

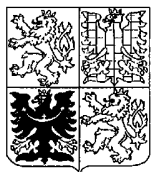
PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 4123

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.05.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.05.1997 16.12.1997
23.04.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/19721352 1997/19755801
1998/19818098**

(33) Země priority: **DE DE DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.02.2000**
(Věstník č. 2/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP98/02753**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/52619**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 L 27/00

C 07 K 17/06

(71) Přihlašovatel:

MERCK PATENT GMBH, Darmstadt, DE;

(72) Původce:

**Kessler Horst, Garching, DE;
Finsinger Dirk, Garching, DE;
Jonczyk Alfred, Darmstadt, DE;
Meyer Jörg, Egelsbach, DE;
Nies Berthold, Fränkisch-Crumbach, DE;
Kantlehner Martin, Freising, DE;**

(74) Zástupce:

**Hořejš Milan Dr. Ing., Národní 32, Praha 1,
110 00;**

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Peptidem povlečené implantáty a způsob
jejich přípravy**

(57) Anotace:

**Způsob biologické funkcionalizace biomateriálů, zejména
implantátů povlákáním na míru syntetizovanými peptidy RGD
selektivními pro buňky nebo tkáň, které stimulují in vitro adhezi
hlavně buněčných druhů určených k dosažení tkáňové integrace
odpovídajícího biomateriálu.**

01-2337-99-Ho

Peptidem povlečené implantáty a způsob jejich přípravy

Oblast techniky

Vynález se týká implantátů obecné povahy pro lidské a zvířecí tělo, které jsou povlečeny peptidy umožňujícími selektivní zprostředkování adheze specifických buněk v určitém prostředí implantátu. Zvláště se vynález se týká implantátů povlečených peptidy RGD a způsobu jejich přípravy.

Vynález je založen na principu cílené stimulace adheze vybraných typů buněk na povrchové povlaky biomateriálů obecně a na implantátů zvláště pro účely jejich tkáňově selektivní, urychlené a podpořené integrace po chirurgickém začlenění do vhodné tkáně.

Způsobem podle vynálezu různé povrchové části implantátu se mohou povléknout a stát dosažitelnými pro různé peptidy zprostředkovávající adhezi buněk, zvláště pro peptidy RGD, které zohledňují specifické tkáňové prostředí, do kterého se implantáty včleňují.

Nadto je tímto způsobem tkáňového inženýrství umožněna generace "inteligentních" biohybridních orgánů, které nesou biologickou informaci pro regeneraci orgánu spontánní organizací pomocí specifické aktivace různých druhů buněk různými peptidy v různých oblastech povrchu implantátu.

Dosavadní stav techniky

Výrazem "peptidy podle vynálezu" se zde vždy míní, pokud není uvedeno jinak, všechny peptidy, které jsou schopny zprostředkovávat adhezi buněk. Z těchto všech peptidů se při-

pomínají zvláště peptidy, které obsahují následně aminokyseliny arginin (R), glycin (G) a kyselinu asparagovou (D) (peptidy RGD). Příklady vhodných RGD peptidů a vhodných peptidů, které neobsahují RGD, jsou dále uvedeny. Kromě toho jsou zahrnuty odpovídající peptidy, které neobsahují sekvenci RGD, nicméně však ovlivňují adhezi buněk. V nejširším slova smyslu zahrnuje vynález také nepeptidové sloučeniny, které mají kvalitativně stejnou biologickou účinnost jako uvedené peptidové sloučeniny.

Výrazem "biomateriály nebo implantáty" se zde vždy míní materiály, které se mohou zavádět do lidského nebo do živočišného těla k obnovení funkce odpovídající funkčnosti poškozené přírodní tkáně. Míní se například kyčelní endoprotézy, umělé kolenní klouby, čelistní implantáty, šlachové náhrady, náhrady kůže, vaskulární protézy, kardiostimulátory, umělé srdční chlopně, prsní implantáty, stenty, katethery a umělé cesty pro odklonění tekutiny.

Integrační chování implantátů v těle je vždy problematické. Integrace tkáně materiálů často postupuje příliš pomalu a příliš nedokonale, aby se dosahovalo mechanické stability vazby tkáň/biomateriál, která by byla dostatečná pro funkčnost. Je to často způsobeno kompozicí povrchu implantátu, který v důsledku své nepřiměřené kompatibility na styčné ploše nebo biokompatibility brání aktivní absorpci okolní zdravé tkáně nebo buněk. To komplikuje vytváření stabilní vazné vrstvy mezi tkání a implantátem, což vede k nepřiměřené integraci tkáně, což způsobuje uvolňování, resorpci tkáně, infekce, záněty, alergie a k vytváření mikrothrombů (restenózy). Následkem je revize intervenční náhrady implantátů (například kyčelní endoprotézy, čelistních implantátů, kateterů nebo externích fixátorů) a tak se stávají nutnými nové chirurgické zákroky. (Malchau a Herberts, 1996, Prognosis of the Total Hip Arthroplasty, 63, Annual Meeting of the American Academy of the Orthopaedic Surgeons, Atlanta; Haddad a kol., The Journal of Bone

and Joint Surgery, 78-B, str. 546 až 549, 1996; Collinge a kol., 1996, Pin Tract Infections).

Kromě toho zvláště v případě kyčelních endoprotéz se jeví tak zvané aseptické uvolňování implantátu jako problematické, přičemž kostní buňky a tedy kostní tkáň nevytvářejí přímý spoj s biomateriálem, jak je žádoucí, nábrž fibroblasty a spojovací tkáně se vyskytují jako rušící prvky. Následkem toho je protéza vázána na pojivovou tkáň místo na kostní tkáň, stabilita vazby protéza/pojivová tkáň není přiměřená pro splnění mechanických požadavků na násilnou transmisi umělého kyčelního kloubu. Tím může docházet k uvoňování protézy (Pilliar a kol., Clin. Orthop. 208, str. 108 až 113, 1986) a k pravděpodobné nutnosti revize zákroku. Dalším příkladem nežádoucích buněčných typů, ulpělých na implantátátech, jsou krevní destičky, které mohou vést k vytáření mikrothrombů a tak ke zhoršení integrace implantátu (Phillips a kol., Cell 65, str. 359, 1991).

Nedostatečná integrovatelnost biomateriálů nebo implantátů do těla má obzvláště závažné důsledky v případě kompletně nahrazených orgánů, jelikož v tomto případě různé typy buněk přicházejí do styku s implantátem a má být cílem nutná integrovatelnost. Aby bylo možno vyhnout se extrémně komplikovaným transplantačním procedurám za pomoci jiných pacientů je například snaha provádět terapii funkčního selhání jater, pankreatu, ledvin a sleziny stále častěji a častěji v oboru tkáňového inženýrství prostřednictvím tak zvaných biohybridních orgánů, které sestávají z nosičových materiálů, které jsou pokryty živými buňkami a mohou se implantovat jako funkční jednotka. Ve většině případů se živé buňky začleňují nebo zapouzdřují in vitro do resorbovatelných nebo neresorbovatelných membrán a transplantují se pacientovi jako umělé biohybridní orgány nebo duté orgány (například Lim a kol., Science, 210, str. 908 až 912, 1980; Altman a kol., Horm. Met. Res. Suppl. 12, str. 43 až 45, 1982; Zekorn a kol., Transplantation Proceed-

dings 21, str. 2748 až 2750, 1989; evropský patentový spis číslo EP O 504781 B1). Avšak takto v tomto případě popsáno mnoho problémů tkáňového zapouzdření spojeného s nedostatečným dodáváním živin transplantátu, s imunologickými obrannými reakcemi v důsledku uvolňování buněk z kapslí a s vytvářením shluků krve v důsledku trombogenicity povrchů materiálu, přičemž k těmto potížím dochází velmi často.

Je známá stimulace integrace tkáně mezi biometariálem a implantáty jejich povlečením peptidy, které zprostředkovávají adhezi buněk. Pro tento účel přicházejí v úvahu jednak peptidy, které obsahují tripeptidovou aminokyselinovou sekvenci arginin, glycin, asparagová kyselina (RGD) nebo jejich nepeptidové analogy a na druhé straně peptidy prosté RGD zprostředkující adhezi buněk (například dále uvedené) nebo jejich nepeptidové analogy, o nichž je známo, že jsou integrálními složkami mnoha proteinů, například extracelulárních matric (například typ kolagenu I, fibronectin, laminin, vitronectin, entaktin, osteopontin, thrombospondin) nebo funkce kaskády krevního srážení (fibrinogen, Willebrandův faktor) jako centrálního rozlišovacího modelu pro adhezi eukaryotických buněk (například Pierschbacher a Ruoslahti, Nature 309, str. 30 až 33, 1984; Yamada, J. Biol. Chem. 266, str. 12809 až 12812, 1991). Sekvence definované podle vynálezu jsou rozpoznány a vázány příslušnými receptory na povrch buněk na integriny. Jelikož adheze buněk k odpovídajícím proteinům je zprostředkovávána velkým počtem různých integrinů, je integrinový expresivní model druhů buněk rozhodující pro jejich adhezivní vlastnosti k těmto proteinům. Konstrukce na míru a syntéza většiny peptidů s krátkým řetězcem, vybavených vhodnými sekvencemi, které se mohou vázat selektivně a specificky jen na určité integriny, umožňuje cílenou aktivaci pouze takových druhů buněk, které expresují tyto integriny. Proto například jsou známy RGD peptidy, které se selektivně váží na α_v -integrinové receptory a tak jsou výhodně schopné stimulovat vázání (adhezi) $\alpha_v\beta_3$ /

$\alpha_v\beta_3$ nesoucích buněk (osteoblasty, osteopklysty, endothelové buňky) bez současné schopnosti stimulovat adhezi nežádoucích druhů buněk například $\alpha_{IIb}\beta_3$ -nesoucích krevních destiček (Haubner a kol., Am. Chem. Soc. 118, str. 7461, 1996, 7,). Na rozdíl od toho jiné peptidy RGD vykazují opačný jev a přednostně se váží na $\alpha_{IIb}\beta_3$ -integrinové receptory a tak inhibují selektivitu například pro krevní destičky (Phillips a kol., Cell 95, str. 359, 1991).

Vybavení povrchů implantátu synteticky dostupnými peptidy definovanými podle vynálezu je známé. V tomto případě se peptidy váží na povrch ve větší nebo v menší míře adsorpcí nebo kovalentní vazbou. V německém patentovém spise číslo DE 1 97 06 667 se například popisují biomateriály, které jsou příbuzné materiálům k náhradě kosti, které jsou založeny na porézním polymerním materiálu, jehož povrch je pokryt peptidy s RGD aminokyselinovou sekvencí nanesenými adsorpcí. Ve světovém patentovém spise číslo WO91/05036 se dále popisují kovové protézy, zvláště z titanu nebo ze slitin titanu, na jejichž povrchu jsou kovalentně vázány peptidy, které kromě jiného mají RGD aminokyselinovou sekvenci. Valentini a kol. (Transactions of 23rd Annual Meeting of the Society for Biomaterials, New Orleans, Sp. st. a. květen 1997) popisuje kovalentní vazbu peptidů RGD na titanové šrouby vybavené fluorovanou ehtylenpropylenovou mezivrstvou. Rezanía a kol., popisuje na témže mítingu povrchy oxidu křemičitého nebo oxidu titaničitého vázané kovalentní vazbou s aminoskupinami organosilanů a kovalentně prostřednictvím heterobifunkčních zesíťujících činidel vázajících thiol obsahující peptidy RGD.

Tato technická řešení však nesplňují požadavek, aby implantáty nebo biomateriály, jejichž povrchy jsou povlečeny specificky peptidy definovanými podle vynálezu, byly selektivně přizpůsobeny pro určité typu buněk sousedních tkání, pro které je implantát určen.

Je proto žádoucí umožnit modifikaci biomateriálů takovým způsobem, aby specificky tkáň nebo druhy buněk, které také po včlenění implantátu do těla, s ním mají aktivně působit, například kostní buňky v kyčelních endoprotézách nebo epitelové buňky při náhradě kůže, vlasů nebo zubů, byly uspořádány výlučně nebo přednostně pro tkáňovou integraci, přičemž by se současně předcházelo selektivně vzájemnému působení buněčných druhů, které překáží těmto procesům, například krevních destiček nebo fibroblastů, které podporují vytváření mikrothrombů nebo váčků spojovacích tkání.

Kromě toho je žádoucí a přitažlivou strategií povlékat implantáty peptidy podle vynálezu (nebo jejich nepeptidovými analogy), které výlučně nebo alespoň přednostně stimulují adhezi těchto vybraných buněčných typů, které mají odpovídající komplementární integriny, což vede k urychlování in vivo syntézy odpovídající vybrané tkáně.

Se zřetelem na vývoj kompletních biohybridních orgánů (kůže, krevních cév, močových cest, močového měchýře, oesofagů, slinivky, jater, sleziny, ledvin) by bylo rozhodujícím přístupem umožnit aktivaci žádaných buněčných druhů v každém případě pro určitý orgán povlékáním různými pro buňku selektivními peptidy podle vynálezu cíleným, prostorově definovaným a koordinovaným způsobem pro provádění různých buněčných procesů in vivo.

Vynález se týká možnosti biofunkcionalizace biomateriálů zvláště implantátů pro všechny možné orgány povlékáním syntetizovanými pro buňky nebo pro tkáně selektivními peptidy RGD podle vynálezu, které in vitro simulují adhezi hlavně buněčných druhů, které v každém případě mají přispívat tkáňové integraci odpovídajícího biomateriálu a které současně in vitro nestimulují adhezi převážně takových buněčných druhů, které brání takovému procesu. Použitím takových povlaků se

může dosahovat urychlené a podporované integrace různých biomateriálů/implantátů se zlepšenou dlouhodobou stabilitou jejich začlenění do těla.

Kromě toho tento záměr povlékání povrchových částí různých materiálů implantátu různými peptidy podle vynálezu umožňuje existenci vývoje "inteligentních" biohybridních orgánů ("tkáňové inženýrství"), které mohou nést biologickou informaci pro selektivní aktivaci různých cílových tkání nebo cílových buněk a tak se integrovat do těla spontánní organizací a tímto způsobem podporovat tkáňovou integraci nebo ji mohou umožňovat pro první dobu.

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je implantát vhodný pro různé lidské a zvířecí orgány, sestávající v podstatě z nosičové matrice a z peptidového povlaku této matrice, který obsahuje stejné nebo odlišné peptidy pro cílenou adhezní stimulaci buněk lidského nebo zvířecího těla, které mají sekvence rozpoznávající vazebná místa na integrinových receptorech zodpovědných za adhezi na buňkách lidského nebo zvířecího těla, přičemž nosičová matrice má reaktivní skupiny schopné vazby na svůj povrch, které jsou schopny vstupovat do stálých kovalentních vazeb se vhodnými funkčními reaktivními skupinami peptidové vrstvy, spočívající v tom, že peptidy jsou uspořádány na povrchu implantátu tak, že na základě své odpovídající rozličné, strukturně podmíněné adhezi buněk stimulující aktivity odpovídají specificky přirozeně odlišnému komplementárnímu integrinovému modelu tkáňových buněk s nimi sousedících v určité oblasti, do které má být implantát začleněn prostřednictvím místně odlišného, selektivního, bioaktivního povlakového modelu povrchu implantátu.

Vynález se také týká způsobu přípravy implantátů vhod-

ných orgánů/tkáně na základě anorganické nosičové matrice, která má povlak z peptidů stimulujících adhezi buněk, přičemž peptidy jsou selektivní se zřetelem na komplementární integrinové modely tkáňových buněk bezprostředně sousedících s implantátem, který podle vynálezu spočívá v tom, že

- i) integrinová receptorová struktura cílových buněk tkáně, do které se má implantát začlenit in vivo, se stanovuje testovacím systémem in vitro,
- ii) selektují a syntetizují se peptidy mající vhodnou komplementární strukturu,
- iii) peptidy se kovalentně váží na příslušný, popřípadě modifikovaný povrch implantátu přímo nebo prostřednictvím zakončujících molekul, přičemž lokální uspořádání různých peptidů na povrchu implantátu odpovídá určitému předem stanovenému lokálnímu uspořádání cílových buněk majících komplementární integrinový model, do kterého se implantát začleňuje.

Zvláště se vynález týká způsobů a implantátů/biomateriálů majících tyto charakteristiky: peptidy a zvláště peptidy RGD se váží na povrch implantátu kovalentní vazbou, popřípadě prostřednictvím rozvětvených molekul se zvětšným povrchem a/nebo molekulových kotev; používá se s výhodou RGD peptidů, které stimulují $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ -nesoucí buňky, zvláště adhezi osteoblastů, osteoklastů, endotelových buněk a zároveň jsou schopny nestimulovat adhezi krevních destiček nebo fibroblastů; používané nosičové matrice jsou tvarované nebo netvarované díly z keramiky, plastu nebo kovu nebo biohybridní orgány nebo duté orgány.

Na molekulární úrovni peptidy podle vynálezu mají v podstatě následující složky:

- aminokyselinou sekvenci nesoucí doménu příslušnou pro adhezi (například zmíněnou RGD sekvenci) která selektivně rozpoznává a váže vybrané druhy buněk),

- mezerník pro buňky rozpoznávající a rozpoznané sekvence nesooucí doménu buňkám tak, aby vázání buněk bylo možné ze sterického hlediska,
- molekulární kotvu, která umožňuje stabilní vázání derivátu peptidu uvažovaného jako povrch biomateriálu nebo implantátu,
- popřípadě se adheze buněk může zvýšit přidavnou kopulací peptidů, definovaných podle vynálezu, na rozvětvenou molekulární strukturu (tak zvané dendrimér nebo Tentakely), které vykazují jev rozšiřování povrchu před vázáním na povrch biomateriálu.

Povrchem biomateriálu nebo implantátu se zde vždy míní nejen bezprostřední povrch nosičové matrice, avšak také přídavný povlak, kterým mohou být například polymerní materiály, přírodní nebo umělé kostní materiály, proteiny nebo deriváty proteinů.

