

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. März 2009 (12.03.2009)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2009/030217 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12N 5/00 (2006.01)

(74) Anwalt: SIMANDI, Claus; Höhenstrasse 26, 53773 Hen-
nef (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE2008/001470

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE,
EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
3. September 2008 (03.09.2008)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2007 041 655.7
3. September 2007 (03.09.2007) DE

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): MEDICYTE GMBH [DE/DE]; Im Neuen-
heimer Feld 581, 69120 Heidelberg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BRASPENNING,
Adrianus, J., C., M. [DE/DE]; Heidelberger Strasse
47, 69436 Schönbrunn-Haag (DE). HOLDER, Stefan
[DE/DE]; Werastrasse 67, 70190 Stuttgart (DE). KÜP-
PER, Heiner [DE/DE]; Ostkrichstrasse 50, 47574 Goch
(DE).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

(54) Title: PROPAGATION OF PRIMARY CELLS AND USE THEREOF

(54) Bezeichnung: VERMEHRUNG VON PRIMÄREN ZELLEN UND DEREN VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to a method for propagating or concentrating primary cells without tumorous characteristics
and to the subsequent use thereof.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Vermehrung oder Anreicherung von primären Zellen ohne Tu-
moreigenschaften und deren weitere Verwendung.



WO 2009/030217 A2

Titel: Vermehrung von primären Zellen und deren Verwendung**Beschreibung**

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Vermehrung oder Anreicherung von primären Zellen ohne Tumoreigenschaften und deren weiteren Verwendung.

Die Bereitstellung von geeigneten Zellen für den Menschen ist eine medizinische Herausforderung, sei es zu Zwecken im
10 therapeutischen in-vivo Einsatz oder in der Entwicklung von in-vitro Zellsystemen einschließlich zugehöriger Zellkulturen. Darüber hinaus besteht ein großes Bedürfnis Zellkulturen zu etablieren, die möglichst ähnlich zu humanen Zellen sind, sei es für die Testung von Medikamenten, in der Forschung etc.

15

Im Stand der Technik haben sich Zelllinien etabliert, dies sind Zellen, die sich auf entsprechendem Nährboden unbegrenzt fortpflanzen können und immortal sind. Bekannt sind insbesondere Tumorzellen oder tumorähnliche Zellen sowie
20 einschlägig bekannt HeLa-Zellen - Cervix-Karzinom Zelllinie, COS-Zellen, HEK-293 Zellen - Niere, Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen, HEp-2 - humane epitheliale Larynxkarzinom-Zelllinie u.v.a. Die Herstellung von solchen Zelllinien ist beispielsweise in EP833934 (Crucell) beschrieben. Solche
25 Zelllinien werden beispielsweise zur Medikamententestung eingesetzt. Nachteilig an solchen Zelllinien sind jedoch die genetischen Veränderungen (solche wie Punktmutationen, Austausch von Chromosomenstücken (Rearrangements), Erhöhung der Kopienzahl von Genen (Genamplifikation) und sogar

Veränderungen der Chromosomensätze (Aneuploidie)) sowie die Tumor-Eigenschaften infolge eintretender Immortalisierung und unbegrenzter Teilungsfähigkeit. Es ist bekannt, dass sich die Zellen solcher Zelllinien im Lauf der Kultivierung durch

5 spontane Mutationen allmählich verändern und sich zu einer malignen Zellpopulation entwickeln können und genetisch instabil sind. Nach Erkenntnis der Erfinder tritt hierbei eine kritische Schwelle von angesammelten Mutationen schon nach etwa 60 Zellteilungen in der Kultur ein. Dies können

10 Mutationen sein, die zur Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen.

In einer Zellpopulation können sich daher solche Zellen durchsetzen, die aufgrund der angesammelten Mutationen eine erhöhte Zellteilungsaktivität haben. Dieser Selektionsprozess

15 entspricht der Präkanzerose bei der Tumorentstehung; zusätzlich haben die im Handel erhältlichen Zelllinien zumeist eine nicht bekannte Anzahl von Verdopplungen bereits hinter sich, falls sie nicht ohnehin von malignen Tumorzellen abstammen.

20

Tabelle 1: Eigenschaften von Zellen mit erweiterter Verdopplungskapazität verglichen mit anderen Zellsystemen

Zellsystem Eigenschaft	Primäre Zellen	Zellen mit erweiterter Verdopplungs- kapazität	Tumorzelllinien
Herstellung	Aus natürl. Gewebe	Aus primären Zellen	Aus Tumoren
Anzahl möglicher Zellteilungen	Begrenzt auf 10-25 ^a	Begrenzt auf 30 - 60	unbegrenzt
Erscheinungsbild	Natürlich	Natürlich	verändert
Genetisch stabil	Ja	Ja	Nein
Wachstum in Soft Agar ^b	Nein	Nein	Ja
Tumorstadium in vivo ^c	Nein	Nein	Ja

