



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 27 817 T2** 2005.01.05

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 929 271 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 27 817.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/15470**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 941 403.4**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/09582**

(86) PCT-Anmeldetag: **04.09.1997**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **12.03.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.07.1999**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **25.02.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **05.01.2005**

(51) Int Cl.⁷: **A61F 2/02**

C12N 5/00, A61L 27/00, B65D 1/02

(30) Unionspriorität:

25511 P 05.09.1996 US

(73) Patentinhaber:

**Children's Medical Center Corp., Boston, Mass.,
US**

(74) Vertreter:

Strehl, Schübel-Hopf & Partner, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**ATALA, Anthony, Weston, US; YOO, J., James,
Brookline, US; ASHKAR, Samy, Boston, US**

(54) Bezeichnung: **Nierenprothese und ihre Verwendung zum Behandeln einer Nierenkrankheit**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Hintergrund

1. Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft eine Nierenprothese und Verfahren zum Herstellen der Nierenprothese.

2. Beschreibung des Hintergrunds

[0002] Die Nieren entfernen Stoffwechselabfälle aus dem Blut, regeln das Fluidgleichgewicht durch Aufrechterhalten der Homöostase und führen wichtige regulatorische Aktivitäten durch Abscheiden von Hormonen aus. Normalerweise werden etwa 20% des durch das Herz gepumpten Bluts von den Nieren behandelt.

[0003] Nephrone, die funktionale Einheit der Nieren, behandeln Blut durch die drei Prozesse, Filtration, Reabsorption und Sekretion. Jede Niere enthält etwa eine Million Nephrone, die jeweils aus einem Nierenkörperchen und einem Nierentubulus bestehen. Die Form eines Nephrons ähnelt einem Minirichter mit einem sehr langen gewundenen Stamm. Blut tritt durch den Glomerulus in das Nierenkörperchen ein. Das Blutfiltrat dringt in die Glomerulärkapsel ein, die auch als Bowmansche Kapsel bezeichnet wird, und fließt durch den Nierentubulus. Der Nierentubulus weist vier Teile auf, nämlich den proximalen gewundenen Tubulus, die Henlesche Schleife, den distalen gewundenen Tubulus und den Sammeltrubulus.

[0004] Das Nierenkörperchen weist eine verwundene Ansammlung von Blutkapillaren auf, die als Glomerulus bezeichnet wird, einen Durchmesser von etwa 200 Mikrometer aufweist und von einer als Glomerulärkapsel bezeichneten dünnwandigen sackartigen Struktur umgeben ist. Blut dringt durch die Zuflußarteriole in den Glomerulus ein und tritt durch die Abflußarteriole aus dem Glomerulus aus. Während es sich im Glomerulus befindet, bewirkt der Blutdruck, daß Wasser und verschiedene gelöste Substanzen aus den Glomerulärkapillaren als Glomerulärfiltrat in die Glomerulärkapsel ausgefiltert werden.

[0005] Die relative Konzentration einiger der Substanzen im Plasma, im Glomerulärfiltrat und im Urin ist in den Tabellen I und II dargestellt. Diese Werte können sich abhängig von vielen Faktoren, wie dem Fluidverbrauch, der Medikation, dem Alter, der Ernährung, der Gesundheit und der Nierenfunktion des Patienten ändern.

Tabelle I

Substanz	Plasma (mEq/l)	Glomerulärfiltrat (mEq/l)	Urin (mEq/l)
Natrium	142	142	128
Kalium	5	5	60
Kalzium	4	4	5
Magnesium	3	3	15
Chlor	103	103	134
Bicarbonat	27	27	14
Sulfat	1	1	33
Phosphat	2	2	40

Tabelle II

Substanz	Plasma (mg/100 ml)	Glomerulärfiltrat (mg/100 ml)	Urin (mg/100 ml)
Glucose	100	100	0
Harnstoff	26	26	1820
Harnsäure	4	4	53
Creatinin	1	1	196

[0006] Die Gesamtrate der Glomerulärfiltration beträgt typischerweise etwa 180 Liter je Tag und Person. Der größte Teil dieses Volumens wird über den Reabsorptionsprozeß in den Blutstrom zurückgeführt. Die Reabsorption ist die Bewegung von Substanzen aus den Nierentubuli in das Blut. Reabsorbierte Substanzen umfassen Wasser, Glucose und andere Nährstoffe, Natrium und andere Ionen. Die Reabsorption beginnt in den proximalen gewundenen Tubuli und setzt sich in der Henleschen Schleife, den distalen gewundenen Tubuli und den Sammel tubuli fort.

[0007] Die Sekretion ist der Prozeß, durch den sich Substanzen und Fluide aus dem Blut in den Kapillaren in die distalen und sammelnden Tubuli um diese Tubuli herum bewegen. Abgeschiedene Substanzen sind Wasserstoffionen, Kaliumionen, Ammoniak und bestimmte Arzneimittel. Die Nierentubulussekretion spielt eine entscheidende Rolle beim Aufrechterhalten des Säure/Base-Gleichgewichts des Körpers.

[0008] Die Homöostase wird vom Körper durch spezialisierte Hormone aufrechterhalten, die die Funktionen der Nieren beeinflussen. Das Hypophysenhormon ADH (antidiuretisches Hormon) verringert die erzeugte Urinmenge, indem die distalen und sammelnden Tubuli wasserdurchlässig gemacht werden. Aldosteron, das von der Nebenniere abgeschieden wird, steuert die Reabsorption von Salz und anderen Elektrolyten durch die Nierentubuli. In erster Linie stimuliert Aldosteron die Tubuli dazu, Natrium bei einer höheren Rate zu reabsorbieren.

[0009] Wenngleich Hormone die Nierenfunktion beeinflussen, erzeugen die Nieren auch Hormone zum Regeln der Funktion anderer Organe. Erythropoietin ist ein von den Nierenzellen abgeschiedenes Hormon zum Regeln der Bildungsrate roter Blutkörperchen. Renin, ein zweites von den Nieren abgeschiedenes Hormon, regelt den Blutdruck. Zusätzlich aktivieren die Nieren Vitamin D, das an der Skelettintegrität beteiligt ist.

[0010] Zusammenfassend sei bemerkt, daß infolge der Glomerulärfiltration von Blutplasma, der Tubulärreabsorption und der Tubulärsekretion Blut behandelt wird und Urin gebildet wird. Bei der Tubulärreabsorption werden Substanzen, wie Glucose, Aminosäuren, Proteine, Creatin, Milchsäure, Zitronensäure, Harnsäure, Ascorbinsäure, Phosphationen, Sulfationen, Kalzium, Kaliumionen, Natriumionen, Wasser und Harnstoff reabsorbiert. Bei der Tubulärsekretion werden Penicillin, Creatinin, Histamin, Phenobarbital, Wasserstoffionen, Ammoniak und Kalium abgeschieden.

[0011] Wenn beide Nieren in einem Patienten versagen, kann der Blutdruck ansteigen, kann sich Fluid im Körper ansammeln, können sich Abfallwerte im Blut bis zu einem schädlichen Niveau aufbauen und kann die Produktion roter Blutkörperchen reduziert werden. Wenn dies geschieht, ist eine Behandlung zum Ersetzen der Funktion der ausgefallenen Nieren erforderlich. Behandlungen für eine Nierendysfunktion sind die Hämodialyse, die Peritonealdialyse und Nierentransplantationen.

[0012] Die Hämodialyse ist eine Behandlungsprozedur, die das Blut eines Patienten mit einer unzureichenden Nierenfunktion reinigt und filtert. Die Behandlungsprozedur verringert die Niveaus schädlicher Abfälle, zusätzlichen Salzes und von Fluiden. Die Hämodialyse hilft auch dabei, den Blutdruck zu regeln, und sie behält das richtige Gleichgewicht von Chemikalien, wie Kalium, Natrium und Chlorid, im Körper bei.

[0013] Bei der Hämodialyse wird ein Dialysegerät oder ein spezieller Filter zum Behandeln des Bluts verwendet. Während der Behandlung läuft Blut von einem Patienten durch Schläuche in ein externes Dialysegerät. Das Dialysegerät filtert Abfälle und überschüssige Fluide heraus und führt das frisch gereinigte Blut in den Körper zurück. Ein typischer Behandlungsablauf kann aus drei Hämodialysebehandlungen pro Woche für jeweils zwei bis vier Stunden bestehen. Während der Behandlung ist die Beweglichkeit eingeschränkt, ein Patient kann jedoch Aktivitäten ausüben, die keine übermäßigen Bewegungen erfordern, wie Lesen und Schreiben.

[0014] Yasushi u. a. (GB 2 011 274 A) haben ein Hämodialysegerät offenbart, das ein in einem Gehäuse enthaltenes Bündel hohler Fasern aufweist. Bei dieser Hohlfaser-Permeabilitätsvorrichtung fließt ein erstes Fluid, wie beispielsweise das Dialysat, entlang dem Außenbereich der hohlen Fasern, während ein zweites Fluid, wie beispielsweise Blut, entlang dem Inneren der Fasern fließt.

[0015] Die Nachteile der Hämodialyse umfassen Nebenwirkungen und Komplikationen, die durch schnelle Änderungen des Körperfluids des Patienten und seines chemischen Gleichgewichts während der Behandlung hervorgerufen werden. Muskelkrämpfe und Hypotension sind zwei häufige Nebenwirkungen. Die Hypotension, ein plötzlicher Abfall des Blutdrucks, kann eine extreme Schwäche und Schwindelgefühle hervorrufen.

[0016] Ein Patient benötigt gewöhnlich einige Monate, um sich an die Nebenwirkungen der Hämodialyse zu gewöhnen. Die Nebenwirkungen können durch striktes Befolgen der geeigneten Diät und des Verbrauchs der Medikamente nach Vorschrift reduziert werden. Eine geeignete Diät hilft dabei, die Abfälle zu reduzieren, die sich im Blut eines Patienten aufbauen, und sie reduziert die Belastung der Niere. Ein Ernährungsfachmann ist erforderlich, um dabei zu helfen, Mahlzeiten nach Anweisungen des Arztes zu planen.

[0017] Weitere Nachteile der Hämodialyse sind hohe Kosten und häufige und langandauernde Reisen zu einem Dialysezentrum. Eine Alternative zu Dialysezentren ist die Heimdialyse. Zur Heimdialyse ist eine Hilfsperson erforderlich, und sowohl der Patient als auch die Hilfsperson benötigen eine spezielle Ausbildung. Zusätzlich ist Platz erforderlich, um die Maschine und Versorgungseinrichtungen zu Hause unterzubringen.

[0018] Die Peritonealdialyse verwendet die Umhüllung des Unterleibs des Patienten, die Peritonealmembran, zum Filtern von Blut. Eine als Dialysat bezeichnete Reinigungslösung läuft durch einen speziellen Schlauch in den Unterleib des Patienten. Fluid, Abfälle und Chemikalien laufen von dünnen Blutgefäßen in der Peritonealmembran in das Dialysat. Nach einigen Stunden wird das Dialysat aus dem Unterleib abgezogen, wobei die Abfälle aus dem Blut mit ihm entnommen werden. Der Unterleib wird dann mit frischem Dialysat gefüllt, und der Reinigungsprozeß beginnt von neuem.

[0019] Die Dialyseprozedur weist verschiedene Schwierigkeitsgrade auf und benötigt erhebliche Behandlungszeiten. Wenngleich die Behandlungsabläufe variieren, führen sie im allgemeinen zu erheblichen Unannehmlichkeiten. Ein typischer Behandlungsablauf kann beispielsweise dreißig bis vierzig Minuten alle vier bis sechs Stunden, zehn bis zwölf Stunden jede Nacht, sechsenddreißig bis zweiundvierzig Stunden je Woche oder 24-Stunden-Behandlungssitzungen umfassen. Zusätzlich sind in Ergänzung zur Dialyse spezielle Diäten mit einer reduzierten Kalorienaufnahme und einer beschränkten Kaliumaufnahme erforderlich.

[0020] Mögliche Komplikationen der Peritonealdialyse sind eine Peritonitis oder eine Infektion des Peritoneums. Die Prozedur der Peritonealdialyse weist viele Schritte auf, bei denen Pathogene, wie Bakterien, in den Körper eingeführt werden können. Symptome der Peritonitis umfassen Entzündungen, Absonderungen von Serumfibrinzellen und Eiter, Übelkeit, Schwindel, Fieber, Unterleibsschmerzen, Schwächezustände, Verstopfung und Erbrechen. Zum Vermeiden einer Peritonitis muß dafür gesorgt werden, daß die Prozedur genau verfolgt wird. Ein Patient muß dafür ausgebildet werden, daß er die Frühzeichen einer Peritonitis erkennt. Falls nicht schnell eingegriffen wird, können sich ernste Probleme ergeben.

[0021] Zusätzlich zu kurzfristigen Unannehmlichkeiten und Nebenwirkungen weisen die Hämodialyse und die Peritonealdialyse ernste Langzeitkomplikationen auf. Komplikationen, wie Knochenkrankheiten, hoher Blutdruck, Nervenschädigungen und Anämie, können im Laufe der Zeit verheerende Wirkungen haben. Infolge dieser Komplikationen sind 60% der Nierendialysepatienten arbeitslos und 30% behindert. Nierendialysepatienten haben gewöhnlich kürzere Lebensdauern und im Vergleich mit der allgemeinen Bevölkerung fünfmal mehr Krankenhausaufenthalte.

[0022] Die Nierentransplantation ist eine Prozedur, bei der eine gesunde Niere von einem Spender in den Körper eines Patienten verpflanzt wird. Die implantierte Niere erhöht oder ersetzt die Blutfilterkapazität der versagenden Nieren des Patienten. Die implantierte Niere wird zwischen dem oberen Teil des Oberschenkels und dem Unterleib angeordnet. Die Arterie und die Vene der neuen Niere werden mit einer Arterie und einer Vene des Patienten verbunden, und Blut fließt durch die neue Niere und bildet Urin. Die eigenen Nieren des Patienten, die noch teilweise funktionsfähig sein können, werden nicht entfernt, es sei denn, daß sie eine Infektion oder hohen Blutdruck hervorrufen.

[0023] Ebenso wie die Dialyse ist eine nicht histokompatible Transplantation keine Heilung. Die Gewebeabstoßung ist selbst dann ein erhebliches Risiko, wenn eine gute Histokompatibilität vorhanden ist. Immunosup-

pressive Maßnahmen zum Verhindern der Abstoßung auf der Grundlage von Arzneimitteln, wie Cyclosporin, bleiben der Eckstein der meisten Behandlungen nach der Transplantation. Das schmale therapeutische Fenster des pharmazeutischen immunsuppressiven Mittels zwischen einer angemessenen Immunsuppression und einer Giftigkeit, das durch die erheblichen pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Veränderlichkeiten innerhalb eines Patienten und zwischen Patienten bestimmt wird, macht es schwierig, wirksame, jedoch minimal giftige immunsuppressive Arzneimittelniveaus festzulegen. Demgemäß sind mit der Behandlung nach der Transplantation noch erhebliche Kosten und Risiken verbunden.

[0024] Ein längerer Verbrauch von immunsuppressiven Mitteln kann Nebenwirkungen hervorrufen. Die ernsteste Nebenwirkung ist ein geschwächtes Immunsystem, wodurch es erleichtert wird, daß sich Infektionen entwickeln. Manche Arzneimittel bewirken Gewichtszunahme, Akne, Gesichtshaare, Katarakte, übermäßige Magensäure, Hüftkrankheiten, Leber- oder Nierenschädigungen. Diäten für Transplantationspatienten sind weniger einschränkend als jene für Dialysepatienten, ein Patient muß jedoch weiterhin bestimmte Nahrungsmittel einschränken. Manchmal können selbst immunsuppressive Mittel die Abstoßung der Niere nicht verhindern. Falls eine Abstoßung auftritt, muß der Patient irgendeine Form der Dialyse verwenden und möglicherweise auf eine andere Transplantation warten.

[0025] Die Zeit, die erforderlich ist, um einen Nierenspender zu finden, schwankt. Es gibt nicht genug Spenderleichen für jede Person, die eine Transplantation benötigt, und dieses Problem ist bei Nierentransplantationen besonders ausgeprägt. Eine andere Nierenquelle sind lebende Spender, wie Verwandte und Ehegatten. Transplantate von genetisch verwandten lebenden Spendern funktionieren häufig besser als Transplantate von Spenderleichen, weil sie eine bessere Histokompatibilität aufweisen.

[0026] Humes (US-A-5 429 938) hat über ein Verfahren zum Kultivieren von Nierenzellen für die In-Vitro-Tubulogenese und die Ex-Vivo-Bildung von Nierentubuli berichtet. Bei dem Verfahren werden Nierenzellen bei Vorhandensein des Tumorstromafaktors $\beta 1$, des epidermalen Wachstumsfaktors und von All-Trans-Retinsäure kultiviert, um dreidimensionale Aggregate zu bilden. Zu den Nachteilen des Verfahrens gehören die Anforderungen zur Verabreichung von Wachstumsfaktoren und das Fehlen einer Glomerulibildung. Das Verabreichen von Wachstumsfaktoren an einen Patienten kann unerwünschte Nebenwirkungen und Komplikationen aufweisen. Wenngleich Humes ein Verfahren offenbart hat, das das Neuwachsen beschädigten Nierengewebes unterstützen kann, wurde kein Verfahren zum Aufbau und zur Verwendung einer Nierenprothese offenbart.