Vhodnými nosičovými matricemi jsou zvláštní keramické, plastové nebo kovové materiály (například PMMA) nebo s výhodou resorbovatelné kostní náhradní materiály. Resorbovatelné nebo biologicky odbouratelné materiály se připravují například z polylaktidů, zvláště z racemických D, L polylaktidových sloučenin nebo z resorbovatelného fosfátu vápenatého nebo z hydroxyapatitových směsí, které mohou přispívat k obnovení přibližně původního stavu tkáně a které jsou popsány například ve světovém patentovém spise číslo WO 96/36562 nebo v evropském patentovém spise číslo EP O 543765, a jsou zvláště vhodné. V závislosti na oboru použití mohou být také vhodné jako nosičové matrice kolagen nebo agar.

Výrazem "biohybridní orgán" se zde vždy míní obvykle anorganická matrice, na které jsou naloženy nebo se kterou jsou vázány živé buňky jakýmkoliv způsobem (jak shora uvedeno). Podle vynálezu se tímto výrazem také míní odpovídající uspořádání, které je prosté buněk a obsahuje pouze odpovídající pepti-

dy různých typů podle vynálezu na různém povrchu částí implantátu, které po vložení do vadné tkáně jsou selektivně schopné aktivovat obklopující buňky. Výhodou takových buněčných biohybridních orgánů je "intelligence" biokompabilitních implantátů, které se mohou vyrábět cenově účinně a říditelným způsobem nesou biologickou informaci pro regeneraci orgánu. Integrací takových biohybridních orgánů do těla se může předcházet endogenním regeneračním procesům, jejichž prostřednictvím dochází často k imunologickým obranným reakcím například v důsledku implantovaných cizích buněk nebo cizích proteinů.

Podle vynálezu jsou implantáty zpravidla obsaženy jako tvarované těleso nebo protézy, přičemž jsou tvarovány podle určité defektní tkáně nebo kosti. V případě biohybridních orgánů mohou být protézami pouhé membrány nebo filmy povlečené odpovídajícími buňkami nebo prosté buněk a peptidy podle vynálezu nebo jejich uspořádání, popsané například v evropském patentovém spise číslo EP O 504781.

Jakožto vhodné peptidy, kterých se může používat podle vynálezu, se uvádějí všechny peptidy a jejich sloučeniny mající nepeptidové substituenty, které obsahují doménu nebo aminokyselinovou sekvenci zodpovědnou za adhezi buněk a které se mohou vázat na povrch implantátu prostřednictvím svých peptidových nebo nepeptidových substituentů. Obzvláště možnými odpovídajícími peptidy jsou peptidy se sekvencí RGD.

Následující seznam výhodných peptidů a peptidových sloučenin je míněn pouze příkladně bez záměru na jakémkoliv omezení. Používané zkratky mají následující význam:

Asp (D)	asparagová kyselina
Gly (G)	glycin
Arg (R)	arginin
Tyr (Y)	tyrosin

Ser (S)	serin
Phe (F)	fenylalanin
Lys (K)	lysin
DPhe (f)	D-fenylalanin
Pro (P)	prolin
Leu (L)	leucin
Ile (I)	isoleucin
Val (V)	valin
Glu (E)	glutamová kyselina
Thre (T)	threonin
Ala(A)	alanin

a) Příklady vhodných peptidů obsahujících RGD

RGD	(Arg-Gly-Asp),
GRGD	(Gly-Arg-Gly-Asp),
GRGDY	(Gly-Arg-Gly-Asp-Tyr),
RGDS	(Arg-Gly-Asp-Ser),
GRGDS	(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser),
RGDF	(Arg-Gly-Asp-Phe),
GRGDF	(Gly-Arg-Gly-Asp-Phe),
cyklo-RGDfK	(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lysin),
cyklo-RGDfKG	(Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys-Gly).

b) Příklady vhodných peptidů neobsahujících RGD

LDV	(Leu-Asp-Val),
LGTIPG	(Leu-Gly-Thr-Ile-Pro-Gly),
REDV	(Arg-Glu-Asp-Val),
IKVAV	(Ile-Lys-VAL-Ala-Val),
YIGSRG	(Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-Gly),
LRE	(Leu-Arg-Glu),
PDSGR	(Pro-Asp-Ser-Gly-Arg),
DGEA	(Asp-Gly-Glu-Ala),
RYVVLPR	(Arg-Tyr-Val-Val-Leu-Pro-Arg).

Peptidy podle vynálezu mohou být lineární nebo cyklické.

Shora uvedené peptidy a peptidové sekvence mohou být také v delších peptidech, majících v závislosti na peptidu podle vynálezu vybrané aminokyseliny v počtu přibližně celkem 4 až 20. Podobně vynález také zahrnuje aminokyseliny, mající D nebo L konfiguraci, nebo které jsou alkylovány na atomu uhlíku a/nebo dusíku. Cyklickými peptidy se podle vynálezu míní peptidy, které jsou uzavřeny do formy kruhu amidovou vazbou, které s výhodou v molekule neobsahují žádné volné karboxylové skupiny nebo aminoskupiny. Peptidy RGD podle vynálezu jsou zvláště výhodné, zvláště peptidy podle shora uvedeného seznamu a především pentapeptid RGDfK, který ve své cyklické formě je popsán v německém patentovém spise číslo DE-A-1 95 38 741 a je specifický pro osteoblasty a také hexapeptid RGDfKG, který je podobně v cyklické formě a je specifický pro trombocyty.

Odpovídající lineární a cyklické peptidy podle vynálezu jsou popsány například v následujících patentových spisech číslo: EP O 632053, EP O 655462, EP O 578083, EP O 770622 a DE 1 95 38 741. Zvláště jsou vhodnými peptidy, které se váží selektivně na druhy $\alpha_v\beta_3$ -/ $\alpha_v\beta_5$ -integrin expresující buňky (například osteoblasty, osteoklasty, endothelové buňky) bez současného vázání například na druhy $\alpha_1\beta_3$ nesoucí buňky (například krevní destičky). Peptidy a jejich odpovídající deriváty se mohou snadno připravovat o sobě známými způsoby, pokud nejsou dosažitelné jinou cestou.

V zásadě se peptidy podle vynálezu mohou vázat na povrch biomateriálu adsorpcí nebo kovalentní vazbou. Adsorpce je méně vhodná, pokud se používá různých peptidů na jeden a tentýž implantát, jelikož lokálně selektivně odlišný povlak povrchu podle vynálezu se může uskutečnit méně uspokojivě tímto způsobem.

Kopulace peptidů nebo jejich nepeptidových analogů na povrch nosiče kovalentní vazbou hlavně tak zvaným molekulovým

zakotvením je jako taková přiměřená a popsal ji například Singer a kol. (J. Cell Biol. 104, str. 573, 1987); Brandley, Schnaar (Develop. Biol. 135, str. 74, 1989); Massia, Hubbell (Anal. Biochem. 187, str. 292, 1990); Hirano a kol., (J. Biomed. Mat. Res. 25, str. 1523, 1991; Lin a kol. (Biomaterials 13, str. 905, 1992; Nicol a kol. (J. Biomed. Mat. Res. 26, str. 393, 1992); (Dee a kol. (Tissue Engin. 1, str. 135, 1995) aniž avšak v tomto případě povlak implantátů byl získán obecně a zejména jakýmkoliv způsobem.

Vynález se tedy týká nových aplikací způsobů povlékání o sobě známých pro přípravu implantátů podle vynálezu například způsobu "Kevloc^R" (evropský patentový spis číslo EP O 712621), kterého se po prvé používá podle vynálezu pro kopulaci shora uvedených peptidů (nebo jejich nepeptidových analogů) pro povrchy, které obsahují akryloylové nebo methakryloylové kotvící složky nebo způsobu "Silicoater^R" (německý patentový spis číslo DE-A 42 25 106), kterého se používá podle vynálezu pro kopulaci odpovídajících peptidů prostřednictvím akryloylových nebo methakryloylových kotvících složek zpravidla prostřednictvím mezivrstvy akryloyl/methakryloylsilanového derivátu (například 3-metakryloxypropyltrimethoxysilanové vrstvy) na odpovídající nosičové matrice. Další možností vázání peptidů podle vynálezu na povrch nosičové matrice nebo implantátu je obdobné použití silanizačního procesu, jako je popsán v německém patentovém spise číslo DE-A 43 21005, původně vyvinutém pro nanášení povlaků s perleťovými pigmenty povlakovými systémy na vodné bázi na kovy a plasty v automobilovém průmyslu a v průmyslu plastů. Rovněž je podle vynálezu vhodný způsob pro povlékání zlatých povrchů peptidy majícími thiolové skupiny, který byl původně popsán v jiné slouvislosti (Heuvel a kol., Analytical Biochem. 215, str. 223, 1993).

Dosud známých způsobů nebylo použito pro povlékání implantátů pro jejich bioaktivizaci.

Kopulace odpovídajících peptidů podle vynálezu na povrch implantátu se provádí podle vynálezu prostřednictvím kotvicích molekul, to znamená, že se peptid jako takový neváže přímo na povrch implantátu. Včlenění takové molekuly, dále podrobně popsané, je speciálně bodem, který uvažuje sterické požadavky biologického receptoru na cílové buňky ve spojení s vazbou odpovídajícího peptidu.

Pro tento účel musí mít povrch implantátu vhodné funkční skupiny nebo reaktivní jednotky, které umožňují vazbu odpovídajících funkčních skupin kotvicí molekuly. Funkční skupiny, které mají být na povrchu implantátu, závisí na složení příslušné nosičové matrice, které se řídí podle požadavků použití (kov, plast, kostní materiály). V případě kovových implantátů je možné například generovat povrchovou vrstvu reaktivní pro SH skupiny kotvicí molekuly napařováním zlata. Silanizace kovových povrchů o sobě známými způsoby (jak shora uvedeno) vede podobně k vytvoření reaktivních povrchů, které se mohou začleňovat do sloučenin se vhodnými kotvicími molekulami podle vynálezu při vhodném použití silan obsahujících promotorů adheze (dále popsanych). Implantáty z přírodní kosti nebo z kostních materiálů podobných přírodním materiálům (například kalciumfosfátový cement) mohou vázat kotvicí molekuly, které obsahují fosfonátovou skupinu (princip popsal Chu, Orgel Bioconjugates Chem. 8, str. 103, 1997). Kotvicí molekuly podle vynálezu, které jako takové mají akrylátovou skupinu, se mohou kopulovat na implantáty z plastů na bázi akrylátu (například PMMA) nebo na bázi jiných materiálů majících povlak ze vhodného plastu.

Kotvicí molekuly podle vynálezu jsou molekuly na bázi modifikovaných nebo substituovaných alkylových řetězců nebo uhlovodíkových řetězců, které mají alespoň dvě funkční skupiny, přičemž jednou funkční skupinou je zpravidla volná karboxylová skupina (volná aminoskupina NH_2), která generuje amido-

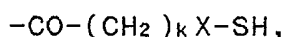
vou vazbu ($-\text{CO}-\text{NH}-$) s volnou aminoskupinou NH_2 (volná karboxylová skupina) vedlejšího řetězce peptidu podle vynálezu, zvláště peptidu RGD a jinou funkční skupinou, která je s výhodou umístěna na druhém konci uhlíkového řetězce kotvicí molekuly a přináší přímou nebo nepřímou vazbu na povrch implantátu v závislosti na složení nebo na požadavcích povrchu implantátu je to s výhodou skupina obsahující (meth)akrylát nebo merkaptoskupina. V podstatě je také možné použít jiných funkčních skupin, které jsou schopny reagovat s příslušnými reaktivními skupinami přímo na povrchu implantátu nebo na vhodné mezivrtvě za dosažení stabilní vazby.

Kotvicí molekuly podle vynálezu (jak shora uvedeno) mají zároveň funkci mezerníku, to znamená, že vedle možnosti vazby mají vhodnou případnou specificky upravenou délku, aby umožnily že doména, zodpovědná za stimulaci adheze buněk, má správný odstup od cílové buňky, takže se může zlepšit buněčná vazba nebo se dokonce může umožnit ze sterického hlediska.

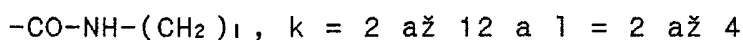
Biologická funkce rozpoznávající buňku a odpovídající doména nesoucí aminokyselinovou sekvenci je potvrzena příkladem prostřednictvím vázání syntetického peptidu selektivně na druhy $\alpha\text{v}\beta_3$ -/ $\alpha\text{v}\beta_5$ -integrin expresujících buněk (například osteoblasty, osteoklasty, endotelové buňky) (Haubner a kol., J. Am. Chem. Soc. 118, str. 7461 až 7472, 1996).

Kotvicí molekuly podle vynálezu mají s výhodou následující línérání struktury, peptidy, definované podle vynálezu, se váží prostřednictvím NH_2 skupiny jednoho z jejich vedlejších aminokyselinových řetězců, s výhodou na vedlejší lysin na volné karboxylové zakončení příslušné kotvicí molekuly.

i) Deriváty merkapto(amido)karboxylové kyseliny



kde znamená X jednoduchou vazbu nebo skupinu



- ii) Deriváty akrylamidokarboxylové kyseliny
 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_m-[\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n]_p-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$,
 kde m a $n = 2$ až 8 , $p = 0$ až 2 ,
- iii) Deriváty akrylamidoamidotriethylenglykolové kyseliny
 $-(\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH})_q-\text{CO}-(\text{CH}_2)_r-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2-$
 kde $q = 1$ až 3 a $r = 2$ až 8 .

Zvláště jsou výhodné následující typy kotvicích molekul:

- ia) $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$ (merkaptopropionová kyselina),
- ib) $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$ (merkptoethylamidojantarová kyselina),
- iiia) $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ (akrylamidohexanová kyselina),
- iib) $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$ (akrylamidohexanová kyselina-amidohexanová kyselina),
- iiia) $-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$
 (akrylamidohexanová kyselina-amidotriethylenglykolová kyselina)
- iiib) $-(\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH})_2-\text{CO}-(\text{CH}_2)_5-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$
 (akrylamidohexanová kyselina-diamidotriethylenglykolová kyselina).

Obecně je podle vynálezu výhodná jakákoliv kotvicí molekulová struktura, která má alespoň šest atomů uhlíku a lineární uhlíkový řetězec. S překvapením se zjistilo, že délka kotvicí molekuly je obzvláště příznivá k dosažení optimálních výsledků se zřetelem na urychlenou a podpořenou tkáňovou integraci implantátu. Skutečnost, že lineární řetězec podle vynálezu má mít alespoň šest atomů uhlíku se týká podle vynálezu celkové délky molekuly mezi peptidem a povrchem implantátu. Proto, aby kotvicí molekuly struktur shora uvedených majících kratší řetězec (například typu ia) byly také vhodné, pokud není uvedeno jinak, včelňuje se řetězec prodlužující kopulační složky mezi peptid a povrch implantátu.

Kotvicí molekuly se váží v amidové formě prostřednictvím karboxylové skupiny na peptidy definované podle vynálezu o sobě známými způsoby, čímž vznikají struktury typu peptid-NH-CO- kotvicí molekula, které se jako takové váží na implantát, čímž nakonec vznikají konstrukty: implantát-NH-CO-kotvicí molekula-implantát (povrch). V souhlase s tím jsou výhodné implantátové konstrukty, které jsou složeny z jednoho ze shora jednotlivě uvedených peptidů, zvláště z peptidů RGD, jednak z obecně a specificky definované kotvicí molekuly jednotlivě shora definované a z implantátu se vhodně upraveným povrchem. Obzvláště výhodnými jsou následující implantáty:

cyklo-RGDfK NH-CO - thiolové deriváty (typ:i) implantát,

cyklo-RGDfK NH-CO - akrylátové deriváty (typ:ii) implantát,

cyklo-RGDfK NH-CO - akrylátglykolové deriváty (typ:iii)
implantát,

cyklo-RGDfKG NH-CO -akrylátglykolové deriváty (typ:iii)
implantát,

přičemž lineární uhlíkový řetězec kotvicí molekuly jako celku má alespoň šest atomů uhlíku.

Z těchto uvedených implantátů jsou obzvláště výhodnými následující implantáty:

cyklo-RGDfK NH-CO - thiolový derivát (typ:ib) implantát,

cyklo-RGDfK NH-CO - akrylátový derivát (typ:ia) implantát,

cyklo-RGDfK NH-CO - akrylátový derivát (typ:iib) implantát,

cyklo-RGDfK NH-CO - akrylátglykolový derivát (typ:iiia)
implantát,

cyklo-RGDfKG NH-CO -akrylátglykolový derivát (typ:iiia)
implantát,

cyklo-RGDfKG NH-CO -akrylátglykolový derivát (typ:iiib)
implantát.

Tyto výhodné struktury se připrvují o sobě známým způsobem nebo dále popsány způsoby nebo způsobem podle současné podávané přihlášky vynálezu, která se týká kotvicích struktur

jako takových.

Jak bylo shora uvedeno, sledují se tři alternativní cesty pro kotvení se zřetelem na buňky nebo tkáně selektivních shora posaných derivátů peptidů na povrch biomateriálů podle vynálezu, aby se umožnil molekulárně rozpoznávací model domény nesoucí příslušnou RGD sekvenci, aby zůstala selektivně nezměněna pro určitý typ buněk a mezerník, přičemž se molekulární kotva může měnit v závislosti na zmíněných kopulačních variantách, například následujícími způsoby

- kopulace derivátů thiolpeptidu na zlatem povlečené povrchy biomateriálu (například typ (i) kotvicí molekuly),
- kopulace derivátů (meth)akryloylpeptidu na akrylátovém nebo methakrylátem povlečené povrchy biomateriálu (například typ (ii) nebo (iii) kotvicí molekuly),
- kopulace derivátů (meth)akryloylpeptidu na silanem povlečené povrchy biomateriálu (například typ (ii) nebo (iii) kotvicí molekuly) za použití (meth)akryloylsilanového derivátu jako promotoru adheze nebo mezivrstvy (například 3-methakryloxypropyltrimethyloxysilan).

