PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2004-696

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
C 12 N 5/06
C 12 N 5/08

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA

ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **12.11.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **09.11.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/344913**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.02.2005**
(Věstník č. 2/2005)
(86) PCT číslo: **PCT/US2002/036373**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2003/039489**

(71) Přihlašovatel:
ARTECEL SCIENCES, INC., Durham, NC, US

(72) Původce:
Cheatham Bentley, Durham, NC, US
Halvorsen Yuan-Di C., Holly Springs, NC, US
Gimble Jeffrey M., Chapel Hill, NC, US

(74) Zástupce:
JUDr. Karel Čermák jr. Ph.D., Národní 32, Praha 1, 11000

(54) Název přihlášky vynálezu:

Endokrinní pankreatická diferenciace buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně a její použití

(57) Anotace:

Řešení poskytuje buňky, kompozice a způsoby založené na bázi diferenciace kmenových buněk odvozených z adipózní tkáně k buněčné expresi alespoň jedné genotypické nebo fenotypické vlastnosti pankreatické buňky. Takto produkované buňky jsou použitelné při poskytování zdroje diferenciovaných a funkčních buněk pro výzkum, implantaci, transplantaci a vývoj tkáňových produktů pro léčbu chorob pankreatu a pro opravu pankreatické tkáně.

CZ 2004 - 696 A3

12.10.04
PV 2004-696
64493

Endokrinní pankreatická diferenciace buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně a její použití

Oblast techniky

Vynález se týká buněk stromatu odvozených z izolované adipózní tkáně indukovaných k expresi alespoň jedné vlastnosti pankreatické buňky. Vynález se rovněž týká způsobů léčby endokrinních onemocnění pankreatu.

Dosavadní stav techniky

Endokrinní buněčná hmota Langerhansových ostrůvků pankreatu je tvořena čtyřmi typy buněk, které jsou zatříděny na základě hlavního regulovaného sekrečního produktu. Tyto zahrnují α-buňky produkující glukagon, β-buňky produkující inzulin, γ-buňky produkující pankreatický polypeptid a δ-buňky produkující somatostatin (Henquin, 2000, Diabetes *49*, 1751-1760; Slack, 1995, Vývoj *121*, 1569-1580). Obecně se má za to, že během vývoje se tyto rozlišitelné buněčné populace vyvíjejí ze společného prekurzoru kmenové buňky spojovaného s epitelem pankreatického vývodu (Rao *et al.*, 1989, Am. J. Pathol. *134*, 1069-1086; Rosenberg a Vinik, 1992, Adv. Exp. Med. Biol. *321*: *95-104*; Swenne, 1992, Diabetologia *35*, 193-201; Hellerstrom, 1984, Diabetologia *26*, 393-400; Gu a Sarvetnick, 1993, Vývoj *118*, 33-46). Prekurzorové buňky získají po absolvování řady krokově diferenciačních drah vlastnosti různých buněčných populací. Raná pozorování naznačila, že α-buňky jsou první detekovatelnou populací ostrůvku, za kterou následují postupně populace β-buněk,

δ-buněk a γ-buněk (Slack, 1995, Vývoj *121*, 1569-1580). Ostrůvek se tvoří podél duktálního epitelu jako hmota β-buněk obklopená α-buňkami nebo γ-buňkami a do ních zapadajícími δ-buňkami. Nezralý ostrůvek následně migruje do okolní acinární (sekreční) tkáně a je vaskularizován (Slack, 1995, Vývoj *121*, 1569-1580).

Primární funkcí buněk ostrůvků je regulovat fyziologickou nutriční homeostázu. Normálně fungující β-buňky například syntetizují a sekretují inzulin, a tím se snaží zachovat hladiny glukózy v krvi. Toto se realizuje přes endogenní aparát detekující glukózu, který je spojen se sekreční drahou pro regulované uvolňování inzulinu. U tohoto typu spojení stimulu a sekrece mění zvýšená hladina glukózy v plazmě (např. postprandiální) metabolizmus β-buněk, což vede ke změnám potenciálu membrány v důsledku uzavření ATP-sensitivních K^+ kanálků. Tato depolarizace otevře Ca^{2+} kanálky citlivé na napětí a zahájí vstup Ca^{2+} - spouštěčů regulovaného uvolňování insulinu (Henquin, 2000, Diabetes 49, 1751-1760) do buňky. Plazmový inzulin následně stimuluje up-take glukózy do kosterního svalstva a adipózních tkání a současně inhibuje produkci hepatické glukózy, v důsledku čehož dojde ke snížení plazmové glukózy (Cheatham a Kahn, 1995, Endocr. Rev.16, 117-142).

I. Insulin

Diabetes 1. typu (inzulin-dependentní) je hlavní nemocí související se zánikem endokrinní pankreatické funkce. Ve většině případů k tomuto zániku dochází v důsledku poškození ostrůvků autoimunitním procesem. V současné době používaná terapie pro léčbu diabetu 1. typu

vyžaduje jednu až několik injekcí inzulinu denně. Ve většině případů není tento režim dostatečný pro udržení odpovídající kontroly hladiny glukózy v krvi, což způsobuje celou řadu pozdějších diabetických komplikací, které výrazně zvyšují procento morbidity a mortality u postižených osob. Alternativní terapií k denně aplikovaným injekcím inzulinu je léčba diabetu zavedením pankreatických nebo ostrůvkových transplantátů (Serup *et al.*, 2001, BMJ *322*, 29-32; Soria *et al.*, 2001, Diabetologia *44*, 407-415). Studie naznačily, že ačkoliv představuje transplantace intaktní pankreatické tkáně účinnou léčbu, má tento postup tři hlavní překážky: 1) nedostatek dárcovkého materiálu; 2) nutnost rozsáhlejšího chirurgického zákroku a 3) potřeba dlouhodobé imunosupresivní terapie s krátkodobým přínosem. Stejně tak je transplantace ostrůvku účinná pouze do určité míry. Tento způsob zahrnuje odebrání ostrůvků ze slinivky dárce a injekci do portální (jaterní) žíly. Tento postup nav íc zahrnuje aplikaci určitého počtu injekcí, což vyžaduje několik hospitalizací (Serup *et al.*, 2001, BMJ *322*, 29-32; Soria *et al.*, 2001, Diabetologia *44*, 407-415). Kromě toho musí tito pacienti ještě podstoupit intenzivní imuno-supresivní terapii. Navíc stejně jako v případě transplantace pankreatické tkáně i v tomto případě, kdy se ostrůvky vyjímají z těl dárců, je velký nedostatek dárců. Probíhají sice studie používající xenoimplantované (heteroimplantované) ostrůvky prasat, nicméně imunitní odhojení implantátu je stále významnou překážkou tohoto přístupu (Serup *et al.*, 2001, BMJ *322*, 29-32; Soria *et al.*, 2001, Diabetologia *44*, 407-415).

Z výše uvedeného tedy vyplývá, že zde existuje potřeba vyvinout alternativní buněčné terapeutické přístupy. Společně s těmito liniemi se pro produkci buněčných linií

podobných ostrůvkům, ke které se používá řízená indukce diferenciace spodní endokrinní pankreatické dráhy, používají pankreatické duktální kmenové buňky a embryonální kmenové buňky odvozené jak z myší, tak z člověka (Assady etal.,2001, Diabetes *50*, 1691-1697; Serup *et al.*,2001, BMJ *322*, 29-32; Lumelsky *et al.*,2001, Science *292*, 1389-1394; Soria *et al.*, 2001, Diabetologia *44*, 407-415). Z myší odvozené kmenové buňky, u kterých je vyvolána diferenciace na buňky produkující hormon ostrůvků, se úspěšně používají pro rekonstituci diabetického modelu myši (Serup *et al.*, 2001, BMJ *322*, 29-32; Soria *et al.*, 2001, Diabetologia *44*, 407-415). I tyto přístupy jsou omezovány imunitním odhojením a vysoce omezeným zdrojem prekurzorových buněčných linií vhodných pro použití u lidí.

Lidské embryonální kmenové buňky (HES) se úspěšně diferencují na buňky, které produkují insulin (Assady *et al.*, 2001, Diabetes *50*, 1691-1697; Diabetes *50*: 1691-1697). Použití pluripotentních nediferencovaných HES buněk případně reprezentuje zdroj diferencovaných pankreatických β-buněk, které se používají v případě léčby takových chorob, jakými jsou například diabetes. Nicméně, i tyto metody mají celou řadu nevýhod. První nevýhodou je problém se zdrojem HES buněk jako takových. Navzdory současné publicitě seznamující širokou veřejnost s kritickou potřebou výzkumu a vývoje v oblasti HES buněk stále přetrvávají politické a etické kontroverzní postoje, díky kterým není zajištěna potřebná dostupnost příslušných HES buněk. Druhým nedostatkem použití HES buněk při výrobě diferencovaných buněk pankreatických ostrůvků je neschopnost předvídat u kultivovaných diferencovaných buněk schopnost vykazovat glukózovou reakci. Naopak Assady a kolegové (Diabetes *50*, 1691-1697) mají spíše za to, že

buňky diferencované z HES buněk glukózovou reakci nevykazují. K neschopnosti vykazovat tuto reakci by mohly přispívat diference v heterogenitě buněčných populací rostoucích v kultuře, obtíže při normalizaci inzulinové odezvy na parametry, jakými jsou například obsah proteinu nebo DNA nebo dlouhodobá expozice vysokých hladin glukózy v kultuře. Aby tedy bylo možné použít diferencované β-buňky, je třeba prokázat, že tyto buňky vykazují v případě inzulinu spojení stimul - sekrece. Dalším nedostatkem HES buněčné terapie je případné vysoké riziko vývoje teratomu.

Pankreas samotný je zdrojem progenitorových buněk Langerhansových ostrůvků. WO 01/23528 (University of Florida Research Foundation) popisuje použití progenitorových buněk Langerhansových ostrůvků pěstovaných *in vitro* pro implantaci do těla savce při *in vivo* terapii diabetu.

Diferenciaci kmenových buněk odvozených z pankreatických vývodů nebo diferenciaci izolovaných embryonálních kmenových buněk směrem k endokrinním pankreatickým liniím charakterizují exprese specifických markerových enzymů a transkripčních faktorů. Je zajímavé, že během embryonálního vývoje sdílejí ostrůvky a neurální buňky mnoho společných markerů, včetně neurálně-specifické enolasy, synaptofysinů, enzymů syntetizujících katechol, tyrosin hydroxylasy, nestinu a transkripčních faktorů HNF3β, Isl-1, Brain-4 Pax-6, Pax-4, Beta2/NeuroD, pankreatického a duodenálního homeobox genu 1 (PDX-1), Nkx6.2, Nkx2.2 a neurogeninu-3 (Ngn-3) (Ramiya *et al.*, 2000, Nat. Med. *6*, 278-282; Schwitzgebel *et al.*, 2000, Vývoj *127*, 3533- 3542; Fernandes *et al.*, 1997, Endocrinology *138*, 1750-1762; Zulewski *et al.*, 2001, Diabetes *50*, 521-533; Gradwohl *et al.*, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 97, 1607- 1611). Funkčními markery pro zralejší buňky ostrůvků jsou exprese glukagonu,

somatostatinu, inzulinu, glukózového transporteru 2 (Glut2) a pankreatického polypeptidu.

II. Glukagon

Glukagon je peptidový hormon obsahující 29 aminokyselin, který se uvolňuje v α-buňkách Langerhansových ostrůvků. α-Buňky produkující glukagon reprezentují jednu z nejranějších populací detekovatelných buněk ostrůvků při vývoji endokrynního pankreatu. Tkáňově specifické uvolňování proglukagonu je řízeno buněčně specifickou expresí prohormonových konvertasových (PC) enzymů. Zásadní úlohu PC2 při zpracování ostrůvkového proglukanonu odhalily studie PC2 prováděné na vědomí zbavené myši. Tato myš má mírnou hypoglykemii a zvýšený proinzulin a vykazuje závažný defekt při zpracování proglukagonu na zralý pankreatický glukagon a α-buňky myších ostrůvků sekretují proglukagon z atypických sekrečních granulí. (J. Biol Chem. 1998 Feb 6; 273(6): 3431-7; J Biol Chem. 2001 Jul 20; 276(29): 27197-202).

Klíčové biologické účinky glukagonu se spojují při regulaci homeostázy glukózy skrze zesílenou syntézu a mobilizaci glukózy v játrech. Receptory glukagonu jsou rovněž exprimovány na β-buňkách lidských ostrůvků a přispívají k regulaci glukózou stimulované sekrece inzulinu (Diabetologia 2000 Aug; 43(8): 1012-9).

Glukagon zpravidla funguje jako protiregulační hormon, který působí proti účinkům inzulinu a udržuje hladiny krevní glukózy, zejména u hypoglykemických pacientů. U pacientů, kteří trpí diabetem sehrává nadbytečná sekrece glukagonu hlavní roli při metabolických poruchách

souvisejících s diabetem, jako například při hyperglykemii. Hlavním problémem diabetických pacientů s opakující se hypoglykemii je vývoj defektních protiregulačních odpovědí, které zahrnují redukované nebo absenční glukagonové odpovědi na hypoglykemii. Pochopení toho, jak a proč autonomní nervový systém a α-buňky ostrůvků vyvinou defekty v sekreci glukagonu vedou k hypoglykemické necitlivosti je tedy hlavním úkolem při výzkumu diabetu.

