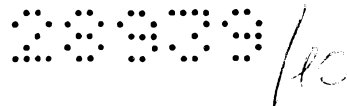
**Kivonat**

A találmány tárgya sejt kultúra médium humán sejtek tenyésztésére, amely antikoagulált teljes vérsérumot tartalmaz, ahol a hemoglobin szint körülbelül 8 és körülbelül 16 g/dl közötti. Közelebbről a találmány tárgya olyan sejt kultúra médium, ahol a vérben jelen lévő sejtek fel vannak tárva, és a lizált sejtek oldhatatlan maradéka el van távolítva. Továbbá a találmány tárgya eljárás humán sejtek tenyésztésére szolgáló sejt kultúra médium előállítására.

jell. ábra  $\emptyset$

11. 11. 21



## Sejtkultúra médium

A találmány tárgya sejtkultúra médium humán sejtek tenyésztésére, amely antikoagulált teljes véranyagot tartalmaz, ahol a hemoglobin szint körülbelül 8 és körülbelül 16 g/dl közötti. Közelebbről a találmány tárgya olyan sejtkultúra médium, ahol a vérben jelen lévő sejtek fel vannak tárva, és a lizált sejtek oldhatatlan maradéka el van távolítva. Továbbá a találmány tárgya eljárás humán sejtek tenyésztésére szolgáló sejtkultúra médium előállítására.

### A találmány háttere

Humán eredetű normál vagy rákos primer sejtek kultúrában tartása nagyon sok nehézségbe ütközik, mely a nagy igény ellenére sem megoldott probléma. Legfőbb nehézséget az okozza, hogy a jelenleg forgalomban lévő jól definiált tartalommal bíró sejtkultúra táptalajok különböző, többféle specifikus sejttypus ellen vannak kifejlesztve. Ezek a sejtkultúra táptalajok gazdagon tartalmaznak alacsony molekulásúlyú anyagokat, ugyanakkor gyakran csak kevésbé, vagy egyáltalán nem tartalmaznak a növekedéshez, szaporodáshoz és a túléléshez fontos faktorokat. A sejtkultúra médiumok megalkotásánál sokszor fontos szempont, hogy azok nagy mennyiségben olcsón termelhetőek legyenek. Ugyanakkor a modern technikák térhódítása, úgymint a mikrofluidika és automatizált mikroszkópia ezen korábbi kritériumokon túllépett és idejét múltnak érzi.

Primer normál sejt kultúrák gyakran játszanak szerepet mint összejt forrás pl. rekonstruktív terápiához vagy mint *in-vivo* célpont génhordozóként génterápiához. Tumoros primer sejtkultúrákat gyakran használnak nagy mennyiségben gyógyszerérzékenységi tesztekhez, hogy specifikusan meghatározzák a páciens egyénre szabott rákterápiás kezelését, vagy egy-egy újonnan piacra kerülő már használatban lévő gyógyszer hatékonyságát többféle még nem kipróbált tumor típusokon, de alkalmasak hatóanyag könyvtárak nagybani tesztelésére is új rákellenes szerek után kutatva.

A humán tumorok egyik fő jellemvonása, hogy folyamatosan változnak, ezért az ideális terápia az egyénre szabott vizsgálatok, melyek fényt derítenek a páciens egyéni, specifikus, tumorára jellemző biológiai sajátosságokra. A legjobb megoldás ezen cél megvalósítására egy olyan megbízható, összetett, reprodukálható módszer kifejlesztése, ahol ezen egyéni tumorok több különböző gyógyszerre adott válasza mérhető. Ezen mérési adatok mind teoretikus, mind gyakorlati alátámasztását kell adják az assay-alapú terápiának.

Napjaink kezelési protokolljai az évek folyamán összegyűlt több ezer, alaposan alátámasztott és kontrollált klinikai vizsgálati információra és eredményességi adatokra épülnek. Az elmúlt évtizedekben szemtanúi lehetünk a betegek számottevő túlélési idejének megnövekedésében bizonyos leukémiás és limfómás megbetegedéseknél. A fejlődés legszembetűnőbbben a gyermekkori leukémiáknál volt megfigyelhető. Ezen megbetegedéseknél a legnagyobb segítséget az adta, hogy a betegeket a tumor specifikus biológiai markerei és prognosztikus jellemzői alapján különböző csoportba osztályozták, mely bizonyítottan segítette a legmegfelelőbb kezelési protokoll megválasztásában. Ezen protokollok relative régi, de jól bevált gyógyszerekre alapulnak, melyek a 70-es 80-as években lettek kifejlesztve. A sikeres eredmények elérésében a kulcs faktor a fenti esetekben az a tény volt, hogy szigorúan ragaszkodott a régi, standardizált már jól bevált kezelési protokoll alkalmazásához. Ez a stratégia nagyon jól bevált a pediátriai eseteknél, akiknek ez a nagyon erős mellékhatásokkal járó agresszív toxikus terápia megmentette az életét. Ugyanakkor ez a stratégia nagyon kis teret hagyott a piacra kerülő újabb, modernebb, kevesebb mellékhatással járó, kevésbé toxikus gyógyszerkészítmények alkalmazására. Ez a tény



főleg akkor tekinthető negatívumként, ha figyelembe vesszük, hogy több mint hatvanféle forgalomban lévő rákellenes gyógyszerkészítmény van jelenleg piacon és több száz potenciális szer van fejlesztés alatt a gyógyszergyárakban.

Másrészről a felnőttkori leukémiás esetekben a legnagyobb gyógyászati áttörést néha pont az új gyógyszerek alkalmazása jelentette, terminális fázisba került betegeknél történt alkalmazásuk következményeként (pl. bcr-abl inhibitor Gleevec alkalmazása CML-ben szenvedő betegeknél; proteoszóma inhibitor Bortezomib alkalmazása multiple mielómáknál vagy monoklonális antitestek, mint az anti-CD20 – Rituximab bevezetése különféle B-sejtes tumoroknál). Minden erőfeszítés ellenére, mind a felnőttkori, és kisebb mértékben ugyan, de mind a gyermekkori betegek egy jelentős hányada nem válaszol a rákellenes terápiára, vagy többszöri visszaesést mutat. Ezekben az esetekben az individuálisan meghatározott speciálisan egyénre megtervezett terápia és az új rákellenes szerek alkalmazása vezethetne megoldáshoz.

Már negyven évvel ezelőtt megszületett az igény az *in vivo* gyógyszerérzékenységi vizsgálatokra, hogy meghatározzák a páciensből származó leukémiás sejtek gyógyszerrezisztencia képét. Különböző technikákat fejlesztettek ki ezen vizsgálatok elvégzéséhez, melyek a tumorsejtek túlélési arányát volt célzott vizsgálni, különféle rákellenes szerekkel való *in vitro* kezelését követően. [1]. Az összes vizsgálati metodika négy alaplépésre épült: i) sejtek páciensből történő izolálása; ii) sejtek sejt kultúrában történő inkubálása rákellenes szereket tartalmazó konvencionális sejt kultúra médiumban; iii) a túlélési arány meghatározása; iv) a kapott adatok kiértékelése. Ezen technikák egy része ma is elterjedten használt a klinikai diagnosztikában, úgymint az ATP átalakulást mérő, vagy mint az MTT redukciót vizsgáló (tetrazóliumsó átalakulása oldhatatlan formazánná) vagy az FMCA teszt (fluoreszcens mikrokultúra citotoxicitást mérő) metodikák [2, 3] és bizonyítottan alkalmas klinikailag releváns gyógyszerérzékenységi információk megszerzésére a tumoros sejtekben.

Sajnos a jelenleg használt metodikák erősen korlátozó körülményektől szenvednek. Az egyik legfontosabb ilyen korlátozó tényező a páciensből származó primer tumorsejtek életben tartása *in vitro* [4]. A legtöbb eukarióta sejt kétféle szignál szimultán meglétét igényli a sikeres *ex vivo* túléléshez és szaporodáshoz: növekedést segítő (proliferációs) és túlélési (anti-apoptotikus) szignálok. Ezen szignálok oldott ligandok formájában vannak jelen, alternatívaként lehetnek olyan ligandok, melyek részei az extracelluláris mátrixnak vagy asszociáltak a szomszédos sejt felülethez. A szignál molekulák a sejtek felszínén jelenlévő receptorokhoz kötődnek, melyek specifikusak az adott sejt típusra és a sejt differenciációs fokára. Klasszikus sejt kultúra médiumok általában adalékként szérumot vagy szöveti extraktumokat tartalmaznak, hogy alkalmasak legyenek a sejtek *in vitro* kultúrában tartására. Az általánosan használt 10%-os magzati borjúsérum megfelelő mennyiségű PDGF-t és inzulinhoz hasonló növekedési faktort tartalmaz a primer fibroblasztok növekedéséhez és mesenchymalis eredetű őssejtek életben tartásához *in vitro* körülmények között. A legtöbb primer eredetű sejt azonban egyéb extra növekedési faktor hozzáadását igénylik a túlélésükhöz. Azon *in vitro* adaptált sejt vonalak, melyek képesek növekedni kizárólag PDGF és IGF jellegű molekulák jelenlétében, egy különleges generációja az eredeti primer sejtnek, mely egy speciális genetikai variáns szelekciója révén jött létre és adaptálódott az *in vitro* körülményekhez. A lymphoid/myeloid vonalból származó normál és a tumoros sejtek ezen felül adalékos növekedési/túlélési faktorokat követelnek meg *in vitro*. Fontos azonban, hogy a túlélési faktorok hiánya érzékenyebbé teszi a sejteket a cytotoxikus szerekkel szemben, ami nem kívánt hamis pozitív eredményt mutathat a rövid idejű *in vitro* assay futtatása alatt, ezzel túlértékelve a szer hatását. A jelenleg futó drogrezisztencia tesztek nagy számban lévő tumorsejtet igényelnek és munkaigényesek. Ennek következtében a felhalmozott rezisztencia adatok igen