- a) Die tatsächliche Zellteilungsfähigkeit hängt vom Alter des Zellspenders ab, je älter der Spender, desto mehr Teilungen haben jene Zellen durchgeführt.
- b) Die zu untersuchenden Zellen werden mit einer speziellen Agarose überschichtet (Soft Agar); Zellen, die ihre natürliche Fähigkeit zur Kontaktinhibition verloren haben, wachsen als Kolonien in den Soft Agar hinein. Dies wird oft auch als Transformation bezeichnet und ist eine Voraussetzung für Tumorentstehung. Diese bedarf aber meist noch weiterer Schritte wie z.B. Zell-Immortalisierung. Natürliche Zellen haben keine Fähigkeit zum Wachstum in Soft Agar.
- c) Um maligne Entartung von Zellen nachzuweisen, reicht in der Regel der Soft Agar Test nicht aus. Ein gängiger und dem Fachmann bekannter Test ist das Grafting von den zu testenden Zellen in immundefekten Mäusen (engl. nude mice oder SCID mice). Aufgrund des eingeschränkten oder fehlenden Immunsystems werden sogar Zellen anderer Spezies

(Xenografts) nicht immunologisch abgestoßen und können zu Tumoren auswachsen, sofern es sich um maligne Tumorzellen handelt.

Es besteht jedoch ein großer Bedarf, solche Zellen aus primären Zellkulturen zu gewinnen, welche im Vergleich zu primären Zellen eine Erweiterung ihrer natürlichen Teilungsfähigkeit aufweisen, jedoch möglichst keine Eigenschaften von Tumorzellen haben, insbesondere solche von malignen Tumorzellen, wie z.B. Wachstum in Soft Agar oder gar Tumorstadium in vivo und zudem weitgehend keine Mutationen angesammelt haben.

Die Verfügbarkeit von primären Zellen ist nicht nur für die Forschung sowie in der biotechnologischen und pharmazeutischen Industrie von großer Bedeutung, sondern auch für Zell-basierte

Therapien zur Behandlung von degenerativen Erkrankungen. Dazu zählen z.B. Herzmuskelschwäche, Leberzirrhose, Parkinson-Krankheit und Insulin-abhängiger Diabetes.

Der Mangel an primären Zellen limitiert bisher jedoch ihre
5 Anwendung.

Unter dem Begriff „primäre Zellen“ werden im Rahmen der Erfindung direkt aus Körperflüssigkeiten oder aus Körpergeweben gewonnene Explantate mit normalen, d.h. nicht
10 entarteten Zellen, von vielzelligen Organismen, wie z.B. dem Menschen, verstanden. Primäre Zellkulturen sind in Kultur genommene primäre Zellen bis zur ersten Passage. Primäre Zellen haben die natürlichen Differenzierungseigenschaften und sind mortal.

15 Unter dem Begriff „Typ I Zellen“ werden im Rahmen der Erfindung solche primäre Zellen bezeichnet, die in Kultur zur Vermehrung gebracht werden können, jedoch nach ein paar wenigen Verdopplungen aufhören zu wachsen und absterben. Typ I Zellen machen eine kleine Anzahl von primären Zelltypen aus.
20 Diese Sterblichkeit der Zellen limitiert stark ihre Kommerzialisierung. Beispiele für solche Typ I Zellen sind Endothelzellen (Gefäßzellen), Keratinozyten (Hautzellen) oder Fibroblasten (Bindegewebszellen).

Unter dem Begriff „Typ II Zellen“ werden im Rahmen der
25 Erfindung solche primäre Zellen bezeichnet, die von Anfang an in der Kultur eine Arretierung ihrer Teilungsfähigkeit haben und daher nicht zur Vermehrung gebracht werden können. Typ II Zellen bilden die überwiegende Mehrheit von primären Zellen in

vielzelligen Organismen, wie z.B. dem Menschen. Beispiele für solche Typ II Zellen sind Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen), Inselzellen (Insulin-produzierende Zellen der Bauchspeicheldrüse), Neuronen (Nervenzellen) u.a.

5

Es ist lange bekannt, dass primäre Zellkulturen eine begrenzte Zellteilungsfähigkeit haben. Leonard Hayflick vom Wistar Institut (US) entdeckte bereits 1961, dass Fibroblasten von Neugeborenen 80-90 Zellteilungen machen können, die von 70-jährigen Personen teilten sich nur noch 20-30 Mal (Übersicht in: HAYFLICK, LEONARD The biology of human aging. American Journal of the Medical Sciences. 265(6):432-446, June 1973). Nach diesen Teilungszahlen gehen die Zellen in die Seneszenz. Ferner ist für primäre Zellen die so genannte verlängerte Lebensspanne (engl. Extended Life Span) beschrieben, wobei die Teilungsfähigkeit der primären Zellen zur Untersuchung der Krebsentstehung durch das Einschleusen von viralen Onkogenen wie SV40 TAg, Adenovirus E1A, HPV E6 und E7 oder zellulären Onkogenen wie c-ras und c-myc erhöht wird. In den untersuchten

15 Systemen wurde mittels Selektion, Mutagenese und weiteren Verfahren versucht, die Zellen über die „Extended Life Span“ hinaus zu immortalisieren, um einen Einfluss der viralen oder zellulären Gene auf die Krebsentstehung untersuchen zu können.