[0027] Humes u. a. (US-A-5 549 674) beschreiben zwei getrennte Vorrichtungen, die so kombiniert sind, daß sie als eine künstliche Niere wirken. Die erste Vorrichtung wird als "Filtrationsvorrichtung" bezeichnet, die eine zylinderförmige Membran und eine zusammenfließende Monoschicht von Epithel- und/oder Endothelzellen aufweist. Die zweite Vorrichtung wird als die "Tubulusprozeßvorrichtung" bezeichnet und hat Nierentubuluszellen, die auf die Innenfläche einer zylinderförmigen Membran aufgebracht sind. Die Tubulusprozeßvorrichtung hat ein Ende, in das Fluid eintritt, und ein zweites Ende, aus dem Fluid, das durch eine Monoschicht von Nierentubuluszellen nicht reabsorbiert wurde, als Urin austritt. Die Nierenzellen der Tubulusprozeßvorrichtung von Humes u. a. sind in einer immunologisch geschützten Kammer untergebracht und können daher nicht in Kontakt mit Empfängerewebe gelangen. Weil die Nierenzellen der Vorrichtung von Humes u. a. nicht dem Empfängerewebe ausgesetzt werden, können sie keine glomerulären Strukturen induzieren.

[0028] Es wurde über das Wachstum von Leberzellen (Rozga u. a., Hepatology 17, 258–65) und Blutzellen (Schwartz u. a., Blood 78, 3155–61) berichtet, die in halbporösen Membranstrukturen eingesperrt waren. Diese Organstrukturen sind für den Aufbau einer Nierenprothese nicht geeignet, weil sie nicht das Sammeln und die Exkretion glomerulären Filtrats außerhalb des Körpers gestatten.

[0029] Naughton und Naughton (US-A-5 516 680) haben über ein dreidimensionales Nierenzellen- und Gewebekultursystem berichtet. Eine dreidimensionale Struktur lebender Stromazellen wird auf eine Stromastützmatrix aufgebracht. Nierenzellen werden schichtförmig auf dieses dreidimensionale System aufgebracht und kultiviert.

[0030] Vacanti und Langer (WO-A-88/03785) haben Verfahren zum Kultivieren von Zellen in einem dreidimensionalen Polymerzellengerüst eines biologisch abbaubaren Polymers offenbart. Innerhalb des Polymerzellengerüsts kultivierte Orgazellen werden in den Körper eines Patienten implantiert, um ein künstliches Organ zu bilden.

[0031] Es ist daher insgesamt ersichtlich, daß die bekannten Verfahren für eine Nierenkultur innewohnende

Mängel und Fehler aufweisen und wegen Beschränkungen ihrer Auslegung in spezifischer Weise die Möglichkeit begrenzen, die Kultur als eine Nierenprothese zu verwenden. Wenngleich jedes dieser Verfahren versucht hat, einige der Probleme zu adressieren, die bei der Konstruktion von Nierenprothesen auftreten, schlägt keines der offenbarten Verfahren ein Verfahren zur Konstruktion einer tatsächlichen Nierenprothese vor, die in der Lage ist, Blut zu filtern, glomeruläres Filtrat zu erzeugen und eine Sekretion oder eine Reabsorption auszuführen.

Zusammenfassung der Erfindung

[0032] Die vorliegende Erfindung löst die Probleme und Nachteile, die mit gegenwärtigen Strategien und Entwürfen verbunden sind, und sieht eine Vorrichtung zur Behandlung einer Nierendysfunktion und eines Nierenausfalls vor.

[0033] Eine Ausführungsform der Erfindung betrifft eine Nierenprothese, die wenigstens eine künstliche Niereneinheit (ARU) aufweist. Die künstliche Niereneinheit weist eine poröse Membranstruktur mit einer Außenfläche auf, die einen geschlossenen Innenraum mit wenigstens einem Abflußkanal eingrenzt, wobei an der Außenfläche der Membranstruktur weiter mehrere Nephronanaloga angebracht sind, die in Fluidkommunikation mit dem geschlossenen Innenraum stehen. Jedes Nephronanalogon weist ein Nierentubulusanalogon mit einem Gefäßsystem auf, wodurch in wenigstens einem Bereich des Nierentubulusanalogons eine glomeruläre Struktur gebildet ist. Das Nierentubulusanalogon weist ein dreidimensionales Zellaggregat von Nierentubuluszellen auf, wobei das Aggregat ein Lumen aufweist, das in Fluidkommunikation mit dem Innenraum der Membranstruktur steht und wobei die Nierentubuluszellen in dem Aggregat einen Bürstensaum aufweisen.

[0034] Eine andere Ausführungsform der Erfindung betrifft eine künstliche Niereneinheit mit einer porösen Membranstruktur, die eine Außenfläche aufweist, welche einen geschlossenen Innenraum mit wenigstens einem Abflußkanal definiert, wobei an der Außenfläche der Membranstruktur weiterhin mehrere Nephronanaloga angebracht sind, die in Fluidkommunikation mit dem geschlossenen Innenraum stehen. Jedes Nephronanalogon weist ein Nierentubulusanalogon mit einem Gefäßsystem auf, das in wenigstens einem Bereich des Nierentubulusanalogons eine glomeruläre Struktur bildet. Das Nierentubulusanalogon weist ein dreidimensionales Zellaggregat von Nierentubuluszellen auf, wobei das Aggregat ein Lumen aufweist, das in Fluidkommunikation mit dem Innenraum der Membranstruktur steht, und wobei die Nierentubuluszellen einen Bürstensaum aufweisen.

[0035] Eine andere Ausführungsform der Erfindung betrifft eine künstliche Niereneinheitenvorstufe, die zur Implantation in einen Patienten geeignet ist, der eine zusätzliche Nierenfunktion benötigt, welche eine poröse Membranstruktur mit einer Außenfläche aufweist, die einen geschlossenen Innenraum definiert und wenigstens einen Abflußkanal aufweist. An der Außenfläche der Membranstruktur und in Fluidkommunikation mit ihrem geschlossenen Innenraum sind weiterhin mehrere Nierentubulusanaloga angebracht. Die Nierentubulusanaloga weisen ein dreidimensionales Aggregat von Nierentubuluszellen auf, wobei das Aggregat ein Lumen aufweist, das in Fluidkommunikation mit dem Innenraum der Membranstruktur steht, wobei die Nierentubuluszellen in dem Aggregat einen Bürstensaum aufweisen.

[0036] Eine andere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren zum Bilden einer künstlichen Niereneinheitenvorstufe, die zur Implantation in einen Patienten geeignet ist, der eine zusätzliche Nierenfunktion benötigt, wobei eine poröse Membranstruktur bereitgestellt wird, die eine Außenfläche aufweist, welche einen geschlossenen Innenraum mit wenigstens einem Abflußkanal definiert, die Außenfläche in Kontakt mit einer Suspension von Nierengewebezellen gebracht wird und die Nierenzellen auf der Außenfläche in vitro kultiviert werden, um eine Anzahl von Nierentubulusanaloga zu bilden, wobei die Nierentubulusanaloga ein dreidimensionales Aggregat von Nierentubuluszellen aufweisen und das Aggregat ein Lumen aufweist, das in Fluidkommunikation mit dem eingeschlossenen Raum der Membranstruktur steht, wobei die Nierentubuluszellen in dem Aggregat einen Bürstensaum aufweisen.

[0037] Es ist auch ein Verfahren zum Behandeln einer Nierenkrankheit oder zum Verstärken der Nierenfunktion in einem Patienten offenbart, wobei eine vorstehend beschriebene künstliche Niereneinheitenvorstufe in einem Bereich mit einer nativen vaskulären Versorgung in den Patienten implantiert wird, die native vaskuläre Versorgung angeregt wird, glomeruläre Strukturen in dem einen Bereich zu bilden, und der Abflußkanal von der Membranstruktur mit dem Urintrakt des Patienten verbunden wird.

[0038] Eine andere Ausführungsform der Erfindung betrifft eine poröse Membranstruktur für eine Nierenprothese, welche eine semipermeable Membran eines biokompatiblen Polymers mit einer Außenfläche aufweist,

die einen Innenraum definiert, wobei die Membranstruktur eine Anzahl von Hohlröhrchen aufweist, die in Fluidkommunikation mit einem Kopfteil und einem Abflußkanal am Kopfteil stehen, um die Drainage des Innenraums zu ermöglichen.

[0039] Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Verfahren zum Bilden von Nierentubulusanalogia, bei dem Nierengewebe durch enzymatische Behandlung dissoziiert wird, um eine Zellsuspension zu bilden, die Nierenzellsuspension in vitro kultiviert wird, eine eingeschlossene poröse Membranstruktur mit extrazellulärem Matrixprotein behandelt wird und die Nierenzellen an der behandelten Außenfläche der eingeschlossenen porösen Membranstruktur kultiviert werden, um Nierentubulusanalogia zu bilden, wobei die Nierentubulusanalogia dreidimensionale Zellaggregate von Nierentubuluszellen enthalten, die Lumen innerhalb der Aggregate aufweisen, und wobei die Tubuluszellen einen Bürstensaum bilden.

[0040] Andere Ausführungsformen und Vorteile der Erfindung werden teilweise in der folgenden Beschreibung dargelegt und teilweise anhand dieser Beschreibung offensichtlich werden und können bei der Verwirklichung der Erfindung gelernt werden.

Beschreibung der Zeichnung

[0041] Die Unterlagen zu diesem Patent enthalten wenigstens eine Farbdarstellung. Kopien dieses Patents mit Farbdarstellung(en) werden vom Patentamt auf Anforderung und bei Zahlung der notwendigen Gebühr bereitgestellt.

[0042] Die **Fig. 1A–D** zeigen verschiedene zusammenfaltbare Konfigurationen für die künstliche Niereneinheit (ARU) oder die poröse Membranstruktur.

[0043] Die **Fig. 2A–C** zeigen verschiedene aufblasbare, zusammenfaltbare Konfigurationen für die künstliche Niereneinheit ARU oder die poröse Membranstruktur.

[0044] Die **Fig. 3A–J** zeigen verschiedene Formen für eine künstliche Niereneinheit oder eine poröse Membranstruktur.

[0045] **Fig. 4** zeigt eine aus Polycarbonat-Tubulärmembranen bestehende künstliche Nierenvorrichtung mit einer Porengröße von 4 Mikrometern, die mit Sammelleitungen und einem Vorratsbehälter verbunden ist.

[0046] **Fig. 5** zeigt eine immunozytochemische Färbung eines Abschnitts der künstlichen Niereneinheit mit Antiosteopontin-Antikörpern.

[0047] **Fig. 6** zeigt eine gleichmäßige Färbung für Fibronectin in der extrazellulären Matrix neu geformter Tubuli.

[0048] Die **Fig. 7A–B** zeigen Schnitte einer mit antialkalischen Phosphataseantikörpern gefärbten ARU.

[0049] Die **Fig. 8A–B** zeigen einen Schnitt einer implantierten ARU, worin die Bildung von glomerulären Strukturen und hochorganisierter tubulärer Strukturen unterschiedlicher Größen dargestellt ist.

Beschreibung der Erfindung

[0050] Die hier anhand von Ausführungsformen allgemein beschriebene vorliegende Erfindung betrifft eine Nierenprothese und Verfahren zum Herstellen einer Nierenprothese.

[0051] Bei allen der zahlreichen Verfahren und Vorrichtungen, die zum Behandeln von Nierenkrankheiten verwendet wurden, wurde versucht, eines oder mehrere Probleme zu lösen, die als für das erfolgreiche Verstärken der Nierenfunktion wichtig erkannt wurden. Beispiele dieser Verfahren umfassen die Blutdialyse und verschiedene Formen der Peritonealdialyse. Bei all diesen Verfahren und Vorrichtungen traten jedoch Probleme hinsichtlich der Systemkomplexität, der hohen Größe und des hohen Gewichts, langer Behandlungszeiten und Schwierigkeiten beim Kontrollieren von Infektionen auf. Die Probleme, die mit aktuellen Vorrichtungen und Verfahren zum Behandeln von Nierenkrankheiten, wie Dialysemaschinen und der Intraperitonealdialyse, verbunden sind, umfassen die Unfähigkeit, eine hohe Lebensqualität bei einer hohen Mobilität, eine angemessene Nierenfunktion für eine moderate körperliche Aktivität, eine Befreiung von einem strengen Diätplan und eine Freiheit von Komplikationen bereitzustellen, welche beispielsweise Infektionen, Übelkeit, Pruritus, eine

schlechte Ernährung, Pseudogicht, eine Hepatitis-B-Infektion, eine beschleunigte kardiovaskuläre Krankheit, eine Hypertension, eine renale Osteodystrophie, eine Anämie, eine Pleuraleffusion, Thrombosen, eine Sero-sites, eine Perikardites, eine Dialyseasites und eine Dialyseudemenz einschließen.

[0052] Es wurde gezeigt, daß transplantierte Nieren wirksam auf einer breiten Basis verwendet werden können, um Nierenkrankheiten zu behandeln, und daß ein langfristiges Überleben erhalten werden kann. Es gibt jedoch bis heute nicht genügend Spendernieren für alle Patienten, die eine benötigen, und es wurde keine künstliche Niere entwickelt, die für eine weitverbreitete Anwendung wirklich praktisch verwendbar ist. Zusätzlich benötigen heutige Nierentransplantationspatienten ein sehr hohes Maß an Patientennachsorge, einschließlich einer medizinischen Behandlung des Immunsystems des Patienten.

[0053] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine Nierenprothese bereitzustellen, die in der Lage ist, über viele Jahre eine hohe Lebensqualität aufrechtzuerhalten, wobei ein geringes Risiko von Komplikationen besteht, die mit heutigen Verfahren zum Behandeln von Nierenkrankheiten verbunden sind, welche Erbrechen, Infektionen, Hypotension, Krämpfe, Blutungen, Leukopenie, Hypoxie, Elektrolytstörungen und Dialyseudisäquilibrium und Übelkeit einschließen.

[0054] Eine andere Aufgabe der Erfindung besteht darin, eine Nierenprothese bereitzustellen, die bei hohen Filtrationsraten wirksam funktioniert und daher ein ausreichend kleines Volumen belegt.

[0055] Eine andere Aufgabe der Erfindung besteht darin, Nierenprothesen bereitzustellen, die in den Patienten implantiert werden können, um die Funktion der natürlichen Nieren zu ersetzen oder zu verstärken.

[0056] Eine andere Aufgabe der Erfindung besteht darin, ein Verfahren zum Herstellen einer Nierenprothese aus den eigenen Nierenzellen eines Patienten oder aus Spenderzellen bereitzustellen.

[0057] Eine andere Aufgabe der Erfindung besteht darin, Nierenprothesen bereitzustellen, die inhärent histokompatibel, dauerhaft und zuverlässig sind und das Blut über längere Zeiträume filtrieren können.

[0058] Eine andere Aufgabe der Erfindung besteht darin, eine Nierenprothese redundant bereitzustellen, um im Fall des Versagens einer oder mehrerer ihrer Komponenten eine angemessene Nierenfunktion zu ermöglichen.

[0059] Eine andere Aufgabe der Erfindung besteht darin, eine Nierenprothese bereitzustellen, die eine biologisch abbaubare Struktur aufweist, welche eine anfängliche strukturelle Rolle für die Bildung der Nierenprothese spielen kann und dann das Gewebewachstum fördern kann, wenn die biologisch abbaubare Struktur abgebaut wird.

[0060] Eine andere Aufgabe der Erfindung besteht darin, eine Nierenprothese mit einem Abflußdrainage- und Sammelsystem bereitzustellen.

[0061] Eine Ausführungsform der Erfindung betrifft eine Nierenprothese mit einer oder mehreren künstlichen Niereneinheiten (ARU). Ein bevorzugter Prozeß zur Herstellung einer solchen Vorrichtung wird nun beschrieben.

Ernten von Nierenzellen

[0062] Die ARU wird teilweise unter Verwendung von Nierenzellen von einem Spender hergestellt. Bei einer autologen Nierenprothese können die Nierenzellen aus den eigenen Nieren des Patienten gewonnen werden. Bei einer allogenen Nierenprothese können die Nierenzellen von einem anderen Mitglied der Gattung des Patienten gewonnen werden. Bei einer xenogenen Nierenprothese können die Nierenzellen von einer von derjenigen des Patienten verschiedenen Gattung gewonnen werden. Spenderzellen können vom Nierenkortex vieler Säugetierquellen, beispielsweise von Menschen, Rindern, Schweinen, Pferden, Schafen und Hühnern, stammen. Nierenzellen können in Biopsien oder Autopsien isoliert werden. Zusätzlich können die Zellen vor der Verwendung gefroren oder gestreckt werden.

[0063] Zum Herstellen der ARU-Anordnung wird eine Niere oder ein Nierengewebeabschnitt zu einer Zellsuspension dissoziiert (Beispiel 1). Die Dissoziation der Zellen zu der Einzelzellenstufe ist für die anfängliche Primärkultur nicht wesentlich, weil eine Einzelzellensuspension nach einem Zeitraum von beispielsweise einer Woche einer In-Vitro-Kultur erreicht werden kann. Eine Gewebedissoziation kann durch mechanisches und en-

zymatisches Aufbrechen der extrazellulären Matrix und der interzellulären Verbindungen, die die Zellen zusammenhalten, erreicht werden. Es können Nierenzellen von allen Entwicklungsstufen, beispielsweise von Föten, Neugeborenen, Jugendlichen oder Erwachsenen, verwendet werden. Höhere Zellerträge können von fötalem oder neonatalem Gewebe erhalten werden.

