



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 600 11 761 T2 2005.08.04**

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 171 573 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 11 761.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US00/09150**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 923 144.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 00/60051**

(86) PCT-Anmeldetag: **06.04.2000**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **12.10.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.01.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **23.06.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **04.08.2005**

(51) Int Cl.⁷: **A61K 38/18**

**C08J 9/14, A61K 31/4155, A61M 31/00,
A61F 9/00, A61P 27/02, A61P 25/28,
A61P 35/00**

(30) Unionspriorität:

127926 P	06.04.1999	US
543119	05.04.2000	US

(73) Patentinhaber:

Neurotech S.A., Paris, FR

(74) Vertreter:

Schwabe, Sandmair, Marx, 81677 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**TAO, Weng, Lincoln, US; REIN, H., David,
Cambridge, US; DEAN, J., Brenda, Cumberland,
US; STABILA, F., Paul, Coventry, US; GODDARD,
B., Moses, Tiverton, US**

(54) Bezeichnung: **ARPE-19 ALS PLATTFORM ZELLINIE ZUR VERABREICHUNG EINGEKAPSELTER ZELLEN**

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

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

Beschreibung

TECHNISCHES GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Diese Erfindung bezieht sich allgemein auf Zelltherapie und verkapselte Vorrichtungen.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Wachstumsfaktoren haben ein enormes therapeutisches Potenzial für neurodegenerative Störungen. Wachstumsfaktoren müssen jedoch noch erfolgreich zu klinischen Behandlungen entwickelt werden, wegen der Tatsache, dass große Proteine, wie Wachstumsfaktoren, die Bluthirnschranke nicht überqueren. Die Transplantation von Zellen, die gentechnisch verändert wurden, um Wachstumsfaktoren zu produzieren, bietet eine teilweise Lösung des Problems der Zufuhr von Wachstumsfaktoren, da Implantate aus Zellen, die Wachstumsfaktoren herstellen, die Bluthirnschranke umgehen können und die therapeutischen Faktoren direkt an die Zielstelle liefern können. Unglücklicherweise sind diese Transplantate Gegenstand der Immunabwehr des Empfängers und benötigen Immunsuppression. Weiterhin können Implantate einiger gentechnisch veränderter Zelllinien letale Tumoren bilden.

[0003] Das Implantieren von Zellen, die in semipermeablen Polymermembranen makroverkapselt worden sind, stellt eine bessere Lösung für diese Probleme bereit. Säugerzellen, die gentechnisch verändert worden sind, um Wachstumsfaktoren zu produzieren, können in semipermeablen Polymermembranen verkapselt werden. Die semipermeablen Membranen schützen die verkapselten Zellen vor der akuten Immunabwehr des Empfängers, ermöglichen jedoch die Zufuhr therapeutischer Mittel in das Empfängergewebe. Diese kleinen bioartifizellen Vorrichtungen (Zellen, die in semipermeablen Membranen makroverkapselt sind) können direkt an der Zielstelle für die ortsspezifische, fortdauernde Langzeitzufuhr auf niedrigem Niveau der gewünschten Faktoren implantiert werden. Das Verkapseln von Zellen in semipermeable Membranen reduziert auch das Risiko der Tumorentwicklung. Weiterhin haben polymerverkapselte Zelltransplantate ein verringertes Auftreten von Infektion, da die Transplantate nur ein einzelnes Eindringen in die Zielstelle für die fortwährende Wachstumsfaktorzufuhr benötigen.

[0004] Hinsichtlich der Zufuhr gewünschter Wachstumsfaktoren zeigten vorklinische Studien, dass polymerverkapselte Zellen den Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) kontinuierlich mit therapeutischer Wirksamkeit in Nagermodellen zuführen können (Emerich et al., 16 J. Neurosci. 5168-81 (1996)). Klinische Versuche unterstützten die Sicherheit der chronischen CNTF-Zufuhr in das menschliche Zentralnervensystem (ZNS) mit polymerverkapselten Zellen (Aebischer et al., 7 Hum. Gene Ther. 851-60 (1996), Aebischer et al., 2 Nature Medicine 6969-9 (1996)). Die Hauptherausforderung bei der Umsetzung solcher Erfolge von den Nagermodellen auf den Menschen ist jedoch die Sicherstellung der Langzeitzellüberlebensfähigkeit in verkapselten Vorrichtungen in vivo.

[0005] WO 97/34586 beschreibt ein Verfahren und eine Vorrichtung zur Zufuhr eines biologisch aktiven Moleküls an das Auge für die Behandlung optalmischer Erkrankung. Die Vorrichtung umfasst einen Kern gentechnisch veränderter Zellen, die in einem biokompatiblen Mantel verkapselt sind.

[0006] WO 98/40498 beschreibt die Verwendung von Immunadhäsionen in der Gentherapie für die Behandlung von Augenentzündungszuständen unter Verwendung von Retinapigmentepithelzellen.

[0007] WO 97/44065 beschreibt Verfahren und Vorrichtungen für die Gentherapie unter Verwendung von verkapselten Verpackungszelllinien, um virale Partikel zuzuführen, die wenigstens ein heterologes Gen tragen, das wenigstens ein biologisch aktives Molekül kodiert.

[0008] Die vorliegende Erfindung stellt folglich eine implantierbare Zellkulturvorrichtung bereit, die eine semipermeable Membran umfasst, welche die Diffusion eines biologischen Mittels durch diese hindurch ermöglicht, und ARPE-19-Zellen, die gentechnisch verändert sind, um das in der semipermeablen Membran angeordnete biologische Mittel herzustellen.

[0009] Die vorliegende Erfindung stellt auch die Verwendung einer ARPE-19-Zelle, die in einer semipermeablen Membran verkapselt ist, wobei diese ARPE-19-Zellen gentechnisch verändert sind, um ein biologisches Mittel herzustellen, und wobei diese Membran die Diffusion des biologischen Mittels durch diese hindurch erlaubt, für die Herstellung eines Medikamentes bereit für die Zufuhr des biologischen Mittels an einen Empfänger nach der Implantation dieser verkapselten Zelle in einen Zielbereich in dem Empfänger.

[0010] Die ARPE-19-Zelllinie ist eine überragende Plattformzelllinie für die auf verkapselten Zellen basierende Zufuhrtechnologie und sie ist auch nützlich für die Zufuhrtechnik, die auf nicht verkapselten Zellen basiert. Die ARPE-19-Zelllinie ist zäh (das heißt, die Zelllinie ist unter stringenten Bedingungen, wie die Implantation in das zentrale Nervensystem oder die intraokulare Umgebung, lebensfähig). ARPE-19-Zellen können gentechnisch modifiziert werden, um eine Substanz von therapeutischem Interesse zu sezernieren. ARPE-19-Zellen haben eine vergleichsweise lange Lebensspanne. ARPE-19-Zellen sind menschlichen Ursprungs. Weiterhin haben verkapselte ARPE-19-Zellen eine gute in vivo Vorrichtungsüberlebensfähigkeit. ARPE-19-Zellen können eine wirkungsvolle Menge an Wachstumsfaktor zuführen. ARPE-19-Zellen lösen eine vernachlässigbare Wirtimmunreaktion aus. Ferner sind ARPE-19-Zellen nicht tumorigen.

[0011] Die therapeutische Nützlichkeit der Zufuhr, basierend auf polymerverkapselten ARPE-19-Zellen, von Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) für die Herstellung eines Medikamentes für die Behandlung degenerativer Erkrankungen wurde sowohl in einem Nager- als auch in einem Hundemodell der Retinitis pigmentosa gezeigt. ARPE-19-Zellen wurden gentechnisch modifiziert, um CNTF zu sezernieren. Verkapselte gentechnisch modifizierte ARPE-19-Zellen führten eine gleichmäßige Menge an CNTF, z. B. über ein 7-wöchiges Implantationsintervall, zu. Die Zelllebensfähigkeit innerhalb der verkapselten Vorrichtungen war ausgezeichnet. Die Anwesenheit der verkapselten Zellvorrichtungen in dem Auge verursachte keine signifikanten Nebenwirkungen an der Retina. Diese Ergebnisse stellen einen Nachweis des Prinzips für das therapeutische Potenzial der auf verkapselten ARPE-19-Zellen basierenden Zufuhr gewünschter neurotropher Faktoren bereit.

[0012] [Fig. 1](#) ist eine Photographie, die den Schutz von Photorezeptoren in transgenen Ratten, die die Rhodopsinmutation S334ter durch ARPE-19-/CNTF-Zellen tragen, zeigt. (A) mit S334ter nicht behandelte Ratte; (B) mit elterlichen ARPE-19-Zellen behandelte Kontrollratte; und (C) mit ARPE-19/CNTF-Zellen behandelte Ratte.

[0013] [Fig. 2](#) ist ein Säulendiagramm, das anti-ARPE-19-spezifische IgG-Titer in Hunde- im Vergleich zu menschlichem Serum zeigt. ARPE-19-, Hs27- und SIRC-Zellen wurden entweder mit Hunde- oder menschlichen Serumverdünnungen inkubiert. Der Antikörpertiter wurde durch durchflusscytometrischen Kreuzvergleich (FCXM) bestimmt.

[0014] [Fig. 3](#) ist ein Säulendiagramm, das den cytotoxischen ARPE-19-spezifischen Antikörpertiter in Hunde- im Vergleich zu menschlichem Serum zeigt. ARPE-19-, Hs27- und SIRC-Zellen wurden mit entweder Hunde- oder menschlichen Serumverdünnungen inkubiert. Der cytotoxische Antikörpertiter wurde durch komplementabhängigen Cytotoxizitätskreuzvergleich (CDC) gemessen.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

A. ARPE-19-Zelllinie als eine Plattformzelllinie für ein auf verkapselten Zellen basierendes Zufuhrsystem.

[0015] Um eine Plattformzelllinie für ein auf verkapselten Zellen basierendes Zufuhrsystem zu sein, sollte die Zelllinie so viele der folgenden Eigenschaften als möglich haben: (1) Die Zellen sollten unter stringenten Bedingungen zäh sein (die verkapselten Zellen sollten in den gefäßfreien Gewebehohlräumen, wie in dem zentralen Nervensystem oder im Auge, insbesondere in der intraokularen Umgebung, funktionell sein). (2) Die Zellen sollten in der Lage sein, gentechnisch modifiziert zu werden (die gewünschten therapeutischen Faktoren müssen in die Zellen eingebracht werden). (3) die Zellen sollten eine vergleichsweise lange Lebensspanne haben (die Zellen sollten ausreichend Nachkommen produzieren, um angehäuft, charakterisiert, bearbeitet, auf Sicherheit untersucht und als klinischer Artikel hergestellt zu werden). (4) Die Zellen sollten vorzugsweise menschlichen Ursprungs sein (was die Kompatibilität zwischen den verkapselten Zellen und dem Wirt erhöht). (5) Die Zellen sollten eine Lebensfähigkeit von mehr als 80% für einen Zeitraum von mehr als einem Monat in vivo in der Vorrichtung ausüben (was die Langzeitzufuhr sicherstellt). (6) Die verkapselten Zellen sollten eine wirksame Menge eines nützlichen biologischen Produktes zuführen (was die Wirksamkeit der Behandlung sicherstellt). (7) Die Zellen sollten ein geringes Maß der Wirtimmunreaktion haben (was die Langlebigkeit des Implantates sicherstellt). (8) Die Zellen sollten nicht tumorigen sein (um eine zusätzliche Sicherheit für den Wirt bereitzustellen im Falle der Leckage der Vorrichtung).

[0016] Wir durchsuchten und charakterisierten zahlreiche Zelllinien, identifizierten optimale Konfigurationen verkapselter Zellvorrichtungen und beurteilten Zelllebensfähigkeiten in Vorrichtungen in unterschiedlichen Tiermodellen. Wir fanden, dass die ARPE-19-Zelllinie (Dunn et al., 62 Exp. Eye Res. 155-69 (1996); Dunn et al., 39 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2744-9 (1998); Finnemann et al., 94 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 12932-7 (1997); Handa et al., 66 Exp. Eye. 411-9 (1998); Holtkamp et al., 112 Clin. Exp. Immunol. 34-43 (1998); Maidji

et al., 70 J. Virol. 8402-10 (1996)) alle Eigenschaften einer erfolgreichen Plattformzelle für ein auf verkapselte Zellen basierendes Zufuhrsystem hatten. Die ARPE-19-Zelllinie war den anderen von uns untersuchten Zelllinien überlegen.

[0017] Die ARPE-19-Zelllinie ist von der American Type Culture Collection (ATCC Nummer CRL-2302) erhältlich. ARPE-19-Zellen sind normale Retinapigmentepithel-(RPE)-Zellen und exprimieren die Retinapigmentepithelzell-spezifischen Marker CRALBP und RPE-65. ARPE-19-Zellen bilden stabile Monolayer, die eine morphologische und funktionelle Polarität ausüben.

[0018] ARPE-19-Zellen werden in Complete Growth Medium, dem Serum enthaltenden Medium, das von dem Zellhinterleger empfohlen wird, kultiviert. Complete Growth Medium ist entweder eine 1:1-Mischung aus Dulbecco's modifiziertem Eagle's-Medium und Ham's-F12-Medium mit 3 mM L-Glutamin, 90%, fötalem Rinderserum, 10% , oder eine 1:1-Mischung aus Dulbecco's modifiziertem Eagle's-Medium und Ham's-F12-Medium mit HEPES-Puffer, der 10% fötales Rinderserum, Natriumbikarbonat in einer Endkonzentration von 56 mM und 2 mM L-Glutamin enthält und bei 37°C in 5% CO₂ inkubiert wird. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 60.000/cm² ausplattiert. Die Zellen wurden typischerweise in mit Falcon-Gewebekultur behandelten 6- oder 12-Well-Platten oder T25- oder T75-Kolben wachsen gelassen.

[0019] Für die Subkultivierung wird das eingesetzte Medium entfernt und die ARPE-19-Zellen werden mit 0,05% Trypsin-, 0,02% EDTA-Lösung gespült und das Trypsin wird entfernt. Ein bis zwei ml zusätzlicher Trypsinlösung werden hinzugefügt. Die Kultur wird bei Raumtemperatur (oder bei 37°C) inkubiert bis sich die ARPE-19-Zellen ablösen. Ein Subkultivierungsverhältnis von 1:3 bis 1:5 wird empfohlen.

1. Die ARPE-19-Zelllinie ist zäh

[0020] Um die Zähigkeit der Zelllinien zu beurteilen, wurde ein Drei-Schritt-Screen etabliert. (a) Zelllebensfähigkeitsscreen (die Zellen wurden beurteilt unter Stressbedingungen unter Verwendung von artifiziell wässrigem Körperflüssigkeits (aAH)-Medium oder artifiziell Zerebrospinalflüssigkeits (aCSF)-Medium. (b) In vitro ECM-Screen (die Zellen wurden beurteilt in einem in vitro Extrazellulär-Matrix (ECM)-Screen). (c) In vivo Vorrichtungslbensfähigkeitsscreen (die verkapselten, Zellen wurden in einem in vivo Membranscreen beurteilt).