limitáltak és a legtöbb mai ilyen körű vizsgálat csak néhány darab gyógyszerrel való vizsgálatot tud futtatni páciensenként és ezért nem igazán ideálisan nagy számban jelenlévő rákellenes szerek egyidejű vizsgálatára. A legtöbb gyógyszerérzékenységi teszt az alacsony információtartalma miatt kizárólag egyféle adat kinyerésére alkalmas (pl. csak a túlélő sejtek számának meghatározására tesztenként).

Nem beszélve arról a problémáról, hogy nem minden gyógyszer alkalmas a konvencionális *in vitro* tesztekben való futtatásra. Néhányan közülük, mint például az antraciklinek, inkompatibilisak direct fluoreszcens technikákban való felhasználásra. Mindezen hátrányok ellenére ezen jelenleg alkalmazott roved idejű *in vitro* metodikák már elkezdtek a klinikai kezelést segítő információkat szolgáltatni [1, 5-7].

Napjainkban azért ezen *in vitro* assay technológiát még mindig meglehetősen megbízhatatlannak tartják a beteg *in vivo* gyógyszerválaszának predikciójában. Ezen vélemények az ovarium carcinómáknál alkalmazott *in vitro* klonális assay rossz eredményeire alapozódtak. Másrészt az *in vitro* assayek *in vivo* gyógyszerválasz-predikciójának perspektívája változóban van, mint azt néhány publikációban olvashatjuk [8], minthogy a legtöbb munka szerint - melyet *ex vivo* gyógyszerérzékenységi vizsgálatokra levetítve publikáltak az 1980-as évektől kezdve napjainkig - "az uralkodó nézőpontnak megfelelően a rák egy regulálatlan sejtosztódás. A programozott sejthalál, az apoptózis leírása fundamentális napjaink felfogásában a humán tumorbiológiát illetően, nem történt volna meg, ha az *in vitro* kemoszenzitivitás vizsgálatok nem bukkanak fel. Ezek összevetették a carcinogenezisről alkotott modern tanokat a sejttúlélési-zavarok tapasztalataival, amiket mi most újra vizsgálhatunk és értékelhetünk a gyógyszer indukálta programozott sejthalál vizsgálatán keresztül."

A hibaforrások közül az egyik legfontosabb a sejt kultúra médium volt, mely egy kémiaiilag definiált egyszerű oldatból indul ki, melyhez fokozatosan különböző szérum, vagy szövet extraktum komponensek adódnak, míg a tesztsejtek megfelelő túlélést és szaporodási görbét mutatnak. Éppen ezért a sok hibaforrásnak köszönhetően ma már világossá vált, hogy más megközelítés szükséges az *in vitro* assayek jobbá tételéhez és a sejtek számára valóban optimális életközeg megteremtésével az egyénre szóló rákterápiához vezető út megteremtéséhez.

A digitális képalkotás gyors fejlődése, napjaink mikroszkópiában és lézertoptikában elért újabb fejlesztései, valamint új módszerek a labor automatizálásban és mikrofluidikában elérhető közelségbe hozták ezen törekvéseket. Mi meg tudtuk valósítani egy általunk programozott intelligens konfokális képalkotásra alapozott új metodikával, hogy vizsgálni tudjuk a rákellenes szerek primer humán tumorsejtekre gyakorolt hatását, akár 1 milliliternyi testfolyadékából, (vér, csontvelő, ascites, pleurális effúzió). Készíteni tudunk olyan 384-lyukú lemezen, előprogramozott robottal készített gyógyszerérzékenységi tesztet, mely lehetővé teszi számunkra nagy mennyiségű szer vizsgálatát, egyedül vagy akár különböző kombinációkban is. Kifinomult fluoreszcens jelölő technikával lehetőségünk nyílt több vitálisan fontos paraméter egyidejű vizsgálatára humán primer tumorsejteken, mint például, sejt túlélés, sejtciklus megoszlás, metabolikus aktivitás és motilitás. Az egyetlen hiányzó láncszem az átfogó *in vitro* gyógyszerérzékenységi teszt megalkotásához tehát csak egy effektív, megbízható sejt kultúra médium kifejlesztése volt, mely segít a primer tumor sejtek megtartani egyedi tulajdonságukat az eredeti *in vivo* körülményekkel megegyező vagy minél jobban hasonlító körülményeket, hogy lehetővé váljon a lehető legjobb tumorterápia meghatározása.

Ezen igény kielégítésére teljesen újra-terveztük a primer tumorsejtek tenyésztési körülményeit. A megközelítési módunk értelmében megőrizzük az eredeti *in vivo* körülményeket, amennyire csak lehetséges. Az új sejt kultúra médium elméleti alapja a következő korábbi megfigyelésekre támaszkodik: a primer humán limfociták, amelyek nagyon érzékenyek apoptózisra, extra növekedési faktorok nélkül kiülteve sejt kultúra médiumra több



napig képesek túlélni teljes vérben [9-12], még akkor is, ha az részlegesen hemolizált [13]. Azonban az említett irodalmi helyek egyike sem tárja fel vagy akárcsak javasolja is a teljes vért, mint ami lehetséges lenne humán sejtek tenyésztésére szolgáló sejt kultúra médium alapjának.

Ennek megfelelően a találmány tárgya humán sejtek tenyésztésére szolgáló sejt kultúra médium, amely anti-koagulált teljes véranyagot tartalmaz, ahol a hemoglobin szint körülbelül 8 és körülbelül 16 g/dl közötti.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgya olyan sejt kultúra médium, ahol a vérben jelen lévő sejtek fel vannak tárva, és a lizált sejtek oldhatatlan maradéka el van távolítva.

Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya sejt kultúra médium, ahol a vér emlős eredetű. Egy specifikus megvalósítási mód szerint a találmány tárgya sejt kultúra médium, ahol a vér humán eredetű.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgya sejt kultúra médium, ahol a médium iontartalma vissza van állítva, hogy igazodjon a teljes vér kiindulási anyag extracelluláris frakciójához.

Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya sejt kultúra médium, ahol az alacsony molekulatömegű (< 3000 Dalton) tápanyag-tartalom és/vagy összetétel lényegében ugyanolyan, mint az RPMI, DMEM és IMDM által alkotott csoportból előnyösen kiválasztott hagyományos sejt kultúra médiumé.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgya sejt kultúra médium, ahol a médium redukálóképessége vissza van állítva redukált glutation hozzáadásával.

Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya a találmány szerinti sejt kultúra médium alkalmazása humán sejtek tenyésztésére.

Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya eljárás humán sejtek tenyésztésére szolgáló sejt kultúra médium előállítására, amely tartalmazza a következő lépéseket:

- (a) antikoagulált emlős vér biztosítása kiindulási anyagként;
- (b) a vérben jelen lévő sejtek mechanikai feltárása;
- (c) a lizált sejtek oldhatatlan maradékának eltávolítása.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgya eljárás, ahol a sejtek mechanikai feltárása a teljes vér lefagyasztásával, vagy ultrahanggal, elektromos késes homogenizátorral vagy French press készülékkel van elérve.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgya eljárás, ahol a lizált sejtek oldhatatlan maradékának az eltávolítása ultracentrifugálással vagy mechanikus szűréssel van elérve.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgya eljárás, ahol a médium alacsony molekulatömegű (< 3000 Dalton) tápanyag-tartalma és/vagy összetétele módosítva van az RPMI, DMEM és IMDM által alkotott csoportból előnyösen kiválasztott hagyományos sejt kultúra médiummal szemben végzett dialízissel.

Egy másik megvalósítási mód szerint a találmány tárgya eljárás, ahol a médium redukálóképessége vissza van állítva redukált glutation hozzáadásával.

Egy további megvalósítási mód szerint a találmány tárgya sejt kultúra médium humán sejtek tenyésztésére, amely találmány szerinti eljárással állítható elő.

#### **A találmány részletes leírása**

A primer sejttenyészetek humán szövetekből történő létrehozásának eljárásai sok nehézséggel járnak. Az *in vitro* tenyésztett primer sejtek olyan környezetet igényelnek, amelynek hasonlóak a fizikai-kémiai tulajdonságai, valamint számos biológiai szignállal rendelkeznek, mint az *in vivo* milió.