[0064] Um die Belastung der Zelle zu verringern und die Handhabung zu erleichtern, kann ein Teil des Nierengewebes vor dem Aufbrechen in eine ausgeglichene Salzlösung gegeben werden. Beispiele ausgeglichener Salzlösungen sind beispielsweise ein Gewebekulturmedium, eine ausgeglichene Henk-Salzlösung und phosphatgepufferte Salzlösung und dergleichen, welche von kommerziellen Quellen, wie Gibco (Gaithersburg, MD) und Sigma (St. Louis, MO), erhältlich sind. Das Nierengewebe kann durch mechanische Gewebetrennvorrichtungen, wie Skalpelle, Nadeln, Scheren oder ein Zelldissoziationssieb (Sigma, St. Louis, MO) aufgebrochen werden. Nach dem mechanischen Aufbrechen kann das Gewebe mit proteolytischen Enzymen, wie Trypsin, Kollagenase, Dispase, und mit Mitteln, welche Kalziumionen binden oder chelatieren, wie Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), weiter enzymatisch behandelt werden. Kalziumchelatoren entfernen die biologische Verfügbarkeit von Kalziumionen, von denen die Haftung von Zelle zu Zelle abhängt.

[0065] Um die Lebensfähigkeit von Zellen aufrechtzuerhalten, kann die enzymatische Dissoziation mit dem Auge oder durch das Mikroskop überwacht werden. Die Enzyme können nach dem Erreichen der gewünschten Dissoziation, jedoch bevor die Lebensfähigkeit der Zellen erheblich beeinträchtigt wird, inaktiviert werden. Die Enzyminaktivierung kann durch isotonisches Waschen oder durch eine Serumbehandlung ausgeführt werden.

[0066] Primärkulturen können mit einem Zellfraktionierungsschritt oder ohne diesen anhand der dissoziierten Zellen hergestellt werden. Die Zellfraktionierung kann unter Verwendung solcher Techniken, wie einer fluoreszenzaktivierten Zellsortierung, die Fachleuten bekannt ist, ausgeführt werden. Die Zellfraktionierung kann anhand der Größe der Zellen, ihres DNA-Gehalts, Zelloberflächenantigenen und ihrer Lebensfähigkeit ausgeführt werden. Beispielsweise können Tubularzellen angereichert werden und Fibroblastenzellen reduziert werden. Wenngleich eine Zellfraktionierung verwendet werden kann, ist sie für die Verwirklichung der Erfindung nicht erforderlich.

[0067] Eine Zellsortierung kann beispielsweise wünschenswert sein, wenn der Spender Krankheiten, wie Nierenkrebs oder eine Metastase eines anderen Tumors in der Niere, aufweist. Eine Nierenzellenpopulation kann sortiert werden, um maligne Nierenzellen oder andere Tumorzellen von normalen nicht kanzerösen Nierenzellen zu trennen. Die durch eine oder mehrere Sortierungstechniken isolierten normalen nicht kanzerösen Nierenzellen können zum Herstellen einer Nierenprothese verwendet werden.

[0068] Eine andere optionale Prozedur bei dem Verfahren ist die Kryokonservation. Die Kryokonservation kann beispielsweise nützlich sein, um die Notwendigkeit mehrerer invasiver chirurgischer Prozeduren zu reduzieren. Aus einer Niere entnommene Zellen können vermehrt werden, und ein Teil der vermehrten Zellen kann verwendet werden, und ein anderer Teil kann kryogen konserviert werden. Die Möglichkeit des Vermehrens und Konservierens von Zellen ermöglicht eine erhebliche Flexibilität bei der Auswahl von Spenderzellen. Beispielsweise können Zellen von einem histokompatiblen Spender vermehrt und in mehr als einem Empfänger verwendet werden. Ein zusätzlicher Vorteil, der sich bei der Kryokonservation und der Vermehrung ergibt, besteht darin, daß Zellen von einer Niere vermehrt werden können, um eine zweite Niere zu erzeugen.

[0069] Ein weiteres Beispiel der Nützlichkeit der kryogenen Konservation besteht in Gewebebänken. Spenderzellen können zusammen mit Histokompatibilitätsdaten kryokonserviert werden. Spenderzellen können beispielsweise in einer Spendergewebebank gelagert werden. Wenn Gewebe erforderlich ist, um eine Nierenkrankheit in einem Patienten zu behandeln, können Zellen ausgewählt werden, die mit dem Patienten am besten histokompatibel sind. Patienten, die eine Krankheit haben oder einer Behandlung unterzogen werden, die ihre Nieren gefährden kann, können eine Biopsie ihrer Nieren kryogen konservieren. Falls später die eigene Niere des Patienten versagt, können die kryogen konservierten Nierenzellen aufgetaut werden und für die Behandlung verwendet werden. Beispiele von Krankheiten, die Nieren beschädigen, sind beispielsweise hoher Blutdruck und Diabetes. Beispiele von nierenschädigenden Behandlungsprozeduren sind beispielsweise Chemotherapie und Strahlung.

Kultivieren von Nierenzellen

[0070] Es kann wünschenswert sein, die Anzahl der Zellen zu vermehren, um ausreichend Ausgangsmaterial für die ARU zu erzeugen. Die Vermehrung bietet Vorteile, wie eine Reduktion der Menge des erforderlichen Spendergewebes. Beispielsweise kann ein kleiner Nierenbiopsieschnitt von einem lebenden Spender entfernt

werden. Das entfernte Gewebe kann klein genug sein, damit die Nierenfunktion und die Nierenkapazität des Spenders nicht erheblich reduziert werden. Der entfernte Nierenbiopsieschnitt kann vermehrt werden, um eine Nierenprothese für einen oder mehrere Patienten bereitzustellen. In manchen Situationen, wie einer autologen Transplantation, bei der der Patient bereits eine erhebliche Nierenschädigung erlitten hat, weist die Fähigkeit, Nierenzellen zu vermehren und ARU zu regenerieren, erhebliche Vorteile auf.

[0071] Die Zellvermehrung kann durch wiederholtes Subkultivieren der Zellen in zunehmend größere und zahlreichere Kulturgefäße erreicht werden. Zellen können über Wochen, Monate und Jahre wiederholt subkultiviert werden. Demgemäß kann ein kleiner Nierenschnitt, beispielsweise weniger als ein Gramm Gewebe von einer Biopsie, nach dem wiederholten Kultivieren zu etwa 10 Gramm, etwa 50 Gramm, etwa 200 Gramm oder mehr Gewebe zur Verwendung beim Bilden von ARU vermehrt werden.

[0072] Bei einem bevorzugten Verfahren werden Zellen unter den in den Beispielen 2 und 3 erörterten Bedingungen kultiviert und vermehrt. Kurz gesagt, werden alle Zellen auf kollagen- behandelten Platten in modifiziertem Eagles-Medium von Dulbecco, das mit etwa 10% fötalem Rinderserum, etwa 5 µg/ml Rinderinsulin, etwa 10 µg/ml Transferrin, etwa 10 µg/ml Natriumselenit, etwa 0,5 µM Hydrocortison, etwa 10 ng/ml Prostaglandin E₂, etwa 100 Einheiten/ml Penicillin G, etwa 100 µg/ml Streptomycin versetzt ist, in einem Inkubator bei etwa 37°C und etwa 5% CO₂, kultiviert. Alle Medien und Reagenzien können im Handel von Gewebekultur-Ver sorgungsquellen, wie beispielsweise Sigma aus St. Louis, MO, gekauft werden.

[0073] Andere Kulturmedien, wie beispielsweise MCDB, 199, CMRL, RPMI, F10, F-12, MEM und dergleichen, sind von gewerblichen Quellen, wie beispielsweise Gibco (Gaithersburg, MD) und Sigma (St. Louis, MO), erhältlich und können auch zum Kultivieren von Nierenzellen verwendet werden. Zusätze können auch durch eine erhöhte Serumkonzentration, wie beispielsweise etwa 15%, etwa 20%, etwa 30%, etwa 40% oder etwa 50% Serum, zugeführt werden. Die Zusammensetzungen verschiedener geeigneter Säugetier-Zellmedien, Serum, ausgeglichener Salzlösungen und Zusätze sind in den Katalogen von Gibco (Gaithersburg, MD) und Sigma (St. Louis, MO) aufgelistet, worauf hiermit verwiesen sei.

[0074] Das Kulturmedium und die Matrix, die für das Erhalten lebensfähiger Nierenzellen über lange Zeiträume verwendet werden, sollten ausgewählt werden, um diese Zellen in einem hormonell ansprechenden Zustand zu halten. Kleine Mengen Insulin, Hydrocortison und Retinonsäure sind erwünscht, um Zellen zu erhalten, die in der Lage sind, Nierentubulusanaloge und künstliche Niereneinheiten zu bilden. Insulin, Hydrocortison und Retinonsäure sind insbesondere bei längeren Kultivierungsperioden, die während der Vermehrung von Zellen auftreten, besonders wünschenswert.

Poröse Membranstruktur

[0075] Die ARU gemäß der vorliegenden Erfindung weist eine eingeschlossene poröse Membranstruktur auf. Diese poröse Membranstruktur weist eine poröse Membran mit einer Außenfläche auf, die einen geschlossenen Innenraum und wenigstens einen Abflußkanal bildet. Wie nachstehend beschrieben wird, werden Nierentubulusanaloga an der Außenfläche der porösen Membranstruktur gebildet. Bei der einfachsten Ausführungsform der Erfindung kann die Membranstruktur ein hohles Röhrchen aufweisen, bei dem beide Enden gedichtet sind. Der Abflußkanal kann an dem eingeschlossenen Röhrchen angebracht werden, um die Drainage des Innenraums zu ermöglichen.

[0076] Eine poröse Membranstruktur gemäß der Erfindung kann beispielsweise auch aus einer Anzahl hohler poröser Röhrchen oder hohler Fasern bestehen, die jeweils an einem Ende geschlossen sind und am anderen Ende in Fluidkommunikation mit einem Kopfteil stehen. Hohle Fasern können im Handel gekauft werden, und der Aufbau hohler Fasern für eine Zellkultur ist Fachleuten wohlbekannt. Bei einem Verfahren zur Herstellung hohler Fasern werden Membranpolymere durch feine Düsen extrudiert, um Röhrchen zu bilden, welche härten und Röhrchen bilden, die hochporös sind. Mehrere hundert bis mehrere tausend bis Zehntausende von Fasern können zu einem Kopfteil verbunden werden. Weiterhin können zahlreiche Fasern durch Fluidkanäle verbunden werden, um eine Überstruktur für die Nierenprothese zu bilden. Eine Hohlfaserkonstruktion kann ein großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis zu einem verhältnismäßig kleinen Volumen reduzieren.

[0077] Alternative poröse Membranstrukturen können eine Anzahl hohler poröser Röhrchen oder Fasern aufweisen, die an beiden Enden offen sind und an einem Ende in Fluidkommunikation mit einem ersten Kopfteil stehen und an einem zweiten Ende in Fluidkommunikation mit einem zweiten Kopfteil stehen. Diese Konstruktion kann ein Spülen oder das Hindurchführen eines Reinigungsfluids durch die poröse Membranstruktur ermöglichen. Das Spülen kann das Reinigen, die Desinfektion, die Behandlung oder die Verabreichung von Arz-

neimitteln oder Chemikalien vor und während der Verwendung der porösen Membranstruktur ermöglichen.

[0078] Poröse Membranstrukturen können auch durch Sinterfusion von Teilchen unter Bildung einer dreidimensionalen Struktur gebildet werden. Andere Verfahren für den Aufbau poröser Membranstrukturen umfassen ein Ummanteln, ein Strecken, ein Auslaugen, eine Nukleierung und eine Laserherstellung. Bei der Ummantelung wird ein Dünnsfilm einer das Polymer und ein Lösungsmittel enthaltenden Lösung, manchmal auf einer Grundlage von Stoff oder Papier, gegossen. Das Lösungsmittel entweicht, und die Polymerausfällung bewirkt eine Porenbildung. Beim Strecken werden TeflonTM, Polypropylen oder andere Polymerlagen in allen Richtungen gleichmäßig gestreckt, wodurch gleichmäßige Poren erzeugt werden. Beim Auslaugen wird eine zwei Materialien enthaltende Lösung als ein Film ausgebreitet. Als nächstes wird ein Lösungsmittel zum Auflösen einer der Komponenten verwendet, was zu einer Porenbildung führt. (Siehe Mikos, US-A-5 514 378). Beim Nukleieren werden dünne Polycarbonatfilme radioaktiven Spaltprodukten ausgesetzt, welche Bahnen strahlungsbeschädigten Materials erzeugen. Als nächstes werden die Polycarbonatlagen mit einer Säure oder Base geätzt, wodurch die Bahnen des strahlungsbeschädigten Materials zu Poren umgewandelt werden. Schließlich kann ein Laser verwendet werden, um individuelle Löcher durch viele Materialien zu brennen und dadurch poröse Membranstrukturen zu bilden. Zusätzlich zu einem Polymermaterial können auch Metalle, Gläser und Keramiken verwendet werden, um eine poröse Membranstruktur durch Laserfertigung zu bilden. Ein Elektronenmikroskop kann zur Qualitätskontrolle und zum Bestimmen der Struktur der Membranen nach einem Herstellungsverfahren verwendet werden.

[0079] Die porösen Membranstrukturen können mit folgenden natürlichen oder künstlichen polymerischen, biokompatiblen Materialien hergestellt werden: Celluloseether, Cellulose, Celluloseester, fluoriertes Polyethylen, Poly-4-methylpenten, Polyacrylnitril, Polyamid, Polyamidimid, Polyacrylat, Polybenzoxazol, Polycarbonat, Polycyanarylether, Polyester, Polyestercarbonat, Polyether, Polyetheretherketon, Polyetherimid, Polyetherketon, Polyethersulfon, Polyethylen, Polyfluorolefin, Polyamid, Polyolefin, Polyoxadiazol, Polyphenylenoxid, Polypheylensulfid, Polypropylen, Polystyren, Polysulfid, Polysulfon, Polytetrafluorethylen, Polythioether, Polytriazol, Polyurethan, Polyvinyl, Polyvinylidenfluorid, regenerierte Cellulose, Silicon, Urea-Formaldehyd oder Copolymere oder physikalische Mischungen davon. Das Polymermaterial sollte so ausgewählt werden, daß es mit Körperfluiden und Empfängerzellen kompatibel und gegen Angriffe von diesen widerstandsfähig ist. Weiterhin ist es bevorzugt, daß das Material gegen Angriffe durch Arzneimittel oder Chemikalien, wie medizinische oder Chemotherapiematerialien, widerstandsfähig ist, denen der Patient als Teil der Behandlung der Nierenkrankheit oder einer anderen Krankheit, die der Patient auch haben kann, ausgesetzt ist.

[0080] Das poröse Membranmaterial kann biologisch abbaubar sein und so ausgelegt sein, daß es in einem Körper langsam abgebaut wird. Biologisch abbaubare Materialien können eine anfängliche strukturelle Rolle bei der Bildung der Nierenprothese spielen und dann ein Gewebewachstum fördern, wenn sie abgebaut werden. Weiterhin ist es bevorzugt, daß das biologisch abbaubare Material und seine Abbauprodukte ungiftig sind und leicht aus dem Körper eines kranken oder eines gesunden Patienten beseitigt werden können. Repräsentative Materialien zur Bildung der biologisch abbaubaren Struktur umfassen natürliche oder künstliche Polymere, wie beispielsweise Poly(alphaester), wie Poly(laktatsäure), Poly(glycolsäure), Polyorthoester und Polyanhydride und ihre Copolymere, welche durch Hydrolyse bei einer kontrollierten Rate abgebaut werden und reabsorbiert werden. Diese Materialien bieten eine maximale Steuerung der Abbaubarkeit, Handhabbarkeit, Größe und Konfiguration.

[0081] Die Poren an der porösen Membranstruktur sollten groß genug sein, um das Hindurchtreten von Fluiden und Gas zu ermöglichen, jedoch klein genug sein, damit sie für Zellen undurchdringlich sind. Geeignete Porengrößen zum Erreichen dieses Ziels können durch einen Durchmesser von etwa 0,04 Mikrometer bis etwa 10 Mikrometer und vorzugsweise zwischen etwa 0,4 Mikrometer und etwa 4 Mikrometer gegeben sein. Polycarbonatmembranen sind besonders geeignet, weil sie in sehr gut gesteuerten Porengrößen von beispielsweise etwa 0,01 Mikrometer, etwa 0,05 Mikrometer, etwa 0,1 Mikrometer, etwa 0,2 Mikrometer, etwa 0,45 Mikrometer, etwa 0,6 Mikrometer, etwa 1,0 Mikrometer, etwa 2,0 Mikrometer und etwa 4,0 Mikrometer hergestellt werden können. Beim Submikrometerniveau kann die poröse Membran für Bakterien, Viren und andere Mikroben undurchdringlich sein.