[0021] (a) In vitro Zelllebensfähigkeitsscreen. Die Wirkung von aAH und aCSF auf Testzellen (einschließlich ARPE-19-Zellen) wurde untersucht. Artifizielle wässrige Körperflüssigkeit (aAH) und artifiziell zerebrospinale Flüssigkeit (aCSF) wurden gemäß den Protokollen der Geigy Scientific Tabellen formuliert. Die detaillierten Formulierungen sind in Tabelle 1 aufgelistet:

TABELLE 1
FORMULIERUNGEN FÜR AAH & ACSF

artifizielle wässrige Körper- flüssigkeit (Artificial Aqueous Humor: aAH)		artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (artificial Cerebral Spinal Fluid: aCSF)		
Aminosäure	(μM)	(mg/L)	(μM)	(mg/L)
L-Alanin	294	26.19	28	2.4945
L-α-Aminobuttersäure	31.4	3.24		
L- Arginin•HCl	133	28.02	19	4.0033
L-Asparagin	49.2	6.49	6.3	0.9456
L-Asparaginsäure	1	0.13	0.45	0.0599
L-Citrullin	9.8	1.72		
L-Cystin•2HCl			0.1	0.0313
Ethanolamin			16.7	1.02
L-Glutaminsäure	12	1.77	11.4	1.6769
L-Glutamin	717	104.75	515.7	75.3438
Glycin	16.7	1.25	6.2	0.4654
L-Histidin•HCl•H₂O	77.9	16.33	12.6	2.6410
L-Isoleucin	79.8	10.47	4.6	0.6035
L-Leucin	192	25.19	12	1.5744
L-Lysin•HCl	155	28.30	24.9	4.5467
L-Methionin	44.4	6.62	2.7	0.4028
L-Ornithin•HCl	25.3	4.27	4.5	0.7587
L-Phenylalanin	119	19.66	7.8	1.2886
O-Phosphorylethanolamin			5.2	0.7337
L-Prolin	16	1.84		
L-Serin	179	18.81	25.4	2.6695
Taurin	39.1	4.89		
L-Threonin	152	18.10	28.8	3.4301
L-Tryptophan	31.9	6.51	1.2	0.2450
L-Tyrosin	123	22.26	7.2	1.6214
L-Valin	388	45.43	17.3	2.0258

TABELLE 1 (FORTGESETZT)
FORMULIERUNGEN FÜR AAH & ACSF

	artifizielle wässrige Körper- flüssigkeit (Artificial Aqueous Humor: aAH)		artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (artificial Cerebral Spinal Fluid: aCSF)	
anorganische Salze	(mM)	(mg/L)	(mM)	(mg/L)
Natriumbicarbonat	21.6		22.6	1898.626
Natriumchlorid	120			
Kaliumchlorid	3.2		4	298.2000
Natriumphosphat	111		0.25	34.5000
Kupfersulfat	0.002		0.00025	0.0624
Kupfer	0.0028			
Zinksulfat		1.0	0.00064	0.1826
NaF			0.005	0.2100
MnCl ₂		0.1	0.000021	0.00415
MgCl ₂			0.5	101.6500
KI			0.000016	0.002656
KBr			0.029	3.4510
kurzkettige Fettsäuren	(mM)	(mg/L)		(mg/L)
Harnstoff	4.51	270.87		
DL-Milchsäure	4.69	422.48	1.47 mM	132.4176
Zitronensäure	0.133	25.55	0.176 mM	33.8096
Brenztraubensäure			0.14 mM	11.9762
Essigsäure			116 µM	7.0830
Propionsäure			2.8 µM	0.2074
Isobuttersäure			1.8 µM	0.1586
n-Buttersäure			1.4 µM	0.1234
Isovaleriansäure			1.35 µM	0.1378
α-Oxoglutarinsäure			8.9 µM	1.3000
Oxalessigsäure			7.2 µM	0.9511
Bernsteinsäure			28.5 µM	3.3659
Ketonkörper (wie Aceton)			117 µM	6.7954
Acetessigsäure			26.2 µM	2.6700
DL-B-Hydroxybuttersäure			46.4 µM	5.5810

TABELLE 1 (FORTGESETZT)
FORMULIERUNGEN FÜR AAH & ACSF

		artifizielle wässrige Körper- flüssigkeit (Artificial Aqueous Humor: aAH)	artifizielle zerebrospinale Flüssigkeit (artificial Cerebral Spinal Fluid: aCSF)
Vitamine		(mg/L)	(mg/L)
Nicotinamid	40 nmol/Auge	2.44	
Trigonellin	70 nmol/Auge	6.08	
B12	22.1 pM	0.0000299	13.58 pM 1.8406E-05
L-Ascorbinsäure	810 pM	234.53	60 µM 10.5660
Nicotinsäure			2.4 µM 0.2954
D-Pantothensäure			2.37 µM 0.5648
Thiamin (B1)			15 nM 0.0050595
B6 (Pyridoxin)			2.2 nM 0.00045232
Folsäure			62.55 nM 0.02760957
Biopterin			4.3 nM 0.00101996
Lipide			(mg/L)
Triglyceride			4.17 mg/L 4.1700
Cholesterol			4.63 mg/L 4.6300
Phospholipide			5.49 mg/L 5.4900
Fettsäuren			7.36 mg/L 7.3600
Prostaglandin PGE1			1.31 nM 0.0004644
Prostaglandin PGF2a			1.98 nM 0.00094169
Kohlenhydrate		(mg/L)	
D(+)- Glucose	0.756 g/L	756.84	
Gesamtprotein		mg/L	
FBS	10.6 ml/L	450.00	8.4ml/L
Transferrin	59 mg/L	59.00	

[0022] Die Zellen wurden anfänglich in Serum enthaltendem Medium ausplattiert, um den Zellen zu ermöglichen, sich anzuheften. Die Zellen wurden in einer Konzentration von 60.000/m² ausplattiert und in einem 37°C-Inkubationsgerät mit 5% CO₂ inkubiert. Nachdem sich die Zellen angeheftet hatten (18 bis 24 Stunden) wurde das Wachstumsmedium entfernt und die Zellen wurden zweimal mit Hank's balancierter Salzlösung (HBSS) gewaschen, um das Serum zu entfernen. Das Medium wurde mit entweder aAH oder aCSF (vorgewärmt auf 37°C) ersetzt. Die eingesetzte aAH oder aCSF wurde mit frischer aAH oder aCSF jeden zweiten Tag (Montags-, Mittwochs-, Freitagsplan) ersetzt. Die Testzellen wurden täglich auf ihre Morphologie, Lebensfähigkeit und % -Konfluenz (im Vergleich zur Kontrolle) durch mikroskopische Untersuchung beurteilt. Alle Zellen wurden für eine einwöchige Dauer beurteilt. Die Beobachtungen wurden mit Photographien dokumentiert.

[0023] Eine Kontrolle jeder Zelllinie in vollständigem Wachstumsmedium wurde während des Screens für den Vergleich mit der experimentellen Gruppe geführt. Am Ende des Testzeitraums wurden die Ergebnisse in Form der Zellzahl und %-Konfluenz mit einer Benotung über die Morphologie aufgenommen. Auch wurde Lebensfähigkeitsfärbung wie Fluoresceindiacetat/Propidiumiodid (FDA-PI) verwendet, um zur Lebensfähigkeit der Kultur zu gelangen. Zellen, die den anfänglichen in vitro Zelllebensfähigkeitsscreen passiert hatten, gelangten in den in vitro ECM-Screen.

[0024] (b) In vitro Extrazellulär-Matrix (ECM)-Screen. Das Überleben der Zellen unter Verwendung von verschiedenen extrazellulären Matrices (ECM) wurde unter aCSF- und hypoxischen Bedingungen beurteilt und die ECM, die für das beste Überleben sorgte, wurde ausgewählt. Für jeden möglichen Hardy Cell"-Kandidaten (zäher Zellkandidat) wurde die Zell-Substrat-Wechselwirkung für die folgenden extrazellulären Matrices beurteilt (TABELLE 2):

TABELLE 2
EXTRAZELLULÄRE MATRIX

Typ	Quelle
Primaria Cultureware	synthetisch
Collagen Typ IV	menschliche Plazenta
Cell-Tak	Muschel
Fibronectin	menschliche Plazenta
Poly-D-Lysin	synthetisch
Laminin	synthetisch
Elastin	Rind
Gewebekulturplastik	Kontrolle

[0025] Die optimale ECM wurde verwendet, um damit das Gerüst, an welches die Zellen schließlich in der Vorrichtung haften, zu überziehen. Die optimale Kombination aus "Hardy Cell"-Kandidat, ECM und Gerüst wurde unter Verwendung einer Membran mit einer mittleren Permeabilität verkapselt und unter stringenten Gewebekulturbedingungen (aAH oder aCSF) untersucht. Das Überleben wurde in Intervallen von 1, 2 und 4 Wochen beobachtet unter Verwendung von sowohl metabolischen als auch histologischen Verfahren.

[0026] (c) In vivo Vorrichtungslebensfähigkeitsscreen. Zähe Zellen aus dem ECM-Screen wurden weiter beurteilt unter Verwendung von unterschiedlichen Membranen und Gerüsten. Die optimalen Kombinationen aus Zelle/ECM/Gerüst wurden mit unterschiedlichen Membrantypen (Membranen mit unterschiedlichen Diffusionseigenschaften) verkapselt und Vorrichtungen wurden in den Rattenventrikel implantiert. Das Erscheinungsbild der Vorrichtung wurde nach einer in vivo Implantationsdauer von einem Monat beurteilt.

[0027] Die Lebensfähigkeit von ARPE-19 (ebenso wie andere wünschenswerte Eigenschaften) war den anderen untersuchten Zelllinien überlegen. TABELLE 3 fasst die Ergebnisse für menschliche Zelllinien zusammen.

TABELLE 3
ZELLSCREENING-ERGEBNISSE - MENSCHLICHE ZELLINIEN

#	Zelllinie	Gewebeursprung	Morphologie	Status im Screen
1	C3A*	Hepatoblastom	Polygonal	Lebensfähigkeit: bestanden
2	HepG2*	Hepatoblastom	Polygonal	Lebensfähigkeit: bestanden
3	HFCH	fötaler Femur	Chondroblast	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
4	Hs27**	Vorhaut	Fibroblast	Lebensfähigkeit: bestanden
5	Hs2-MX1	Vorhaut	Fibroblast	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
6	HS683	Gliom	Glioblast	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
7	A172	Glioblastom	Glioblast	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
8	HS578BST***	normale Brust	Fibroblast	Lebensfähigkeit: bestanden
9	184BS	mammär	Epithelial	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
10	HCN-1A	Kortikal	Neuron	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
11	HCN-2	Kortikal	Neuron	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
12	HEPM	Gaumen	Fibroblast	Matrix: ausgeschieden
13	NHLF	Lunge	Fibroblast	Matrix: ausgeschieden
14	HL60	leukämisch	Monocyte	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
15	Haut	Cri du Chat	Fibroblast	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
16	9.5 Fbr	Vorderhirn	neuronale Stammzelle	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
17	FHS 74 INT	Dünndarm	Epithelial	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
18	MRC-5	Lunge	Fibroblast	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
19	MRC-9	fötale Lunge	Fibroblast	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
20	WI-38	Lunge	Fibroblast	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
21	T98G	Glioblastom	Glioblast	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
22	ARPE-19	Retina	Epithelial	Lebensfähigkeit: bestanden

* Diese Zelllinien sind tumorigen

** Diese Zelllinie benötigt Immortalisation

*** Diese Zelllinie hat eine langsame Wachstumsrate (Verdoppelung alle 5 Tage)

TABELLE 4 fasst die Ergebnisse für xenogene Zelllinien zusammen

TABELLE 4 ZELLSCREENING-ERGEBNISSE - XENOGENE ZELLINIEN				
#	Zelllinie	Gewebeursprung	Morphologie	Status im Screen
1	SC-1	Rattenerv	Schwannzelle	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
2	SIRC*	Kaninchencornea	Fibroblast	Lebensfähigkeit: bestanden
3	NCTC 4206	Hamsterperitoneum	Fibroblast	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
4	Klon 9	Rattenleber	Epithelial	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
5	TM4	Rattensertolizellen	Epithelial	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
6	PAS	Schweineembryogehir	Astrocyte	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
7	BHK	n	Fibroblast	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
8	CNTF-Klon 72	Hamsterniere		Lebensfähigkeit: ausgeschieden
9	NT4/5-Klon 45			Lebensfähigkeit: ausgeschieden
10	CHO		Epithelial	<i>in vivo</i> : ausgeschieden*
11	3T3	Hamsteroovar	Fibroblast	<i>in vivo</i> : ausgeschieden
12	C2C12	Mausfibroblast	Myoblast	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
13	B14RAF28-G3	Mausmyoblast	Fibroblast	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
14	BRL3A	Hamsterperitoneum	Epithelial	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
15	PC12	Rattenleber	Pheochromoblast	Lebensfähigkeit: ausgeschieden
		Rattenphäochromoblast		
* Die Zelllinie ist xenogenen Ursprungs (nicht menschlich)				

2. ARPE-19-Zellen können genetisch modifiziert werden.

[0028] Die ARPE-19-Zellen können genetisch modifiziert werden, um einen gewünschten Faktor zu produzieren. Wir transfizierten ARPE-19-Zellen mit geeigneten Plasmiden unter Verwendung von Fugene 6 (einem lipid-basierten Transfektionsreaktionsmittel von Boehringer Ingelheim) gemäß dem Protokoll des Herstellers. Stabile polyklonale Zelllinien wurden ausgewählt, z. B. unter Verwendung von G418 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) in einer Konzentration von 1,0 mg/ml und in einer Konzentration von 0,25 mg/ml erhalten. Stabile ARPE-19/GDNF-, ARPE-19-/CNTF- und ARPE-19/EGFP-Zelllinien wurden etabliert. Der Ausstoß von GDNF oder CNTF, wie gemessen durch ELISA, lag zwischen 100–200 mg/Millionen Zellen/24h (ng/M/d). (Dies ist ein Beispiel einer "therapeutisch wirksamen" Menge.)

[0029] (a) CNTF. ARPE-19-Zellen wurden mit verschiedenen CNTF-kodierenden Plasmiden transfiziert (siehe TABELLE 5). ARPE-19-Zellen, transfiziert mit P544 (pNUT-IgSP-CNTF (genomisch)), wurden als ARPE-P544 (ATCC Zugangsnr. ###) bezeichnet.

TABELLE 5 CNTF-TRANSFEKTION			
IgSP-CNTF	PcDNA3.1. (hCMV)**	pPI (mPGK)**	pNUT (mMT-1)**
cDNS	P566*	P565*	--
genomisch	--	--	P544
* verifiziert nur durch Restriktionsanalyse			
** Promotoren: hCMV, menschlicher Cytomegalovirus; mPGK, Mausphosphoglyceratkinase; mMT-1, Mausmetallothionin.			

[0030] (b) GDNF. ARPE-19-Zellen wurden mit fünf Plasmidkonstrukten, die hGDNF unter unterschiedlichen Promotoren und Signalsequenzen exprimieren, transfiziert (TABELLE 6). Die Zellen wurden durch FuGene 6 transfiziert. Transfizierte Zellen wurden durch ihre Resistenz gegen das Arzneimittel G418 (Geneticin) oder Methotrexat ausgewählt.