A találmány egy új sejt kultúra médiumot képvisel, amely megtartja a teljes vér helyes ion, ozmotikus és redox körülményeit, együtt a teljesen megőrzött növekedési és túlélési faktor készlettel. Az új sejt kultúra médium teljes vér extraktumon alapszik, amely tartalmazza a vér összes makromolekuláris komponensét, valamint a hagyományos szövettenyésztő médiumok kismolekulás tápanyagait, de hiányzik belőle a vörösvértestek membrán-frakciója. Az új médium jobb a hagyományos médiumoknál a normál és rosszindulatú eredetű primer humán sejtek túlélésének biztosítására. Különösen alkalmas frissen kiültetett humán tumor sejtek gyógyszerérzékenységi tesztelésére, így egy új technológia platform alapját képezi egyedi páciensek citotoxikus gyógyszerérzékenységi profiljának meghatározására. A rövid idejű gyógyszerérzékenységi assay előrevetítheti az egyénre szabott irányított rákterápiát. Az új médium optikai tulajdonságai lehetővé teszik a kezelt sejtek értékelését nagy információ tartalommal rendelkező szűrések ("High Content Analysis", HCA) esetében. A médium gyengíti a leggyakrabban alkalmazott gyógyszerek autofluoreszcenciáját is. A médium továbbá jól alkalmazható nagymértékű kémiai vagy biológiai vegyület-könyvtárak nagyteljesítményű szkrínelésére is vagy nagyléptékű toxikológiai tesztelésre primer humán sejteken.

Tehát az empirikus adataink alapján egy olyan új sejt kultúra médiumot fejlesztettünk ki, amely egyesíti a túlélést elősegítő komponenseket a sejt kultúra médiumok táplálási képességeivel a helyes ion és redox környezetben. A médiumot különböző eredetű sejt vonalak, valamint aszcitesz folyadékából vagy az ovarium, emlő, vastagbél, végbél, hasnyálmirigy és húgyhólyag carcinomákat kísérő effúzióból és AML, ALL, CLL, testüreg limfómákból, Hodgkin és post-transzplantációs limfómákból származó primer tumorok nagy készletén teszteltük. Amikor összehasonlítottuk az új médiumot a hagyományos sejt kultúra médiummal, a primer tumor sejtek rendszeresen jobb túlélését és csökkent citotoxikus gyógyszerérzékenységét találtuk. Az új sejt kultúra médium lehetővé teszi a humán tumor sejtek hosszantartó *in vitro* túlélését. Az új sejt kultúra médium alkalmazásával már lehetséges olyan assays-k végrehajtása, amelyek képesek meghatározni a leukémiás, limfómás vagy előrehaladott carcinómás páciensekből frissen izolált primer tumor sejtek gyógyszerérzékenységi mintázatát.

A találmány tárgya olyan eljárás, amely átalakítja a humán (vagy állati) teljes vért olyan sejt kultúra médiummá, amely elősegíti primer tumor sejtek *ex vivo* túlélését és kompatibilis az életképesség meghatározására és különféle fiziológiai funkciók mérésére szolgáló különböző fluoreszcens leképezési módszerekkel. Az eljárás hígítatlan antikoagulált vér mechanikai feltárásán, a vörösvértestek úgynevezett "ghost"-jainak az eltávolításán, a helyes ion-tartalom helyreállításán, alacsony molekulatömegű tápanyagokkal való ekvilibráción és a redukáló körülmények helyreállításán alapszik. A végtermék azonnal felhasználható rövid idejű assay-kben, vagy hosszú időn keresztül fagyaszttva tárolható.

Habár a teljes vér lizátumai gyakran alkotóelemei bizonyos bakteriális tenyésztő médiumoknak, mint például a véres agar, azt nem alkalmazzák humán vagy emlős sejtek tenyésztésére. A találmány tárgya eukarióta sejt kultúra médium kifejlesztése, elsősorban humán tumor sejtek/öszejtek *ex vivo* tenyésztésére. A bakteriális és eukarióta médium kémiai összetétele olyannyira eltérő, hogy emlős sejtek nem élnek túl a bakteriális médiumon. Mivel a teljes vér csak egy specifikus alkotóelem azokban a médiumokban, a hemoglobin koncentráció jóval a találmány szerinti sejt kultúra médiumra jellemző szint alatt van.

Ennek megfelelően a találmány tárgya sejt kultúra médium humán sejtek tenyésztésére, amely antikoagulált teljes véranyagot tartalmaz, ahol a hemoglobin szint körülbelül 8 és körülbelül 16 g/dl közötti. Amiatt a tény miatt, hogy a találmány szerinti médium lényegében a teljes vér kiindulási anyagból áll, a magas hemoglobin-tartalom a vörösvértestek teljes vér anyag feldolgozása alatti lízisének az eredménye. Közelebbről, a találmány sze-



rinti sejt kultúra médium hemoglobin-koncentrációja körülbelül 10 és körülbelül 14 g/dl, előnyösen körülbelül 11 és körülbelül 12 g/dl közötti, és még előnyösebben körülbelül 11 g/dl.

A találmány szerinti sejt kultúra médium egy másik előnyös jellemzője az, hogy habár a médium önmagában nem átlátszó, nagyteljesítményű mikroszkópos képalkotás hatékonyan végrehajtható rajta. A technika állása szerint a sejtéletképesség nagy érzékenységgű fluoreszcenciás mérései nem kompatibilisek számos általánosan alkalmazott rákellenes gyógyszerrel (pl. epirubicin, daunorubicin, doxorubicin), amelyeknek erős az endogén autofluoreszcenciás tulajdonsága hagyományos sejt kultúra médiumok alkalmazásával. Kimutattuk, hogy a vér extraktum alapú sejt kultúra médium alkalmazásával a zavaró autofluoreszcencia hatékonyan csillapítható. A találmány szerinti sejt kultúra médium nem átlátszó, rendelkezik a vér jellegzetes színével, az említett nagyteljesítményű mikroszkópos leképezés inverz mikroszkópos rendszerekkel hajtható végre, ahol a sejtek a tenyésztő edények fenekén vannak összegyűjtve.

A találmány szerinti sejt kultúra médium egyik fő jellemzője, hogy a teljes vér sejt komponensei maguk el vannak távolítva, de az ilyen sejt komponensekben megtalálható anyagok megmaradnak a sejt kultúra médiumban. Ezt a vérben jelen lévő sejtek feltárással és a lizált sejtek oldhatatlan maradékának eltávolításával érjük el. Az ilyen feltárást és eltávolítást a szakember számára hozzáférhető bármely alkalmas eszközzel végrehajthatjuk.

A találmány tárgyát képező eljárás is humán sejtek tenyésztésére szolgáló sejt kultúra médium előállítására, amely tartalmazza a következő lépéseket:

- (a) antikoagulált emlős vér biztosítása kiindulási anyagnak;
- (b) a vérben jelen lévő sejtek mechanikai feltárása;
- (c) a lizált sejtek oldhatatlan maradékának eltávolítása.

A találmány szerinti eljárás egy szemléltető protokollját az 1. példában mutatjuk be, azonban a szakember könnyedén képes behelyettesíteni különböző procedúrákat a fenti lépésekben megadottal lényegében azonos eredményt elérve. Például a sejtek mechanikai feltárást nem korlátozó példaként elérhetjük a teljes vér lefagyasztásával, vagy ultrahanggal, elektromos késes homogenizátorral vagy French press készülékkel. Ezen módszerek megfelelő paramétereinek az optimalizálása szintén nyilvánvaló a szakember számára. Hasonlóképpen a sejt feltárást után a sejt "ghost"-ok eltávolítását elvégezhetjük számos különböző technika állása szerinti módszer közül eggyel vagy többel. Nem korlátozó példák közé tartozik az ultracentrifugálás vagy mechanikai szűrés.

Amint fent részleteztük, az egyik fő elérendő cél a találmány szerinti sejt kultúra médium biztosításával az, hogy biztosítsuk humán sejtek optimális *ex vivo* tenyésztési körülményeit. Nyilvánvaló, hogy a humán vér biztosíthatja a humán sejtek tenyésztéséhez a legközelebbi illeszkedést. Ennek megfelelően, amennyiben lehetséges, a találmány szerinti sejt kultúra médium véranyag alapja humán eredetű. Más megoldásként amikor a kívánt tenyésztési protokoll lehetővé teszi vagy megkívánja, a humán vér alapú médium helyettesíthető olyan találmány szerinti sejt kultúra médiummal, amely egy másik emlősfaj – előnyösen borjú vagy sertés eredetű – teljes vérén alapszik.