[0082] Die poröse Membranstruktur kann vollständig oder teilweise porös sein. Es kann erwünscht sein, daß Bereiche der porösen Membranstruktur nichtporös sind. Nichtporöse Bereiche können beispielsweise Gelenkbereiche, strukturelle Bereiche, Abfluß- und Zuflußöffnungen, Verbinder und Befestigungsstellen einschließen.

[0083] Der Abflußkanal kann eine beliebige Auslaßöffnung in der porösen Membranstruktur sein, wie beispielsweise eine Düse, ein Röhrchen, ein Anschlußstück, ein Loch oder eine Öffnung oder dergleichen, wo-

durch das Fluid aus dem Innenraum der porösen Membranstruktur austreten kann. Wahlweise kann ein rückflußfreies Ventil, das gemeinhin als ein Absperrventil bekannt ist, in den Abflußkanal aufgenommen werden, um einen Rückfluß von Ausfluß in die poröse Membranstruktur zurück zu verhindern. Ein Filter, dessen Poren groß genug sind, um das Hindurchtreten von Fluiden zu ermöglichen, jedoch klein genug sind, um das Hindurchtreten von Mikroben zu verhindern, kann zum Abflußkanal hinzugefügt werden, um die Möglichkeit einer Infektion der Nierenprothese auszuschließen oder zu verringern. Wahlweise können Mittel zum Sammeln und Speichern von Ausfluß, wie eine künstliche Blase, eine Kammer, ein Röhrchen oder dergleichen, mit dem Abflußkanal oder der porösen Membranstruktur verbunden werden. Der Ausfluß kann zwischen Drainageperioden oder zur anschließenden Analyse gespeichert werden.

[0084] Die poröse Membranstruktur kann eine zusammenfaltbare Struktur, beispielsweise in der Art der in **Fig. 1** dargestellten Strukturen sein. Eine zusammenfaltbare Struktur ist eine beliebige Struktur, die in einer Form entfaltet werden kann und zu einer zweiten kompakteren Form zurückgezogen werden kann. **Fig. 1** zeigt Beispiele von Strukturen, deren Formen umgewandelt werden können, wie beispielsweise von eben zu gewölbt (**Fig. 1A**), von langgestreckt zu helixförmig (**Fig. 1B**), von langgestreckt zu superhelixförmig (**Fig. 1C**) und von zylindrisch zu balgförmig (**Fig. 1D**). Die entfaltete Form kann besser geeignet sein, um Nierenzellen zu impfen oder sie zu implantieren, während die zurückgezogene Form für langfristige Implantate besser geeignet sein kann. Die entfaltete Form der zusammenfaltbaren porösen Membranstruktur kann beispielsweise ein langer oder flacher Zylinder (**Fig. 3A, 3G**), ein langgestrecktes Röhrchen (**Fig. 3B, 3E**), eine Spule (**Fig. 3K**), eine Helix (**Fig. 1B und 3C**), eine Doppel- oder Mehrfachhelix (**Fig. 1C**), eine Nierenform (**Fig. 3D**), ein Würfel (**Fig. 3H**), eine flache Tasche (**Fig. 3I**) oder eine Kombination von diesen sein. Die poröse Membranstruktur kann weiterhin Bälge **10** (**Fig. 1D**), Stränge, Fäden oder einen Draht **20** (**Fig. 1D**) zum Verformen und Gestalten der Struktur bei der Vorimplantation oder Nachimplantation aufweisen. Weiterhin kann die poröse Membranstruktur Träger aufweisen, um die Integrität aufrechtzuerhalten und eine Drucknekrose der Zellen der ARU zu verhindern. Diese Träger können Säulen, Rippen oder dergleichen einschließen, welche befestigt oder nicht befestigt sein können und innerhalb oder außerhalb der porösen Membranstruktur positioniert sein können. Die zurückgezogene Form der zusammenfaltbaren porösen Membranstruktur kann der entfalteten Struktur ähneln, abgesehen davon, daß sie komplexer ist. Andere zurückgezogene Formen können Ebenen, Kugeln und Nierenformen einschließen. Andere wünschenswerte zusammenfaltbare Strukturen können zurückgezogene Formen einschließen, welche dafür ausgelegt sind, subkutan oder in den Unterleib oder Brustkorb eines Patienten zu passen.

[0085] Beispiele zusammenfaltbarer Strukturen, die für eine Nierenprothese geeignet sind, umfassen eine akkordeonartige oder balgartige zusammenfaltbare Struktur (**Fig. 2C**), die am bevorzugtesten aus einem porösen, biokompatiblen Polymer besteht. Faltbare oder zusammenfaltbare poröse Membranstrukturen können während des Anbringens der Nierenzellen entfaltet werden. Daraufhin kann die zusammenfaltbare Struktur in entfalteter Form in einen Patienten implantiert werden. Weil eine neoangiogene Aktivität des Patienten die Nierenprothese perfundiert, kann die Struktur langsam zurückgezogen werden. Alternativ kann die Struktur nach dem Anbringen, von Nierenzellen zurückgezogen und in einen Patienten implantiert werden. Zusammenfaltbare dreidimensionale poröse Membranstrukturen können in einer Vielzahl von Formen entwickelt werden. Es ist bevorzugt, daß die dreidimensionale, zusammenfaltbare Membranstruktur eine wünschenswerte End- und Anfangsgeometrie aufweist. Die wünschenswerte Geometrie wird durch die Implantationsstelle der Nierenprothese vorgeschrieben. Eine Nierenprothese, die für eine subkutane Implantation ausgelegt ist, kann eine planare Form aufweisen, während eine Nierenprothese zum Ersetzen einer normalen Niere eine Nierenform aufweisen kann. Eine andere Entwurfsüberlegung besteht darin, daß die Struktur entfaltbar sein muß, ohne daß im zusammengefalteten oder im entfalteten Zustand eine Zerlegung oder ein Komponentenfehler hervorgerufen wird. Es ist beispielsweise wünschenswert, daß eine solche Struktur die strukturelle Integrität beibehält und im ausgedehnten und zusammengefalteten Zustand keine Okklusion aufweist, welche die Blutzufuhr zur Nierenprothese unterbrechen oder verringern kann.

[0086] Ein anderes Verfahren zum Bilden einer zusammenfaltbaren porösen Membranstruktur ist eine aufblasbare Struktur (**Fig. 2A, 2B und 2C**). Beispielsweise ist eine Ausführungsform einer aufblasbaren zusammenfaltbaren Struktur und ihrer entsprechenden Querschnittsstruktur in **Fig. 2A bzw. 2B** dargestellt. Die Struktur kann einen aufblasbaren Hauptteil **10** mit einer flexiblen, jedoch im wesentlichen nichtelastischen und in Querrichtung konvexen Wand **20** aufweisen. Die in Querrichtung konvexen Wände können langgestreckt sein und dafür ausgelegt sein, daß sie gebogen oder konkav und dadurch über ihre Breite flexibel sind. Die aufblasbare Struktur kann zum Impfen mit Nierenzellen aufgeblasen werden und entweder vor oder nach der Implantation entleert werden. Eine andere Ausführungsform einer aufblasbaren, zusammenfaltbaren porösen Membranstruktur ist akkordeonförmig und in **Fig. 2C** dargestellt.

[0087] Die eingeschlossene poröse Membranstruktur kann wahlweise ein verformbares Außengehäuse aufweisen, dessen Stärke ausreicht, um eine mechanische Beschädigung der ARU zu verhindern. Das verformbare Gehäuse kann zu einer beliebigen Anzahl gewünschter Konfigurationen geformt werden, um einer beliebigen Anzahl von Gesamtsystem-, Geometrie- und Platzbeschränkungen Rechnung zu tragen. Das verformbare Gehäuse kann aus Film, Gaze, Netzmaterial, Drahtgitter, Stoff, Schaumgummi und dergleichen bestehen. Geeignete Materialien zum Aufbau des Gehäuses können beispielsweise Metalle, wie Stahl und Titan, Glas, Polymere, Glasfaser, Kunststoffe oder dergleichen, einschließen. Die endgültige Form der porösen Membranstruktur mit dem Außengehäuse kann beispielsweise ein Zylinder (**Fig. 3A, 3B, 3G**), eine Spule (**Fig. 3J**), eine Helix (**Fig. 3C**), eine Doppel- oder Mehrfachhelix (**Fig. 1C**), eine Nierenform (**Fig. 3D**), ein Würfel (**Fig. 3H**), eine flache Tasche (**Fig. 3I**) oder eine Kombination von diesen (**Fig. 4**) sein. Die einzige Begrenzung für den Verformungsgrad besteht darin, daß kein größerer Bereich der porösen Membranstruktur und der zugeordneten ARU in erheblichem Maße zerbrochen, gestreckt, gekräuselt oder unter übermäßige Spannungen, Druck oder Kompression gesetzt wird, so daß die renale Funktion der Nierenprothese beeinträchtigt, vermindert oder auf andere Weise nachteilig beeinflusst wird.

[0088] Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung kann die poröse Membranstruktur mit Materialien hergestellt werden, die strahlungsbeständig sind, so daß eine Strahlentherapie die renalen Funktionen der Nierenprothese nicht in ungünstiger Weise ändert. Bei der Behandlung bestimmter Krankheiten, wie beispielsweise Nierenkrebs, kann es erforderlich sein, postoperativ Strahlung anzuwenden. Die strahlungsbeständige poröse Membranstruktur ermöglicht das Anwenden starker Strahlung bei sich an ihrem Ort befindender Nierenprothese für eine Resttumorbehandlung, falls dies erforderlich ist.

[0089] Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung besteht die poröse Membranstruktur aus Materialien, die ultraschallbeständig sind. Steinansammlungen und Verkrustungen, wie beispielsweise Nierensteine, im Urinsystem stellen ein häufiges Problem bei Patienten mit reduzierten Nierenfähigkeiten dar. Ein Verfahren zum Behandeln von Steinansammlungen, Verkrustungen und Steinen besteht in der Verwendung von Ultraschallenergie zum Zerstören der Ansammlungen. Eine ultraschallbeständige poröse Membranstruktur ermöglicht eine nach der Implantation stattfindende Ultraschallbehandlung, ohne die Nierenprothese nachteilig zu ändern.

[0090] Es ist Fachleuten bekannt, daß Kombinationen von Wachstumsfaktoren, wie des transformierenden Wachstumsfaktors β_1 , des epidermalen Wachstumsfaktors und von All-Trans-Retinsäure eine Bildung von Nierentubuli induzieren können. Es ist auch bekannt, daß verschiedene Chemikalien und Pharmazeutika, wie Kaliumcitrat und Acetohydroxaminsäure, die Kristallisation schwer löslicher Kalzium- und Magnesiumsalze behindern. Es ist bekannt, daß verschiedene Chemikalien und Pharmazeutika, wie Antibiotika und metallische Verbindungen, das Wachstum von Mikroben behindern oder diese töten können. Wachstumsfaktoren, Antiverkrustungsfaktoren und Antibiotika können in flüssiger Form durch den Zuflußkanal zur porösen Membranstruktur hinzugefügt werden. Der Zuflußkanal kann weiterhin beispielsweise ein Röhrchen aufweisen, das sich von der ARU zu einer subkutanen Stelle erstreckt. Bei einem Patienten mit einer abdominalen ARU kann das Hinzufügen von Wachstumsfaktoren, Antiverkrustungsfaktoren und Antibiotika beispielsweise leicht durch Verbinden mit einem subkutan implantierten Einlaßanschluß erreicht werden, der durch eine hypoderme Nadel zugänglich ist.

[0091] Eine Ausführungsform der Erfindung sieht das Aufbringen von extrazellulärem Matrixmaterial auf die poröse Membranstruktur für das Wachstum und die Entwicklung von Nierentubulusanaloga in vitro vor. Das schnelle dreidimensionale Wachstum von Nierenzellen für den Aufbau von ARUs kann durch die Verfügbarkeit von Biomaterialmatrizen erleichtert werden, auf denen Zellen vorhanden sein können und regeneriert werden können. Es kann demgemäß bevorzugt sein, die Außenfläche der porösen Membranstruktur mit Materialien, die geeignete Signale zur Zellenwachstumssteuerung geben, wie extrazellulären Matrixproteinen, zu behandeln.

[0092] Extrazelluläre Matrixproteine umfassen Glycoproteine, Proteoglycane und Kollagen. Die Außenfläche der porösen Membranstruktur kann mit einem dieser Proteine oder einer Kombination von diesen behandelt werden. Beispiele geeigneter extrazellulärer Proteine, welche verwendet werden können, umfassen Kollagen, Fibronectin, Thrombospondin, Cytotactin, Echinonectin, Entactin, Laminin, Tenascin, Uvomorulin, Vitronectin, Biglycan, Chondroitinsulfat, Decorin, Dermatan-sulfat, Heparin, Heparin-sulfat und Hyaluronsäure.

[0093] Das extrazelluläre Matrixprotein kann frisch aus einer Säugetierquelle, wie einem Rattenschwanz, extrahiert werden. Andere Säugetierquellen von Kollagen sind Rinder, Schweine und Menschen. Menschliches extrazelluläres Protein, wie Kollagen, kann von menschlichen Geweben, wie Plazentas oder Leichen, gesammelt werden und von kommerziellen Lieferanten, wie Sigma (St. Louis, MO), gekauft werden.

[0094] Extrazelluläres Matrixprotein und die poröse Membranstruktur können vor der Verwendung sterilisiert werden. Durch die Sterilisation kann die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination des extrazellulären Matrixproteins mit Mikroorganismen reduziert werden. Bevorzugte Verfahren für die Sterilisation sind eine Ultrafiltration und eine Bestrahlung. Die Bestrahlung kann beispielsweise eine Gammabestrahlung oder eine Röntgenbestrahlung sein. Alternativ können Antibiotika, antibakterielle Mittel und cytotoxische Mittel und Ultraviolettstrahlung in normalerweise wirksamen Dosen verwendet werden. Ein bevorzugt verwendetes cytotoxisches Mittel ist Ethylenoxid.

[0095] Bei der Oberflächenbehandlung der porösen Membranstruktur kann eine Lösung von ECM-Protein mit der porösen Membranstruktur in Kontakt gebracht werden. Nach dem Herstellen des Kontakts kann der pH-Wert beispielsweise durch Ammoniumhydroxid erhöht werden, um das Anhaften, Gelieren oder die Polymerisation zu fördern. Alternativ kann das extrazelluläre Matrixprotein mit der porösen Membranstruktur vernetzt werden. Vernetzende und derivatisierende Reagenzien können von einem gewerblichen Lieferanten, wie Pierce (Rockford, IL), gekauft werden.

Impfen von Nierenzellen auf die poröse Membranstruktur

[0096] Das Anbringen der Nierenzellen an der Außenfläche der porösen Membranstruktur kann durch Kombinieren der dissoziierten Nierenzellen mit der porösen Membranstruktur erreicht werden. Ein bevorzugtes Verfahren wird detailliert in Beispiel 3 beschrieben. Kurz gesagt, wird eine poröse Membranstruktur bei einer Dichte von etwa 1×10^7 Zellen je Quadratzentimeter der Oberfläche der porösen Membranstruktur leicht in Kontakt mit einer Suspension von Nierenzellen gebracht. Die beschichtete poröse Membranstruktur wird in einem Gewebekulturrinkubator bei einer Feuchtigkeit von etwa 100% bei etwa 37°C und etwa 5% CO₂ für etwa 30 Minuten bis etwa eine Stunde inkubiert. Nach diesem Zeitraum wird das Medium vorsichtig hinzugefügt, um die poröse Membranstruktur vollständig einzutauchen.

[0097] Das extrazelluläre Matrixprotein auf der porösen Membranstruktur kann das Anbringen von Nierenzellen fördern, und dieses Anbringen ist nach etwa 30 Minuten bis etwa 24 Stunden, beispielsweise innerhalb 1 Stunde, innerhalb 2 Stunden, innerhalb 4 Stunden, innerhalb 8 Stunden oder innerhalb 16 Stunden, vollständig abgeschlossen. Die genaue Zeit, die für ein vollständiges Anbringen erforderlich ist, hängt von der Oberflächeneigenschaft und der Oberflächenzusammensetzung der porösen Membranstruktur, des Mediums und der extrazellulären Matrix sowie der Nierenzellen ab.

Kultivieren der Nierenzellen auf der porösen Membranstruktur zur Bildung von Nierentubulusanaloga

[0098] Nach dem Anbringen wird die Nierenzellen enthaltende Struktur eine Zeitlang in vitro unter Bedingungen, die zur Bildung von Nierentubulusanaloga ausreichen, kultiviert. Beispielsweise ist eine Kultur bei etwa 5% CO₂ und etwa 37°C für etwa 3 Tage bis etwa 20 Tage, vorzugsweise zwischen etwa 7 bis etwa 10 Tagen, im allgemeinen ausreichend. Das die poröse Membranstruktur bedeckende Medium kann nach Bedarf in Zeitintervallen von etwa 1 Tag bis etwa 6 Tagen, vorzugsweise zwischen 2 Tagen und 5 Tagen und bevorzugter zwischen 3 Tagen und 4 Tagen ersetzt werden. Das Mediumaustauschintervall hängt vom Volumen der Medien und der Verbrauchsrate der Nährstoffe in den Medien und der Ansammlungsrate von Abfallprodukten ab. Es sei bemerkt, daß durch Anpassen der Volumina der Medien längere Zeiträume von beispielsweise 7 Tagen, 8 Tagen, 9 Tagen oder 10 Tagen zwischen Medienwechseln verstreichen können. Es sei bemerkt, daß der Zeitraum zwischen Medienwechseln durch Hinzufügen von Nährstoffen, Antibiotika und Hormonen, wie fötalem Rinderserum, Insulin, Transferrin, Natriumselenit, Hydrocortison, Prostaglandin E₂, Penicillin und Streptomycin, verlängert werden kann.