TABLE 6
PLASMIDE, DIE hGDNF UNTER UNTERSCHIEDLICHEN PROMOTOREN
UND SIGNALSEQUENZEN EXPRIMIEREN

Plasmid	Vektor	cDNS	Promotor	Signalpeptid	Selektions- marker	Amplifikations- marker
p142	pcDNA3	hGDNF	CMV	HGDNF	Neomycin	
p168	pcDNA3	hGDNF	CMV	Ig	Neomycin	
p558	pPI-DN	hGDNF	pgk	Ig	Neomycin	DHFR
p559	pPI-DN	hGDNF	pgk	HGDNF	Neomycin	DHFR

p560	pNUT	hGDNF	MT-1	HGDNF	DHFR	DHFR
------	------	-------	------	-------	------	------

CMV = Cytomegalovirus; PGK = Phosphoglyceratkinase; MT = Metallothionein; Ig = Immunglobulin; hGDNF = neurotropher Faktor, abgeleitet von einer menschlichen Glia-Zelllinie; DHFR = Dihydrofolatreduktase

[0031] Konditionierte Medien der transfizierten Zellen wurden gesammelt und durch Western Blot hinsichtlich der Expression von hGDNF analysiert. GDNF ist ein Heparin bindendes, disulfidgebundenes Homodimer, das heterolog glykosyliert ist und in der SDS-PAGE mit einem anscheinenden Molekulargewicht von 33–45 kDa wandert. Unglykosyliertes GDNF hat ein anscheinendes Molekulargewicht von 30 kDa (Lin et al., 63(2) J. Neurochem. 758-768 (1994)). Konditionierte Medien wurden von elterlichen und transfizierten ARPE-19 für die Western-Blot-Analyse der hGDNF-Expression gesammelt. GDNF wurde semigereinigt aus den konditionierten Medien durch Cellufine, ein Zelluloseaffinitätsmedium (Amicon Matrix) mit Eigenschaften, die ähnlich der Heparinsepharose sind. Nicht spezifisch gebundene Proteine wurden in 25 mM HEPES / 150 mM NaCl, pH 7,4, gewaschen und gebundene Proteine wurden in 25 mM HEPES / 2 mM NaCl, pH 7,4, eluiert. Die eluierten Proteine wurden mit Pall Filtron Mikrozentrifugen-Konzentrationsgeräten (MWCO 3 kDa) konzentriert und der Puffer wurde durch 25 mM HEPES ausgetauscht, um eine 200-fache Konzentration der konditionierten Medien (CM (conditioned media)) zu erreichen. Bis zu 1/20 der nicht reduzierten, semigereinigten CM wurden auf ein denaturierendes Tricin-SDS-PAGE-Gel mit einem Gradienten von 10–20% und auf Immobilon-P-PVDF-Membranen elektro-geblottet. Western Blots wurden durch Chemolumineszenz nachgewiesen.

[0032] Eine Palette aus 5 Antikörpern (3 polyklonale und 2 monoklonale) wurden verwendet, um die GDNF-Produktion nachzuweisen: Chemicon Kaninchen-pAB (AB 1454); Promega Hühnchen-pAb (G2791); R&D Systems Ziegen-pAb (AF212NA); Promega-mAb (erhältlich nur in GDNF E, ImmunoAssay Systems G3240/G3520-Kit); R&D Systems-mAb (MAB212). Die Antikörper mit der geringsten unspezifischen Bindung und der höchsten Sensitivität waren die monoklonalen Antikörper von Promega und R&D Systems. ARPE-19/p559 (ATCC Zugangsnr. ###).

[0033] (c) Grünes fluoreszierendes Protein. ARPE-19-Zellen wurden mit dem Plasmid, das das grüne fluoreszierende Protein (GFP) kodiert, pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA) transfiziert. Da die Expression des grünen fluoreszierenden Proteins leicht per Sicht unter Verwendung eines Fluoreszenzmikroskops überwacht werden kann, kann die Stabilität der heterologen Expression dieses Fremdgens durch viele Generationen hindurch überwacht werden. Kurz, ARPE-19-Zellen werden gentechnisch modifiziert, um das grüne fluoreszierende Protein zu exprimieren. Klonale Linien wurden von polyklonalem ARPE-19/GFP durch begrenzende Verdünnung abgeleitet, dann auf einen T-25-Kolben expandiert. Eine dieser Linien, P-393-1 (ATCC Zugangsnr. ###) wurde erhalten und wöchentlich überimpft.

[0034] P393-1 wurde wenigstens 5-mal überimpft, bis es in den Eingangs-T-25 expandiert wurde. P393-1 machte über 30 Verdoppelungen durch bis es kloniert wurde. Die grüne fluoreszierende Proteinexpression war fortwährend durch die gesamte Lebensspanne der Linien hindurch stabil.

3. ARPE-19 hat eine lange Lebensspanne.

[0035] Die Wachstumsrate von ARPE-19-Zellen in Serumkulturmedium (DMEM/F12 + 10% FBS) beträgt ungefähr eine Verdoppelung/48h. Die Gesamtpassageanzahl überschritt 100. Die ARPE-19-Zellen scheinen einen normalen Phänotyp zu haben und wachsen in einer stabilen Rate.

4. ARPE-19 ist menschlichen Ursprungs.

[0036] ARPE-19 ist eine spontan auftretende Retinapigmentepithel-(RPE)-Zelllinie, abgeleitet 1986 aus den

normalen Augen eines 19 Jahre alten menschlichen Mannes, der an einer Kopfverletzung in einem Kraftfahrzeugunfall starb (ATCC).

5. ARPE-19-Zellen üben eine annehmbare in vivo Vorrichtungslebensfähigkeit aus.

[0037] Die Vorrichtungsüberlebensfähigkeit verkapselter ARPE-19-Zellen wurde in vivo im Zentralnervensystem und in Augenumgebungen beurteilt. ARPE-19-Zellen oder ARPE-P544-Zellen (die CNTF exprimieren) wurden verkapselt und die resultierenden Vorrichtungen wurden in den Rattenventrikel (ICV), Kaninchenauge, Hundeauge und den intrathekalen Raum vom Schaf implantiert. Kurz, die Zellen wurden mit entweder CytoPES-14-(Polyethersulfon)- oder CytoPES-1000-Membranen verkapselt. Für die CytoPES-14-Membranen war das Matrixgerüst ein PET-Garn, sechssträngig; der Extrazellulär-Matrix (ECM)-Überzug war Laminin/Collagen IV; der Vorrichtungsanker war eine Titanschleife; die Gesamtlänge der Vorrichtung war 1,1 cm; die Zellbeladungsdichte war 66 K/ μ l, das Beladungsvolumen war 6 μ l, das Haltemedium war Ultra Culture. Für CytoPES-1000-Membranen war die Matrix PET-Garn, überzogen in einem zweistufigen Überzugsvorgang mit menschlichem Collagen Typ IV und Laminin in einer Konzentration von 1 mg/ml bzw. 0,1 mg/ml. Für Ratten-ICV waren die Vorrichtungen 0,7 cm lang. Für das Hunde- und Kaninchenauge waren die Vorrichtungen 1,0 cm lang. Für den intrathekalen Raum beim Schaf waren die Vorrichtungen 7 cm lang. Alle Vorrichtungen waren nicht abgestützt und E-Strahl-(Elektronenstrahl)-sterilisiert bei Titansystemen (Denver, CO). Die Haltemedien waren Ultra Culture + 1% L-Glutamin oder aCSF + 0,83% FPS, 0,26% L-Glutamin und Puffer mit 15 mM HEPES.

[0038] Ein Monat nach der chirurgischen Implantation wurden die Vorrichtungen explantiert und die Zellüberlebensfähigkeit in den Vorrichtungen wurde histologisch beurteilt. Die Zellvorrichtungsüberlebensfähigkeit war an allen untersuchten Implantationsstellen ausgezeichnet. Die Ergebnisse sind in TABELLE 7 präsentiert.

TABELLE 7			
ARPE-P544-ZELLVORRICHTUNGSÜBERLEBENSFÄHIGKEIT NACH EINEM MONAT <i>IN VIVO</i>			
Tiermodell	Vorrichtungsdesign	Implantationsstelle	Vorrichtungsüberlebensfähigkeit
Ratte	0,7 cm lang	ICV	lebensfähig
Kaninchen	1,0 cm lang	intravitreal	lebensfähig
Hund	1,0 cm lang	intravitreal	lebensfähig
Schaf	7,0 cm lang	intrathekal	lebensfähig

6. ARPE-19 kann modifiziert werden, um eine wirksame Menge an Wachstumsfaktor abzugeben: Nachweis dieser Auffassung.

[0039] Die therapeutische Wirkung (Retinaschutz) von CNTF-sezernierenden ARPE-P544-Zellen wurde sowohl in Ratten- als auch in Hundetiermodellen für den retinalen Abbau beurteilt.

[0040] (a) Transgener Rattentest – nicht verkapselte ARPE-P544. Am postnatalen Tag (PD) 9 wurden ungefähr 10^5 ARPE-P544-Zellen in 2 μ l phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) in den Glaskörper des linken Auges von S334ter-3-Ratten unter Verwendung einer Injektionsnadel Nr. 32 injiziert. Den Kontrollaugen (rechte Augen) wurden nicht transfizierte ARPE-19-Zellen injiziert. Für die CNTF-Bolusinjektionen wurden 1 μ g CNTF in 1 μ l PBS in den Glaskörper am PD 9 injiziert. Die Augen wurden am PD 20 gesammelt und für die histologische Beurteilung bearbeitet. In Plastik eingebettete Schnitte von einer Dicke von 1 μ m wurden durch Lichtmikroskopie untersucht.

[0041] In den unbehandelten transgenen S334ter-Ratten wurde eine schwere Photorezeptordegeneration am Tag 20 nach der Entbindung PD (Post Delivery) beobachtet. Die äußere Körnerschicht (ONL) hatte nur eine Reihe an Kernen. In den mit ARPE-P544 injizierten Augen hatte die ONL 5–6 Reihen an Kernen, wohingegen in den Kontrollaugen, denen ARPE-19-Zellen injiziert wurden, 1–2 Kernreihen verblieben waren. In den Tieren, die mit einer Bolusinjektion an gereinigtem menschlichem rekombinantem CNTF behandelt worden waren, hatte die ONL 2–3 Kernreihen. Die Ergebnisse sind in [Fig. 1](#) vorgestellt.

[0042] Die verzögerte Freisetzung von CNTF aus den nicht verkapselten ARPE-19-Zellen, die mit CNTF transfiziert worden waren, erreichte einen besseren Schutz der Photorezeptoren als eine Bolusinjektion aus gereinigtem CNTF-Protein.

[0043] (b) Test mir mutierten Hunden – verkapseltes ARPE-544. Diese Studie wurde in Hunden mit Stäbchen-Zapfen-Dysplasie (rcd 1) mit einer Mutation des Gens der beta-Untereinheit der zyklischen GMP-Phosphodiesterase (PDE6B) der Stäbchen durchgeführt. Ein Testsatz verwendete 6 Hunde mit einem Alter von 7 Wochen. Zwei Hunde waren betroffen (Retinadegeneration) und 4 waren Genträger (normal). Bei den beiden betroffenen Hunden erhielt das linke Auge eine ARPE-P544 enthaltende Vorrichtung und das rechte Auge blieb unbehandelt (Kontrolle). Bei den vier normalen Hunden erhielten beide Augen ARPE-P544 enthaltende Vorrichtungen. Die Vorrichtungen hatten eine Länge von 1,1 cm, einschließlich einer Verankerungsschleife aus Titan. Jede Vorrichtung bestand aus der CytoPES14-Membran und einem PET-Garngerüst, überzogen mit Laminin und Collagen Typ IV. Die Dauer der Studie war 7 Wochen. Es wurden sämtliche Vorrichtungen, mit der Ausnahme von zweien in einem normalen Hund, explantiert und auf den CNTF-Ausstoß mittels ELISA (R&D Systems) und die Zelllebensfähigkeit durch histologische Analyse beurteilt.

[0044] Der CNTF-Ausstoß für ARPE-P544 wurde auf 150–200 mg/10⁶ Zellen/24 h (unverkapselt, in vitro, in vollständigen Wachstumsmedien) geschätzt. Die Zellen wurden in T-75-Kolben wachsen gelassen und in einem auf DMEM basierenden Medium, ergänzt mit 10% FBS, in einem Inkubator mit 5% CO₂, 95% Feuchtigkeit und 37°C gehalten. Vor der Verkapselung wurde der CNTF-Ausstoß der Zellen durch eine enzymgekoppelte Immunabsorptionsbestimmung (ELISA) untersucht.

[0045] Vor der Verkapselung wurden die Vorrichtungen in einer kontrollierten Umgebung zusammengebaut, verpackt und dann Elektronenstrahl-sterilisiert (siehe unten für Details in anderen Verkapselungsprotokollen). Die ARPE-19-Zellen wurden am Tag der Verkapselung gesammelt und in serumfreiem Ultraculture-Medium in einer Dichte von 66.000 Zellen/µl suspendiert. Die sterilen Vorrichtungen wurden dann unter Verwendung einer Hamilton-Spritze mit einem Volumen von jeweils 6 µl beladen. Nach der Infusion der zellulären Suspension wurde die Endversiegelung aufgetragen. Die zellbeladenen Vorrichtungen wurden in Ultraculture-Medium gehalten, das mit 1% L-Glutamin ergänzt worden war. Nach 7 Tagen wurden sämtliche Vorrichtungen für den CNTF-Ausstoß durch ELISA untersucht. In-vitro-Gruppen an Vorrichtungen wurden in sechs Wellplatten während dem Verlauf der Studie gehalten. Die Fütterung wurde einmal pro Woche durchgeführt.

[0046] Für die Operation wurden die Tiere mit Ketamin und Xylazin sediert. Das Körpergewicht und die Temperatur wurden gemessen und die Pupillen wurden mit jeweils zwei Tropfen Mydfrin (2,5%) und Cyclogyl (1%) erweitert. Blutproben wurden entnommen und es wurde eine intravenöse (IV) Linie etabliert. Anästhesie wurde mit Natriumpentothal induziert. Die Tiere wurden dann endotracheal intubiert und in den Operationsraum gebracht, wo eine Inhalation von Isofluran etabliert wurde und wo die Lebenszeichen überwacht wurden. Alternativ wurde die Inhalation von Isofluran vor der Intubation etabliert, was den Bedarf für das Zuführen von Sedativa und Pentothal überflüssig machte. Die Tiere wurden dann auf dem Operationstisch in der lateralen Decubitusposition positioniert und mit einem Heizkissen bedeckt.

