно изобретението намира приложение и за изпитване на цитотоксичност на костен мозък спрямо фармацевтични анти-неопластични средства, карциногени, хранителни добавки и други вещества.

За целта най-напред се създават стабилни растящи култури от клетки на костен мозък /включително от стомата и костен мозък/, след което културата се подлага на раздействието на различни концентрации от изпитвания агент. След съответна инкубация препаратът се изследва под фазов микроскоп за определяне на оптимално допустимата доза /НТД/ от изпитвания агент, при която се явяват най-ранните морфологични изменения. Изпитването за цитотоксичност може да се осъществи с използването на различни багрила за суправитално оцветяване с цел преценка жизнеспособността на тази тридименсионална система, като се използват известни методики. Определянето на най-високата допустима доза предлага обхватът концентрация за следващо изпитване.

След като се определи обхватът на изпитване, следва изпитване на изследвания агент за въздействието му върху жизнеспособността, растежа и/или морфологията на различни клетъчни типове, съставлящи културата от костен мозък по известни методики.

В допълнение изобретението дава възможност тридименсионалната опора /плочка/ да се изработи от какъвто и да е друг материал, който позволява клетките да се полепват по него и да растат в повече от един слой, така че да може да бъде използвана за изготвяне на препарати от костен мозък, черен дроб, кожа и много други типове клетки и тъкани. Например, такава тридименсионална плочка от кожа се получава първо, като се оставят фибробластите да растат и да се закрепят върху мрежата 7 до 9 дни, като се отлага слой колаген типове I и II, второ върху получената мрежа се разстилат меланоцити и се оставят да растат 5 дни и трето върху прорастналите до степен на сливане на колонии от меланоцити се инокулират кератоцити.

Дадените само някои конкретни приложения на метода не изчерпват неговото приложение.

Патентни претенции

1. Метод за реплициране на клетки от костен мозък, характеризиращ се с това, че тридименсионална плочка, разположена в хранителна среда за отглеждане на клетъчни култури, се инокулира с клетки от стромата на костен мозък, култивира се до степен припокриване на колонияте от клетки една с друга, и се инокулира културата от стромални клетки с базични кръвотворни клетки, включващи многопотенциални, прародителски и предшествашки клетки с репродуктивна способност.

2. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че тридименсионалната плочка представлява найлонова мрежа с отвори с големина 400 мкм^2 и диаметър на влакното от 100 мкм , покрита с колаген.

3. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че хранителната среда съдържа фактори, изолирани от културалната среда за макрофаги на далак или черен дроб.

4. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че клетките от стромата на костен мозък включват фибробласти, ретикулни клетки и мастни клетки.

5. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че клетъчните колонии от костен мозък включват еритроидни, миелоидни, лимфоидни и макрофагни колонии и колонии от мегакариоцити.

6. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че стромалните клетки върху плочка от найлонова мрежа могат да се използват веднага или след съхранение в условията на криоконсервация.

7. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че базичните кръвотворни клетки се култивират при температура от 33 до 34°C през първите три дни след инокулацията и след това се култивират при 35 до 37°C .

8. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че стромалните клетки и основните базични клетки могат да произхождат или от един и същ, или от различен индивид.

9. Метод съгласно претенция 2, характеризиращ се с това, че с цел покриване на мрежата от найлон с колаген, последната се инокулира с фибробласти, секретирани колаген и/или други екстрацелуларни компоненти на матрикса, култивират се и след това се отделят от тридименсионалната плочка чрез средства, които не въздействат на отложения върху плоч-

ката колаген.

10. Метод съгласно претенция 9, характеризиращ се с това, че фибробластите са в съотношение $6:3:1$ и секретират колаген тип I, III и IV, а средството за отделянето им от тридименсионалната плочка е трипсин.

11. Метод съгласно претенция 6, характеризиращ се с това, че тридименсионалната плочка се съхранява в условията на криоконсервация след като фибробластите, секретирани колаген и/или други екстрацелуларни компоненти, са отстранени.

12. Метод съгласно претенции 1 и 7, характеризиращ се с това, че базичните кръвотворни клетки се култивират в присъствие на моноклеарни клетки от периферна кръв, добавени в културата четири до пет дни след началното инокулиране с кръвотворни клетки и след това на всяка трета седмица.

13. Метод съгласно претенция 12, характеризиращ се с това, че моноклеарните и кръвотворните клетки произхождат от един и същ индивид, а моноклеарните клетки са моноцити.