20

25

Um Zellen zusätzlich zu der verlängerten Lebensspanne hinaus zu vermehren, muss ein Verfahren verwendet werden, welches die bei jeder Zellteilung auftretende Verkürzung der chromosomalen Telomere kompensiert. Eine Möglichkeit dazu ist die Verwendung

der Telomerase (Harley, C. B. and B. Villeponteau. 1995. Telomeres and telomerase in aging and cancer. Curr.Opin.Genet.Dev. 5:249-255.). Zellen, welche den Telomerverlust beispielsweise durch Telomerase kompensieren können, haben eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit bzw. Immortalität. Dabei treten jedoch im Lauf der Zellteilungen nachteilig unvermeidlicherweise Mutationen auf, die früher oder später zur Krebsentstehung führen müssen.

10 Nicht bekannt im Stand der Technik ist jedoch eine gezielte Anreicherung oder Vermehrung - auch Gewinnung - von primären Zellen unter Vermeidung der Entstehung von Eigenschaften von Tumorzellen wie Wachstum in Soft Agar oder Tumorstadium in vivo.

15

Daher ist es Aufgabe der Erfindung ein solches Verfahren zur Anreicherung oder Vermehrung von primären Zellen bereitzustellen, die verfahrensgemäß weitgehend keine Tumoreigenschaften aufweisen.

20

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren zur Vermehrung von primären Zellen gelöst, wobei humane primäre Zellen in den folgenden Schritten:

a.) isoliert,

25

b1.) mit mindestens einem Proliferationsgen oder dessen Genprodukt in die Zelle funktionell eingebracht wird und / oder

b2.) mindestens ein zellulärer Faktor, der einen

Zellteilungsarrest induziert, inaktiviert wird,

c.) die Zellen kultiviert und / oder passagiert
und

d.) geerntet werden, wobei die geernteten Zellen keine

5 Tumoreigenschaften aufweisen.

Vorzugsweise können mehr als drei zusätzliche Passagen im Vergleich zu unbehandelten primären Zellen, mehr als fünf zusätzliche Passagen, vorzugsweise 20 - 40 zusätzliche Passagen, durchgeführt werden.

10 Durch die Begrenzung der Zellteilungen auf 20-40 zusätzliche Verdopplungen entfallen die unerwünschten Veränderungen, die bei immortalisierten Zellen nach mehr als 60 Verdopplungen zwingend auftreten.

15 Daher betrifft die Erfindung ein solches Verfahren mit den Schritten a.) - d.), wobei in Schritt c.) bis zu 20 - 40 Passagen erreicht werden können, ohne dass die erhaltenen Zellen Tumoreigenschaften aufweisen.

20 Besonders vorteilhaft gewährleistet daher das erfindungsgemäße Verfahren, dass die erhaltenen Zellen keine Eigenschaften von Tumorzellen annehmen, insbesondere von malignen Tumorzellen, wie z.B. Wachstum in Soft Agar oder Tumorstadium in vivo (das Anwachsen von Tumoren in Xenograft-Tiermodellen). Der Begriff
25 „Tumoreigenschaft“ bezieht sich jedoch nicht auf die Fähigkeit der erweiterten Verdopplungskapazität der Zielzellen durch das erfindungsgemäße Verfahren.

Ferner wird vorteilhaft keine eigene Immortalisierung der erhaltenen Zellen durch das erfindungsgemäße Verfahren erreicht. Daher erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren die Anreicherung oder Vermehrung von erhaltenen nicht-

5 immortalisierten Zellen.

Die Kultivierung erfolgt auf für den Fachmann bekannten Kulturmedien.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt die vorteilhafte
10 Anreicherung und Vermehrung von primären Zellen mit erweiterter Verdopplungskapazität, die zudem im Wesentlichen genetisch unverändert vorliegen wie primäre Zellen nach Kultivierung, während die meisten Zelllinien viele genetische Veränderungen aufweisen.

15

Der erfindungsgemäße Begriff „Ernten“ bedeutet, dass die erhaltenen Zellen kontinuierlich oder diskontinuierlich aus der Vermehrung entnommen oder gewonnen werden können und in beliebigen Einheiten (Mengen, Qualität, etc.) weiter
20 eingesetzt und verwendet werden können.

Der Begriff „Vermehrung oder Anreicherung von primären Zellen“ bedeutet die Bereitstellung von „Zellen mit erweiterter Verdopplungskapazität“ (siehe vergleichende Tabelle 1), wobei
25 das Verfahrensmerkmal b1.) oder b2.) im Anspruch 1 zu einer strukturellen Veränderung von primären Zellen des Ausgangsmaterials führen.

Die erweiterte Verdopplungskapazität erlaubt vorteilhaft die

Erzeugung einer wesentlich vergrößerten Zellmenge.

Im Rahmen dieser Erfindung ist ein Proliferationsgen ein solches, dass die Zellteilung verbessert und eine begrenzt
5 erweiterte Zellteilungskapazität in der primären Zelle ermöglicht, wobei die Wahrscheinlichkeit von Zelltransformation oder Veränderungen der Differenzierungseigenschaften sehr stark reduziert wird im Vergleich zu den Zelllinien, die Stand der Technik sind.