[0099] Die Oberflächeneigenschaften der porösen Membranstruktur werden durch eine extrazelluläre Matrixproteinbehandlung geändert, um die Morphologie und die Migration der angebrachten Zellen zu beeinflussen. Wenn sie auf der behandelten porösen Membranstruktur kultiviert werden, breiten sich Nierenzellen anfänglich als eine Monoschicht aus, sie sammeln sich jedoch im Laufe der Zeit spontan zu dreidimensionalen Zellaggregaten an, die jeweils ein inneres Lumen aufweisen. Die Form der Zellaggregate ähnelt einem linearen Segment eines Nierentubulus. Zellaggregate werden an dem Substrat angebracht und haben eine glatte Oberfläche mit praktisch nicht unterscheidbaren Grenzen zwischen Zellen. Die Nierentubulusanaloga können an einem Ende offen oder geschlossen sein. Nierentubulusanaloga weisen zellenweise betrachtet, verglichen mit den Nierenzellen-Monoschichten, höhere nierenspezifische Aktivitäten auf und bleiben länger lebensfähig. Spezifische zelluläre Funktionen von Tubuluszellen umfassen die Sekretion, Absorption und Expression zellspezifischer Genprodukte, wie alkalische Phosphatase (**Fig. 7A** und **B**) und Osteopontin (**Fig. 5**). Nierentubulusanaloga sind an der porösen Membranstruktur angebracht (**Fig. 7B**) und weisen eine eher gewebeartige Ultrastruktur

auf als Nierenzellen in einer Monoschicht.

[0100] Die Entwicklung der nierenspezifischen Aktivität im Laufe einer Selbstanordnung von Nierentubulusanaloga auf der porösen Membranstruktur kann phenotypisch und funktionell überwacht werden. Phenotypisch weisen Nierentubulusanaloga Eigenschaften, wie einen Bürstensaum, Lumen und Zellverbindungen ähnlich natürlichen Tubuli auf. Die Expression von Nierentubulus-spezifischen Genen, wie Osteopontin und alkalischer Phosphatase, kann durch beliebige molekularbiologische oder immunologische Verfahren überwacht werden, die Fachleuten bekannt sind, wie nördliche Tupfer, westliche Tupfer, Polymerasekettenschutz und In-Situ-Hybridisierungen. Tests für Aktivitäten, die für der Niere nahe Tubuluszellen lokalisiert sind, wie beispielsweise der periodische Säure-Schiff-Test (PAS-Test) für den Glucosemetabolismus, können zum Erkennen der Niere naher Phenotypen verwendet werden.

[0101] Es wurde beobachtet, daß der Niere nahe Tubuli zusammenhängende Schichten ovaler bis langgestreckter Zellen an der Oberfläche der porösen Membranstruktur bilden. Anfänglich, 24 Stunden nach dem Impfen, sind die Nierenzellen auf der porösen Membranstruktur eine Zellschicht dick, wenn sie sich jedoch dem Zusammenfließen nähern, können Bereiche gefunden werden, in denen mehrere Zellschichten vorhanden sind. Jede Zelle des Nierentubulusanalogons hat einen ausgeprägten runden Kern mit einer oder zwei getrennten Nukleoli. Die Zwischenzellenräume sind groß, wobei Zellen an Bereichen haften, die intrazellulären Brücken ähneln. In manchen Bereichen treten ausgeprägte Einfaltungen oder Taschen in die Zelloberfläche auf. Manche Zellen enthalten eine große Anzahl von Körnchen, vermutlich Lysosomen, die für proximale Tubuluszellen charakteristisch sind. Die Körnigkeit der Zellen nahm in Kulturen erheblich zu, die älter als 7 Tage waren.

[0102] Bei Betrachtung unter dem Mikroskop zeigen Nierentubulusanaloga ebenso wie natürliche Tubuli große intrazelluläre Räume, die mit langen, schmalen Mikrovilli-Vorsprüngen von der Zelloberfläche gefüllt sind, welche einem Bürstensaum ähnelt. Bürstensäume, die auch als gestreifte Säume bezeichnet werden, sind für die apikale Oberfläche der proximalen Nierentubuluszellen eindeutig charakteristisch. Unter dem Mikroskop erscheinen Bürstensäume als eine Spezialisierung der freien Oberfläche einer Zelle, die aus winzigen zylindrischen Vorsprüngen (Mikrovilli) bestehen, wodurch die Oberfläche stark vergrößert wird. Der Bürstensaum bei Nierentubulusanaloga weist eine umfangreiche Mikrovilli-Oberfläche auf, die durchgehend in die Einfaltungen oder Taschen verläuft, welche entlang der Zelloberfläche ausgebildet sind. Durch die Einfaltung, parallel jedoch unterhalb der Zelloberfläche, ausgeführte histologische Schnitte erscheinen als mit Mikrovilli ausgekleidete Kanäle, die von Cytoplasma umgeben sind. Die Bildung von Bürstensäumen oder mit Mikrovilli ausgekleideten Taschen kann den Mechanismus darstellen, durch den eine in hohem Maße mit Mikrovilli versehene Würfelzelle ihre umfangreiche apikale Oberfläche in einer anderenfalls schuppenartigen Zellkulturumgebung erhält. In Bereichen der Zelloberfläche, in denen es an mit Mikrovilli verbundenen Taschen oder Kanälen mangelt, weisen die Ränder der Zellen auch lange von ihnen vorstehende Mikrovilli auf. Ihre Anzahl ist jedoch reduziert, und ihre strukturelle Organisation unterscheidet sich von dem beobachteten Bürstensaum, der die Taschen oder Kanäle und benachbarte Oberflächen auskleidet. Die Bereiche geringerer Anzahlen von Mikrovilli können die lateralen und basalen Flächen normaler würfelförmiger Nierentubuluszellen sein.

[0103] Die Zellen der Nierentubulusanaloga enthalten die intrazellulären Organisationen, die für intakte proximale Tubuluszellen typisch sind. Die Kerne der Tubuluszellen sind oval und enthalten in erster Linie in der Umgebung des Kerns verstreutes Heterochromatin. Ein großer Teil des Kernmaterials erscheint euchromatisch, und ein oder zwei Nukleoli sind bei einer mikroskopischen Untersuchung sichtbar. Das Cytoplasma der Zellen der Nierentubulusanaloga enthält zahlreiche filamentöse Mitochondrien, die parallel zur Oberfläche der Zellen angeordnet sind. Die plattenartigen Cristae sind im allgemeinen senkrecht zur Länge der Mitochondrien angeordnet. Bei den eher langgestreckten Zellen sind auch, insbesondere in der Fortsetzung von intrazellulären Verbindungen, feine cytoplasmatische Mikrofaserbündel und umfangreiche Netze cytoplasmatischer Mikrofaser vorhanden. Diese faserigen Bündel verlaufen parallel zur Seitenfläche der Zellen. In den meisten Zellen sind kurze Profile körniger endoplasmatischer Retikuli vorhanden, wenngleich sie bei manchen Zellen sehr ausgedehnt werden können. Andere zelluläre Organellen sind dichte lysosome Granulen und ausgeprägte Golgi-Netze. Der Lysosomgehalt kann in einer älteren Kultur erheblich ansteigen.

[0104] Individuelle Desmosomen können an Kontaktstellen entlang den seitlichen Rändern benachbarter Zellen gefunden werden. Wenn Gruppen der eher langgestreckten Zellen in einem einzigen Bereich Kontakt herstellen, können sich sehr umfangreiche Desmosomen-artige Verbindungskomplexe bilden, die den eingeschobenen Scheiben des Herzmuskels ähneln. Von diesen Komplexen gehen umfangreiche Netze von Monofilamenten aus. Diese Verbindungskomplexe ähneln den Gürteldesmosomen der apikalen Grenze normaler proximale Tubuluszellen. Es ist demgemäß anhand ihrer Morphologie ersichtlich, daß Nierentubulusanaloga alle

Merkmale proximaler Nierentubuli aufweisen.

[0105] Die Genexpressionsanalyse weist auch darauf hin, daß die Nierentubulusanaloga Gene exprimieren, die für natürliche Tubuli typisch sind. Natürliche Nierentubuli exprimieren Osteopontin über die Länge des Nierentubulus und alkalische Phosphatase vorzugsweise am proximalen Ende. Nierenzellen weisen als eine Monoschichtkultur sehr niedrige Niveaus der Osteopontin- und Alkaliphosphataseaktivität auf, was anhand des niedrigen Niveaus einer Fleckenbildung in Abschnitten ersichtlich ist, die mit Antiosteopontin und Antialkaliphosphatase-Antikörpern behandelt wurden. Wenn sich die Nierenzellen zu Nierentubulusanaloga zusammenzuballen beginnen, nimmt die Alkaliphosphataseaktivität zu. Innerhalb eines einzigen Nierentubulusanalogons ist die Verteilung dieser Aktivität heterogen. Das proximale Ende des Nierentubulusanalogons weist detektierbare Niveaus von alkalischer Phosphatase auf. Falls die Zellen, beispielsweise durch Trypsin, dissoziiert werden, verlieren die Zellen ihre erhöhte Aktivität und kehren zu den niedrigen Niveaus zurück, die bei den anfänglichen Monoschichten gesehen werden. Zellen, die in einer Nierentubulusanalogstruktur bleiben, behalten jedoch ihre erhöhte Aktivität. Es wird vermutet, daß ihr verstärkter Kontakt von Zelle zu Zelle und ihre eher gewebeartige Struktur zu der erhöhten Aktivität beitragen, die bei Nierentubulusanaloga beobachtet wird.

Implantation künstlicher Niereneinheitstufen

[0106] Die künstliche Niereneinheitstufe, welche eine eingeschlossene poröse Membranstruktur mit angebrachten Nierentubulusanaloga aufweist, kann in einen Empfänger implantiert werden, um die Bildung von Nephronanaloga durch Bildung von Glomeruli am Ende der Tubuli zu induzieren. Die Angiogenese ist bei der Funktion der Nierenprothese wichtig. Die Funktion und das Wachstum von Nierenprothesen erfordern eine Blutzufuhr.

[0107] Bei der Angiogenese reagiert das Empfängergewebe auf von den Zellen der Nierenprothese erzeugte Signale. Diese Reaktion scheint wenigstens drei Komponenten zu enthalten. Erstens durchbrechen die kapillaren Endothelzellen des Nierentubulusanalogons die Basallamina, die ein existierendes Blutgefäß umgibt, und es wurde gezeigt, daß Endothelzellen des Empfängers während der Angiogenese Protease in der Art eines Plasminogenaktivators absondern, wodurch es ihnen ermöglicht wird, sich durch Digestion ihren Weg durch die Basallamina der Wirtskapillare oder -venole zu bahnen. Zweitens wandern die Endothelzellen des Empfängers zu den Nierenzellen hin. Drittens breiten sich die Endothelzellen aus und bilden Kapillaren, die in die glomeruläre Struktur eindringen, welche sich am proximalen Ende der Nierentubulusanaloga bildet. Die sich ergebende Struktur, die als Nephronanalogon bezeichnet wird, wird in vivo durch Implantieren eines Nierentubulusanalogons in einen Empfänger und durch Induzieren der Bildung von Glomeruli am proximalen Ende des Nierentubulusanalogons gebildet. Die Bildung von Glomeruli kann an den Enden einiger der Nierentubulusanaloga zwei Wochen nach der Implantation gesehen werden. Acht Wochen nach der Implantation ist die Bildung von Glomeruli ausgeprägt und an den meisten Nierentubulusanaloga sichtbar.

[0108] Die künstliche Niereneinheitstufe hat die Fähigkeit, die Bildung neuer Gefäße zu induzieren und kann in weniger vaskularisierte oder hoch vaskularisierte Bereiche des Körpers eines Patienten implantiert werden. Eine Woche nach der subkutanen Implantation ist die Gefäßbildung entlang den Nierentubulusanaloga ausgeprägt. Die Nierentubulusanaloga entwickeln sich am Ende von acht (8) Wochen durch Angiogenese entlang dem Tubulus zu Nephronanaloga, und es bilden sich Glomeruli in wenigstens einem Bereich des Nierentubulusanalogons. Mehrere Glomeruli oder glomeruläre Strukturen sind auch an jedem Nierentubulusanalogon sichtbar. Durch histologische Beobachtungen wurde eine umfangreiche Gefäßbildung entlang jedem Nierentubulusanalogon erkannt.

[0109] Die untersuchte ARU wies Eigenschaften proximaler Nierentubuli und Glomeruli auf. ARU exprimieren alkalische Phosphatase und Gammaglutamyltransferase, wobei es sich um zwei Gene handelt, die fast ausschließlich in proximalen Tubuluszellen exprimiert werden. Künstliche Glomeruli zeigen, wenn sie funktionell oder immunohistochemisch getestet werden, das Vorhandensein des Koagulationsfaktors VIII.

[0110] Weil eine Nierenprothese ohne eine Blutzufuhr auf der Diffusion für eine Zufuhr von Nährstoffen beruht, kann eine Nierenprothese auf eine lebende Schicht beschränkt werden, die nicht dicker als einige Millimeter ist, bis die Angiogenese eine angemessene Perfusion bereitstellen kann. Zum Überwinden dieser Beschränkung können zahlreiche ARU-Strukturen in einen Empfänger implantiert werden, um zu ermöglichen, daß die Angiogenese die ARU mit einer Arterie oder einer Vene verbindet. Daraufhin werden die ARU zusammen mit einer Arterie und Vene aus einem Empfänger entfernt und chirurgisch zu einer größeren oder dickeren ARU kombiniert und in einen Patienten reimplantiert. Die Arterie und die Vene der ARU werden mit einer Arterie und Vene des Patienten verbunden, um die Blutzufuhr zur eingerichteten Nierenprothese herzustellen.

Anschluß des Abflußkanals

[0111] Der Abflußkanal der ARU kann mit einer beliebigen Stelle in einem Patienten verbunden werden, um die Entfernung von Ausfluß aus der Nierenprothese zu ermöglichen. Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung kann der Abflußkanal mit einem Teil im Patienten verbunden werden, um das Entfernen von Filtrat aus der Spenderniere zu ermöglichen. Der Abflußkanal kann mit dem Harntrakt, einschließlich der Niere, dem Ureter, dem Nierenpelvis, der Blase, der Urethra, den Testikeln, der Prostata oder der Vas differens, verbunden werden. Alternativ kann der Abflußkanal mit dem Darm, wie dem Dickdarm oder dem Dünndarm, bei einer Darmkanaloperation verbunden werden. Weiterhin kann der Abflußkanal durch ein Röhrchen verlängert werden, so daß er durch die Haut des Patienten vorsteht, in den die Nierenprothese implantiert ist. Bei einer Unterleibsimplantation einer Nierenprothese kann der Abflußkanal beispielsweise durch die Unterleibswand verlängert werden. Am Ende des Abflußkanals kann eine Kappe installiert werden, um das Lecken von Ausfluß zu verhindern. Wenn es erwünscht ist, kann der Patient die Kappe entfernen und ermöglichen, daß der Ausfluß extern abgeführt wird.

[0112] Der Abflußkanal kann durch Nähte befestigt werden. Damit die ARU durch den Chirurgen eigens zugeschnitten werden kann, der die ARU in einem Patienten installiert, kann der Abflußkanal verschiedener ARU verschiedene Größen aufweisen, so daß sie an die Befestigungsstelle für den Abflußkanal angepaßt werden können. Weiterhin kann der Abflußkanal aus einem Material hergestellt werden, das während einer Implantation ein einfaches Zuschneiden ermöglicht, um während der Operation eine Anpassung an die Situation und den Ort zu erreichen.

In-Vitro-Operation

[0113] Gemäß einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann die Nierenprothese zusammen mit ihrer Arterie und Vene aus dem Empfänger entfernt werden und in vitro kultiviert werden. Eine Nierenprothese mit Nephronanaloga kann als ein Auftisch-Bioreaktor zur Bildung einer Auftisch-Nierenprothese verwendet werden. In-Vitro-Nierenprothesen können unter Verwendung von Säugetierserum oder durch direktes Verbinden mit einem Säugetier gespeist werden. Eine anfängliche In-Vitro-Nierenprothese mit einer Pilotgröße kann als das Ausgangsmaterial für eine schließliche In-Vitro-Nierenprothese mit der Produktionsgröße verwendet werden. Beispielsweise können zusätzliche poröse Membranstrukturen an der Nierenprothese angebracht werden, um sie zu veranlassen, in der Kultur zu wachsen. Die In-Vitro-Nierenprothese kann schließlich als ein individualisiertes therapeutisches Produkt in einen Patienten implantiert werden. Die Nierenprothese kann konserviert werden und in einem solchen Maße in vitro vervielfacht werden, daß eine industrielle Verarbeitung großen Umfangs und das Ernten eines Produkts möglich werden können. Eine In-Vitro-Nierenprothese kann beispielsweise zum Herstellen von Renin verwendet werden.

