

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

A

77 875

63.284/SZE

K I V O N A T

Mesterséges biológiai szervbe bezárt sejtek szaporodásának szabályozására szolgáló módszerek és készítmények

CytoTherapeutics, Inc., Providence, RI, USA

A bejelentés napja: 1995. 07. 20.

Elsőbbségei: 1994. 07. 20. (08/279,773), USA,

1995. 05. 09. (08/432,698), USA

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US95/09281.

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/02646

A jelen találmány mesterséges biológiai szervben levő sejtek eloszlásának szabályozására szolgáló módszerekkel és összetételekkel kapcsolatos, melynek során a sejteket olyan kezelésnek vetjük alá, mely gátolja a sejtosztódást, elősegíti a sejt differenciálódást, vagy hatással van a sejtek mesterséges biológiai szervben belüli szaporító felszínhez való kapcsolódására. Az ilyen kezelések közé tartoznak (1) a sejtek genetikai manipulálása, (2) kites^{szük} a sejteket egy szaporodás-gátló vegyületnek vagy egy differenciálódást indukáló vegyületnek, vagy eltávolítjuk a sejteket egy szaporodást-stimuláló vegyület vagy egy differenciálódást gátló vegyület hatása alól; a sejteket besugárzásnak vetjük alá, és (3) a BAO (mesterséges biológiai szerv) szaporító felszínét ECM molekulákkal - mely molekulák a sejt szaporodásra vagy adhézióra vannak hatással - vagy egy inert állványrendszerrel vagy ezek kombinációjával módosítjuk. Ezek a kezelések egymással kombinációban is alkalmazhatók.

Tolcsán

S.B.G. & K.
Nemzetközi
Szabadalmi Iroda
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950, Fax: 34-24-323

P9700181

22097

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

A

63.284/SZE

Mesterséges biológiai szervbe bezárt sejtek szaporodásának
szabályozására szolgáló módszerek és készítmények

CytoTherapeutics, Inc., Providence, RI, USA

Feltalálók:

SCHINSTINE, Malcolm, BEN SALEM, PA, USA,
SHOICHET, Molly, S., TORONTO, Ontario, USA,
GENTILE, Frank, WARWICK, RI, USA,
HAMMANG, Joseph, P., BARRINGTON, RI, USA,
HOLLAND, Laura, M., HORSHAM, PA, USA,
CAIN, Brian, M., EVERETT, MA, USA,
DOHERTY, Edward, J., MANSFIELD, MA, USA,
WINN, Shelley, R., SMITHFIELD, RI, USA,
AEBISCHER, Patrick, LUTRY, CH,
MESSING, Albee,

A bejelentés napja: 1995. 07. 20.

Elsőbbségei: 1994. 07. 20. (08/279,773), USA,
1995. 05. 09. (08/432,698), USA

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/US95/09281.

A nemzetközi közzététel száma: WO 96/02646

A TALÁLMÁNY LEÍRÁSA

Mesterséges biológiai szervekbe zárt sejtek szaporításának módszere

A találmány területe

A jelen találmány mesterséges biológiai szervbe bezárt sejtek szaporodásának szabályozására szolgáló módszerekkel és készítményekkel kapcsolatos.

A találmány háttere

A mesterséges biológiai szervek ("BAO-k") olyan eszközök, melyek élő sejteket tartalmaznak és egy gazda számára egy olyan metabolikus funkciót biztosítanak, melyre a gazdának szüksége van.

A mesterséges biológiai szervekbe bezárt sejtek egy vagy több biológiailag aktív molekulával látják el a gazdát, így felhasználhatók számos klinikai körülmény, hiányállapot és betegség megelőzésére vagy kezelésére.

Például az inzulint szekretáló sejteket tartalmazó BAO-k a diabetes kezelésére használhatók. Hasonlóképpen, más betegségek, mint a hipoparatiroidizmus és az amémia is

kezelhető olyan sejtekkel, melyek sorrendben paratiroid hormont és erithropoietint szekretálnak.

A mesterséges biológiai szervek felhasználhatók olyan biológiailag aktív molekulák biztosítására is, melyekkel neurodegeneratív állapotok, például a Huntington-féle betegség, a Parkinson-kór, az Alzheimer-kór és a Szerzett Immunhiány Betegséggel kapcsolatos dementiák, kezelhetők vagy megelőzhetők. Továbbá, limfokinek és citokinek is biztosíthatók BAO-kkal a gazda immunrendszerének módosítása céljából. A mesterséges biológiai szervekkel biztosítható biológiailag aktív molekulák közé tartoznak a katekolaminok, az endorfinok, az enkefalinok és más opioid vagy nem-opioid peptidek, melyek a fájdalom kezelésében hasznosak. Az enzimatis hiányok is kezelhetők BAO-kkal. Másik lehetőségként a biológiailag aktív molekula eltávolíthat vagy kiiktathat káros molekulákat a gazdaszervezetből. Például a BAO tartalmazhat olyan sejteket, melyek olyan biológiailag aktív molekulákat termelnek, melyek felhasználhatók a koleszterin gazdából való "kisöprésére".

Különböző "makrokapszula" BAO-k ismertek. Lásd például Aebischer (5,158,881 számú US szabadalom) Dionne et al., (WO 92/03327), Mandel et al., (WO 91/00119), Aebischer (WO 93/00128). A BAO-k tartalmazznak extravaszkuláris diffúziós kamrákat, intravaszkuláris diffúziós kamrákat, intravaszkuláris ultrafiltrációs kamrákat és mikrokapszulákat. Lásd például Lim et al., Science 210:908-910 (1980); Sun, A.M. Methods in Enzymology 137:575-579 (1988); Dunleavy et al., (WO 93/03901) és Chick et al., (5,002,661 számú US szabadalom).

Mivel a BAO-kba bezárt sejtek a kívánt metabolikus funkciókat biztosítják kívánatos, hogy ezek a sejtek a funkciót

befolyásoló biológiailag aktív molekulákat optimálisan biztosítsák. Tipikusan a differenciálódott, nem osztódó sejteket részesítjük előnyben az osztódó sejtekkel szemben a BAO-k esetében való alkalmazáskor, mivel ezek lehetővé teszik a kívánt biológiailag aktív molekulák optimális termelését. Például, számos differenciálódott, nem osztódó sejt nagyobb mennyiségben termeli a kívánt terápiás proteint, mint az osztódó sejtek, mivel a differenciálódás specifikus gének expresszióját és a sejt osztódást antagonistá folyamatoknak tartják. Wollheim, "Establishment and Culture of Insuline-Secreting beta Cell Lines", Methods in Enzymology, 192, p. 223-235, 1990. A celluláris replikálódási kapacitás csökken a sejtek differenciálódásával. Számos esetben a szaporodás és a differenciálódás kölcsönösen kizárólagos. Gonos "Oncogenes in Cellular Immortalisation and Differentiation", 13, Anticancer Research, p. 1117, 1993.

A differenciálódott szövet használata előnyös, mert a BAO-ba való beépítéshez szükséges szövet funkcionális tulajdonságait leginkább az in vivo differenciált szövet tulajdonságai határozzák meg. A differenciált, nem osztódó sejtek alkalmazásának másik előnye az, hogy a BAO-n belüli sejtszám viszonylag állandó marad. Ez, viszont sokkal kiszámíthatóbb eredményekhez, valamint a recipiens gazda stabil dózisaihoz vezet. Továbbá, a differenciált sejtek jobban illenek az olyan BAO-kban való felhasználáshoz, ahol egynél több, biológiailag aktív molekulát szekretáló sejtípust zártunk be. Az ilyen BAO-kban, ha osztódó sejteket használunk, a különböző sejt típusok különböző sebességgel szaporodhatnak, ami az egyik sejt típus túlzott szaporodásához vezethet. A

differentiált, nem osztódó sejtek felhasználásával a két vagy több szinergista sejt típus relatív arányát sokkal könnyebb ellenőrizni.

Bár számos esetben a differentiált sejtek alkalmazása előnyös, számos probléma merült fel a közvetlenül emlősökből izolált differentiált sejtek felhasználásával.

Először, ott van az izolált szövet potenciális fertőzése, ami azt teszi szükségessé, hogy az egyes állatokból izolált szöveteket költséges és időigényes tesztelésnek vessük alá, annak biztosítása céljából, hogy ezek patogénmentesek.

Másodszor, a szövet megsérülhet az izolálás során a mechanikai vagy enzimatisz izolálási eljárások következtében az izolálási folyamat során. A mechanikai manipulálás nem mindig standardizálható könnyen, ami az izolátumok közötti variabilitáshoz vezethet.

Harmadszor, ischemia következhet be az izolálás során, ami szövet károsodást eredményezhet.

Negyedszer, a reprodukálható hozamok különbözők lehetnek a szövet donorokban való eltérések következtében. Például, a kor, a nem, az egészségi állapot, a forrás állat hormonális státusza hatással lehet a kérdéses szövet hozamára és minőségére.

Ötödször, néha nincs elegendő forrás szövet a BAO tervezett követelményeinek kielégítésére. Ez például akkor fordul elő, ha a forrás szövet egy kis méretű szervből származik, vagy ha a szövet mennyiség iránti végső igény magas. Ha az izolált szövet forrása az ember, gyakran komoly hiány lép fel a donor szövet esetében.

Hatodszor, néhány esetben kívánatos lehet a BAO-ban használt szövet genetikai módosítása. A nem osztódó szövetet

ezideig nehéz volt genetikailag módosítani in vitro és a módosított sejtek hozama és tulajdonságai bizonytalanok. Így az előzőekben szereplő problémák miatt míg a differenciált, nem osztódó sejtek kívánatosak, szükség van a BAO-kba bezárandó differenciált, nem osztódó sejtek termelésére és fenntartására szolgáló módszerekre.

Ezen problémák miatt, az osztódó sejtek és sejtvonalak részesültek előnyben a BAO-kban való alkalmazáskor a szükséges biológiai funkció biztosítása céljából. Az osztódó sejtek használatában egy fontos előny az, hogy az ilyen sejtek nagy létszámúakká szaporodhatnak in vitro és patogénekre tesztelhetők és bankokba tehetők. Ez egy majdnem korlátlan szövet utánpótlást tesz lehetővé alacsonyabb termelési költséggel. A szelekciós sémák, mint a sejt válogatás vagy klónozás alkalmazható a sejtek esetében olyan szubpopulációk kifejlesztéséhez, melyek javított tulajdonságokkal rendelkeznek. Továbbá, az osztódó sejtek és sejtvonalak sokkal jobban manipulálhatók genetikailag, mint a differenciált, nem osztódó sejtek. A heterológ rekombináns DNS bejuttatása számos új lehetőséget nyit meg a BAO-ba bezárandó sejtek funkciójának vagy fenotípusának megváltoztatásához. Ez viszont a BAO-k terápiás alkalmazásának nagyobb diverzitását biztosítja.

Azonban, a fentiekben megtárgyaltak szerint, a folyamatosan osztódó sejtek BAO-ba való bezárásának hátrányai közé tartoznak az eszközben levő sejtszám gyenge szabályozása, ami a kívánt biológiailag aktív molekula termelését kevésbé kiszámíthatóvá teszi.

Míg a legtöbb esetben kívánatos lehet korlátozni vagy minimalizálni a BAO-ban levő sejtek szaporodását, más

esetekben, például ahol a BAO-t "ellenséges" környezetbe implantáljuk, kívánatos lehet ha a sejteket hagyjuk lassan szaporodni a BAO-ban levő sejtszám fenntartása céljából.

Van egy másik a sejtek bezárásával kapcsolatos általános probléma is. Számos sejt típus adherens tulajdonságokkal rendelkezik, mint például, az hogy a sejtek hajlamosak az egymáshoz tapadásra és sűrű agglomerációk vagy aggregátumok létrehozására, különösen ha nincs megfelelő a sejtek számára rendelkezésre álló szubsztrát. Az ilyen sejt csoportok központi nekrotikus régiókat hozhatnak létre a tápanyagok és az oxigén magba beágyazott sejtekhez való relatív hozzáférhetetlenségének, vagy a magban bekövetkező toxikus termékek létrejöttének következtében. A nekrotikus szövet felszabadíthat többlet celluláris proteineket, melyek sürgősen el kell távolítani a gazdát xeno-proteinekkal, vagy más olyan faktorokkal, melyek károsak a túlélő sejtek számára, például olyan faktorok, melyek makrofág vagy más immunválaszt váltanak ki. Ez a probléma súlyosbodhat, ha a sejteket a BAO-ba egy szemi-permeabilis membrán burkolatba zárjuk, a membránon keresztüli diffúziós kötöttségeknek köszönhetően. Gyakran kevesebb oxigén és kevesebb gazda által biztosított tápanyag áll rendelkezésre a BAO-n belül. Továbbá, a BAO-ban hulladék termékek is akkumulálódhatnak.

Ezek a sűrű celluláris tömegek lassan, vagy gyorsan sűrű telepeket alakíthatnak ki, a frissen diszpergált sejtek, vagy szövetek sejt-felszíni adhéziós proteinek által közvetített újrakapcsolódása révén. A nagy anyagcsere aktivitással rendelkező sejtek vagy szövetek különösen fogékonyak az oxigén vagy tápanyag hiány hatásával szemben, és egy nagy sejt csomóba

való beágyazódás után rövidesen el is pusztulnak. Számos endokrin szövet, melyek normálisan sűrű kapilláris közegben találhatók, ilyen tulajdonságot mutat; a Langerhans szigetek különösen érzékenynek tûnnek a beágyazódással szemben.

Szükség van a bezárt sejtek szaporodásának szabályozására szolgáló módszerre és készítményekre, melyek a szaporodó sejtek és a differenciálódott, nem osztódó sejtek különböző előnyeit egyesítik. A jelen találmány olyan módszereket és készítményeket biztosít, melyek révén a sejtek szaporíthatók és korlátlan ideig terjeszthetők in vitro és ahol a szaporodás és differenciálódás egyensúlya szabályozható ha a sejteket BAO-ba ágyazzuk be oly módon, hogy a készülék a megfelelő, kívánt módon működjön. Ily módon a jelen találmány lehetővé teszi a BAO-ban levő sejtszám szabályozását és ezen keresztül a kapszula megnyilvánulásának javított szabályozását biztosítja. A jelen találmány olyan módszereket is biztosít, melyek révén a sejtek szaporodása a BAO-n belüli elhelyezkedés révén szabályozható, ily módon a BAO-ban a nem kívánatos nekrotikus sejt magok kialakulását csökkenti. A sejtszám és a BAO-n belüli sejt elhelyezkedés szabályozása biztosítja azt az előnyt, hogy megkönnyíti a BAO membrán, valamint az adott beágyazott sejt típus más eszköz paramétereinek optimalizálását. Ez azért lehetséges, mert a kívánt készülék jellemzők könnyebben meghatározhatók egy rögzített sejt populáció esetén, mint osztódó sejt populációk esetében a BAO-ban. Továbbá, a biológiailag aktív molekulák hosszútávú biztosítása ily módon megoldható.

A találmány összefoglalása

A jelen találmány ezen problémákra irányul, oly módon, hogy módszereket és készítményeket biztosít a sejtek eloszlásának szabályozására (azaz a mesterséges biológiai szervben belül a sejtszám vagy a sejt elhelyezkedés, vagy mindkettő szabályozására) a mesterséges biológiai szervben belül. A jelen találmány módszerei és készítményei a következőket foglalják magukba: (1) a mesterséges biológiai szervbe beágyazott sejtek módosítására szolgáló módszereket és készítményeket és (2) a mesterséges biológiai szervben belüli szaporodási felszín módosítására szolgáló módszereket és készítményeket.