Amint az nyilvánvaló a szakember számára, a teljes vér sejt komponenseinek a feltárása felszabadítja azok tartalmát a médiumba, megváltoztatva ezzel a teljes vér eredeti összetételét. Előnyös megvalósítási módok szerint tehát kívánatos lehet a kapott médium összetételének a módosítása, hogy jobban megközelítse a kiindulási anyag, azaz a teljes vér összetételét. Vagy más megoldásként, hogy az összetételét hasonlóvá tegyük a szakterületen hagyományosan alkalmazott sejt kultúra médiumok összetételével. A szakember könnyedén meghatá-



rozhatja milyen típusú módosítások a legalkalmasabbak a találmány szerinti sejt kultúra médium tervezett felhasználásához.

Ennek megfelelően egy specifikus megvalósítási mód szerint a médium ion-tartalmát visszaállítjuk, hogy megközelítse a kiindulási teljes vér extracelluláris frakciójáét. Egy másik megvalósítási mód szerint a médium redukálóképességét visszaállítjuk redukált glutation hozzáadásával. Ezenfelül egy további specifikus megvalósítási mód szerint az alacsony molekulatömegű (< 3000 Dalton) tápanyag-tartalom és/vagy összetétel lényegében ugyanolyan, mint az RPMI, DMEM és IMDM által alkotott csoportból előnyösen kiválasztott hagyományos sejt kultúra médiumé. A szakember képes választani a technika állása szerinti módszerek közül, hogy elérje ezeket a módosításokat, vagy bármilyen olyan módosítást, amelyet megfelelőnek tart. Nem korlátozó példákat bemutatunk a példák között.

#### Az ábrák leírása

1. ábra: A vérextraktum alapú sejt kultúra médium sematikus gyártási ábrázolása

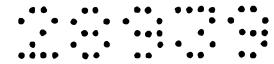
2. ábra: A: 384-lyukú lemez 30 féle gyógyszerrel. B: Primer humán ovarian carcinoma sejtek 7 napos kultúrában tartást követően vérextraktum alapú médiumban (Fáziskontraszt – sejt magfestés Hoechst 33342). C: DLBL sejtek 30 különböző gyógyszerre adott válasza, individualizált sejt képanalízissel kiértékelve 500.000 sejt 7680 konfokális szekcióban. D: Maximum felhasznált gyógyszerkoncentráció.

3. ábra: Gyógyszerérzékenységi mintázat 38 különböző primer humán carcinoma esetben, a sejtek pleural effúzióból vagy ascites folyadékból direkt izoláltak és három napos túlélési assayben humán vér extraktum alapú médiumban inkubáltak, mint ahogy azt a 2. ábrán is láthatjuk (Az 5 lépéses intenzitás skálája a "heat map"-nek 50% túlélésnek vagy annál nagyobb arányúnak felel meg az adott gyógyszerkoncentrációnál mérve. Fekete: több mint 50% túlélés a legmagasabb gyógyszerkoncentrációban, legmagasabb intenzitású piros, kevesebb, mint 50% túlélés a legmagasabb gyógyszerkoncentrációnál).

4. ábra: Gyógyszerérzékenységi teszt 42 különböző primer Acute Myeloid Leukemiában ahol a sejtek izolálása direkt a perifériás vérből történt és három napos túlélési assayben humán vérextraktum alapú médiumban tenyésztve mint ahogy az a 2. ábrán látható (Az 5 lépéses intenzitás skálája a "heat map"-nek 50% túlélésnek vagy annál nagyobb arányúnak felel meg az adott gyógyszerkoncentrációnál mérve. Fekete: több mint 50% túlélés a legmagasabb gyógyszerkoncentrációban, legmagasabb intenzitású piros, kevesebb, mint 50% túlélés a legmagasabb gyógyszerkoncentrációnál).

5. ábra: Gyógyszerérzékenységi teszt mintázat 74 különböző primer Chronic Lymphoid Leukemia esetben, ahol a sejtek izolálása direkt a perifériás vérből történt és három napos túlélési assayben humán vérextraktum alapú médiumban tenyésztve mint ahogy az a 2. ábrán látható (Az 5 lépéses intenzitás skálája a "heat map"-nek 50% túlélésnek vagy annál nagyobb arányúnak felel meg az adott gyógyszerkoncentrációnál mérve. Fekete: több mint 50% túlélés a legmagasabb gyógyszerkoncentrációban, legmagasabb intenzitású piros, kevesebb, mint 50% túlélés a legmagasabb gyógyszerkoncentrációnál).

6. ábra: Gyógyszerérzékenységi teszt mintázat 216 különböző humán primer tumoros beteg esetében, három napos túlélési assayben humán vérextraktum alapú médiumban tenyésztve mint ahogy az a 2. ábrán látható (Az 5 lépéses intenzitás skálája a "heat map"-nek 50% túlélésnek vagy annál nagyobb arányúnak felel meg az adott gyógyszerkoncentrációnál mérve. Fekete: több mint 50% túlélés a legmagasabb gyógyszerkoncentrációban, legmagasabb intenzitású piros, kevesebb, mint 50% túlélés a legmagasabb gyógyszerkoncentrációnál).



7. ábra: Gyógyszerérzékenységi teszt mintázat erősen rezisztens késői fázisban lévő primer ovarium carcinoma esetekben, ahol a sejtek szignifikáns érzékenységet mutatnak kettő rákellenes szerre a tesztelt 29 közül. A találmány szerinti vér extraktum alapú médiumnak köszönhetően a gyógyszerérzékenységi vizsgálat legtöbb esetben sikeresen identifikál legalább egy hatékony terápiás szert még a reménytelennek hitt késői fázisú rákos betegeknél is.

8. ábra: Az ábra a három napos túlélési assay vizsgálat adatait mutatja. A tumorsejtek Aute Myeloid Leukemia (AML) szenvedő betegekből lettek izolálva és különböző gyógyszerekkel inkubálva, vérextrakt alapú médium különböző koncentrációiban vagy tradicionálisan dúsított médiumban - IMDM. A túlélő sejtek száma lett ábrázolva a relatív drogkoncentrációval szemben, mely itt az in vivo/in vitro Görbe alatti terület hányadosából lett kiszámítva (pAUC). A pAUC = 1 érték azt a gyógyszer koncentrációt reprezentálja, mely a beteg plazmájában mérhető kemoterápiás kezelés alatt. \*AUC, azaz a görbe alatti terület egy idő dependens integráltja a gyógyszer koncentráció görbének, mely mértékegysége (microgram/ml)\*hours

9. ábra: Hasonló gyógyszerérzékenységi profil primer humán carcinoma sejteknél, vér extrakt alapú médiumban tenyésztve melyek humán, borjú és sertésvérből lettek készítve. Három napos túlélési assay a 2. ábrának megfelelően.

### **1. példa: A totál humán vérből származó extraktum sejt kultúra médium gyártási folyamata**

Egészséges donoroktól származó humán vénás vér kerül felhasználásra. Alternatívaként használható állatból származó vér is (legalkalmasabb erre a borjú vagy sertésből származó), mely mindkét esetben steril körülmények között frissen csapolt a mézárás alatt. A koagulációt 100 IE Heparin per ml hozzáadásával gátoljuk a kollektív zsákban. Ezt követően a vörös vértetek lízisére kerül sor, hogy a vörös véresejtekben lévő intracelluláris anyagok kiszabaduljanak a plazmába. Optimális esetben a lízis az antikoagulált vér fagyasztásával történik -20°C-os hőmérsékleten, 50 ml csövekben kontrollált fagyasztási sebességű és hőfokú fagyasztó készülékben, a sejtmembrán egységes feltörése céljából, mikroszkópikus méretű jégkristályok segítségével. Ezt követően a fagyasztott vér -80°C-on tárolandó, míg további kezelésre kerül. Hogy a megfelelő iontartalom helyreálljon, mely a hemolízis eredményeként lépett fel, és hogy alacsony molekulású tápanyagokat adjunk, a lizátum dialízisre kerül többlet térfogattal bíró sejt kultúra médium ellen, mint például Dulbeccos modified Eagle médium (DMEM - D6546, Sigma-Aldrich Company) vagy pedig Iscoves modified DMEM (IMDM). Optimális körülmények között az 50 ml-es kiserelésekben lefagyasztott vér, Falcon műanyagcsövekben, felolvasztásra kerül 37°C-os vízfürdő segítségével. A felolvasztott vér lizátum egy rehidrált Cellu SepH1 dialízis zsákba (0310-46, M.S.E. Micron Separation Europe, Belgium – size exclusion limit 3500D) töltendő. A dialízis membrán mérsékelt extra nyomás elérésével zárandó be (1,2-1,4 bar) a normál atmoszférikus nyomást meghaladó extra nyomás azért szükséges, hogy eltávolítsa a lizátumból a levegőbuborékokat és hogy megelőzze a további térfogatnövekedést. A dialízis sötétben történik 24 órán keresztül 4 °C-os hőmérsékleten 20-szoros térfogattöbblettel, folyamatos mágneses keverés közepette. A vörösvértest membránból származó úgynevezett "ghost" elemek eltávolítása centrifugálással történik. Optimális gyártási keretek között a centrifugálás egy mikropórusú szilika matrixon keresztül történik, mely equilibriumban van a médiummal, mely a dialízishez lett használva. A membránból származó "ghost" maradványok megfelelő eltávolítása végett a folyamat állandóan monitorozva és dokumentálva van 10 mikroliteres mintavételek vételével, minden 50 ml filtrált lizátumból és képanalízissel digitális automatizált fáziskontraszt mikroszkóppal ellenőrzésre kerül. A megfelelő redox milieu megteremtése végett, a



részecske mentes vér lizátumhoz extra redukáló ágens adandó. Optimális gyártási körülmények között az ágens 0,5 mM redukált glutathione (G6013, Sigma-Aldrich Company). Ezt követően a vér lizátum vákuumfiltrálásra kerül nitrocellulóz membránon át (Corning 431153, Corning Inc.) 0,22 microméteres pórusmérettel, és az utolsó filtrációs lépést követően azonnal folyékony nitrogén segítségével villámfagyasztjuk 3 ml kiszerezésekben. Az így lefagyasztott csövek azután -80°C-on kerülnek tárolásra mielőtt felhasználásra kerülnek a különböző biológiai assay-kben. Lásd az 1. ábrát a folyamat sematikus ábrázolásáért.