[0114] Eine Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung einer Nierenprothese zur Analyse der Wirkungen einer Substanz auf die Niere. Eine Substanz kann ein Arzneimittel oder ein Pharmazeutikum oder eine Mikrobe sein. Ein Arzneimittel oder ein Pharmazeutikum ist eine chemische Verbindung, die an einem Patienten, einschließlich Menschen und Tiere, als eine Hilfe bei der Diagnose, Behandlung oder Prävention einer Krankheit oder eines anderen abnormen Zustands verwendet oder an diesen verabreicht werden kann. Ein Arzneimittel kann zum Lindern von Schmerzen oder zum Steuern oder Verbessern eines physiologischen oder pathologischen Zustands verwendet werden. Beispiele von Arzneimitteln sind Impfstoffe, Rekombinationsmittel, Chemikalien, rekombinierende Nukleinsäure, rekombinierendes Protein und lebende, tote oder abgeschwächte Mikroben. Nützliche Arzneimittel zum Testen schließen Kandidaten von Arzneimitteln, Chemikalien, Verbindungen und Mitteln ein, von denen vermutet wird, daß sie die Eigenschaften eines Arzneimittels haben. Mikroben schließen lebende Organismen, wie Bakterien, Pilze, Viren, Amöben, Parasiten und Hefe oder dergleichen ein, welche während des Testens lebend, tot, in aufgeschobener Animation, in Ruhe oder abgeschwächt sein können.

Behandlung der Nierenkrankheit

[0115] Die Nierenprothese kann extern erhalten und betrieben werden und ex vivo funktionieren. Ein Patient, der eine Blutbehandlung benötigt, kann seine Blutversorgung über einen Zeitraum mit der Nierenprothese verbinden. Das behandelte Blut kann nach der Behandlung von der Nierenprothese getrennt werden und in den Patienten zurückgeführt werden.

[0116] Die Erfindung kann zum Behandeln einer Nierenkrankheit durch Verstärken der Nierenfunktion durch Implantieren der Nierenprothese in den Patienten verwendet werden. Nierenkrankheit ist ein allgemeiner Be-

griff, der Krankheiten von weniger lebensbedrohlichen Krankheiten, wie Nierensteinen, bis zu lebensbedrohlichen Störungen, wie der polyzystischen Nierenkrankheit und Nephrose, einem vorübergehenden und chronischen und permanenten Nierenausfall, einschließt. Krankheiten der Niere, die durch die erfindungsgemäße Niere behandelt werden können, umfassen alle Krankheiten, die von einer Verstärkung der Nierenfunktion profitieren können, wie angeborene Anomalien der Niere, wie eine zystische renale Dysplasie, eine polyzystische Nierenkrankheit, zystische Krankheiten der renalen Medulla, eine erworbene (mit der Dialyse verbundene) zystische Krankheit und einfache Zysten, glomeruläre Krankheiten, wie beispielsweise akute Glomerulonephritis, kreszentische Glomerulonephritis, das nephrotische Syndrom, die Membranglomerulonephritis, die Minimaländerungskrankheit, eine Lipoidnephrose, eine fokale segmentale Glomerulosklerose, eine membranoproliferatorische Glomerulonephritis, eine IgA-Nephropathie, eine fokalproliferatorische Glomerulonephritis, eine chronische Glomerulonephritis, einen systemischen Lupuserythematosus, Henoch-Schonlein-Purpura, eine bakterielle Endokarditis, eine diabetische Glomerulosklerose, eine Amyloidnephritis und eine erbliche Nephritis, Tubuluskrankheiten, wie eine akute Tubulusnekrose, ein akutes Nierenversagen und andere Nierenkrankheiten, wie eine mikroangiopathische hämolytische Anämie, die atheroembolische Nierenkrankheit, die Sichelzellenkrankheit-Nephropathie, die diffuse kortikale Nekrose, Niereninfarkte, Adenome, Karzinome, Nephroblastome, die immunologisch vermittelte Nierenkrankheit, die arzneimittelinduzierte Nephritis, die Uratnephropathie, die Hyperkalzämie und die Nephrokalzinose.

[0117] Andere Krankheiten, die behandelt werden können, können beliebige Zustände umfassen, bei denen die Niere eines Patienten beschädigt werden kann. Beispielsweise kann die Niere gemäß der Erfindung verwendet werden, um Patienten mit gesunden Nieren zu behandeln, die einer Chemotherapie mit einem Arzneimittel unterzogen werden, das für die Nephrone giftig ist. Andere Zustände, die eine Behandlung notwendig machen können, umfassen beispielsweise Traumata, eine Toxineinnahme, eine Autoimmunkrankheit, hohes Alter und dergleichen.

[0118] Die Niere gemäß der Erfindung ist für die Behandlung jeder Nierenkrankheit verwendbar, bei der es erwünscht ist, die Funktion der normalen Nieren eines Patienten zu verstärken. Die Nierenprothese kann für eine begrenzte Dauer oder permanent implantiert werden, wobei dies davon abhängt, ob die renale Verstärkung vorübergehend oder permanent erforderlich ist.

[0119] Die Nierenprothese kann viele verschiedene Formen annehmen, so daß sie zu den Erfordernissen des Patienten und zur Implantationsstelle paßt. Beispielsweise kann eine Nierenprothese mit einer langgestreckten oder flachen oder kompakten Form für eine Implantation im Unterleib oder eine subkutane Implantation optimal sein, bei der die existierenden Nieren des Patienten nicht entfernt werden. Alternativ kann eine Nierenprothese mit der anatomischen Form einer natürlichen Niere für Patienten am besten geeignet sein, die einen Nierenersatz benötigen. Die Größe der Nierenprothese kann im Interesse einer optimalen Funktionsweise auch geändert werden. Ein größerer Patient kann eine größere Nierenprothese benötigen, während ein kleinerer Patient, wie ein Kind, besser zu einer kleineren Nierenprothese paßt.

[0120] Andere Ausführungsformen und Vorteile der Erfindung werden teilweise in der folgenden Beschreibung dargelegt und werden teilweise anhand dieser Beschreibung offensichtlich werden und können anhand der Verwirklichung der Erfindung erlernt werden.

Beispiele

Beispiel 1 Isolation von Nierenzellen

[0121] Kleine Nieren und Nierenabschnitte von großen Nieren, beispielsweise von einer Woche alten C57-Schwarzmäusen, wurden dekapsuliert, präpariert, zerlegt und in modifiziertem Eagles-Medium von Dulbecco (DMEM; Sigma, St. Louis, MO) suspendiert, das 15 mM Hepes, einen pH-Wert von 7,4 und 0,5 µg/ml Insulin, 1,0 mg/ml Kollagenase und 0,5 mg/ml Dispase, eine neutrale Protease des Bacillus polymyxal (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), aufwies.

[0122] Große Nieren, wie Schweinenieren, wurden bei 37°C 10 Minuten lang mit kalziumfreiem, minimalem, essentiellm Eagles-Medium innerhalb von drei Stunden nach der Extraktion arteriell perfundiert. Die Nieren wurden dann mit 0,5 mg/ml Kollagenase (Typ IV, Sigma, St. Louis, MO) in demselben Puffer perfundiert, dem 1,5 mM MgCl₂ und 1,5 mM CaCl₂ zugesetzt waren. Die Nieren wurden dann dekapsuliert, präpariert, zerlegt und in modifiziertem Eagles-Medium von Dulbecco (DMEM; Sigma, St. Louis, MO) suspendiert, das 15 mM Hepes, einen pH-Wert von 7,4 und 0,5 µg/ml Insulin, 1,0 mg/ml Kollagenase und 0,5 mg/ml Dispase, eine neutrale Protease des Bacillus polymyxal (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN), aufwies.

[0123] Die Nierenzellensuspension von großen oder kleinen Nieren wurde in einem Wasserbad 30 Minuten lang bei 37°C leicht gerührt. Die Zellen und Fragmente wurden durch Zentrifugation bei 50 g über 5 Minuten wiedergewonnen. Die Pellets wurden wieder in DMEM suspendiert, das 10% fötales Rinderserum (Biowhitaker, Walkersville, Maryland) enthielt, um die Proteolyse zu unterbrechen, und die trübe Lösung wurde durch sterile Nylonsiebe mit einer Maschenweite von 80 hindurchgeführt, um große Fragmente zu beseitigen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation wiedergewonnen und zweimal mit kalziumfreiem modifiziertem Eagles-Medium von Dulbecco gewaschen.

Beispiel 2 In-Vitro-Kultivierung von Nierenzellen

Isolation von Rattenschwanzkollagen

[0124] Die Sehne wurde aus Rattenschwänzen abgestreift und in 0,12 M Essigsäure in deionisiertem Wasser in 50-ml-Röhrchen gelagert. Dies geschah 16 Stunden lang bei 4°C über Nacht.

[0125] Dialysebeutel wurden vorbehandelt, um eine gleichmäßige Porengröße und das Entfernen von Schwermetallen zu gewährleisten. Kurz gesagt, wird der Dialysebeutel in eine Lösung von 2%igem Natriumbicarbonat und 0,05%igem EDTA eingetaucht und zehn Minuten lang gekocht. Mehrere Spülungen mit destilliertem Wasser wurden verwendet, um das Natriumbicarbonat und die 0,05% EDTA zu entfernen.

[0126] Die Rattensehnen enthaltende 0,12 M Essigsäurelösung wurde in behandelte Dialysebeutel gegeben und zwei oder drei Tage lang dialysiert, um Essigsäure zu entfernen. Die Dialyselösung wurde alle 3 bis 4 Stunden gewechselt.

Behandlung einer porösen Membranstruktur mit Kollagen

[0127] Eine poröse Membranstruktur (**Fig. 4**) wurde durch Kontakt mit einer Lösung, die 30 µg/ml Kollagen (Vitrogen oder Rattenschwanzkollagen), etwa 10 µg/ml menschliches Fibronektin (Sigma, St. Louis, MO) und etwa 10 µg/ml Rinderserumalbumin (Sigma, St. Louis, MO) in einem Gesamtvolumen von etwa 2 ml hinzugefügten Mediums enthielt, durch Inkubation bei 37°C über 3 Stunden behandelt. Daraufhin wurde die kollagenbeschichtete poröse Membranstruktur 30 Minuten lang in einen Inkubator mit 1 ml konzentriertem Ammoniumhydroxid (etwa 28% bis 30% NH₄OH, Sigma, St. Louis, MO) gegeben, um den pH-Wert zu erhöhen und das Gelieren des Kollagens zu fördern. Nach der Behandlung der porösen Membranstruktur mit Ammoniumhydroxid wurde die Struktur extensiv mit isotonischem Medium gewaschen, um den pH-Wert der porösen Membranstruktur vor der Verwendung zu neutralisieren.

Beschichten von Gewebekulturplatten

[0128] Die 75 cm² aufweisenden Kulturflaschen wurden mit einer 30 µg/ml Kollagen (Vitrogen oder Rattenschwanzkollagen), etwa 10 µg/ml menschliches Fibronektin (Sigma, St. Louis, MO) und etwa 10 µg/ml Rinderserumalbumin (Sigma, St. Louis, MO) in einem Gesamtvolumen von etwa 2 ml ergänztem Medium enthaltenden Lösung durch Inkubation bei 37°C für 3 Stunden beschichtet.

Zellkultur

[0129] Digerierte einzelne suspendierte Nierenzellen wurden auf eine modifizierte Kollagenmatrix bei einer Konzentration von etwa 1×10^6 Zellen/ml aufgebracht und in DMEM, das mit etwa 10% fötalem Rinderserum, etwa 5 µg/ml Rinderinsulin, etwa 10 µg/ml Transferrin, etwa 10 µg/ml Natriumselenit, etwa 0,5 µM Hydrocortison, etwa 10 ng/ml Prostaglandin E₂, etwa 100 Einheiten/ml Penicillin G, etwa 100 µg/ml Streptomycin (Sigma, St. Louis, MO) versetzt war, in einem 5% CO₂ aufweisenden Inkubator bei etwa 37°C gezüchtet.

[0130] Zusammenfließende Monoschichten wurden durch Behandlung mit etwa 0,05% Trypsin, etwa 0,53 mM EDTA (Gibco BRL, Grand Island, NY) in einer kalziumionenfreien Phosphatpuffer-Salzlösung (PBS) (etwa 1,51 mM KH₂PO₄, etwa 155,17 mM NaCl, etwa 2,8 mM Na₂HPO₄·7H₂O) subkultiviert.

[0131] Zellen können zu jeder Zeit vom ersten Durchgang durch die Suspension in etwa 10% DMSO im Kulturmedium kultiviert werden, um sie im flüssigen Medium zu gefrieren und zu lagern.

Beispiel 3 Präparation der Nierenprothese

[0132] Nierenzellen wurden in vitro 10 Tage lang kultiviert und vermehrt. Das In-Vitro-Kulturmedium, nämlich DMEM, das mit 10% fötalem Rinderserum, etwa 5 µg/ml Rinderinsulin, etwa 10 µg/ml Transferrin, etwa 10 µg/ml Natriumselenit, etwa 0,5 µM Hydrocortison, etwa 10 ng/ml Prostaglandin E₂, etwa 100 Einheiten/ml Penicillin G und etwa 100 µg/ml Streptomycin (Sigma, St. Louis, MO) versetzt war, wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Zellen wurden durch Trypsindigestion unter Verwendung von 0,05% Trypsin, etwa 0,53 mM EDTA (Gibco BRL, Grand Island, NY) in einer kalziumionenfreien Phosphatpuffer-Salzlösung (PBS) (etwa 1,51 mM KH₂PO₄, etwa 155,17 mM NaCl, etwa 2,8 mM Na₂HPO₄·7H₂O) geerntet. Nach der Digestion über 10 Minuten bei 37°C wurden die Zellen in DMEM-Medien bei etwa 5 × 10⁶ Zellen/ml resuspendiert.

[0133] Die Zellsuspension wurde vorsichtig schichtförmig auf eine poröse Membranstruktur aufgebracht, die eine vorgeformte tubuläre Vorrichtung aufwies, welche aus einer Polycarbonatmembran mit einer Porengröße von 4 Mikrometer aufgebaut war, die an einem Ende mit einem zu einem Vorratsbehälter führenden silastischen Katheter verbunden war. Die poröse Membranstruktur wurde mit Rattenkollagen beschichtet (Beispiel 2). Die an der Oberfläche mit etwa 10⁷ Zellen je Quadratzentimeter beschichtete poröse Membranstruktur wurde bei 37°C unter 5% CO₂ etwa 30 bis 40 Minuten lang inkubiert. Am Ende des Inkubationszeitraums wurde ein zusätzliches vorgewärmtes Medium vorsichtig hinzugefügt, bis die poröse Membranstruktur untergetaucht war. Die poröse Membranstruktur wurde bei 37°C unter 5% CO₂ etwa 7 bis 10 Tage lang inkubiert. Das Medium wurde gewechselt, und die Zellen wurden bei häufigen Intervallen, beispielsweise etwa jeden Tag, etwa alle zwei Tage oder etwa alle drei Tage, versorgt.

[0134] Etwa sieben bis 10 Tage nach dem Impfen entwickelten sich künstliche Niereneinheitenvorstufen an der Oberfläche der porösen Membranstruktur. Nach 30 Tagen der In-Vitro-Kultur wurde ein Fluid beobachtet und in dem Vorratsbehälter der porösen Membranstruktur gesammelt. Während das In-Vitro-Kulturmedium infolge von Phenolrot rot ist, ist das Fluid in dem Vorratsbehälter transparent und farblos. Die Sammlung eines von dem Medium verschiedenen Fluids gibt an, daß die künstlichen Niereneinheitenvorstufen Filtrations- und Sekretionsfunktionen aufweisen.

Implantation künstlicher Niereneinheitenvorstufen

[0135] Etwa 7 bis 10 Tage nach dem Impfen wurden einige der künstliche Niereneinheitenvorstufen an ihrer Oberfläche aufweisenden porösen Membranstrukturen in den subkutanen Raum thymusloser Mäuse implantiert. Thymuslose Mäuse können im Handel von Lieferanten, wie Jackson Laboratories aus Bar Harbor, ME, gekauft werden. Die Tiere wurden etwa zwei, vier und acht Wochen nach der Implantation geopfert, und die künstlichen Niereneinheitenvorstufen wurden gewonnen und analysiert.

[0136] Die gewonnenen Proben wurden mit Hematoxylin und Eosin grob und histologisch untersucht. Immunohistochemische Färbungen für Osteopontin, Fibronectin und alkalische Phosphatase wurden ausgeführt, um die Zelltypen und ihre Architektur in vivo zu bestimmen (**Fig. 5, 6, 7**). Menschliche monoklonale Fibronectin-Antikörper (Sigma, St. Louis, MO) wurden für die Fibronectinmatrix verwendet. Rhodamin-konjugiertes Ziegen-Antimaus (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) wurde als ein zweiter Antikörper verwendet. Ein immunozytochemisches Färben für Osteopontin (**Fig. 5**) wurde mit einem in unserem Labor erzeugten polyklonalen Antikörper ausgeführt. Antikörper wurden unter Verwendung von Standardprozeduren (Harlow and Lane, Antibodies a laboratory manual, 1988, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor) in neuseeländischen weißen Kaninchen erzeugt und bei einem Verdünnungsverhältnis von 1 : 5000 verwendet. Mit FITC (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) konjugierte Ziegen-Antikaninchen-Antikörper wurden als ein zweiter Antikörper verwendet. Es wurde ein immunohistochemisches Färben für alkalische Phosphatase unter Verwendung von Nitroblautetrazolium und 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (Sigma, St. Louis, MO) ausgeführt. Das von der Nierenprothese gesammelte Filtrat wies eine strohgelbe Farbe auf. Eine Analyse des Filtrats auf das Harnsäureniveau wurde unter Verwendung einer Harnsäure-Detektionsausrüstung (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO) ausgeführt.