[0047] Bei dem Augenimplantationsvorgang wurden die Lider und der um die Augenhöhle liegende Bereich durch chirurgisches Waschen mit verdünnter Iodophorlösung vorbereitet und sterile Tücher wurden gesichert. Die Augenlider wurden mit einem Lidspekulum zurückgezogen und das Auge wurde mit einem einzelnen Bindehautstich, platziert am Limbus und mit den Tüchern verklammert, positioniert, wobei das Auge medial rotiert wurde. Unter mikroskopischer Sichtbarmachung wurde ein 6 mm großer Einschnitt durch sowohl die Konjunktiva als auch die Tenonsche Kapsel ungefähr 3,5 mm vom Limbus entfernt unter Verwendung einer stumpfen Schere gemacht. Unter Verwendung einer Schneide Nr. 75 wurde ein 2,0–3,0 mm langer Längsschnitt durch die Hornhaut gemacht, ungefähr 4 mm lateral zum Limbus, um die Vorrichtung durch die Pars plana hindurch zu implantieren. Eine Vorrichtung wurde aus seiner Verpackung entfernt, mit steriler Salzlösung gespült und auf grobe Defekte untersucht. Unter Verwendung einer Juwelierpinzette wurde die Vorrichtung mit der Halteschleife gefasst und durch den Einschnitt in den Glaskörper eingeführt. Nach der Platzierung wurde die Hornhaut mit unterbrochenen 8–0-Nylonnähten geschlossen, welche durch die Schleife am äußeren Ende der Vorrichtung hindurchgeführt wurde. Die Konjunktiva wurde mit unterbrochenem 8–0-Nylon ebenfalls geschlossen. Das Spekulum und die Tücher wurden entfernt und das Tier wurde erneut positioniert, so dass der obige Vorgang am gegenüberliegenden Auge wiederholt werden konnte.

[0048] Am Operationstag wurden die Hunde (7 Wochen alt, Gewicht ungefähr 10 Pfund) hinsichtlich Herz- und Atmungsraten, Rektaltemperatur, Blutdruck und allgemeinen Körperzustand überwacht. Jedes Tier wurde mit einer einzigartigen Nummer identifiziert, die auf dem Tier notiert wurde. Einmal am Tag wurde Cyclosporin A (Sandoz, 100 mg/ml, 10 mg/kg) gegeben (oral), wobei einen Tag vor der Implantation damit begonnen wurde. Prednison (5 mg/kg) und Clavamox (15 mg/kg) wurden zweimal täglich verabreicht (oral), wobei am Tag der Implantation damit begonnen wurde. Die Tiere wurden auf angemessenes Futter und Wasser ad libitum eingestellt und im Haus mit einem Dunkel/Hell-Zyklus, in Übereinstimmung mit der Eastern-Standard-Zeit, gehalten.

ten. Die Raumtemperatur wurde auf 18–29°C (65–84°F) gehalten. Der Feuchtigkeitsbereich wurde bei 30–70 % gehalten.

[0049] Alle Tiere wurden täglich nach dem operativen Vorgang auf Anzeichen von mit der Operation verbundenen Komplikationen überwacht. Die Tiere wurden auf einer wöchentlichen Basis auf die Anwesenheit des Folgenden überwacht: Husten, Anzeichen von Gewichtsverlust, Fieber, aphthöse Stomatitis, Augenzündung oder -sekret oder grobe motorische Mängel. Die Tiere wurden gewogen und die Temperaturen wurden vor der Implantation innerhalb von 3 Tagen der Implantation und 7 Tage nach der Implantation genommen. Blutdrücke wurden ebenfalls vor der Implantation und innerhalb 1 Woche der Opferung gemessen.

[0050] Für das Sammeln der Blutproben wurden 30 ml Blut für das immunologische Screening an (1) dem Zeitpunkt der Implantation und (2) bei der Opferung entnommen. 10 ml wurden in ein mit Heparin versetztes Röhrchen mit grüner Kappe bei Raumtemperatur für periphere Blutlymphozyten gegeben; 10 ml wurden in ein Röhrchen mit roter Kappe ohne Antikoagulantien auf Eis für die Serumuntersuchung gegeben und 10 ml wurden einem Blutchemieprofil unterzogen.

[0051] Beim Abschluss des Experimentes wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital 360 mg/kg IV nach anfänglicher Sedierung mit Ketamin und Pentotal euthanasiert. Die Vorrichtungen wurden chirurgisch explantiert, auf die CNTF-Freisetzung untersucht und dann in 4 Paraformaldehyd gegeben für die Vorlage an die Histologie. Die Augen wurden entkernt und in 50 cc Bouin's Lösung bei Raumtemperatur für 8–12 Stunden fixiert. Die Augen wurden dann im Wasser gespült und in 70% EtOH gelagert und für die histologische Untersuchung vorgelegt. Für die histologische Analyse wurden 3 Objektträger mit in Paraffin eingebetteten Augen, geschnitten durch den Sehnerv, in dorsal-lateraler Richtung, gefärbt mit Hämatoxylin und Eosin (H&E), für jedes Auge angeordnet. Die Vorrichtungen wurden in 4% Paraformaldehyd für 30 Minuten bis 2 Stunden fixiert und für das Einbetten in Paraffin oder Glycidylmethacrylat (GMA) bearbeitet, geschnitten und für die histologische Beurteilung gefärbt. Jede Vorrichtung wurde überprüft, um die Zelldichte und Zelllebensfähigkeit zu bestimmen.

[0052] Der Ausstoß der Vorrichtungen an CNTF wurde nach der Explantation beurteilt. Kurz, die Vorrichtungen wurden in Ultraculture (0,5 ml/Vertiefung) für 24 Stunden inkubiert, das dann hinsichtlich des CNTF-Ausstoßes untersucht wurde. Der durchschnittliche Vorrichtungsausstoß an CNTF war $1,62 \pm 0,4$ ng/Vorrichtung/24 h. (Dies ist ein Beispiel einer "therapeutisch wirksamen" Menge.) Der einzelne Ausstoß der Vorrichtung ist in TABELLE 8 vorgestellt.

TABELLE 8	
CNTF-AUSSTOSS AUS EXPLANTIERTEN VORRICHTUNGEN	
Vorrichtung #	CNTF (ng/Vorrichtung/24 h)
1	1.65
2	1.9
3	2.45
4	1.1
5	1.4
6	1.3
7	1.7
8	1.62
Mittelwert $\pm$ SD	1.62 ± 0.4

[0053] Verkapselte ARPE-P544-Zellen schützten Photorezeptoren in dem mutierten Hundemodell für die Retinadegeneration. Der Schutz wurde durch den Grad des Schonens der Photorezeptoren definiert. Die nicht betroffenen Hunde hatten 10–12 Schichten an ONL, wohingegen die betroffenen, nicht behandelten Hunde 2–3 Schichten aus ONL hatten. Die betroffenen, mit CNTF behandelten Hunde hatten 5–6 ONL-Schichten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 vorgestellt.

TABELLE 9						
ANZAHL DER KERNE IN DER ÄUSSEREN KÖRNERSCICHT (ONL) IN MIT CNTF BEHANDELTEN/UNBEHANDELTEN <i>rcd1</i> - UND NICHT BETROFFENEN HUNDEN ÜBER 6 BEREICHE DER RETINA						
	äußere Retina ^c			innere Retina ^d		
Hund#, Auge	S1	S2	S3	I1	I2	I3
1485L ^a	4-6	6	6	4	4	4
1485R ^a	3-4	3	4	2-3	2-3	2-3
1489L ^a	5-6	7-8	7-8	5-6	4-5	5
1489R ^a	3-4	3-4	3-4	3-4	4-5	2-3
1487L ^b	10-11	11-12	9-10	11-12	10-11	8
1487R ^b	11-12	10-11	9	11-12	10	9
a. betroffener <i>rcd1</i> -Hund						
b. nicht betroffener Hund						
c. äußere Retina = 7-8 10x Felder lang; 18 40x Felder						
S1 = 2 10x Felder peripher vom Sehnerv (4-40x Felder peripher)						
S2 = Mittelpunkt zwischen Sehnerv und Ora serrata						
S3 = 2 10x Felder zentral der Ora serrata (4-40x Felder zentral)						
d. innere Retina = 5-6 10x Felder lang; 10 40x Felder						
I1 = 1 10x Felder peripher vom Sehnerv (3 4x Felder peripher)						
I2 = Mittelpunkt zwischen Sehnerv und Ora serrata						
I3 = 1 10x Felder zentral der Ora serrata (3 40x Felder zentral)						

[0054] Die histologische Beurteilung zeigte, dass alle Vorrichtungen gesunde, lebensfähige Zellen enthalten. Es wurde keine zelluläre Nekrose in irgendeiner der Vorrichtungen beobachtet. Es wurde keine Immunreaktion, Entzündung oder Schädigung der Retina beobachtet.

7. ARPE-19 löst eine Immunreaktion des Wirtes auf niedrigem Niveau aus.

[0055] (a) HLA-Klasse I- und Klasse II-DR. Es wurden Grunduntersuchungen an den Zelllinien Hs27 und ARPE-19 durchgeführt, um die Ruheexpressionsspiegel der menschlichen HLA-Klasse-I- und HLA-Klasse-II-DR-Moleküle zu bestimmen. Der Haupthistokompatibilitätsmarker W6/32 wird normalerweise auf jeder kernhaltigen Zelle exprimiert. Im Gegensatz dazu wird der HLA-Klasse-II-DR-Marker auf einer spezifischeren Zellpopulation exprimiert. Normalerweise wird das HLA-Klasse-II-DR-Molekül auf B-Lymphozyten, Monozyten, aktivierten T-Zellen, aktivierten natürlichen Killer (NK)-Zellen und menschlichen Progenitorzellen gefunden.

TABELLE 10 fasst die nicht aktivierten Spiegel der Expression aus der Färbung unter Verwendung des Durchflussscytometers zusammen.

TABELLE 10		
ZELLSCREENING-DURCHFLUSSCYTOMETRIE (% POSITIV)		
Zelle	HLA-Klasse I monoklonal W6/32 IgG 2a	HLA-Klasse II DR Becton Dickinson Klon L243 IgG 2a
Hs27 P9 menschlicher Hautfibroblast	80,1	3,1
ARPE P37	98,1	3,2
Cyno B083 110492 positive Kontrolle	98,7	23,1
BHK NGF P47 negative Kontrolle	0,1	0,03

[0056] (b) Alloge gegen xenogene Antikörperantworten. Serumproben von entweder Hundewirten oder menschlichen Wirten wurden unter Verwendung von ARPE-19, Hs27 (vom Menschen abgeleitet) und SIRC (von Kaninchen abgeleitet) als Zielzellen beurteilt. Um den spezifischen Anti-ARPE-19-IgG-Titer zu bestimmen, wurden ARPE-19-Zellen als Zielzellen für die durchflussscytometrische Analyse verwendet. ARPE-19-Zellen (100.000 Zellen/100 µl) wurden mit 25 µl Wirtserum inkubiert, seriell verdünnt bis zu einem Titer von 4×10^6 und wurden dann mit einem mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierten zweiten Antikörper (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA) markiert. Die Datenaufnahme und die Histogrammanalyse wurden unter Verwendung eines Becton Dickinson FACSort™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA,

USA) mit einer Exzitation bei 488 nm und einem einzelnen luftgekühlten Argonlaser durchgeführt. Die Daten wurden unter Verwendung der Software CELLQuest™ (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA) mit einem 256-Kanalprogramm und Geometrie/Kanal-Priorität interpretiert.

[0057] Alle Daten wurden als ein Anstieg in der mittleren Kanal-Shift-Fluoreszenz (MCS) gegenüber den negativen Kontrollproben berichtet. Ein Shift von mehr als 10 Kanälen wurde als positiv erachtet. Das Ergebnis zeigt, dass Hundeserumantikörper einen viel höheren Titer enthält im Vergleich zu menschlichem Serum ([Fig. 2](#)).

[0058] Allogene gegen xenogene komplementabhängige Cytotoxizitäts (CDC)-Antworten. Um den Titer cytotoxischer Antikörper, die spezifisch für ARPE-19-Zellen sind, zu bestimmen, wurden ARPE-19-Zellen als Zielzellen in einem komplementabhängigen Cytotoxizitätstest verwendet. Die Komplementfixierung des cytotoxischen Antikörpertiters wurde unter Verwendung von entweder Hundeserum- oder menschlichen Serumproben beurteilt. ARPE-19-, Hs27- und SIRC-Zellen wurden als die Ziele verwendet. Alle Serumproben wurden in zwei Gruppen von dreifachen Ansätzen angesetzt und unter Verwendung einer Standardgewebetypisierungstechnik des National Institutes of Health (NIH) (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI) Manual, 1994) untersucht. Eine Gruppe dreifacher Ansätze wurde mit 1 µl Wirtsserum und ARPE-19-Zellen (1000 Zellen/1 µl) analysiert; die zweite Gruppe der dreifachen Ansätze wurde auf dieselbe Art und Weise untersucht mit dem Zusatz von 5 µl exogen vorgescreeentem Kaninchenkomplement (Pel Freez Brown Deer, WI, USA). Die Proben wurden unter Verwendung eines zweifarbigen immunfluoreszierenden mikrocytotoxischen Analyseverfahrens zubereitet. Einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur des Wirtsserums und der ARPE-19-Zellen folgte eine zweite einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit oder ohne zusätzlichem Kaninchenkomplement. In derselben Mikrotitervertiefung wurde der Prozentsatz lebender Zellen (negatives Reaktionsvermögen) unter Verwendung von Fluoresceindiacetat sichtbar gemacht, wohingegen der Prozentsatz toter Zellen (positives Reaktionsvermögen) unter Verwendung von Propidiumiodid sichtbar gemacht wurde. Alle Serumproben wurden 1:2-Reihenverdünnungen bis zu einem Maximum einer 1:100.000-Verdünnung angesetzt. Alle Daten wurden unter Verwendung eines Nikon Diaphot™ Fluoreszenz-Dunkelfeldmikroskops mit einer Exzitation bei einer Wellenlänge von 488 nm bewertet.

[0059] Die Ergebnisse zeigen, dass Hundeserum Antikörper enthielt, welches Komplement in der Anwesenheit dieser Zellen aktivieren kann. Im Gegensatz dazu fixierte menschliches Serum das Komplement nicht ([Fig. 3](#)).

8. Die ARPE-19-Zelllinie ist nicht tumorigen.

[0060] Eine Tumorigenitätsstudie von ARPE-19-Zellen wurde durchgeführt, wobei dem Vorgehen, das von der U.S. Food and Drug Administration (FDA), Points to Consider in the Characterization of Cell Lines used in the Production of Biologicals, 58 Federal Register 42974 (12. August 1993) gefordert wird, gefolgt wurde. Kurz, 10 Millionen Zellen in 0,2 ml serumfreiem Medium (PBS + 10 mM Glukose) wurden subkutan in jede Nacktmaus (bestrahlte Swiss-Nacktmaus, 2–7 Tage nach der Bestrahlung, n = 10) injiziert. Die Tiere wurden täglich für 3 Wochen auf Anzeichen der Tumorbildung beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Hälfte der Tiere geschlachtet, seziiert und histologisch untersucht, um die Anwesenheit der Zellen sicherzustellen. Die verbleibenden Tiere wurden für weitere 12 Wochen beobachtet. Die ARPE-19-Zellen zeigten keine Tumorbildung in der Nacktmaus für den 15-wöchigen Studienzeitraum.