## 2. példa: Túlélési teszt gyógyszerrel kezelt primer humán tumorsejteken

A teljes vérből kiinduló lizátumra alapozott sejt kultúra médium különlegesen alkalmas gyógyszerérzékenységi tesztek elvégzésére humán primer sejteken, melyek szuszpenzió formájában nőnek, rövid idejű in vitro túlélési assay használatával. Ezekhez a vizsgálatokhoz a betegből származó tesztelésre szánt sejtek perifériás vérből vannak tisztítva, vagy csontvelőből, vagy testüri folyadék (peritonealis vagy pleuralis) effúzióból Ficoll gradiens centrifugálással. Normális körülmények között az assayhez tíz ml testüri folyadékhoz 100 IE/ml heparint adunk, hogy megelőzzük a koagulációt. A folyadék azután, 5 ml LymphoprepR (Frezenius Kabi Norge AS) párnára helyezendő és 10 percig 2500 rpm fordulaton centrifugálandó.

A sejtek a gradiens interfázisából kerülnek ki és előmelegített 20% humán szérum tartalmú sejt kultúra médiummal átmosásra kerülnek. A minőségellenőrzés és tumorsejtszám fáziskontraszt mikroszkóp segítségével analízisre és dokumentálásra kerül. Ha a tumorsejtszám 70% alatti, a sejtek további tisztítási eljárás mennek keresztül megfelelő Dynabead kóktél segítségével, melyek reagálnak a kontamináló normál (pl. gyulladáso) sejtekkel. A tumorsejtek identifikálásának igazolásaképpen független assayek elvégzésére kerül sor immunhisztokémiai markerek segítségével. Példának okáért a carcinoma sejtek a testüri folyadék effúziókból Cytospin lemezekon kerülnek immunofluorescens festésre pan-cytokeratin antitestekkel. A T, B, plazma-, NK sejtek, granulociták és macrophagok/monocyták rutin tesztelese például anti- CD3, CD4, CD8, CD19, Ig, CD56, Mac1 antitestekkel történik. A tumorsejtek gyógyszerérzékenységének tesztelése ezután 384-lyukú lemezekon történik.

Az előre leprintelt 384-lyukú gyógyszer tartalmú lemezek egy Biomek 2000 folyadékkezelő robot segítségével készülnek, ami egy lapos rozsdamentes acéltüskés 50 nanoliter replika térfogat tartalmú adagolófejjel van ellátva. A törzskoncentrációt tartalmazó replika-lemezekről hígítási sorozattal készülnek a munkahígítású replika-lemezek egyes és nyolcas pipettahegy kombinációk adagolásával. Egy tipikus futtatás alkalmával 30 különféle gyógyszert 4 különböző hígításban (általában 1x 5x 25x 125x hígítási sorban a törzsoldatból, 50% DMSO/PBS-ben) triplettekben 24 kontrol lyuk kíséretében készül. Egy példa a gyógyszerek hígítási sorának bemutatása a 2. ábrán látható. A megfelelő gyógyszerkoncentrációk a farmakokinetikára humán egyedekre számított, publikált adatokra építve lettek meghatározva [14, 15]. Amikor szükséges, akkor az eredeti inaktív pro-drug helyett azok aktív metabolitjai kerültek felhasználásra (pl. 4-OH cyclophosphamide).

Rövid idejű túlélési assay-khez  $2 \times 10^5$  -  $2 \times 10^6$  számú tumor sejt (körülbelül 500 – 4000 sejt lyukanként) került felhasználásra és 12 ml frissen felolvasztott totál vérextrakt lizátumban hígítva. Harminc mikroliter minta kerül kimérésre a 384-lyukú lemezre lyukanként. A sejtek azután 72 órán át inkubálódnak 37 °C-on 5% CO<sub>2</sub> tartalommal. Az inkubálás végén a sejtek differenciáltan kerülnek megfestésre fluoreszcens festék-keverékkel, mely különválasztja az elpusztult sejteket az élőtől (pl. VitalDye – BioMarker Kft, Hungary) (2. ábra). Az egyes lemezen lévő lyukak fényképezésre kerülnek egy automatizált inverz fluoreszcens mikroszkóppal, két különböző gerjesztési hullámhosszon [16]. A lefényképezett képen ezután egy digitális kvantitatív képanalizáló



program segítségével meghatározzuk az élő és elpusztult sejtek számát és egymáshoz való arányukat egyetlen és minden egyes sejtből külön-külön meghatározva binárisan határértékelt adatokból. A túlélési érték 3 napos inkubáció eltelte után az indikált gyógyszerek esetében egy "hőterkép" szerű ábrázolással párba állított hierarchikus csoportanalízissel kerülnek kiértékelésre a különböző primer tumorok esetében, mint például tüdő, ovarium, emlő (3. ábra), acute myeloid leukemiáknál (4. ábra), chronic lymphoid leukemiáknál (5. ábra). A 216 primer tumorból származó gyógyszerérzékenységi mintázatot magába foglaló kép a 6. ábrán látható. Ezen adatok egyértelműen igazolják, hogy még a legrezisztensebb tumorok esetében is (pl. késői stádiumú ovarium carcinoma ascites sejtek amint azt a 7- ábra mutatja) található hatékonyan működő rákellenes szer, ha az a sejteket egy *in vivo* környezethez közeli millieut biztosító teljes vér extraktum alapú médiumban növesztjük.

Totál fluoreszcens intenzitás, sejtméret, sejt felszínének a kerülete úgymint morfológiai sajátosságok, pl. cirkularitás, feret átmérő, adatoknak a feldolgozása folyamatosan történik a nagy információ tartalommal rendelkező szűrések esetében, "High Content Analysis" (HCA). Ha sejtciklus-megoszlási adatokra is szükség van, akkor egy permeabilizálási és fixálási lépést, mint a detergens kezelés aldehid-keresztalkotással kombinálva. A gyakorlatban formaldehid és Nonidet P-40 keveréke adandó a fluoreszcensen festett lemezekhez, 1 és 0,1% végkoncentrációban. A lemezek ezután képalkotó rendszerrel analizálva vannak a korábbi, elpusztult sejteknél használt paraméterek alapján. A fluoreszcens festék ami az első körben az elpusztult sejteket detektálja a kiegyenlített membrán-permeabilitású sejtek DNS megfestésével, a második futtatás alkalmával segít a DNS tartalom meghatározásakor. A sejtciklus megoszlás, túlélési adatok, sejt morfológiai adatok kombinációja hasznos segítséget ad, hogy karakterizáljuk egy-egy gyógyszer hatását az egyedi primer tumorsejteken. Például egy sejtciklus-stop vagy az adherens sejtek felkerekedése szintén fontos információ tartalommal bír a gyógyszer sejt populációra gyakorolt hatásáról, amit az egyszerű viabilitási tesztek nem képesek megkülönböztetni.

### **3. példa: Klasszikus sejt kultúra médiummal történő összehasonlítás (csökkent érzékenység a gyógyszerekkel szemben)**

Humán primer carcinoma és leukemias sejtek inkubálása vér extraktum alapú sejt kultúra médiumban a konvencionális sejt kultúra médiumokkal szemben állandóan nagyobb és hosszabb túlélési görbét mutatott és csökkent érzékenységet a különböző rákellenes gyógyszerek citotoxikus hatásával szemben (8. ábra).

### **4. példa: Humán, borjú, sertés eredetű vér extraktumok összehasonlítása**

Frissen vágott sertés és borjú totál véreből azonos körülmények között vérextraktum alapú sejt kultúra médium készült. A vér steril körülmények között került lecsapolásra, ahogy azt az 1 példa leírja.