A celluláris manipulációra szolgáló módszerek és készítmények közé tartoznak a sejtek genetikai megválogatása olyan gén segítségével, mely egy a sejt szaporodást vagy differenciálódást befolyásoló terméket kódol. A kezelés magába foglalhatja egy olyan kémiai vegyület vagy növekedési faktor biztosítását, mely a proliferációt gátolja, vagy a differenciálódást indukálja. Másik lehetőségként a kezelés állhat egy olyan kémiai vegyület, vagy növekedési faktor a szaporító tápközegből való eltávolításából, melyek stimulálják a proliferációt, vagy melyek gátolják a differenciálódást. A kezelés történhet a mesterséges biológiai szervbe való beágyazás előtt vagy után, előnyösen a beágyazás után. Továbbá, a sejt szaporodás szabályozható besugárzással is.

A szaporodási felszín módosítására szolgáló módszerek és készítmények magukba foglalják a mesterséges biológiai szervben belüli legalább egy szaporító felszín egy vagy több extracelluláris mátrix molekulával ("ECM") való burkolását. Az

ECM-ek burkolhatók közvetlenül a luminális felszínre vagy a mesterséges biológiai szervben belüli belső támasztékra, vagy a mikroszféra hordozókra ("mikrohordozók"). A sejtek vagy a sejtekkel-beoltott mikrohordozók továbbá szuszpendálhatók egy olyan mátrix anyagban, mely fizikailag gátolja a sejt szaporodást. Továbbá, a mátrix anyag származhat kémiai vagy peptid származékokból is.

Továbbá, a mesterséges biológiai szerv szaporodási felszíne módosítható kémiai kezeléssel, oly módon, hogy gátolja a sejt kapcsolódást vagy fokozza a sejtek mesterséges biológiai szervek luminális felszínéhez való kapcsolódását. Azonkívül, a szaporodási felszín módosítható egy inert állványrendszer hozzáadásával a sejt bejuttatást megelőzően. Az állványzat fizikailag akadályozza meg a sejtek szaporodását és további helyeket biztosít a sejtkapcsolódás számára. El kell fogadni, hogy a sejt módosításra és a szaporító felszín módosítására szolgáló különböző módszerek és készítmények nem kölcsönösen kizárólagosak és ezek kombinációkban is alkalmazhatók.

Az ábrák rövid leírása

Az 1. ábra egy olyan szerkezet plazmid térképét mutatja, mely magába foglalja a patkány Mx-1 promóter 2,3 kb fragmentjét az SV40 korai régióhoz fúzionálva, melyet egy egér beta globin 3' nem transzlált régióból származó BamHI-XbaI fragment követ.

A 2. ábra az NGF szekréciót (ng/ml/24 óra) mutatja 4, 11 és 25 nap után olyan BHK sejtek esetében, melyeket kontroll, nem származtatott membránokba ágyazunk ("0%"-ként mutatjuk a

függelékben) vagy 1% vagy 5% PEO-PDMS származtatott membránokba ágyazunk (sorrendben "1%", vagy "5%"-ként mutatjuk be a függelékben). A sejteket beágyazzuk mátrix nélkül, ("no matD"-ként szerepel a függelékben), egy Vitrogen mátrixba ("vit"-ként mutatjuk be a függelékben) vagy egy agaróz mátrixba ("agse"-ként mutatjuk be a függelékben).

A 3. ábra a CultiSphers-en agaróz mátrix hiányában szaporított BHK sejtekből származó NGF felszabadulást mutatja (függelék: n-mat-008, 0709-n-m) vagy egy agaróz mátrix jelenlétében (függelék: agaro-008, agaro-0709).

A 4. ábra a katekolamin felszabadulást mutatja a PC12A sejtekből az inert PHEMA álványzattal rendelkező BAO-ba való beágyazás után 1, 14 és 28 nap elteltével. Az A panel az alap katekolamin felszabadulást mutatja; a B panel a K^+ -kiváltott katekolamin felszabadulást. Az L-dopa, a NEPI, az epi, a DOPAC, a DA és a HVA rövidítések sorrendben az L-dopa, a norepinefrin, az epinefrin, a dopac, a dopamin és a homovanillinsav megfelelői.

Az 5. ábra a katekolaminok PC12A sejtekből való felszabadítását mutatja az inert PHEMA/MMA álványzattal rendelkező BAO-kba való beágyazás után 1, 14 és 28 nap elteltével. Az A panel az alap katekolamin termelést mutatja; a B panel a K^+ -által kiváltott katekolamin felszabadulást. Az L-dopa, a NEPI, az epi, a DOPAC, a DA és a HVA rövidítések sorrendben az L-dopa, a norepinefrin, az epinefrin, a dopac, a dopamin és a homovanillinsav megfelelői.

A 6. ábra a Cultispherákon egy alginát mátrix jelenlétében (függelék:CS/AL), vagy egy agaróz mátrix jelenlétében (függelék:CS/AG) szaporított SV40/Dbeta4-NGF sejtekből történő

L-dopa felszabadulást mutatja a BAO-kba való beégyezés után 2, 20, 40, és 80 nappal.

A találmány részletes leírása

A következőkben megadjuk a találmányban használt definíciókat:

A találmány szerinti alkalmazásban a "mesterséges biológiai szerv" vagy "BAO" egy olyan készüléket takar, melyet egy gazdába való implantációhoz tervezünk, vagy mely úgy készíthető el, hogy a testen kívül funkcionáljon és vagy állandóan vagy eltávolíthatóan kapcsolódjon a gazdához. Egy BAO sejteket vagy élő szöveteket tartalmaz, melyek egy biológiailag aktív molekulát termelnek, mely terápiás hatású a gazdára nézve. A BAO a gazda recipiensben való inplantáció során biokompatibilis kell legyen. Ennek megfelelően, a BAO nem szabad, hogy káros gazda választ váltson ki olyann mértékben, mely működésképtelenné vagy terápiás szempontból használhatatlanná teszi a BAO-t. Az ilyen működésképtelenség előfordulhat, például a kapszula körüli fibrotikus szerkezet kialakulása révén, ami az abban levő sejtek számára a tápanyagok diffúzióját korlátozza. A káros hatások közé tartozhatnak a kapszula kilökése, vagy toxikus vagy pirogén vegyületek (például szintetikus polimer melléktermékek) kiválasztása a BAO-ból a környező gazda szövetbe.

A beégyezett sejteket tartalmazó BAO-k megszerkeszthetők immunoizolációs tulajdonságokkal, melyek megakadályozzák a gazda immunrendszer elemeinek a szervbe való bejutását, így védelmet biztosítanak a mesterséges biológiai szervben található sejtek számára a káros immun pusztítástól. A BAO

alkalmazása növeli a terápiában alkalmazható sejt típusok diverzitását. Az implantált BAO-kban a készülékek, melyek immunoizolációsak lehetnek vagy lehetnek nem immunoizolációsak, általában egy szelektált terméket termelő sejteket vagy szöveteket tartalmaznak egy szemi-permeábilis fizikai korláton belül, mely lehetővé teszi a tápanyagok, a hulladék anyagok diffúzióját és a szekretált termékek környező gazda szövetbe való diffúzióját és visszatartják a bennük található sejteket, de minimalizálják az immunológiai kilökődés effektorainak celluláris és molekuláris káros hatásait. Az immunoizolációs tulajdonságok, azonban nem szükségszerűek minden esetben (például ha a sejtek autológok vagy szingenikusak a gazdával szemben).

Egy "biológiailag aktív molekula" olyan molekula, mely (a) funkcionálhat az olyan sejten belül, melyben termelődik, vagy (b) expresszálható a sejt felszínén és hatással lehet a sejt más sejtekkel, vagy biológiailag aktív molekulákkal való kölcsönhatására (például egy neurotranszmitter receptor, vagy sejt adhéziós molekula), vagy (c) felszabadítható vagy szekretálható azokból a sejtekből, melyekben termelődnek és hatásukat egy külön célsejtre, vagy cél molekulára fejtik ki a gazdában (például egy neurotranszmitter, hormon, növekedési faktor, vagy citokin).

A találmány szerinti használatban hacsak másként nem specifikáljuk, a "sejtek" fogalma bármilyen formájú sejteket jelent, ideértve az ezekre való korlátozás nélkül a szövetben visszamaradó sejteket, a sejt csoportokat és az egyedileg izolált sejteket. A jelen találmányban használt sejtek legalább egy biológiailag aktív molekulát termelnek.

A BAO-n belüli sejt eloszlás (disztribúció) szabályozása a BAO-n belüli sejtszám szabályozását, a BAO-n belül a sejtek térbeli elhelyezkedésének szabályozását vagy mindkettőt jelenti.

Sejtek széles köre alkalmazható a jelen találmányban. Ezek közé tartoznak a jól ismert, nyilvánosan beszerezhető halhatatlanná tett sejtvonalak, valamint az osztódó primer sejt tenyészték. A nyilvánosan beszerezhető és a jelen találmányban megfelelően alkalmazható sejtvonalakra példák az L-6 sejtek, az MDCK sejtek, az LLC-PK sejtek, a beta-CH3 sejtek, a C2 sejtek, a hörcsög vese (BHK), a kínai hörcsög ovárium (CHO), az egér fibroblaszt (L-M), a NIH Swiss egér embrió (NIH/3T3) esetében, az afrikai zöld majom sejtvonalak (ideértve a COS-a, COS-1, COS-6, COS-7, BSC-1, BSC-40, BMT-10 és Vero sejtvonalakat), a patkány mellékvese feokromocitoma (PC12) sejtek, a patkány gliás tumor sejtek (C6), a RAJI (humán limfóma) sejtek, a MOPC-31C egér plazmacitoma sejtek, az MN9D sejtek, a ripTAG transzgenikus egér eredetű sejtek, az SCT-1, beta-TC sejtek, a Hep-G2 sejtek, az AT-T20 sejtek, a beta sejtvonalak, mint a NIT sejtek vagy a RIN sejtek, az Ntera-2 sejtek (Pleasure et. al., Journ. Neuroscience, 12, pp. 1802-15, 1992) és a humán asztrocita sejtvonalak, mint az U-373 és az U-937.

A felhasználható primer sejtek közé tartoznak a bFGF-érzékeny neurális törzs/utód sejtek, melyek emlősök CNS-éből származik (Richards et al., PNAS 89, pp. 8591-8595, 1992; Ray et al., PNAS, 90, pp. 3602-3606, 1993) a primer fibroblasztok, Schwann sejtek (WO 92/03536) asztrociták, oligodendrociták és ezek prekursorai, mioblasztjai és mellékvese kromaffin sejtjei. Például egy ilyen mioblaszt sejtvonal a C₂C₁₂ sejtvonal.

A sejtek választhatók a használni kívánt növekedés szabályozás és differenciálódás adott módszerétől függően is. Például, a törzs sejtek könnyen használhatók olyan módszerekkel, melyek a differenciálódást egy kémiai anyag alkalmazásával indukálják. Általában, a törzs sejtek nem differenciált sejtek, melyek in vivo normálisan nyugalomban vannak, de melyek szaporodásra képesek és még több olyan törzs sejt létrehozására képesek, melyek nagy számú utód sejtek létrehozására képesek, ami viszont differenciált vagy differenciálható leánysejtek létrehozását teszik lehetővé. A törzs sejtek a sejtek egy olyan osztályát képviselik, melyek könnyen kibővíthetők tenyészetben és melyek utódsejtjei terminálisan differenciálhatók egy specifikus növekedési faktor hozzáadásával. Lásd például Weiss et al., (PCT/CA 92/00283).

A mioblasztok egy olyan sejt típust jelentenek, melyek a találmány szerint egy BAO-ba ágyazhatók. A mioblasztok izom prekursor sejtek, melyek eredetileg mezodermális törzs sejt populációkból származnak. Számos mioblaszt sejtvonal szerezhethető be, melyek tenyészetben differenciálódáson mennek keresztül, például az L-6 és a beta-CH3 sejtek. A primer mioblasztok könnyen izolálhatók egy autopsziából vagy biopsziából származó szövetből és tisztíthatók és kibővíthetők. A mioblasztok szaporodnak és egymással fuzionálnak, hogy egy differenciált, sokmagvú miotubulust hozzanak létre. A mitubulusok nem osztódnak tovább, de tovább folytatják az izom proteinek termelését. A szaporodás alatt a mioblasztok könnyen manipulálhatók génszabályozási eljárásokkal terápiás molekulák termeltetése céljából. A mioblasztokba egy kívánt biológiailag aktív molekulák termeltetése céljából való egy vagy több gén

bejuttatásának módszerei ismertek. A mioblasztok képesek migrálni, korábban létező rostokhoz fuzionálni, valamint hordozókként szolgálni a bejuttatott gén(ek) számára. Verma et al., (WO 94/01129); Blau et al., TIG 9, pp. 269-74, 1993; WO 93/03768; WO 90/15863. Ezután a genetikailag manipulált sejtek beágyazhatók és a BAO-ban differenciálódni hagyhatók vagy maguk a differenciálódott sejtek kapszulázhatók be.

A sejtek kiválasztása függ a tervezett alkalmazástól is. A BAO-n belüli sejtek egy neurotranszmitter szekréciójára is választhatók. Az ilyen neurotranszmitterek közé tartoznak a dopamin, a gamma aminovajsav (GABA), a szerotonin, az acetilkolin, a noradrenalin, az epinefrin, a glutaminsav és más peptid neurotranszmitterek. Olyan sejtek is alkalmazhatók, melyek neurotranszmitterek fragmentjeinek agonistáit, analógjait, számrázékait szintetizálják vagy szekretálják, melyek aktívak, ideértve például a bromokriptint, egy dopamin agonistát szekretáló sejteket, és az L-dopát, egy dopamin prekuzort szekretáló sejteket.

A sejtek választhatók hormon, citokin, növekedési faktor, tropikus faktor, angiogenezises faktor, antitest, vér koagulációs faktor, limfokin, enzim és más terápiás anyag vagy agonista, prekuzor, aktív analóg vagy ezek aktív fragmentjeinek szekréciójára. Ezek közé tartoznak az enkefalinok, a katekolaminok, az endorfinok, a dinorfinok, az inzulin, a VIII-as faktor, az eritropoietin, a P szubsztancia, az ideg növekedési faktor (NGF), a gliás sejvonal eredetű neurotróp faktor (GDNF), a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF), az epidermális növekedési faktor (EGF), az agy eredetű neurotróp faktor (BDNF), a neurotrofin-3 (NT-3), a neurotrofin-

4/5, a CDF/LIF, a bFGF, az aFGF, egy sor más fibriblaszt növekedési faktor, ciliáris neurotróf faktor (CNTF) és az interleukinek.

Az előzőek alapján el kell fogadni, hogy a jelen találmány módszereiben hasznos sejtek nem transzformált sejteket is magukba foglalnak, melyek a kívánt biológiailag aktív molekulá(ka)t szekretálják, vagy azokat a sejteket is, melyek ilyenné transzformálhatók.

A számos biológiailag aktív molekulát kódoló géneket már klónozták és nukleotid szekvenciáikat publikálták. Ezen gének közül sok nyilvánosan is beszerezhető olyan deponálóktól, mitn az American Type Culture Collection (ATCC) vagy számos kereskedelmi forrásból is. A jelen találmányban hasznos és a nyilvánosan nem beszerezhető biológiailag aktív molekulákat kódoló gének standard rekombináns DNS módszerekkel - mint például PCR amplifikációval, genom és cDNS könyvtár bármilyen közzétett szekvenciából származó oligonukleotid próbákkal való szkrínelésével is kinyerhetők. A biológiailag aktív molekulákat kódoló bármely ismert gén felhasználható a jelen találmányban. Lásd például az 5,049,493 számú US szabadalmat; Gage et al., 5,082,670 számú US szabadalmat; és az 5,167,762 számú US szabadalmat.

Egy kérdéses gén (azaz egy a megfelelő biológiailag aktív molekulát kódoló gén) egy megfelelő expressziós vektor klónozási helyére inzertálható standard technikák segítségével. Ezek a technikák jól ismertek a tudomány e területén képzett szakemberek számára.

A kérdéses gént tartalmazó expressziós vektor ezután a jelen találmány módszerében használandó sejtvonal

transzfektálására használható. A standard transzfektálási módszerek, mint a kalcium foszfát ko-precipitáció, a DEAE-dextrán transzfekeció, a lipid által közvetített módszerek vagy az elektroporáció is felhasználhatók.