B. Zellverkapselungsverfahren und Vorrichtungen.

[0061] Verkapselte Zelltherapie wird auf dem Konzept der Isolation von Zellen von dem Immunsystem des Empfängerwirts basiert, indem die Zellen mit einem semipermeablen, biokompatiblen Material vor der Implantation in den Wirt umgeben wird. Die Erfindung schließt eine Vorrichtung ein, in welcher ARPE-19-Zellen in einer immunisierenden Kapsel verkapselt werden. Eine "immunisierende Kapsel" bedeutet, dass die Kapsel nach der Implantation in einen Empfängerwirt die schädlichen Wirkungen des Immunsystems des Wirts auf die ARPE-19-Zellen im Kern der Vorrichtung minimiert. ARPE-19-Zellen werden von dem Wirt immunisiert, indem sie in implantierbaren polymeren Kapseln, gebildet von einer mikroporösen Membran, eingeschlossen werden. Dieser Ansatz verhindert den Zell-Zell-Kontakt zwischen Wirt und implantierten Geweben, wodurch die Antigenerkennung durch die direkte Präsentation eliminiert wird. Die verwendeten Membranen können auch angepasst werden, um die Diffusion der Moleküle wie Antikörper und Komplement, basierend auf ihrem Molekulargewicht, zu kontrollieren (Lysaght et al., 56 J. Cell Biochem. 196 (1996); Colton, 14 Trends Biotechnol. 158 (1996)). Unter Verwendung von Verkapselungstechniken können ARPE-19-Zellen in einen Wirt ohne Immunabwehr transplantiert werden, entweder mit oder ohne die Verwendung von immunsupprimierenden

Arzneimitteln. Nützliche biokompatible Polymerkapseln enthalten gewöhnlich einen Kern, der Zellen enthält, welche entweder in einem flüssigen Medium suspendiert sind oder in einer immobilisierenden Matrix immobilisiert sind, und einen umgebenden oder peripheren Bereich einer permeabilitätsselektiven Matrix oder Membran ("Mantel"), der keine isolierten Zellen enthält, der biokompatibel ist und der ausreichend ist, um Zellen im Kern vor dem schädlichen immunologischen Angriff zu schützen. Die Verkapselung hindert Elemente des Immunsystems am Eindringen in die Kapsel, wobei die verkapselten ARPE-19-Zellen vor der Immunzerstörung geschützt werden. Die semipermeable Art der Kapselmembran erlaubt dem biologisch aktiven Molekül von Interesse auch, leicht von der Kapsel in das umgebende Wirtsgewebe zu diffundieren.

[0062] Die Kapsel kann aus einem biokompatiblen Material hergestellt werden. Ein "biokompatibles Material" ist ein Material, welches nach der Implantation in einen Wirt keine schädliche Wirtsantwort auslöst, die ausreichend wäre, in der Abstoßung der Kapsel zu resultieren oder sie inoperabel z. B. durch Zersetzung zu machen. Das biokompatible Material ist vergleichsweise undurchlässig für große Moleküle wie Bestandteile des Immunsystems des Wirts, ist jedoch permeabel für kleine Moleküle wie Insulin, Wachstumsfaktoren und Nährstoffe, während es erlaubt, dass Stoffwechselabfall entfernt wird. Eine Anzahl an biokompatiblen Materialien sind für die Zufuhr von Wachstumsfaktoren mittels der Zusammensetzung der Erfindung geeignet. Zahlreiche biokompatible Materialien sind bekannt, wobei sie verschiedene Morphologien der Oberfläche und andere mechanische und strukturelle Charakteristika haben. Vorzugsweise wird die Kapsel dieser Erfindung ähnlich sein mit jener, die durch die internationalen PCT-Patentanmeldungen WO 92/19195 oder WO 95/05452, oder die US-Patente 5,639,275; 5,653,975; 4,892,538; 5,156,844; 5,283,187 oder 5,550,050 beschrieben sind. Solche Kapseln erlauben den Durchgang von Metaboliten, Nährstoffen und therapeutischen Substanzen, wohingegen die schädlichen Wirkungen des Wirtimmunsystems minimiert werden. Bestandteile des biokompatiblen Materials können eine umgebende semipermeable Membran und das innere zellstützende Gerüst einschließen. Vorzugsweise werden die transformierten Zellen auf dem Gerüst ausgesät, welches durch die permeabilitätsselektive Membran verkapselt wird. Das fadenförmige zellabstützende Gerüst kann aus jedem biokompatiblen Material hergestellt werden, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Acrylsäure, Polyester, Polyethylen, Polypropylen, Polyacetonitril, Polyethylenterephthalat, Nylon, Polyamide, Polyurethane, Polybutester, Seide, Baumwolle, Chitin, Kohlenstoff oder biokompatible Metalle. Auch können gebundene Faserstrukturen für die Zellimplantation (US-Patent 5,512,600) verwendet werden. Bioabbaubare Polymere schließen jene ein, zusammengesetzt aus Polymilchsäure) PLA, Polymilch-coglykolsäure) PLGA und Poly(glykolsäure) PGA und deren Äquivalente. Schaumgerüste wurden verwendet, um Oberflächen bereitzustellen, auf welchen sich transplantierte Zellen anheften können (internationale PCT-Patentanmeldung 98/05304). Gewobene Maschenröhren wurden als Gefäßimplantate verwendet (internationale PCT-Patentanmeldung WO 99/52573). Zusätzlich kann der Kern aus einer immobilisierenden Matrix zusammengesetzt sein, gebildet aus einem Hydrogel, welches die Position der Zellen stabilisiert. Ein Hydrogel ist ein dreidimensionales Netzwerk quervernetzter hydrophiler Polymere in der Form eines Gels, im Wesentlichen bestehend aus Wasser.

[0063] Zahlreiche Polymere und Polymergemische können verwendet werden, um die umgebende semipermeable Membran herzustellen, einschließlich Polyacrylaten (einschließlich Acrylcopolymeren), Polyvinylidenen, Polyvinylchloridcopolymeren, Polyurethanen, Polystyrolen, Polyamiden, Zelluloseacetaten, Zellulosenitraten, Polysulfonen (einschließlich Polyethersulfonen), Polyphosphazenen, Polyacrylonitrilen, Poly(acrylonitril/covinylchlorid), ebenso wie Derivate, Copolymere und Mischungen davon. Vorzugsweise ist die umgebende semipermeable Membran eine biokompatible semipermeable Hohlfasermembran. Solche Membranen und Verfahren zu ihrer Herstellung sind in den US-Patenten 5,284,761 und 5,158,881 offenbart. Die umgebende semipermeable Membran wird aus einer Polyethersulfonhohlfaser gebildet, wie z. B. jene beschrieben von den US-Patenten 4,976,859 oder 4,968,733. Ein alternatives umgebendes semipermeables Membranmaterial ist Poly(acrylonitril/covinylchlorid).

[0064] Die Kapsel kann jede Gestalt haben, die geeignet ist für die Aufrechterhaltung der biologischen Aktivität und zur Bereitstellung eines Zugangs für die Zufuhr des Produktes oder der Funktion, einschließlich z. B. zylindrisch, rechteckig, scheibenförmig, fleckförmig, eiförmig, sternförmig oder kugelig. Weiterhin kann die Kapsel aufgerollt sein oder in eine maschenartige oder verschachtelte Struktur eingeschlagen sein. Falls die Kapsel, nachdem sie implantiert worden ist, wiedergewonnen werden soll, sind Gestaltungen, die dazu neigen, zur Migration der Kapsel von der Stelle der Implantation zu führen, wie kugelige Kapseln, die klein genug sind, um in den Blutgefäßen des Empfängerwirts zu wandern, nicht bevorzugt. Gewisse Formen wie Rechtecke, Flecke, Scheiben, Zylinder und flache Blätter bieten eine größere strukturelle Integrität an und sind dort bevorzugt, wo die Rückgewinnung gewünscht wird.

[0065] Wenn Makrokapseln verwendet werden, werden vorzugsweise zwischen 10^3 und 10^8 ARPE-19-Zellen verkapselt, am bevorzugtesten werden 10^5 bis 10^7 ARPE-19-Zellen in jeder Vorrichtung verkapselt. Die Dosie-

zung kann durch die Implantation einer geringeren oder größeren Anzahl von Kapseln kontrolliert werden, vorzugsweise zwischen 1 und 10 Kapseln pro Patient.

[0066] Das Gerüst kann mit Extrazellulär-Matrix (ECM)-Molekülen überzogen sein. Geeignete Beispiele extrazellulärer Matrixmoleküle schließen z. B. Collagen, Laminin und Fibronectin ein. Die Oberfläche des Gerüsts kann auch durch die Behandlung mit Plasmabestrahlung modifiziert sein, um eine Ladung zu verleihen, um die Adhäsion der ARPE-19-Zellen zu erhöhen.

[0067] Jedes geeignete Verfahren zur Versiegelung der Kapseln kann verwendet werden, einschließlich der Verwendung von Polymerklebstoffen oder Falten, Verknoten und Hitzeversiegelung. Zusätzlich kann auch jedes geeignete "trockene" Versiegelungsverfahren verwendet werden, wie z. B. im US-Patent 5,653,687 beschrieben.

[0068] Die verkapselten Zellvorrichtungen werden gemäß bekannten Techniken implantiert. Viele Implantationsstellen werden für die Vorrichtungen und Verfahren dieser Erfindung in Betracht gezogen. Diese Implantationsstellen schließen ein, sind jedoch nicht begrenzt auf das zentrale Nervensystem, einschließlich dem Gehirn und der Wirbelsäule (siehe US-Patente 5,106,627, 5,156,844 und 5,554,148), und die restlichen und Glaskörperflüssigkeiten des Auges (siehe internationale PCT-Patentanmeldung WO 97/34586).

C. Gentechnische Veränderung von ARPE-19-Zellen.

[0069] Wie oben beschrieben, können ARPE-19-Zellen gentechnisch verändert werden. Die Begriffe "gentechnische Modifikation" und "genetische Veränderung" beziehen sich auf die stabile oder vorübergehende Veränderung des Genotyps einer ARPE-19-Zelle durch die beabsichtigte Einführung exogener DNS. DNS kann synthetisch oder natürlich gewonnen sein und kann Gene, Teile von Genen oder andere nützliche DNS-Sequenzen enthalten. Der Begriff "gentechnische Modifikation" ist nicht so gedacht, dass er natürlich vorkommende Änderungen wie jene, die durch natürliche virale Aktivität, natürliche genetische Rekombination oder Ähnliches geschieht, einschließt.

[0070] Jede nützliche genetische Modifikation von ARPE-19-Zellen liegt im Umfang der Erfindung. Zum Beispiel können ARPE-19-Zellen modifiziert werden, um eine biologisch aktive Substanz wie einen Neurotransmitter oder Wachstumsfaktor oder Ähnliches zu produzieren oder die Produktion davon zu steigern. Die genetische Modifikation kann entweder durch Infektion mit viralen Vektoren (Retrovirus, modifiziertes Herpesvirus, Adenovirus, adeno-assoziiertes Virus und Ähnliche) oder durch Transfektion unter Verwendung von Methoden, die im Stand der Technik bekannt sind (Lipofektion, Calciumphosphattransfektion, DEAE-Dextran, Elektroporation und Ähnliche), durchgeführt werden (siehe Maniatis et al., in Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1982)). Zum Beispiel können die chimären Genkonstrukte virale, z. B. retrovirale, lange terminale Wiederholungen (LTR), Affenvirus 40 (SV40), Cytomegalovirus (CMV) oder säugerzellspezifische Promotoren enthalten. Zusätzlich können die Vektoren einen Arzneimittelselektionsmarker wie das Aminoglycosidphosphotransferasegen von E. coli einschließen, welches, wenn es mit dem Testgen co-infiziert wird, Resistenz für Geneticin (G418), einen Proteinsyntheseinhibitor, verleiht.

[0071] ARPE-19-Zellen können genetisch modifiziert werden unter Verwendung von Transfektion mit Expressionsvektoren. Ein "Expressionsvektor" ist eine Nukleinsäure, die entweder in das Genom integriert wird oder in dem Cytoplasma vorhanden ist, und die in der Lage ist, die Expression des Polypeptides, Protein oder viralen Vektors zu ermöglichen. In einem Protokoll werden Vektor-DNS, die die Gene enthalten, in 0,1x TE (1 mM Tris, pH 8,0, 0,1 mM EDTA) auf eine Konzentration von 40 µg/ml verdünnt. 20 µl der DNS werden zu 250 µl 2x HBS (280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, 12 mM Dextrose, 50 mM HEPES) in ein wegwerfbares, steriles 5ml-Plastikröhrchen hinzugefügt. 31 µl 2 M CaCl₂ werden langsam hinzugefügt und die Mischung wird für 30 Minuten (min) bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser 30-minütigen Inkubation werden die Zellen bei 800 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Zellen werden in 20 Volumina eiskalter PBS resuspendiert und in Aliquoten von 1 × 10⁷ Zellen aufgeteilt, die wiederum zentrifugiert werden. Jede Aliquote an Zellen wird in 1 ml der DNS-CaCl₂-Suspension resuspendiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen werden dann in Wachstumsmedium verdünnt und für 6–24 Stunden bei 37 °C in 5–7% CO₂ inkubiert. Die Zellen werden wiederum zentrifugiert, in PBS gewaschen und zu 10 ml Wachstumsmedium für 48 Stunden zurückgegeben.

[0072] Geeignete Vehikel für die direkte DNS-, Plasmidpolynucleotid- oder rekombinante Vektorapplikation schließen ohne Begrenzung Salzlösung oder Saccharose, Protamin, Polybren, Polylysin, Polykatione, Proteine, Calciumphosphat oder Spermidin ein. Siehe z. B. internationale PCT-Patentanmeldung WO 94/01139.

[0073] ARPE-19-Zellen können auch genetisch modifiziert werden unter Verwendung von Calciumphosphat-transfektionstechniken. Für die Standard-Calciumphosphattransfektion werden die Zellen mechanisch in eine einzelne Zellsuspension aufgespalten und auf mit Gewebekultur behandelte Petrischalen in einer Konfluenz von 50% (50.000–75.000 Zellen/cm²) ausplattiert und es wurde ihnen ermöglicht, sich über Nacht anzuheften. Gemäß einem Protokoll wird das modifizierte Calciumphosphattransfektionsvorgehen wie folgt durchgeführt: DNS (15–25 µg) in sterilem TE-Puffer (10 mM Tris, 0,25 mM EDTA, pH 7,5), verdünnt auf 440 µl mit TE, und 60 µl 2 M CaCl₂ (der pH-Wert ist auf 5,8 mit 1 M HEPES-Puffer eingestellt) werden zu dem DNS/TE-Puffer-Gemisch hinzugefügt. Ein Gesamtvolumen aus 550 µl 2x HeBS (HEPES-gepufferte Salzlösung; 275 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,4 mM Na₂HPO₄, 12 mM Dextrose, 40 mM HEPES-Pufferpulver, pH 6,92) wird tropfenweise zu dieser Mischung hinzugefügt. Der Mischung wird erlaubt, bei Raumtemperatur für 20 Minuten zu stehen. Die Zellen werden kurz mit 1x HeBS gewaschen und 1 ml der mit Calciumphosphat gefällten DNS-Lösung wird zu jeder Platte hinzugefügt und die Zellen werden bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Nach dieser Inkubation werden 10 ml "Vollmedium" zu den Zellen hinzugefügt und die Platten werden in ein Inkubationsgerät gestellt (37°C, 9,5% CO₂) für zusätzliche 3–6 Stunden. Die DNS und das Medium werden durch Ansaugen am Ende der Inkubationsdauer entfernt. Die Zellen werden gewaschen, frisches Medium wird hinzugefügt und dann werden die Zellen in das Inkubationsgeräturntergegeben.