Humán frissen izolált carcinoma sejteken paralell futtatott tesztvizsgálatok hasonló gyógyszerérzékenységi mintázatot és eredményeket mutattak a különböző fajból származó vérextraktum alapú sejt kultúra médium használatakor. Primer humán leukémiás sejtek ugyanakkor valamivel jobb túlélési arányt mutattak a humán teljesvérből előállított vérextraktum alapú sejt kultúra médiumban a más fajból származókkal szemben. Ezek az adatok arra utalnak, hogy nagy mennyiségű humán primer carcinoma sejt gyógyszerérzékenységi tesztelésekor a más fajból származó totál vérextraktum alapú sejt kultúra médiumok is jól működnek, míg a humán primer leukemias sejtek gyógyszer érzékenységi tesztelésekor a humán eredetű totál vérextraktumot kell előnyben részesíteni a megbízhatóbb klinikai információ megszerzése végett (9. ábra).



## Referenciák

1. Samson DJ, Seidenfeld J, Ziegler K, Aronson N: **Chemotherapy sensitivity and resistance assays: a systematic review.** *J Clin Oncol* 2004, **22**:3618-3630.
2. Larsson R, Nygren P: **A rapid fluorometric method for semiautomated determination of cytotoxicity and cellular proliferation of human tumor cell lines in microculture.** *Anticancer Res* 1989, **9**:1111-1119.
3. Larsson R, Fridborg H, Kristensen J, Sundstrom C, Nygren P: **In vitro testing of chemotherapeutic drug combinations in acute myelocytic leukaemia using the fluorometric microculture cytotoxicity assay (FMCA).** *Br J Cancer* 1993, **67**:969-974.
4. Shay JW, Wright WE: **Tissue culture as a hostile environment: identifying conditions for breast cancer progression studies.** *Cancer Cell* 2007, **12**:100-101.
5. Nygren P, Fridborg H, Csoka K, Sundstrom C, de la Torre M, Kristensen J, Bergh J, Hagberg H, Glimelius B, Rastad J, et al.: **Detection of tumor-specific cytotoxic drug activity in vitro using the fluorometric microculture cytotoxicity assay and primary cultures of tumor cells from patients.** *Int J Cancer* 1994, **56**:715-720.
6. Nygren P, Hagberg H, Glimelius B, Sundstrom C, Kristensen J, Christiansen I, Larsson R: **In vitro drug sensitivity testing of tumor cells from patients with non-Hodgkin's lymphoma using the fluorometric microculture cytotoxicity assay.** *Ann Oncol* 1994, **5 Suppl 1**:127-131.
7. Villman K, Blomqvist C, Larsson R, Nygren P: **Predictive value of in vitro assessment of cytotoxic drug activity in advanced breast cancer.** *Anticancer Drugs* 2005, **16**:609-615.
8. Nagourney RA: **Ex vivo programmed cell death and the prediction of response to chemotherapy.** *Curr Treat Options Oncol* 2006, **7**:103-110.
9. Arosa FA, Pereira CF, Fonseca AM: **Red blood cells as modulators of T cell growth and survival.** *Curr Pharm Des* 2004, **10**:191-201.
10. Fonseca AM, Pereira CF, Porto G, Arosa FA: **Red blood cells upregulate cytoprotective proteins and the labile iron pool in dividing human T cells despite a reduction in oxidative stress.** *Free Radic Biol Med* 2003, **35**:1404-1416.
11. Fonseca AM, Pereira CF, Porto G, Arosa FA: **Red blood cells promote survival and cell cycle progression of human peripheral blood T cells independently of CD58/LFA-3 and heme compounds.** *Cell Immunol* 2003, **224**:17-28.
12. Fonseca AM, Porto G, Uchida K, Arosa FA: **Red blood cells inhibit activation-induced cell death and oxidative stress in human peripheral blood T lymphocytes.** *Blood* 2001, **97**:3152-3160.
13. Porto B, Fonseca AM, Godinho I, Arosa FA, Porto G: **human red blood cells have an enhancing effect on the relative expansion of CD8+ T lymphocytes in vitro.** *Cell Prolif* 2001, **34**:359-367.
14. Markasz L, Stuber G, Flaberg E, Jernberg AG, Eksborg S, Olah E, Skribek H, Szekely L: **Cytotoxic drug sensitivity of Epstein-Barr virus transformed lymphoblastoid B-cells.** *BMC Cancer* 2006, **6**:265.
15. Markasz L, Stuber G, Vanherberghen B, Flaberg E, Olah E, Carbone E, Eksborg S, Klein E, Skribek H, Szekely L: **Effect of frequently used chemotherapeutic drugs on the cytotoxic activity of human natural killer cells.** *Mol Cancer Ther* 2007, **6**:644-654.




16. Flaberg E, Sabelstrom P, Strandh C, Szekely L: **Extended Field Laser Confocal Microscopy (EFLCM): combining automated Gigapixel image capture with in silico virtual microscopy.** *BMC Med Imaging* 2008, 8:13.

### Szabadalmi igénypontok

1. Sejtkultúra médium humán sejtek tenyésztésére, amely antikoagulált teljes véranyagot tartalmaz, ahol a hemoglobin szint körülbelül 8 és körülbelül 16 g/dl közötti.
2. Az 1. igénypont szerinti sejtkultúra médium, ahol a vérben jelen lévő sejtek fel vannak tárva, és a lizált sejtek oldhatatlan maradéka el van távolítva.
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti sejtkultúra médium, ahol a vér emlős eredetű.
4. A 3. igénypont szerinti sejtkultúra médium, ahol a vér humán eredetű.
5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti sejtkultúra médium, ahol a médium iontartalma vissza van állítva, hogy igazodjon a teljes vér kiindulási anyag extracelluláris frakciójáéhoz.
6. Az 1-5. igénypont szerinti sejtkultúra médium, ahol az alacsony molekulatömegű (< 3000 Dalton) tápanyag-tartalom és/vagy összetétel lényegében ugyanolyan, mint az RPMI, DMEM és IMDM által alkotott csoportból kiválasztott hagyományos sejtkultúra médiumé.
7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti sejtkultúra médium, ahol a médium redukálóképessége vissza van állítva redukált glutation hozzáadásával.
8. Az 1-7. igénypont szerinti sejtkultúra médium alkalmazása humán sejtek tenyésztésére.
9. Eljárás humán sejtek tenyésztésére szolgáló sejtkultúra médium előállítására, amely tartalmazza a következő lépéseket:
  - (a) antikoagulált emlős vér biztosítása kiindulási anyagként;
  - (b) a vérben jelen lévő sejtek mechanikai feltárása;
  - (c) a lizált sejtek oldhatatlan maradékának eltávolítása.
10. A 9. igénypont szerinti eljárás, ahol a sejtek mechanikai feltárása a teljes vér lefagyasztásával, vagy ultrahanggal, elektromos késes homogenizátorral vagy French press készülékkel van elérve.
11. A 9. vagy 10. igénypont szerinti eljárás, ahol a lizált sejtek oldhatatlan maradékának az eltávolítása ultracentrifugálással vagy mechanikus szűréssel van elérve.
12. A 9-11. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, ahol a médium alacsony molekulatömegű (< 3000 Dalton) tápanyag-tartalma és/vagy összetétele módosítva van az RPMI, DMEM és IMDM által alkotott csoportból kiválasztott hagyományos sejtkultúra médiummal szemben végzett dialízissel.
13. A 9-12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, ahol a médium redukálóképessége vissza van állítva redukált glutation hozzáadásával.
14. Sejtkultúra médium humán sejtek tenyésztésére, amely a 9-13. igénypontok bármelyike szerinti eljárással állítható elő.
15. A sejtkultúra médium, amint a leírás szerint fel van tárva.