10 Insbesondere ist das Proliferationsgen nicht-immortalisierend. Erfindungsgemäß ist das Proliferationsgen vorzugsweise ausgewählt aus der Gruppe der viralen Proliferationsgenen: E6 und E7 von Papillomviren wie z.B. HPV (humanes Papillomvirus) und BPV (bovines Papillomvirus); das große und kleine TAg von
15 Polyomaviren wie z.B. SV40, JK-Virus und BC-Virus; die Proteine E1A und E1B von Adenoviren, EBNA- Proteine von Epstein Barr Virus (EBV); sowie das Proliferationsgen von HTLV und Herpesvirus Saimiri und jeweils deren kodierenden Proteine oder ausgewählt aus der Gruppe der zellulären
20 Proliferationsgene, insbesondere folgenden Klassen von Genen: myc, jun, ras, src, fyg, myb, E2F und Mdm2 und TERT (katalytische Untereinheit der Telomerase), vorzugsweise der humanen Telomerase hTERT).

In einer weiteren Ausführungsform ist das genannte TAg (1-708
25 AS, z:b. SV 40) im Bereich der Aminosäuren 1-121 und / oder 137 bis 708 mittels Punktmutationen, Deletionen und / oder Insertionen die transformierende Aktivität, jedoch unter Erhalt der p53 Bindungsdomäne („bipartite Domäne“) (Ruppert,

Stilman (1993), Analysis of a protein binding domain p53, Mol. Cell. Biol. 13, 3811-3820), ausgeschaltet.

Erfindungsgemäß bevorzugt sind jedoch virale

5 Proliferationsgene, besonders bevorzugt sind E6 und E7 von HPV oder BPV. Dabei können Proliferationsgene von HPV-Typen verwendet werden, die in Zusammenhang mit malignen Erkrankungen stehen. Die bekanntesten Beispiele für „High Risk“ Papillomviren sind HPV16 und HPV18. Weitere Beispiele
10 der High Risk Gruppe sind HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 und 82. Es können aber auch die Proliferationsgene E6 und E7 von so genannten „low risk“ HPVs verwendet werden. Bekannte Beispiele sind die HPV-Typen 6 und 11, weitere HPV Typen der Low-Risk Gruppe sind HPV 40, 42, 43,
15 44, 54, 61, 70, 72, und 81.

Die Bedeutung der E6 Proteine im Zusammenhang mit Proliferationssteigerung sind vor allem in der Inaktivierung des p53 Weges sowie der Induktion der Telomerase zu sehen. Die

20 Bedeutung der E7 Proteine im Zusammenhang mit Proliferationssteigerung sind vor allem in der Inaktivierung des pRB-Weges zu sehen. Im Zusammenhang der Erfindung können auch die Proliferationsgene verschiedener Serotypen einer Virusspezies oder verschiedener Virusspezies kombiniert werden
25 oder sogar chimäre Proliferationsgene von verschiedenen Serotypen einer Virusspezies oder verschiedener Virusspezies hergestellt und eingesetzt werden. Z.B kann eine E6 Domäne in einem chimären Gen z.B. von HPV 16 abstammen und eine andere

von HPV 6. Selbstverständlich können die Proliferationsgene auch trunktiert sein oder einen oder mehrere Basenaustausche haben, ohne den Rahmen der Erfindung zu verlassen. Die oben erwähnten Proliferationsgene stellen bevorzugte

5 Ausführungsformen dar und sollen die Erfindung nicht einschränken. Das Proliferationsgen kann ebenfalls Gegenstand einer synthetischen oder künstlich hergestellten Gensequenz sein.

10 Diese Faktoren werden in die Zielzellen, deren Zellteilungskapazität erweitert werden soll, „funktionell eingebracht“ und hierbei können nicht abschließend folgende Gentransfersysteme verwendet werden: Transfer von Expressionskonstrukte der vorstehend genannten Genfunktionen
15 in Zellen mit der klassischen Calzium-Phosphatmethode (Wigler, M. et al., 1977. Cell 11:223-232), mit Lipofektion (Felgner, P. L. et al, 1987. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 84:7413-7417), mit Elektroporation (Wolf, H. et al., 1994. Biophys.J. 66:524-531), mit Mikroinjektion (Diacumakos, E. G. 1973. Methods Cell
20 Biol. 7:287-311), über Konjugate, welche über zelluläre Rezeptoren aufgenommen werden oder Rezeptor-unabhängig. Die vorstehend genannten Genfunktionen können auch über virale Vektoren in Zielzellen übertragen werden. Beispiele sind retrovirale Vektoren, AAV-Vektoren, Adenovirus-Vektoren und
25 HSV-Vektoren, um nur einige Beispiele von Vektoren zu nennen (Übersicht über virale Vektoren in: Lundstrom, K. 2004. Technol.Cancer Res.Treat. 3:467-477; Robbins, P. D. and S. C. Ghivizzani. 1998. Pharmacol.Ther. 80:35-47). Der Begriff

„funktionell eingebracht“ umfasst insbesondere die Transfektion der Zielzellen mittels mindestens einem Proliferationsgen.