[0074] Alternativ kann die Calciumphosphat-Co-Präzipitations-Technik verwendet werden, wie beschrieben in der internationalen PCT-Patentanmeldung WO 93/06222.

[0075] Ferner können ARPE-19-Zellen gentechnisch verändert werden, um einen gewünschten sezernierten Faktor zu erzeugen. Der gewünschte sezernierte Faktor kann entweder durch ein synthetisches oder rekombinantes Polynucleotid kodiert werden. Der Begriff "rekombinant" bezieht sich auf die molekularbiologische Technik für die Kombination von Polynucleotiden, um nützliche biologische Produkte herzustellen, und auf die Polynucleotide und Peptide, die durch diese Technik erzeugt werden. Das Polynucleotid kann ein rekombinantes Konstrukt (wie ein Vektor oder Plasmid) sein, welches das Polynucleotid enthält, das den gewünschten sezernierten Faktor unter der operativen Kontrolle von Polynucleotiden kodiert, die regulatorische Elemente wie Promotoren, Terminationssignale und Ähnliches kodieren. "Operativ gekoppelt" bezieht sich auf eine Aneinanderlagerung, worin die so beschriebenen Bestandteile in einer Beziehung sind, die es ihnen erlaubt, in ihrer beabsichtigten Weise zu funktionieren. Eine Kontrollsequenz, die operativ an eine kodierende Sequenz gekoppelt ist, wird dergestalt ligiert, dass die Expression der kodierenden Sequenz unter Bedingungen erreicht wird, die mit den Kontrollsequenzen verträglich sind. "Kontrollsequenz" bezieht sich auf Polynucleotidsequenzen, die notwendig sind, um die Expression von kodierenden und nicht kodierenden Sequenzen, mit welchen sie ligiert sind, zu bewirken. Kontrollsequenzen schließen im allgemeinen Promotor, Ribosomenbindungsstelle und eine Transkriptionsterminationssequenz ein. Zusätzlich bezieht sich der Begriff "Kontrollsequenzen" auf Sequenzen, die das Verarbeiten des Peptides kontrollieren, das in der kodierenden Sequenz kodiert ist; diese können einschließen, sind jedoch nicht begrenzt auf Frequenzen, die die Sekretion, Proteasespaltung und Glykosylierung des Peptids kontrollieren. Von dem Begriff "Kontrollsequenzen" wird beabsichtigt, dass er mindestens Bestandteile einschließt, deren Anwesenheit die Expression beeinflussen können, und er kann auch zusätzliche Bestandteile einschließen, deren Anwesenheit vorteilhaft ist, z. B. Leitfrequenzen und Fusionspartnersequenzen. Eine "kodierende Sequenz" ist eine Polynucleotidsequenz, die in ein Polypeptid transkribiert und translatiert wird. Zwei kodierende Polynucleotide sind "operabel gekoppelt", falls die Kopplung in einer kontinuierlich translatierbaren Sequenz resultiert, ohne Änderung oder Unterbrechung des Tripletleserahmens. Ein Polynucleotid wird an ein Genexpressionselement operabel gekoppelt, falls die Kopplung in der sauberen Funktion jenes Genexpressionselementes resultiert, um in der Expression des gewünschten sezernierten Faktors zu resultieren. "Transformation" ist die Insertion eines exogenen Polynucleotids (das heißt eines "Transgens") in eine Wirtszelle. Das exogene Polynucleotid wird in das Wirtsgenom integriert. Ein Polynucleotid ist "in der Lage zur Expression" eines gewünschten sezernierten Faktors, falls es Nucleotidsequenzen enthält, die transkriptionische und translationische regulatorische Information enthält, und solche Sequenzen sind "operabel gekoppelt" an ein Polynucleotid, das den gewünschten sezernierten Faktor kodiert. Ein Polynucleotid, das einen kodierenden Bereich eines Peptides kodiert, kann dann amplifiziert werden, z. B. durch Zubereitung in einem bakteriellen Vektor, gemäß gewöhnlichen Verfahren, z. B. beschrieben in dem Standardwerk Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press 1989). Expressionsvehikel schließen Plasmide oder andere Vektoren ein.

[0076] Das Polynucleotid, das den gewünschten sezernierten Faktor kodiert, kann durch chemische Syntheseverfahren oder durch rekombinante Techniken zubereitet werden. Die Polypeptide können gewöhnlich durch chemische Synthesetechniken zubereitet werden, wie jene, beschrieben von Merrifield, 85 J. Amer. Chem. Soc., 2149-2154 (1963) (siehe Stemmer et al., 164 Gene 49 (1995)). Synthetische Gene, deren in vitro oder in vivo Transkription und Translation in der Produktion des gewünschten sezernierten Faktorproteins resultie-

ren werden, können durch im Stand der Technik wohlbekannte Techniken konstruiert werden (siehe Brown et al., 68 Methods in Enzymology 109-151 (1979)). Das kodierende Polynucleotid kann unter Verwendung eines gewöhnlichen DNS-Syntheseapparates wie die DNS-Synthesegeräte Applied Biosystems Modell 380A oder 380B (im Handel erhältlich von Applied Biosystems, Inc., 850 Lincoln Center Drive, Foster City, CA, USA) erzeugt werden.

[0077] Polynucleotidgenexpressionselemente, die für die Expression von cDNS nützlich sind, die den gewünschten sezernierten Faktor kodiert, schließen ein, sind jedoch nicht begrenzt auf (a) virale Transkriptionspromotoren und ihre Enhancerelemente wie den frühen SV40-Promotor, die LTR des Rous-Sarcoma-Virus und die LTR des Moloney-Maus-Leukämie-Virus; (b) Splicebereiche und Polyadenylierungsstellen wie jene, die aus der späten Region des SV40 abgeleitet werden; und (c) Polyadenylierungsstellen wie in SV40. Empfängerzellen, die in der Lage sind, den gewünschten sezernierenden Faktor zu exprimieren, werden dann transfiziert. Die transfizierten Empfängerzellen werden unter Bedingungen kultiviert, die die Expression des gewünschten sezernierten Faktors erlauben, welcher aus der Kultur wiedergewonnen wird. ARPE-19-Zellen können in Verbindung mit Pockenvirusvektoren wie Vakzinia oder Schweinepocken verwendet werden. Geeignete, nicht pathogene Viren, die modifiziert werden können, um das synthetische Gen in die Zellen des Wirtes zu tragen, schließen Pockenviren wie Vakzinia, Adenovirus, Retroviren und Ähnliche ein. Eine Reihe solcher nicht pathogener Viren werden allgemein für die menschliche Gentherapie verwendet und werden als Träger für andere Impfstoffmittel verwendet und sind bekannt und selektierbar von einem Fachmann. Die Auswahl anderer geeigneter Wirtszellen und Verfahren für die Transformation, Kultur, Amplifikation, das Screening und die Produktproduktion und -aufreinigung können von einem Fachmann unter Bezugnahme auf bekannte Techniken (siehe z. B. Gething & Sambrook, 293 Nature 620-625 (1981)) durchgeführt werden. Ein anderes bevorzugtes System schließt das Baculovirusexpressionssystem und -vektoren ein.

[0078] Das Polynucleotid, das den gewünschten sezernierten Faktor kodiert, kann in einer Reihe von Wegen verwendet werden. Zum Beispiel kann ein Polynucleotid das gewünschte sezernierte Faktorpeptid in vitro in einer Wirtszellkultur exprimieren. Der exprimierte gewünschte sezernierte Faktor kann dann nach geeigneter Aufreinigung in ein pharmazeutisches Reagens oder Vakzin (unten beschrieben) eingebaut werden.

[0079] Bestimmungen der Sequenzen für den kodierenden Bereich des Polynucleotids, der den gewünschten sezernierten Faktor, der hierin beschrieben ist, kodiert, können unter Verwendung von im Handel erhältlichen Computerprogrammen wie DNA Strider and Wisconsin GCG durchgeführt werden. Wegen der natürlichen Degeneriertheit des genetischen Codes wird der kundige Fachmann bemerken, dass eine beträchtliche und außerdem eindeutige Anzahl von DNS-Sequenzen konstruiert werden kann, die die beanspruchten Peptide kodieren (siehe Watson et al., Molecular Biology of the Gene, 436-437 (The Benjamin/Cummings Publishing Co. 1987)).

[0080] Der Begriff "biologisches Mittel" bezieht sich auf jedes Mittel, wie ein Virus, Protein, Peptid, Aminosäure, Lipid, Kohlenhydrat, Nukleinsäure, Nucleotid, Arzneimittel, Prodroge oder andere Substanz, das eine Wirkung auf neuronale Zellen haben kann, unabhängig davon, ob solch eine Wirkung schädlich, günstig oder anderweitig ist. Biologische Mittel, die günstig sind für neuronale Zellen, sind "neurologische Mittel", ein Begriff, der jede biologisch oder pharmazeutisch aktive Substanz einschließt, die sich als möglicherweise nützlich für die Proliferation, Differenzierung oder das Funktionieren von ZNS- oder Augenzellen oder für die Behandlung einer neurologischen oder ophtalmologischen Krankheit oder Störung herausstellen. Zum Beispiel kann der Begriff gewisse Neurotransmitter, Neurotransmitterrezeptoren, Wachstumsfaktoren, Wachstumsfaktorrezeptoren und Ähnliche, ebenso wie Enzyme, die bei der Synthese dieser Mittel verwendet werden, umfassen.

[0081] Wenn die genetische Modifikation der Produktion eines biologischen Mittels dient, kann die Substanz eine sein, die nützlich für die Behandlung einer gegebenen ZNS- oder Augenstörung ist. ARPE-19-Zellen können genetisch modifiziert werden, um ein biologisch aktives Mittel wie Wachstumsfaktor, Wachstumsfaktorrezeptoren, Neurotransmitter, Neurotransmitter synthetisierende Gene, Neuropeptide und den chromaffinen granulären Amintransporter zu exprimieren. Zum Beispiel kann es wünschenswert sein, Zellen genetisch zu modifizieren, so dass sie einen die Proliferation induzierenden Wachstumsfaktor oder einen die Differenzierung induzierenden Wachstumsfaktor sezernieren.

[0082] Das biologische Mittel kann sein: basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), saurer Fibroblastenwachstumsfaktor, epidermaler Wachstumsfaktor, Transformierender Wachstumsfaktor α , Transformierender Wachstumsfaktor β , Nervenwachstumsfaktor, Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor, thrombozytärer Wachstumsfaktor, Glia Derived Neurotrophic Factor, Brain Derived Neurotrophic Factor, Ciliary Neurotrophic Factor, Phorbol-12-myristat-13-acetat, Trypophytin, Activin, Thyrotropinfreisetzungshormon, Interleukine, Knochenmor-

phogeneseprotein, Makrophagenentzündungsproteine, Heparinsulfat, Amphiregulin, Retinsäure, Tumornekrosefaktor α , Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor, epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor oder andere Mittel, von denen erwartet wird, dass sie therapeutisch nützliche Wirkungen auf mögliche Zielgewebe haben werden. Beispiele biologischer Mittel schließen ein: trophische Faktoren wie den Glia Derived Neurotrophic Factor (GDNF), Regulatoren des intrazellulären Stoffwechselweges, der mit Wachstumsfaktoraktivität verknüpft ist, wie Staurosporin, CGP-4 1251 und Ähnliche; Hormone; verschiedene Proteine und Polypeptide wie Interleukine; Oligonucleotide wie Gegensinnstränge, die z. B. gegen Transkripte für Rezeptoren gerichtet sind; heparinähnliche Moleküle; und eine Anzahl von anderen Molekülen, die eine Wirkung auf radiale Glia-Zellen oder neuronale ZNS-Stammzellen haben.

[0083] ARPE-19-Zellen, die IL-2 sezernieren, können durch die Transfektion von ARPE-19 mit dem Plasmidvektor pBCMG-hygro-hIL-2 geschaffen werden (Roux et al., 159 J. Cell. Physiol. 101-113 (1994)), einem episomalen Expressionsvektor, der die menschliche IL-2-cDNS-Sequenz unter der transkriptorischen Kontrolle eines Cytomegalovirus (CMV)-Promotors enthält, einschließlich einem β -Globulintron aus Kaninchen, gefolgt von einer Poly-(A)-Sequenz und einem Hygromycinresistenzgen für die Selektion. Um einen Expressionsvektor, der das hIL-2-Protein kodiert, in die ARPE-19-Zelllinie einzuführen, kann die Calciumphosphatfällungstechnik verwendet werden. Das pPCHIL-Plasmid (pBCMG-hIL-2) enthält die hIL-2-cDNS-Sequenz, gefolgt von dem Hygromycin-B-Resistenzgen für die Selektion. Zellen, die fremde DNS in ihrem Genom stabil integriert haben, werden in der Anwesenheit von Hygromycin B im Medium selektiert.

[0084] Es können ARPE-19-Zellen geschaffen werden, die IL-10 sezernieren. Interleukin 10 (IL-10), hergestellt durch die Th-Untergruppe von CD4-Zellen, unterdrückt die Cytokinproduktion durch die Th₁-Untergruppe der CD₄⁺-Helfer-T-Lymphocyten. IL-10 inhibiert auch die Produktion zahlreicher proinflammatorischer Cytokine durch Monocyten. Die IL-10-Expression wurde in menschlichen malignen Gliomen nachgewiesen und in höheren Spiegeln in malignen im Vergleich zu langsam wachsenden Tumoren. Dies führte zu der Hypothese, dass endogenes IL-10 dahingehend funktioniert, dass die Antigliomaimmunität im Gehirn unterdrückt wird. Trotz der möglicherweise immunsuppressiven und antiinflammatorischen Wirkungen von endogenem IL-10 nimmt der Nachweis zu, dass transgenes IL-10, das in hohen Spiegeln durch modifizierte Tumorzellen produziert wird, das Wachstum von systemischen Tumoren durch entweder die Stimulierung der Antitumorimmunität oder durch die Inhibition von tumorassoziierter Angiogenese hemmen kann. IL-10 produzierende ARPE-19-Zellen können durch die Transfektion mit dem Plasmid pBMGneo.IL-10 in der Anwesenheit von Lipofectamin (GIBCO) unter Verwendung eines Vorgehens, das ähnlich ist zu jenem von Kundu et al., 88 J. Natl. Cancer Inst. 536-41 (1996), geschaffen werden.