Farmakologické podání glukagonu vede k rychlému zvýšení krevní glukózy, a injektovatelný glukagon se tedy používá jako farmakologická léčba diabetických pacientů v případě, kdy těmto pacientům hrozí signifikantní hypoglykemie. Na diabetes se dlouhodobě pohlíželo jako na bihormonální poruchu, přičemž přebytek glukagonu signifikantně přispívá k vývoji hyperglykemie. Shah a kolegové (Am. J. Physiol 1999 277: E283-E290) zkoumali důležitost okolní koncentrace inzulinu pro vývoj hyperglykemie vyvolané glukagonem u lidí a následné prandiální glukózové zatížení. Autoři zjistili, že přebytek glukagonu v přítomnosti relativního nedostatku inzulinu zjevně přispívá ke snížení suprese výroby glukózy a tedy k hyperglykemie. Inhibitory sekrece glukagonu nebo účinku glukagonu lze tedy použít pro léčbu diabetiků s inzulínovou nedostatečností a/nebo přebytkem glukagonu. Ze studií prováděných u pacientů trpících diabetem 2. typu vyplívá, že nedostatek suprese glukagonu částečně přispívá k postprandiální hyperglykemii tím, že urychluje glykogenolýzu. Analýza krevní glukózy v přítomnosti nebo za absence glukagonové suprese indukované somatostatinem během orálního testu glukózové tolerance (OGTT) odhalila signifikantní zvýšení glukózy u subjektů s vyšší hladinou

glukagonu. (Viz J Clin Endocrinol Metab. 2000 Nov; 85(11): 4053-9).

Celá řada studií prokázala, že glukagon podporuje rozklad tuku (známý jako lipolýza) jak v buněčných preparátech, tak *in vivo*. Glukagon může tedy podporovat lipolýzu v lidské adipózní tkáni. Nicméně starší studie byly spíše protichůdné, přičemž některé zprávy potvrzovaly úlohu glukagonu při lipolýze v lidských adipocytech. Lidský glukagon a vazoaktivní intestinální polypeptid (VIP) stimulují uvolňování volných mastných kyselin z lidské adipózní tkáně *in vitro*, zatímco ostatní experimenty selhaly při prokazování signifikantních vlivů glukagonu na lipolýzu v izolovaných lidských tukových buňkách (Int. J. Obes. 1985; 9(1): 25-7). Nedostatek glukagonu neboli fyziologická hyperglukagonemie *in vivo* neprodukuje signifikantní změny průtoku palmitátu, což je index lipolýzy, u normálního nebo diabetického lidského subjektu (J Clin Endocrinol Metab. 1991 Feb; 72 (2): 308-15). Podobně negativní zjištění byla zaznamenána nedávno, kdy se 7 zdravým subjektům mužského pohlaví implantovaly do abdominální stěny trvale mikrodialytické katétry a zkoumaly se účinky infuze glukagonu na intersticiální glycerol, plazmový glycerol a FFA. Žádné účinky na glycerol nebo volné mastné kyseliny nebyly při systemické infuzi glukagonu s nebo bez exogenní glukózy detekovány. (J Clin Endocrinol Metab. 2001 May 1; 86 (5): 2085-2089). Podobně negativní výsledky se získaly při studii lipolýzy u normálních subjektů mužského pohlaví, kterým byly do abdominální adipózní tkáně dlouhodobě implantovány mikrodialytické katétry (J Clin Endocrinol Metab. 2001 May; 86 (5):2085-9). Dostupná data tedy nepodporují důležitou fyziologickou úlohu glukagonu při lipolýze.

Glukagon má antimotilitní účinky na gastrointestinální trakt (jícen, žaludek, tenké a tlusté střevo), pokud se podává farmakologicky lidským subjektům. (Dig Dis Sci. 1979 Jul; 24 (7): 501-8; Gut. 1975 Dec;16 (12): 973-8; N Engl J Med. 1999 Nov 11; 341 (20): 1496-503). Glukagon může rovněž uvolňovat hladké svalstvo v žlučníku a v močové trubici, což lze případně využít při radiologických studiích žlučníku a ledvin.

III. Somatostatin

Somatostatin je endogenní peptid produkovaný v pankreatických δ-buňkách, které vykonávají celou řadu různých důležitých funkcí v těle. Somatostatin je vysoce flexibilní cyklický peptid s velmi krátkým biologickým poločasem života. U somatostatinu, který byl původně objevený pro své působení jako klasický endokrinní hormon systému hypotalamické hypofýzy, se později ukázalo, že rovněž působí jako parakrinní a autokrinní signalizační faktor pro širokou škálu buněčných typů. Početné fyziologické procesy, o kterých se v současné době předpokládá, že jsou ovlivňovány somatostatinem, zahrnují sekreci hormonu a peptidového faktoru, neurotransmisi, buněčnou proliferaci, kontrakci hladkého svalstva, absorpci živin a zánět. Hormony a peptidy regulované somatostatinem zahrnují růstový hormon (GH), thyroid stimulující hormon (TSH), prolaktin (PRL), inzulin, a látku P (SP).

Somatostatin ovlivňuje funkci mnoha důležitých biologických systémů, jakými jsou na příklad endokrinní systém, gastrointestinální systém, vaskulární systém a imunitní systém společně s centrálním a periferním nervovým

systémem. U endokrinního systému sehrává somatostatin důležitou úlohu při řízení sekrece růstového hormonu, inzulinu a glukagonu (Koerker *et al.*, Science 1974, 184, 482-484). Účinky somatostatinu na gastrointestinální a vaskulární biologické systémy vedly ke klinickému terapeutickému využití somatostatinu v obou těchto oblastech. Zdá se, že v centrálním nervovém systému (CNS) somatostatin působí jako důležitý regulátor kognitivních funkcí (Schettini, Pharmacologic Research 1991, 23, 203-215) a ve specifických oblastech mozku působí jako neurotransmiter nebo jako neuromodulátor regulující uvolňování neurotransmiterů, jakými jsou například acetylcholin (Gray etal., J. of Neuroscience 1990, 10, 2687-2698) a dopamin (Thal *et al.*, Brain Research 1986, 372, 205-209). V periferním nervovém systému (PNS) je somatostatin přítomen ve vláknech obsahujících katecholamin a v senzorických terminálech společně s látkou P (Greenet *al.*, Neuroscience 1992,50, 745-749) a působí zde tak, že inhibuje jejich uvolňování a mediované účinky.

Stejně jako samotný somatostatin se receptory somatostatinu nacházejí v celé řadě tkání a buněčné typy zahrnují typy patřící do endokrinního, gastrointestinálního, vaskulárního, imunitního, CNS a PNS systému. Vysoký výskyt receptorů somatostatinu byl rovněž prokázán v celé řadě různých lidských tumorů. Neuroendokrinní tumory představují třídu tumorů, které vykazují vysokou hustotu funkčně aktivních receptorů somatostatinu. Funkčně aktivní neuroendokrinní tumory se v důsledku nadbytečného uvolňování hormonu z buněk tumoru prezentují takovými klinickými symptomy, jakými jsou například syndrom gastrinomu a glukagomu. Tyto symptomy lze léčit aktivací receptorů somatostatinu.

IV. Pankreatický Polypeptid

Je známo, že pankreatické gama buňky sekretují pankreatický polypeptid (PP), který je členem neuropeptidové Y rodiny proteinů. O tom, jak přesně funguje fyziologický mechanizmus tohoto peptidu, se ví pouze málo. Je známo, že PP vyvolává určité účinky přímo v pankreatu tím, že inhibicí stimulace vagového nervu inhibuje sekreci pankreatických trávicích enzymů. Předpokládá se, že k tomuto účinku PP dochází jak v důsledku přímého působení na vagus, tak v důsledku centrálním nervovým systémem mediovaného působení na dorzální vagový komplex a nucleus arcuatus (Deng et al Brain Res 2001; 902: 18-29). Rovněž se předpokládá, že prostřednictvím těchto účinků vagového nervu PP inhibuje uvolňování inzulinu. Rovněž se zdá, že PP inhibuje hypertrofii ostrůvkových buněk, což lze pozorovat za non-inzulinově dependentních diabetických podmínek. Cirkulující hladiny PP rovněž působí na játra, což vede ke snížení produkce hepatické glukózy. Podávání PP tedy může sehrát určitou úlohu při léčbě non-inzulinově dependentního diabetu mellitus.

V. Neembryonální zdroje kmenových buněk

Dospělé buňky vykazují schopnost diferenciace. Například nedávné studie prokázaly specifickou schopnost buněk stromatu odvozených z kostní dřeně podléhat neuronální diferenciaci *in vitro* (Woodbury *et al.* (2000) J Neuroscience Research 61:364; Sanchez-Ramos *et al.* (2000) Exp Neurology 164: 247). V případě těchto vyšetřování léčba buňky stromatu odvozenými z kostní dřeně antioxidanty, epidermálním růstovým faktorem (EGF), nebo neurotrofním

faktorem odvozeným z mozku (BDNF) indukovala buňky k tomu, aby podléhaly morfologickým změnám, které jsou konzistentní s neuronální diferenciací, tj. rozsah dlouhých buněčných procesů končí v růstových kónusech a filopodiích (Woodbury *et al.* (2000) J Neuroscience Research 61: 364; Sanchez-Ramos *et al.* (2000) Exp Neurology 164: 247). Kromě toho tato činidla indukovala expresi neuronálně specifického protein zahrnujícího nestin, neuronspecifickou enolasu (NSE), neurofilament M (NF-M), NeuN, a receptor nervového růstového faktoru trkA (Woodbury *et al.* (2000) J Neuroscience Research 61:364; Sanchez-Ramos *et al.* (2000) Exp Neurology 164: 247.

Další příklady dospělých buněk majících schopnost diferenciace jsou popsány v následujících patentech:

Patent US 5 486 359 (Osiris) se týká izolované homogenní populace lidských mesenchymálních kmenových buněk, které lze diferencovat na buňky více než jednoho typu pojivové tkáně. Tento patent popisuje způsob izolace, purifikace a rozsáhlé replikace těchto buněk v kultuře, tj. *in vitro*.

Patent US 5 942 225 (Case Western a Osiris) popisuje kompozici pro indukci liniově-usměrněné diferenciace izolovaných lidských mesenchymálních kmenových buněk v jediné konkrétní mesenchymální linii, která zahrnuje lidské mesenchymální kmenové buňky a jeden nebo několik bio-aktivních faktorů pro indukci diferenciace mesenchymálních kmenových buněk do jediné konkrétní linie.

Patent US 5 736 396 (Case Western) popisuje způsob indukce *ex vivo* liniově usměrněné diferenciace izolovaných lidských mesenchymálních kmenových buněk, který zahrnuje

kontaktování mesenchymálních kmenových buněk s bioaktivním faktorem tak, aby se tímto kontaktem indukovala jejich *ex vivo* diferenciace do jediné konkrétní mesenchymální linie. Tento patent rovněž popisuje způsob léčby osoby, u níž existuje potřeba mesenchymálních buněk určité mesenchymální linie, přičemž tento způsob zahrnuje podání kompozice obsahující izolované lidské mesenchymální kmenové buňky, které byly indukovány k diferenciaci *ex vivo* kontaktem s bioaktivním faktorem tak, aby se tímto kontaktem indukovala jejich *ex vivo* diferenciace do jediné konkrétní mesenchymální linie, osobě, která tuto léčbu potřebuje.

Patent US 5 908 784 (Case Western) popisuje kompozici pro *in vitro* chondrogenezi lidských mesenchymálních prekurzorových buněk a *in vitro* tvorbu lidských chondrocytů z těchto lidských mesenchymálních prekurzorových buněk, přičemž tato kompozici obsahuje izolované lidské mesenchymální kmenové buňky zahuštěné do těsné blízkosti jako paketované buněčné pelety a alespoň jedno chondroinduktivní činidlo, které je s nimi v kontaktu. Tento patent rovněž popisuje způsob indukce chondrogeneze v mesenchymálních kmenových buňkách uvedením mesenchymálních kmenových buněk do kontaktu s chondroinduktivním činidlem *in vitro* zatímco jsou kmenové buňky zahuštěny do těsné blízkosti jako paketované buněčné pelety.

Patent US 5 902 741 (Advanced Tissue Sciences, Inc.) popisuje žijící chrupavkovou tkáň připravenou *in vitro*, která zahrnuje buňky stromatu produkující chrupavku a proteiny pojivové tkáně, které jsou přirozeně sekterované buňkami stromatu přichycenými na v podstatě obalující trojrozměrný rám tvořený biokompatibilním, neživým materiálem, který byl zpracován do trojrozměrné struktury mající intersticiální prostory přemostěné buňkami stromatu.

Tento patent rovněž popisuje kompozici určenou pro růst nové chrupavky obsahující mesenchymální kmenové buňky v polymerním nosiči vhodném pro proliferaci a diferenciaci buněk na buňky chrupavky.

Patent US 5 863 531 (Advanced Tissue Sciences, Inc.) popisuje tubulární živou tkáň stromatu připravenou *in vitro*, která obsahuje buňky stromatu a proteiny pojivové tkáně, které jsou za normálních podmínek sekretovány buňkami stromatu, přichycené na v podstatě obalující trojrozměrný tubulární rám tvořený biokompatibilním, neživým materiálem, který byl zpracován do trojrozměrné struktury mající intersticiální prostory přemostěné buňkami stromatu.

Patent US 6 022 743 (Advanced Tissue Sciences, Inc.) popisuje trojrozměrný systém kultury založené na bázi buněk stromatu odvozený z pankreatických parenchymálních buněčných kultur na rámu žijící tkáně stromatu. Tyto buňky stromatu mohou zahrnovat buňky pupeční šňůry, buňky placenty, mesenchymální kmenové buňky nebo fetální buňky. Tento systém kultur se tedy používá pro poskytnutí materiálu fungující pankreatické tkáně a orgánu.

Patent US 5 811 094 (Osiris) popisuje způsob výroby pojivové tkáně, který zahrnuje výrobu pojivové tkáně u jedince, který toto potřebuje tak, že se mu podá uvedený individuální buněčný přípravek obsahující lidské mesenchymální kmenové buňky, které se izolují z lidské kostní dřeně a které jsou v podstatě prosté krevních buněk.

Patent US 6 030 836 (Thiede *et al.*) popisuje způsob zachování lidských hematopoietických kmenových buněk *in vitro*, který zahrnuje ko-kultivaci lidských mesenchymálních

kmenových buněk s hematopoietickými kmenovými buňkami, při které se alespoň některé hematopoietické kmenové buňky zachovají svůj fenotyp kmenové buňky.

Patent US 6 103 522 (Torok-Storb *et al.*) popisuje ozařovanou „imortalizovanou" linii lidské buňka stromatu v kombinované *in vitro* kultuře s lidskými hematopoietickými prekurzorovými buňkami.