5 Die Expression der vorstehend genannten viralen oder zellulären Proliferationsgene kann durch starke oder schwache konstitutiven Promotoren kontrolliert werden, von Gewebespezifischen Promotoren, von induzierbaren Promotoren (Meyer-Ficca, M. L. et al. 2004. Anal.Biochem. 334:9-19) oder
10 die Expressionskassetten können von spezifischen Sequenzen für molekulare Exzisionssysteme flankiert sein. Beispiele sind das Cre/Lox System (US Patent 4,959,317), dessen Anwendung zur molekularen Entfernung der Expressionskonstrukte aus dem Genom der Zielzellen führt.

15

In einer weiteren Ausführungsform können die Genprodukte der Proliferationsgene ebenfalls direkt in die Zielzelle als solches oder mittels eines Fusionsproteins funktionell eingebracht werden. Vorzugsweise handelt es sich um Messenger-
20 Proteine, wie VP22, HIV TAT (Suzuki et al., 277 J. Biol. Chem. 2437-2443 2002 and Futaki 245 Int. J. Pharmaceut. 1-7 (2002), (HIV) REV, Antennapedia Polypeptid (WO97/12912 and WO99/11809) oder Penetratin (Derossi et al., 8 Trends Cell Biol., 84-87 (1998), Engrailed (Gherbassi, D. & Simon, H. H. J. Neural
25 Transm. Suppl 47-55 (2006), Morgan, R. 580 FEBS Lett., 2531-2533 (2006), Han, K. et al. 10 Mol. Cells 728-732 (2000)) oder Hoxa-5 (Chatelin et al. 55 Mech. Dev. 111-117 (1996)), ein Polymer aus L-Arginin oder D-Arginin Aminosäureresten

(Can. Patent No. 2,094,658; U.S. Pat. No. 4,701,521; WO98/52614), ein Polymer aus L-Lysin or D- Lysin Aminosäureresten (Mai et al., 277 J. Biol. Chem. 30208-30218 (2002), Park et al. 13 Mol. Cells 202-208 (2002), Mi et al. 2 Mol. Ther. 339-347 (2000)), Transkriptionsfaktoren wie BETA2/neuro D, PDX-1 (Noguchi and Matsumoto 60 Acta Med. Okayama 1-11, (2006), Noguchi et al. 52 Diabetes 1732-1737 (2003), Noguchi et al. 332 Biochem. Biophys. Res. Commun. 68-74 (2005)), Nuclear Localization Signal , (Yoneda et al. 201 Exp. Cell Res. 313-320 (1992), Histone derived peptides (Lundberg and Johansson 291 Biochem. Biophys. Res. Comm. 367-371 (2002)), ein Polymer aus kationischen Makromolekülen, FGF-1 und FGF-2, Lactoferrin u.a., wie einschlägig in der Literatur beschrieben.

15 Im Rahmen dieser Erfindung wird unter „mindestens ein zellulärer Faktor, der einen Zellteilungsarrest induziert, inaktiviert wird“, verstanden, dass z.B. Zellteilungsarrest im Zuge des Seneszenzprogramms aktiviert wird (Übersicht in: Ben Porath, I. and R. A. Weinberg. 2005. Int.J.Biochem.Cell Biol. 37:961-976.) oder um denjenigen Zellteilungsarrest, der im Rahmen des Differenzierungsprogramms bei Zellen aktiviert wird. Beispielsweise ist bei Herzmuskelzellen bekannt, dass sie schon kurz nach der Geburt ihre Teilungsfähigkeit einstellen, was u.a. durch Expression von Zellzyklus-

25 Inhibitoren wie p16, p21, p27 reguliert wird (Brooks,G., et al. 1998. Cardiovasc. Res. 39, 301-311; Flink,I.L. et al., 1998. J. Mol. Cell Cardiol. 30, 563-578; Walsh,K. and Perlman,H. 1997. Curr. Opin. Genet. Dev. 7, 597-602). Ähnliche

Vorgänge treffen sicherlich auf die Mehrzahl aller primären Zelltypen zu. Eine Ausschaltung von Zellzyklusinhibitoren in differenzierten Zellen könnte somit bewirken, dass die Zellen wieder in die Proliferation gehen. Das trifft im Kontext der Erfindung auch auf weitere hier nicht erwähnte Zellzyklus-inhibitorische Proteine zu.

Im Rahmen der Erfindung kann allgemein das für die Kontrolle des Zellzyklus wichtige Protein p53 sowie sämtliche an p53 direkt bindende Proteine, vorgeschaltete (nachfolgend upstream) und/ oder nachgeschaltete (nachfolgend) downstream Faktoren dieses p53 Pathways ausgeschaltet werden, um das Ziel der erweiterten Zellteilungskapazität zu erreichen (Übersicht über den p53 Pathway in: Giono, L. E. and J. J. Manfredi. 2006. J.Cell Physiol 209:13-20; Farid, N. R. 2004. Cancer Treat.Res. 122:149-164).