12 oldal  
8 ábrával

Σ 20 oldal

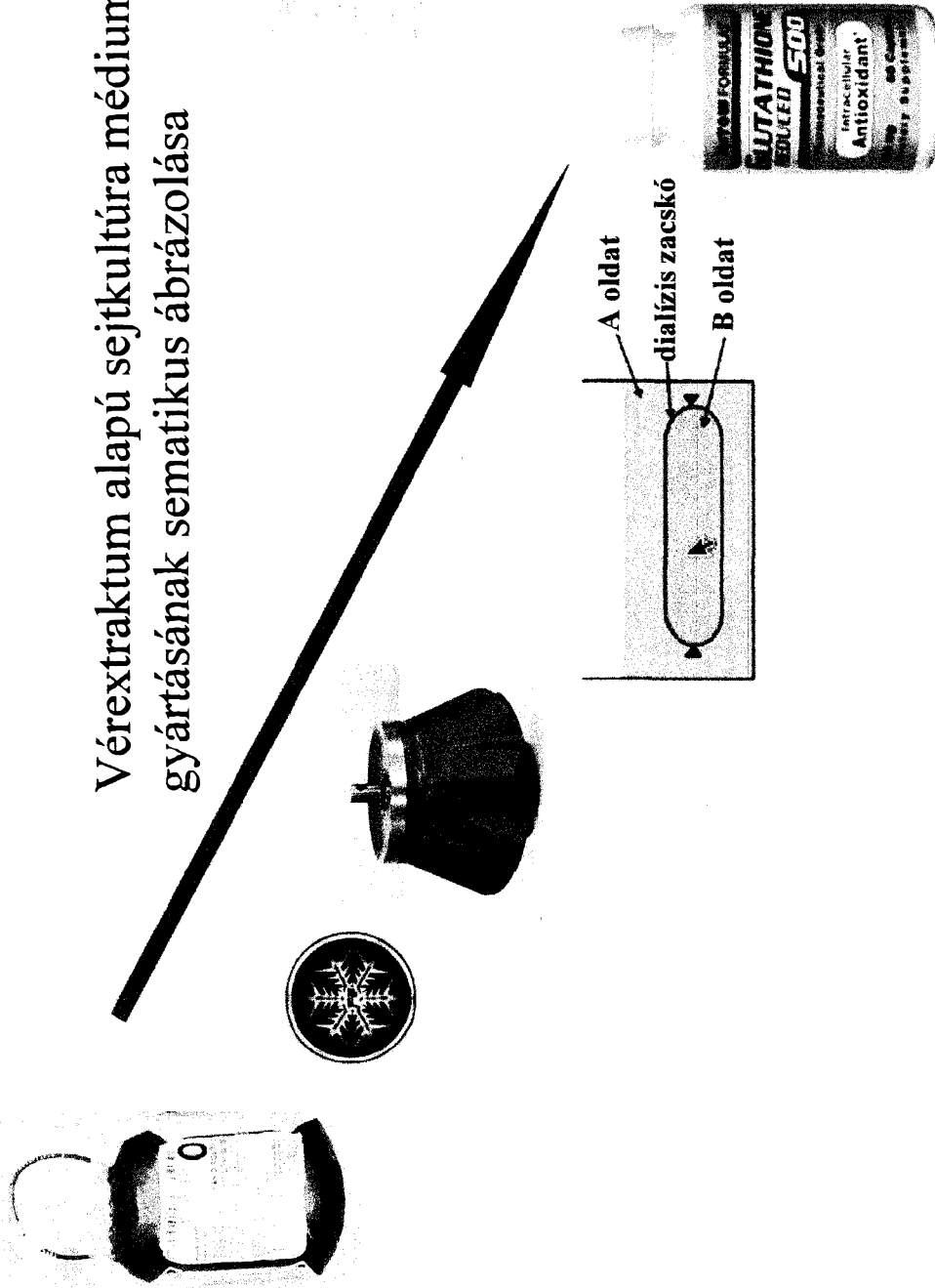
A meghatalmazott:  
  
**DANUBIA**  
Szabadalmi és Jogi Iroda Kft.  
Lengyel Zsolt  
szabadalmi ügyvivő h.

11. 11. 21

Drahos Eszter  
2011. 03. 25.

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

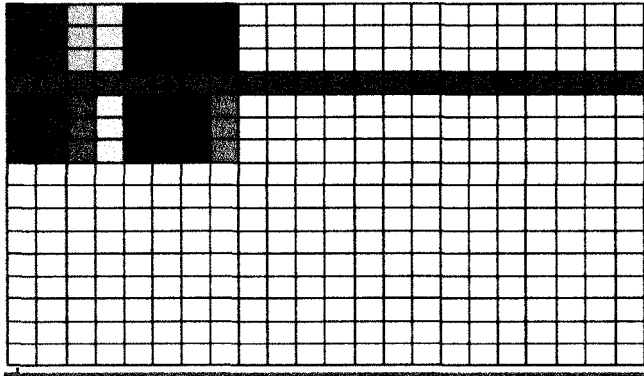
**Vérextraktum alapú sejt kultúra médium  
gyártásának sematikus ábrázolása**



**1. ábra**



384-lyukú lemez alapelrendezése:  
30 féle gyógyszer 4-lépéses hígítással három párhuzamosban



A  
C

B  
D

1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Epidoxorubicin 1,66mcg/ml	Chlorambucil 83,33mcg/ml	Bleomycin 25 IU/ml	Oxaliplatin 4,166mcg/ml	Docetaxel 33,33mcg/ml	Vincristin 0,4166mcg/ml						
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Doxorubicin 1,66mcg/ml	Cladribine 0,833mcg/ml	Gemcitabin 50mcg/ml	Bevacizumab 20,833 mcg/ml	Topotecan 3,33mcg/ml	Ifosfamid 33,33mcg/ml						
control	control	control	control	control	control						
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Vinblastin 0,833mcg/ml	Hydroxyurea 41,66mcg/ml	Cytosine-arabinoside 83,33mcg/ml	Paclitaxel 5 mcg/ml	MG-132 8,33mcg/ml	Fludarabin 20,833mcg/ml						
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Methotrexate 20,833mcg/ml	Streptozotocin 41,66mcg/ml	Epirubicin 1,666mcg/ml	Actinomycin-D 0,4166mcg/ml	Asparaginase 4,166 IU/ml	Vinorelbine NAVEL 8,33mcg/ml						
1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Carboplatin 0,33mcg/ml	6-Mercaptopurin 69,44mcg/ml	5-Fluorouracil 41,66mcg/ml	Bortezomib 0,833 mcg/ml	Daunorubicin 4,166mcg/ml	Cyclophosphamide 33,33mcg/ml						

Gyógyszerek	Maximális koncentráció
5-Fluorouracil	41,66 ug/ml
6-Mercaptopurin	69,44ug/ml
Actinomycin-D	0,4166ug/ml
Asparaginase	4,166 IU/ml
Bevacizumab	41,66ug/ml
Bleomycin	25 IU/ml
Bortezomib	0,833 ug/ml
Carboplatin	8,33ug/ml
Chlorambucil	83,33ug/ml
Cisplatin	8,33ug/ml
Cladribine	0,833ug/ml
Cyclophosphamide	33,33ug/ml
Cytosine-arabinoside	83,33ug/ml
Daunorubicin	4,166ug/ml
Docetaxel	33,33ug/ml
Doxorubicin	1,66ug/ml
Epirubicin	1,666ug/ml
Etoposide	16,66ug/ml
Fludarabine	20,833 ug/ml
Gemcitabin	50ug/ml
Hydroxyurea	41,66ug/ml
Ifosfamid	33,33ug/ml
Methotrexate	20,833ug/ml
MG-132	8,33ug/ml
Mitomycin C	0,55 ug/ml
Oxaliplatin	4,166ug/ml
Paclitaxel	5 ug/ml
Prednisolone	16,66ug/ml
Streptozotocin	41,66ug/ml
Topotecan	0,0833ug/ml
Vinblastin	0,833ug/ml
Vincristin	0,4166ug/ml

DLBL sejtek 30 különböző gyógyszerre adott válasza, individualizált sejt képanalízissel kiértékelve 500.000 sejt 7680 konfokális szekcióban, ami 10,31 Gigapixel információnak felel meg

élő sejtek — sárga 4 különböző gyógyszerhígítás három párhuzamosban  
elpusztult sejtek — kék

2. ábra



# Krónikus limfoid leukémia

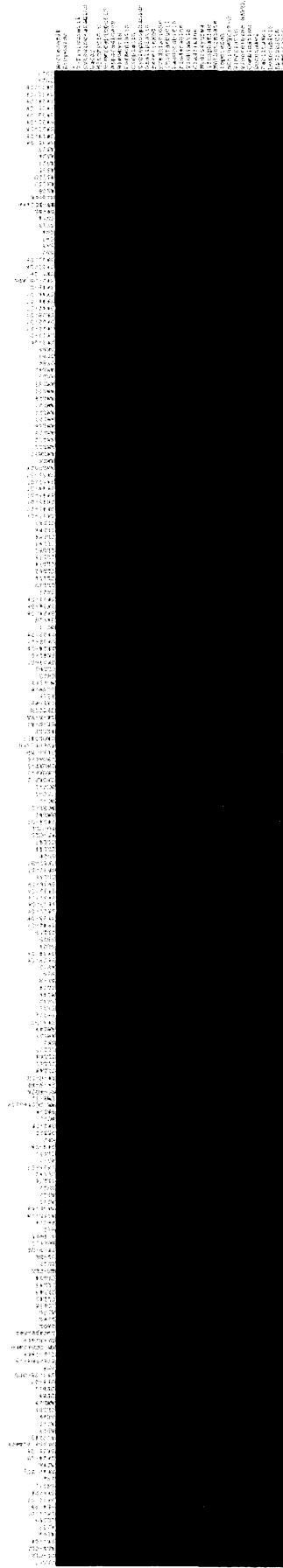
SK30-07	CLL82
SK51-07	SK54-07
SK1-08	SK1-08
SK4-08	SK17-08
SK20-08	SK21-08
SK29-08	SK36-08
CLL38	CLL39
CLL41	CLL43
CLL44	CLL45
CLL47	CLL48
CLL54	CLL57
CLL61	CLL64
CLL74	CLL83
CLL85	CLL86
CLL87	SK42-07
SK43-07	SK45-07
SK47-07	SK53-07
SK9-08	SK22-08
SK24-08	SK26-08
SK34-08	SK35-08
SK37-08	CLL51
CLL56	CLL62
CLL81	CLL84
SK50-07	SK14-08
SK14-08	SK14-08
CLL69	CLL78
SK21-07	SK41-07
KE-CLL	SK49-07
SK19-08	SK25-08
SK25-08	SK38-08
CLL60	CLL75
SK37-07	SK39-07
SK33-08	CLL36
CLL50	CLL76
CO-CLL	ALB-CLL
BM-CLL	KO-CLL
SK36-07	SK15-08
SK15-08	SK15-08
SK31-08	SK32-08