Dosažení kritické minimální délky kotvicí molekuly pro různé kopulační peptidové varianty povrchu biomateriálu se provádí syntézou peptidů definovaných podle vynálezu s kotvicími molekulami definovanými podle vynálezu s délkou řetězce s výhodou 6 až 24 atomů uhlíku a nebo s odlišnými hydrofobními/hydrofilními vlastnostmi (například použitím početně odlišných jednotek $-CH_2-$ a/nebo amidohexanové kyseliny nebo ethylenglykolu o sobě známými způsoby a následným testováním biologické účinnosti stanovením adheze buněk in vitro po povlečení vhodných biomateriálových povrchů).

Popsaným způsobem v závislosti na materiálových vlastnostech implantátu, se volí vhodný způsob povlékání pro kondicionaci povrchů před skutečnou kopulací s peptidovými deriváty

podle vynálezu. Kromě toho v závislosti na typu tkáně nebo na typu buňky, u kterých se má dosáhnout včlenění biomateriálu/ implantátu, je možný povlak jinými peptidy, které aktivují integriny odpovídajících cílových druhů buněk cíleným způsobem, například α_6/β_4 -integrin z epitelových buněk (například pro použití implantátů kosti, kyčle, kůže nebo vlasu) nebo α_{IIb}/β_3 integrin z krevních destiček. α_v/β_3 -Specifické RGD peptidy mají selektivitu pro endotelové buňky a osteoblasty, a proto například by byly vhodné pro povlékání vaskulárních protéz nebo kostních implantátů. Tímto způsobem je možno realizovat vhodný bioaktivační povrchový povlak pro téměř každý žádaný orgán pro implantáty v oboru náhrady kostí, cév, zubů, kůže a vlasů.

Dříve než jsou implantáty nebo biohybridní orgány podle vynálezu učiněny dostupnými, musí se testovat peptidy vhodné pro určitý typ buněk a musí se předem stanovit jejich biologická aktivita v testovacím systému in vitro, aby byly schopny nést specifický a selektivní povlak implantátu, který se má začlenit do vybrané tkáně.

Analýza integrinové receptorové struktury cílové tkáně nebo cílových buněk, do kterých se implantát má začlenit, nutná pro tento způsob se provádí o sobě známými běžnými imunohistologickými způsoby, například imunofluorescencí nebo imunohistochemicky vzorků tkáně. Protilátky proti různým integrinovým receptorům nebo jejich podjednotkám, nutné pro tento účel, jsou známy a dostupné nebo se mohou produkovat o sobě známými způsoby, například vhodnými imunizacemi.

Peptidy, definované podle vynálezu, se kovalentně kopulují v různých koncentracích na kulturové povrchy, například na polystyren povlečený hovězím sérovým albuminem (BSA). Materiál tohoto testovaného nosiče není podstatnou částí stanovení vhodných peptidů. Podobně použitý kopulační způsob má přídavně malý význam. Z praktických důvodů se kopulace při těchto sta-

noveních může také provádět inkubací a adsorpcí peptidů na testovaném povrchu.

Následně adheze vybraných tkáňových buněčných kultur (například osteoblasty), které jsou schopné odpovídat svými adhezními vlastnostmi buňkám, které se mají aktivovat v přírodní tkáni in vivo se zkoumají na vhodně povlečených površích. Rozhodujícím pro volbu vhodných buněčných kultur pro zkoušky adheze je porovnatelné začlenění expresního modelu pro cílové buňky in vivo po implantaci, například jejich $\alpha_v\beta_3$ -/ α_v/β_5 - nebo α_{IIb}/β_3 -exprese, která se ověřuje fluorescenčně značenými protilátkami proti $\alpha_v\beta_3$ -, $\alpha_v\beta_5$ - nebo $\alpha_{IIb}\beta_3$ -integrinům nebo proti α_v -, α_{IIb} , β_3 - nebo β_5 -podjednotkám integrinových receptorů fluorescenčně aktivovanými buněčnými třídíči (FACS). V případě jiných druhů cílových molekul in vivo s různými modely integrinových receptorů se musí použít jiných protilátek. Takové protilátky jsou o sobě známe a dostupné nebo se mohou produkovat o sobě známými způsoby například vhodnou imunizací.

Různé vybrané druhy buněk se naočkují a inkubují na BSA předupravené polystyrenové kulturní povrchy povlečené peptidy podle uvážení. Nepřilnuté buňky se vymyjí.

Chování při vázání různých vybraných druhů buněk na testovaných površích povlečených různými peptidy, definovanými podle vynálezu, odpovídá v pozitivním případě, to znamená v případě přiměřené specifity v každém případě titrační křivnce mající maximální míru adsorpce přibližně 60 až 100 % naočkovaných buněk a poloviční maximální vázání buněk koncentraci peptidu RGD v povlakovém roztoku přibližně 5 nM až 5 μ M.

Podobným způsobem jako je popsán pro kopulaci vhodných peptidů na předem BSA povlečené povrchy polystyrenu je možná kotvicí strategie k modifikaci nebo kondicionaci povrchů bio-

materiálu za použití různých mezivrstv jako promotorů adheze.

Souhrnně se připomíná: implantáty podle dosavadního stavu techniky mají tyto nevýhody:

- nedokonalé, pomlé začlenění implantátu do tkáně,
- omezené přijímání tkání,
- nepřiměřená funkční stabilita okrajových vrstev implantátu a tkáně,
- nedostatek stimulačního působení implantátu na neogenezi tkáně,
- nefyziologické vlastnosti povrchu implantátu.

Následkem těchto nedostatků dochází k těmto problémům:

- aseptické uvolňování implantátu (vytváření vláknitých kapslí),
- místní vytváření mikrothrombů,
- infekce,
- záněty,
- resorpce tkáně,
- revize.

Všechny tyto problémy se v široké míře eliminují způsobem podle vynálezu nebo implantáty pro tento účel. Předmět vynálezu se proto od dosavadního stavu techniky liší těmito charakteristikami:

- konstrukce adheze peptidů na míru, přičemž jsou peptidy komplementární s modelem exprese integrinu cílené tkáně nebo buněk,
- selektivní stimulace adheze buněk cílových buněk, které mají doplnit tkáň,
- neogeneze bez současného způsobování adheze buněk, které zabraňují procesu,
- povlaky vysoké stability dosahované prostřednictvím nových molekul kotvicích peptidy,
- urychlení a podpora procesu začlenění implantátů do tkáně.

Bylo možno doložit, že kritická sterická absolutní minimální vzdálenost mezi sekvencí rozpoznávacích buněk peptidu a nepovlečeným povrchem materiálu je 2,0 až 3,5 nm, s výhodou 2,5 až 3,5 nm. Maximální míry povlaku (80 až 100 %) se může dosáhnout s minimální vzdáleností 3,0 až 5,0 nm.

Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1:

Analyza integrinové sloučeniny primárních lidských osteoblastů FACS (fluorescenčně aktivovaného třidiče buněk) pomocí fluorescenčně konjugovaných protilátek proti integrinům $\alpha_v\beta_3$ a $\alpha_v\beta_5$
osa x: intenzita fluorescence (počet)

osa y: počet buněk

M21: pozitivní kontroly $\alpha_v\beta_3$ a $\alpha_v\beta_5$

M21L: negativní kontroly $\alpha_v\beta_3$ a $\alpha_v\beta_5$

HOB: kultura primárních lidských osteoplastů

ROB: kultura primárních krysích osteoplastů

Obr. 2:

Adheze osteoblastů MC3T3 H1 na polystyrenový zkušební povrch povlečený různými peptidy RGD cestou BSA

osa x: koncentrace peptidu RGD v povlékacím roztoku (μM)

osa y: míra povlečení buněk (%)

horní křivka: cyklo-RGDfK NH-CO-CH₂-CH₂-S- (sulfo-SMPB) ("derivát thiolpeptidu 2-SMPB"), SMPB = sukcinimidyl-4-(p-maleimidofenyl)butyrát

střední horní křivka: cyklo-RGDfK NH-CO-CH₂-CH₂-CO-NH-CH₂-CH₂-S- (sulfo-SMPB) ("derivát thiolpeptidu 2-SMPB")

střední dolní křivka: cyklo-RGDvE CO-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-CO-NH-CH₂-CH₂-S- (sulfo-SMPB) ("derivát thiolpeptidu 3-SMPB")

dolní křivka: thiolpeptidová kontrola: cyklo R β ADfK-NH-CO-CH₂-CH₂-S (sulfo-SMPB)

Obr.3:

Adheze osteoblastů na testované povrchy povlečené derivátem thiolpeptidu 1-SMPB (viz obr. 2):

osa x: koncentrace peptidu v povlékacím roztoku (μM)

osa y: míra povlečení buněk (%)

horní křivka: myší osteoblasty MC3T3 H1

střední horní křivka: primární lidské osteoprogenitorové buňky

střední křivka: primární lidské osteoblasty

střední dolní křivka: negativní kontrolní buňky alfavbeta3
M21L

dolní křivka: primární krysí osteoblasty

Obr. 4:

Adheze osteoblastů na testované povrchy povlečené derivátem thiolpeptidu 1-SMPP ($10 \mu\text{M}$ v povlakovém roztoku) (viz obr. 2)

osa x: koncentrace rozpuštěného cyklo-RGDfK (bez molekulární kotvy) v adhezním mediu (μM)

osa y: míra povlečení buněk (%)

horní křivka: myší osteoblasty MC3T3 H1

střední křivka: primární lidské osteoblasty

dolní křivka: primární krysí osteoblasty

Obr. 5:

Adheze osteoblastů na testované povrchy povlečené derivátem thiolpeptidu 1-SMPB ($10 \mu\text{M}$ v povlakovém roztoku) (viz obr. 2)

osa x: počet očkovaných buněk/ cm^2

osa y: počet ulpělých buněk/ cm^2

horní křivka: primární krysí osteoblasty

střední horní křivka: myší osteoblasty MC3T3 H1

střední dolní křivka: primární lidské osteoblasty

dolní křivka: BSA negativní povlak

Obr. 6:

Adheze osteoblastů na testované povrchy povlečené derivátem thiolpeptidu 1-SMPB ($10 \mu\text{M}$ v povlakovém roztoku) (viz obr. 2)

osa x: počet očkovaných buněk / cm^2

osa y: požadovaná vypočtená plocha/buňky (μm^2)
horní křivka: primární lidské osteoblasty
střední křivka: myší osteoblasty MC3T3 H1
dolní křivka: primární krysí osteoblasty

Obr. 7:

Adheze osteoblastů na testované povrchy povlečené derivátem thiolpeptidu 1-SMPB (10 μM v povlakovém roztoku) (viz obr. 2)
osa x: čas (min)
osa y: míra povlečení buněk (%)
horní křivka: myší osteoblasty MC3T3 H1
střední křivka: primární lidské osteoblasty
dolní křivka: primární krysí osteoblasty

Obr. 8:

Adheze osteoblastů MC3T3 H1 na povrchy kostního cementu PMMA povlečené různými RGD peptidy
osa x: koncentrace peptidu RGD v povlékacím roztoku (μM)
osa y: míra povlečení buněk (%)
horní křivka: derivát cyklo-RGDfK NH-CO-akrylátu (typ iia, akrylátový peptid 3)
střední horní křivka: derivát cyklo-RGDfK NH-CO-akrylátu (typ iib, akrylátový peptid 2)
střední dolní křivka: derivát cyklo-RGDfK NH-CO-akrylátu (typ iiib, akrylátový peptid 4)
dolní křivka: derivát cyklo-RGDfK NH-CO-akrylátu (typ iia, akrylátový peptid 1)

Obr. 9:

Adheze osteoblastů MC3T3 H1 na porézní povrchy PMMA/PHEMA povlečené různými RGD peptidy
osa x: koncentrace peptidu RGD v povlékacím roztoku (μM)
osa y: míra povlečení buněk (%)
horní křivka: derivát cyklo-RGDfK NH-CO-akrylátu (typ iia, akrylátový peptid 3)

střední křivka: derivát cyklo-RGDfK NH-CO-akrylátu (typ iiib, akrylátový peptid 4)

dolní křivka: derivát cyklo-RGDfK NH-CO-akrylátu (typ iib, akrylátový peptid 2)

Orb. 10:

Adheze osteoblastů MC3T3 H1 na porézní povrchy PMMA/Plex Y7H povlečené různými RGD peptidy

osa x: koncentrace peptidu RGD v povlékacím roztoku (μM)

osa y: míra povlečení buněk (%)

horní křivka: derivát cyklo-RGDfK NH-CO-akrylátu (typ iiaa, akrylátový peptid 3)

střední křivka: derivát cyklo-RGDfK NH-CO-akrylátu (typ iiib, akrylátový peptid 4)

dolní křivka: derivát cyklo-RGDfK NH-CO-akrylátu (typ iib, akrylátový peptid 2)

Obr. 11:

Maximální adheze osteoblastů MC3T3 H1 na kostní cement PMMA nebo polystyrenové povrchy BSA-SMPB povlečené různými RGD peptidy s kolísavou molekulovou délkou

osa x: molekulové délky peptidů RGD (nm)

osa y: maximální míra povlečení (%)

Obr. 12:

Adheze osteoblastů MC3T3 H1 na povrchy nerazvějící oceli V4A povlečené derivátem akrylátového peptidu RGD cyklo-RGDfK NH-CO (typu iiaa, akrylátový peptid 3), povrchy nerezavějící oceli předběžně povlečeny ve své části různými způsoby

osa x: koncentrace peptidu RGD v povlékacím roztoku (μM)

osa y: míra povlečení buněk (%)

horní křivka: povlak Kevloc^R

střední křivka: povlak Silicoater^R

dolní křivka: pigmentový povlak

Obr. 13:

Proliferace osteoblastů MC3T3 H1 na povrchu kostního cementu PMMA povlečeného akrylovým derivátem peptidu RGD cyklo-RGDfK NH-CO (typ iiiia, akrylátový peptid 3)

osa x: doba kultivace (dny)

osa y: počet buněk

horní křivka: 100 μ M peptidu v povlékacím roztoku

střední horní křivka: 1 μ M peptidu v povlékacím roztoku

střední dolní křivka: 0,1 μ M peptidu v povlékacím roztoku

dolní křivka: nepovlečená kontrola

Obr. 14:

Adheze osteoblastů MC3T3 H1 a destiček na povrchy kostního cementu PMMA povlečené derivátem akrylátového peptidu RGD cyklo-RGDfK NH-CO (typu iiiia, akrylátový peptid 3)

osa x: osteoblasty samotné a destičky samotné očkované na povrchy mající různou koncentraci peptidu v povlékacím roztoku 100 μ M, 10 μ M a 1 μ M

osa y: počet buněk (absorpce při 405 nm)

Obr. 15:

Adheze osteoblastů MC3T3 H1 a destiček na povrchy kostního cementu PMMA povlečené derivátem akrylátového peptidu RGD cyklo-RGDfK NH-CO (typu iiiia, akrylátový peptid 5)

osa x: osteoblasty samotné a destičky samotné očkované na povrchy mající různou koncentraci peptidu v povlékacím roztoku 100 μ M, 10 μ M a 1 μ M

osa y: počet buněk (absorpce při 405 nm)

Obr. 16:

Adheze osteoblastů MC3T3 H1, destiček a směsi osteoplastů a destiček na povrchy kostního cementu PMMA povlečené derivátem akrylátového peptidu RGD cyklo-RGDfK NH-CO (typu iiiia, akrylátový peptid 3)

osa x: osteoblasty samotné, destičky samotné a směs osteoblas-

tů a destiček očkované na povrchy mající různou koncentraci peptidu v povlékacím roztoku 100 μ M
osa y: počet buněk (absorpce při 405 nm)

Obr. 17:

Adheze osteoblastů MC3T3 H1, destiček a směsi ostoplastů a destiček na povrchy kostního cementu PMMA povlečené derivátem akrylátového peptidu RGD cyklo-RGDfK NH-CO (typu iia, akrylátový peptid 5).

osa x: osteoblasty samotné, destičky samotné a směs osteoblastů a destiček očkované na povrchy mající různou koncentraci peptidu v povlékacím roztoku 100 μ M
osa y: počet buněk (absorpce při 405 nm)

Vynález objasňují, nijak však neomezují následující příklady praktického provedení.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

(a) Příprava cyklo-RGD peptidu (Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys) s kotevní merkaptopropionovou kyselinou ($\rightarrow$ cyklo-RGDfK NH-CO-thiol-derivát typu: ia) se provádí způsobem podle německého patentového spisu číslo DE 1 95 38 741. Syntesa odpovídajícího cyklo-RGDfK, který je biologicky inaktivní a derivátu cyklo-RGDfK bez kotevní molekuly se provede obdobně.