A jelen találmányban az osztódó sejtek szaporodásának szabályozására szolgáló módszereket biztosítunk, ahol a szaporodás és a differenciálódás közötti egyensúly úgy szabályozható, hogy differenciált, nem osztódó beágyazott sejteket biztosítson a BAO-n belül. Olyan módszert is biztosítunk, mely az osztódó és a nem osztódó sejtek szaporodásának szabályozását is biztosítja, ahol a BAO-n belüli sejt eloszlás és sejtszám kerül szabályozásra, ami a nekrotikus sejt magok képződését és a celluláris hulladékot csökkenti.

A proliferáció és a differenciálódás génszabályozása

A jelen találmányban módszereket és készítményeket biztosítunk a sejt szaporodás szabályozására a sejtek genetikai megváltoztatása révén egy olyan terméket kódoló gén segítségével, mely a sejtproliferációt vagy differenciálódást befolyásolja.

A jelen találmány egy aspektusa szerint a feltételesen (feltételtől függő) immortalizált (halhatatlanná tett) sejtvonalak kerülnek felhasználásra a BAO-ban történő szaporodás szabályozásának elérése céljából. A primer sejteket egy proliferációt elősegítő terméket kódoló génnek transzformáljuk. A proliferációt elősegítő gén működőképesen kapcsolódik egy szabályozható promóterhez. Az immortalizált sejtek előállítására szolgáló Land et al., által (Nature, 304,

pp. 596-602, 1983), vagy Cepko által (Neuron, 11, pp. 345-53, 1988) leírt technikák rutinszerűen módosíthatók a feltételesen immortalizált sejtek létrehozása céljából.

Ezen módszer szerint, a sejt proliferáció (például a mitózis) a proliferációt elősegítő gén, mint például egy onkogén (például a c-myc, v-mos, v-Ha-ras, SV40 T antigén, az adenovírusból származó E1-A) csökkentett expressziójával gátolható vagy korlátozható. Az onkogén csökkentett expressziója az onkogén expresszióját irányító promóter lefelé ható szabályozásával, repressziójával vagy inaktiválásával érhető el, ha a BAO-t in vivo egy gazdába implantáljuk. A felfelé ható szabályozás, a szabályozható promóter in vitro aktiválása vagy derepresszálása a proliferációt elősegítő gén expresszióját eredményezi, így lehetővé teszi a sejt in vitro proliferációját. A megfelelő promóterek azok, melyek in vivo lefelé hatóan szabályozhatók, ideértve például a glükokortikoidra reagáló promótereket, mint a PNMT (Hammang et al., Neuroprotocols, 3, pp. 176-83, 1993) és az interferonra reagáló ("INF") promótereket, mint az Mx1 (Hug et al., Mol. Cell. Biol. 8. pp. 3065-79, 1988; Arnheiter et al., Cell, 52, pp. 51-61, 1990), a retrovirális hosszú terminális ismétlési promótereket, a tetraciklinre reagáló promótereket, például a lac promótert és az inzulinra reagáló promótereket. Lásd McDonnell et al., WO 93/23431. El kell fogadni, hogy a promóter kiválasztása a tervezett implantációs helytől függ. Így például a glükokortikoid vagy IFN-re reagáló promóterek hasznosak, ha a találmány szerinti implantációt az agyban végezzük, mivel a glükokortikoid és/vagy az IFN mennyisége nagyon alacsony az agyban. Így ezektől a promóterektől nem várható, hogy az

onkogének jelentős szintű expresszióját fogják irányítani a BAO agyba való implantációjakor.

Egy megvalósulásban a feltételesen immortalizált sejtek úgy hozhatók létre, hogy egy onkogént egy szabályozható promóterhez kapcsolunk működőképesen. A promótert aktiváljuk vagy egy kötő protein jelenlétében felfelé hatóan szabályozzuk. A kötő protein termelése úgy szabályozható, ha a kötő proteint kódoló gént működőképesen egy tetraciklinre reagáló promóterhez kapcsoljuk.

Például egy megvalósulásban egy a tet represszor expressziót irányító konstitutív promótert tartalmazó transzformált sejtet tervezünk. A sejt továbbá tartalmaz egy a CMV-IE promóterhez működőképesen kapcsolódó heterológ gént is. Ha a CMV-IE promótert egy tet operátor szekvencia határolja az ezen promóterből történő expresszió kikapcsolható a tet represszorról. A tet jelenlétében transzkripció fog bekövetkezni, mivel a tet a tet represszorról kapcsolódik lehetővé téve, hogy más transzkripciós faktorok is a CMV-IE promóterhez kapcsolódjanak. Az ezen megvalósulás szerint az onkogén csupán csak akkor expresszáldik, ha tetraciklin van jelen. Így a sejtek in vitro szaporíthatók tetraciklin jelenlétében.

Az implantáció előtt néhány nappal a tetraciklin eltávolítható a transzgén expressziójának csökkentése céljából és így ennek megfelelően a BAO-ban a sejt proliferáció csökkentése vagy leállítása céljából.

Egy specifikus, a feltételesen immortalizált sejteket alkalmazó megvalósulásban a szaporodás ellenőrzése úgy érhető el, ha az Mx1 promótert alkalmazzuk. Az Mx1 gén egy olyan

proteint kódol, mely az influenza A-val és B-vel szemben biztosít rezisztenciát. Az Mx1 gént szorosan szabályozza ennek promótere. Interferon ("IFN") hiányában a gén nem expresszálódik és a gén IFN-alfa és IFN-beta jelenlétében indukálható. Arnheiter et al., (Cell 52, pp. 51-61, 1990) az Mx1 transzgenikus egér létrehozásáról számolnak be, mely számos szövetben a transzgen interferonnal indukálható expresszióját mutatja. Az SV40 nagy T-antigén számos szövetből származó sejt transzformálására és immortalizálására képes.

Egy megvalósulásban az egér Mx1 promóter az SV40 korai régióval fuzionáltatható és a kiméra gén transzgenikus egerek létrehozására használható. Az Mx1 promóter elemek által biztosított szigorú szabályozás lehetővé teszi az onkogén szövetekben vagy a transzgenikus állatokból származó sejt tenyészetekben való expressziójának szabályozását, így lehetővé téve feltételelesen immortalizált sejtvonalak létrehozását.

Az IFN-alfa vagy IFN-beta jelenlétében az így módon termelt sejtvonalak aritmetikusan bővíthetők, mint a legtöbb sejtvonal esetében. A sejtosztódás az IFN-alfa vagy az IFN-beta eltávolításával megállítható akár a bekapszulázás előtt, akár a bekapszulázás után. Egy előnyben részesített megvalósulásban a neurális törzs sejtek (neurosférák) az Mx1-SV40 T-antigén szerkezetet tartalmazó transzgenikus egerekből állíthatók elő Weiss (PCT/CA 92/00283) módszerét használva. Az így nyert feltételezetten immortalizált neurális törzs sejtvonal ezután bekapszulázható és egy gazdába implantálható in vivo.

Továbbá, tetszés szerint a feltételezetten immortalizált neurális törzs sejt vonal további genetikai módosításnak vethető alá bármilyen számú növekedési faktor vagy

neurotranszmitter molekulák standard technikákkal való felszabadítása céljából. Ebben a megvalósulásban más IFN-re reagáló promóter molekulák is felhasználhatók. Ezek a promóterek magukba foglalják a metallotioneint, a H-2K^b-t, a H-2D^d-t, a H-2L^d-t, a HLA-A3-at, a HLA-DRalfát, egy HLA I-es osztályú gént, a 202-öt, az 56K-t, a 6-16-ot, az IP-10-et, az ISG15-öt, az ISG54-et és a 2',5'-oligo(A) szintetázt. Lásd Hug et al., Mol. Cell. Biol. 8. pp. 3065-79, 1988).

Ez a megvalósulás különösen jól illik a BAO-ba bekapszulázandó sejtekhez az agyba való implantáció esetére. Az IFN-alfa és az IFN-beta agyban keringő szintjei elegendően alacsony szintűek ahhoz, hogy az Mx1 promóter által irányított transzkripció aktivitás ne legyen elegendő a sejt proliferáció eredményezéséhez. Az alapító transzgenikus állatokban, a T-antigén expressziója számos szövetben indukálható, azonban az onkogének természetes expresszióját csak a timuszban figyeltük meg. Azonban, az onkogén timuszos expressziója egy viszonylag gyakori jelenség az SV40 korai régiót expresszáló transzgenikus állatokban. Így a szignifikáns onkogén expresszió hiányában a sejtek in vivo közel nyugalmi állapotban tarthatók.

Egy másik megvalósulás azt a megfigyelést hasznosítja, mely szerint a sejt génszabályozáshoz in vivo alkalmazott, felhasznált hagyományos retrovirális fertőzési technikákban retrovirális, például a hosszú terminális ismétlési ("LTR") promóter kerül felhasználásra. Lásd például Gage et al., 5,082,670 számú US szabadalom). Az ezen promóterek által irányított gének expresszióját in vivo tipikusan lefelé hatóan szabályozzuk. Az az elképzelés, hogy ezt a lefelé ható szabályozást a keringő citokinek közvetítik. A jelen találmány

kihasználja a retrovirális gének ezen normálisan káros lefelé ható szabályozását a sejtek proliferációjának csökkentésére vagy megállítására, ha a sejtek a BAO-ba vannak bekapcsolódva és in vivo implantált állapotban vannak. Ebben az esetben egy immortalizáló gént (onkogén) irányítunk az LTR-ből. Ez a gén fogja immortalizálni a sejteket, míg ezeket in vitro fenntartjuk és bővítjük. Az implantáció után a citokinek jelenlétében az "immortalizáló" onkogén lefelé szabályozódik a proliferáció csökken vagy leáll és a sejtek nyugalmi állapotba kerülhetnek a készüléken belül.

Az ezen megvalósulás szerint a feltételezetten immortalizált sejtek retrovirális fertőzéssel vagy egy retrovirális promóterhez, például az LTR promóterhez működőképesen kapcsolódó onkogént (például c-myc, v-mos, v-Ha-ras, SV40 T-antigén, adenovírusokból származó El-A) tartalmazó cDNS-sel történő DNS transzfekcióval állíthatók elő. A jelen találmányban a Moloney patkány leukémia vírus (MLV), a Rous szarkoma vírus (RSV) és az egér emlő tumor vírus (MMTV) promóter szekvenciákat részesítjük előnyben.

Ezek a transzformált sejtek normálisan expresszálják az onkogént in vitro. A sikeresen transzformált sejtek szaporodnak a tenyészetben megalapozott tenyésztési technikákat alkalmazva. Az LTR-transzgén expresszió stimulálható a dexametazon vagy epidermális növekedési faktor hozzáadásával a transzformált sejtek tenyésztéséhez szükséges idő lerövidítése céljából. A sejtek citokineknek például gamma interferonnak (IFN-gamma), TNF-alfa és transzformáló növekedési faktor-bétának (TGFbeta) a előnyösen napokkal a bekapcsolódás és implantáció előtt történő kitevése révén a mitózis csökkenthető az LTR által irányított



transzgén expresszió gátlásával. Schinstein and Gage Molecular and Cellular Approaches to the Treatment of Neurological Diseases, 71, ed. Waxman, S.G. 1993; Seliger et al., J. Immunol. 141, pp. 2138-44, 1988; Seliger et al., J. Virology, 61, pp. 2567-72, 1987; Seliger et al., J. Virology, 62, pp. 619-21, 1988.

A fenti módszerrel bármely megfelelő sejt feltételezetten halhatatlanná tehető. A tudomány e területén átlagosan képzett szakember meghatározhatja egy adott sejttípus alkalmasságát a feltételezett immortalizációhoz, a tudomány e területén ismert szkrínelési módszereket használva, ideértve a jelen találmányban biztosított módszereket.

Módszereket biztosítunk az immortalizált sejtvonalak vagy más folyamatosan szaporodó sejtek szaporodásának szabályozására oly módon, hogy ezeket a sejteket úgy transzformáljuk, hogy tumor szupresszor géneket, például a p53 gént, vagy az RB gént tartalmazzák, a proliferáció megállítása vagy csökkentése céljából. A tumor szupresszor génekről vagy az anti-onkogénekről úgy vélik, hogy szaporodást kényszerítő gének. Lásd például Weinberg, Neuron, 11, pp. 191-96, 1993. Például egy vad típusú p53-aktivált 1-es fragment (WAF1) szupresszálni képes a tumor sejtek szaporodását tenyészetben. Az az elmélet, hogy a p53 protein által indukált gének közvetíthetik ennek tumor szupresszorkénti biológiai szerepét. El-Deiry et al., "WAF1, a Potential Mediator of p53 Tumor Suppression", Cell, 75 pp. 817-825, 1993. A WAF1 génre CIP1 génként is szoktak hivatkozni. Más p53 által közvetített szaporodást gátló gének közé tartoznak a GADD45 és a GADD153 (vagy CHOP). Lásd Ron, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, pp. 1985-86, 1994). A fent

megtárgyalt heterológ DNS-sel történő sejt transzformálási standard technikák a találmányban is felhasználhatók.

Egy megvalósulás szerint az immortalizált sejteket vagy a folyamatosan szaporodó sejteket egy szabályozható promóterhez működőképesen kapcsolódó tumor szupresszor génnel transzformáljuk. Egy megfelelő szabályozható vagy indukálható promóter alkalmazása lehetővé teszi a lefelé szabályozandó vagy "kikapcsolandó" transzgén expresszióját, ha a transzformált sejteket in vitro tenyésztjük, lehetővé téve így az expansziót. A bekapszulázás és az implantáció során a promóter "indukálódik" vagy felfelé szabályozódik és a tumor szupresszor gén expressziója bekövetkezik, csökkentett vagy gátolt sejt proliferációt eredményezve.

A tirozin hidroxiláz és az eritropoietin promóterek hasznosak lehetnek a jelen találmány ezen aspektusában. Ezek a promóterek tipikusan "lefelé szabályozódnak" magas O₂ körülmények között, mint amelyek in vitro körülmények között fordulnak elő, de alacsony O₂ körülmények között, mint amilyenekkel a sejtek egy BAO-ba való bekapszulázáskor és egy gazdába való implantáció során találkoznak, "felfelé szabályozódnak".

Ezenkívül, a megfelelő kapcsolt vagy depresszálható promóter rendszerek alkalmazhatók a proliferáció-szuppresszálo gének kívánt szabályozásának elérése céljából. Egy ilyen megfelelő rendszer például magába foglalja az AP1 promóter és a lac operátor/PGK1 promóter rendszer (Hannan et al., Gene 130, pp. 233-39, 1993, írták le) alkalmazását. Az AP1 promóter működőképesen kapcsolódik a lac represszor génhez. A lacO (lac operátor) és a 3-foszfoglicerát kináz (PGK1) promóter

működőképesen kapcsolódik a proliferáció-szuppresszálo génhez. Az exogén forbol észter in vitro hozzáadása indukálja az AP1 promótert, ami a lac represszor protein expresszióját eredményezi. A represszor protein jelenlétében a lacO-PGK1 promóter szerkezet represszállódik és nem következik be a proliferáció-szuppresszálo gén expressziója. In vivo a forbol észter hiányában a represszor protein nem expresszállódik, a lacO-PGK1 promóter depresszállódik és a proliferáció-szuppresszálo gén expreszállódik.