WO 96/02662 A1 a patent US 5 879 940 (Torok-Storb *et al.*) popisuje lidské linie buněk stromatu kostní dřeně které podporují krvetvorbu.

Patent US 5 827 735 (Morfogen) popisuje purifikované pluripotentní mesenchymální kmenové buňky, které jsou v podstatě prosté vícejadernými myogenními liniemi determinovaných buněk, a které mají převážně hvězdicový tvar, přičemž tyto mesenchymální kmenové buňky tvoří, pokud se dostanou do kontaktu se svalovým morfogenním proteinem v prostředí tkáňové kultury, které obsahuje 10% fetální bovinní sérum, převážně fibroblastické buňky a pokud se dostanou do kontaktu se svalovým morfogenním proteinem a faktorem inhibujícím jizvy ve tkáňové kultuře s prostředím obsahujícím 10% fetální bovinní sérum, potom tvoří převážně větvené vícejaderné struktury, které spontánně smršťují.

WO 99/43286 (Hahnemann University) popisuje použití mesenchymálních kmenových buněk při léčbě centrálního nervového systému a způsob řízení diferenciace buněk stromatu kostní dřeně.

WO 98/20731 (Osiris) popisuje kompozici obsahující mesenchymální megakaryocytové prekurzory a způsob izolace MSCs souvisejících s izolovanými megakaryocyty izolací megakaryocytů.

WO 99/61587 (Osiris) popisuje lidské CD45 a/nebo fibroblastové a mesenchymální kmenové buňky.

WO 01/079457 (Ixion Technology) popisuje použití kmenových buněk odvozených z kostní dřeně a z krve kultivovaných a diferenciovaných *in vitro* pankreatickým buňkám podobné buňky. WO 01/78752 (University of Texas) popisuje použití neurálních kmenů implantovaných do pankreatu při léčbě pankreatických poruch.

Nicméně techniky popsané v předcházejících odstavcích se opírají o zdroje prekurzorových buněk, jakým je například kostní dřeň, jejíž získání je obtížné a pro dárce bolestivé. Cílem vynálezu je tedy poskytnout buňku, materiál a způsob, který by pomáhal při léčbě endokrinních onemocnění pankreatu.

Podstata vynálezu

Předložený vynález poskytuje buňku stromatu odvozenou z izolované adipózní tkáně izolovanou z těla člověka nebo jiného savce indukovanou k expresi alespoň jedné genotypické nebo fenotypické vlastnosti pankreatické buňky, a výhodně endokrinní pankreatické buňky.

Buňka může vykazovat vlastnost α-buňky produkující glukagon, β-buňky produkující inzulin, γ-buňky produkující pankreatický polypeptid nebo δ-buňky produkující somatostatin. U výhodného provedení se produkuje β-buňka produkující inzulin. Buňka podle vynálezu může být indukována k diferenciaci *in vitro* nebo k diferenciaci po implantaci do těla pacienta.

Buňku podle vynálezu lze zabudovat do dvou nebo trojrozměrné struktury, a vytvořit tak implantovatelnou nebo implantovanou matrici, jak bude podrobněji popsáno níže.

Předložený vynález například poskytuje způsob zapouzdření diferencovaných z adipózní tkáně odvozených dospělých kmenových buněk nebo diferencovaných buněk v biomateriálu kompatibilním s transplantací do těla savce výhodně člověka. Zapouzdřující materiál by neměl bránit uvolňování proteinů nebo hormonů sekretovaných dospělými kmenovými buňkami odvozenými z adipózní tkáně nebo diferencovanými buňkami. Použité materiály zahrnují neomezujícím způsobem deriváty kolagenu, hydrogely, alginát vápenatý, agarózu, kyselinu hyaluronovou, deriváty kyseliny polymléčné/kyseliny polyglykolové a fibrin.

Buňka podle vynálezu může být rovněž geneticky zpracována tak, aby zahrnovala exogenní genetický materiál. U jednoho provedení se použije vektor, který je schopen integrovat požadované genové sekvence do buněčného chromozomu hostitele. U výhodného provedení se zavedená nukleokyselinová molekula zabuduje do plasmidu nebo virového vektoru, který je schopen autonomní replikace v recipientní hostitelské buňce. Pro tyto účely lze použít libovolný vektor zvolený z široké škály různých vektorů. Výhodné eukaryotické vektory zahrnují například virus vakcínie, SV40, retroviry, adenoviry, adeno-související viry a celou řadu komerčně dostupných savčích expresních vektorů na bázi plasmidů, které jsou v daném oboru obecně známé. Po připravení vektoru nebo nukleokyselinové molekuly pro expresi, lze za použití libovolného vhodného prostředku, tj. transformace, transfekce, virové infikace, konjugace, fúze protoplastů, elektroporace, technology

částicové pistole, vysrážení fosforečnanu vápenatého, přímá mikroinjektáž apod., DNA konstrukt(konstrukty) zavést do vhodné hostitelské buňky. Po zavedení vektoru se recipientní buňky nechají růst ve zvoleném prostředí, které se zvolí tak ,aby bylo vhodné pro růst buněk obsahujících uvedený vektor. Exprese molekuly (molekul) naklonovaného genu vyvolá produkci heterologního proteinu.

Vynález rovněž poskytuje způsob diferenciace buněk stromatu odvozených z izolované adipózní tkáně k expresi alespoň jedné genotypické nebo fenotypické vlastnosti pankreatické buňky, například α-buňky produkující glukagon, β-buňky produkující inzulin, γ-buňky produkující pankreatický polypeptid nebo δ-buňky produkující somatostatin, přičemž tento způsob zahrnuje kontaktování buňky stromatu odvozené z izolované adipózní tkáně s pankreas indukující látkou, výhodně endokrinní pankreas indukující látkou. Tato látka se nachází v chemicky definovaném médiu buněčné kultury, jak bude podrobněji popsáno níže, které může zahrnovat růstové faktory, cytokiny, chemická činidla, a/nebo hormony v koncentracích dostatečných pro indukci buněk stromatu odvozených z izolované adipózní tkáně k expresi alespoň jednoho endokrinního pankreatického buněčného markeru.

Vynález dále poskytuje způsob léčby poruchy, která je mediovaná pankreatickou funkcí α-buňky produkující glukagon, β-buňky produkující inzulin, γ-buňky produkující pankreatický polypeptid nebo δ-buňky produkující somatostatin, u hostitele, přičemž tento způsob léčby zahrnuje indukci buňky stromatu odvozené z izolované adipózní tkáně k expresi alespoň jedné genotypické nebo fenotypické vlastnosti pankreatické buňky, která je terapeuticky přínosná pro hostitele; a následnou

transplantaci indukované buňky do těla hostitele. Výhodou metody podle vynálezu je to, že buňky stromatu odvozené z adipózní tkáně lze z těla hostitele přímo izolovat, diferencovat a následně autologně re-implantovat. Alternativně lze tuto terapii provádět allogenně.

Neomezujícími příklady pankreatických endokrinních poruch nebo degenerativních stavů, k jejich léčbě lze předložený vynález použít, zahrnují diabetes mellitus 1. typu, diabetes mellitus 2. typu, onemocnění související s lipodystrofií, chemicky vyvolané onemocnění, onemocnění související s pankreatitidou nebo onemocnění související s traumatem.

Buňku podle vynálezu lze použít buď jako homogenní nebo v podstatě homogenní populaci buněk nebo jako součást buněčné populace, kde ostatní buňky sekretují látky, které podpoří růst nebo diferenciaci buňky podobné endokrinní pankreatické buňce, nebo s dalšími buňkami, které sekretují nebo exhibují další požadované terapeutické faktory.

Vynález rovněž zahrnuje způsoby výroby hormonů, který spočívá v ošetření buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně. Součástí jsou rovněž způsoby kondiciováním media kultury, kdy se médium buněčné kultury vystaví působení buňky podle vynálezu. Toto médium lze následně použít pro kulturu jiných než z adipózní tkáně odvozených buněk.

Vynález se rovněž týká kitu pro produkci buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně, které byly indukovány k expresi alespoň jedné genotypické nebo fenotypické vlastnosti pankreatické buňky, přičemž tento kit může obsahovat instrukce pro separaci stromálních nebo kmenových buněk ze zbytku adipózní tkáně a obsahuje médium pro

diferenciaci kmenových buněk, přičemž médium způsobí, že buňka exprimuje alespoň jednu genotypickou nebo fenotypickou vlastnost pankreatické buňky, nebo je obecně pankreogenní. Rovněž je zde popsán kit, který zahrnuje všechny nezbytné složky pro vytvoření tkáně podle vynálezu. Tento kit zahrnuje buňku nebo buněčnou populaci podle vynálezu, biologicky kompatibilní mřížku a stejně tak složky tvořené hydratačními činidly, substráty buněčné kultury, média buněčné kultury, další buňky, antibiotické sloučeniny a hormony.

Další cíle a znaky vynálezu se stanou zjevnějšími po prostudování následujícího popisu.

Předložený vynález poskytuje buňku stromatu odvozené z izolované adipózní tkáně člověka nebo jiného savce indukovanou k expresi alespoň jedné genotypické nebo fenotypické vlastnosti pankreatické buňky, a výhodně endokrinní pankreatický buňka. Buňka může vykazovat vlastnost α-buňky produkující glukagon, β-buňky produkující inzulin, γ-buňky produkující pankreatický polypeptid nebo δ-buňky produkující somatostatin. U výhodného provedení se produkuje β-buňka produkující inzulin. Buňku podle vynálezu lze indukovat k diferenciaci *in vitro* nebo k diferenciaci po implantaci pacientovi.

Buňky produkované způsoby podle vynálezu mohou poskytovat zdroj částečně nebo zcela diferencovaných funkčních buněk majících vlastnosti zralých pankreatických buněk pro výzkum, transplantaci, a vývoj buněčných terapeutických produktů pro léčbu onemocnění živočichů, výhodně lidských onemocnění, opravu nebo zlepšení tkáně a

korekci život měnících nebo život ohrožujících metabolických poruch. Součástí jsou rovněž způsoby produkce takových buněk.

I. Definice

„Vývojový fenotyp" je potenciál buňky získat procesem diferenciace určitý fyzikální fenotyp.

„Genotyp" je exprese alespoň jednoho genu mediátorové RNA transkriptu souvisejícího s diferenciační dráhou.

„Beta buňka pankreatického ostrůvek" označuje libovolnou buňku schopnou sekretovat inzulin, analog inzulinu, prekurzor inzulinu nebo inzulinu podobný faktor, výhodně regulovaným způsobem, výhodněji způsobem dependentním na koncentraci glukózy.

„Pankreatická alfa buňka" označuje libovolnou buňku schopnou sekretovat glukagon, analog glukagonu, prekurzor glukagonu nebo glukagonu podobný faktor, výhodně regulovaným způsobem.

„Pankreatická delta buňka" označuje libovolnou buňku schopnou sekretovat somatostatin, prekurzor somatostatinu nebo somatostatinu podobný faktor, výhodně regulovaným způsobem.

Výrazem „pankreatická PP buňka" nebo „gama buňka" se rozumí libovolná buňka schopná sekretovat pankreatický peptid, jeho analog, prekurzor nebo podobný faktor, výhodně regulovaným způsobem.

Výrazem „inzulin" se rozumí inzulin, analogy inzulinu nebo známé inzulinu podobné faktory. Toto zahrnuje prohormon nebo inzulinové prekurzorové proteiny, zcela zpracovaný protein nebo metabolit libovolného z těchto entit.

„Diabetes mellitus" označuje libovolný chorobný stav, při kterém je funkce beta buňka pankreatického ostrůvku dysfunkční, takže dojde ke ztrátě schopnosti reagovat na cirkulující hladiny glukózy. Tento chorobný stav může být důsledkem vrozené metabolické chyby, traumatického poškození, chemického poškození, infekčního onemocnění, chronické konzumace alkoholu, endokrinopatie, genetických poruch, například Downova syndromu nebo libovolné další etiologie způsobující přímo nebo nepřímo poškození endokrinního pankreatu.

MODY neboli „mature onset diabetes of young" zahrnuje malé procento diabetických pacientů, kteří zjevně nespadají do fenotypu diabetu 1. typu nebo diabetu 2. typu.

Je charakteristický genetickým defektem funkce beta buňky s raným nástupem, zpravidla před 25. rokem života.

„Autoimunitní onemocnění" zahrnuje libovolný imunitou mediovaný způsob, humorální nebo buněčný, který vede k odhojení a destrukci hostitelského endokrinního pankreatu. Etiologií tohoto způsobu je neomezujícím způsobem imunitní odezva na infikaci činidlem, jakým je například coxsackie virus nebo *Mycoplasma pneurraoniae*, vrozený metabolický sklon k autoimunitní dysfunkci nebo chemické expozici.

Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE). Nejběžněji používanou technikou (ačkoliv ne jediná) pro dosažení frakcionace polypeptidů na základě velikosti je

polyacrylamidová gelová elektroforéza. Principem tohoto způsobu je migrace molekul polypeptidu skrze gel, jako skrze síto, které zpomaluje pohyb největších molekul největší měrou a pohyb nejmenších molekul nejmenší měrou. Čím menší polypeptidový fragment je, tím větší má mobilitu za elektroforézy v polyakrylamidovém gelu. Jak před, tak během elektroforézy jsou polypeptidy zpravidla kontinuálně vystaveny působení detergentního nátriumdodecylsulfátu (SDS), přičemž za těchto podmínek se polypeptidy denaturují. Nativní gely protékají za absence SDS. Polypeptidy frakcionované polyakrylamidovou gelovou elektroforézou lze vizualizovat přímo zabarvováním.

Postup Westernového přenosu. Účelem postupu westernového přenosu (rovněž označovaného jako „imuno-blotting") je fyzikální přenos polypeptidů frakcionalizovaných polyakrylamidovou gelovou elektroforézou na nitrocelulózovém filtru nebo dalším vhodném povrchu, za současného zachování relativních pozic polypeptidů, které získaly v důsledku frakcionačního postupu. Blot se potom sonduje protilátkou, která se specificky váže na sledovaný polypeptid (polypeptidy).