(b) Cyklo(R(Pbf)GD(tBu)fK(Z)) (Pbf = pentamethylbenzofuransulfonyl; tBu = terc.-butyl) se získá syntézou peptidu v pevné fázi (Merrifield, Angew.Chem. 97, str. 801, 1985) a následnou cyklizací (například způsobem, který popsali Zimmer a kol. Liebig's Ann. Chem. 497, 1993). Po selektivním odstranění chránicí skupiny Z osobě známými způsoby, může být lysinový boční řetězec rozšířen reakcí 0,1 mmol cyklo (R(Pbf)GD(tBu)fK)

s 0,2 mmol anhydridu kyseliny jantarové (sa) v 5 ml dimethylformamidu k získání cyklo (R(Pbf)GD(tBu)fp[sa-K]).

c) Příprava cyklo-RGD peptidu (Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys) s kotevní merkaptoethylamidojantarovou kyselinou ($\rightarrow$ cyklo-RGDfK NH-CO-thiolderivát typu: ib = cyklo(RGDf[thiol-sa-K])) se provádí takto:

V ledové kyselině octové se rozpustí při teplotě 60 °C 10 mmol cysteaminhydrochloridu a ekvimolární množství (eq.) tri-fenylmethanolu a zpracuje se za míchání 1,1 eq. etherátu fluoridu boritého. Po 50-minutovém míchání se směs neutralizuje nasyceným roztokem hydrogenuhličitanu sodného a extrahuje se ethylacetátem. Olej, zbylý po extrakci, se rozpustí v terc.-butanolu pro převedení na hydrochlorid upravený na hodnotu pH 2 zředěnou kyselinou chlorovodíkovou a vysuší se vymrazováním. Výtěžek je 99%. Takto vzniklá strukturní jednotka se kopuluje za pomoci EDCI·HCl o sobě známým způsobem na cyklo-(R(Pbf)GD-(tBu)f[sa-K]) a boční chránicí skupina se odstraní.

d) Příprava cyklo-RGD peptidu (Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys) s kotevní akrylamidohexanovou kyselinou ($\rightarrow$ cyklo-RGDfK NH-CO-akrylderivát typu: iia = cyklo(RGDf[akryl-ahx-K])) se provádí takto:

Akrylový kotevní systém se syntetizuje odděleně a kopuluje se na boční peptidový řetězec jako aktivní ester. K tomu se 10 mmol 6-aminohexanové kyseliny a 1,8 eq. hydroxidu vápenatého suspenduje ve vodě a přidá se 1,2 eq. akryloylchloridu při teplotě 0 °C. Nerozpustný hydroxid vápenatý se odfiltruje a filtrát se okyslí na hodnotu pH 2 koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou. Vysrážený produkt se překrystaluje z ethylacetátu. Výtěžek 65%. Suspenduje se 10 mmol krystalické 6-akrylamidohexanové kyseliny v 50 ml dichlormethanu, zpracuje se 1 eq. N-hydroxysukcinimidu a při teplotě 0 °C se přidá 1,2 eq. EDCI·HCl. Po jednohodinovém míchání se reakce ukončí pří-

sadou 10 μ l ledové kyseliny octové. Extrahuje se několikrát studeným roztokem nasyceného uhličitanu sodného a vodou a extrakt se vysuší síranem sodným. Výtěžek 52%. Takto vzniklý aktivní ester se kopuluje na cyklo(R(Pbf)GD(tBu)fK) v dimethylformamidu a chránicí skupiny bočního řetězce se odstraní.

(e) Příprava cyklo-RGD peptidu (Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys) s kotevním systémem akrylamidohexanová kyselina-amidohexanová kyselina ($\rightarrow$ cyklo-RGDfK NH-CO-akryl-drivát typu : iib = cyklo-(RGDf[akryl-ahx-ahx-K]) se provádí takto:

K syntéze akrylového kotevního systému se rozpustí 10 mmol aminohexanové kyseliny ve vodném pufru fosforečnanu sodného (hodnota pH 8) a ochladí se na teplotu 0 °C. V systému ethanol/chloroform se rozpustí 2 mmol aktivního esteru akrylamidohexanové kyseliny (podle (d)) a pomalu se přidá. Udržuje se konstantní hodnota pH 8 pomocí zředěného roztoku hydroxidu sodného. Po oddestilování organického rozpouštědla se vodná fáze okyslí na hodnotu pH 2,6 koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou a vysrážená pevná látka se odfiltruje, promyje se vodou a vysuší se oxidem fosforečným (výtěžek 70%). Vytvořený akrylový kotevní systém se kopuluje na peptidový boční řetězec známým způsobem pomocí EDCI·HCl a chránicí skupina se odstraní.

(f) Příprava cyklo-RGD peptidu (Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys) s kotevním systémem akrylamidohexanová kyselina-amidotriethylen-glykolová kyselina ($\rightarrow$ cyklo-RGDfK NH-CO-akryl-drivát typu: iiii = cyklo(RGDf[akryl-ahx-tEG-K]) se provádí takto:

Akrylový kotevní systém se připraví shora uvedenou syntézou peptidu v pevné fázi. Jako poslední složka se kopuluje akrylamidohexanová kyselina. Výtěžek 97%. Vytvořený akrylový kotevní systém se kopuluje na peptidový boční řetězec známým způsobem pomocí EDCI·HCl a chránicí skupiny se odstraní.

(g) Příprava cyklo-RGD peptidu (Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys) s ko-
tevním systémem akrylamidohexanová kyselina-amidotriethylen-
glykolová kyselina-amidotriethylenglykolová kyselina ($\rightarrow$ cyk-
lo-RGDfK NH-CO-akryl-drivát typu: iiib = cyklo(RGDf[akryl-ahx-
tEG-K]) se provádí obdobně jako ve stupni (f). Výtěžek 85%.

(i) Synteza cyklo-RGD peptidu (Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys) s ko-
tevním systémem akrylamidohexanová kyselina-amidotriethylen-
glykolová kyselina ($\rightarrow$ cyklo-RGDfK NH-CO-akryl-drivát typu:
iiia = cyklo(RGDf[akryl-ahx-tEG-KG]) se provádí obdobně jako
ve stupni (f). Výtěžek 81%.

Příklad 2

Kovalentní kopulace peptidů podle vynálezu se sulfosuk-
cinimidyl-4-(p-maleimidofenyl)butyrátem (sulfo-SMPB) na kul-
turní povrchy polystyrenu povlečeného albuminem hovězího séra
(BSA) se provádí způsobem, který popsal Singer a kol, (J.Cell.
Biol. 104, str. 573, 1987) a Ruoslahti a kol. (Methods Enzy-
mol. 82, str. 803 až 831, 1982).

K tomu účelu se povléknou 48-důlkové destičky (Costar
"non-tissue culture treated", druh č. 3547) 250 μ l PBS (fosfá-
tem pufovaná solanka), hodnota pH = 8,3, 2 % BSA na důlek
a inkubují se přes noc při teplotě místnosti k vytvoření pov-
laku BSA na polystyrenu. Destičky se omyjí 250 μ l PBS/důlek,
hodnota pH 8,3, a inkubují se jednu hodinu při teplotě míst-
nosti s 250 μ l roztoku obsahujícího 100 μ g/ml SMPB v PBS, hod-
nota pH 8,3. Důlky se promyjí třikrát 250 μ l PBS, pokaždé o
hodnotě pH 8,3. Pro povlékací roztoky se připraví příslušný
peptidthiol-RGD v následujících konečných koncentracích v PBS,
o hodnotě pH 8,3: 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M a
1 mM. Po přidání 250 μ l povlékacího roztoku do každého důlku
se destičky inkubují při teplotě místnosti přes noc a pak se
promyjí třikrát PBS, hodnota pH 8,3. Po přidání pokaždé 250 μ l

5% roztoku BSA v PBS, hodnota pH 7,4, následné inkubaci dvě hodiny při teplotě místnosti a promytí PBS, hodnota pH 7,4, byla blokována nespecifická místa vazby buněk. Polystyrenové povrchy, které tvoří povlaky, se zpracují 5% roztokem BSA stejně jako pozitivní vzorky, fungující jako negativní kontroly povlečení. Přilnutí čtyř buněčných kultur, získané ze tří různých druhů, se pak zkoumá na uvedeném povrchu povlečeném peptidem RGD:

- primární lidské osteoblasty z hlavy kostní trámčiny stehenní kosti dospělých pacientů (Siggelkow a kol., Bone 20, str. P231, 1997),
- primární lidské osteoprogenitorové buňky z kostního morku dospělých pacientů (Vilamitjana-Amedee a kol., In vitro Cell Dev. Biol. 29, str. 699, 1993),
- primární osteoblasty z lebečních kostí neonatálních krys, jejichž preparace a kultivace se provádí způsobem, který popsali Yagiela a Woodbury, The Anatomical Record 188, str. 287 až 305, 1977),
- linie MC3T3 H1 osteoblastových buněk získaných z lebek neonatálních myší (Heermeier a kol., Cells and Materials 5, str. 309 až 321, 1995) a
- buněčná linie M21L lidských melanomových buněk jako negativní kontrola $\alpha v\beta_3/\alpha v\beta_5$ integrinu.

Dříve než se použije těchto buněčných druhů ke zkouškám adheze, ověří se jejich exprese integrinu pomocí fluorescenčně značené protilátky vůči receptorům $\alpha v\beta_3$ nebo $\alpha v\beta_5$ a vůči integrinovým podjednotkám αv , β_3 a β_5 pomocí Becton-Dickensonova sorberu fluorescencí aktivovaných buněk (FACS). V tomto případě se pozoruje silná exprese uvedených integrinů (obr. 1).

Popsané buněčné druhy se očkují s hustotou buněk 48000 buněk/cm², jak shora uvedeno, do 48-důlkových destiček Costar povlečených peptidem RGD a pak se inkubují jednu hodinu při teplotě 37 °C, za 95% relativní vlhkosti a při obsahu oxidu

uhlíčitého 5 %. Neulpělé buňky během tohoto pokusu se odplaví dvakrát PBS, hodnota pH 7,4. Kvantifikace ulpělých buněk se provede nepřímo stanovením aktivity buněčného enzymu N-acetylhexosaminidáza pomocí vhodné standardní křivky způsobem podle Landegrena (J. Immunol. Methods 67, str. 379 až 388 1984).

Povlak povrchů buněčné kultury předběžně BSA zpracovaného polystyrenu derivátů $\alpha\beta_3$ - nebo $\alpha\beta_5$ - selektivních thiolpeptidů 1-, 2-(sulfo-SMPB)derivátů vede k silné a na dávce nezávislé stimulaci adheze kulturních myších osteoblastů MC3T3 H1 (obr. 2). Na rozdíl od toho, nemá biologicky inaktivní thiolpeptidová kontrola významný účinek, z čehož vyplývá vysoká selektivita a vysoká specifická prokázané peptidové interakce integrin-RGD. Méně selektivní $\alpha\beta_3/\alpha\beta_5$ thiolpeptid 3-(sulfo-SMPB) (cyklo-RGDvE-aminocysteinamidohexanová kyselina (Delforge a kol., Anal. Biochem. 242, str. 180, 1996) vykazuje také výrazně slabší účinek než odpovídající deriváty thiolpeptidu 1 a 2.

Vazební chování různých buněčných druhů k polystyrenovým BSA-předběžně zpracovaným povrchům povlečeným thiolpeptidovým derivátem 1-(sulfo-SMPB) nebo thiolpeptidovým derivátem 2-(sulfo-SMPB) odpovídá titrační křivce mající maximální míru absorpce přibližně 70 % (primární kryší osteoblasty), přibližně 80 % (primární lidské osteoblasty a primární buňky lidského osteoprogenitoru) a přibližně 90 až 100 % (myší osteoblasty MC3T3 H1) očkovaných buněk a poloviční maximální buněčnou vazbu s koncentrací peptidu RDG v povlakovém roztoku 50 až 1000 nM (obr.3). Na rozdíl od toho nevykazují negativní kontrolní buňky (M21L) $\alpha\beta_3/\alpha\beta_5$ žádnou významnou buněčnou adhezi. Shora popsané míry absorpce jsou zvýšeny 20 až 40x ve srovnání s povrchy povlečenými 5% BSA, což vede k nevýznamné buněčné adhezi u všech použitých osteoblastových kultur.

Podobné chování uvedených osteoblastových kultur potvrzuje, že účinky stimulující adhezi jsou specifické pro osteo-

blasty, nejsou však závislé na druhu.

Vazba shora uvedených osteoblastových buněčných kultur na BSA předzpracovaných polystyrenových površích povlečených thiolpeptidovým derivátem 1-sulfo-SMPB může být úplně inhibována přísadou rozpuštěného cyklického RGDfK v adhesním prostředí (obr. 4). Tento výsledek potvrzuje, že pozorované jevy ulpívání buněk zprostředkuje peptid RGD samotný.

Závislost ulpívání buněk primárních lidských osteoblastů nebo buněk MC3T3 H1 na uvedeném thiolpeptidem povlečeném 1,2 (sulfo-SMPB) předem BSA zpracovaném polystyrenovém povrchu na řadu očkovaných buněk vytváří saturační křivku (obr. 5). Lze však rozeznat nevýznamnou adhezi buněk na BSA negativním povlaku. Průměrná plocha ulpělých buněk je přibližně 200 až 500 μm^2 vypočteno pro případ maximální hustoty očkovaných buněk vytvářící na povrchu střední vzdálenost mezi buňkami přibližně 15 až 25 μm (obr. 6). Jelikož průměr buněk osteoblastu je přibližně 10 až 15 μm , je zřejmé, že peptidový povlak vytváří dostupná místa pro adhezi buněk v takovém počtu, že lze dosáhnout hustě povlečeného povrchu osteoblasty, kde jsou buňky uspořádány v bezprostřední vzájemné vzdálenosti. Časový průběh procesu adheze buněk na shora uvedeném povrchu ukazuje rychlou adhezi buněk, která v závislosti na buněčném typu je ukončena po přibližně 45 až 60 minutách (obr. 7). Buněčné linie (například MC3T3 H1) vykazují rychlejší kinetiku adheze než primární buněčné kultury (lidské, krysí). Významné rozdíly mezi oběma zde použitými thiolpeptidivými deriváty nejsou v těchto pokusech rozeznatelné.

Příklad 3

K prozkoumání účinku různých délek kotevních molekul a tudíž vzdálenosti mezi sekvencí RGD rozeznávající buňky a povrchem materiálu na rozsah osteoblastové adheze, se připraví

čtyři různé akrylát-RGD peptidy (cyklo-RGDfK NH-CO-akrylátové deriváty) (typ: iia, iib, iiaa, iiib) s různými délkami mezer-níku molekul.

Cyklo-RGD peptidy se připraví způsobem podle příkladu 1 nebo způsoby, které popsal Pless a kol. (J. Biol. Chem. 258, str. 2340 až 2349, 1983) nebo Gurrath a kol. (Eur. J. Biochem. 210, str. 911 až 921, 1992). Odpovídající délky kotev těchto peptidů byly přibližně 2,6 nm (akrylátpeptid 1, typ iia), 3,5 nm (akrylátpeptid 2, typ iib), 3,7 nm (akrylátpeptid 3, typ iiaa) a 4,2 nm (akrylátpeptid 4, typ iiib).

Ke kovalentní vazbě těchto peptidů na polymerované povrchy PMMA (polymethylmethakrylátu) se připraví ze tří různých složek PMMA články vhodného tvaru s různou porozitou (průměr 10 mm, výška 2 mm):

- kostní cement na bázi PMMA (Merck KGaA, Německo, číslo licence 5181.00.00) odpovídajícího popisu produktu (40 g prášku + 20 ml tekutiny).
- 10 g granulí PMMA/PHEMA (polyhydroxyethylmethakrylátu) o velikosti částic 0,5 až 0,6 mm (Biomet) smíšených s 1,3 ml roztoku HEMA (68,6 % HEMA, 29,4 % TEGMA [triethylenglykoldimethakrylát], 2 % tBPB [terc.-butylperoxybezoát]) a ulpělých prostřednictvím tohoto roztoku na porézním podložním materiálu.
- 10 g granulí PMMA (Plex Y7H, Röhm, Německo) frakce částic 0,7 až 2 mm s 1,5 ml roztoku methylmethakrylátu (MMA) (68,6 % MMA, 29,4 % TEGMA, 2 % tBPB) a ulpělých prostřednictvím tohoto roztoku na porézním podložním materiálu.

Ke kovalentní vazbě akrylátových peptidů na předběžně polymerované lisované prvky PMMA se připraví zásobní roztoky akrylátových peptidů 1, 2, 3 a 4 v konečné koncentraci 100 μ M v každém případě v systému DMSO/0,2 % (hmotnost/objem) karcinonu. Ve všech případech se připraví zředěním systémem

isopropanol/2 % (hmotnost/objem) kafrchinonu řada koncentrací mající konečný obsah peptidu 0,1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M a 10 μ M. Vylisované prvky se inkubují 2 hodiny při denním světle a při teplotě místnosti a pak se v suchém stavu skladují při teplotě 4 °C. Před použitím se vzorky promyjí PBS, hodnota pH 7,4 k odstranění nevázaných peptidů a uloží se v PBS o hodnotě pH 7,4 přes noc při teplotě 4 °C.

Přísadou 250 μ l/ na každý vylisovaný prvek každého z 5% roztoku BSA v PBS o hodnotě pH 7,4 a následnou inkubací dvě hodiny při teplotě místnosti a promytím jednou PBS o hodnotě pH 7,4 jsou blokována nespecifická místa buněčné vazby.

Vylisované prvky PMMA, které byly zpracovány roztokem isopropanol/0,2 % (hmotnost/objem) kafrchinonu místo peptidovými roztoky, působí jako negativní kontroly.

Zkoumá se adheze osteoblastů linie MC3T3 H1 získané z lebek neonatálních myší (Heermeier a kol., Cells and Materials 5, str. 309 až 321, 1995) na shora uvedených peptidem povlečených površích.

Osteoblasty MC3T3 H1 se očkují s očkovací hustotou 48000 buněk/cm², jak shora uvedeno, do 48-důlkových destiček Costar s vylisovanými prvky PMMA povlečenými peptidem RGD a pak se inkubují po dobu jedné hodiny při teplotě 37 °C, v prostředí s 95% vlhkostí a s obsahem 5 % oxidu uhličitého. Neulpělé buňky během pokusu se pak vymyjí dvakrát PBS, hodnota pH 7,4.

Kvantifikace ulpělých buněk se provede nepřímým stanovením aktivity buněčného enzymu N-acetylhexosaminidáza pomocí vhodné standardní křivky způsobem podle Landegrena (J. Immunol. Methods 67, str. 379 až 388, 1984).

Vazební chování osteoblastů MC3T3 H1 k různým PMMA

vylišovaným prvkům povlečeným uvedenými akrylátovými peptidy 1 RGD (typ iia), 2 (typ iib), 3 (typ iiaa), 4 (typ iiib) odpovídá v každém případě titrační křivce. Maximální míry absorpce jsou přibližně 20 % pro akrylátový peptid 1 a přibližně 80 % až 100 % pro akrylátové peptidy 2, 3 a 4. K poloviční maximální buněčné vazbě dochází při koncentraci RGD v povlékacím roztoku přibližně 1 až 10000 nM pro akrylátové peptidy 2, 3 a 4.

Popsané míry absorpce buněk na RGD peptidem povlečených tvarovaných prvcích z kostního cementu se zvyšují přibližně 1,5x (akrylátový peptid 1) a přibližně 5 až 15x (akrylátové peptidy 2, 3 a 4) v porovnání s nepovlečenými povrchy (obr. 8).