Egy módszernek megfelelően egy megfelelő sejtet egy a differenciálódást indukáló terméket kódoló génnel transzformálunk. Ez a differenciálódás indukáló gén működőképesen kapcsolódik egy szabályozható promóterhez. Ezen módszer szerint a differenciálódást indukáló gén a bekapszulázás és az in vivo gazdába történő implantáció során expresszállódna. Azonban, az expresszió in vitro lefékezhető vagy gátolható a szabályozható promóter megfelelő lefelé ható regulációjával, repressziójával vagy inaktiválásával, így lehetővé téve egy kívánt sejt vagy sejtvonal in vitro expanszióját. Ez a módszer alkalmazható osztódó sejtekkel, vagy immortalizált primer sejtekkel is. A nagy mobilitású csoport kromoszómális 14-es protein, a "HMG", egy olyan génre példa, mely részt vesz a sejtek differenciálódásának szabályozásában. Bármilyen in vivo felfelé szabályozott megfelelő promóter, mely azonban in vitro "kikapcsolható" vagy lefelé szabályozható felhasználható ebben a megvalósulásban, amint azt korábban említettük proliferációt lefékező génekkel kapcsolatos alkalmazás során. Ezenkívül, bármely megfelelő depresszállható

promóter rendszer alkalmazható, a fent megtárgyaltak szerint, a tumor szuppresszor gén expresszió szabályozásában.

A szaporodás szabályozásának egy másik módszerében antisense RNS-t vagy DNS-t vagy ezek származékát használjuk. Az antisense RNS vagy DNS egy egyszálú nukleinsav, mely komplementer egy gén kódoló szálával vagy az ezen gén transzkripciójából származó "kódoló" mRNS-sel. Ha az antisense RNS ugyanabban az időben van jelen a sejtben, mint az mRNS, az antisense RNS az mRNS-hez hibridizálódik egy kettős szálát létrehozva, melyet azután a riboszómák nem transzlálhatnak protein előállítás céljából. Antisense RNS adható a sejteknek vagy mikroinjektáláson vagy a tápközeghez való ömlesztett formában való hozzáadáson keresztül. A jelen találmány előnyben részesített módszere a célsejtek eukarióta expressziós vektorral való transzfektálására irányul. Neckers et al., "Antisense Technology: Biological Utility and Practical Considerations", Am. J. Physiol., 265 (Lung Cell. Mol. Physiol., 9) pp. L1-L12, 1993.

Ezen megvalósulás szerint egy proliferáció-t indukáló génhez vagy egy tumor szuppresszor génhez való antisense RNS-t kódoló antisense gén működőképesen kapcsolható egy indukálható promóterhez. Ha a promóter indukálódik antisense RNS termelődik. Ha a transzformált sejtek egy proliferációt indukáló gént tartalmaznak, az ezen megvalósulás szerint, az antisense RNS termelés megállna, vagy in vitro lefelé szabályozódna, lehetővé téve a sejt expansziót és in vivo felfelé szabályozódna a proliferáció megszüntetésének vagy csökkentésének elérése céljából.

Másik lehetőségként, ha a transzformált sejtek egy tumor szuppresszor gént tartalmaznak, az antisense RNS termelése felfelé szabályozódna in vitro és lefelé szabályozódna in vivo a kívánt szaporodási kontroll elérése céljából.

Ezenkívül, antisense technológia alkalmazható bármilyen a proliferációhoz vagy a differenciálódáshoz alapvető fontosságó terméket kódoló génhez való antisense gén megszerkesztéséhez. Az antisense gén expressziójának megfelelő indukciója lehetővé tenné a tudomány e területén átlagosan képzett szakember számára, hogy megvalósíthassa a találmány szerinti bekapszulázott sejtek kívánt szaporodási szabályozását.

Előnyben részesül egy szabályozható promóter/gén szerkezet alkalmazása, mely in vivo manipulálható abban az esetben, ha ez szükségessé válik vagy további in vivo sejt proliferációt szándékozunk indukálni. Például a korábbiakban megtárgyalt Mx1/SV40 szerkezetben IFN adható lokálisan vagy szisztémásan az onkogén expresszió indukálása céljából. Az in vivo BAO-ban levő sejt osztódás növekedése kívánatos lehet a sejtszám növeléséhez a BAO-n belüli elhalt sejtek pótlása céljából, vagy a BAO-ból származó kívánt biológiailag aktív molekula mennyiségének növelése elérése céljából.

A szaporodás és a differenciálódás szabályozásának megvalósítása kémiai vegyületekkel

A jelen találmány módszereinek megfelelően a sejtek olyan kezelésnek vethetők alá, mely gátolja a proliferációt vagy indukálja a differenciálódást. Néhány módszerben a kezelés egy kémiai vegyület vagy növekedési faktor biztosítását foglalja

magába. Más módszerekben a kezelés egy kémiai vegyület vagy növekedési faktor eltávolítását jelenti a szaporító tápközegből. A kezelés bekövetkezhet a BAO-ba való bekapszulázás előtt vagy után, előnyösen a bekapszulázás előtt.

A használt protein, vagy kémiai vegyület a sejttípustól és a tervezett hatástól függ. A tudomány e területén átlagosan képzett szakember egy adott sejttípust rutin technikákkal szkrínelhet annak érzékenységeire, egy vegyület, vagy protein szelektálása céljából.

Egy módszer szerint a sejt eloszlást egy olyan kezeléssel lehet szabályozni, mely magába foglalja egy proliferáció-t indukáló kémiai vegyület vagy növekedési faktor sejt szaporító tápközegből való eltávolítását. Egy megvalósulásban a növekedési faktorok, mint például az epidermális növekedési faktor ("EGF"), a transzformáló növekedési faktor alfa ("TGF-alfa"), az amfiregulin vagy bármely más megfelelő anyag felhasználható a törzs sejtek vagy utód sejtek - ideértve az embrionális szimpatikus ganglionok és immortalizált utód sejtekből származó sejteket, előnyösen a neurális törzs sejteket (Weiss, PCT/CA 92/00283) - proliferációjának indukálására. Ez lehetővé teszi a neuronális prekursor sejtek in vitro biztosításának fenntartását és expanszióját. Ha ezen proliferációt indukáló növekedési faktorok hiányában végezzük a bekapszulázást, a neurális prekursor sejtek osztódása és differenciálódása csökken.

A neuronális prekursor sejtek további differenciálódásra indukálhatók kezeléssel, például forbol észteres, vagy egy rögzített szubsztáron való növekedéssel, ideértve az ionosan töltéssel rendelkező felszíneket, mint például a poli-L-lizint

és a poli-L-ornitint és más hasonló vegyületeket. A differenciálódás indukálható az FGF család egyik tagjával való kezeléssel is, az Ip et al (WO 94/03199) által leírt faktor családokba tartozó ciliáris neutrotóf faktor (CNTF) vagy ideg növekedési faktor (NGF) család legalább egy tagjával kombinációban.

Egy másik megvalósulásban a sztrómában termelt sokvonalú növekedési faktor, melyet "hízósejt növekedési faktornak", "törzs sejt faktornak", "c-kit-ligandumnak" vagy "acél faktornak" is hívnak, felhasználható a hematopoietikus törzs sejtek proliferációjának indukálására. Az osztódó sejtek biztosításának fenntartásához a hematopoietikus törzs sejteket a hízósejt növekedési faktor jelenlétében tenyésztjük. A proliferáció lefékezéséhez vagy csökkentéséhez a hízósejt növekedési faktort eltávolítjuk a tenyész tápközegből. Ezt megtehetjük a bekapszulázás előtt és után, előnyösen a bekapszulázás előtt.

Más sokvonalú növekedési faktorokra - melyek a proliferációt indukálják - szolgáló példák közé tartoznak az interleukin-3 és a granulocita-makrofág telep stimuláló faktor. A hízósejt növekedési faktor hatással lehet a sejt szaporodásra más sokvonalú növekedési faktoral kombinációban, vagy vonal specifikus növekedési faktorokkal kombinációban, például az eritropoietinnel. Például a hízósejt növekedési faktorról úgy vélik szinergikusan hat az IL-3-mal az erősen dúsított patkány hematopoietikus törzs sejtek proliferációjának és differenciálódásának indukálásában. Galli et al., "The Biology of Stem Cell Factor, a New Hematopoietic Growth Factor Involved

in Stem Cell Regulation", Int. J. Clin. Lab. Res. 23, pp. 70-77, 1993.

A jelen találmány egy másik módszerében a BAO-n belüli sejt eloszlás szabályozását úgy lehet elérni, hogy olyan kémiai vegyületet vagy növekedési faktort biztosítunk, melyek gátolják a sejt proliferációt vagy indukálják a differenciálódást. Bármilyen proliferációt gátló vagy differenciálódást indukáló vegyület felhasználható ezen módszer szerint. A tudomány területén átlagosan képzett szakember rutinszerűen szkrínelheti az adott vegyületet, hogy meghatározza egy adott sejt típus esetében a proliferációra vagy a differenciálódásra kifejtett hatásának hatékonyságát.

Egy másik megvalósulásban a citokinek, ideértve például a transzformáló növekedési faktor beta1-et (TGFbeta1), felhasználhatók a sejt proliferáció gátlására vagy lefékezésére vagy a sejt differenciálódás indukálására. Például, a BHK sejtek csökkentett proliferációja és fokozott differenciálódása elérhető a TGFbeta1-nek és aszkorbátnak való kitevéssel. Hasonlóképpen, a TGFbeta1 felhasználható a fibroblaszt sejtek a differenciálódás indukálására valamint a keratinociták és endoteliális sejtek szaporodásának inhibítoraként. Phillips et al., "Ascorbic Acid and Transforming Growth Factor-beta1 Increase Collagen Biosynthesis via Different Mechanisms: Coordinate Regulation of Proalpha1(I) and proalpha1(III) Collagens" Archives of Biochemistry and Biophysics, 195, pp. 397-403, 1992.

Egy másik megvalósulásban a TGFbeta1, szerotonin vagy az FGF használható a neuroendokrin sejtek szaporodásának szabályozására. A neuroendokrin sejtek szaporodása

szabályozható saját termékeikkel is autokrin módon. A TGFbeta1 egy autokrin szaporodás-gátló faktor a humán hasnyálmirigy karcinoid sejtjei (BON) számára, míg az FGF és a szerotonin autokrin szaporodás stimuláló faktorok. A TGFbeta1 BON sejtek szaporodására kifejtett gátló hatása megfordítható szerotonin hozzáadásával. Townsend Jr. et al., "Studies of Growth Regulation in a Neuroendocrine Cell Line" *Acta Oncologica*, 32. pp. 125-130, 1993.

Számos más kémiai anyag is felhasználható a jelen találmány módszerei szerint a sejtek proliferációjának lefékezésére vagy gátlására vagy a differenciálódás indukálására. Ezek közé a kémiai anyagok közé tartoznak a mitomycin C, az 5-bromo-dezoxiuridin (BrdU), a proszttaglandin E₁ (PGE₁), a dibutiril cAMP, az 1-beta-D-arabinofuranozil citozin (Ara-C) a nikotinamid, és a heparin. A mitomycin különösen alkalmas lehet a bekapszulázott betaHC sejt vonalak proliferációjának szabályozására. Lásd például Radvanyi et al., *Mol. Cell. Biol.*, 13, pp. 4223-27, 1993.

Néha kémiai anyagok kombinációját alkalmazzuk. Az IMR-32 humán neuroblasztoma sejtek in vitro differenciálódásra indukálhatók, ha mitomycin C-vel és BrdU-val vagy PGE₁-gyel és dibutiril cAMP-vel (dbcAMP) kezeljük. Gash et al., "Amitotic Neuroblastoma Cells Used for Neural Implants in Monkeys" *Science*, 233, pp. 1420-22, 1986. A humán embrionális rhabdomyosarkoma sejt vonal Ara-C-vel való előkezelése jelentős in vitro szaporodás gátlást, in vivo, pedig a tumorigenicitás elvesztését, és egy még differenciáltabb fenotípust eredményez még a vegyület eltávolítása után is. Crouch et al., "Ara-C Treatment Leads to Differentiation and Reverses the Transformed

Phenotype in a Human Rhabdomyosarcoma Cell Line", *Experimental Cell Research*, 204, pp. 210-16, 1993. A nikotinamidról (NIC) úgy vélik indukálja a humán magzati hasnyálmirígy sziget sejtek differenciálódását és érését. Otonkoski et al., "Nicotinamide Is a Potent Inducer of Endocrine Differentiation in Cultured Human Feat1 Pancreatic Cells" *J. Clin. Invest.* 92. pp. 1459-66, 1993.

A dbcAMP hozzáadása esetében arról számoltak be, hogy a fejlődő szövetek differenciálódását befolyásolja. Például a dbcAMP-ről úgy vélik módosítja az asztrocita prekursorok differenciálódását, a PC12 sejtekben indukálja a neurit képződését és stimulálja a Schwann sejt proliferációt. Baron-Van Evercooren et al., "Schwann Cell Differentiation in vitro: Extracellular Matrix Deposition and Interaction", *Dev. Neurosci.* 8, pp. 182-96, 1986. Hasonlóképpen a Schwann sejtek differenciálódása indukálható az aszkorbátnak való expozícióval is. Ibid.

Továbbá, szialoglikopeptid ("SGP") molekulák használhatók a sejt proliferáció gátlására vagy lefékezésére. Például egy intakt szarvasmarha cerebrális kortex sejtekből izolált 18 kDa méretű sejt felszíni szialoglikopeptid lefékezi az exponenciálisan szaporodó Swiss 3T3 sejtek proliferációját. Lásd például Toole-Simms et al., *Jour. Cell. Physiol.*, 147, pp. 292-97, 1991; Fattaey et al., *Exp. Cell. Res.*, 194, pp. 62-68, 1991. Számos transzformált és nem transzformált sejt típusról kimutatták, hogy fogékonyak néhány SGP-vel szemben. Ezek közé a sejtek közé tartoznak a gerinces és gerinctelen fajok széles köréből származó epiteliális-szerű és fibroblaszt sejtek. Lásd

például Fattaey et al., Jour. Cell. Physiol. 139, pp. 269-74, 1989., mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak.

Méltányolni fogják, hogy a korábbiakban bemutatott néhány kezelés csupán átmeneti hatással van a proliferációra és differenciálódásra. Ezekben az esetekben kívánatos lehet egy folyamatosan újrafeltöltött vegyület vagy növekedési faktor forrást biztosítani a bekapszulázott sejtek számára ha egy gazdába in vivo implantálásra kerülnek. Ez együtt járhat egy növekedési faktor vagy vegyület biológiailag lebontható polimer nem celluláris forrásának használatával, vagy a növekedési faktor, vagy vegyület celluláris forrásának együttes bekapszulázásával, vagy bármely más megfelelő eszköz alkalmazásával. Lásd például az 5,106,627 és 5,156,844 számú US szabadalmakat.

A szaporodás szabályozása besugárzással

A sejt proliferáció szabályozható a sejtek egy megfelelő dózisú besugárzásnak - például röntgen sugárzás, ultraibolya (UV) sugárzás és más hasonló sugárzások - való kitévésével. Amikor a sejteket besugárzásnak vetjük alá, ezek sejtcikluson keresztüli átesésük gátolható. A kritikus dózis arány, vagy a minimum dózis arány a tudomány számára ismert módszerekkel meghatározható egy adott sejt típusra. Lásd például Stanley and Lee, Radiat Res. 133, pp. 163-9, 1993; Mitchell et al., Radiat. Res., 79, pp. 537-51, 1979, Például a normál humán epidermális keratinociták 5 és 10 mJ/cm² UVB-vel való besugárzása jelentős (78%-ig terjedő) proliferációbeli csökkenést eredményez a besugárzás után 3-5 nappal. Prystowsky et al., J. Invest.

Dermatol., 101, pp. 54-58, 1993. Yi és munkatársai (Radiation Research, 133, pp. 163-69, 1993) a röntgen sugárzásnak való kitettséggel történő sejt proliferáció megállításához szükséges legalacsonyabb dózis kiszámítására biztosít módszert.

A szaporodás és differenciálódás szabályozása extracelluláris mátrix molekulák felhasználásával

A jelen találmányban módszert biztosítunk a BAO-n belüli sejt eloszlás szabályozására egy szaporodási felszín szaporodás szabályozó extracelluláris mátrixszal ("ECM"), vagy ezek alkotórészeivel való módosítása révén, magában vagy egy szaporodást szabályozó fizikai mátrixszal vagy más szaporodást szabályozó anyagokkal kombinációban.