„Purifikovaným" proteinem nebo hormonem je protein nebo hormon, který se separoval z celulární složky. „Purifikované" proteiny nebo hormony se purifikovaly do stupně čistoty, který se v přírodě nevyskytuje. Výrazem "v podstatě čistý" protein nebo hormon se rozumí protein nebo hormon v preparátu, který obsahuje pouze ty další složky, které podstatně neovlivňují vlastnosti hormonu nebo proteinu.

Výraz „Geny endokrinního pankreatu" má zahrnovat neomezujícím způsobem kterýkoliv z genů souvisejících s

fenotypem diferenciace nebo diferencovanými alfa, beta, delta nebo PP buňkami endokrinního pankreatu. Tyto geny zahrnují neomezujícím způsobem pdx1, pax4, pax6, neurogenin 1, neurogenin 2, neurogenin 3, neuro D, GLUT2, inzulin, Isl1, Hlxb9, Nkx2.2.

II. Kmenové buňky nebo buňky stromatu odvozené z adipózní tkáně

Adipózní kmenová buňka nebo "adipózní buňka stromatu" označuje buňky, které pocházejí z adipózní tkáně. Výrazem „adipózní" se rozumí libovolná tuková tkáň. Adipózní tkání může být hnědá nebo bílá adipózní tkáň odebraná ze subkutánní tkáně, omentální tkáně/viscerální tkáně, prsní žlázy, z pohlavní žlázy nebo jiného místa výskytu adipózní tkáně. Výhodně je adipózní tkání subkutánní bílá adipózní tkáň.

Tyto buňky mohou obsahovat primární buněčnou kulturu nebo imortalizovanou buněčnou linii. Adipózní tkáň může být tkání libovolného organizmu, který má tukovou tkáň. Výhodně je adipózní tkání savčí adipózní tkáň, nejvýhodněji je adipózní tkání lidská adipózní tkáň. Konvenčním zdrojem je adipózní tkáň získaná při liposukčním chirurgickém zákroku, nicméně zdroj adipózní tkáně nebo způsob izolace adipózní tkáně není pro vynález nikterak zásadní. Liposukce je relativně neinvazivní procedura s kosmetickými účinky, která je přijatelná pro podstatnou většinu pacientů. Je dobře zdokumentováno, že adipocyty jsou obnovitelnou buněčnou populací. I po chirurgickém odstranění liposukcí nebo jinými postupy lze u dané osoby na stejném místě po určité době pozorovat obnovu adipocytů. Z tohoto vyplývá,

že adipózní tkáň obsahuje kmenové buňky stromatu, které jsou schopné autoobnovy na adipocyty.

Z patologických fakt vyplývá, že buňky stromatu odvozené z adipózní tkáně jsou schopné diferenciace po víceliniových drahách. Nejběžnější měkké tkáňové tumory, liposarkomy, se vyvíjejí z adipocytům podobných buněk. Měkké tkáňové tumory smíseného původu jsou relativně běžné. Tyto mohou zahrnovat prvky adipózní tkáně, sval (hladký nebo kosterní), chrupavku, a/nebo kost. U pacientů, kteří trpí vzácným stavem známým jako progresivní heteroplazie kostí, tvoří subkutánní adipocyty z neznámého důvodu kost.

Z lidské adipózní tkáně odvozené dospělé buňky stromatu lze expandovat *ex vivo*, diferencovat po unikátních liniových drahách, geneticky zpracovat, a opět zavést do těla jednotlivců buď ve formě autologní nebo allogenní transplantace.

WO 00/53795 (University of Pittsburgh a The Regents of University of, California) a patnetová přihláška US 2002/0076400 (University of Pittsburgh) popisuje kmenové buňky odvozené z adipózní tkáně a mřížky v podstatě prosté adipocytů a červených krvinek a klonální populace kmenových buněk pojivové tkáně. Tyto buňky lze použít, samotné nebo v rámci biologicky kompatibilních kompozic, ke generování diferencovaných tkání a struktur, jak *in vivo*, tak *in vitro*. Kromě toho lze buňky expandovat a kultivovat, aby produkovaly hormony a poskytovaly média kondiciované kultury pro podporu růstu a expanzi jiné buněčné populace. V další kategorii tyto publikace popisují z tuku odvozenou mřížku v podstatě prostou buněk, které zahrnují extracelulární matricový materiál z adipózní tkáně. Tuto mřížku lze použít jako substrát pro usnadnění růstu a

diferenciace buněk, *in vivo* nebo *in vitro*, v kitu nebo zralé tkáni nebo strukturách. Žádná z publikací nepopisuje z adipózní tkáně odvozené buňky stromatu, které by byly indukované pro expresi alespoň jedné fenotypické nebo genotypické vlastnosti buňky endokrinního pankreatu.

Patent US 6 391 297 (Artecel Sciences) popisuje kompozici obsahující izolovanou buňku stromatu odvozenou z lidské adipózní tkáně, která byla diferencována, aby vykazovala alespoň jednu vlastnost osteoblastu, kterou lze použít *in vivo* pro opravu kosti a pro léčbu onemocnění kosti. Tuto osteoblastu podobnou buňku odvozenou z adipózní tkáně lze případně geneticky modifikovat nebo kombinovat s matricí.

Patent US 6 426 222 (BioHoldings International) popisuje způsoby indukce diferenciace osteoblastu z lidské extramodulární adipózní tkáně inkubací buněk adipózní tkáně v kapalném nutričním médium, které musí obsahovat glukokortikoid.

WO 00/44882 a Patent US 6 153 432 (kde jsou jako vynálezci zapsání Halvorsen et al) popisují metody a kompozice pro diferenciaci lidských preadipocytů izolovaných z adipózní tkáně na adipocyty nesoucí biochemické, genetické a fyziologické vlastnosti podobné těm, které lze pozorovat u izolovaných primárních adipocytů.

WO 01/62901 a publikovaná patentová přihláška US 2001/0033834 (Artecel Sciences) popisuje buňky stromatu odvozené z izolované adipózní tkáně, které byly indukovány k expresi alespoň jedné fenotypické vlastnosti neuronálního, astrogliového, hematopoietického progenitoru nebo hepatické buňky. Kromě toho jsou zde rovněž popsány

buňky stromatu odvozené z izolované adipózní tkáně, které byly dediferencovány tak, postrádají adipocytové fenotypické markery.

Patent US 6 429 013 (Artecel Sciences) popisuje kompozice obsahující buňku stromatu odvozenou z izolované adipózní tkáně, která byla indukována k expresi alespoň jedné vlastnosti chondrocytu. Jsou zde rovněž popsány způsoby diferenciace těchto buněk.

Patent US 6 200 606 (Peterson *et al.*) uvádí, že prekurzorové buňky, které mají potenciál tvořit kost nebo chrupavku, lze izolovat z celé řady hematopoetických a nehematopoetických tkání, včetně periferní krve, kostní dřeně a adipózní tkáně.

Buňky stromatu odvozené z adipózní tkáně použitelné v rámci metody podle vynálezu se izolují celou řadou různých pro odborníky v daném oboru známých metod, například za použití metod popsaných v WO 00/53795 (University of Pittsburgh *et al.*) a WO 00/44882 a patentu US 6 153 432 (Zen-Bio, Inc.) U výhodného způsobu se adipózní tkáň izoluje z těla savce, výhodně z těla člověka. Výhodným zdrojem adipózní tkáně je subkutánní adipózní zdroj. U lidí se adipózní tkáň zpravidla izoluje liposukcí. Pokud mají být buňky podle vynálezu transplantovány do těla člověka, potom je výhodné, pokud se adipózní tkáň izoluje z těla stejného jedince, a poskytne se tak autologní transplantát. Alternativně může být transplantovaná tkáň alogenní.

Jako neomezující příklad lze uvést případ, kdy se u způsobu izolace buňky stromatu odvozené z adipózní tkáně adipózní tkáň ošetřuje kolagenasou v koncentracích 0,01 % až 0,5 %, výhodně 0,04 % až 0,2 %, nejvýhodněji 0,1 %,

trypsinem v koncentracích 0,01 % až 0,5 %, výhodně 0,04 % až 0,04 %, nejvýhodněji 0,2 %, při teplotách 25 °C až 50 °C, výhodně 33 °C až 40 °C, nejvýhodněji při 37 °C, po dobu 10 min až 3 h, výhodně 30 min až 1 h, nejvýhodněji 45 min. Buňky se protáhnou přes nylonový nebo mušelínový filtr s velikostí ok 20 µm až 800 µm, výhodněji 40 µm až 400 µm, nejvýhodněji 70 µm. Buňky se následně podrobí diferenciální centrifugaci přímo v mediích nebo gradientové centrifugaci na roztoku Ficoll nebo Percoll nebo jiné částicové gradientové centrifugaci. Buňky se odstřeďují při rychlostech 100x až 3000xG, výhodněji 200x až 1500xG, nejvýhodněji při 500xG po dobu 1 min až 1 h, výhodněji 2 min až 15 min, nejvýhodněji 5 min, při teplotách 4 °C až 50 °C, výhodně 20 °C až 40 °C, nejvýhodněji při 25 °C.

U ještě dalšího způsobu izolace buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně se používá mechanická systém, jaký je například popsán v patentu US 5 786 207 (Katz *et al.*). Tento systém se používá pro zavedení vzorku adipózní tkáň do automatizovaného přístroje, kde vzorek podstoupí proplachovací fázi a disociační fázi, přičemž tkáň je zde míchána a odstřeďována a výsledná buněčná suspenze se jímá do nádobky vhodné pro přímé zavedení do odstředivky. Tímto způsobem se ze vzorku tkáně izolují buňky odvozené z adipózní tkáně a současně se zachová celulární integrita požadovaných buněk.

III. Indukce buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně k tomu, aby vykazovaly alespoň jednu vlastnost pankreatické buňky

Součástí vynálezu je ošetření buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně, které indukuje tvorbu buňky, která exprimuje alespoň jednu genotypickou nebo fenotypickou vlastnost pankreatické buňky. Neomezující příklady jak indukovat diferenciaci buňky stromatu odvozené z adipózní tkáně zahrnují: 1) použití buněčných medií; 2) použití nosných buněk; 3) přímá implantace nediferencovaných buněk do tkáně pacienta; a 4) techniky buněčného inženýrství.

A) Indukce za použití buněčných médií

Aniž by se vynález vázal na některou konkrétní teorii, předpokládá se, že ošetření buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně médiem obsahujícím kombinaci séra, embryonálních extraktů, purifikovaných nebo rekombinantních růstových faktorů, cytokinů, hormonů, a/nebo chemických činidel, ve dvourozměrném nebo trojrozměrném mikro-prostředí, bude indukovat diferenciaci.

Konkrétněji vynález poskytuje způsob diferenciace buněk odvozených z adipózní tkáně na buňku mající genotypickou nebo fenotypickou vlastnost pankreatické buňky, přičemž tento způsob zahrnuje: rozprostření izolovaných dospělých kmenových buněk odvozených z adipózní tkáně v požadované hustotě na plotny, například v hustotě přibližně 1000 buněk/cm^2 až přibližně 500 000 buněk/cm^2; inkubaci buněk v chemicky definovaném kultivačním médium

obsahujícím alespoň jednu sloučeninu zvolenou z množiny sestávající z růstového faktoru, hormonu, cytokinu, sérového faktoru, kapaliny receptorů jaderných hormonů nebo libovolného dalšího definovaného chemického činidla.

Základní média použitelná v rámci způsobů podle vynálezu zahrnují neomezujícím způsobem Neurobasal (případně doplněný fetálním bovinním sérem nebo bazickým fibroblastickým růstovým faktorem (bFGF)), N2, B27, Minimální Essential Médium Eagle, Ado-1, LPM (prostý albuminu bovinního séra), F10 (HAM), F12 (HAM), DCCM1, DCCM2, RPMI 1640, BGJ Médium (s a bez modifikace Fitton-Jackson), Basal Medium Eagle (BME-s přídavkem báze Earleho soli), Dulbecco's Modified Eagle Médium (DMEM-bez séra), Yamane, IMEM-20, Glasgow Modification Eagle Médium (GMEM), Leibovitz L-15 Médium, McCoy's 5A Médium, Médium M199 (M199E-s bází Earleho soli), Médium M199 (M199H-s bází Hankeho soli), Minimum Essential Médium Eagle (MEM-E- s bází Earleho soli), Minimum Essential Médium Eagle (MEM-H-s bází Hankeho soli) a Minimum Essential Médium Eagle (MEM-NAA- s neesenciálními aminokyselinami), a celá řada dalších, včetně média 199, CMRL 1415, CMRL 1969, CMRL 1066, NCTC 135, MB 75261, MAB 8713, DM 145, Williams' G, Neuman & Tytell, Higuchi, MCDB 301, MCDB 202, MCDB 501, MCDB 401, MCDB 411,MDBC 153. Výhodným médiem pro použití v rámci vynálezu je DMEM. Tato a další použitelná média jsou mimo jiné k dispozici u společnosti GIBCO, Grand Island, N. Y., USA a Biological Industries, BetHAemek, Israel. Seznam celé řady těchto médií je sumarizován v Methods in Enzymology, Volume LVIII, „Cell Culture", pp. 62-72 (ed. Jakoby a Pastan, Academic Press, Inc).

Media použitelná pro diferenciaci buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně na buňky, které exprimují

alespoň jednu genotypickou nebo fenotypickou vlastnost pankreatické beta buňky, zahrnují sekretin nebo libovolný analog nebo agonista sekretinu, o kterých se ví, že jsou důležité při diferenciaci progenitorových buněk na beta buňky sekretující inzulin, viz WO 00/47721 (Ontogeny, Inc. *et al.*). Média použitelná v rámci způsobů podle vynálezu budou obsahovat fetální sérum, a to bovinní nebo jiného druhového původu v koncentraci of alespoň 1 % až přibližně 30 %, výhodně alespoň přibližně 5 % až 15 %, nejvýhodněji přibližně 10 %.