Popsané míry absorpce buněk na RGD peptidem povlečených prvcích tvarovaných z porézních granulí PMMA/PHEMA se zvyšují 2 až 5x (akrylátové peptidy 2, 3 a 4) v porovnání s nepovlečenými povrchy (obr. 9).

Popsané míry absorpce buněk na RGD peptidem povlečených prvcích tvarovaných z porézních granulí Plex Y7H se zvyšují 2 až 3x (akrylátové peptidy 2, 3 a 4) v porovnání s nepovlečenými povrchy (obr. 10).

U vzorků PMMA/PHEMA nebo PMMA-Plex Y7H je patrné, jak větší kolísání šířky hodnot buněčné adheze, tak silnější adheze osteoblastů na nepovlečené kontrolní vzorky s konstantní mírou maximální adheze RGD peptidem povlečených vzorků než u prvků tvarovaných z kostního cementu PMMA.

U akrylátových peptidů 2, 3 a 4 jak v porovnání navzájem, tak v porovnání s thiopeptidy 1 a 2 povlečenými při testu kontroly BSA, se pozorují velmi podobné stimulace buněčného ulpívání, avšak nejkratší peptid, akrylátový peptid 1 je téměř neaktivní. Z toho vyplývá závěr, že rozhodující minimální vzdálenost přibližně 2,5 až 3,5 mm je nutná mezi RGD buněčnou roz-

lišovací sekvencí a povrchem materiálu k možnosti uskutečnit stericky úspěšnou adhezi buněk (obr. 11).

Vyšší aktivita akrylátového peptidu 3 na nosič kostního cementu PMMA ukazuje na molekulovou strukturu optimální pro adhezi buněk s ohledem jak na délku molekuly, tak na případné hydrofilní/hydrofobní rozdělení nebo poměr v mezerníku.

Příklad 4

Ke zkoušce buněčné adheze osteoblastů k peptidem povlečenému kovovému povrchu byly opatřeny tvarované prvky ($7 \times 7 \times 1 \text{ mm}^3$) z nerezavějící oceli V4A třemi různými povlaky a vždy byly povlečeny peptidy RGD. K tomu se napřed tvarované nerezové prvky inkubují v ultrazvukové lázni 15 minut při teplotě 60°C za účelem vyčištění, opláchnou se demineralizovanou vodou, inkubují se 30 minut v acetonu, opět se opláchnou demineralizovanou vodou a inkubují se 24 hodin při teplotě 60°C k vysušení.

Destičky z nerezavějící oceli se pak opatří třemi druhy povlaků:

a. Způsob Kevloc^R (Haereus Kulzer GmbH, Wehrheim, Německo): Primární roztok Kevloc^R se nanese v tenké vrstvě a inkubuje se tři minuty při teplotě místnosti. Pak se nanese podobně tenká vrstva vazebního roztoku Kevloc^R a aktivuje se 20 minut v sušárně při teplotě 180°C .

Jelikož tato varianta povlaku přímo vytváří dostupné akrylátové volné radikály na kovovém povrchu, je pak možno přímo kovalentně kopulovat akrylátový peptid 3, typu iiiia, jak je popsáno v příkladu 3 pro polymerovaný kostní cement PMMA.

b. Způsob Silicoater^R (Haereus Kulzer GmbH, Wehrheim, Německo): Nanese se v tenké vrstvě roztok Siliseal^R a suší se pět minut

při teplotě místnosti. Pak se stejným způsobem nanese v tenké vrstvě roztok Sililink[®] a aktivuje se v sušárně tři minuty při teplotě 320 °C. K umožnění nanést akrylátové radikály na povlečený kovový povrch se připravené tvarové prvky z nerezavějící oceli ponoří do demineralizované vody zahřáté na teplotu 75 °C a hodnota pH se nastaví hydroxidem sodným na přibližně 8,00. Za míchání se vnese během jedné hodiny 1% roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu (Hüls AG, Německo) až do dosažení hodnoty pH přibližně 6,5. Směs se míchá jednu hodinu při teplotě 75 °C při hodnotě pH přibližně 6,35. Dojde k vazbě akrylátového peptidu 3, typu iia, jak je popsáno v příkladu 3 pro polymerovaný kostní cement PMMA.

c. Pigmentový povlak (Merck KGaA, Darmstadt, Německo):

Tato varianta povlečení se provádí podle silanizačního způsobu popsaného v patentovém spise číslo DE-A 4321005, který původně popisuje techniku nanášení perleťově lesklého pigmentu v povlakovém systému na vodné bázi na kovy a plasty v automobilním a plastovém průmyslu.

Při tom se tvarované prvky z nerezavějící oceli ponoří do demineralizované vody zahřáté na teplotu 75 °C, hydroxidem sodným se nastaví hodnota pH 8,00 a za míchání se přidá během dvou hodin roztok chloridu hlinitého. Pak se podobně dává za míchání během dvou hodin 5% roztok silikátu sodného. V následujícím stupni se za míchání během jedné hodiny přidá 1% roztok 3-methakryloxypropyltrimethoxysilanu (Hüls AG, Německo). Směs se míchá jednu hodinu při teplotě 75 °C a při hodnotě pH přibližně 6,40. Uskuteční se vazba akrylátového peptidu 3, typu iia, jak je popsáno v příkladu 3 pro polymerovaný kostní cement PMMA.

Když jsou tvarované prvky z nerezavějící oceli povlečeny akrylátovým peptidem 3, typu iia třemi různými způsoby, zkoumá se adheze osteoblastů linie MC3T3 H1. K tomu se použije

popstupu popsaného v příkladu 3.

Vazební chování osteoblastů linie MC3T3 H1 na tvarované prvky z nerezavějící oceli povlečené akrylátovým peptidem 3 a předem upravené třemi různými způsoby odpovídá pro každý případ titrační křivce (obr. 12).

Maximální míra adheze je přibližně 60% u pigmentového povlaku a přibližně 80% u způsobů Kevloc^R a Silicoater^R. Poloviční maximální vazba buněk nastává při koncentraci peptidu RGD v povlékacím roztoku přibližně 1 až 100 nM u všech třech variant povlečení. Popsané míry absorpce na tvarovaných prvcích z nerezavějící oceli povlečených peptidem RGD jsou zvýšeny 3 až 8x ve srovnání s nepovlečenými kontrolami.

U způsobů Kevloc^R nebo Silicoater^R pro každý případ dodatečně provedou povlaky za použití pouze jednoho povlékacího roztoku (samotný primer Kevloc^R, samotná vazba Kevloc^R, samotný Siliseal^R, samotný Sililink^R). V tomto případě se nepozorují žádné významné rozdíly v adhezí buněk v porovnání s příslušnými dvojíty povlaky (Kevloc^R primer/bond, Siliseal^R/Sililink^R).

Příklad 5

K doplňujícímu výzkumu nikoli pouze adheze osteoblastů, ale také jejich proliferace na povrchu povlečeném peptidem RGD se postupuje takto:

Ke kovalentní vazbě akrylátového peptidu 3 typu iiii na polymerované prvky tvarované z kostního cementu PMMA je zvolen způsob povlékání popsaný v příkladu 3.

Na prvky tvarované z kostního cementu povlečené peptidem RGD se aplikují myší osteoblasty MC3T3 H1 způsobem popsaným

v příkladu 3, avšak se dvěma rozdíly: naočkuje se 12000 buněk/cm² místo 48000 buněk/cm² a doba adheze se zvýší na dvě hodiny místo jedné hodiny. Kromě toho se zkoumají tři různé koncentrace peptidu v povlékacím roztoku: 0,01 μM, 1 μM a 100 μM. Po odplavení neulpělých buněk, se osteoblasty MC3T3 H1 kultivují při 95% atmosferické vlhkosti a při obsahu 5 % oxidu uhličitého při teplotě 37 °C v prostředí obsahujícím sérum (10 %) po dobu 15 dní. Během té doby se prostředí mění dvakrát týdně a po 1, 2, 3, 4, 5, 10 a 15 dnech se zjišťuje počet buněk testem WST (Boehringer, Mannheim, Německo). V každém případě je patrná typická exponenciální křivka buněčné proliferace kultivovaných osteoblastů (obr. 13). Maximálně dosažený počet buněk je přímo závislý na koncentraci peptidu RGD v povlékacím roztoku. Tak po 15 dnech kultivace se dosahuje na cm² přibližně 1000000 buněk (100 μM peptidu), přibližně 550000 buněk (1 μM peptidu), přibližně 300000 buněk (0,01 μM peptidu) a přibližně 230000 buněk (kontrola bez peptidů). Při nejvyšší koncentraci peptidu 100 μM je tedy patrný přibližně čtyř- až pětinasobný nárůst proliferace ve srovnání s nepovlečenými vzorky.

Příklad 6

Modelem použitým pro povlékání materiálu peptidy RGD různé selektivity buněk k získání implantátů majících místně diferencované bioaktivní modely povlečení, které mají stimulovat adhezi různých buněčných druhů se polymerují prvky tvarované kostním cementem PMMA. Na ně se kovalentně kopulují dva peptidy RGD s různou buněčnou selektivitou. V tomto případě se na prvky tvarované PMMA, popsané v příkladu 3, kovalentně kopuluje akrylátový peptid 3 typu iiia se selektivitou pro osteoblasty obsahující αvβ₃/αvβ₅ integrin a akrylátový peptid 5 typu iiaa mající selektivitu pro α₁β₁β₃-pozitivní destičky.

a. V první části pokusu se tvarované prvky PMMA povléknou

akrylátovými peptidy 3 a 5 v koncentracích povlékacího roztoku 100 μM , 10 μM a 1 μM pro každý případ. Tyto materiály povlečené peptidem RGD se pak paralelně očkují osteoblasty a destičkami a zjišťuje se jejich buněčná adheze. Osteoblasty MC3T3 H1 (350000 buněk/ cm^2) a lidské destičky 50 milionů buněk/ cm^2) se paralelně naočkují do tvarovaných prvků PMMA povlečených jak akrylátovým peptidem 3, tak akrylátovým peptidem 5 a jejich buněčná adheze se stanoví způsobem popsáným v příkladu 3. Lidské destičky se připraví způsobem, který popsali Shattil a Brass (J. Biol. Chem. 262, str. 992 až 1000, 1987). Tímto pokusem je možno předvést buněčnou selektivitu obou peptidů RGD.

Osteoblasty $\alpha\text{v}\beta_3/\alpha\text{v}\beta_5$ -pozitivní přilnuly přednostně na tvarované prvky PMMA povlečené akrylátovým peptidem 3 ($\alpha\text{v}\beta_3/\alpha\text{v}\beta_5$ -selektivně) ve srovnání s $\alpha\text{v}\beta_3/\alpha\text{v}\beta_5$ -negativními destičkami (obr. 14). Pro osteoblasty se zjistily vypočtené Abs (405 nm) přibližně 6,0 Abs (pro 100 μM peptidu v povlékacím roztoku), přibližně 2,0 Abs (pro 10 μM peptidu) nebo 1,8 Abs (pro 1 μM peptidu). Pro destičky se však zjistily podstatně nižší hodnoty buněčné adheze přibližně 3,0 Abs (pro 100 μM peptidu v povlékacím roztoku), přibližně 1,5 Abs (pro 10 μM peptidu) nebo přibližně 0,2 Abs (pro 1 μM peptidu). Opačný jev se však zjistil u tvarovaných prvků PMMA povlečených akrylátovým peptidem 5 ($\alpha\text{IIb}\beta_3$ -selektivně). V tomto případě ulpívaly destičky na přednostně $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -pozitivní oproti $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -negativním osteoblastům (obr. 15)

Pro destičky se zjistily vypočtené Abs (405 nm) přibližně 4,0 (pro 100 μM peptidu v povlékacím roztoku), přibližně 0,5 Abs (pro 10 μM peptidu) nebo přibližně 0,2 Abs (pro 1 μM peptidu). Pro osteoblasty byly však zjištěny významně nižší hodnoty buněčné adheze, přibližně 1,5 Abs (pro 100 μM peptidu v povlékacím roztoku), přibližně 1,0 Abs (pro 10 μM peptidu) nebo přibližně 0,2 Abs (pro 1 μM peptidu).

b. Ve druhé části pokusu se podobně tvarované prvky PMMA povléknou akrylátovými peptidy 3 a 5, avšak vždy pouze v koncentraci povlékacího roztoku 100 μM . Materiály povlečené peptidy RGD se pak očkují paralelně ostoblasty, destičkami nebo směsí osteoblastů a destiček a stanoví se jejich buněčná adheze. V každém případě se paralelně naočkují osteoblasty MC3T3 H1 (350000 buněk/ cm^2), lidské destičky (50 milionů buněk/ cm^2) a směs buněk (350000 buněk/ cm^2 nebo 50 milionů buněk/ cm^2) jak na tvarované prvky PMMA povlečené akrylátovým peptidem 3 tak akrylátovým peptidem 5 a jejich buněčná adheze se stanoví způsobem popsaným v příkladu 3.

Osteoblasty $\alpha\text{v}\beta_3/\alpha\text{v}\beta_5$ -pozitivní (přibližně 6,0 Abs) přilnuly přednostně na tvarované prvky PMMA povlečené akrylátovým peptidem 3 ve srovnání s $\alpha\text{v}\beta_3/\alpha\text{v}\beta_5$ -negativními destičkami (přibližně 3,0 Abs) (obr. 16). Jestliže se oba druhy očkují jako směs, získá se výsledek odpovídající osteoblastům samotným (přibližně 6,5 Abs.).

Opačný jev byl však zjištěn u tvarovaných prvků PMMA povlečených akrylátovým peptidem 5 ($\alpha\text{IIb}\beta_3$ -selektivně). Destičky ($\alpha\text{IIb}\beta_3$ -pozitivní) (přibližně 4,0 Abs) ulpívaly přednostně v porovnání s $\alpha\text{IIb}\beta_3$ -negativními osteoblasty (přibližně 1,5 Abs) (obr. 17). Jestliže se oba buněčné druhy očkují jako směs, byl získán výsledek, který odpovídá přibližně součtu jednotlivých hodnot pro destičky a osteoblasty (přibližně 6,5 Abs.).

Tyto výsledky potvrzují, že povlaků implantátů různými buněčně selektivními peptidy RGD je možno použít k vytváření implantátů, které zprostředkují preferované adhezi vybraných buněčných druhů. V tomto případě z porovnání osteoblastů a destiček vyplývá:

- povrchový povlak integrin-selektivními peptidy RGD může výrazně stimulovat adhezi buněčných druhů, které mají komplementární integrinovou úpravu v porovnání s buňkami, které

nemají takové speciální integriny, nebo je mají jen v malé míře,

- tento jev přetrvává i když se použije směsí buněk, které se blíží více stavu in vivo.

Průmyslová využitelnost

Výroba biologicky funkcionalizovaných biomateriálů, zejména implantátů povlákáním na míru syntetizovanými peptidy RGD selektivními pro buňky nebo tkáně, které stimulují in vitro adhezi buněčných druhů, které jsou určeny k dosažení tkáňové integrace odpovídajícího biomateriálu.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Implantát vhodný pro různé lidské a zvířecí orgány, sestávající v podstatě z nosičové matrice a z peptidového povlaku této matrice, který obsahuje stejné nebo odlišné peptidy pro cílenou adhezní stimulaci buněk lidského nebo zvířecího těla, které mají sekvence rozpoznávající vazebná místa na integrinových receptorech zodpovědných za adhezi na buňkách lidského nebo zvířecího těla, přičemž nosičová matrice má reaktivní skupiny schopné vazby na svůj povrch, které jsou schopny vstupovat do stálých kovalentních vazeb se vhodnými funkčními reaktivními skupinami peptidové vrstvy, v y z n a č u j í c í s e t í m, že peptidy jsou uspořádány na povrchu implantátu tak, že na základě své odpovídajících rozličných, strukturně podmíněné adhezi buněk stimulující aktivity odpovídají specificky přirozeně odlišnému komplementárnímu integrinovému modelu tkáňových buněk s nimi sousedících v určité oblasti, do které má být implantát začleněn prostřednictvím místně odlišeného, selektivního, bioaktivního povlakového modelu povrchu implantátu.

2. Implantát podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že peptidy jsou vázány na povrchu implantátu pomocí kotvicích molekul.

3. Implantát podle nároku 2, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kotvicí molekuly mají jednu z následujících struktur:
 $-\text{CO}-(\text{CH}_2)_k\text{X}-\text{SH},$ (i)

kde znamená X jednoduchou vazbu nebo skupinu

$-\text{CO}-\text{NH}-(\text{CH}_2)_l$, $k = 2$ až 12 a $l = 2$ až 4 ,

$-\text{CO}-(\text{CH}_2)_m-[\text{NH}-\text{CO}-(\text{CH}_2)_n]_p-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2,$ (ii)

kde m a $n = 2$ až 8 , $p = 0$ až 2 ,

$-(\text{CO}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH})_q-\text{CO}-(\text{CH}_2)_r-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2-$ (iii)

kde $q = 1$ až 3 a $r = 2$ až 8 .

4. Implantát podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kotvicí molekuly mají jednu z následujících struktur:
- CO-CH₂-CH₂-SH (ia)
 - CO-CH₂-CH₂-CO-NH-CH₂-CH₂-SH (ib)
 - CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂ (iia)
 - CO-(CH₂)₅-NH-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂ (iib)
 - CO-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-NH-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂ (iiaa)
 - (CO-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-NH)₂-CO-(CH₂)₅-NH-CO-CH=CH₂ (iibb)
5. Implantát podle nároku 2 až 4, v y z n a č u j í c í s e t í m, že peptidy jsou vázány na povrchu implantátu prostřednictvím karboxylové skupiny kotvicí molekuly amidovou vazbou a kotvicí molekuly jsou vázány na povrch implantátu prostřednictvím merkaptoskupiny nebo akrylátové skupiny.
6. Implantát podle nároku 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že peptidová kotvicí molekula je vázána na povrch implantátu tak, že stericky rozhodující, absolutní minimální vzdálenost mezi buňkou rozpoznávací doménou peptidu a povrchem nepovlečeného materiálu je 2,5 až 3,5 nm.
7. Implantát podle nároku 1 až 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že peptidy jsou schopny vázat αvβ₃/αvβ₅-expresující buňky.
8. Implantát podle nároku 1 až 7, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje peptidy mající aminokyselinovou sekvenci RGD.
9. Implantát podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje peptidy se sekvencí cyklo-RGDFK.
10. Implantát podle nároku 1 až 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje mezivrstvu podporující adhezi a/nebo rozvětvené molekuly, které přispívají efektu rozšíření povrchu

mezi peptidy nebo molekulami kotvicími peptid a povrchem nosičové matrice.