[0137] Alle Tiere überlebten, bis sie geopfert wurden. Die gewonnenen Proben behielten ihre ursprüngliche Architektur. Die künstlichen Niereneinheitenvorstufen waren grob durch Empfängergewebe bedeckt. Das Fluid in der Nierenprothese wurde in den mit der Membran verbundenen Kathetern gesammelt. Die histologische Untersuchung der implantierten Nierenprothesen zeigte eine ausgeprägte Vaskularisierung, eine Bildung von Glomeruli (**Fig. 8**) und hochorganisierte tubulusartige Strukturen. Das immunozytochemische Färben mit Antiosteopontinantikörpern, die primär von proximalen und distalen Tubuluszellen abgeschieden werden, färbte die Tubulusabschnitte sicher. Das immunohistochemische Färben für alkalische Phosphatase färbte proximale

tubulusartige Strukturen sicher. Weiterhin wurde ein gleichmäßiges Färben für Fibronektin in der extrazellulären Matrix der neu gebildeten Tubuli beobachtet (**Fig. 6**). Das von der neu gebildeten Niereneinheit gesammelte gelbe Fluid enthielt 66 mg/dl Harnsäure, verglichen mit 2 mg/dl im Plasma, was darauf hinweist, daß diese Tubuli zu einer unidirektionalen Sekretion und Konzentration von Harnsäure in der Lage sind. Der Nachweis der Glomerulibildung, des histologischen Färbens und der Sekretion von Harnsäure weist darauf hin, daß sich die künstliche Niereneinheit vorstufe 7 Tage nach der Implantation zu einer ARU entwickelt hat.

Phenotypischer Vergleich zwischen Nierentubulusanalog und natürlichen Tubuli

[0138] Proximale Tubuluszellen der Niere sind würfelförmig. Sie enthalten einen zentral angeordneten runden bis ovalen Kern mit einem oder zwei ausgeprägten Nukleoli. Die apikale Fläche der Zelle ist zu langen, schmalen fingerartigen Mikrovilli geformt, die bei Tieren, wie der Ratte, Höhen von 1,3 mm erreichen und die apikale Oberfläche etwa um das 22Fache vergrößern. Dagegen enthält der distale gefaltete Tubulus gewöhnlich kurze, stoppelartige Mikrovilli auf seiner apikalen Fläche, und die sammelnden Tubuli weisen keinen Bürstensaum auf.

[0139] Die Zellen des Nierentubulusanalogons ähneln natürlichen Nierentubuli. Künstliche Nierentubuluszellen haben einen ausgeprägten Bürstensaum langer, schmaler Mikrovilli, die sich in Oberflächeneinstülpungen erstrecken. Die Dichte der Mikrovilli bei den kultivierten Zellen ist mit derjenigen vergleichbar, die bei proximalen Tubuluszellen in vivo vorgefunden wird. Die lateralen und basalen Grenzen der proximalen Zellen sind hochgradig unregelmäßig und weisen ausgeprägte Verzahnungen mit benachbarten Zellen ähnlich derjenigen auf, die bei kultivierten Zellen beobachtet werden.

[0140] Ein Merkmal proximaler Tubuluszellen ist das Vorhandensein großer Anzahlen von Lysosomen, Phagosomen und Peroxisomen, die auch in großen Anzahlen in kultivierten Zellen auftreten. Das Aufrechterhalten der Aktivitäten von alkalischer Phosphatase und Gammagutamytransferase, welche Markerenzyme für den Bürstensaum proximaler Tubuluszellen sind, über lange Kultivierungszeiträume bildet einen weiteren Beweis für die Identität und Integrität der künstlichen Nierentubuli.

[0141] Andere Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung werden Fachleuten beim Lesen der Beschreibung und durch die Anwendung der hier offenbarten Erfindung verständlich werden. Die Beschreibung und die Beispiele sollten nur als Beispiel angesehen werden, wobei der Schutzbereich der Erfindung durch die folgenden Ansprüche angegeben wird.

Patentansprüche

1. Nierenprothese mit wenigstens einer künstlichen Niereneinheit, wobei die künstliche Niereneinheit eine poröse Membranstruktur mit einer Außenfläche aufweist, die einen geschlossenen Innenraum mit wenigstens einem Abflußkanal eingrenzt,

dadurch gekennzeichnet, daß an der Außenfläche der porösen Membranstruktur mehrere Nephronanaloge angebracht sind, von denen jedes ein Nierentubulusanalog enthält, wobei das Nierentubulusanalog ein dreidimensionales Aggregat von Nierentubuluszellen mit einem Bürstensaum aufweist, der zum Kontaktieren von Empfängergerewebe konfiguriert ist, um die Ausbildung einer glomerulären Struktur und eines Lumens in Fluidkommunikation mit dem Innenraum der Membranstruktur zu bewirken.

2. Nierenprothese nach Anspruch 1, wobei die poröse Membranstruktur einen der folgenden Stoffe enthält: Celluloseether, Cellulose, Celluloseester, fluoriniertes Polyethylen, Poly-4-methylpenten, Polyacrylnitril, Polyamid, Polyamidimid, Polyacrylat, Polybenzoxazol, Polycarbonat, Polycyanarylether, Polyester, Polyestercarbonat, Polyether, Polyetheretherketon, Polyetherimid, Polyetherketon, Polyethersulfon, Polyethylen, Polyfluorolefin, Polyimide, Polyolefin, Polyoxadiazol, Polyphenylenoxid, Polyphenylensulfid, Polypropylen, Polystyren, Polysulfid, Polysulfon, Polytetrafluorethylen, Polythioether, Polytriazol, Polyurethan, Polyvinyl, Polyvinylidenfluorid, regenerierte Cellulose, Silicon, Urea-Formaldehyd, oder Copolymere oder physikalische Mischungen davon.

3. Nierenprothese nach Anspruch 1, wobei die poröse Membranstruktur ein biologisch abbaubares Material enthält.

4. Nierenprothese nach Anspruch 1, wobei die poröse Membranstruktur eine Porengröße aufweist, die den Durchtritt von Zellen verhindert und den Durchtritt von Fluid und Gas gestattet.

5. Nierenprothese nach Anspruch 1, wobei die poröse Membranstruktur Poren aufweist, deren Durchmesser zwischen etwa 0,04 µm und etwa 10 µm liegt.
6. Nierenprothese nach Anspruch 1, wobei die poröse Membranstruktur Poren aufweist, deren Durchmesser zwischen etwa 0,4 µm und etwa 4 µm liegt.
7. Nierenprothese nach Anspruch 1, wobei das Nierenzellenaggregat Säugetierzellen umfaßt.
8. Nierenprothese nach Anspruch 7, wobei die Säugetierzellen menschliche Zellen sind.
9. Nierenprothese nach Anspruch 1, wobei die Nierenprothese dazu ausgelegt ist, in vivo oder ex vivo zu funktionieren.
10. Nierenprothese nach Anspruch 1, wobei der Bürstensaum mehrere Mikrovilli auf der freien Oberfläche der Nierentubuluszellen aufweist.
11. Nierenprothese nach Anspruch 1, wobei die Zellenaggregate Osteopontin exprimieren und die Nierentubuluszellen in wenigstens einem Bereich des Aggregats alkalische Phosphatase exprimieren.
12. Nierenprothese nach Anspruch 1, wobei die Zellenaggregate Fibronectin exprimieren.
13. Nierenprothese nach Anspruch 1, wobei das Zellenaggregat in einer Periodsäure-Schiff-Färbungsanalyse positiv ist.
14. Nierenprothese nach Anspruch 1, wobei der Abflußkanal ein Nicht-Rückflußventil aufweist, das dazu angeordnet ist, den Eintritt von Fluiden in die poröse Membranstruktur zu verhindern.
15. Nierenprothese nach Anspruch 1, wobei der Abflußkanal ein semiporöses Membranventil aufweist, das eine Porengröße hat, die den Durchtritt von Mikroben verhindert und den Durchfluß von Fluid und Gas gestattet.
16. Künstliche Niereneinheit mit einer porösen Membranstruktur die eine Außenfläche aufweist, die einen geschlossenen Innenraum mit wenigstens einem Abflußkanal eingrenzt, dadurch gekennzeichnet, daß an der Außenfläche der porösen Membranstruktur mehrere Nephronanaloge angebracht sind, von denen jedes ein Nierentubulusanalog enthält, wobei das Nierentubulusanalog ein dreidimensionales Aggregat von Nierentubuluszellen mit einem Bürstensaum aufweist, der zum Kontaktieren von Empfängergewebe konfiguriert ist, um die Ausbildung einer glomerulären Struktur und eines Lumens in Fluidkommunikation mit dem Innenraum der Membranstruktur zu bewirken.
17. Künstliche Niereneinheit nach Anspruch 16, wobei die poröse Membranstruktur einen der folgenden Stoffe enthält: Celluloseether, Cellulose, Celluloseester, fluoriniertes Polyethylen, Poly-4-methylpenten, Polyacrylnitril, Polyamid, Polyamidimid, Polyacrylat, Polybenzoxazol, Polycarbonat, Polycyanarylether, Polyester, Polyestercarbonat, Polyether, Polyetheretherketon, Polyetherimid, Polyetherketon, Polyethersulfon, Polyethylen, Polyfluorolefin, Polyimide, Polyolefin, Polyoxadiazol, Polyphenylenoxid, Polyphenylensulfid, Polypropylen, Polystyren, Polysulfid, Polysulfon, Polytetrafluorethylen, Polythioether, Polytriazol, Polyurethan, Polyvinyl, Polyvinylidenfluorid, regenerierte Cellulose, Silicon, Urea-Formaldehyd, oder Copolymere oder physikalische Mischungen davon.
18. Künstliche Niereneinheit nach Anspruch 16, wobei die poröse Membranstruktur ein biologisch abbaubares Material enthält.
19. Künstliche Niereneinheit nach Anspruch 16, wobei die poröse Membranstruktur eine Porengröße aufweist, die den Durchtritt von Zellen verhindert und den Durchtritt von Fluid und Gas gestattet.
20. Künstliche Niereneinheit nach Anspruch 16, wobei die poröse Membranstruktur Poren aufweist, deren Durchmesser zwischen etwa 0,04 µm und etwa 10 µm liegt.
21. Künstliche Niereneinheit nach Anspruch 16, wobei die poröse Membranstruktur Poren aufweist, deren Durchmesser zwischen etwa 0,4 µm und etwa 4 µm liegt.

22. Künstliche Niereneinheit nach Anspruch 16, wobei das Nierenzellenaggregat Säugetierzellen umfaßt.
23. Künstliche Niereneinheit nach Anspruch 22, wobei die Säugetierzellen menschliche Zellen sind.
24. Künstliche Niereneinheit nach Anspruch 16, wobei der Bürstensaum mehrere Mikrovilli auf der freien Oberfläche der Nierentubuluszellen aufweist.
25. Künstliche Niereneinheit nach Anspruch 16, wobei die Zellenaggregate Osteopontin exprimieren und die Nierentubuluszellen in wenigstens einem Bereich des Aggregats alkalische Phosphatase exprimieren.
26. Künstliche Niereneinheit nach Anspruch 16, wobei das Zellenaggregat in einer Periodsäure-Schiff-Färbungsanalyse positiv ist.
27. Künstliche Niereneinheit nach Anspruch 16, wobei die künstliche Niereneinheit dazu ausgelegt ist, in vivo oder ex vivo zu funktionieren.
28. Künstliche Niereneinheit nach Anspruch 16, wobei die künstliche Niereneinheit dazu ausgelegt ist, Harnsäure in den eingeschlossenen Raum auszuscheiden.
29. Nephronanalog mit einem Nierentubulusanalog, wobei das Nierentubulusanalog an einer porösen Membranstruktur mit einer Außenfläche angebracht ist, die einen geschlossenen Innenraum mit wenigstens einem Abflußkanal eingrenzt, und das Nierentubulusanalog ein dreidimensionales Aggregat von Nierentubuluszellen mit einem Bürstensaum aufweist, der zum Kontaktieren von Empfängergerewebe konfiguriert ist, um die Ausbildung einer glomerulären Struktur und eines Lumens in Fluidkommunikation mit dem Innenraum der Membranstruktur zu bewirken.
30. Nephronanalog nach Anspruch 29, wobei die poröse Membranstruktur einen der folgenden Stoffe enthält: Celluloseether, Cellulose, Celluloseester, fluoriniertes Polyethylen, Poly-4-methylpenten, Polyacrylnitril, Polyamid, Polyamidimid, Polyacrylat, Polybenzoxazol, Polycarbonat, Polycyanarylether, Polyester, Polyester-carbonat, Polyether, Polyetheretherketon, Polyetherimid, Polyetherketon, Polyethersulfon, Polyethylen, Poly-fluorolefin, Polyimide, Polyolefin, Polyoxadiazol, Polyphenylenoxid, Polyphenylensulfid, Polypropylen, Polystyren, Polysulfid, Polysulfon, Polytetrafluorethylen, Polythioether, Polytriazol, Polyurethan, Polyvinyl, Polyvinylidenfluorid, regenerierte Cellulose, Silicon, Urea-Formaldehyd, oder Copolymere oder physikalische Mischungen davon.
31. Nephronanalog nach Anspruch 29, wobei die poröse Membranstruktur ein biologisch abbaubares Material enthält.
32. Nephronanalog nach Anspruch 29, wobei die poröse Membranstruktur eine Porengröße aufweist, die den Durchtritt von Zellen verhindert und den Durchtritt von Fluid und Gas gestattet.
33. Nephronanalog nach Anspruch 29, wobei die poröse Membranstruktur Poren aufweist, deren Durchmesser zwischen etwa 0,04 µm und etwa 10 µm liegt.
34. Nephronanalog nach Anspruch 29, wobei die poröse Membranstruktur Poren aufweist, deren Durchmesser zwischen etwa 0,4 µm und etwa 4 µm liegt.
35. Nephronanalog nach Anspruch 29, wobei das Nierenzellenaggregat Säugetierzellen umfaßt.
36. Nephronanalog nach Anspruch 35, wobei die Säugetierzellen menschliche Zellen sind.
37. Nephronanalog nach Anspruch 29, wobei der Bürstensaum mehrere Mikrovilli auf der freien Oberfläche der Nierentubuluszellen aufweist.
38. Nephronanalog nach Anspruch 29, wobei die Zellenaggregate Osteopontin exprimieren und die Nierentubuluszellen in wenigstens einem Bereich des Aggregats alkalische Phosphatase exprimieren.
39. Nephronanalog nach Anspruch 29, wobei das Zellenaggregat in einer Periodsäure-Schiff-Färbungsanalyse positiv ist.

40. Nephronanalog nach Anspruch 29, wobei die Säugetierzellen zum Ausscheiden von Harnsäure in den eingeschlossenen Raum ausgelegt sind.
41. Faltbare poröse Membranstruktur für eine Nierenprothese mit einer semipermeablen Membran aus einem biokompatiblen Polymer mit einer einen Innenraum eingrenzenden Außenfläche, wobei die Membranstruktur mehrere hohle Röhren in Fluid-Kommunikation mit einem Kopfteil und einem Abflußkanal, der eine Drainage des Innenraums gestattet, aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß an der Außenfläche der porösen Membranstruktur ein Nierentubulusanalog angebracht ist, das ein dreidimensionales Aggregat von Nierentubuluszellen mit einem Bürstensaum aufweist, der zum Kontaktieren von Empfängergerewebe konfiguriert ist, um die Ausbildung einer glomerulären Struktur und eines Lumens in Fluidkommunikation mit dem Innenraum der Membranstruktur zu bewirken.
42. Poröse Membranstruktur nach Anspruch 41, wobei die semipermeable Membran ein biologisch abbaubares Material enthält.
43. Poröse Membranstruktur nach Anspruch 41, wobei die semipermeable Membran eine Porengröße aufweist, die den Durchtritt von Zellen verhindert und den Durchtritt von Fluid und Gas gestattet.
44. Poröse Membranstruktur nach Anspruch 41, wobei die semipermeable Membran Poren aufweist, deren Durchmesser zwischen etwa 0,04 µm und etwa 10 µm liegt.
45. Poröse Membranstruktur nach Anspruch 41, wobei die semipermeable Membran Poren aufweist, deren Durchmesser zwischen etwa 0,4 µm und etwa 4 µm liegt.
46. Poröse Membranstruktur nach Anspruch 41, wobei die hohlen Röhren einen runden Querschnitt aufweisen.
47. Poröse Membranstruktur nach Anspruch 41 mit der Form eines Kreises, einer Einzelwicklung, einer Mehrfachwicklung, einer Spirale, eines Wulstes, einer Niere, einer Helix, einer Mehrfachhelix, eines Ovals, einer Ebene, einer U-Form, eines Quadrats oder Kombinationen davon.
48. Poröse Membranstruktur nach Anspruch 41, wobei der Abflußkanal ein Nicht-Rückflußventil aufweist, das dazu angeordnet ist, den Eintritt von Fluiden in die poröse Membranstruktur zu verhindern.
49. Poröse Membranstruktur nach Anspruch 41, wobei der Abflußkanal ein semiporöses Membranventil aufweist, das eine Porengröße hat, die den Durchtritt von Mikroben verhindert und den Durchfluß von Fluid und Gas gestattet.
50. Poröse Membranstruktur nach Anspruch 41, ferner mit einem äußeren Gehäuse zum Schutz der porösen Membranstruktur vor mechanischer Schädigung.
51. Poröse Membranstruktur nach Anspruch 41, ferner mit einem Zuflußkanal.
52. Poröse Membranstruktur nach Anspruch 41, ferner mit einer Einrichtung zum Sammeln und Speichern von Abflüssen aus dem Abflußkanal.
53. Verfahren zum Herstellen eines Nierentubulusanalog, wobei:
 - a) Nierengewebe durch enzymatische Behandlung dissoziiert wird, um eine Zellsuspension zu bilden;
 - b) die Nierenzellsuspension in vitro kultiviert wird;
 - c) eine eingeschlossene poröse Membranstruktur mit extrazellulärem Matrixprotein behandelt wird; und
 - d) die Nierenzellen an der behandelten Außenfläche der eingeschlossenen porösen Membran kultiviert werden, um Nierentubulusanaloge zu bilden, wobei die Nierentubulusanaloge dreidimensionale Zellaggregate von Nierentubuluszellen enthalten, die Lumen innerhalb der Aggregate aufweisen, und wobei die Tubuluszellen einen Bürstensaum bilden.
54. Verfahren nach Anspruch 53, wobei das extrazelluläre Matrixprotein Kollagen aufweist.
55. Verfahren nach Anspruch 54, wobei das Kollagen Rattenschwanzkollagen ist.
56. Verfahren nach Anspruch 53, wobei der Bürstensaum mehrere Mikrovilli an der freien Oberfläche der

Nierentubuluszellen aufweist.