Élő szövetben az ECM számos proteinnből és poliszacharidból jön létre, melyeket a sejtek szekretálnak és az ezeket szekretáló sejtek közelében egy hálózattá állnak össze. Az ECM molekulák közé tartoznak a glükózaminoglükánok és a proteoglükánok, mint a kondroitin szulfát, a fibronectin, a heparin szulfát, a hialuron, a dermatán szulfát, a keratin szulfát, a laminin, a kollagén, a heparán szulfát proteoglükán (HSPG) és az elasztin. Különösen a kollagén az ECM in vivo fő összetevője. Az ECM molekulákról ismert, hogy sejt proliferáció csökkenést és sejt differenciálódás növekedést okoznak. Azonkívül, az acelluláris ECM, ha a találmány módszereiben kerülnek alkalmazásra, befolyásolhatják a BAO-ban bekapszulázott sejtek térbeli elhelyezkedését is.

Az ECM kinyerhető az ECM-et deponáló sejtek - ideértve a mezenhima vagy asztrocita eredetű sejteket - tenyésztésével. A

Schwann sejtek az ECM szintetizálására indukálhatók, ha aszkorbáttal és cAMP-vel kezelik ezeket. Ezek az ECM alkotórészek hasonlítanak a Schwann sejt proliferációt elősegítő alap membrán egy prekursorára. Továbbá, az endoteliális sejtekből természetesen termelt ECM és egy az Engelbreth Holm-Swarm tumor sejtekből (EHS) újra megszerkesztett alap membrán gél elősegíti a különböző epiteliális és endoteliális sejtek szaporodását és differenciálódását. Baron-Van Evercooren et al., "Schwann Cell Differentiation in vitro: Extracellular Matrix Deposition and Interaction", Dev. Neurosci., 8, pp. 182-96, 1986.

Egy megvalósulásban a szaporodás szabályozás a BAO-ban levő szaporodási felszín ECM-mel (vagy ennek szaporodást szabályozó alkotórészeivel) való burkolásával érhető el. Azt részesítjük előnyben ha a BAO-ban a szaporodási felszínt olyan sejtekkel oltjuk be, melyek ECM-et termelnek és a sejteket összeérésig szaporítjuk. Ezután a sejteket detergenssel és NH_4OH -val kezeljük. A kapott BAO-t - a szaporodási felszínen az acelluláris ECM borítással - a kívánt biológiailag aktív molekulát termelő sejtekkel való bekapszulázáshoz használjuk.

Egy másik megvalósulásban az ECM-et in vitro alapjában véve azonos módon állítjuk elő, liofilezzük, fragmentáljuk és szuszpenzióként a sejtekkel keverjük. A sejt/ECM fragmenteket ezután együttesen visszük be a BAO-ba.

A néhány ECM molekula jelenlétében szaporított sejtek csökkent proliferációt és megnövekedett differenciálódást mutatnak a hagyományos monoréteges tenyészetben szaporított sejtekhez képest. Például, az adrenokortikális sejtek - melyekről ismert, hogy bizonyos szteroid hormonokat, mint

például aldosteront, szintetizálnak - csökkent proliferációt mutatnak ha in vitro kollagén gél jelenlétében szaporítjuk. Fujiyama et al., "Influence of Extracellular Matrix on the Proliferation and Differentiation of Adrenocortical Cells in Culture", Path. Res. Pract. 189, pp. 12051-14, 1993.

A Schwann sejtek is mutathatnak csökkent proliferációt és megnövekedett differenciálódást ha kollagén jelenlétében szaporítjuk ezeket.

Az endokrin sejtekről ismert, hogy in vitro akkor differenciálódnak ha a szaporodási felszínt a IV-es típusú kollagén és HSPG kombinációjával burkoljuk. A IV-es típusú kollagénre a sejt adhézióban van szükség és a HSPG a differenciálódást indukálja. de Bruine et al., "Extracellular Matrix Components Induce Endocrine Differentiation In Vitro in NCI-H716 Cells" American Journal of Pathology, 142, pp. 773-782, 1993.

A fentieket beleértve számos növekedési faktor vagy kémiai anyag adható az ECM komponensekhez a sejtek proliferációjának és differenciálódásának további szabályozása céljából. A növekedési faktorok in vitro a sejtekhez adhatók az implantáció előtt vagy in vivo a sejtekhez adhatók, vagy mind a két eset alkalmazható. Lásd például az 5,156,844 és az 5,106,627 számú US szabadalmakat, melyek olyan módszerekre utalnak, melyekkel növekedési faktorokat szállítunk növekedési faktorok közösen bekapcsolódott celluláris vagy nem celluláris forrásaként. Ezenkívül, az ECM molekulák származtathatók szaporodást szabályozó peptidekkel is ismert technikák segítségével.

Például a transzformáló növekedési faktor-beta - mely magában modulálja a sejt szaporodást és mely reverzibilisen

kötődik bizonyos ECM molekulákhoz (például dekorin) - hozzáadható az ECM-hez az ECM molekulák szaporodás gátló hatásának erősítése céljából.

Hasonlóképpen a heparinról szintén kimutatták, hogy megakadályozhatja a nem transzformált és a transzformált sejtvonalak szaporodását. Matuoka et al., Cell Structure and Function, 9. p. 357, 1984.

Az alap fibroblaszt növekedési faktorról is kimutatták, hogy fokozza az endokrin sejt differenciálódást ha ECM komponensekkel együtt alkalmazzák. Lásd, de Bruine et al., "Extracellular Matrix Components Induce Endocrine Differentiation In Vitro in NCI-H716 Cells", American Journal of Pathology, 142, pp. 773-782, 1993.

A növekedési faktorok a sejtekre különböző hatásokat fejthetnek ki ha különböző ECM komponensekkel együtt alkalmazzák ezeket. Például, a fibroblaszt növekedési faktorról (FGF) kimutatták, hogy hatékony differenciálódást elősegítő faktor és gyenge mitogén a lamininen szaporodó kromaffin sejtekre nézve. Azonban, ha FGF-et adunk hozzá a kollagénen szaporodó kromaffin sejtekhez az FGF gyenge differenciálódást elősegítő faktor és erős mitogén. Ezt a tulajdonságot mutatták ki a ciklikus AMP analóg (8-(4-klorofeniltio) ciklikus AMP) esetében. Chu et al., Neuroscience, 95, pp. 43-54, 1994.

Az 1. táblázat az olyan ECM molekulák, növekedési faktorok és kémiai vegyületek egy részleges listája, melyekről ismert, hogy hatással vannak a proliferációra és a differenciálódásra bizonyos sejttípusok esetében.

1. táblázat: A proliferációt és a differenciálódást befolyásoló ECM molekulák, növekedési faktorok és kémiai vegyületek

Sejt típus	differenciálódás	proliferáció
	indukáló/szaporodás gátló	elősegítő
Schwann	aszorbát; kollagén	TGF-beta;
	(Vitrogen); kulti-	dbcAMP
	szférák/agaróz	

PC12	NGF; dbcAMP; SGP	
fibroblasztok	TGF-beta-1; kultiszférák/agaróz; aszkorbát; SGP	Vitrogen
mioblasztok	kollagén; aszkorbát	
neurális törzs	laminin; peptid 2000 kultiszférák/peptid 2000; forbol észter; heparin; FGF és (CNTF vagy NGF)	EGF; bFGF; TGF-alfa; amfiregulin
humán embrionális rabdomyoszarkoma sejtvonala	Ara-C	
humán magzati hasnyálmirígsziget sejtek	nikotinamid (NIC)	
asztroblasztok	dbcAMP	
Swiss 3T3	SGP	
adrenokortikális	kollagén	

1. táblázat (folytatás)

endokrin	IV-es típusú kollagén + HSPG; bFGF + ECM komponensek	
kromaffin	FGF + laminin; 8-(4-kloro-feniltio)ciklikus AMP + laminin	FGF + kollagén; 8-(4-klorofeniltio)ciklikus AMP + kollagén

hematopoietikus		emlő sejt növekedési faktor
BHK	TGFbeta-1 + aszkorbát; az E15 patkány meningeális sejtekből származó ECM	
keratinociták	TGFbeta-1	
endoteliális sejtek	TGFbeta-1	
neuroendokrin (humán hasnyál- mirígy karanoid sejtek (BON))	TGFbeta-1	TGFbeta-1 + aszkorbát; szerotonin; FGF
humán neuro- blasztoma	mitomycin C + BrdU; PGE ₁ + dbcAMP	
IMR-32 sejtvonal	SGP	
SCT-1	kollagén; aszkorbát	

A BAO-n belüli szaporodási felszín magába foglalja a BAO lumenális felszíneit, azonkívül más szaporodási felszíneket is, mint például egy belső támasztékot, mely a BAO-n belülré ágyazható.

A mikrohordozók felszínt biztosíthatnak a sejt szaporodáshoz. A mikrohordozók használata nagyobb bekapszulázandó sejtszámot tesz lehetővé és egyenletesebb eloszlást a BAO-n belül, különösen azon sejtek számára, melyek szaporodással kapcsolatban gátoltak lesznek. A mikrohordozók számos típusa szerezhető be a kereskedelemben, ideértve a Cytodex (Sigma, St. Louis, MO) dextrán mikrohordozókat és a CultiSpher (HyClone Labs, Logan, UT) makropórusos zselatin

mikrohordozókat és az üveg mikrohordozókat. Ezeket a mikrohordozókat gyakran használják a rögzítés függő sejtek tenyésztésére. Azon sejtvonalak közé, melyekről kimutatták, hogy makroporózusos zselatin mikrohordozókon szaporodnak, tartoznak az OBHK, a BHK-21, az L-929, a CHO-K1, az rCHO, az MDCK, a V79, az F9, a HeLa és az MDBK. A mikrohordozók készíthetők ECM molekulákból vagy burkolhatók ECM molekulákkal (mint például FACT kollagén burkolt mikrohordozók (Solo Hill labs, Ann Arbor, MI)), vagy acelluláris ECM molekulákkal, alapjában véve a fent leírtak szerint.

Egy előnyben részesített megvalósulásban a kívánt biológiailag aktív molekulákat termelő sejtek az ECM-mel burkolt mikrohordozó felületekre olthatók és a mikrohordozókon szaporíthatók in vitro, a bekapszulázást és az implantációt megelőzően. Cherksey (WO 93/14790) a sejtek üveg vagy műanyag gyöngyökön való szaporítására utal, majd a mikrogyöngyök ezt követő recipiens agyba való implantációjára.

Egy másik megvalósulásban a jelen találmány szerint, a mikrohordozókra oltott sejtek egy megfelelő szaporodást gátló mátrix jelenlétében szuszpendálhatók, majd a BAO-ba kapszulázhatók. Az ilyen mátrix anyag (például agaróz, vagy agar a fibroblasztok esetében; kollagén az adrenokortikális sejtek esetében) fizikailag gátolja a sejtek további szaporodását. Ilyen hidrogél mátrixokról ír például Dionne WO 92/19195, mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak.

A jelen találmány egy másik aspektusa szerint az agaróz az ECM helyettesítőjeként alkalmazható peptid szekvenciákkal való származtatással a sejtek mátrixhoz való kapcsolódásának befolyásolása céljából. Például agaróz hidrogélek

származtathatók a laminin vagy fibronektin peptid szekvenciáival.

Ebben a módszerben a sejteket a sejt adhézióban résztvevő sejt felszíni receptort felismerő peptid szekvenciával származtatott agarózból álló 3-D mátrixokban szuszpendáljuk. Számos peptid szekvenciáról kimutatták (a 2-D-ben), hogy elősegítik a sejt adhéziót. Lásd például Pierschbacher et al., Science, 309, pp. 30-33, 1984; Graf et al., Biochemistry, 26, pp. 6896-900, 1987; Smallheiser et al., Dev. Brain Res. 12, pp. 136-40, 1984; Jucker et al., J. Neurosci. Res., 28, pp. 507-17, 1991. A jelen találmány származtatott agaróz mátrixai a megfelelő molekuláris utasításokat prezentálhatják a sejt adhézióhoz a 3-D-ben. Az agaróz koncentráció előnyösen 1,25 % w/v, vagy kevesebb, legelőnyösebben körülbelül 1,0 %. Az RGD tartalmú szekvenciákat (azaz az AraGlyAsp; a 2. számú szekvencia AA₂-AA₄-e), az YIGSR tartalmú szekvenciákat (TyrIleGlySerArg; az 1. számú szekvencia AA₅-AA₉-e), az IKVAV tartalmú szekvenciákat (IleLysValAlaVal; a 3. számú szekvencia AA₁₁-AA₁₅-e) és más hasonló szekvenciákat részesítünk előnyben. A származtatás egy bifunkcionális párosító anyag használatával valósítható meg, mint például az 1'1 karbonil-diimidazollal vagy bármely más megfelelő módszerrel.

Az ECM alkotórészek helyett történő agaróz használatának egy kifejezett előnye az, hogy a természetesen előforduló ECM komponensek enzimatikusan lebonthatók az idő múlásával in vivo, míg az agaróz nem bomlik le könnyen. Az agaróz alkalmazása azért is előnyös, mert ez egy határozott összetételű anyag, a Matrigélhez hasonló anyagoktól eltérően, mely egy tumor sejtvonalból származik és ezért egy nem határozott összetételű

anyag. Specifikusan, kimutatták, hogy a Matrigel bFGF-et - egy számos sejt típus számára hatásos mitogén anyagot - tartalmaz. Az agaróz egy tiszta, termoreverzibilis, poliszacharidokból készített hidrogél. Azon kívül, hogy fizikailag korlátozza a sejt kinövést, maga az agaróz gátolja a proliferációt és differenciálódást indukál. Lásd, például Aulthouse, in "Expression of the Human Chondrocyte Phenotype In Vitro" In Vitro Cellular & Developmental Biology, 25, pp. 659-668, 1989.

Az agaróz kémiaailag módosítható származékokkal, például PEO-PDMS-sel, hogy tovább gátolja a sejt kinövést, előnyösen a sejtekre kifejtett toxikus hatás nélkül.

Értékelendő, hogy a különböző sejt típusok különböző érzékenységet mutatnak egy adott ECM molekulával szemben, vagy egy adott forrás acelluláris ECM-jével szemben. Lásd például End and Engel, "Multidomain Proteins of the Extracellular Matrix and Cellular Growth", pp. 79-129, in Receptors For Extracellular Matrix [Eds] McDonald and Mecham, Academic Press, New York, 1991, mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak. A tudomány e területén átlagosan képzett szakember könnyen szkrínel egy sejt típust, egy ECM molekulával, vagy egy specifikus forrásból származó acelluláris ECM molekulával szembeni érzékenységének meghatározása céljából, a sejt eloszlás szabályozásában tapasztalható hatékonyságának meghatározása céljából.

Szaporodás szabályozás a BAO-ban levő szaporodási felszín módosításával

Módszereket biztosítunk a sejt szaporodás szabályozására a BAO-ban oly módon, hogy kémiaiilag módosítjuk a szaporodási felszínt a BAO-ban található sejtszám és sejt elhelyezkedés szabályozása céljából. A mesterséges biológiai szervben belüli szaporodási felszínek oly módon módosíthatók, hogy szabályozzák a sejtek szaporodási felszínhez való kapcsolódását. A BAO-n belüli szaporodási felszín lehet a BAO luminális felszíne, vagy egy belső membrán, mikrohordozó vagy egy a BAO-ba helyezett belső támaszték. A mikrohordozókkal és a belső támaszték megvalósulásokkal a sejtek ezeken a szerkezeteken in vitro tenyésztethetők, majd a BAO-ba kapszulázhatók az implantáció céljából.

A BAO membrán különböző ismert módszerekkel módosítható, ideértve a kémiai módosítást, a karboxilsav, amin vagy hidroxil csoportok vagy más reakcióképes funkciós csoport létrehozása céljából, vagy módosítható abszorpcióval. Ezek a reakcióképes funkciós csoportok melyek máskülönben nincsenek jelen a polimer gerincen, ezután a további származtatás helyeiként használhatók.