11. Implantát podle nároku 1 až 10, v y z n a č u j í c í s e t í m, že nosičovou matricí je vhodně tvarovaná keramika, polymerní materiál, kov nebo je matrice konstruovaná z těchto materiálů, které mohou být vytvořeny jako biohybridní orgán kolonizovaný buňkami in vitro nebo in vivo.

12. Způsob výroby implantátu podle nároku 1 až 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že

- i) integrinová receptorová struktura cílové tkáně, do které se má implantát začlenit in vivo, se stanovuje testovacím systémem in vitro,
- ii) selektují a syntetizují se peptidy mající vhodnou komplementární strukturu,
- iii) peptidy se kovalentně váží na příslušný, popřípadě modifikovaný povrch implantátu přímo nebo prostřednictvím zakončujících molekul, přičemž lokální uspořádání různých peptidů na povrchu implantátu odpovídá určitému předem stanovenému lokálnímu uspořádání cílových buněk majících komplementární integrinový model, do kterého se implantát začleňuje.

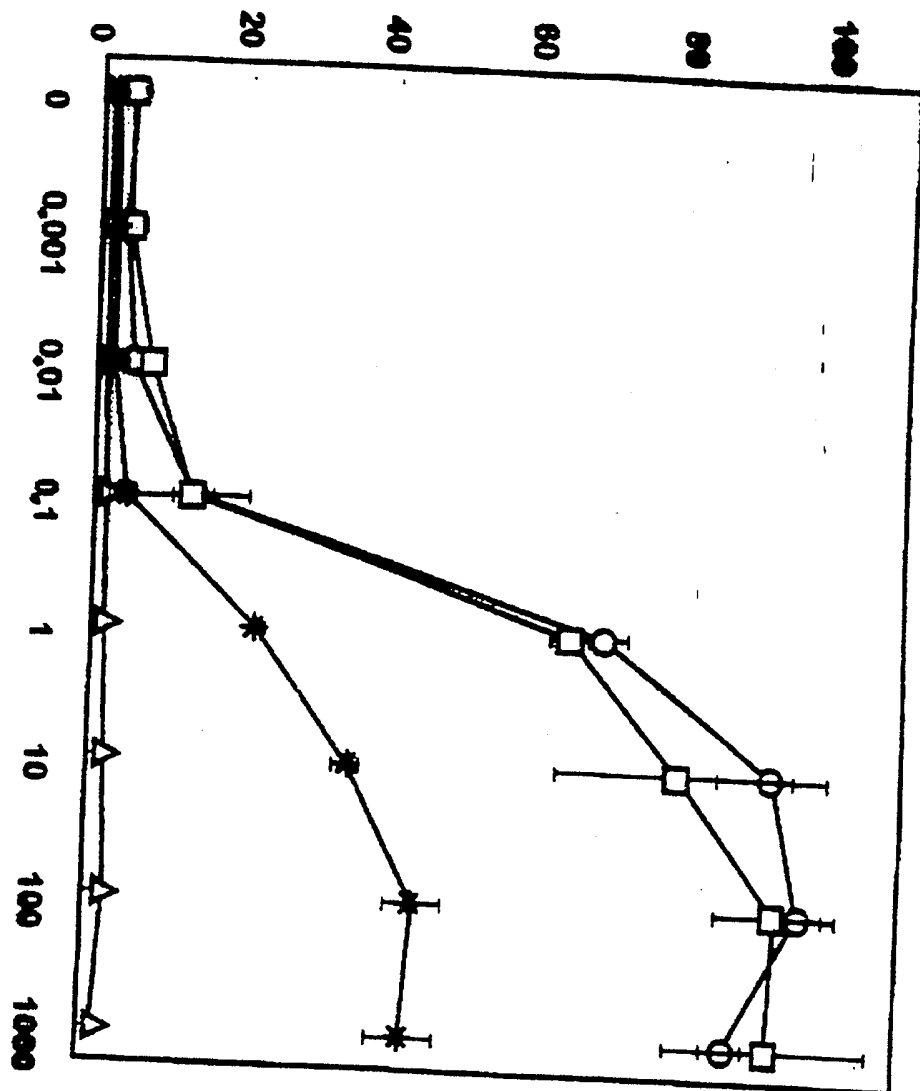
13. Způsob výroby implantátu podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se provádí in vitro stanovení integrinové receptorové struktury cílové tkáně pomocí imunohistologicky aktivních protilátek.

14. Způsob výroby implantátu podle nároku 12 nebo 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že kopulace peptidů nebo kotvicích molekul peptidu na povrch implantátu se provádí o sobě známými způsoby povlékání.