Embryonální extrakt kuřat nebo jiných druhů je přítomen v koncentraci přibližně 1 % až 30 %, výhodně alespoň přibližně 5 % až 15 %, nejvýhodněji přibližně 10 %.

Růstové faktory, cytokiny a hormony použité v rámci vynálezu zahrnují neomezujícím způsobem růstový hormon, erytropoetin, trombopoetin, interleukin 3, interleukin 6, interleukin 7, makrofágové kolonie stimulující faktor, c-kit ligand/ faktor kmenové buňky, ligand osteoprotegerinu, inzulin, inzulinu podobné růstové faktory, epidermální růstový faktor, fibroblastový růstový faktor, nervový růstový faktor, ciliární neurotrofní faktor, z krevních destiček odvozený růstový faktor a kostní morfogenetický protein v koncentracích pikogram/ml až miligram/ml. Při takových koncentracích jsou například růstové faktory, cytokiny a hormony použitelné v rámci způsobů podle vynálezu schopny z buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně při testech jednotek tvořících kolonie (CFU) indukovat až 100 % tvorbu krevních buněk (linie lymfoidu, erytroidu, myeloidu nebo krevní destičky). (Moore *et al.* (1973) J. Natl. Cancer Inst. 50: 603-623; Lee *et al.* (1989) J. Immunol. 142: 3875-3883; Medina *et al.* (2993) J. Exp. Med. 178: 1507-1515.

Růstové faktory, u kterých se ukázalo, že jsou schopny napomáhat při produkci buněk produkujících inzulin, zahrnují peptidy, GLP-1, extendin-4 a stejně tak analogy mající v podstatě homologní aminokyselinové sekvence, jak popisuje WO 00/09666 (Egan *et al.*).

Rovněž se zjistilo, že do kultivačního média lze přidat i další složky. Těmito složkami mohou být antibiotika, albumin, aminokyseliny a další složky, které jsou v oblasti zabývající se kultivací buněk známy. Kromě toho lze přidat složky, které zlepší proces diferenciace. V médiu mohou být obsažena i další chemická činidla, která zahrnují neomezujícím způsobem steroidy, retinoidy a další chemické sloučeniny nebo činidla, která indukují alespoň o 25 % až 50 % vyšší diferenciaci buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně než je tomu v případě pozitivní kontroly.

Zjistilo se, že výše popsané podmínky buněčných medií poskytnou buňku, která exprimuje alespoň jednu genotypickou nebo fenotypickou vlastnost jednoho typu pankreatické buňky, tj. pankreatické alfa, beta, delta nebo PP buňky. Konkrétní buněčné typy se separují libovolným odborníkům v daném oboru známým způsobem. Zvláště výhodné jsou prostředky, které využívají genotypické nebo fenotypické vlastnosti exprimované diferencovanými buňkami. Fenotypické markery požadovaných buněk, jejichž seznam je uveden níže, jsou odborníkům v daném oboru známé, a hojně publikované v literatuře. Nicméně do rozsahu vynálezu patří i další fenotypické markery, které lze identifikovat bez provádění dalších experimentů. Veškeré tyto markery se používají pro potvrzení toho, že se dospělé kmenové buňky odvozené z adipózní tkáně indukovaly k diferencovanému stavu.

Liniově specifické fenotypické vlastnosti mohou zahrnovat neomezujícím způsobem proteiny buněčného povrchu, cytoskeletové proteiny, buněčnou morfologii a/nebo sekreční produkty.

Pankreatické alfa buňky exprimují mezi jinými markery i glukagony. Vlastnosti pankreatických beta ostrůvkových buněk zahrnují expresi markerů zahrnujících neomezujícím způsobem nestin, pdx1 (rovněž známý jako IDX-1, IPF-1 a STF-1), GLUT2, NeuroD, neurogenin, a inzulin.

Kromě toho pankreatické beta buňky obsahují velké množství zinku. Použití netoxických na zinek citlivých fluorescenčních sondy bude selektivně značit labilní zinek v životaschopných beta buňkách a vykazovat excitační a emisní vlnové délky ve viditelném spektru, což činní z této techniky techniku využitelnou standardními měřícími přístroji (Lukowiak B *et al.*, J Histochem Cytochem. 2001 Apr; 49 (4): 519-28). Buněčné třídění disociovaných Newportskou zelení značených buněk umožní jasnou separaci beta-buněk, jak lze usuzovat na základě obsahu inzulinu na DNA a imunocytochemické analýzy. Použitím průtokové cytometrie nebo podobných nástrojů určených pro třídění buněk, bude odborník v daném oboru schopen za použití této nebo srovnatelné techniky purifikovat beta buňky do vysoké čistoty.

Pankreatické delta buňky exprimují mimo ostatních markerů somatostatin, zatímco pankreatické PP buňky exprimují pankreatický polypeptid. Další markery pro tyto buněčné-typy zahrnují: receptor for cholecystokinin (CCKA) a KIT receptor tyrosin kinasu (Schweiger *et al.* Anat Histol Embryol. 2000 Dec; 29 (6): 357-61; Rachdi *et al.* Diabetes 2001 Sep; 50 (9): 2021-8).

Alternativní způsob používá pro purifikaci prováděnou některou z dobře zdokumentovaných technik, které jsou odborníkův daném oboru známy, protilátky zaměřené specificky na markery, které se nacházejí na různých typech buněk. Tyto techniky zahrnují neomezujícím způsobem imunochemickou proudovou cytometrii a třídění buněk a imunomagnetickou purifikaci. Neomezující příklad imunomagnetické purifikace zahrnuje použití „dynabeads", což jsou rovnoměrné, paramagnetické částice potažené specifickými protilátkami (tj. inzulinem, glukagonem, somatostatinem nebo pankreatickým polypetidem).

Odborníkovi v daném oboru my mělo být jasné, že kalorimetrické, fluorescenční, imunochemické, polymerázová řetězová reakce, chemické nebo radiochemické metody jsou schopny snadno odhalit přítomnost nebo absenci pro linii specifického markeru.

U dalšího provedení vynález poskytuje dediferencovanou dospělou kmenovou buňka odvozenou z izolované adipózní tkáně, která může být indukována k expresi alespoň jedné genotypické nebo fenotypické vlastnosti pankreatické buňky v kultivačním médium schopném takové diferenciace. Dediferencovaná dospělá kmenová buňka odvozená z izolované adipózní tkáně je identifikována na základě absence zralých adipocytových markerů.

B) Použití podpůrných buněk pro podporu diferenciace buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně

U dalšího provedení podle vynálezu, se používají podpůrné buňky pro podporu diferenciace buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně. Podpůrnými buňkami mohou být

buňky odvozené z lidského subjektu nebo jiného živočicha. Pokud se použijí podpůrné buňky z jiného živočicha, potom se výsledné diferencované buňky implantují prostřednictvím xenotransplantace.

Buňky odvozené z adipózní tkáně podle vynálezu se izolují a kultivují v populaci buněk, nejvýhodnější populací je definovaná populace. Populace buněk je heterogenní a zahrnuje podpůrné buňky pro dodání faktorů buňkám podle vynálezu.

Podpůrné buňky zahrnují další typy buněk, které budou podporovat diferenciaci, růst a zachování požadovaných buněk. Pokud je žádoucí buňka stromatu odvozená z adipózní tkáně, která exprimuje alespoň jednu genotypickou nebo fenotypickou vlastnost pankreatické beta buňky, potom se libovolným výše popsaným způsobem nejprve izolují buňky stromatu odvozené z adipózní tkáně, a nechají růst v kultuře v přítomnosti dalších podpůrných buněk. Tyto podpůrné buňky například výhodně vykazují vlastnosti dalších typů pankreatických buněk, tj. alfa, delta, gama, PP. U dalšího provedení se podpůrné buňky odvodí z primárních kultur těchto typů buněk odebraných z kultivované pankreatické tkáně. U ještě dalšího provedení se podpůrné buňky odvodí z imortalizovaných buněčných linií. U některých provedení se podpůrné buňky získají autologně. U dalších provedení se podpůrné buňky získají allogenně.

Předložený vynález rovněž počítá s tím, že lze buňky použité pro podporu diferenciace požadované buňky geneticky zpracovat tak, aby se chovaly jako podpůrné buňky. Tyto buňky jsou geneticky modifikované k tomu, aby exprimovaly exogenní geny nebo potlačovaly expresi endogenních genů

libovolným níže popsaným způsobem, který je odborníkům v daném oboru znám.

C) Implantace

V dalším aspektu vynález poskytuje buňky stromatu odvozené z adipózní tkáně a diferencované buňky exprimující alespoň jednu genotypickou nebo fenotypickou vlastnost pankreatické buňky, která je použitelná při autologních a alogenních transplantacích. Diferenciace probíhá *in vivo* pomocí faktorů přirozeně se vyskytujících v daném prostředí nebo pomocí zavedených faktorů. U jednoho provedení je místem transplantace nemocný pankreas.

U dalších provedení je místem transplantace subkutánní nebo intraperitoneální místo.

Výhodně je subjektem savec, výhodněji je subjektem člověk. U dalšího provedení se buňka implantuje do oblasti, ve které existuje potřeba dodání glukagonu, pankreatického polypeptidu, somatostatinu nebo inzulinu společně s nebo bez dalších růstových faktorů. Buňku podle vynálezu lze indukovat k diferenciaci *in vitro* nebo až po implantování pacientovi.

Podle ještě dalšího aspektu tedy vynález popisuje způsob poskytnutí diferencovaných buněk exprimujících alespoň jednu genotypickou nebo fenotypickou vlastnost pankreatické buňky subjektu, přičemž tento způsob zahrnuje:

a) izolaci buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně;
b) umístění na plotny a inkubování buněk v médiu vhodném pro diferenciaci buněk; a
c) zavedení diferencovaných buněk do těla subjektu.

U dalšího provedení vynález poskytuje způsob poskytnutí nediferencovaných buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně subjektu, přičemž tento způsob zahrnuje:

a) izolaci buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně; a

b) zavedení nediferencovaných buněk do těla subjektu.

V rámci vynález se rovněž počítá s tím, že pokud se nediferencované buňky stromatu odvozené z adipózní tkáně zavedou do těla subjektu, potom se u jednoho konkrétního provedení zavedou přímo do nemocného pankreatu společně s nebo bez dalšího růstového nebo diferenciačního faktoru. U ještě dalšího aspektu vynálezu se nediferencované buňky stromatu odvozené z adipózní tkáně zavedou společně s libovolnou podpůrnou buňkou nebo diferenciačním faktorem, které jsou zde popsány a které vytvoří prostředí vhodné pro *in vivo* diferenciaci buněk stromatu. Tyto podpůrné buňky například výhodně vykazují vlastnosti dalších typů pankreatických buněk, tj. alfa, beta, delta, gama, PP. U dalšího provedení jsou podpůrné buňky odvozeny z primárních kultur těchto typů buněk odebraných z kultivované pankreatické tkáně. U ještě dalšího provedení se podpůrné buňky odvodí z imortalizovaných buněčných linií. U některých provedení se podpůrné buňky získají autologně. U dalších provedení se podpůrné buňky získají alogenně.

U dalšího provedení se dediferencovaná buňka odvozená z adipózní tkáně poskytne v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem pro terapeutickou aplikaci, zahrnující neomezujícím způsobem opravu tkáně, regeneraci, rekonstrukci nebo posílení. Buňky odvozené z adipózní tkáně se kultivují způsoby popsanými v patentu US 6 153 432 (jehož obsah je zde zabudován formou odkazu) k dediferenciaci buněk, takže dediferencované dospělé kmenové buňky lze

následně indukovat k expresi genotypických nebo fenotypických vlastností buněk jiných než jakými jsou buňky odvozené z adipózní tkáně. Dediferencované buňky odvozené z adipózní tkáně jsou modifikované tak, aby zahrnovaly neendogenní genovou sekvenci pro produkci požadovaného proteinu nebo peptidu. Dediferencovaná buňka odvozená z adipózní tkáně může být u alternativního provedení podána hostiteli ve dvojrozměrné nebo trojrozměrné matrici ve snaze dosáhnout požadovaného terapeutického účinku. U jednoho provedení se dediferencovaná buňka získá autologně z pacientových vlastních buněk. Alternativně se dediferencovaná buňka získá alogenně.

U ještě dalšího provedení vynálezu jsou diferencované buňky podle vynálezu disagregovány a přeneseny do suspenzí suspendované buněčné kultury způsobem podobným metodám popsaným ve WO 97/15310 (University of Florida Research Foundation), který popisuje metody pro *in vitro* růst funkčních Langerhansových ostrůvků z kmenových buněk odvozených z pankreatické tkáně, a nechají růst až do okamžiku, kdy je možné pozorovat tvorbu shluků ostrůvkových buněk. Media obsahující tyto shluky lze následně analyzovat standardními biochemickými analytickými technikami, jenž jsou odborníkům v daném oboru známé a které stanovují přítomnost inzulinu nebo jiných hormonů sloužících jako indikátory pankreatické endokrinní funkce. Shluky nebo agregáty lze následně vstřikovat nebo naroubovat do tkáně hostitele za účelem vytvoření nebo regenerace tkáně.

Zapouzdření

Předložený vynález poskytuje způsob zapouzdření diferencovaných buněk odvozených z adipózní tkáně v biomateriálu kompatibilním s transplantací do těla savce, výhodně člověka. Zapouzdřující materiál by měl být zvolen tak, aby nepřekážel uvolňování požadovaných proteinů sekretovaných dospělými kmenovými buňkami odvozenými z adipózní tkáně. Použité materiály zahrnují neomezujícím způsobem derivátů kolagenu, hydrogely, alginát vápenatý, agarózu, kyselinu hyalurovou, deriváty kyseliny polymléčné/ kyseliny polyglykolové a fibrin.