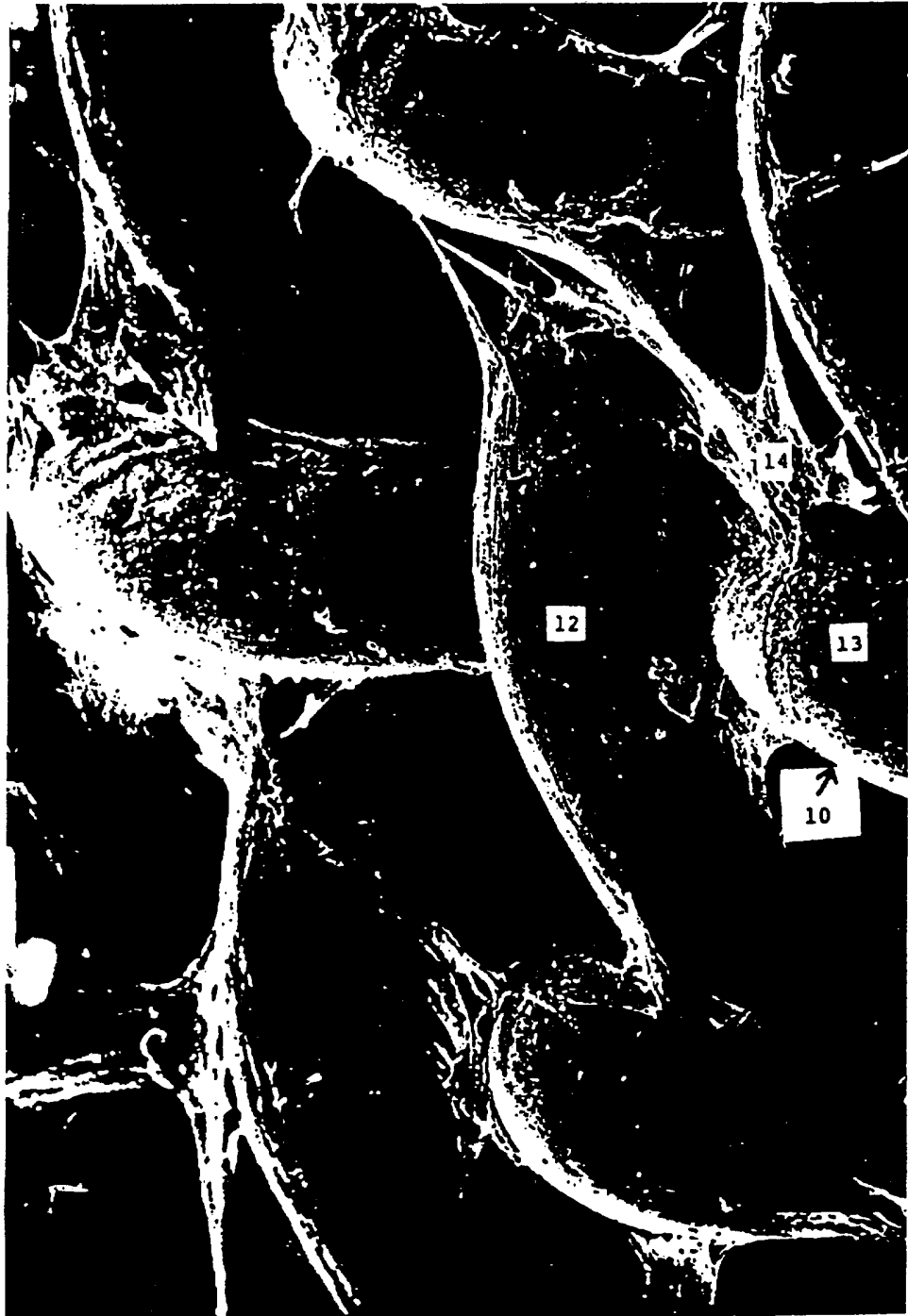
14. Метод съгласно претенция 3, характеризиращ се с това, че екстрамедуларните макрофаги се отглеждат в отделна култура и продуктите на техния метаболизъм се добавят периодически към културалната среда.

15. Метод съгласно претенция 14, характеризиращ се с това, че растежната или секреторна активност на екстрамедуларните макрофаги се стимулира чрез променяне на съотношението $\text{CO}_2:\text{O}_2$, при което се осъществява култивирането им.

16. Метод съгласно претенция 14, характеризиращ се с това, че отделната култура от екстрамедуларни макрофаги се обработва с легла от латекс.

17. Метод съгласно претенция 14, характеризиращ се с това, че отделната култура от макрофаги се обработва със силиций.

18. Метод съгласно претенция 14, характеризиращ се с това, че към отделната култура от макрофаги се добавят простагландин E_1 , E_2 или E_2 и интерлевкин 1 или интерлевкин 2.



Издание на Института за изобретения и рационализации
София - 1156, бул. "Г. М. Димитров" № 52-Б

Експерт: И. Тошева

Редактор: Н. Божинова

Пор. № 35922

Тираж: 40

СК