201199

4123-99

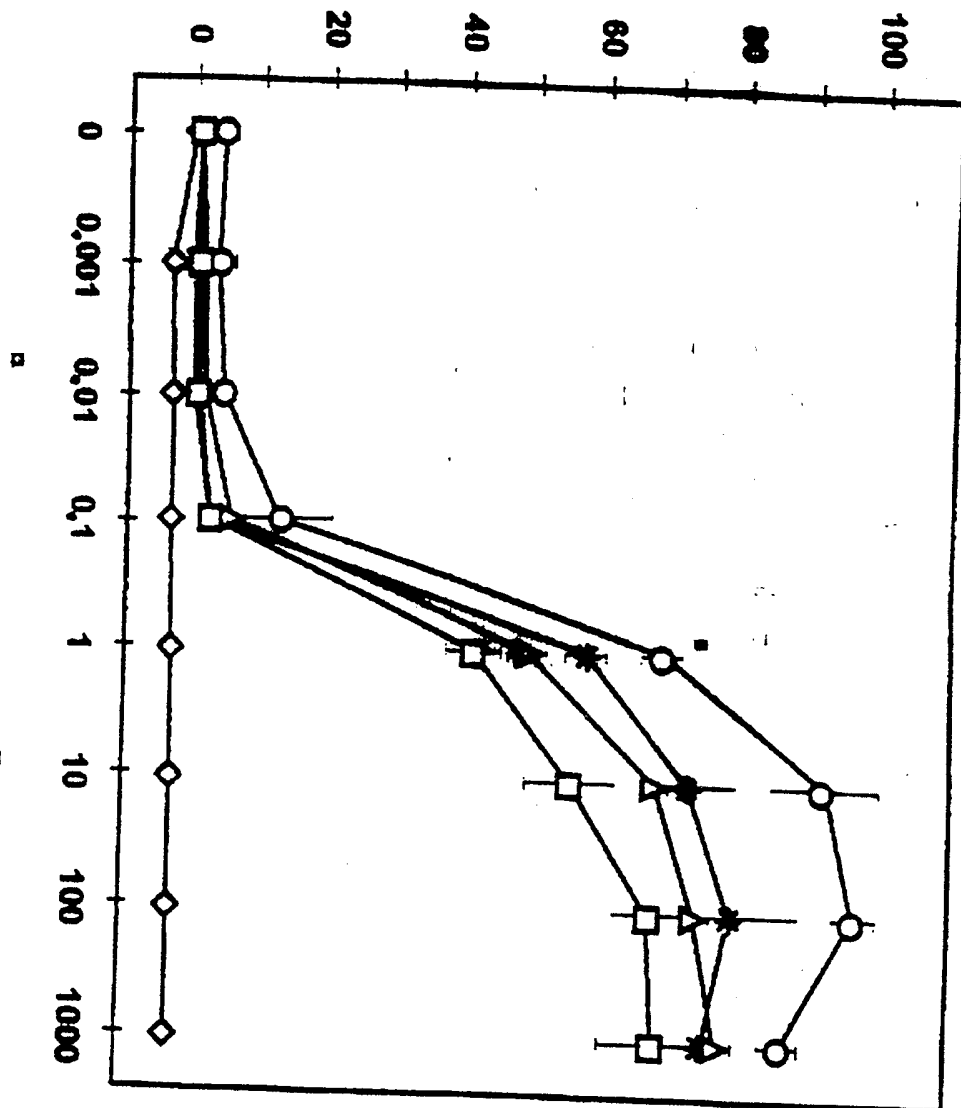
2/17



201199

4123-99

3/17



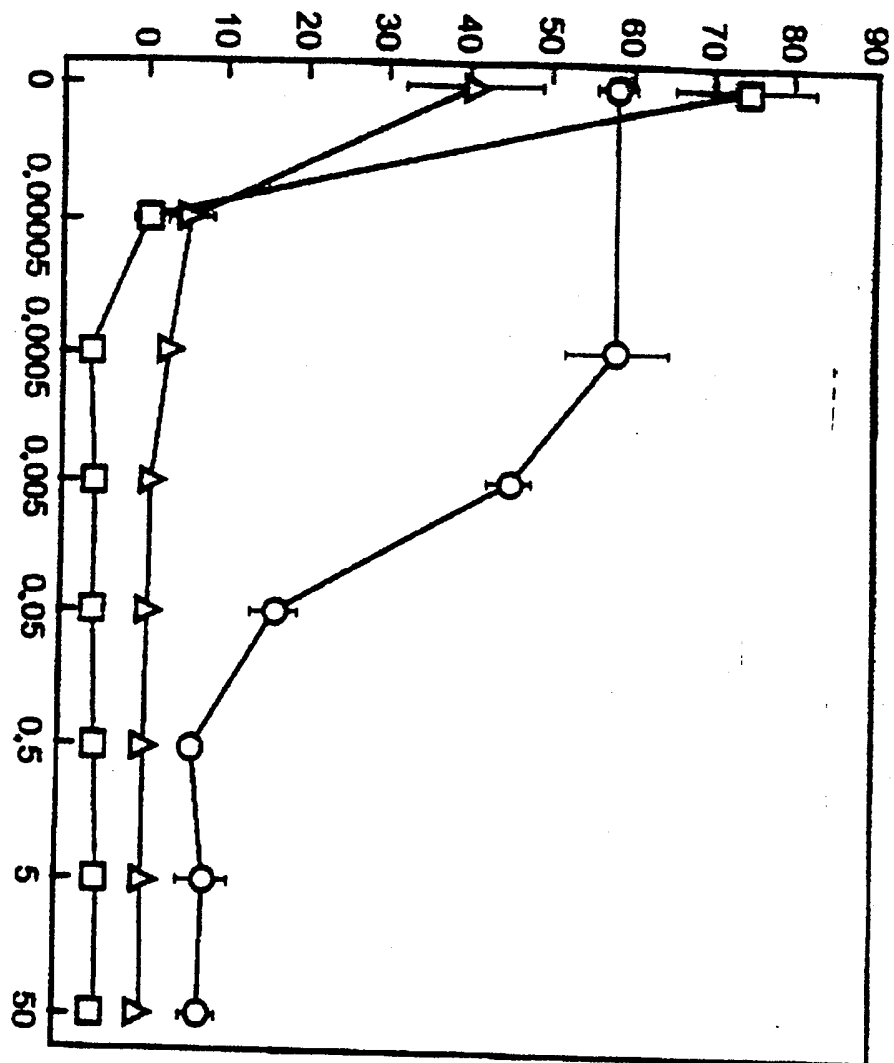
OBR . 3

✓

23.11.99

4123-99

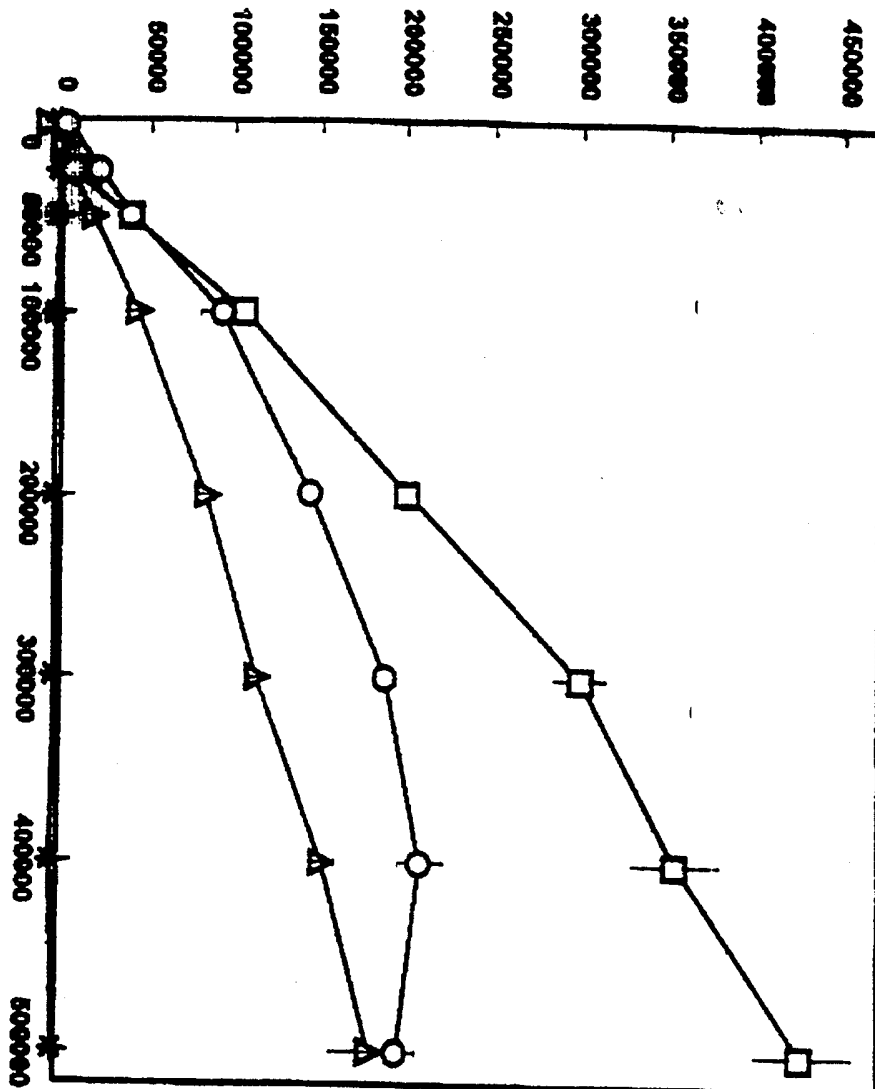
4/17



20.11.99

4123-99

5/17



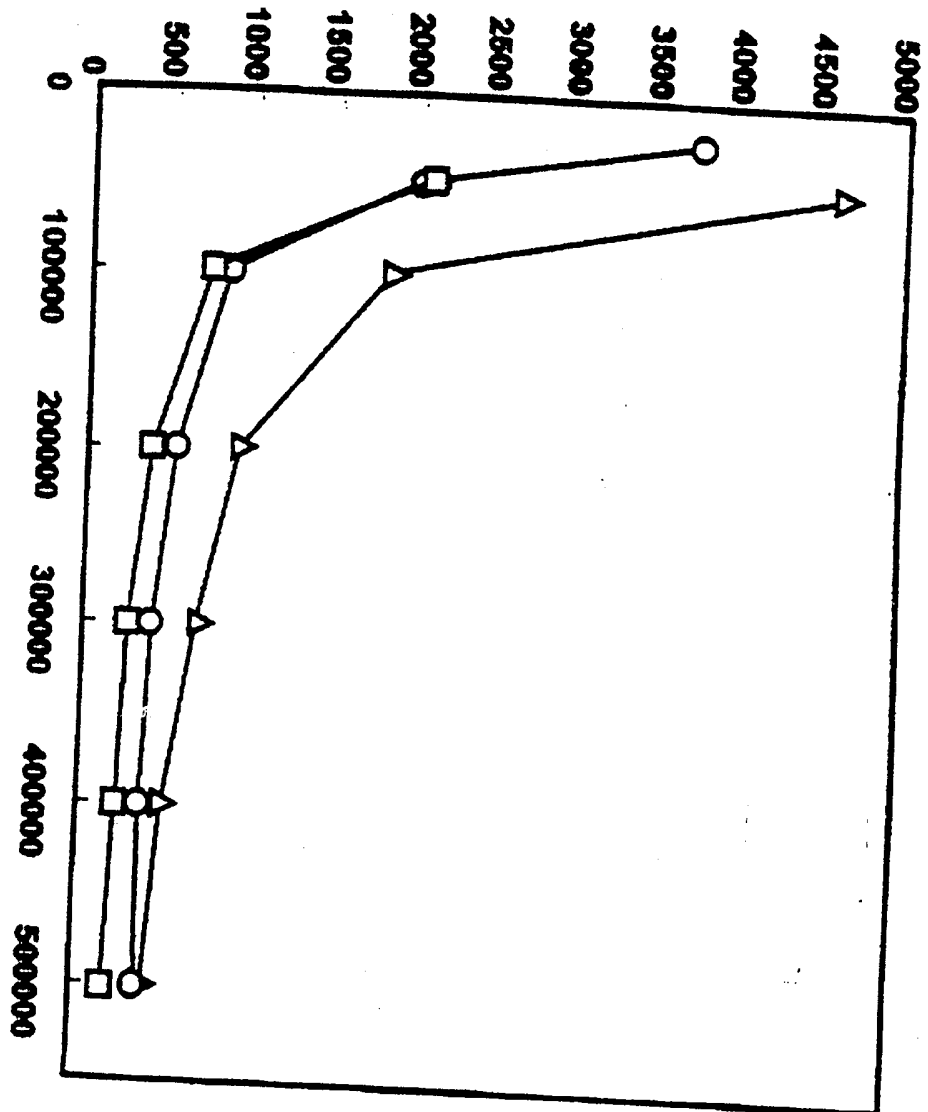
OBR . 5

k

23.11.99

4123-99

6/17

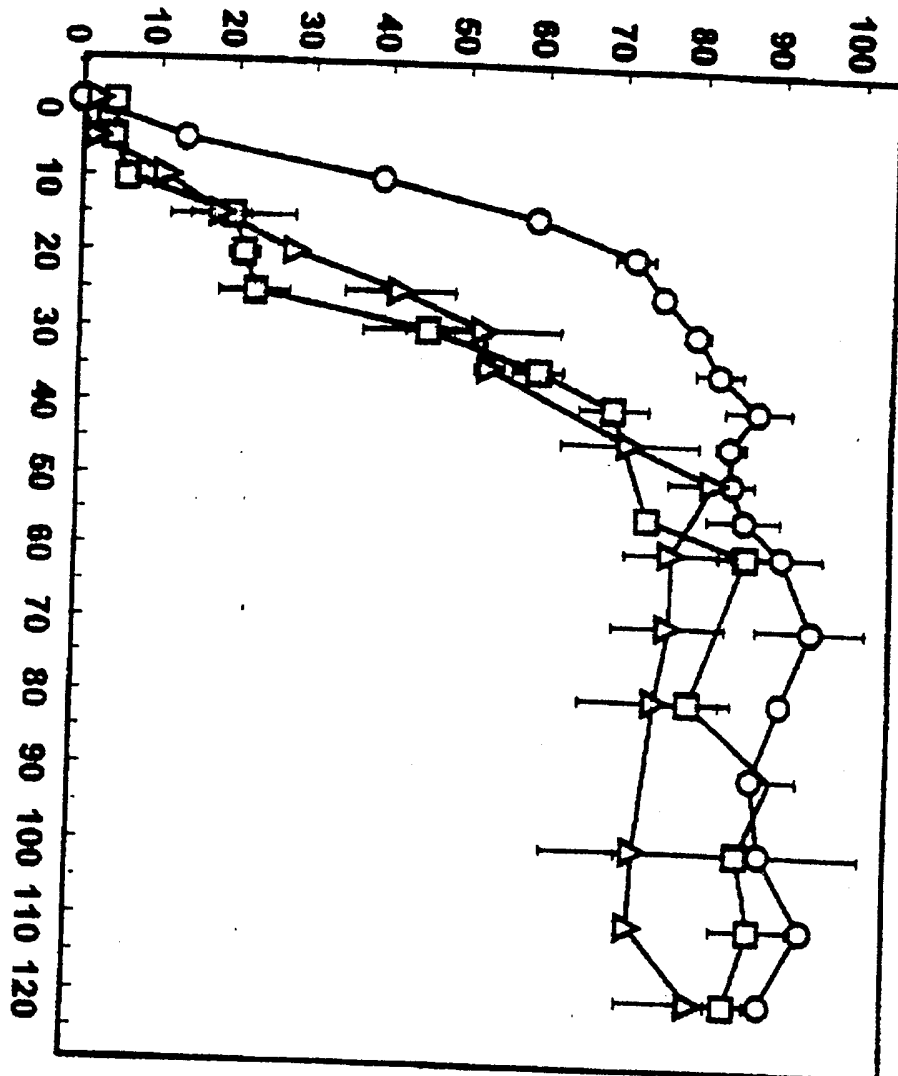


W

23.11.99

4123-99

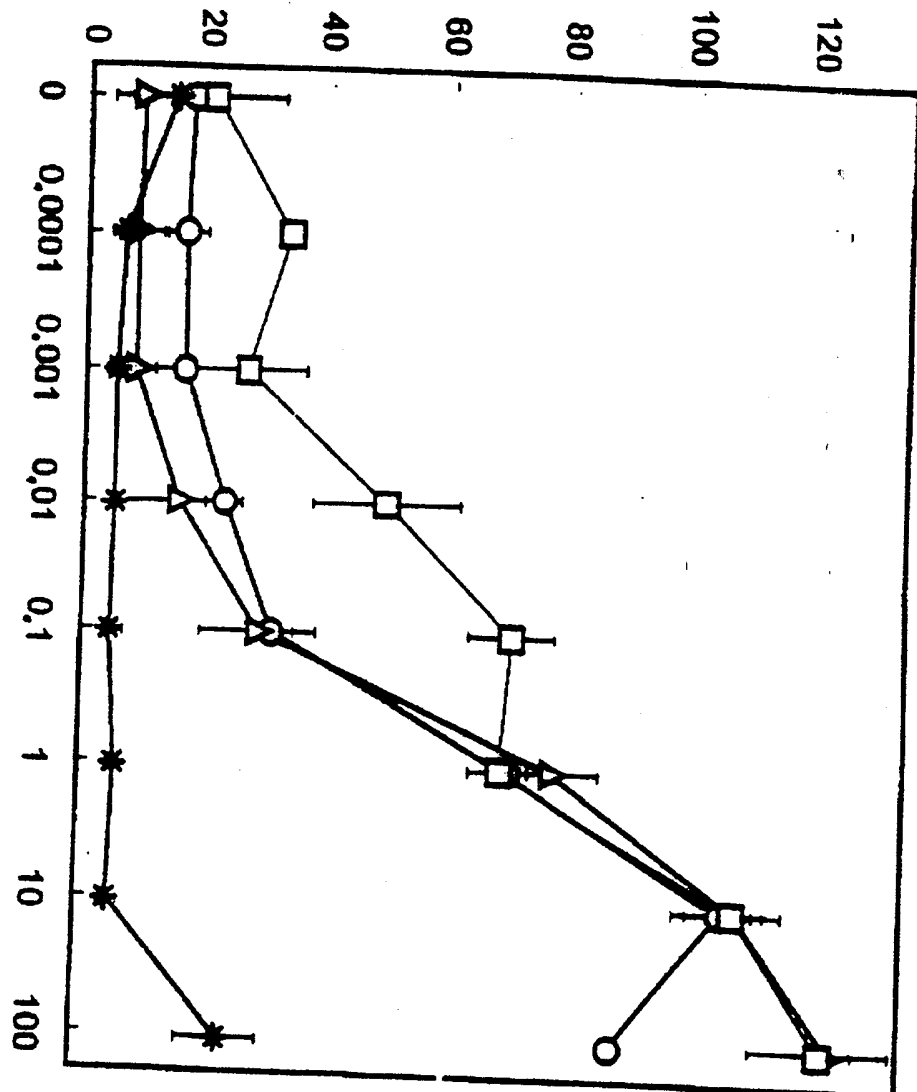
7/17



23.11.99

4123-99

8/17



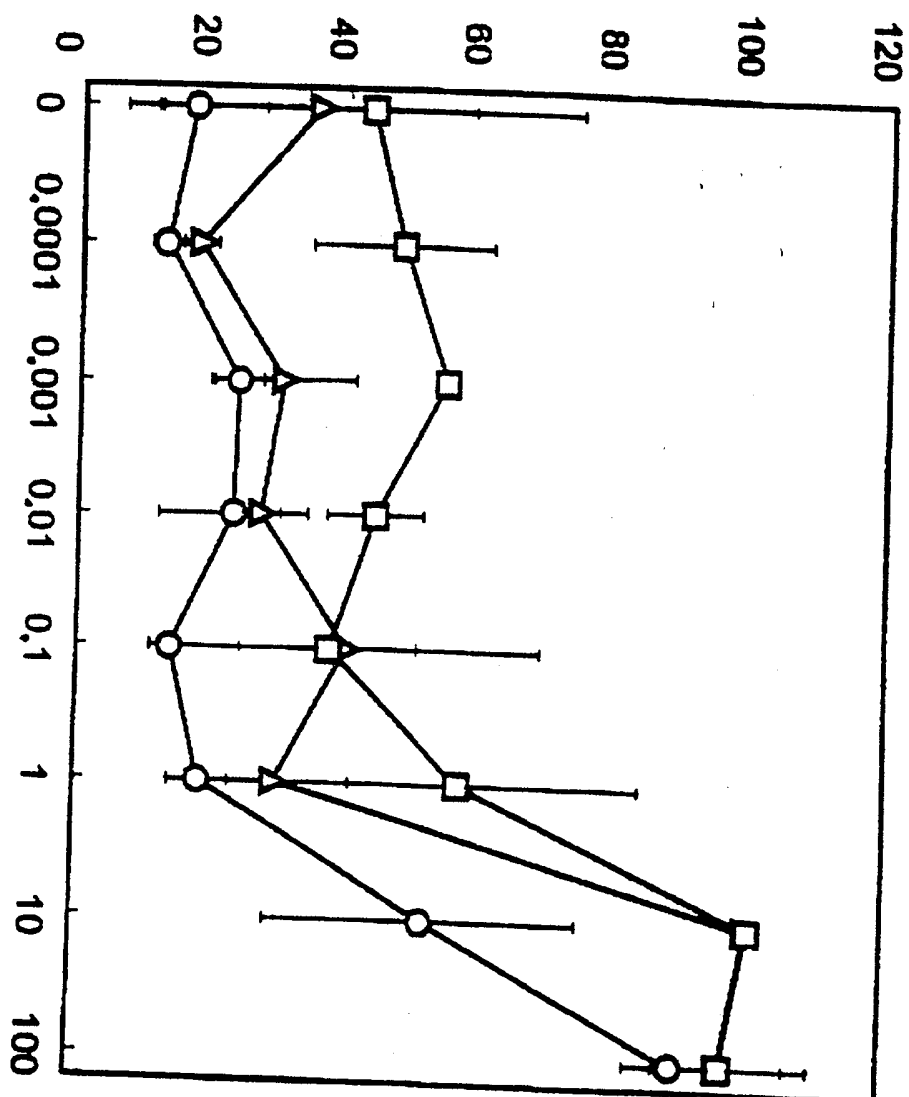
OBR . 8

k

23.11.99

4123-99

9/17



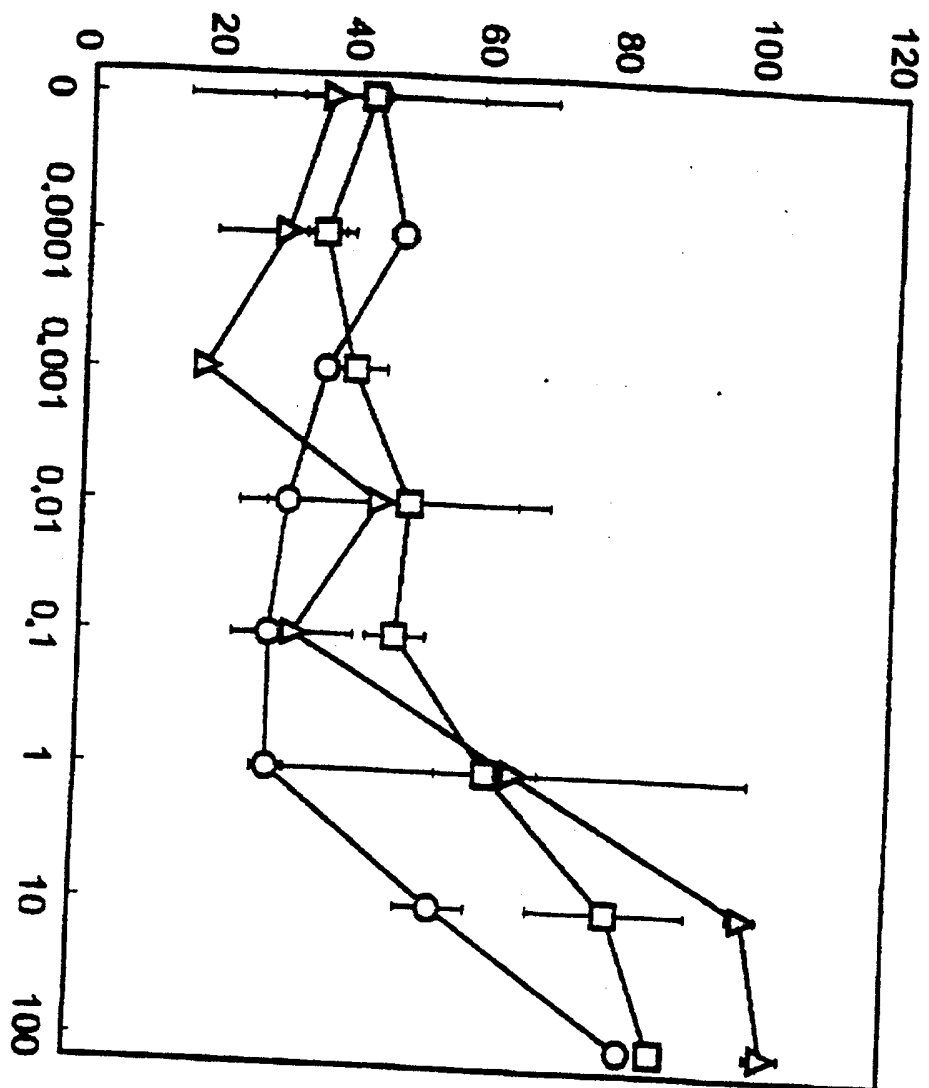
OBR . 9