Im Rahmen der Erfindung kann allgemein das für die Kontrolle des Zellzyklus wichtige Protein p16/INK4a sowie sämtliche an p16/INK4a direkt bindende Proteine, vorgeschaltete (nachfolgend upstream) und/ oder nachgeschaltete (nachfolgend) downstream Faktoren dieses p16 Pathways ausgeschaltet werden, um das Ziel der erweiterten Zellteilungskapazität zu erreichen (Übersicht über den p16/INK4a Pathway in: Shapiro, G. I. et al., 2000. Cell Biochem.Biophys. 33:189-197)

Im Rahmen der Erfindung kann allgemein das für die Kontrolle des Zellzyklus wichtige Protein pRb bzw. die anderen Mitglieder der pRb-Familie (z.B. p107, p130) sowie sämtliche an Mitglieder der pRb-Familie direkt bindende Proteine, vorgeschaltete (nachfolgend upstream) und/ oder

nachgeschaltete (nachfolgend) downstream Faktoren dieses pRb Pathways ausgeschaltet werden, um das Ziel der erweiterten Zellteilungskapazität zu erreichen (übersicht über den pRb Pathway in: Godefroy, N. et al. 2006. Apoptosis. 11:659-661; 5 Seville, L. L. et al. 2005. Curr.Cancer Drug Targets. 5:159-170).

Die Inaktivierung zellulärer Faktoren wie z.B. p53, pRB, p16 etc. kann z.B. durch Expression dominant negativer Mutanten der entsprechenden Faktoren erfolgen (Herskowitz, I. 1987.

- 10 Nature 329:219-222; Küpper, J. H., et al. 1995. Biochimie 77:450-455), durch Inhibition der Genexpression dieser Faktoren mithilfe von antisense Oligonukleotiden (Zon, G. 1990. Ann.N.Y.Acad.Sci. 616:161-172), RNAi Molekülen (Aagaard, L. and J. J. Rossi. 2007. Adv.Drug Deliv.Rev. 59:75-86; 15 Chakraborty, C. 2007. Curr.Drug Targets. 8:469-482), Morpholinos (Angerer, L. M. and R. C. Angerer. 2004. Methods Cell Biol. 74:699-711) , Ribozymen (Sioud, M. and P. O. Iversen. 2005. Curr.Drug Targets. 6:647-653) oder durch Gen-Knockout (Le, Y. and B. Sauer. 2000. Methods Mol.Biol. 20 136:477-485; Yamamura, K. 1999. Prog.Exp.Tumor Res. 35:13-24). Diese Verfahren sind dem Fachmann bekannt und in der Literatur vielfach beschrieben. Die Inaktivierung kann auch durch die Wirkung spezifischer Antikörpern erfolgen (z.B. single chain Antikörper, intra bodies etc.; Übersicht in: Leath, C. A., 25 III, et al. 2004. Int.J.Oncol. 24:765-771; Stocks, M. R. 2004. Drug Discov.Today 9:960-966). Die Inaktivierung kann auch durch Verwendung von chemischen Inhibitoren der zellulären Faktoren erfolgen, beispielsweise durch Verwendung von Kinase

Inhibitoren.

Ein Beispiel für einen Kinase-Inhibitor ist die Substanz Imatinib (Glivec®). Dadurch wird eine Reduktion der Zellproliferation erreicht. Imatinib ist ein spezifischer Hemmstoff, der die Aktivität der Tyrosinkinase ABL in erkrankten Zellen blockiert und damit eine krankhaft gesteigerte Vermehrung mutierten Blutstammzellen unterdrückt.

Diese verfahrensgemäß erhaltenen Zellen mit erweiterter Verdopplungskapazität sind zwischen den primären Zellen und den immortalisierten Zelllinien einzuordnen: Zellen mit erweiterter Verdopplungskapazität weisen die meisten der natürlichen Eigenschaften primärer Zellen auf, können vorteilhaft wesentlich mehr Zellteilungen durchführen. Die Vorteile sind wie folgt:

Zellen mit erweiterter Verdopplungskapazität lassen sich universell von allen Typ I und Typ II Zellen erzeugen. Zellen mit erweiterter Verdopplungskapazität eignen sich für die biomedizinische Grundlagenforschung, die Entwicklung und Überprüfung von Medikamenten, Kosmetika, Lebensmittel- und Textilzusatzstoffen.

Weiterhin vorteilhaft ist die einfache und kostengünstige Handhabung in der Zellkultur, d.h. keine teuren Medienadditive sind notwendig.

25

Beispiel zur Erläuterung der erweiterten Verdopplungskapazität der geernteten Zellen aus dem erfindungsgemäßen Verfahren:

Startkultur aus 1000 primären Endothelzellen, welche eine replikative Kapazität von 15 Verdopplungen haben:

Ausbeute an verfügbaren Zellen = $2^{15} \times 1000 = 3,3 \times 10^7$
Zellen

5

Startkultur aus 1000 „Zellen mit erweiterter Verdopplungskapazität“, welche eine replikative Kapazität von 40 Verdopplungen haben:

Ausbeute an verfügbaren Zellen = $2^{40} \times 1000 = 1,1 \times 10^{15}$

10 Zellen, also acht Zehnerpotenzen mehr.

Aufgrund dieser vorteilhaften Eigenschaften der erfindungsgemäß erhaltenen geernteten „Zellen mit erweiterter Verdopplungskapazität“ können nachstehende Verfahren und Verwendungen solcher geernteten Zellen vorteilhaft angegangen werden.