57. Verfahren nach Anspruch 53, wobei die Zellenaggregate Osteopontin exprimieren und die Nierentubuluszellen in wenigstens einem Bereich des Aggregats alkalische Phosphatase exprimieren.

58. Verfahren nach Anspruch 53, wobei das Zellenaggregat in einer Periodsäure-Schiff-Färbungsanalyse positiv ist.

59. Verfahren zum Messen der Wirkung einer Substanz auf Nierentubulusanalogzellen, wobei:

- a) die Substanz mit einer Nierentubulusanalog-Zellenkultur kontaktiert wird, wobei die Nierentubulusanaloge dreidimensionale Zellaggregate von Nierentubuluszellen aufweisen, die an einer porösen Membran angebracht sind, die Lumen innerhalb der Aggregate enthält, wobei die Tubuluszellen einen Bürstensaum bilden; und
- b) die Wirkungen der Substanz auf die Nierenzellen bestimmt werden.

60. Verfahren nach Anspruch 59, wobei die Substanz in einem Medikament, einem Arzneimittel oder einer Mikrobe besteht.

61. Verfahren nach Anspruch 59, wobei der Bürstensaum mehrere Mikrovilli auf der freien Oberfläche der Nierentubuluszellen aufweist.

62. Verfahren nach Anspruch 59, wobei die Zellenaggregate Osteopontin exprimieren und die Nierentubuluszellen in wenigstens einem Bereich des Aggregats alkalische Phosphatase exprimieren.

63. Verfahren nach Anspruch 59, wobei das Zellenaggregat in einer Periodsäure-Schiff-Färbungsanalyse positiv ist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

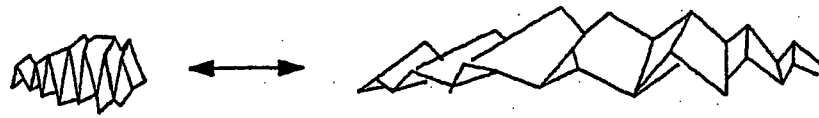


FIG. IA

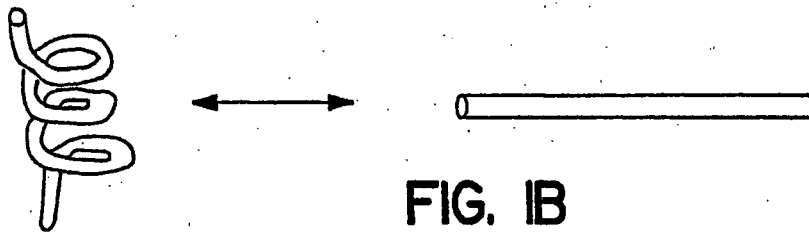


FIG. IB

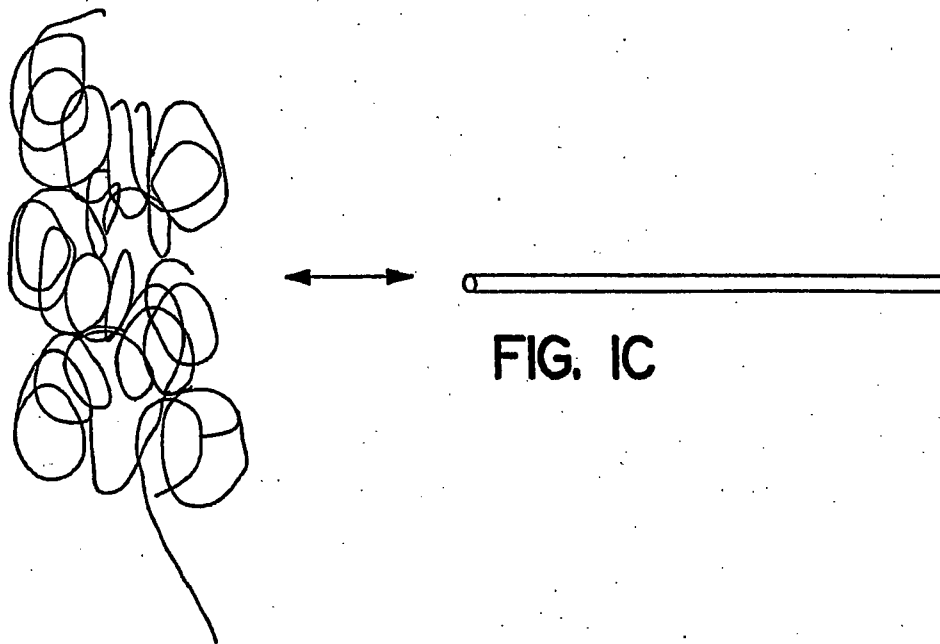


FIG. IC

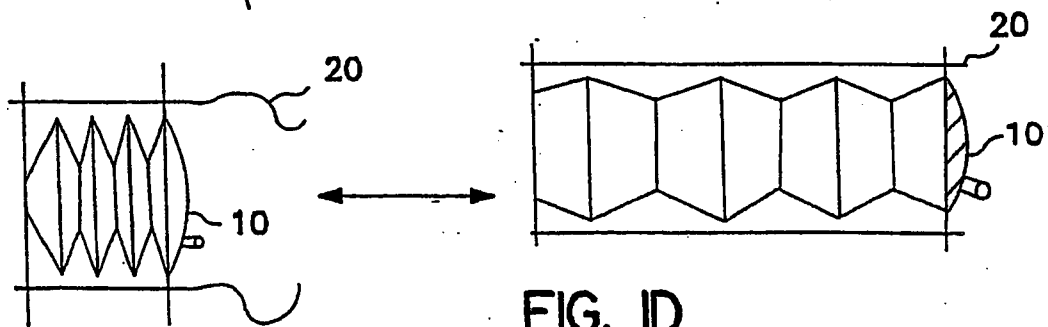


FIG. ID

FIG. 2A

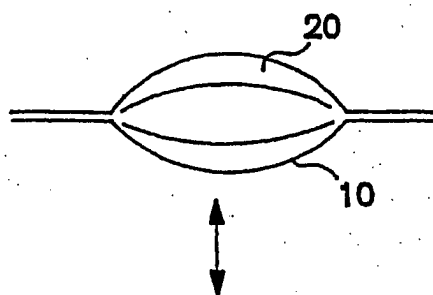


FIG. 2B

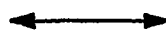
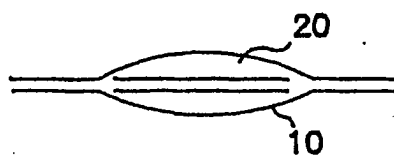
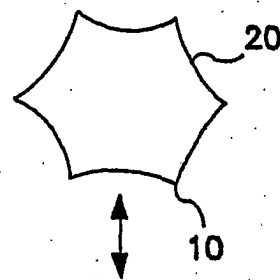


FIG. 2C

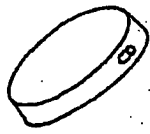


FIG. 3A

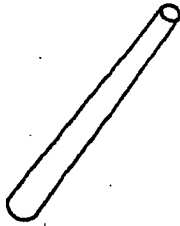


FIG. 3B

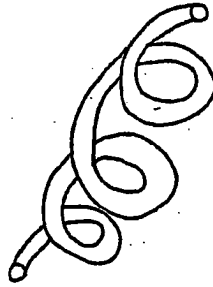


FIG. 3C

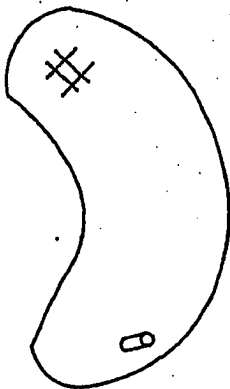


FIG. 3D



FIG. 3E

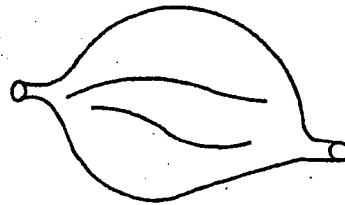


FIG. 3F

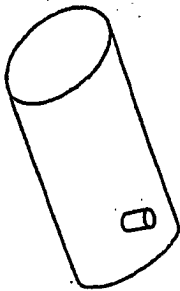


FIG. 3G

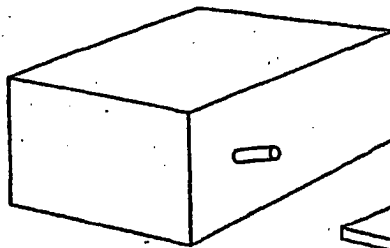


FIG. 3H

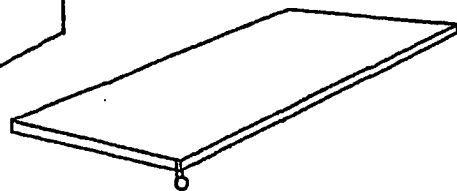


FIG. 3I

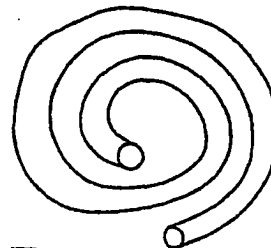


FIG. 3J

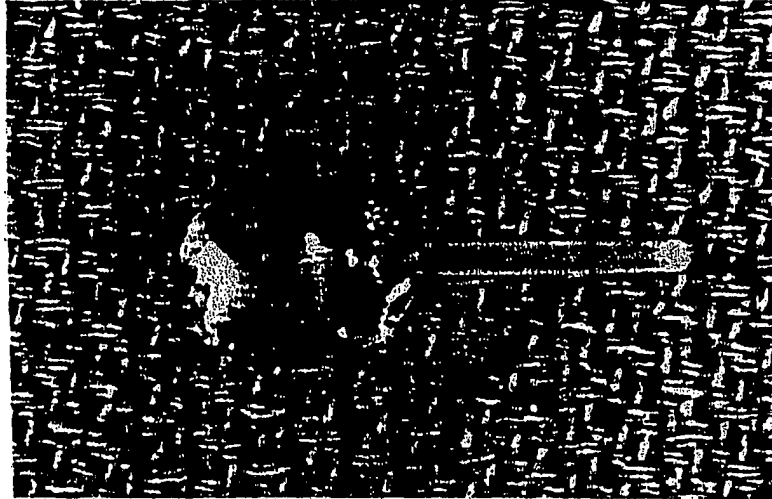


FIG. 4



FIG. 5



FIG. 6

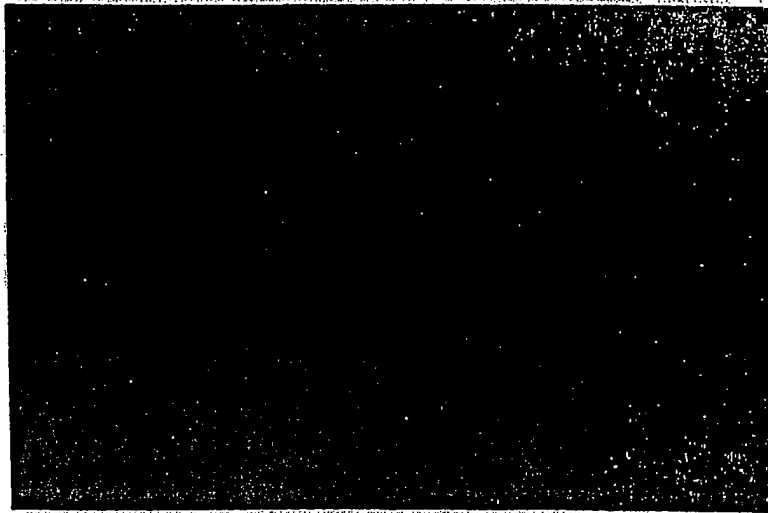


FIG. 7A

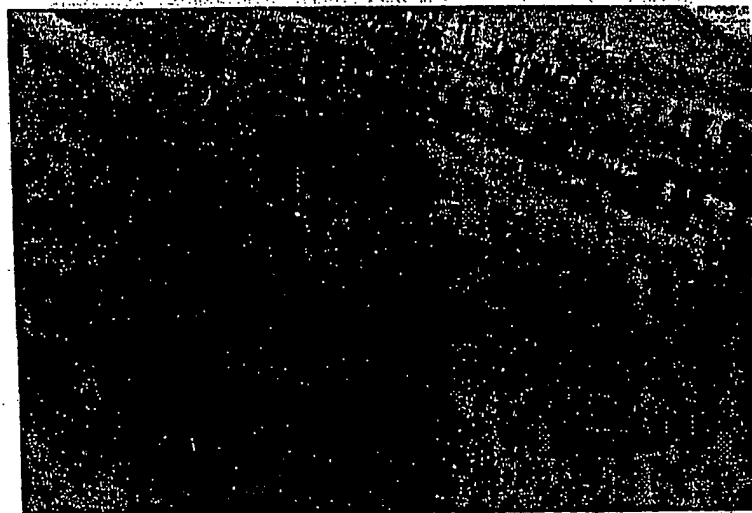


FIG. 7B

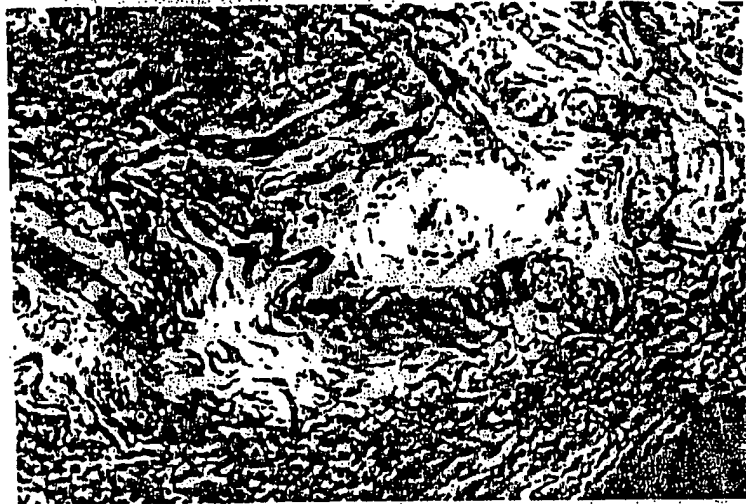


FIG. 8A

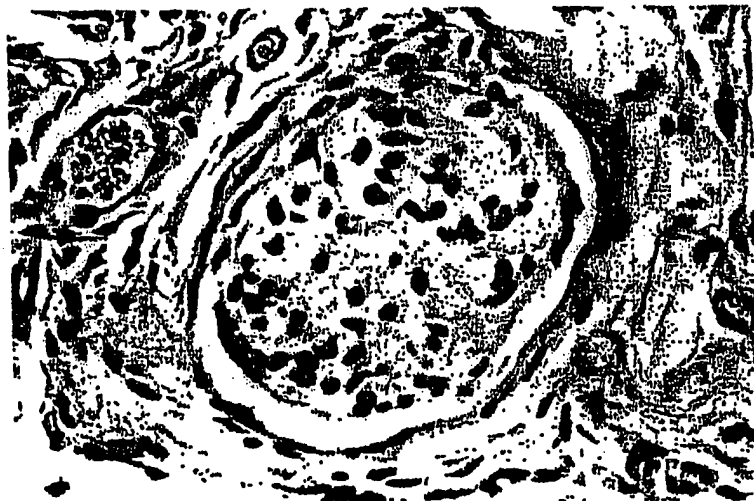


FIG. 8B