h

23.11.99

4123-99

10/17

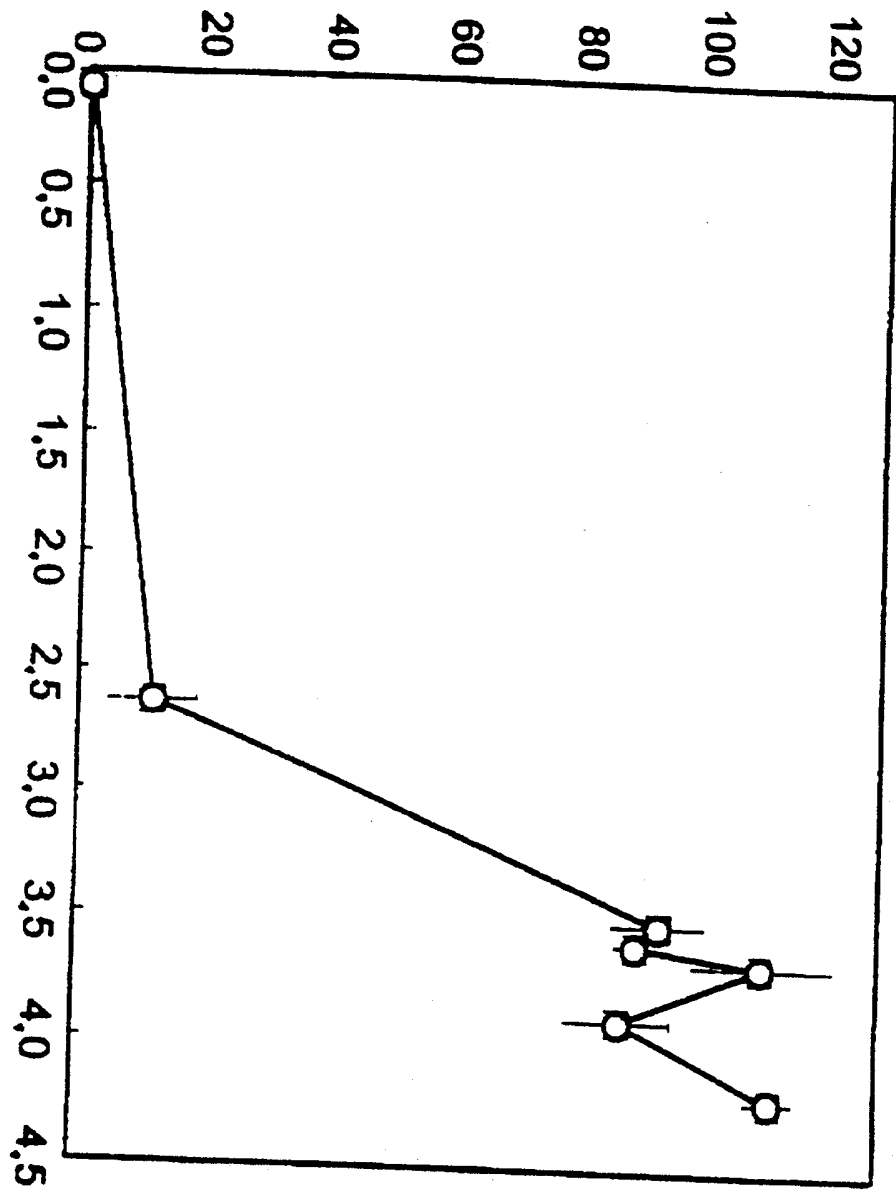


V

23.11.99

4123-99

11/17



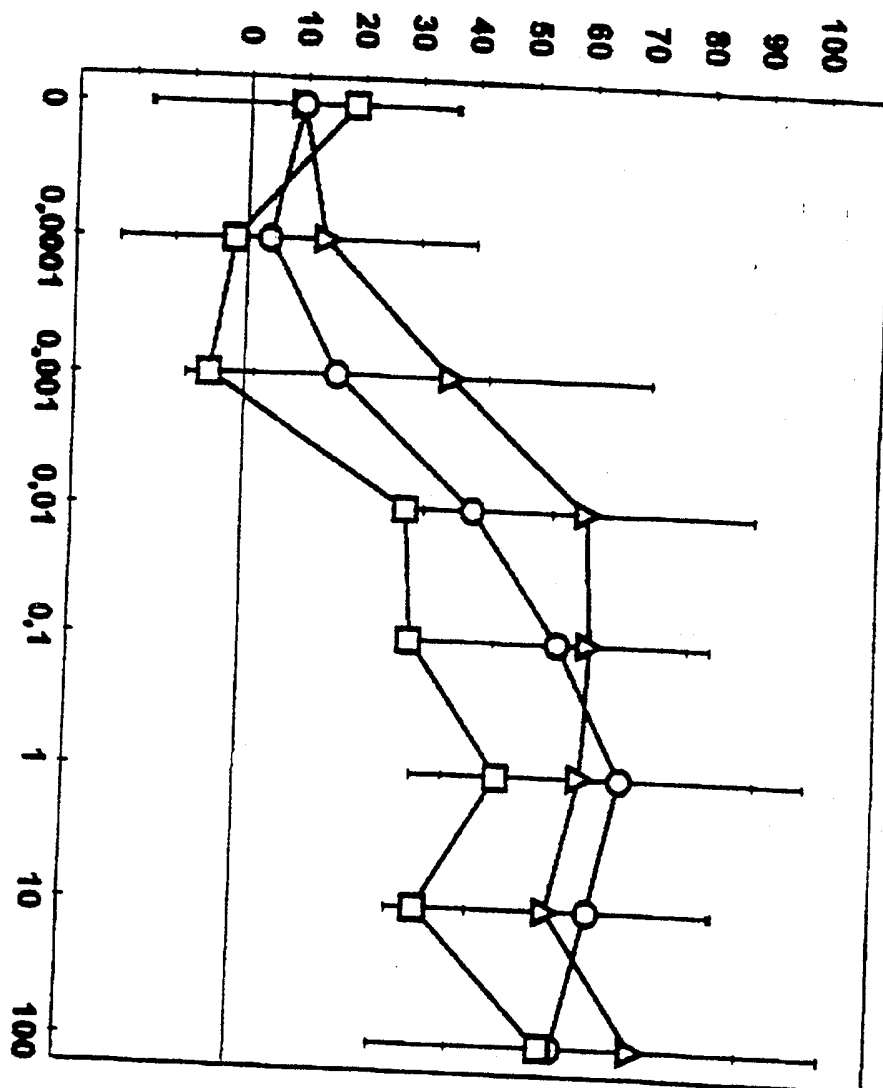
OBR . 11

k

23.11.99

4123-99

12/17

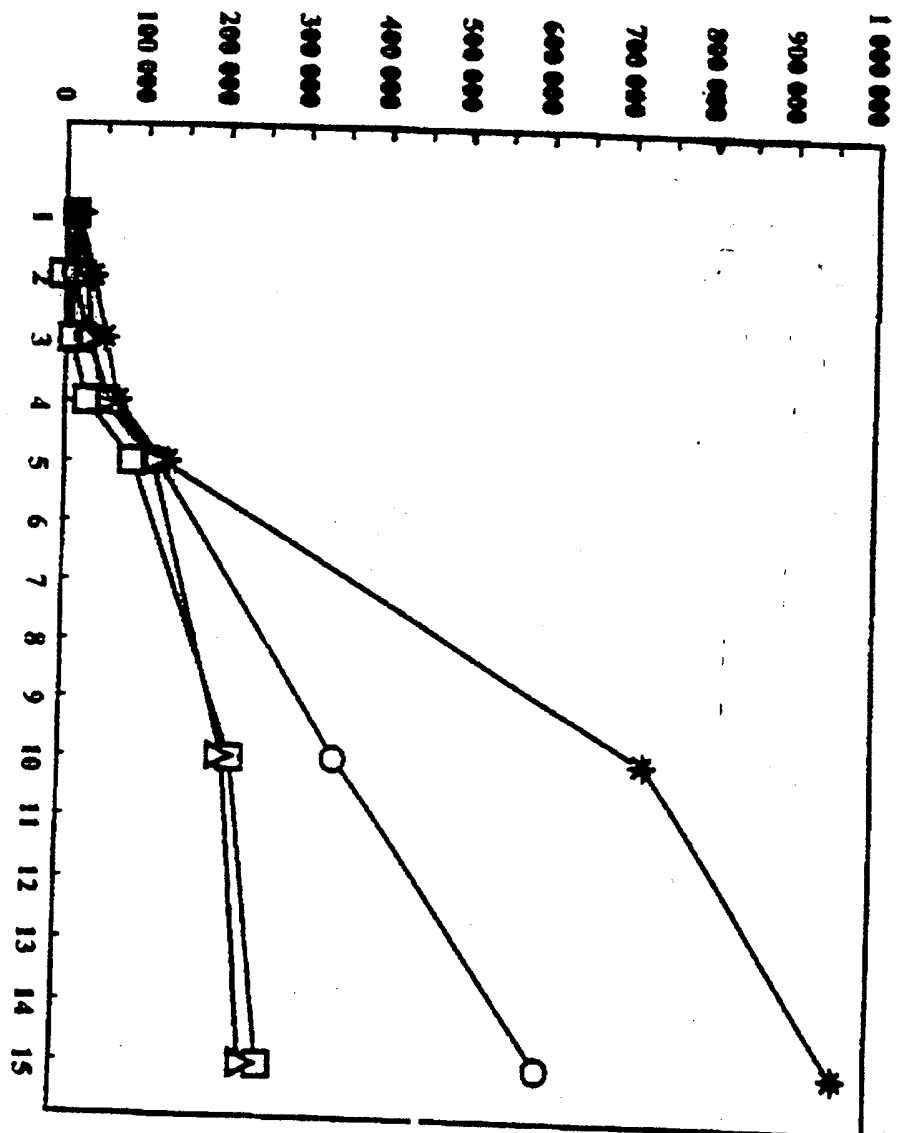


OBR. 12

23.11.99

4923-99

13/17



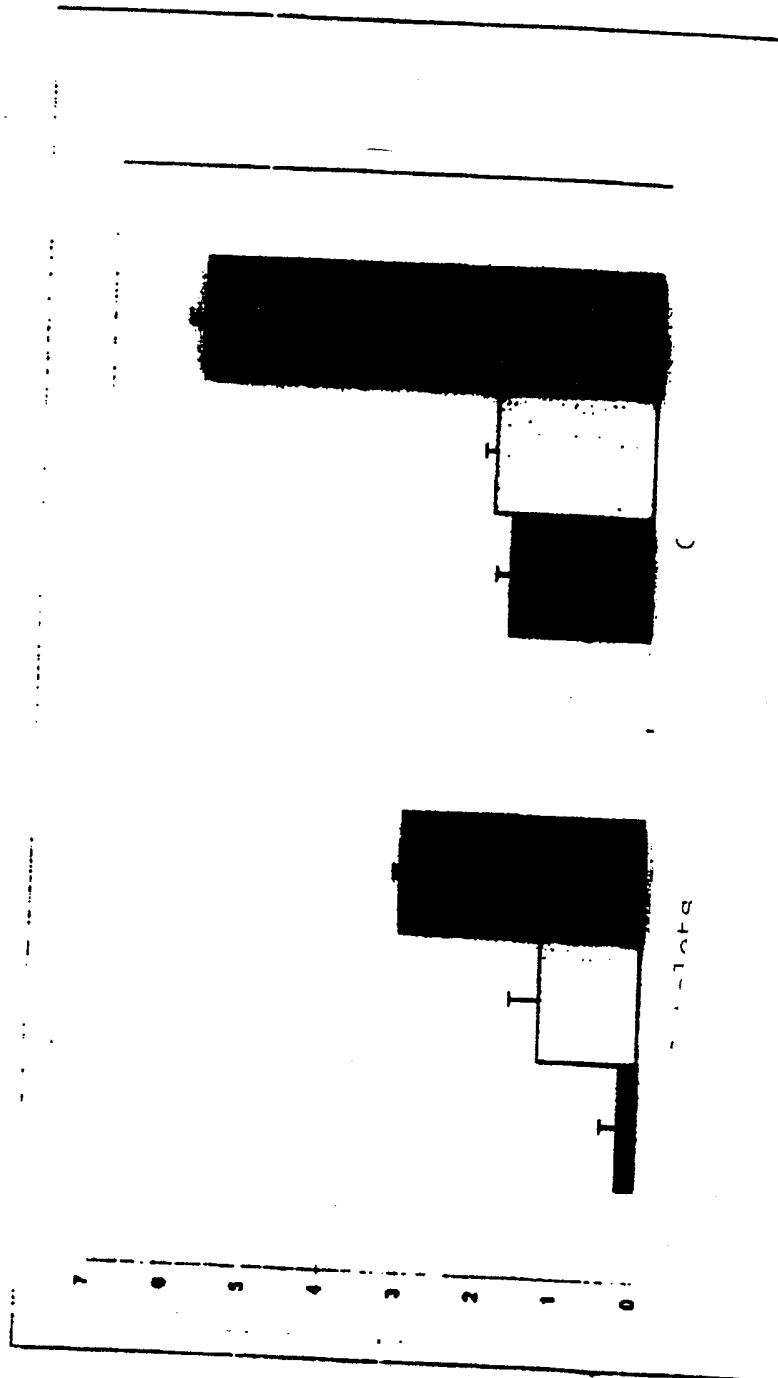
OBR . 13

✓

23.11.99

4123-99

14/17



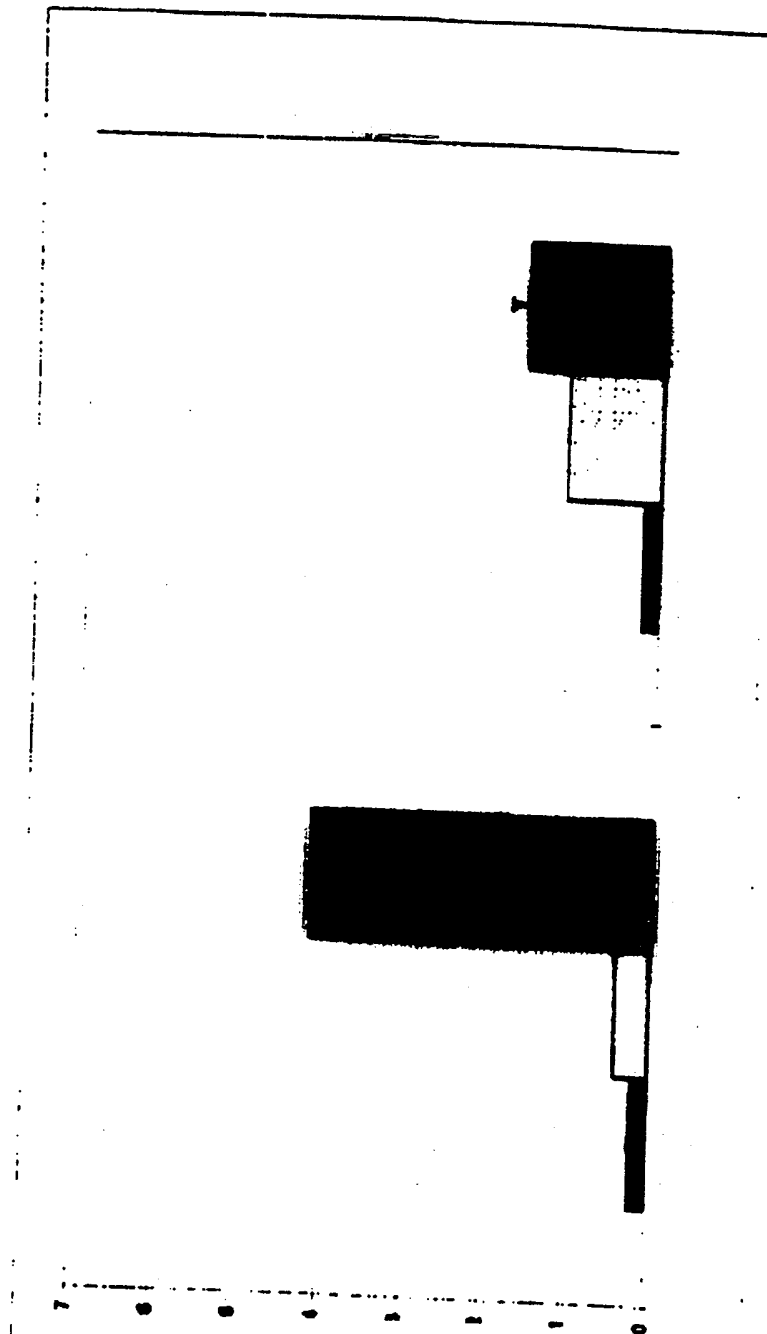
OBR. 14

4

23.11.99

4123-99

15/17



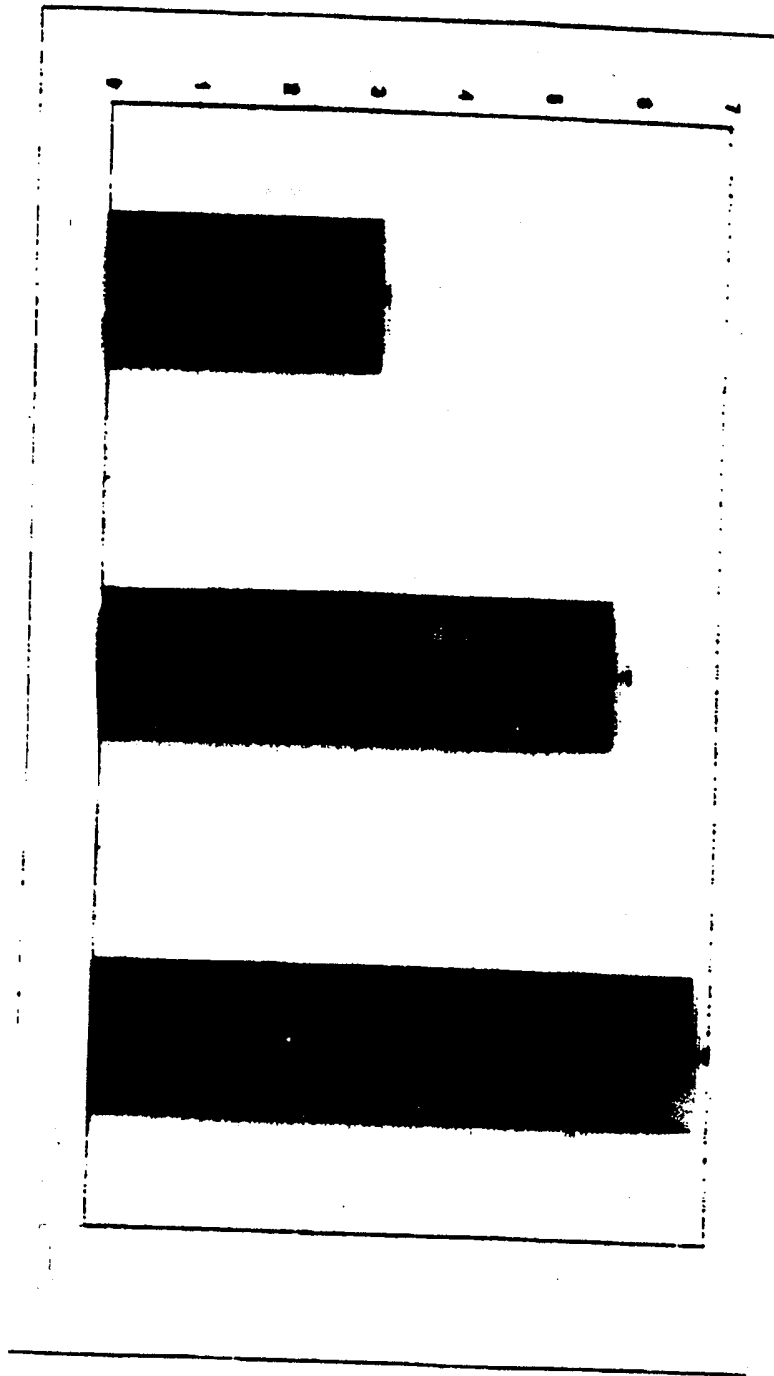
OBR . 15

U

23.11.99

4123-99

15/17



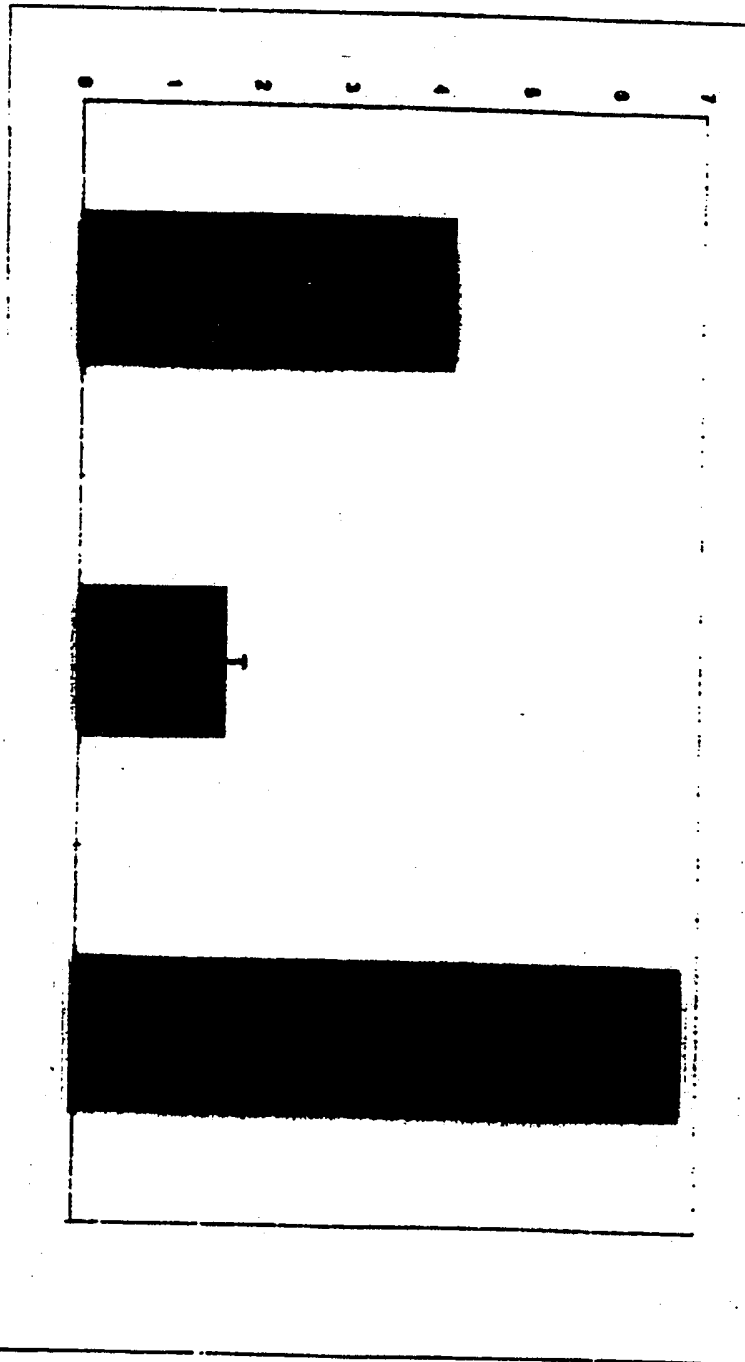
OBR. 16

K

23.11.99

4123-99

17/17



K