15

Die Erfindung betrifft daher in einer bevorzugten Ausführungsform ebenfalls ein Verfahren zum Herstellen eines Assays, umfassend die folgenden Schritte:

20

- a.) Bereitstellen eines Trägermaterials,
- b.) Immobilisieren oder Fixieren von mindestens einer geernteten Zelle gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren auf diesem Trägermaterial und

25

In Kontakt bringen dieser Zelle aus b.) mit einem Analyten.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der erhaltenen Zellen gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Durchführung

eines Assays, wobei solche „Zellen mit erweiterter Verdopplungskapazität“ mit mindestens einem Analyten ausgewählt aus der Gruppe chemische Substanzen (z.B. synthetische oder native Substanzen und deren Gemische),
5 Medikamente, Wirkstoffe, Kosmetika, Zellen versetzt werden.

Die Targets solcher Analyten können beliebig sein, z.B. DNA, RNA, Proteine, Lipide, Zucker etc. Im Fall eines Zell-Assays wird oft die Aktivität eines oder mehrerer Targets gemessen,
10 beispielweise die Reaktion eines oder mehrerer Enzyme, der Transport einer Substanz durch eine biologische Membran, die Bindung eines Liganden an einen Rezeptor, oder umfassender die Replikation der DNA, die Zellteilung oder der Zelltod, um nur einige Beispiele zu nennen.

15

Der Nachweis eines positiven Ereignisses kann mit einem Nachweisreagenz im weitesten Sinne erfolgen, z.B. mittels einem fluoreszenzmarkiertem Antikörper oder dergleichen. Zu nennen sind hier insbesondere dazu geeignete bioanalytische
20 Verfahren, wie zum Beispiel Immunhistochemie, Antikörperarrays, Luminex / Luminol, ELISA, Immunfluoreszenz, Radioimmunoassays.

Ferner betrifft die Erfindung eine Zellbank enthaltend
25 geernteten Zellen aus dem erfindungsgemäßen Verfahren, also solche „Zellen mit erweiterter Verdopplungskapazität“, die in Suspension sind oder angeordnet auf einem festen Träger sein können.

Der Begriff "fester Träger" umfasst Ausführungen wie einen Filter, eine Membran, ein magnetisches Kügelchen, ein Silizium-Wafer, Glas, Kunststoff, Metall, ein Chip, ein
5 massenspektrometrisches Target oder eine Matrix aus z.B. Proteinen oder anderweitige Matrices wie z.B. PEG etc.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Anordnung (synonym: Array) entspricht diese
10 einem Gitter, dass die Größenordnung einer Mikrotiterplatte (96 Wells, 384 Wells oder mehr), eines Silizium-Wafers, eines Chips, eines massenspektrometrischen Targets oder einer Matrix besitzt.

15 Das Trägermaterial (Matrix) kann in der Form von sphärischen, unaggregierten Partikeln, sog. Beads, Fasern oder einer Membran vorliegen, wobei eine Porosität der Matrix die Oberfläche erhöht. Die Porosität kann beispielsweise in üblicher Weise durch Zugabe von Porenbildnern, wie
20 Cyclohexanol oder 1-Dodecanol zu der Reaktionsmischung der Suspensionspolymerisation erreicht werden.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Arzneimittel enthaltend geerntete Zellen aus dem erfindungsgemäßen Verfahren zur
25 Behandlung von Krankheiten, insbesondere Herzmuskelschwäche, Leberzirrhose, Parkinson-Krankheit und Insulin-abhängiger Diabetes. Bei diesen degenerativen Erkrankungen werden die vermehrten Zellen aus einer körpereigenen primären Zelle des

Patienten erhalten. Die geernteten Zellen werden dem Patienten zurückgegeben (z.B. durch Einspritzen von Herzzellen in den Herzmuskel, etc.).

In einer bevorzugten Ausführungsform werden als virales

5 Proliferationsgene E6 und E7 der low risk HPV verwendet.

Weiterhin betrifft die Erfindung eine Starterkultur enthaltend geerntete Zellen aus dem erfindungsgemäßen Verfahren, also solche geerntete Zellen bestehend aus „Zellen mit erweiterter

10 Verdopplungskapazität“ und übliche Zusatz- und Hilfsstoffe.

In einer weiteren Ausführung der Erfindung werden die geernteten Zellen aus dem erfindungsgemäßen Verfahren für eine Kultur auf üblichen Medien verwendet, insbesondere als

15 Kokultivierungszellen (Feederzellen), zur Anreicherung von Targetzellen (z.B. Stammzellen, etc.).

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden die geernteten Zellen aus dem erfindungsgemäßen Verfahren für die

20 Herstellung von 3D-Zellmodellen oder in-vitro Gewebe verwendet, nicht abschließend als Modelle für die humane Haut und anderen Organen (Herz, Leber, etc.), Knochen, Knorpel, ggfs. auf einen Träger aufgebracht (sogenannte Scaffold-Biomaterialien).