[0085] ARPE-19-Zellen, die FGF sezernieren, können geschaffen werden. Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF) ist ein Endothelzellmitogen, das neuroprotektiv für andere Zelltypen im zentralen Nervensystem sein kann. Die ARPE-19-Zelllinie kann genetisch verändert werden, um ein chimäres menschliches FGF-1-Gen, bestehend aus der *hast*/KS3-Signalsequenz von FGF-4, fusioniert im Leseraster mit FGF-1 (*sp-hast*/KS3:FGF-1) (Forough et al., 268 J. Biol. Chem. 2960-8 (1993)) zu exprimieren.

[0086] ARPE-19-Zellen können bearbeitet werden, um verschiedene Neurotransmitter oder ihre Rezeptoren wie Serotonin, L-Dopa, Dopamin, Norepinephrin, Epinephrin, Tachykinin, Substanz P, Endorphin, Enkephalin, Histamin, N-Methyl-D-aspartat, Glycin, Glutamat, GABA, ACh und Ähnliche zu produzieren. Nützliche Neurotransmitter synthetisierende Gene schließen TH, DDC, DBH, PNMT, GAD, Tryptophanhydroxylase, ChAT und Histidindecaboxylase ein. Gene, die verschiedene Neuropeptide kodieren, die sich bei der Behandlung von ZNS-Störungen als nützlich herausstellen könnten, schließen Substanz P, Neuropeptid Y, Enkephalin, Vasopressin, VIP, Glucagon, Bombesin, CCK, Somatostatin, Calcitonin-ge verwandtes Peptid und Ähnliche ein.

[0087] Alternativ dazu können ARPE-19-Zellen konstruiert werden, um retrovirale Gentransfervektoren zu produzieren, unter Verwendung der Verfahren des US-Patentes 5,614,404, welches rekombinante virale Vektoren beschreibt, die heterologe Polypeptide co-exprimieren, welche in der Lage sind, sich in defekte, sich selber nicht vermehrende virale Partikel zusammenzubauen. Viren, die als Gentransfervektoren nützlich sind, schließen Retroviren ein, welche die Vektoren sind, die am üblichsten in menschlichen klinischen Versuchen verwendet werden. Um einen Genthherapievektor zu schaffen, wird das interessierende Gen in ein retrovirales Plasmid mit defekter Replikation kloniert, welches zwei lange terminale Wiederholungen (LTR), eine Primerbindungsstelle, ein Verpackungssignal und ein Polypurinsystem enthält, das notwendig ist, um die Transkription und die Integrierungsfunktionen des Retrovirus nach der Infektion umzukehren. Um den viralen Vektor zu erzeugen, wird die Plasmidform eines Vektors in eine Verpackungszelllinie transfiziert, welche Gag, Pol und Env von den retroviralen Strukturproteinen produzieren, die für den Partikelzusammenbau benötigt werden. Gewöhnlich wird eine Produzentenzelllinie erzeugt unter Verwendung eines selektiven Markers, oftmals ein

G418-resistentes Gen, das von dem retroviralen Vektor getragen wird. Die resultierende Zelllinie kann verkapselt werden, wie beschrieben in der internationalen PCT-Patentanmeldung WO 97/44065, welche biokompatible Kapseln beschreibt, die lebende Verpackungszellen enthalten, die einen viralen Vektor für die Infektion einer Zielzelle sezernieren, und welche Verfahren der Zufuhr für ein vorteilhaftes Infektionsvermögen der Zielzellen beschreibt.

[0088] Die Wirkungen der biologischen Mittel auf Zellen des ZNS oder des Auges im Empfängerwirt können in vitro identifiziert werden, basierend auf signifikanten Unterschieden zwischen Modellzellkulturen für Zellen des zentralen Nervensystems (wie Phäochromcytom-PC12-Zellen aus Ratten, kultivierte primäre, zentralnervöse Neuronen etc.) oder für Augenzellen (wie die IO/LD7/4-Zelllinie, ARPE-19-Zellen, kultivierte Retinapigmentepithelzellen etc.) im Vergleich zur Kontrollkulturen im Hinblick auf Kriterien wie den Verhältnissen der exprimierten Phänotypen (Neuronen, Gliazellen oder Neurotransmitter oder andere Marker), der Zelllebensfähigkeit und Änderungen in der Genexpression. Physikalische Eigenschaften der Zellen können analysiert werden durch Beobachten der Zell- und Neuritenmorphologie und -wachstum mit dem Mikroskop. Die Induktion der Expression neuer oder gesteigerter Spiegel von Proteinen wie Enzymen, Rezeptoren und anderen Zelloberflächenmolekülen, oder von Neurotransmittern, Aminosäuren, Neuropeptiden und biogenen Aminen kann mit jeder im Stand der Technik bekannten Technik analysiert werden, welche die Änderung des Spiegels solcher Moleküle identifizieren kann. Diese Techniken schließen die Immunhistochemie unter Verwendung von Antikörpern gegen solche Moleküle oder die biochemische Analyse ein. Solche biochemische Analyse schließt Proteintests, enzymatische Tests, Rezeptorbindungstests, enzymgekoppelte Immunadsorptionsbestimmungen (ELISA), elektrophoretische Analyse, Analyse mit Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC), Western Blots und Radioimmununtersuchungen (RIA) ein. Nukleinsäureanalyse wie Northern Blots und PCR können verwendet werden, um die Spiegel an mRNS, die diese Moleküle kodieren, oder an Enzymen, welche diese Moleküle synthetisieren, zu untersuchen. Auch kann der zelluläre Nachweis von Transkripten des gewünschten sezernierten Faktors in vivo durch Immunchemie oder durch andere immunologische Verfahren gezeigt werden.

D. Therapeutische Nützlichkeit der Zufuhr an Wachstumsfaktoren mit polymerverkapselten ARPE-19-Zellen.

[0089] Das zentrale Nervensystem ist jene Stelle, die Gegenstand chronischer Degeneration ist. Wachstumsfaktoren sind dafür bekannt, dass sie ein enormes therapeutisches Potenzial für die Behandlung neurodegenerativer Störungen haben. Zum Beispiel können polymerverkapselte xenogene Zellen, die gentechnisch verändert worden sind, um Wachstumsfaktoren zu sezernieren, vor durch Läsionen induzierten Zellverlust im zentralen Nervensystem von Ratten (Winn et al., 91 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2324-8 (1994)), Primaten (Emerich et al., 349 J. Comp. Neurol. 148-64 (1994)) und gealterten Primaten (Kordower et al., 91 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 10898-902 (1994)) schützen. Es wurden therapeutische Wirkungen mit polymerverkapselten Zellvorrichtungen, die direkt verschiedene Wachstumsfaktoren einer Reihe von Zielstellen im zentralen Nervensystem ohne Anzeichen von Nebenwirkungen zuführen, erzeugt (Emerich et al., 130 Exp. Neurol. 141-50 (1994); Emerich et al., 736 Brain Res. 99-110 (1996); Emerich et al., 349 J. Comp. Neurol. 148-64 (1994); Hoffman et al., 122 Exp. Neurol. 100-6 (1993); Kordower et al., 72 Neuroscience 63-77 (1996); Kordower et al., 91 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 10898-902 (1994); Winn et al., 91 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2324-8 (1994)). Die Sicherheit der Zufuhr von Wachstumsfaktoren durch polymerverkapselte Zellen wird durch Studien unterstützt, die keine Nebenwirkungen in Tieren fanden, die Wachstumsfaktoren erhielten, die dem Gehirn für bis zu einem Jahr zugeführt worden waren (Lindner et al., 5 Cell Transplant. 205-23 (1996); Winn et al., 140 Exp. Neurol. 126-38 (1996)). Diese Studien fanden keine Nebenwirkungen, sogar in Untersuchungen gelernten Verhaltens, welche extrem empfindlich sind für Neurotoxizität.

[0090] Die Retina ist eine andere Stelle, die Gegenstand chronischer Degeneration ist. Die Entwicklung von Behandlungen für die Retinadegeneration ist auch durch Probleme der Arzneimittelzufuhr an die hintere Augenkammer verkompliziert. Kürzlich zeigten etliche Studien, dass Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) therapeutisch sein kann für ophthalmologische Störungen. Von CNTF wurde gezeigt, dass er die Retina vor ischämischer Verletzung schützt (Unoki & LaVail, 35 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 907-15 (1994)). LaVail et al. (89 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 11249-53 (1992) und 39 Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 592-602 (1998)) berichteten, dass CNTF ein höheres therapeutisches Potenzial als 8 andere Wachstumsfaktoren bezüglich der Fähigkeit der Wachstumsfaktoren, retinale Photorezeptoren in Rattenaugen, die lichtinduzierter Degeneration ausgesetzt waren, zu schützen, ausüben. Cayouette et al. (18 J. Neurosci. 9282-93 (1998), Cayouette & Gravel, 8 Hum. Gene Ther. 423-30 (1997)) zeigten, dass die chronische CNTF-Zufuhr ein anhaltendes Schonen von Zellen erzeugt und die Funktion überlebender Photorezeptoren in Mäusemodellen der Retinitis pigmentosa verbessert.

[0091] Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist die Hauptursache von irreversiblen Sehverlust in den USA. Die altersabhängige Makuladegeneration ist die üblichste geriatrische Augenstörung, die zu Blindheit führt, und ist charakterisiert durch die Degeneration des Neuroepitheliums in dem Makulabereich des Auges. Apolipoprotein E (apoE) scheint mit der Neurodegeneration verbunden zu sein. Die trockene Form der Krankheit ist üblicher als die nasse Form; die nasse Form verursacht jedoch den schwersten Sehverlust. Es sind gegenwärtig keine anderen Behandlungen oder vorbeugenden Maßnahmen zugänglich für Patienten mit trockener Makuladegeneration als Sehhilfen (z. B. Brillen, Vergrößerungsgläser), und die Laserphotokoagulation mit Fluoresceinangiographie ist die einzige klinisch erprobte Therapie für die neovaskuläre Erkrankung (siehe Starr et al., 103(5) Postgrad Med. 153-6, 161-4 (1998)). Die Laserphotokoagulation chorioider neovaskulärer Membranen (CNVMs) bei exsudativer AMD war bis vor kurzem der einzige gut untersuchte und breit akzeptierte Behandlungsmodus. Diese Behandlung ist lediglich für eine kleine Minderheit von Patienten günstig, die gut begrenzte "klassische" CNVMs zeigen.

[0092] Retinitis pigmentosa (RP) ist eine genetische Störung, die den Abbau von Zellen in der Retina verursacht. Falls sie schwer ist, kann sie zu vollständiger Blindheit führen.

[0093] Die diabetische Augenerkrankung bezieht sich auf eine Gruppe von das Sehvermögen bedrohenden Augenproblemen, die Leute mit Diabetes als eine Komplikation der Erkrankung entwickeln können. Sie schließen diabetische Retinopathie ein, welche Blutgefäße in der Retina, dem lichtsensitiven Gewebe auf der Rückseite des Auges, das das Licht in elektrische Impulse umwandelt, welche das Gehirn als Bild interpretieren, beschädigt. Diabetische Retinopathie betrifft ungefähr die Hälfte der geschätzten 16 Millionen Menschen der Nation mit Diabetes, die wenigstens frühe Zeichen von diabetischer Retinopathie zeigen. Aus dieser Gruppe haben ungefähr 700.000 eine ernsthafte Retinaerkrankung, wobei ungefähr 65.000 Amerikaner jedes Jahr dabei sind, Retinopathie zu proliferieren – der Zustand der Erkrankung, der das Sehvermögen am meisten bedroht. Jährlich werden soviel wie 25.000 Menschen blind von der Störung, was sie zu einer führenden Ursache von Erblindung unter Amerikanern im arbeitsfähigen Alter macht.

[0094] Die Kosten der diabetischen Retinopathie sind hoch, da ein Jahr Blindheit die US-Regierung ungefähr 13.607 \$ jährlich pro Person an Sozialversicherungszuwendungen, verlorenen Einnahmen aus Einkommensteuer und Gesundheitsausgaben kostet.

[0095] Da Wachstumsfaktoren bekannt sind dafür, dass sie nützlich bei der Behandlung von neurologischer oder retinaler Degeneration sind und da verkapselte ARPE-19-Zellen gentechnisch verändert werden können, um Wachstumsfaktoren zu sezernieren, stellt die Erfindung die Verwendung dieser verkapselten und gentechnisch modifizierten ARPE-19-Zellen bei der Herstellung eines Medikaments für die Behandlung neurologischer oder retinaler Degeneration bereit.

E. Schlussfolgerung.

[0096] Die ARPE-19-Zelllinie ist überraschend nützlich für die zellbasierte Zufuhr von Faktoren an einen Empfängerwirt. Zum Beispiel:

- (a) Die ARPE-19-Zelllinie ist eine Plattformzelllinie für die Zelltherapie.
- (b) ARPE-19-Zellen sind nützlich bei der Herstellung eines Medikamentes für die Applikation eines gewünschten therapeutischen Faktors zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen.
- (c) Die ARPE-19-Zelllinie ist eine Plattformzelllinie für die Zelltherapie, wobei die ARPE-19-Zellen unverkapselt sind.
- (d) Die ARPE-19-Zelllinie ist eine Plattformzelllinie für die Zelltherapie, wobei die ARPE-19-Zellen verkapselt sind.
- (e) Die ARPE-19-Zelllinie ist eine Plattformzelllinie für die Zelltherapie, wobei die ARPE-19-Zellen die Zellen sind, die genetisch modifiziert sind, um einen gewünschten therapeutischen Faktor zu sezernieren.
- (f) Die ARPE-19-Zelllinie ist eine Plattformzelllinie für die Zelltherapie, worin die ARPE-19-Zellen genetisch modifiziert sind, um ein gewünschtes therapeutisches Protein zu sezernieren, wenn das gewünschte Protein Neurotrophine, Interleukine, Cytokine, anti-apoptotische, angiogene und antiangiogene Faktoren und Antigene einschließt (jedoch nicht darauf beschränkt ist). Solche Faktoren schließen auch ein: Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin-4 (NT-4), CNTF, Axokin (Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) der zweiten Generation; Regeneron Pharmaceuticals Inc.), basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF), die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF I und IGF II, TGFβ II, das heparinbindende Cytokin Midkine (MK), Interleukin 1 (IL-1β), Tumornekrosefaktor (TNF), Nervenwachstumsfaktor (NGF), IL-2/3, ILF, IL-6, Neurturin (NTN), Neublastin, VEGF, Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor (GDNF), thrombozytärer Wachstumsfaktor (PDGF), vom Linsenepithel stammender Wachstumsfaktor (LEDGF) und vom Pig-

mentepithel stammender Faktor (PEDF).

(g) Die ARPE-19-Zelllinie ist eine Plattformzelllinie für die Zelltherapie, wobei die ARPE-19-Zellen bei der Herstellung eines Medikaments verwendet werden, um eine therapeutisch wirksame Menge des gewünschten Faktors an einen Säuger nach der Implantation dieser Zellen in einen Säuger zu verabreichen.