- 5-Fluorouracil
- 6-Mercaptopurin
- Actinomycin-D
- Asparaginase
- Bleomycin
- Bortezomib
- Carboplatin
- Chlorambucil
- Cisplatin
- Cladribine
- Cyclophosphamide
- Cytosine-arabino
- Dacar
- Daunorubicin
- Docetaxel
- Doxorubicin
- Epirubicin
- Etoposide
- Fludarabine
- Gemcitabin
- Hydroxyurea
- Ifosfamide
- Methotrexate
- Mitomycin C
- Oxaliplatin
- Paclitaxel
- Remetrexed
- Prednisolone
- Topotecan
- Vinblastin
- Vincristin
- Vinorelbine HAVEL
- Combination

5. ábra

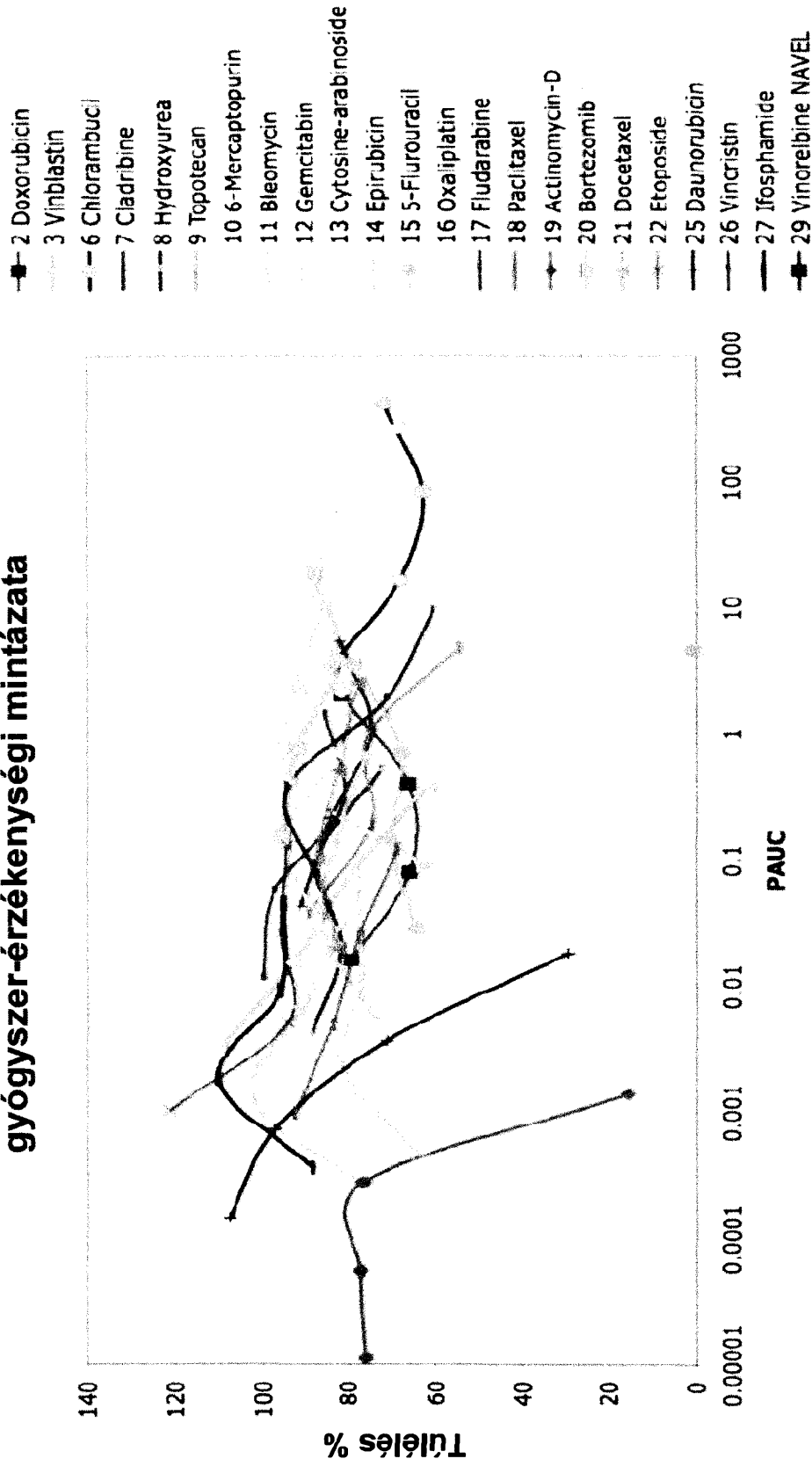


## Gyógyszer-érzékenységi teszt mintázat 216 különböző humán primer tumor esetében citosztatikus gyógyszerrel szemben

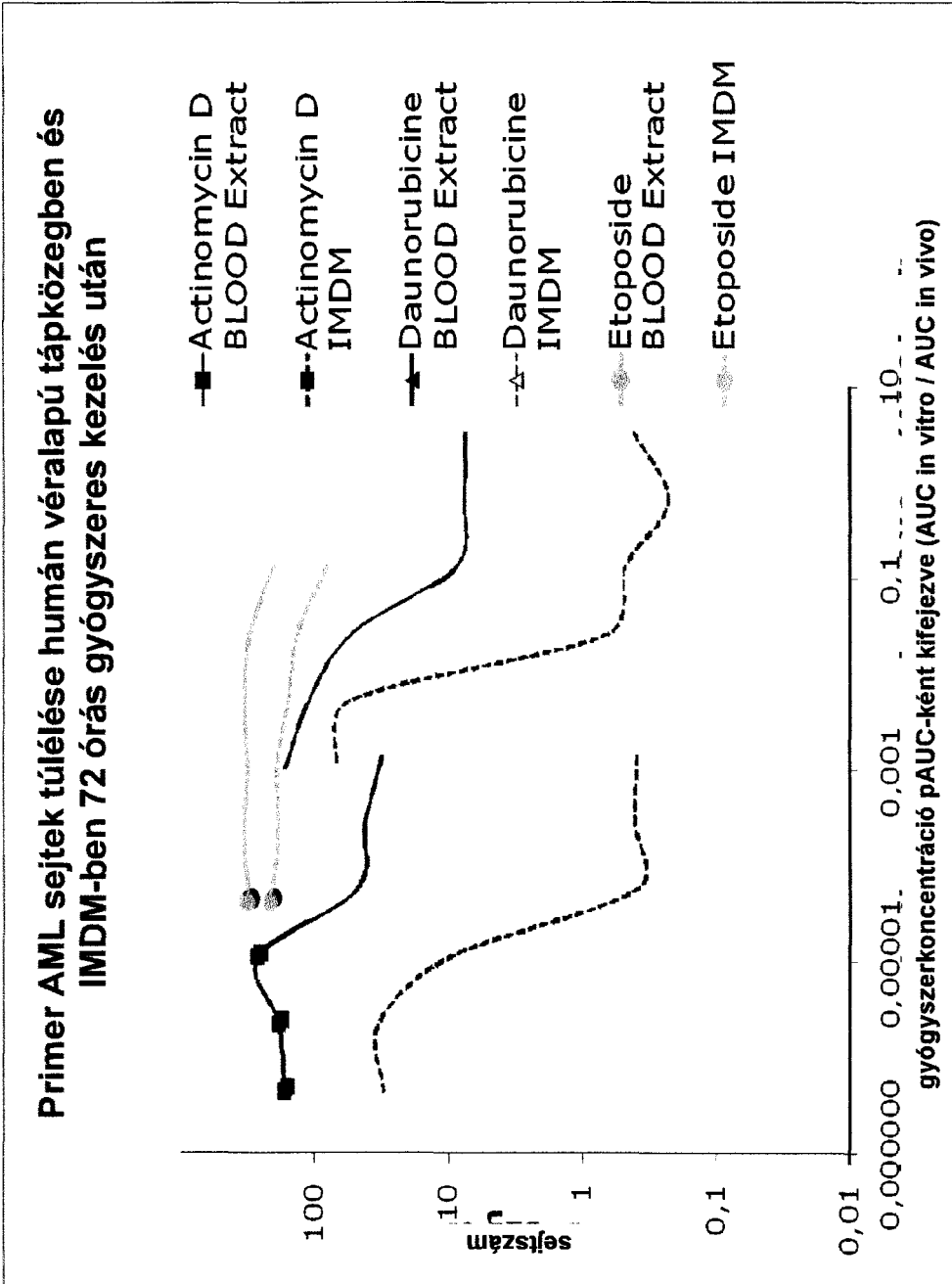


6. ábra

### Az SH11 primer petefészek karcinóma gyógyszer-érzékenységi mintázata



7. ábra



8. ábra