Patentansprüche

1. Verfahren zur Vermehrung oder Anreicherung von primären
Zellen, dadurch gekennzeichnet, dass humane primäre
5 Zellen
a.) isoliert,
b1.) mit mindestens einem Proliferationsgen oder dessen
Genprodukt in die Zelle funktionell eingebracht wird
und / oder
10 b2.) mindestens ein zellulärer Faktor, der einen
Zellteilungsarrest induziert, inaktiviert wird,
c.) die Zellen kultiviert und / oder passagiert
und
d.) geerntet werden, wobei die geernteten Zellen keine
15 Tumoreigenschaften aufweisen.
2. Verfahren zur Vermehrung oder Anreicherung von primären
Zellen nach Anspruch 1, wobei in Schritt c.) 20 bis zu 40
Passagen erfolgen.
3. Verfahren zur Vermehrung oder Anreicherung von primären
20 Zellen nach Anspruch 1 oder 2, wobei die geernteten
Zellen in Schritt d.) keine zusätzliche
Wachstumsfähigkeit in Soft Agar oder Tumorwachstum in
vivo aufweisen.
4. Verfahren zur Vermehrung oder Anreicherung von primären
25 Zellen nach einem der vorherigen Ansprüche, wobei die
erhaltenen Zellen nicht-immortalisiert sind.

5. Verfahren zur Vermehrung oder Anreicherung von primären Zellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Proliferationsgen in b1.) ein zelluläres und / oder virales Proliferationsgen ist.
- 5 6. Verfahren zur Vermehrung oder Anreicherung von primären Zellen nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das zelluläre Proliferationsgen aus der Gruppe myc, jun, ras, src, fyg, myb, E2F und Mdm2 und TERT ausgewählt ist oder das virale Proliferationsgen aus
10 der Gruppe E6 und E7 von Papillomviren wie z.B. HPV; das große und kleine TAg von Polyomaviren wie z.B. SV40, JK-Virus und BC-Virus; die Proteine E1A und E1B von Adenoviren, EBNA- Proteine von Epstein Barr Virus (EBV); sowie HTLV und Herpesvirus Saimiri ausgewählt ist.
- 15 7. Verfahren zur Vermehrung oder Anreicherung von primären Zellen nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass der zelluläre Faktoren in b.) aus der Gruppe p53, p16, pRB, p107, p130 oder deren jeweiligen upstream oder downstream Faktoren oder daran
20 bindende Proteine im Pathway ausgewählt ist und die Inaktivierung solcher zellulärer Faktoren mittels Expression dominant negativer Mutanten erfolgt oder durch Inhibition der Genexpression dieser Faktoren mithilfe von antisense Oligonukleotiden, RNAi Molekülen, Morpholinos,
25 Ribozymen erfolgt oder durch Gen-Knockout, durch die Wirkung spezifischer Antikörpern, chemischen Inhibitoren erfolgt.

8. Verfahren zur Vermehrung oder Anreicherung von primären Zellen nach einem der vorherigen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die virale Proliferationsgene, E6 und E7 von HPV oder BPV sind, insbesondere HPV16 und HPV18 und HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 und 82 und / oder HPV6 und HPV11 sowie HPV 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, und 81.
9. Verfahren zum Herstellen eines Assays, umfassend die folgenden Schritte:
- a.) Bereitstellen eines Trägermaterials,
- b.) Immobilisieren oder Fixieren von mindestens einer geernteten Zelle gemäß Anspruch 1 auf diesem Trägermaterial und
- In Kontakt bringen dieser Zelle aus b.) mit einem Analyten.
10. Verfahren zum Herstellen eines Assays nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Analyt ausgewählt ist aus der Gruppe chemische Substanzen, Medikamente, Wirkstoffe, Kosmetika, Zellen.
11. Zellbank enthaltend geerntete Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 8 auf einem festen Träger oder in Suspension.
12. 3D-Zellmodell oder in-vitro Gewebe enthaltend geerntete Zellen nach einem der Ansprüche 1 bis 8, ggfs. auf einem festen Träger.

13. Starterkultur, Kokultivierungszellen oder Kultur
enthaltend geerntete Zellen nach einem der Ansprüche 1
bis 8 und weitere übliche Zusatz- und Hilfsstoffe.
- 5 14. Arzneimittel enthaltend geerntete Zellen nach einem der
Ansprüche 1 bis 8, insbesondere zur Behandlung von
Krankheiten, insbesondere degenerative Erkrankungen wie
Herzmuskelschwäche, Leberzirrhose, Parkinson-Krankheit
und Insulin-abhängiger Diabetes und weitere übliche
Zusatz- und Hilfsstoffe.
- 10 15. Verwendung der geernteten Zellen nach einem Verfahren
nach Anspruch 1 bis 8 zur Herstellung einer Zellbank, 3D-
Zellmodell oder in-vitro Gewebe, Starterkultur, Kultur,
Kokultivierungszellen, Arzneimittel.