(h) Die ARPE-19-Zelllinie ist eine Plattformzelllinie für die Zelltherapie, wobei die ARPE-19-Zellen bei der Herstellung eines Medikaments für die Implantation in das zentrale Nervensystem, Auge oder jedes andere interessierende Gewebe verwendet werden.

(i) Die ARPE-19-Zelllinie ist eine Plattformzelllinie für die Zelltherapie, wobei die ARPE-19-Zellen bei der Herstellung eines Medikaments für die Implantation in das zentrale Nervensystem verwendet werden, wobei die Stellen des zentralen Nervensystems ventrikuläre und intrathekale Räume, das Striatum und andere Stellen im Gehirn oder im Rückenmarksparenchym einschließen.

(j) Die ARPE-19-Zelllinie ist eine Plattformzelllinie für die Zelltherapie, wobei die ARPE-19-Zellen bei der Herstellung eines Medikaments für die Implantation in das Auge verwendet werden, wobei die Augenstellen subretinale und intravitreale Räume einschließen.

(k) ARPE-19-Zellen können bei der Herstellung eines Medikaments für die Zufuhr eines therapeutischen Proteins nach der Implantation dieser Zellen verwendet werden zur Behandlung von degenerativen Erkrankungen, wobei die degenerativen Erkrankungen die Parkinsonsche Erkrankung, Huntingtonsche Erkrankung, ALS, Alzheimersche Erkrankung, Verletzung des Rückenmarkes, Retinopathie der Frühreife, diabetische Retinopathie, altersabhängige Makuladegeneration, Glaukom, Retinitis pigmentosa, Kataraktbildung, Retinoblastom, Retina-Ischämie einschließen (jedoch nicht darauf begrenzt sind).

(l) ARPE-19-Zellen können bei der Herstellung eines Medikaments für die Zufuhr eines therapeutischen Proteins zur Behandlung von Krebs und von mit Krebs verwandten Störungen, kardiovaskulären Erkrankungen, Asthma, metabolischen Erkrankungen und anderen relevanten Pathologien nach der Implantation dieser Zellen verwendet werden.

(m) ARPE-19-Zellen können bei der Herstellung eines Medikaments für die Verabreichung eines gewünschten antigenischen Faktors als ein Vakzin nach der Implantation dieser Zellen verwendet werden.

(n) Die ARPE-19-Zelllinie kann eine Verpackungszelllinie sein, um virale Gentransfervektoren herzustellen.

(o) ARPE-19-Zellen können bei der Herstellung eines Medikaments für die Zufuhr eines gewünschten Faktors an einen Empfängerwirt verwendet werden. ARPE-19-Zellen, die in einer semipermeablen Membran verkapselt sind, welche die Diffusion des Wachstumsfaktors ermöglicht, werden in eine Zielregion im Empfängerwirt implantiert, dergestalt, dass die verkapselte ARPE-19-Zelllinie den gewünschten Faktor an die Zielregion sezerniert.

[0097] Die oben diskutierten hinterlegten gegenwärtigen Kulturen werden unter Bedingungen hinterlegt, die sicherstellen, dass der Zugang zu den Kulturen während der Anhängigkeit der Patentanmeldung erhältlich sein wird, wobei sie einer vom Commissioner of Patents and Trademarks gemäß 37 C.F.R. § 1.14 und 35 U.S.C. § 122 ermächtigten Person offenbart werden. Hinterlegungen sind zugänglich, wie es für ausländische Patentgesetze in Ländern notwendig ist, wo Gegenstücke der gegenwärtigen Anmeldung oder dessen Nachfolger eingereicht werden. Die Zugänglichkeit der Hinterlegung begründet jedoch nicht eine Lizenz, die gegenwärtige Erfindung unter Beeinträchtigung der durch die Regierungshandlung erteilten Patentrechte zu praktizieren.

[0098] Weiterhin werden die gegenwärtigen Kulturhinterlegungen gelagert und der Öffentlichkeit zugänglich gemacht werden in Übereinstimmung mit den Erfordernissen des Budapester Vertrags für die Hinterlegung von Mikroorganismen, das heißt sie werden mit all der notwendigen Umsicht gelagert werden, um sie lebensfähig und unkontaminiert für einen Zeitraum von wenigstens 30 Jahren nach dem Hinterlegungsdatum oder für die durchsetzbare Lebenszeit jedes Patentes, das die Offenbarung der Kulturen zum Gegenstand haben könnte, plus fünf Jahre nach der letzten Anfrage für eine Probe der Hinterlegung zu halten. Der Hinterleger erkennt die Pflicht an, die Hinterlegungen zu ersetzen, sollte die Hinterlegungsstelle nicht in der Lage sein, eine Probe, wenn sie angefordert wird, zu liefern, wegen den Zuständen der Hinterlegungen. Sämtliche Beschränkungen der Zugänglichkeit der Öffentlichkeit auf die gegenwärtigen Kulturhinterlegungen werden unwiderrufbar nach der Erteilung des Patents, das sie offenbart, entfernt werden.

[0099] Die Details eines oder mehrerer Ausführungsbeispiele der Erfindung sind in der obigen begleitenden Beschreibung dargelegt. Obwohl alle Verfahren und Materialien, die mit jenen, die hierin beschrieben sind, ähnlich oder zu diesen äquivalent sind, können bei der Praxis oder bei den Tests der vorliegenden Erfindung verwendet werden, wobei die bevorzugten Verfahren und Materialien nun beschrieben werden. Andere Besonderheiten, Ziele und Vorrichtungen der Erfindung werden aus der Beschreibung und den Ansprüchen offensichtlich werden. In der Spezifikation und den anhängenden Ansprüchen schließen die Singularformen Pluralverweise ein, wenn der Zusammenhang es nicht deutlich anderweitig festschreibt. Wenn nicht anderes definiert, haben sämtliche technischen und wissenschaftlichen Begriffe, die hierin verwendet werden, dieselbe Be-

deutung wie sie gemeinhin von einer Person mit durchschnittlichem Fachwissen auf dem Gebiet, zu welcher diese Erfindung gehört, verstanden wird.

Patentansprüche

1. Implantierbare Zellkulturvorrichtung, die Vorrichtung umfassend:
 - (a) eine semipermeable Membran, welche die Diffusion eines biologischen Mittels durch diese hindurch gestattet; und
 - (b) ARPE-19-Zellen, die gentechnisch so modifiziert sind, dass sie das in der semipermeablen Membran angeordnete biologische Mittel erzeugen.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, worin die semipermeable Membran immunisierend ist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1, worin die semipermeable Membran mikroporös ist.
4. Vorrichtung nach Anspruch 1, worin die semipermeable Membran die Diffusion eines biologischen Mittels gestattet.
5. Vorrichtung nach Anspruch 1, worin die Vorrichtung zusätzlich eine Matrix umfasse, angeordnet innerhalb der semipermeablen Membran.
6. Vorrichtung nach Anspruch 1, worin die Vorrichtung zusätzlich einen Halterungsanker umfasst.
7. Vorrichtung nach Anspruch 1, worin es sich bei dem biologischen Mittel um den ciliary neurotrophic factor (CNTF) oder den glial cell derived neurotrophic factor (GDNF) handelt.
8. Verwendung einer ARPE-19-Zelle, verkapselt in einer semipermeablen Membran, worin die ARPE-19-Zelle gentechnisch so modifiziert ist, dass sie ein biologisches Mittel erzeugt, und worin die Membran die Diffusion des biologischen Mittels durch diese hindurch gestattet, bei der Herstellung eines Medikaments zur Übermittlung des biologischen Mittels an einen empfangenden Wirt nach Implantation der verkapselten Zelle in einen Zielbereich im empfangenden Wirt.
9. Verwendung nach Anspruch 8, worin der Zielbereich das zentrale Nervensystem (ZNS) ist.
10. Verwendung nach Anspruch 8, worin der Zielbereich das Auge ist.
11. Verwendung nach Anspruch 8, worin der Zielbereich eine subkutane Stelle oder eine intraperitoneale Stelle ist.
12. Verwendung nach Anspruch 8, worin das biologische Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Neurotrophinen, Interleukinen, Cytokinen, antiapoptotischen, angiogenetischen und antiangiogenetischen Faktoren und Antigenen.
13. Verwendung nach Anspruch 8, worin das biologische Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus BDNF, NT-4, CNTF, Axokin, bFGF, IGF I, IGF II, TGF β II, Midkin, IL-1 β , TNF, NGF, IL-2/3, ILF, IL-6, NTN, Neublastin, VEGF, GDNF, PDGF, LEDGF, PEDF.
14. Verwendung nach Anspruch 8, worin das biologische Mittel ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einem therapeutischen Protein, dem ciliary neurotrophic factor (CNTF), dem glial cell derived neurotrophic factor (GDNF), einem antigenen Faktor, einem Antikörper und einem Gentransfervektor.
15. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 14 zur Behandlung von Krebs und mit Krebs in Beziehung stehenden Störungen, Herzkreislauferkrankungen, Asthma, metabolischen Erkrankungen und anderen relevanten Pathologien.
16. Verwendung nach einem der Ansprüche 8 bis 14 zur Behandlung einer degenerativen Erkrankung.
17. Verwendung gemäß Anspruch 16, worin die degenerative Erkrankung ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus der Parkinsonschen Krankheit, der Chorea Huntington, ALS, der Alzheimer'schen Krankheit, Verletzungen des Rückenmarks, der Frühgeborenenretinopathie, der diabetischen Retinopathie, der altersbe-

dingten Maculardegeneration, dem Glaucom, der Retinitis Pigmentosa, der Kataraktbildung bzw. dem grauen Star, dem Retinoblastom und der retinalen Ischämie.

18. Verwendung einer implantierbaren Vorrichtung gemäß Anspruch 1 bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer degenerativen Erkrankung, worin die AR-PE-19-Zelle gentechnisch modifiziert worden ist, um ein biologisches Mittel zu sekretieren, und worin die Behandlung die Sekretion einer therapeutisch wirksamen Menge des biologischen Mittels an einen empfangenden Wirt nach Implantation der Vorrichtung in einen Zielbereich im Wirt als Empfänger umfasst.

19. Verwendung einer implantierbaren Vorrichtung nach Anspruch 1 bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung der Retinadegeneration, worin die ARPE-19-Zelle gentechnisch konstruiert worden ist, um einem ciliary neurotrophic factor (CNTF) zu sekretieren, und worin die Behandlung die Sekretion einer therapeutisch wirksamen Menge des CNTF in ein Auge eines Wirts als Empfänger nach Implantation der Vorrichtung in das Auge des Wirts als Empfänger umfasst.

20. Verwendung nach Anspruch 19, worin die therapeutisch wirksame Menge des CNTF zwischen ungefähren Leveln liegt zwischen etwa 100–350 ng/Millionen Zellen/24 Stunden (ng/M/d).

21. Verwendung nach Anspruch 19, worin die therapeutisch wirksame Menge des CNTF etwa $1,62 \pm 0,4$ ng/Vorrichtung/24 Stunden beträgt.

22. Verwendung nach Anspruch 19, worin die Retinadegeneration verursacht wird durch eine Störung, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus der Frühgeborenenretinopathie, der diabetischen Retinopathie, der altersbedingten Maculardegeneration, dem Glaucom, der Retinitis Pigmentosa, der Kataraktbildung bzw. dem grauen Star, Retinoblastom und der retinalen Ischämie.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

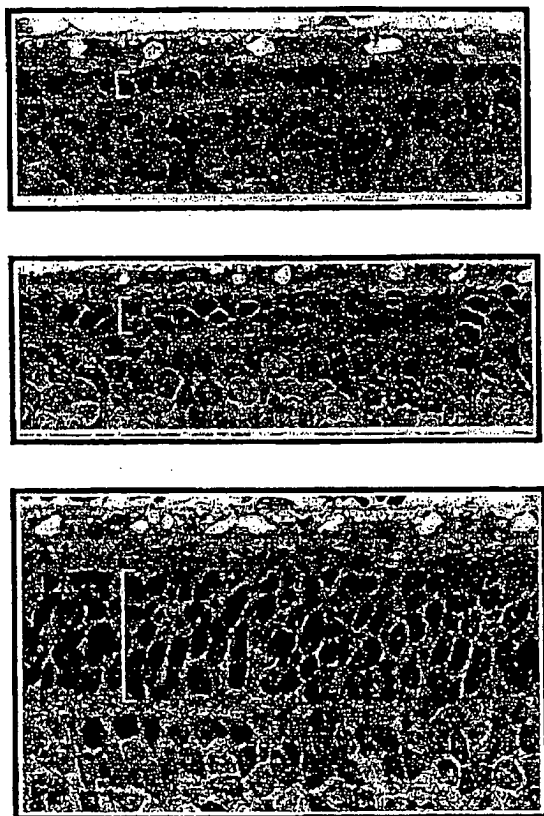


Fig. 1

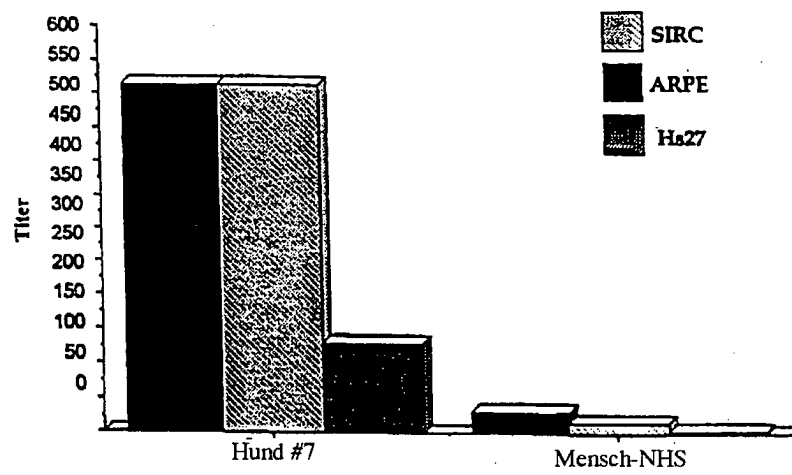


Fig. 2

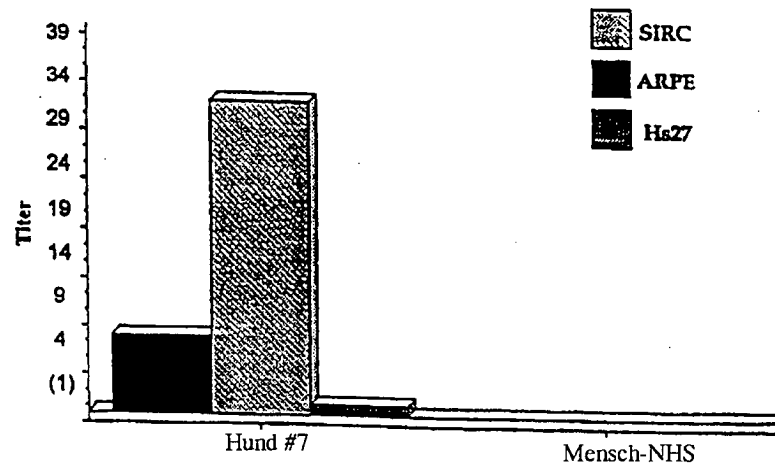


Fig. 3