D) Genetická manipulace buněk odvozených z adipózní tkáně podle vynálezu

U ještě dalšího provedení se buňka odvozená z adipózní tkáně exprimující alespoň jednu genotypickou nebo fenotypickou vlastnost pankreatické buňky geneticky modifikuje, aby exprimovala exogenní geny nebo potlačovala expresi endogenních genů. Vynález poskytuje způsob genetické modifikace takových buněk a populací.

Nukleokyselinový konstrukt obsahující promotor a sledovanou sekvenci může být zaveden do recipientní prokaryotické nebo eukaryotické buňky buď ve formě ne-replikační DNA (nebo RNA) molekuly, která může být buď lineární molekulou nebo, výhodněji, uzavřenou kovalentní kruhovou molekulou. Protože takové molekuly jsou neschopné autonomní replikace bez původu replikace, může exprese genu probíhat přes dočasnou expresi zavedené sekvence. Trvalé exprese lze alternativně dosáhnout integrací zavedené DNA sekvence do chromozomu hostitele.

U jednoho provedení se použije vektor, který je schopen integrovat požadované genové sekvence do chromozomu hostitelské buňky. Buňky, která má ve svých chromozomech stabilně integrovanou zavedenou DNA, může být vybrána současným zavedením jednoho nebo více markerů, které umožní selekci hostitelských buněk, které obsahují požadovanou nukleokyselinovou sekvenci. Tento marker, pokud je to žádoucí, může poskytnout prototrofii auxotrofnímu hostiteli, biocidní rezistenci, např., rezistenci pro antibiotika, nebo těžkým kovům, například mědi, apod. Volitelné sekvence markerového genu lze buď přímo navázat na DNA genovou sekvenci, aby se exprimovala, nebo ji lze zavést do stejné buňky ko-transfekcí. Výhodně lze expresi markeru kvantifikovat a vynést do lineárního grafu.

U výhodného provedení se zavedená nukleokyselinová molekula zabuduje do plasmidu nebo virového vektoru schopného autonomní replikace u recipientního hostitele. Pro tyto účely lze použít libovolný ze širokého spektra vektorů. Faktory důležité pro volbu konkrétního plasmidového nebo virového vektoru zahrnují: snadnost, se kterou lze recipientní buňky, které obsahují vektor, rozpoznat a oddělit od těch recipientních buněk, které vektor neobsahují; počet kopií vektoru, které jsou požadovány konkrétním hostitelem; a zdali je žádoucí schopnost „přesun" vektoru mezi hostitelskými buňkami různých druhů.

Výhodné eukaryotické vektory zahrnují například virus vakcínie, SV40, retroviry, adenoviry, adeno-související viry a různé komerčně dostupné savčí expresní vektory na bázi plasmidů, které jsou odborníkům v daném oboru známy.

Po připravení konstruktu (konstruktů) obsahujícího vektor nebo nukleokyselinovou molekulu pro expresi, lze DNA konstrukt (konstrukty) zavést do vhodné hostitelské buňky pomocí libovolného vhodného prostředku, tj. transformace, transfekce, virová infikace, konjugace, fúze protoplastů, elektroporace, technologie částicové pistole, vysrážení fosforečnanu vápenatého, přímá mikroinjektáž apod. Po zavedení vektoru, se recipientní buňky nechají růst v selektivním médium, které se zvolí tak, aby bylo vhodné pro růst buněk obsahujících vektor. Exprese molekuly (molekul) klonovaného genu má za následek produkci heterologního proteinu.

To, že je zavedená DNA „udržována" v buňkách, by mělo být chápáno jako, že je zavedená DNA kontinuálně přítomna v podstatě ve všech sledovaných buňkách během pokračujícího růstu a proliferace. To znamená, že zavedená DNA se nerozředí mimo většiny buněk v průběhu několikanásobných cyklů buněčného dělení. Naopak se replikuje během buněčné proliferace a alespoň jedna kopie zavedené DNA zůstane v téměř každé dceřiné buňce. Zavedená DNA se může udržovat v buňkách jedním ze dvou způsobů. Za prvé mohou být integrovány přímo do buněčného genomu. To se provádí málo často. Za druhé může existovat jako extrachromozomový prvek nebo epizom. Aby se epizom nenaředil během buněčné proliferace, lze do zavedené DNA zahrnout volitelný markerový gen a buňky rostou za podmínek, ve kterých je žádoucí exprese markerového genu. I v případě, kdy je zavedená DNA integrovaná do genomu, lze zahrnout volitelný markerový gen, který zabrání excidace DNA z chromozomu.

Geneticky upravené buňky lze zavést do organizmu různými metodami za podmínek, kdy se transgen exprimuje *in vivo*. U výhodného provedení vynálezu lze tedy transgen

kódovat k produkci inzulinu. Buňky obsahující transgen pro inzulin lze následně zavést do pankreatu nemocného člověka nebo jiného savce. Alternativně se buňky obsahující transgen injektují intraperitoneálně nebo do některého dalšího vhodného depotního orgánu.

E) Charakteristika buněk

„Charakterizace" výsledných diferencovaných buněk má za cíl identifikovat povrchové a intracelulární proteiny, geny a/nebo další markery, které jsou indikátorem liniové determinaci buněk stromatu na konkrétní koncový diferencovaný stav. Tyto metody mohou zahrnovat neomezujícím způsobem (a) detekci proteinů buněčného povrchu imunofluorescenčními metodami za použití proteinově specifických monoklonálních protilátek navázaných za použití sekundárního fluorescenčního tagu, včetně použití metody proudové cytometrie; (b) detekci intracelulárních proteinů imunofluorescenčními metodami za použití proteinově specifických monoklonálních protilátek navázaných za použití sekundárního fluorescenčního tagu, včetně použití metody proudové cytometrie; (c) detekci buněčných genů polymerasovou řetězovou reakcí, *in situ* hybridizací a/nebo analýzy northernova přenosu. Konečně lze diferencované buňky charakterizovat identifikací povrchových a intracelulárních proteinů, genů a/nebo dalších markerů, které jsou indikátorem liniové determinace buněk stromatu do příslušného konkrétního koncového diferencovaného stavu. Tyto metody, které jsou popsány výše, zahrnují neomezujícím způsobem (a) detekci proteinů buněčného povrchu imunofluorescenčními testy, jakými jsou proudová cytometrie nebo *in situ* imunozabarvení buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně, přičemž proteiny buněčného povrchu jsou například alkalická fosfatasa, CD44,

CD146, integrin beta 1 nebo osteopontin (Gronthos *et al.* 1994 Blood 84: 4164-4173) inzulin, glukagon, somatostatin, pankreatický polypeptid, nestin, PDX1, GLUT2, neuroD a neurogenin; (b) detekci intracelulárních proteinů imunofluorescenčními metodami, jakými jsou například průtoková cytometrie nebo *in situ* imunozabarvení buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně za použití specifických monoklonálních protilátek; (c) detekci exprese liniově selektivních mRNAs, jakými jsou například HNF3, Isl-1, Brain-4, Pax-6, Pax-4, Beta2/NeuroD, PDX-1, Nkx6-2, Ngn-3, inzulin a Glut-2, způsoby, jakými jsou například polymerasová řetězová reakce, *in situ* hybridizace a/nebo další blotové (přenesení na plotnu) analýzy (Viz Gimble *et al.* 1989 Blood 74:303-311).

F) Použití Buněk podle vynálezu jako terapeutických činidel

Buňky a populace podle vynálezu lze použít jako terapeutická činidla. Zpravidla tyto metody zahrnují přenos buněk do požadované tkáně nebo depotu. Buňky se přenesou do požadované tkáně libovolným vhodným způsobem, který se bude obecně měnit podle typu tkáně. Buňky lze například přenést do roubu koupelí roubu v kultivačním médiu obsahujícím buňky nebo infuzí kultivačního média obsahujícího buňky do tohoto roubu.

Alternativně lze buňky naočkovat na požadovaném místě ve tkáni a založit tak populaci. Buňky lze přenést na místa *in vivo* za použití zařízení, která jsou odborníkům v daném oboru známá, například za použití katétrů, trocarů, kanyl, nebo stentů naočkovaných buňkami atd.

Buňky podle vynálezu nacházejí uplatnění při léčbě celé řady různých poruch. Zejména poruch souvisejících s endokrinní dysfunkcí pankreatu nebo poruch, které lze léčit glukagonem, inzulínem, pankreatickým polypeptidem nebo somatostatinem.

i) Poruchy související s insulinem

Transformované buňky lze použít pro léčbu libovolné s inzulínem související poruchy, jakou je například diabetes mellitus, zejména diabetes mellitus 1. typu, diabetes mellitus 2. typu a diabetes mladých vzniklý v dospělosti (MODY). Diabetické stavy, které lze pomocí buněk podle vynálezu léčit, mohou vznikat z libovolné etiologie, zahrnující neomezujícím způsobem genetickou, infekční; traumatickou nebo chemickou. Další onemocnění, která lze léčit buňkami podle vynálezu, zahrnují onemocnění související s lipodystrofií, chemicky vyvolaná onemocnění, onemocnění související s pankreatitidou nebo onemocnění související s traumatem. Chorobné stavy mohou být například výsledkem autoimunitní dysfunkce nebo infikace virem nebo některým dalším infekčním činidlem.

ii) Poruchy související s glukagonem

Buňky produkující glukagon lze použít pro léčbu chronicky hypoglykemických pacientů ve formě implantátů, které uvolňují glukagon systemicky nebo na vyžádání; syndromu dráždivého tráčníku nebo podobných stavů, které vyžadují uvolnění hladkého svalstva; a obezity stimulací lipolýza glukagonem v tukových buňkách, která povede k redukci adipózní tkáňové hmoty.

iii) Poruchy související s pankreatickými polypeptidy

Buňky sekretující pankreatický polypeptid lze implantovat a použít pro léčbu non-inzulinově dependentního diabetu mellitus, obesity nebo libovolného stavu, který vede k hypertrofii beta buněk pankreatických ostrůvek, inzulinové rezistenci, nebo abnormální produkci glukózy v játrech.

iv) Poruchy související se somatostatinem

Transformované buňky lze použít pro léčbu libovolné poruchy, pro kterou je podávání somatostatinu nápomocné. Do rozsahu vynálezu tedy spadá použití diferencovaných buněk, které exprimují alespoň jednu vlastnost pankreatické delta (tj. somatostatin-produkující) buňky při léčbě a prevenci poruch, kdy se do léčby zapojuje somatostatin jako takový, nebo fyziologické způsoby jeho regulace. Tyto zahrnují poruchy endokrinního, gastrointestinálního, CNS, PNS, vaskulárního a imunitního systému a stejně tak rakovinu.

Takto diferencované buňky produkující somatostatin se použijí: 1) pro inhibici sekrece různých hormonů a trofických faktorů u savců; 2) pro léčbu poruch zahrnujících například autokrinní nebo parakrinní sekreci trofických faktorů zahrnujících rakovinu prsu, mozku, prostaty a plic (jak epidermoidů malých buněk, tak ostatních buněk), a tejně tak hepatomy, neuroblastomy, střevní adenokarcinomy a pankreatické adenokarcinomy (duktální typ), chondrosarkomy, a melanomy. U jednoho provedení se buňky produkující somatostatin podle vynálezu

použijí pro léčbu rakoviny přímo nebo se použijí pro zcitlivění rakovinných buněk pro kombinované terapie, kdy se tato léčba používá v kombinaci s dalšími léčebnými režimy zahrnujícími ozařování nebo chemoterapie.

Další využití těchto buněk rovněž zahrnují supresi určitých endokrinních sekrecí, například sekrece inzulinu, glukagonu, prolaktinu a GH, které mohou zase dále potlačovat sekreci různých trofických faktorů, jakými jsou například IGF-1. Buňky podle vynálezu jsou tedy indikovány pro léčbu poruch jejichž etiologie zahrnuje nebo je spojována s přebytkem sekrece GH a trofického faktoru. Schopnost potlačit tyto sekrece napomáhá léčbě takových poruch, jako je například akromegálie. Tyto účinky jsou rovněž užitečné při léčbě neuroendokrinních tumorů, jakými jsou například karcinoidy, VIPomy, inzulinomy a glukagonomy. Buňky produkující somatostatin podle vynálezu jsou rovněž použitelné při léčbě diabetu a pathologií souvisejících s diabetem, včetně angiopatie, fenomén úsvitu, neuropatie, nefropatie, a retinopatie (Grant *et al.*, Diabetes Care 2000,23, 504-509).

U dalšího provedení se buňky produkující somatostatin, které jsou předmětem vynálezu, použijí pro léčbu vaskulárních poruch zahrnujících poruchy krvácení gastrointestinálního systému, jako například ty, které zahrnují splanchnické krvácení a esofageální varixy související s onemocněními, jakými jsou například cirhóza. Schopnost somatostatinu mediovat vasokonstrikci rovněž činí buňky produkující somatostatin použitelnými při léčbě histaminové cefalalgie a migrény.

Buňky produkující somatostatin podle vynálezu lze rovněž použít pro inhibici proliferace vaskulárních

endoteliálních buněk, takže jsou indikovány pro použití při léčbě onemocnění implantátů cév, například při léčbě restenózy nebo vaskulární okluze po vaskulárním inzultu, například angioplastiky, vaskulopatie alotransplantu nebo xenotransplantu, ateroskleróza cévního implantátu, a při transplantaci orgánu (např., srdce, jater, plic, ledvin nebo pankreatických transplantátů (Weckbecker *et al.*, Transplantation Proceedings 1997,29, 2599-2600)). Buňky produkující somatostatin podle vynálezu lze rovněž použít pro inhibici angiogeneze a jsou indikovány pro použití při léčbě zranění a léčbě metastatického stádia rakoviny zahrnující neomezujícím způsobem rakovinu plic, prsu a prostaty.