Egy megvalósulásban a BAO luminális felszíne úgy módosítható, hogy elősegítse az ehhez való celluláris kapcsolódást. A luminális felszínhez történő szabályozott sejt kapcsolódás hasznos lehet a sejtek túlélésének fokozása céljából. A sejtek előnyösen a membránhoz való kapcsolásával a kapszulán belüli egyenletes sejt eloszlást eredményezhet kevesebb sejttel, mint amit az immobilizálási technikák során használunk egy hidrogél szuszpenziót használva. A kisebb sejtszám felhasználása kisebb mennyiségű sejt hulladékot eredményez. Másik előny a tápanyagok sejtekhez való fokozott

diffúziója, mivel a sejtek szoros közelségben vannak a membránnal. Ha membrán módosítást mátrix anyag nélkül használjuk a kapszulában a gélen keresztüli transzporttal kapcsolatos, valamint a proteinek vagy sejt termékek mátrix anyaghoz való adszorpciójával kapcsolatos komplikációk is elkerülhetők. A celluláris kapcsolódás elősegíthető a BAO luminális felszín különböző molekulasúlyú poli(d-lizin)-nel való kezelésével. A poli(d-lizin) a BAO luminális felszínre adszorbeálódhat egy 11-es pH értékű pufferelt oldatból. A körülbelül 67000 g/mol poli(d-lizin)-t részesítjük előnyben.

Ezenkívül azt találtuk, hogy a peptid származékok, például az RGD tartalmú szekvenciák (ArgGlyAsp; a 2. számú szekvencia AA₂-AA₄-e), az YIGSR tartalmú szekvenciák (TyrIleGlySerArg; az 1. számú szekvencia AA₅-AA₉-e), ideértve a CDPGYIGSR (CysAspProGlyTyrIleGlySerArg; 1. számú szekvencia), valamint az IKVAV tartalmú szekvenciák (IleLysValAlaVal, a 3. számú szekvencia AA₁₁-AA₁₅-e) (előnyösen CysSerArgAlaArgLysGlnAlaAlaSerIleLysValAlaValSerAlaAspArg 3. számú szekvencia), különösen hasznosak a celluláris kapcsolódás elősegítésében. Például az RGD (ArgGlyAsp; a 2. számú szekvencia AA₂-AA₄-e) ezen peptidek leggyakoribbika kémiaailag kapcsolható a BAO membránhoz ismert technikákat használva. Néhány RGD (ArgGlyAsp; a 2. számú szekvencia AA₂-AA₄-e) tartalmú molekula beszerezhető a kereskedelemben -- például PepTite (Telios).

Egy másik megvalósulásban a BAO mebrán módosítható, hogy gátolja a sejtkapcsolódást például a PEO-PDMS vagy poli(d-lizin)-alginát adszorpción keresztül. A PEO-PDMS módosítást részesítjük előnyben, különösen, ha a szaporodási felszín porózus. Ez azért van így, mert a PEO-PDMS a pórusokon

keresztük diffundál és a felszínhez adszorbeálódik ahogy keresztül halad a pórusokon a hidrofób-hidrofób kötődések révén. Különösen az alacsony molekulasúlyú (600-3000 g/mol) PEO-PDMS részesül előnyben.

Ez a megvalósulás különösen akkor hasznos, ha a sejteket mikrohordozókon szaporítjuk és BAO-ba kapszulázzuk. Ily módon egyenletes sejt eloszlás érhető el, a sejtszám szabályozható és a sejt adhézió a mikrohordozóra korlátozható.

Ezekenkívül a sejt kapcsolódást elősegítő és gátló anyagok kombinációban is alkalmazhatók. Például a BAO luminális felszíne a sejt kapcsolódást gátló vegyületekkel kezelhető és a sejteket hordozó mikroszférák, vagy a sejteket körülvevő mátrix (ha használunk ilyet) kezelhető a sejt kapcsolódást elősegítő vegyületekkel.

Egy másik megvalósulásban a BAO belső része megváltoztatható egy inert állványzat BAO-ban való biztosításával a sejtek bejuttatása előtt. Ez az állványzat egy olyan szerkezetet biztosít, mely a sejtek adhézióját és a kapszulán belüli egyenletes sejt eloszlást segíti elő. Egy inert állványzat előállításában hasznos vegyületek közé tartoznak a poli(hidroxietil metakrilát) ("PHEMA") és a poli(hidroxietil metakrilát-ko-metil metakrilát) ("PHEMA/MMA"). Továbbá, az állványzat származhat különböző kémiai anyagokból vagy proteinekből, ideértve a korábban tárgyalt vegyületeket, a szaporodás és differenciálódás további szabályozása céljából. Ezen módszer szerint egy megfelelő állvány anyag oldata kicsapatásra kerül a BAO-ban a kívánt állvány létrehozása céljából.

Egy másik megvalósulás a sejtek egy olyan membránon való tenyésztését jelenti, mely belső támasztékként szolgál. A belső támaszték bármilyen alapjában véve biokompatibilis anyagból készülhet, mint például titánból, vagy egy megfelelő polimerből. A támaszték lehet egy gerenda (támasztórúd) formájú, vagy tervezhető úgy, hogy egy állványzatként funkcionáljon, nagy méretű felületi területet biztosítva a sejtszaporodáshoz. Egy ilyen állványzati anyagra példa a nem-fonott poliészter szövet (NWPF) (Reemay, Tennessee). Számos NWPF típus létezik, a szőtt lap szövés szorosságának és vastagságának változásával. Az ilyen technikák lehetővé teszik a BAO-ban levő sejtszám pontos szabályozását valamint a sejt/állványzat BAO-ba való inzertációja előtti kvalifikálását. Ezenkívül az ilyen anyagon szaporított sejtek differenciálódása (a készülékhez képest külső) bekövetkezhet az anyag készülékbe történő inzertálása előtt. Egy ilyen állványzat is módosítható például sejt adhéziós peptidekkel, a celluláris differenciálódás indukálása céljából. Ezenkívül az anyag fokozza a BAO szilárdságát. A belső támasztéket tartalmazó BAO-k összeállítása a függő SN 08/105,728 számú szabadalomban került leírásra.

Az ezen találmányban hasznos BAO-k tipikusan legalább egy szemipermeábilis külső felszín membránnal vagy burokkal rendelkeznek a sejtet tartalmazó nag körül. A burok lehetővé teszi a tápanyagok, biológiailag aktív molekulák és más kiválasztott termékek BAO-n keresztüli diffúzióját. A BAO biokompatibilis és előnyösen immunoizolációs. A mag izolált sejteket tartalmaz vagy egy folyadék tápközegeben szuszpendálva vagy egy hidrogél mátrixban immobilizált formában.

El kell fogadni, hogy a korábbiakban leírt, a BAO-n belüli sejt eloszlás szabályozására szolgáló módszerek és készítmények nem kizárólagosak. Kívánatos lehet különböző módszerek és készítmények kombinációban történő alkalmazása a kívánt szaporodási kontroll elérése céljából.

Például kívánatos lehet olyan sejteket előállítani, melyeket genetikusan módosítottunk oly módon, hogy egy szaporodást szabályozó gént tartalmazzanak a jelen találmány szerint, ezeket a sejteket ECM mikrohordozókon szaporítjuk és a sejt/mikrohordozó csoportokat egy olyan BAO-ba ágyazzuk, melyben legalább egy szaporító felszín a sejt eloszlás szabályozására módosítottunk.

A BAO beágyazó membránja olyan anyagból készíthető, mely azonos a mag anyagáéval, vagy készülhet különböző anyagból. Bármelyik esetben egy a BAO-t körbevevő vagy perifériás membrán régió - mely permszelektív és biokompatibilis - jön létre. A membrán megszerkeszthető úgy is, hogy tetszés szerint immunoizolációs legyen.

A felhasznált anyagok kiválasztását a BAO megszerkesztéséhez számos tényező befolyásolja és részletesen Dionne írja le (WO 92/19195). Röviden, különböző polimerek és polimer keverékek használhatók a kapszula burok előállítására. A polimer membránok, melyek a BAO-t képezik és az azokban levő szaporodási felszínek közé tartoznak a poliakrilátok (ideértve az akril kopolimereket), a polivinilidének, a polivinil klorid kopolimerek, a poliuretánok, a polisztrének, a poliamidok, a cellulóz acetátok, a cellulóz nitrátok, a poliszulfonok, a polifoszfazének, a poliakrilonitrilek, a

poli(akrilonitril/kovinil klorid), valamint ezek származékai, kopolimerei és keverékei.

A BAO-kat a tudomány e területén ismert bármely módszerrel előállíthatjuk. Egy ilyen módszer magába foglalja egy polimer kiöntő oldat és egy koaguláns - biológiai szövet fragmenteket, szerveket, vagy sejtek és/vagy terápiás anyagok szuszpenzióját is magába foglalhatja - koextrúzióját, amint azt Dionne (WO 92/19195) valamint az 5,158,881, 5,283,187, és 5,284,761 számú US szabadalmak (melyek a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak) leírják.

A burkolat lehet egyrétegű (1-es, vagy 2-es típusú) vagy lehet kétrétegű (4-es típus). Egy egyrétegű üreges rost létrehozható úgy, hogy a koextrudáció során csökkentjük a polimer oldat egyik felszínét. A kétrétegű üreges rost úgy hozható létre, hogy a koextrudáció során a polimer oldat mindkét felszínét csökkentjük. Tipikusan az 1-es típusú üreges rost külső felszínének nagyobb százalékát borítják makropórusok a 4-es típusú üreges rosthoz képest. A 2-es típusú üreges rost egy köztes termék.

Számos kapszula konfiguráció ismert, mint például a hengeres, a korong alakú vagy a kerek.

A BAO burokja olyan pórus mérettel rendelkezik, mely a permszelektív membrán nominális molakulasúly határait (nMWCO) határozza meg. Az nMWCO-nál nagyobb molekulák fizikailag akadályozottak a membránon való áthaladásban. A nominális molakulasúly határokat a konvektív körülmények közötti 90%-os visszatartásként határozzuk meg. Az olyan esetekben, amikor a BAO immunoizolációs kell legyen a membrán pórus méretét úgy választjuk meg, hogy lehetővé tegye a sejtek által termelt

adott faktorok hordozóhoz való diffúzióját, azonban kizárja a gazda immun válasz faktorainak BAO-ba való bejutását. Tipikusan az nMWCO 50-200 kD közötti, előnyösen 90-150 kD közötti. A legmegfelelőbb membrán összetétel minimalizálja a gazda immun effektor molekuláinak (melyekről ismert, hogy az implantációs helyen jelen vannak) és a BAO kölső membrán komponenseinek kölcsönhatását.

A BAO magját úgy szerkesztjük meg, hogy egy megfelelő helyi környezetet biztosítson az abban izolált adott sejtek számára. A mag tartalmazhat egy folyadék tápközeget a sejtszaporodás fenntartásához. A folyadék magok különösen alkalmasak a transzformált sejt vonalak, mint például a PC12 sejtek fenntartásához. Másik lehetőségként a mag állhat egy gél mátrixból. A gél mátrix állhat egy hidrogélből (alginát, Vitrogen, stb) vagy extracelluláris mátrix komponensekből. Lásd például Dionne WO 92/19195.

A hidrogéleket létrehozó készítmények három általános osztályba sorolhatók. Az első osztály egy netto negatív töltést (például az alginát) hordoz. A második osztály egy netto pozitív töltést hordoz (például kollagén és laminin). A kereskedelemben beszerezhető extracelluláris mátrix komponensekre szolgáló példák közé tartoznak a Matrigel és a Vitrogen. A harmadik osztály egy netto semleges töltést hordoz (erősen keresztkötött polietilén oxid, vagy polivinil alkohol).

A BAO zárásának bármely megfelelő módszere alkalmazható ideértve a polimer adhézión és/vagy zsugorításos, csomózásos vagy hőzárásos módszereket. Ezek a zárási technikák ismertek a tudomány e területén. Ezenkívül bármely megfelelő "száraz" zárási módszer felhasználható. Az ilyen módszerekben egy

alapjában véve nem porózusos illesztést biztosítunk, melyen keresztül a sejteket tartalmazó oldatot bejuttatjuk. A töltés után a BAO-t zárjuk. Ilyen módszer került leírásra a 08/082407 számú US szabadalomban, mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak.

Egy vagy több in vitro vizsgálatot előnyösen felhasználunk a BAO funkcionalitásának létrehozására a in vivo implantáció előtt. A tudomány számára jól ismert vizsgálatok vagy diagnosztikai tesztek felhasználhatók ebből a célból. Lásd például *Methods in Enzymology*, Abelson [ed] Academic Press, 1993. Például az ELISA (enzim kötött immunoszorbens vizsgálat), kromatográfiás vagy enzimatikus vizsgálatok vagy a szekretált termékre specifikus biovizsgálatok is alkalmazhatók. Tetszés szerint egy implantum szekréciós funkciója nyomon követhető oly módon, hogy a megfelelő mintákat összegyűjtjük (például szérumot) a recipiensből és vizsgáljuk. Ha a recipiens főemlős mikrodialízis alkalmazható.

A BAO-k száma és a BAO-k mérete megfelelő kell legyen a terápiás hatás létrehozásához az implantáció során, ezt az adott alkalmazáshoz szükséges biológiailag aktív molekulák mennyisége révén határozzuk meg. terápiás anyagokat felszabadító szekréciós sejtek esetében standard dózis szempontok és a tudomány számára ismert kritériumok veendő figyelembe a kívánt szekréciós anyag mennyiségének meghatározása céljából. A figyelembe veendő faktorokat Dionne (WO 92/19195) írta le.

A BAO implantációját steril körülmények között végzik. Általában a BAO-t a gazdában olyan helyen helyezik el, ami megfelelő a szekretált termék vagy funkció gazdának való

biztosításához, valamint a tápanyagok bekapcsolódott sejtekhez vagy szövetekhez való eljuttatásához, ezenkívül lehetővé teszi a BAO visszanyerését és/vagy visszahelyezését. Az előnyben részesített gazda egy főemlős, legelőnyösebben egy ember.

Számos implantációs hely figyelembe vehető. Ezen implantációs helyek közé tartozik a központi ideg rendszer, ideértve az agyat, a gerincvelőt és a szem vizes és üvegszerű részeit. Az agyban előnyben részesített helyek közé tartozik a striatum, a cerebrális cortex, a szubthalamikus magok és a Meynert basális magjai. Az egyéb előnyben részesített helyek közé tartoznak a cerebrospinalis folyadék, leginkább a szubarachnoidális tér és a laterális ventrikulumok. A jelen találmány fontolóra veszi a vese szubkapszuláris helyre való implantációt is, valamint az intraperitoneális és szubkután helyeket, vagy bármely más terápiásan hasznos helyet.

A jelen találmány jobb megértése céljából a következőkben példákkal szemléltetjük a találmányt. A példák csupán illusztratív célúak és semmilyen módon nem szándékozzuk ezekkel a találmány körét korlátozni.

1. példa

Szaporodási szabályozás Mx1 promóter alkalmazásával

Az egér Mx1 promótert az SV40 korai régióval fuzionáltatjuk és a kiméra gént transzgenikus egerek létrehozására használjuk. Mivel az Mx1 promóter elemek IFN-alfa vagy IFN-beta jelenlétében indukálódnak, a transzgenikus állatokból előállított szövetekben vagy sejttenyészetekben az

onkogén expresszió szabályozható. Ily módon, feltételesen immortalizált sejtvonalak hozhatók létre.

Transzgenikus egerek létrehozása

Az általunk használt Mx1-Tag szerkezet körülbelül 2 kb hosszúságú Mx1 prmotert (azaz Xba1-EcoR1 ffragment) tartalmaz egy intakt SV40 korai régió cDNS-éhez fúzionálva, mely mind a nagy T és kis T antigéneket kódolja és az egér beta globin 3' nemtranszlált régiótól és a poli-A szignáltól (BamH1-Xba1 fragment) upstream fúzionálódik. A beta globin szekvenciákat azért vettük be, hogy hasítási helyeket biztosítsanak és fokozzák a cDNS transzgenikus állatokban való expresszióját. Az 1. ábra az Mx1 szerkezet plazmid térképét mutatja.