Buňky produkující somatostatin, které jsou subjektem vynálezu lze rovněž použít pro inhibici gastrické a exokrinní a endokrinní pankreatické sekrece a uvolňování různých peptidů gastrointestinálního traktu. Buňky produkující somatostatin jsou tedy použitelné při léčbě gastrointestinálních poruch, například při léčbě peptických vředů, NSAID-indukovaných vředů, ulcerativní kolitidy, akutní pankreatitidy (např. u post-ERCP pacientů), enterokutánní a pankreatikokutánní píštěle, disturbancí GI motility, intestinální obstrukce, chronické atrofické gastritidy, non-ulcerativní dyspepsie, sklerodermu, syndromu dráždivého tráčníku, Crohnovy choroby, dumping syndromu, syndromu vodnatého průjmu a průjmu souvisejícího s takovými chorobami, jako je například AIDS nebo cholera (VIZ o'Dorisio *et al.*, Advances in Endocrinology Metabolism 1990, 1:175-230).

U specifického provedení jsou zde popsané buňky produkující somatostatin rovněž funkční tam, kde je somatostatin vyžadován jako neuromodulátor v centrální

nervové soustavě, přičemž se mohou uplatnit při léčbě neurodegenerativních chorob, jakými jsou například mrtvice, roztroušená skleróza, Alzheimerova choroba a další formy demence, poruchy duševního zdraví (například úzkost, deprese a schizofrenie) a další neurologická stavy, jakými jsou například bolest a epilepsie (A. Vezzani *et al.*, European Journal of Neuroscience 1999, 11, 3767-3776).

Buňky produkující somatostatin lze rovněž použít v kombinaci s dalšími terapeutickými činidly. Například v případě transplantace orgánu může další terapeutické činidlo zahrnovat cyklosporin a FK-506. Při léčbě tumorů může další terapeutické činidlo zahrnovat tamoxifen a alfa-interferon. V případě diabetu zahrnují příklady ostatních sloučenin metformin nebo další biguanidy, akarbózu, sulfonymočoviny, thiazolidindiony nebo další činidla senzitizující inzulin, zahrnující neomezujícím způsobem sloučeniny, které fungují jako agonisty na receptor proliferátoru peroxizomů gama (PPAR-gama), inzulin, inzulinu podobný růstový faktor I, glukagonu podobný peptid I (glp-I) a dostupná činidla podporující pocit sytosti, jako například dexfenfluramin nebo leptin.

III. Tkáňové inženýrství

Zde popsané buňky lze použít ve tkáňovém inženýrství. Vynález poskytuje způsoby produkce živočišné látky, který zahrnuje zachování buněk podle vynálezu za podmínek dostatečných pro jejich expanzi a diferenciaci na požadovanou látku. Tato látka může například zahrnovat část pankreatu nebo i celý pankreas. Zde popsané buňky se použijí v kombinaci s libovolnou známou technikou tkáňového

inženýrství, mezi které lze zahrnout veškeré odborníkům v daném oboru známé techniky popsané v následujících patentech US: patent US 5 902 741 a US 5 863 531 (Advanced Tissue Sciences, Inc.); patent US 6 139 574 (Vacanti *et al.*); patent US 5 759 830, (Vacanti *et al.*); patent US 5 741 685 (Vacanti); patent US 5 736 372 (Vacanti *et al.*); patent US 5 804 178 (Vacanti *et al.*); patent US 5 770 417 (Vacanti *et al.*); patent US 5 770 193 (Vacanti *et al.*); patent US 5 709 854 (Griffith-Cima *et al.*); patent US 5 516 532 (Atala *et al.*); patent US 5 855 610 (Vacanti *et al.*); patent US 5 041 138 (Vacanti *et al.*); patent US 6 027 744 (Vacanti *et al.*); patent US 6 123 727 (Vacanti *et al.*); patent US 5 536 656 (Kemp *et al.*); patent US 5 144 016 (Skjak-Braek *et al.*); patent US 5 944 754 (Vacanti); patent US 5 723 331 (Tubo *et al.*); a patent US 6 143 501 (Sittinger *et al*).

Pro výrobu takové struktury je nutné udržovat buňky a populace podle vynálezu za podmínek vhodných pro jejich expanzi a dělení za vzniku orgánu. To lze realizovat jejich přenosem do těla živočicha, zpravidla s ohledem na to, která nová hmota se požaduje. Vynález tedy může usnadnit regeneraci pankreatu v těle živočicha, do jehož příslušných tkání jsou tyto buňky implantovány.

U ještě dalších provedení se buňky indukují diferenciaci a expanzi do tkáně *in vitro*. V tomto případě jsou buňky kultivovány na substrátech, které usnadňují tvorbu do trojrozměrných struktur vhodných pro vývoj tkáně. Buňky jsou tedy například kultivovány nebo naočkovány na bio-kompatibilní mřížku, například na mřížku, která zahrnuje extracelulární matrixový materiál, syntetické polymery, cytokiny, růstové faktory, atd. Tuto mřížku lze

tvarovat do požadovaných tvarů, které usnadní vývoj jednotlivých typů tkáně.

Vynález tedy poskytuje kompozici obsahující buňky a populace a biologicky kompatibilní mřížku. Mřižku lze vyrobit z polymerního materiálu majícího vlákna jako pletivo nebo houba, zpravidla s otvory řádově 100 µm a přibližně 300 µm. Tyto struktury poskytuje dostatečnou plochu, na které mohou buňky růst a proliferovat. Je žádoucí, aby mřížka byla během určité doby biologicky rozložitelná, takže se po vytvoření živočišné látky do této látky absorbuje. Vhodné polymery lze vyrobit z monomerů, jakými jsou kyselina glykolová, kyselina mléčná, propyl-fumarát, kaprolakton apod. Další polymerní materiál může zahrnovat protein, polysacharid, polyhydroxykyselinu, polyorthoester, polyanhydrid, polyfosfozen, nebo syntetický polymer, zejména biologicky rozložitelný polymer nebo kteroukoliv jejich kombinaci. Mřížka může rovněž zahrnovat hormony, jakými jsou například růstové faktory, cytokiny, morfogeny (např. kyselinu retinovou atd.), požadované extracelulární matrixové materiály (např. fibronektin, laminin, kolagen atd.) nebo další materiály (např. DNA, viry, ostatní buněčné typy atd.), které jsou žádány.

Při tvorbě kompozice se buňky zavádějí do mřížky tak, že pronikají do intersticiálních prostor v mřížce. Mřížku lze například ponořit do roztoku nebo suspenze obsahující buňky, nebo je lze do mřížky zavádět infuzí nebo injekcí. Výhodně se použije hydrogel připravený zesíťováním suspenze zahrnující polymer a mající v sobě dispergované buňky podle vynálezu. Tento způsob přípravy umožní dispergaci buněk v celém rozsahu mřížky a usnadní rovnoměrnější prostupnost mřížky buňkami. Samozřejmě, že kompozice může rovněž zahrnovat zralé buňky požadovaného fenotypu nebo jejich

prekurzory, zejména pro umocnění indukce stimulovaných buněk v mřížce nebo pro podporu produkce hormonů, jakým je například inzulin nebo glukagon, v mřížce.

Odborníkům v daném oboru je zřejmé, že mřížky vhodné pro začlenění do kompozice lze odvodit z libovolného vhodného zdroje, např. matrigelu, a mohou samozřejmě zahrnovat komerční zdroje pro vhodné mřížky. Další vhodnou mřížku lze odvodit z acelulární části adipózní tkáně, například extracelulární matrice adipózní tkáně v podstatě prosté buněk. Tyto matrice odvozené z adipózní tkáně zpravidla zahrnují proteiny, jakými jsou například proteoglykany, glykoproteiny, hyaluronin, fibronektiny, kolageny apod., přičemž všechny tyto látky slouží jako vynikající substráty pro růst buněk. Kromě toho tyto mřížky odvozené z adipózní tkáně mohou obsahovat hormony, cytokin, růstové faktory apod. Odborníci v daném oboru jsou seznámeni se způsoby izolaci takové mřížky odvozené z adipózní tkáně, které jsou například popsány ve WO 00/53795 (University of Pittsburgh) jejíž obsah je zde uveden formou odkazu.

U ještě dalšího provedení vynálezu se za použití solidního neformátovaného způsobu výroby, který umožní regeneraci a růst tkáně vytvoří pankreatické tkání podobná tkáň. Tyto techniky jsou například popsány v patentu US 6 138 573 (Vacanti *et al.*) a umožňují vytvořit parciální nebo celé orgány pro implantaci do těla člověka, který ji potřebuje. Tyto techniky umožní zejména vytvoření parciálního nebo celého pankreatu pro implantaci. Vytvoření takových parciálních nebo celých orgánů se provádí za použití buněk podle vynálezu získaných autologním způsobem. Alternativně lze takové parciální nebo celé orgány vytvořit z buněk podle vynálezu, které se získají alogenním

způsobem. Vynález počítá s libovolným způsobem, který je odborníkům v daném oboru znám a který je použitelný inženýring tkáně z buněk podle vynálezu. Například patenty US 6 022 743 a US 5 516 681 (Naughton *et al.*) (Advanced Tissue Sciences) popisují způsoby přípravy trojrozměrných systémů buněčných kultur pro kulturu pankreatické tkáni podobné tkáně. Tyto techniky zahrnují naočkování a implantaci buněk do matrice za vzniku tkáně orgánu a strukturní složky, které mohou dále poskytovat řízené uvolňování bioaktivních činidel. Matrice je charakterizována sítí průsvitů funkčně odpovídajících přirozeně se vyskytující vaskulatuře tkáně tvořené implantovanými buňkami a je vystlána endoteliálními buňkami. Matrice se potom během implantace naváže na krevní cévy nebo jiná vývody, čímž se vytvoří vaskulární nebo duktilní síť procházející celou matricí. Neformátované výrobní techniky označují libovolnou techniku, která je odborníkům v dané oblasti známá a která umožňuje vystavět komplexní trojrozměrný objekt jako sérii dvourozměrných vrstev. Tyto metody lze přizpůsobit použití v kombinaci s celou řadou polymerních, anorganických a kompozitních materiálů a vytvořit tak struktury mající definované složení, pevnost a hustotu. Použitím takových metod lze tedy v matrici vytvořit přesné kanálky a póry, které budou regulovat následný buněčný růst a proliferaci buněk jednoho nebo více typů majících definované funkce v matrici. Tímto způsobem lze kombinovat diferencované buňky podle vynálezu odpovídající různým typům pankreatických buněk (tj. buňky vykazující alespoň genotypické nebo fenotypické vlastnosti pankreatické alfa, beta, gama nebo delta buňky) a vytvořit tak parciální nebo celý orgán. Takové buňky se kombinují v matrici tak, že poskytnou vaskulární síť vystanou endotheliálními buňkami roztroušenými ve všech buňkách. Lze

vytvořit i struktury, které je možno použít jako lymfatické vývody, žlučovody a další exokrinní nebo exkreční vývody uvnitř orgánu.

Buňky, populace, mřížky a kompozice podle vynálezu se používají při inženýrství a regeneraci tkáně. Vynález se tedy týká implantovatelné struktury zabudovávající libovolný ze zde popsaných inventivních znaků. Přesná povaha implantátu se bude měnit v závislosti na požadovaném použití. Implantát může obsahovat zralou tkáň nebo může obsahovat nezralou tkáň nebo mřížku. Implantát může tedy například obsahovat populaci buněk podle vynálezu, u které probíhá pankreatická diferenciace, případně naočkovanou uvnitř mřížky o vhodné velikosti a rozměrech. Takový implantát se vstříkne nebo naroubuje do těla hostitele, čímž se podnítí tvorba nebo regenerace zralé pankreatické tkáně v těle pacienta.

Mřížky odvozené z adipózní tkáně se běžně používají jako součást kitu buněčné kultury. Vynález tedy dále poskytuje kit zahrnující mřížky podle vynálezu odvozené z adipózní tkáně a jednu nebo více dalších složek, jakými jsou například hydratační činidla (např. voda, fyziologicky kompatibilní solné roztoky, připravená media buněčných kultur, sérum nebo jejich kombinace nebo deriváty), substráty buněčných kultur (např. mystičky, plotny, lahvičky atd.), media buněčných kultur (je jedno jestli v kapalné nebo práškové formě), antibiotika, hormony apod. Kit může sice zahrnovat libovolnou takovou složku, nicméně výhodně zahrnuje všechny složky nezbytné pro podporu kultivace a růstu požadovaných buněk po správném skombinování. Pokud je to žádoucí, potom může požadovaný kit rovněž obsahovat buňky, naočkované do mřížky.

Předložený vynález bude nyní objasněn podrobněji za použití následujících příkladů. Nicméně je třeba zdůraznit, že tyto příklady mají pouze ilustrativní charakter a nikterak neomezují rozsah vynálezu, který je jednoznačně vymezen přiloženými patentovými nároky.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Induktivní metody in vitro

Kmenové buňky odvozené z adipózní tkáně se izolují již popsaným způsobem z odpadního materiálu po liposukci (Sen *et al.*, 2001, J. Cell Biochem. 81, 312-319). Kultivace buněk pokračuje v přítomnosti (neomezující výčet) následujících médií: Neurobasal (*InVitrogen*) obohacený nebo neobohacený fetálním bovinním sérem (FBS), N2, B27 (*InVitrogen*) nebo bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF). Modulace hladiny glukózy se provádí v médiích. Buňky očkují v různých hustotách a zavádějí v intervalech každé 3 dny až 6 dnů. Nejvýhodněji se očkují v hustotě přibližně 1000 buněk/cm^2 až přibližně 500 000 buněk/cm^2.

V průběhu kultivační periody se kondiciovaná media analyzují za použití komerčně dostupných radio-imunotestů nebo imunosorbčních testů navázání enzymů s cílem zjistit přítomnost endokrinních pankreatických hormonů, jakými jsou inzulin (American Laboratory Products), glukagon, somatostatin a pankreatický polypeptid (Peninsula LabsInc).

Exprese fenotypických markerů související s diferenciací různých endokrinních pankreatických buněčných linií se testuje analýzou mRNA pomocí RT-PCR a za použití

primerů specifických pro následující (neomezující výčet) geny: HNF3β, Isl-1, Brain-4, Pax-6, Pax-4, Beta2/NeuroD, PDX-1, Nkx6.2, Nkx2.2, Ngn-3, inzulin a Glut2. Přítomnost těchto markerů a jejich spojení s endokrinními pankreatickými buňkami již bylo popsáno (Ramiya *et al.*, 2000, Nat. Med. *6*, 278-282; Schwitzgebel *et al.*, 2000, Development *127*, 3533-3542; Fernandes *et al.*, 1997, Endocrinology *138*, 1750-1762; Zulewski *et al.*, 2001, Diabetes *50*, 521-533; Gradwohl *et al.*, 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A97, 1607-1611). Rovněž se bude provádět imunohistochemická (IHC) analýza, při které se použijí protilátky proti (neomezující výčet) kterémukoliv z výše zmiňovaných fenotypických markerů.

Příklad 2

Metody genové terapie

Tento způsob zahrnuje inzerci a expresi libovolného genu, která povede k indukci dospělé kmenové buňky k diferenciaci na buňku exprimující alespoň jednu genotypickou nebo fenotypickou vlastnost pankreatické buňky. Tyto geny mohou zahrnovat neomezujícím způsobem řízenou exprese transkripčních faktorů HNF3β, Isl-1, Brain-4,Pax-6, Pax-4, Beta2/NeuroD, PDX-1, Nkx6.2, Nkx2.2 a Ngn-3. Potenciální metody pro zavádění nukleokyselin do buněk zahrnují neomezujícím způsobem elektroporaci, fosforečnanem vápenatým, retrovirově, adenovirově nebo lipidy zprostředkovanou dopravu, jak již bylo detailně popsáno výše. Diferenciace se u buněk analyzovala způsobem popsaným v předcházejícím textu a zejména v příkladu 1.

Příklad 3

Transplantace In vivo

Buňky podle vynálezu se implantovaly *in vivo* za účelem léčby lidských poruch způsobených malfunkcí endokrinních pankreatických tkání, například diabetu 1. typu do těla živočichů. Modely hlodavců existující pro tyto účely zahrnují inzulinově dependentní neobézní diabetickou (NOD) myš, a myši nebo krysy, z nichž byly učiněni diabetici poškozením ostrůvků aplikací streptozotocinu (Lumelsky *et al.*,2001, Science 292, 1389-1394; Soria *et al.*, 2001, Diabetologia *44*, 407-415). NOD myši se použily pro implantaci pankreatických ostrůvků a ostrůvků generovaných z pankreatických duktálních kmenových buněk (Soria *et al.*, 2001, Diabetologia *44*, 407-415; Lumelsky *et al.*, 2001, Science *292*, 1389-1394; Stegall *et al.*, 2001). Diferenciované buňky podle vynálezu, které exprimují alespoň jednu genotypickou nebo fenotypickou vlastnost pankreatických buněk, se použijí pro implantace do těla NOD zvířat, která, aby přežila, musí být normálně držena na denních injekcích inzulinu. Příprava zvířat pro implantaci zahrnuje chirurgický postup, při kterém se v subkapsulární oblasti ledvinového pouzdra vytvoří za použití jehly č. 27 již popsaným způsobem malý kanálek (Ramiya *et al.*, 2000, Nat. Med. *6*, 278 až 282). Výchozí materiál tvořený 10^3-10^6 endokrinních pankreatických buněk odvozených z lidských dospělých kmenových buněk se implantoval za použití malého katétru a otvor kanálku se kauterizoval. Lze zkusit alternativní postup, při kterém se připraví subkutánní místo na rameni, do něhož se implantují buňky (Ramiya *et al.*, 2000, Nat. Med. *6*, 278 až 282). U obou těchto modelů implantátů se naslepo operovaly NOD myši a NOD myše, které nepodstoupily žádný zákrok se použily jako kontrola.

2 až 7 dnů po chirurgickém zákroku se zvířatům přestala podávat denní injekce inzulínu. Jako index buněk produkujících funkční inzulín se u zvířat za použití AccuChek-EZ monitoru glukózy (Roche) sledovala v různých stádiích hladina krevní glukózy. Provedly se ELISA testy na lidský inzulín a další endokrynní pankreatické hormony. Kromě toho se provedla imunohistochemická analýza implantovaných míst za použití lidských specifických protilátek proti inzulínu a dalších proteinech, které může implantát potenciálně produkovat.

Příklad 4

Zapouzdření

Buňky implantované výše popsaným způsobem mohou být odhojeny v důsledku imunitní reakce. Ve snaze zabránit tomuto odhojení byly navrženy metody, které používají zapouzdření matric, které umožní průchod sekretovaným hormonům ze zapouzdřené tkáně, ale budou fungovat jako ochranná bariéra proti imunitnímu zásahu hostitele. Viz Ramiya *et al.*, 2000, Nat. Med. 6: 278: 282. Tyto bariéry mohou zahrnovat gel Restalyne na bázi kyseliny hyaluronové (Q-Med Sweden, Uppsala, Sweden). Při realizaci této metody se do gelu zapouzdří endokrinní pankreatické buňky odvozené z lidských dospělých kmenových buněk ve výchozím rozsahu 10^3-10^6. Implantát se umístí na subkutánní místo, živočichům se přestane podávat inzulin a provede se analýza popsaná ve výše uvedeném příkladu 3.

Příklad 5

Alogenní transplantace

Byl popsán jeden z příkladů zvířecího modelu pro testování alogenní transplantace (Stegall *et al.*, 2001, Transplantation 71, 1549-1555). Jako dárci dospělých kmenových buněk a jako příjemci endokrinních pankreatických buněk odvozených z dospělých kmenových buněk se použijí dvě rasy (Rasa A a Rasa B; např. CBA (H-2k) a BALB/c (H2-d) myší. Donorové endokrinní pankreatické buňky se produkují z rasy A nebo rasy B dospělých kmenových buněk izolovaných z donorové populace myších gonadálních adipocytů způsobem, který odpovídá způsobu, již popsanému v souvislosti s izolací kmenových buněk odvozených z lidské adipózní tkáně. Příjemci rasy A nebo rasy B se učinili diabetickými aplikací streptozotocinu (Stegall *et al.*, 2001, Transplantation 71, 1549-1555). Transplantace se realizovaly tak, aby se vytvořily následující kombinace dárce\příjemce: 1) isogenní, rasa A rase A a rasa B rase B; 2) Alogenní, rasa A rase B a rasa B rase A; 3) třetí model používá holé myši, u kterých se diabetes indukoval streptozoticinem (imunodeficientní) myši, jako příjemce pro donorové buňky izolované z těla zvířat rasy A nebo rasy B. Zvířata přijímající transplantáty se monitorovala a analyzovala způsobem popsaným v příkladu 3.

Příklad 6

Test pro detekci inzulinu

U všech buněčných kultur podle vynálezu se produkce inzulinu detekuje následujícím způsobem. Stručně řečeno, buňky vypěstované způsobem popsaným v kterémkoliv z výše uvedených příkladů se třikrát propláchnou médiem prostým

séra obsahujícím 5 mmol/l až 25 mmol/l glukózy a alespoň po dobu 2 h se inkubují ve 3 ml média prostého séra. Následně se kondiciované medium jímá a hladiny inzulinu se měří za použití imunochemického testu „Microparticle Enzyme Immunoassay", což je kvantitativní analytická metoda založená na principu enzymové imunoanalýzy s fluorogenním substrátem (AXSYM systém Insulin kit kód B2D010; Abbott Laboratories), která detekuje lidský inzulin bez křížové reaktivity pro proinzulin nebo C-peptid.

Příklad 7

Tvorba ostrůvkových shluků

Trojrozměrné shluky ostrůvků se například konstruují způsobem podle Lumelskyho *et al.* (2001, Science 1389-1394). Stručně řečeno, buňky se kultivují způsoby naznačenými ve zde popsaném příkladu 1. Buňky se nejprve pěstují tak, aby poskytly populace velmi bohatou na nestin-pozitivní buňky v suspenzi, a obohatí se sera-prostým ITSFn mediem. Ukázalo se, že tyto podmínky zvyšují zastoupení nestin-pozitivních buněk. Buňky se následně expandují v přítomnosti bFGF v N2 sera-prostém médiu. Za účelem indukce diferenciace a morfogeneze shluku ostrůvků sekretujících inzulin se bFGF následně z media, které obsahuje B27 medium obohacené nikotinamidem, odstraní. Výsledné agregáty nebo shluky se následně identifikují a ověřují jako produkující inzulin libovolným odborníkům v daném oboru známým postupem.

Příklad 8

Izolace specifických typů pankreatických buněk diferencovaných z buněk stromatu odvozených z adipózní tkáně

Single rat ostrůvek buňky se nejprve po dobu 20 min až 60 min inkubovaly protilátkou specifickou pro povrch beta-buňky (K14D10 myší IgG). Na dalších 15 min se přidala suspenze „Dynabeads" potažených druhou protilátkou (anti-myší IgG), načež se „Dynabead" potažené buňky po vytvoření kontaktu mezi zkumavkou a magnetem (Dynal MPC) okamžitě peletovaly. Imunocytochemie se použije pro potvrzení toho, že Dynabead potažené buňky obsahují inzulin a pro potvrzení kvantitativní účinnosti tohoto způsobu. Dynabead potažené a nepotažené buňky se zabarví pro inzulin a glukagon.

Dynabead imunopurifikace poskytla 95% čistotu beta buněk obsahujících inzulin, které uvolňují inzulin v odezvě na isobutylmethylxanthin a glukagonu podobný polypeptide 1. Obsah inzulinu v Dynabead potažených beta buňkách je signifikantně vyšší než v nepotažených buňkách. Úspěšné separace se dosáhne, pokud se jako výchozí materiál použije pouze 30 ostrůvků. Použití „kometového" testu ukázalo, že Dynabead potažené beta buňky vykazují srovnatelnou vnímavost pro cytokinem indukované DNA poškození jako nepotažené buňky (Hadjivassiliou et al Diabetologia. 2000 Sep; 43 (9): 1170-7).

12.10.94
PV 4014-696
674/93

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Buňka stromatu odvozená z izolované adipózní tkáně indukovaná pro expresi alespoň jedné vlastnosti buňky získané z endokrinní slinivky břišní.

2. Buňka podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se buňka indukuje k diferenciace *in vitro*.

3. Buňka podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se buňka indukuje k diferenciaci *in vivo*.

4. Buňka podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se do buňky zavede exogenní genetický materiál.

5. Buňka podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že buňkou je lidská buňka.

6. Buňka podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že buňka sekretuje hormon.

7. Buňka podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že se hormon zvolí z množiny hormonů sestávající z inzulinu, glukagonu, somatostatinu nebo pankreatického polypeptidu.

8. Buňka podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že hormonem je inzulin.

9. Způsob diferenciace buněk stromatu odvozených z izolované adipózní tkáně k tomu, aby vykazovaly alespoň jeden marker endokrinní pankreatické buňky, **vyznačující se tím**, že zahrnuje uvedení buňky stromatu odvozené z izolované adipózní tkáně do kontaktu s látkou indukující endokrinní pankreas.

10. Způsob podle nároku 9, **vyznačující se tím**, že se látka indukující endokrinní pankreas nachází v chemicky definovaném médiu buněčné kultury.

11. Způsob léčení pankreatické endokrinní poruchy nebo degenerativního stavu hostitele, **vyznačující se tím**, že zahrnuje: i) indukci buněk stromatu odvozených z izolované adipózní tkáně k expresi alespoň jednoho markeru endokrinní pankreatické buňky; a ii) transplantaci indukovaných buněk do těla hostitele.

12. Způsob podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že se buňky stromatu odvozené z adipózní tkáně izolují z těla hostitele.

13. Způsob podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že pankreatickou endokrinní poruchou nebo degenerativním

stavem je diabetes mellitus I. typu, diabetes mellitus II. typu, onemocnění související s lipodystrofií, chemicky indukované onemocnění, onemocnění související s pankreatitidou nebo onemocnění související s traumatem.

14. Implantát obsahující buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8.

15. Implantát podle nároku 14, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje biokompatibilní polymer.

16. Implantát podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že biokompatibilním polymerem je hydrogel.

17. Implantát podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že biokompatibilním polymerem je derivát kolagenu, kyselina polyglykolová, kyselina polymléčná, kyselina polyglykolová/ polymléčná, hyaluronát nebo fibrin.

18. Způsob produkce hormonů, **vyznačující se tím**, že zahrnuje (a) kultivaci buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8 v médium za podmínek dostatečných pro to, aby buňka sekretovala hormon do media a (b) izolaci hormonu z media.

19. Způsob podle nároku 18, **vyznačující se tím**, že se produkovaný hormon zvolí z množiny sestávající z inzulinu, glukagonu, somatostatinu nebo pankreatického polypeptidu.

20. Způsob podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že produkovaným hormonem je inzulin.

21. Buňka odvozená z izolované adipózní tkáně stromatu, která je dediferencovaná *in vitro* a následně indukovaná pro expresi alespoň jedné vlastnosti buňky endokrinního pankreatu.

22. Dediferencovaná buňka podle nároku 21 indukovaná *in vivo* k expresi alespoň jedné vlastnosti buňky endokrinní slinivky.

23. Buňka odvozená z izolované adipózní tkáně indukovaná v kultuře k expresi alespoň jedné vlastnosti buňky endokrinní slinivky, **vyznačující se tím**, že indukovaná buňka se: a) rozrušení a přenese do suspendovaných buněčných kultur; b) suspendované buněčné kultury se pěstují až do okamžiku, kdy se zpozoruje důkaz tvorbu shluku buněk ostrůvku; a, c) výsledné shluky buněk ostrůvku se naroubují do těla hostitele.

24. Buňka podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že je dále zapouzdřena v biomateriálu slučitelným s transplantací do těla hostitele.

25. Buňka podle nároku 24, **vyznačující se tím**, že se zapouzdřující materiál zvolí z množiny sestávající z derivátů kolagenu, hydrogelů, alginátu vápenatého, agarózy, kyseliny hyalurové, derivátů kyseliny polymléčné/kyseliny polyglykolové a fibrinu.

26. Použití buňky podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, nebo 21 až 25 implantované do hostitele.

27. Použití implantátu podle kteréhokoliv z nároků 14 až 17 naroubovaného do těla hostitele.