Az Mx1-tag szerkezetet magukba foglaló transzgenikus egereket az egysejtű megtermékenyített egér petesejtbe való pro-nukleáris mikroinjektálás standard technikájával állítjuk elő (Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, pp. 4438-4442, 1985). Az alapító állatokból származó szövetek Southern lenyomat analízise megerősíti, hogy a transzgén intakt kópiái beépültek a genomba.

Az ezen egerek utódairól az SV40 korai régiót felismerő PCR amplimerekkel megállapítjuk, hogy "DNS pozitívak".

Feltételezetten immortalizált törzs sejtek

Striatumot távolítunk el E15 transzgenikus egér embriókból és DNS negatív alom tagjaiból, és primer (individuális) sejt tenyészetbe szélesztjük EGF tartalmú neuroszféra tápközegben

(100 ml-enként 50 ml DDH₂O-t, 10 ml 10 x DMEM/F12-öt, 2,0 ml 30%-os glükózt, 1,5 ml NaHCO₃-at, 0,5 ml 1M-os HEPES-yt, 1,0 L-glutamint, 10 ml 10 x hormon keveréket, 25 ml DDH₂O-t (a szűrőmosásához) tartalmaz). A neuroszférákat Weiss módszerének (PCT CA 92/00283) és Reynolds and Weiss módszerének (J. Neuroscience, 12, pp. 4565-74, 1992) megfelelően készítjük el. A sejteket hetente hét alkalommal oltjuk át, majd két csoportra osztjuk: exogén interferon (IFN) nélkül és IFN-nel. A sejteket T25 lombikokba helyezzük a szélesztési sűrűség 500000 sejt/5 ml EGF tartalmú neuroszféra tápközeg. 1000 egység/ml IFN-t adunk a sejtek feléhez. A kontroll neuroszférák nem kapnak IFN-t. A sejteket 37 C° hőmérsékleten inkubáljuk 5% CO₂ alatt és hetente átoltjuk.

30 átoltás után (23 IFN-nel) a sejteket szérum tartalmú tápközegbe helyezzük (DMEM, 5% magzati borjú szérum, és 1 x L-glutamin 1000 egység IFN-nel 1,25 millió sejt/15 ml). A friss IFN-t minden másnap adjuk a tápközeghez.

Néhány nappal később a tápközeget eltávolítjuk a sejteket Hank-féle egyensúlyi sóoldattal mossuk (HBSS) és a lombikokat enyhén tripszinizáljuk. A sejteket 10 ml szérum tartalmú tápközegben reszuszpendáljuk, 1000 rpm fordulatszámon 2 perciûg centrifugáljuk és a tápközeget levegőztetéssel eltávolítjuk. Ekkor a sejteket 2 ml szérumos tápközegben reszuszpendáljuk triturálással egy tűzön fényesített (fire-polished) pipettával.

Megközelítően 25000 sejtet szélesztünk poli-ornitin kezelt fedőlemezekre DMEM-ben 5% FBS-sel. A fedőlemezek feléhez IFN-t adunk (1000 egység/ml) minden másnap. A sejteket SV40 T antigénre (Tag) és gliás fibrillás savas proteinre (GFAP) - egy köztes szálal fehérje, mely specifikusan asztrocitákban

expresszállódik kölönböző intervallumokban - festjük az alábbi eljárást alkalmazva.

A fedőlemezet 0,1 M-os foszfát pufferelt sóoldatban (PBS) levő 4% paraformaldehidbe merítjük 20 percre szobahőmérsékleten, majd kétszer 5 percig mossuk PBS-ben. A sejteket permeabilizáljuk 100% EtOH-ban 2 percig, majd ismét kétszer öt percig mossuk 0,1 M PBS-ben. A sejteket 0,1 M PBS-ben hígított 5% NGS-sel (normál kecske szérum) blokkoljuk legalább 30 percen keresztül szobahőmérsékleten. A primer antitesteket összegyűjtjük és 2 órán keresztül 1% NGS-sel hígítjuk, majd a fedőlemezekre adjuk szobahőmérsékleten az alábbiak szerint: anti-Tag-ot (egér monoklonális) 1:10 arányban hígítjuk, az anti-GFAP-t (nyúl poliklonális) 1:500 arányban hígítjuk. A primer antitesteket eltávolítjuk és a fedőlemezeket kétszer 5 percig PBS-sel mossuk.

A másodlagos antitesteket összegyűjtjük és 1% NGS-ben hígítjuk, majd 30 perig a fedőlemezekre helyezzük szobahőmérsékleten és sötétben a következők szerint: GAM-FITC (1:128); GAR-Texas Red (1:100 hígítás). A másodlagos antitesteket eltávolítjuk és a fedőlemezeket kétszer 5 percig PBS-sel mossuk sötétben.

A fedőlemezeket Citifluorral (vagy valami más tartós (anti-fadent) preparáló közeggel) tárgylemezekre helyezzük és 4 C° hőmérsékleten tároljuk egy fluoreszcensz mikroszkóppal való vizsgálatig (a mikroszkóp rodamin és fuoreszcein optikákkal van felszerelve).

Ezekben a kísérlet sorozatokban azt akarjuk meghatározni, hogy milyen gyorsan esik a T-antigén szintje az interferon eltávolítása mellett. Ezenkívül az is érdekelt bennünket, hogy

meghatározzuk a T-antigén szintjének hatását a sejt proliferációra és differenciálódásra.

A differenciálódást a GFAP szint nyomonkövetésével vizsgáljuk. A GFAP egy olyan köztes szálak protein, mely sepcifikusan az érett asztrocitákban expresszálódik. A következő fluoreszcensz eredményeket figyeltük meg.

Nap	IFN (1000 egység/ml)		Kontrol (IFN nélkül)	
	Tag	GFAP	Tag	GFAP
1	+++	-	+++	-
4	+++	-	+	+/-
7	+++	-	+/-	+/-
10	+++	-	-	+

Így, amint azt a Tag és GFAP immunofestéssel kimutattuk, a szérumos tápközegben eltöltött idő után az IFN-nel kezelt sejtek azt mutatják, hogy folytatják a T-antigén expresszálását, folytatják a proliferációt, nincs bizonyíték a GFAP expresszióra, míg a kontrollok (IFN nélkül) elkezdik a differenciálódást (a GFAP expresszió felfelé szabályozása) és csökken az osztódásuk. Ezt a fedőlemezek vizuális megfigyelése is alátámasztja -- egyértelmű különbség látható a 4. napon a sejtszámban. A 10. napra az IFN-kezelt sejtek sokkal nagyobb számban vannak, mint a kontroll sejtek.

Az SV40 T-antigén expressziója ebben a szerkezetben dózis-függő módon szabályozódik. A létrehozott sejtvonalakban maximális T-antigén expressziót (immunofluoreszcenciával mértük) figyelünk meg 500-1000 egység/ml IFN dózisonál. 100 egység/ml dózisonál minimális expressziót figyelünk meg. Amint

arra számítani lehet a proliferáció sebessége korrelációban van az IFN dózissal; 100 egység/ml IFN dózisonál vagy kicsi a sejt osztódás vagy nincs is.

A korábban leírt Mx1 Tag EGF-re reagáló neurális törzs sejtekkel leírt további vizsgálatokban kimutattuk, hogy a proliferáció és a differenciálódás szabályozható. Ezen törzs sejtek populációját differenciálódásra kényszerítjük az EGF eltávolításával és FBS hozzáadásával. 1000 egység/ml alfa/beta IFN hozzáadásával lapos, asztrocita-szerű sejtek csoportjai kezdenek proliferálni és végül megtöltik a tenyésztő edényt. 70 átoltáson keresztül ezeket a sejteket IFN-ben tartjuk fenn és 24-36 órás megkettőződési sebességet tartottunk fenn ebben az időszakban. Neurális és glia-specifikus antitestek paneljével végzett próbáztatás után ezek az IFN-kezelte sejtek láthatóan mind nesztin- és T-antigén pozitívak, azonban gyengeen immunoreaktívak glutaminszintetázra és GFAP negatívak.

Az IFN eltávolítása után ezen lapos sejtek osztódási sebessége gyorsan csökken, elveszítik T-antigén immunoreaktivitásukat és általában megnövekedik a glutaminszintetáz és GFAP immunoreaktivitásuk. Ezek a sejtek in vitro több hónapig életképesek maradnak és nincs nyilvánvaló proliferáció az IFN folyamatos hiánya mellett. Érdekes, hogy a T-antigén immunoreaktivitás és a sejt proliferáció újra indukálható IFN hozzáadásával. Ez egy olyan sejtvonalat biztosít, melynek proliferációja vagy differenciálódása szabályozott módon valósítható meg.

2. példa

Az 1. példa szerint előálított sejteket bekapszulázzuk és egy humán gazdába implantáljuk.

A PAN/PVC rostok előállítása

A permszelektív üreges rostokat egy száraz jet-nedves pörgetéses technikával (Cabasso, Hollow Fiber Membranes, vol. 12, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Wiley, New York, 3rd Ed., pp. 492-517, 1980; Dionne, WO 92/19195; 5,158,881 számú US szabadalom). Az aszimmetrikus üreges rostot kiöntjük a 12,5 % poliakrilonitril polivinil klorid (PAN/PVC) kopolimer dimetil szulfoxidban (w/w) levő oldatából. Egyrétegű vagy kétrétegű rostokat állítunk elő. A rostokat egy nem oldószeres víz-fürdőben gyűjtjük össze, glicerínáljuk és megszárítjuk. A sejteket 25000 sejt/ μ l sűrűségben töltjük a PAN/PVC egyrétegű üreges rostokba és hevítés mellett zárjuk.

A gazdába való implantáció

A bekapszulázott sejteket egy humán gazdába implantáljuk. Az implantációs helyek közé tartoznak a laterális ventrikulumok és az agy striátuma. A BAO-k agyba való implantációs eljárásait Aebischer et al., (WO 93/00127) írták le, mely a hivatkozás révén részét képezi a találmánynak.

3. példa

Neunatólis asztrociták feltételezett immortalizációja

Egy egér emlő tumor vírus (MMTV) promóter elemeit tartalmazó fragmentet fúzionálunk az SV40 korai régió cDNS-hez. Az E15 patkány agyból származó neonatális asztrocitákat elektroporációval transzfektáljuk és a transzformánsokat proliferációra való vizsgálattal szelektáljuk. Az osztódó sejteket eltávolítjuk, expandáljuk és a nagy T-antigén expressziójára vizsgáljuk, anti-nagy T antitesteket használva. A transzformált sejteket BAO-kba ágyazzuk és egy gazdába implantáljuk, alapjában véve a 2. példában leírtak szerint. A BAO-kat egy hónapon keresztül in vivo tartjuk. Ezután a BAO-kat kivesszük és a BAO-n belüli sejt eloszlást az in vitro ugyanilyen ideig fenntartott kontrollokhoz hasonlítjuk.

4. példa

Az SCT-1 sejtek kollagénnel csökkentett proliferációja és aszkorbáttal indukált differenciálódása

Az SCT-1 sejteket csípő ideg tumorból klónozzuk egy Po-SV40 transzgenikus egérből (Messing et al., j: Neuroscience, 14, pp. 3533-39, 1994). Ezek az SCT-1 sejtek immunoreaktívak az S100 és Po Schwann sejt markerekre, valamint az SV40 T-antigénre.

Az SCT-1 sejteket három körülmény alatt szaporítjuk: (1) szövettenyésztő műanyagon aszkorbát nélkül, (2) szövettenyésztő műanyagon 50 µg/ml aszkorbát jelenlétében a differenciálódás indukálása céljából, és (3) I-es típusú kollagénben szuszpendáljuk.

Egy műanyag szubsztráton aszkorbát hiányában a legtöbb sejt fibroblaszt-szerű morfológiával rendelkezik. Azonban

néhány bipoláris sejt is jelen van. A sejtek 18-20 óra alatt duplázódnak meg és nem mutatnak érintkezési gátlást.

Az aszkorbát jelenlétében szaporodó SCT-1 sejtek lassabb szaporodást és egy sokkal robosztusabb festődést mutatnak a fibrinektinre és a IV-es típusú kollagénre. A laminin immunoreaktivitás másrészt viszont hasonló a kontroll és az aszkorbáttal indukált differenciálódott tenyészetekben.

Az I-es típusú kollagénben szuszpendált SCT-1 sejtek bipoláros morfológiájúak és a mitotikus aktivitásban drámai csökkenést (azaz a megdúplázódási idő több mint 30 nap) mutatnak.

5. példa

A BHK sejt proliferáció gátlása aszkorbáttal és TGF-betával

A CNTF-et szekretáló BHK sejteket DMEM-ben (magas glükóz tartalmú) szaporítjuk. A szubkonfluens BHK tenyészetek kezelése TGF-beta1-gyel (2,5 ng/ml) és aszkorbáttal (100 μ M) csökkenti a mitózist. Ezenkívül a sejtek megnyúlnak és néhány sejt csoportosul. Ezek az adatok azt jelzik, hogy a TGF-beta és az aszkorbát gátolják a proliferációt és indukálják a BHK sejtek differenciálódását.

További kísérletekben a hNGF-et szekretáló BHK sejteket 2,5 ng/ml TGFbeta-val és 100 μ M aszkorbinsavval kezeljük a BAO-kba való beágyazás és az implantáció előtt. A nem kezelt sejtek szolgálnak kontrollként. A specifikus változók közé tartoznak a) a TGFbeta, Vitrogen nélkül; b) TGFbeta/aszkorbát, Vitrogen; c) TGFbeta/aszkorbát nélkül, Vitrogén és d) TGFbeta/aszkorbát és Vitrogén nélkül. Ezenkívül számos különböző polimert

használunk. A kapszulákat felnőtt patkányok striatumába implantáljuk. A patkányokat 3 hónap után elpusztítjuk.

6. példa

EGF jelenlétében proliferáló és EGF hiányában differenciálódó neurális törzs sejtek

A neuroszférákat a Weiss et al PCT/CA 92/00283 által leírt módszerekkel állítjuk elő. A 68-as átoltású neuroszférákat összegyűjtjük és szétosztjuk. A neuroszférák felét egysejtű szuszpenzióvá dörzsöljük szét a másik felét csomókban hagyjuk. Az egysejt számot egysejt szuszpenziót használva állapítjuk meg, azt feltételezzük, hogy a csomókban álló sejtek koncentrációja ugyanolyan. Az egyedüli sejteket és a sejtcsomókat külön szuszpendáljuk azonos mennyiségű Vitrogenben és vagy neuroszféra tápközegben 20 ng/ml EGF-fel kontrollként vagy PC-1 tápközegben.

A sejteket 25000 sejt/ μ l sűrűségben egyrétegű burkolattal ellátott üreges PAN/PVC BAO rostokba töltjük, melyeket alapjában véve a 2. példában leírtak szerint állítottunk elő. A BAO-kat vagy neuroszféra + EGF tápközegben vagy PC-1 tápközegben (EGF nélkül) tartjuk.

A BAO-kat 3 nap és 7 nap után felnyitjuk és a gliás fibrillás savas protein (GFAP) vizsgálatára megfestjük immunocitokémiával. A GFAP egy köztes filamentumos protein, mely specifikusan expresszálódik az asztrocitákban. A GFAP reaktivitás azt jelzi, hogy a neurális törzs sejtek asztrocitákká differenciálódtak. A következőket figyeltük meg:

Idő (nap)	GFAP reaktivitás
-----------	------------------

Egysejt, EGF nélkül	3	kis % + GFAP
Egysejt, EGF	3	negatív
Sejt csoportok, EGF nélkül	3	kis % + GFAP
Sejt csoportok, EGF	3	negatív
Egysejt, EGF nélkül	7	intenzív + GFAP
Egysejt, EGF	7	negatív
Sejt csoportok, EGF nélkül	7	intenzív + GFAP
Sejt csoportok, EGF	7	negatív

A 7. napra a bekapszulázott neurális törzs sejtek asztrocitákká differenciálódtak az EGF hiányában.

7. példa

Az ECM hatása a BHK sejtekre

Az acelluláris ECM előállítás

15 napos embrionális patkányokból nyert E15 patkány meningeális sejteket szélesztünk soküregű lemezekre és konfluenciáig hagyjuk szaporodni. A sejteket két hét múlva egyrétegűvé tesszük majd hagyjuk újra szaporodni.

Az acelluláris ECM-et 0,1% Triton X-100 detergenssel 30 percig tartó kezeléssel extraháljuk, majd 5 mM NH_4OH -val kezeljük 3 percig.

BHK-hNGF sejtek

Egy NGF-et szekretáló BHK sejt vonalat állítunk elő az alábbiak szerint. Egy első intron 3' végének körülbelül 37

bázispár hosszúságú részletét tartalmazó 2,51 kb fragmentet, egy a pre-pro-NGF protein transzlációs startjának vélt kettős ATG szekvenciát és a teljes kódoló szekvenciát, valamint a a humán NGF gén teljes 3' nem transzlált régióját (Hoyle et al., Neuron, 10, pp. 1019-34, 1993) a DHFR alapú pNUT expressziós vektorba szubklónozzuk közvetlenül az egér metallotionein 1 promótertől (-650 - +7) és a patkány inzulin II-es géntől (Beatge et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, pp. 5454-58, 1986) downstream irányban.

Baby hörcsög vese (BHK) sejteket transzfektálunk pNUT-betaNGF szerkezettel a kalcium foszfátos módszert alkalmazva. A BHK sejtek 10% magzati borjú szérumot, 1 x penicillin/sztreptomycin/ampicillin B keveréket (0,8 g/l) és L-glutamint (GIBCO) tartalmazó DMEM-ben szaporítjuk 5 % CO₂ alatt 37 °C hőmérsékleten. A transzfektált BHK sejteket 200 µM metotrexátot (Sigma) tartalmazó tápközegen szelektáljuk 3-4 héten keresztül és a rezisztens sejteket poliklonális populációként tartjuk fenn 200 µM metotrexáttal vagy metotrexát nélkül.

A transzformált BHK-hNGF sejteket $1,0 \times 10^4$ sejt/üreg sűrűségben meningeális sejtekből kivont ECM-et tartalmazó lemezekre szélesztjük. A BHK-hNGF sejteket ugyanilyen sűrűségben ECM-et nem tartalmazó kontroll lemezekre szélesztjük. A sejteket hemacitométert használva 6 DIV után megszámláljuk.

A kontroll üregek sejtszáma átlagosan $4,5 \times 10^6 \pm 4,5 \times 10^5$ sejt. Az extrahált ECM-et tartalmazó lemezek esetében az átlagos sejtszám $9,9 \times 10^5 \pm 4,9 \times 10^5$ sejt. Ezek az

eredmények azt mutatják, hogy a kezelt lemezeken a sejtszaporodás 4,5-szörösére csökken.

8. példa

A sejtek egy belső támasztékon levő acelluláris ECM-hez való adhéziója

További kísérletekben primer meningeális sejteket oltunk egy TECO poliuretán rostra. Az ilyen rostok BAO-k belső támasztékaiként kerülnek felhasználásra. 10% FBS-sel kiegészített DMEM tápközeget használunk tenyésztápközegként. Két hét elteltével a rostokat 0,1% Triton X-100-zal extraháljuk 30 percig, melyet 25 mM NH_4OH -val történő 3 perces extrahálás követ. Néhány rostot immunofestésnek vetünk alá antifibronektin antitesttel a rostban levő acelluláris ECM jelenlétének megerősítése céljából. Más rostokat a BHK sejtekkel végzett sejt adhéziós vizsgálatban alkalmazunk.

9. példa

A PEO-PDMS-sel módosított BAO-kba beágyazott mikrohordozókon történő BHK sejt szaporodás

A PEO-PDMS származtatott BAO-k előállítása

Az egyrétegű PAN/PVC üreges rostos BAO-kat a 2. példában leírtak szerint állítjuk elő. Ezek a BAO-k $642,6 \pm 36,7 \mu\text{m}$ ID értékkel, $787,8 \pm 32,2 \mu\text{m}$ OD értékkel $67,8 \pm 16,2 \mu\text{m}$ falvastagsággal és 100%-os BSA kilökődési koeficienssel és körülbelül $21,8 \text{ ml/perc/m}^2/\text{mmHg}$ hidraulikus permeabilitási értékkel rendelkeznek.

A PAN/PVC BAO-kat PEO-PDMS-sel származtatjuk steril körülmények között. A PEO-PDMS 1%-os vagy 5%-os (v/v) (Huls, PS073, MW=3126 g/mol; 82% PEO/súly) oldatát 1 ml vagy 5 ml PEO-PDMS 100 ml deionizált vízzel való hígításával állítjuk elő. Az oldatot sterilre szűrjük ($0,2 \mu\text{m}$) egy "nedves" PAN/PVC membránba való injektálás előtt. A membránt hevítéssel zárjuk és vizes oldatba merítjük. A rostokat Hank-féle pufferelt sóoldattal leöblítjük 72 óra elteltével és a sejtekkel való használat előtt.

A 7. példában leírtak szerinti NGF-szekretáló BHK sejteket PEO-PDMS származtatott rostokba töltjük az alábbiak szerint.

Töltési és zárási eljárás

A 90%-os konfluenciáig szaporított NGF-termelő BHK sejtek egysejt szuszpenzióját PBS-sel mossuk (ebből hiányzik a kalcium és a magnézium), körülbelül 1 percig tripszinizáljuk, majd centrifugálással (1000 rpm, 3 perc) pelletizáljuk. A sejteket a tápközegben reszuszpendáljuk így a végső sejt koncentráció $2 \times 10^7 \text{ sejt/ml}$.

A sejteket vagy közvetlenül a PEO-PDMS származtatott rostokba töltjük, vagy 0,15% Vitrogen mátrix oldattal vagy 0,5% agaróz oldattal keverjük és ezután töltjük be. Megközelítően

2,5 μ l sejtet vagy sejt/mátrix keveréket (10000 sejt/ μ l) töltünk az egyes rostokba egy 24-es méretű ferde katéter hegyet és egy Hamilton fecskendőt használva.

A kapszulákat úgy zárjuk le, hogy egy 1-1,1 cm hosszú száraz üreges rostot emelünk egy agyra egy szeptális rögzítéssel a proximális végen, mely töltési lehetőséget biztosít a beinjektálandó sejtek számára a készülék belsejébe. A 2,5 μ l celluláris szuszpenzió bejuttatása után a szeptumot lepattintjuk és a bejutási nyílást zárjuk egy fény-vulkanizáló akriláttal (Luxtrak LCM 24, ICI Resins US, Wilmington, MA) ("agy" zárás) A kapszulákat ezután "kipányvázzuk" egy 1,5 cm-es 0,020" szilasztikus csőbe való helyezéssel az akril agy fölött.

Ily módon a következő BAO-kat állítjuk elő:

1. kontroll nem származtatott burok, mátrix nélkül;
2. kontroll nem származtatott burok, Vitrogen mátrixszal;
3. kontroll nem származtatott burok, agaróz mátrixszal;
4. 1% PEO-PDMS származtatott burok, mátrix nélkül;
5. 1% PEO-PDMS származtatott burok, Vitrogen mátrixszal;
6. 1% PEO-PDMS származtatott burok, agaróz mátrixszal;
7. 5% PEO-PDMS származtatott burok, mátrix nélkül;
8. 5% PEO-PDMS származtatott burok, Vitrogen mátrixszal;
9. 5% PEO-PDMS származtatott burok, agaróz mátrixszal;

A BAO-kat környezeti O_2 értéken tartjuk 4 napig a bekapszulázás után, majd alacsony O_2 értéken tartjuk (50 mmHg) a vizsgálat hátralévő ideje alatt. A 2. ábra a 2., 11. és 25 napos NGF szekréciókat mutatja (ELISA módszerrel mértük).

Az NGF felszabadulási adatok azt jelzik, hogy maga a mátrix kis hatással van a sejtek termelésére. Azonban a PEO-

PDMS jelenlétében az NGF felszabadulás lényegesen alacsonyabb ha agarózt használunk mátrix nélkül, de ha Vitrogent használunk nem befolyásolódik. Ezenkívül a módosításban használt PEO-PDMS százalék nyilvánvalóan kis hatással van az NGF felszabadulásra. A hisztológiai adatok alapján az agarózba beágyazott BHK sejtek megnyúlt morfológiával rendelkeznek és a készülék falát borítják, azonban nagyon kevés sejt életképes magában az agarózban. A PEO-PDMS-sel módosított rostokba agarózzal töltött BHK sejtek szintén kibélelik a kapszula belső luminális felszínét, de kerek morfológiájúak. A PEO-PDMS-PAN/PVC módosított rostokban kevesebb sejt található, mint a nem módosított rostokban agarózzal, ami azt jelzi, hogy a sejt szaporodást sikerült szabályozni. A Vitrogénnel töltött készülékben levő sejteket nem módosította a rost módosítás, sem azokat a sejteket, melyeket mátrix nélkül kapszuláztunk be.

A nem módosított, Vitrogen mátrixot tartalmazó rostokban levő BHK sejtek jó eloszlást mutatnak, megközelítően 75%-os életképességgel. Volt egy csekély nekrosis a készülék belső részében. A PEO-PDMS módosítás nincs hatással a sejt megoszlásra, életképességre vagy morfológiára. Mátrixként agarózt használva a sejt eloszlás kiváló, a sejtek életképessége körülbelül 90%-os. A BHK sejtek morfológiáját a PEO-PDMS származtatott membrán (1% és 5%) agaróz mátrix használata mellett befolyásolja. A sejtek megnyúlnak a nem módosított P(AN/VC)-ban és sokkal kerekesebbek a módosított P(AN/VC)-ben. A sejtek nem az agaróz mátrixban helyezkednek el, hanem a rostok és agaróz szálak közötti térben. Mátrix nélkül a sejt eloszlás sokkal kevésbé kielégítő, mivel a sejtek nagy

csoportokat képeznek és az életképesség is alacsonyabb (megközelítően 60%-os).

10. példa

A BHK sejt szaporodás CultiSpherákon

A 7. példa szerint leírt NGF szekretáló BHK sejteket kollagén borítású CultiSpherákon szaporítjuk. A CultiSpherákat (1 g) 50 ml PBS-ben (CMF) rehidratáljuk. 15×10^6 sejtet szuszpendálunk 1 ml rehidratált CultiSpherában. A sejt/CultiSphera szuszpenziót közvetlenül egyrétegű PAN/PVC üreges rostokba töltjük vagy 1:1 arányban 1%-os agarózzal keverjük és ezután töltjük egyrétegű PAN/PVC üreges rostokba. A rostokat alapjában véve a 2. példában leírtak szerint állítjuk elő és alapjában véve a 9. példában leírtak szerint töltjük és zárjuk.

A bekapszulázott sejteket NGF termelésre teszteljük ELISA módszert használva 2., 15. és 56. napon. A tápközeget hetenként három alkalommal kiegészítjük. A 3. ábra mutatja az eredményeket. Az NGF felszabadulási adatok azt mutatják, hogy a BHK sejtek nőhetnek CultiSphera mikrohordozókon ha BAO-kba ágyazzuk ezeket (3. ábra, jelölés: n-mat-008, 0709-n-m). Ezenkívül, az NGF felszabadítási adatok azt is jelzik, hogy a BHK sejt/CultiSphera tovább szuszpendálható egy agaróz mátrixban az NGF szekrécióra kifejtett kis hatás mellett, vagy hatás nélkül (3. ábra; jelölés: agaro-008, agaro-0709).

11. példa

Egy peptid származék alkalmazása a sejtszám és sejt eloszlás szabályozására

Ebben a példában a BAO luminális felszínét PEO-PDMS-sel, poli(d-lizinnel) vagy PepTite 2000-rel módosítjuk, mely egy a kereskedelmekben beszerezhető adhéziós protein.

Ebben a vizsgálatban baby hörcsög vese (BHK) sejteket használunk, mivel ezek rögzítés függő sejtek és korábban kimutattuk, hogy üreges rostos membránhoz kötődnek.

Rostok

Egyrétegű PAN/PVS BAO-kat állítunk elő alapjában véve a 2. példában leírtak szerint. A rost dimenziói a következők: 625 μm fal vastagság. A rostokat 70%-os alkoholba való egy éjszakán át tartó merítéssel sterilizzük, majd ismételten HBSS-sel mossuk.

Származtatás

1. PDMS-PEO: A BAO-kat PDMS-PEO-val a következők szerint származtatjuk. Egy 1%-os PEO-PDMS oldatot (Huls-tól vásároltuk, PSO73, MW=3126 g/mol; 82% PEO/súly) állítunk elő 1 ml PEO-PDMS 100 ml deionizált vízzel való elegyítésével. Az oldatot szűréssel (0,2 μm) sterilizzük egy steril membránba való injektálás előtt. A membránt 1% PEO-PDMS vizes oldatba merítjük 24 órára szobahőmérsékleten. A rostokat vízzel mossuk (háromszor), majd HBSS-sel a sejtek injektálása előtt.

2. PdL:BAO-kat származtatunk poli(d-lizinnel) az alábbiak szerint. A rostokat 67000 molekulasúlyú poli(d-lizin) vizes oldatába merítjük 2 mg/ml koncentrációban 24 óráig szobahőmérsékleten. A rostokat háromszor mossuk vlzzel, majd háromszor HBSS-sel a sejtek injektálása előtt.

3. PepTite 2000: A BAO-kat PepTite 2000-rel az alábbiak szerint származtatjuk. A rostokat 100 mg/ml korábban etanolban feloldott PepTite 2000 PBS oldatába merítjük. A rostokat ebben az oldatban tartjuk 24 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd háromszor mossuk PBS-ben a sejtek injektálása előtt.

4. PAN/PVC: A kontroll rostokat HBSS-be merítjük 24 órán keresztül szobahőmérsékleten a sejtek injektálása előtt.

Sejtek

A BHK sejteket 5000 sejt/ μ l koncentrációban töltjük a származtatott rostokba. A rostokat zárjuk és egy csavaros kupakkal záródó kémcsőbe helyezzük, mely szérumentes tápközeget (PC1 tápközeget) tartalmaz, majd forgó dobra helyezzük két hétig terjedő időtartamra egy inkubációs készülékben 37 C° hőmérsékleten. A forgó dob forgási sebessége 2 rpm. A megfelelő időpontban a rostokat 4%-os paraformaldehidben rögzítjük (fixáljuk), etanol grádiensben dehidráljuk és hematoxilinnel és eozinnal (H&E) festjük a sejt eloszlás ozmium tetraoxidos hisztológiai analíziséhez.

A PAN/PVC származtatott membránok jó sejt eloszlást mutatnak ha poli(d-lizin)-nel származtatunk és egy sokkal

egyenletesebb eloszlást mutatnak ha PepTite 2000-rel származtatunk, ahogy azt az ozmium tetraoxidos festés kimutatja.

A PAN/PVC membránok, a PepTite 2000 módosításokat kétféleképpen kíséreltük meg elvégezni. Először a membránok belső luminális felszínét módosítjuk csak, és másodszor mind a belső luminális felszínt és a külső felszínt kezeljük. Az üres BAO-kat (azaz sejtmmentes BAO-k) teljes aminosavra analizáljuk a poli(d-lizin), vagy a PepTite 2000 kötődésének meghatározása céljából. A kontrol nem módosított membránokhoz való teljes aminosav kötődés megközelítően $0,2 \mu\text{g}/\text{BAO}$. A poli(d-lizin)-nel módosított membránokhoz kötődő teljes aminosav megközelítően $0,8 \mu\text{g}/\text{BAO}$ a módosított belső luminális membránok esetében és megközelítően $2,6 \mu\text{g}/\text{BAO}$ ha mind a belső luminális felszínt és a külső felszínt módosítottuk. BHK sejtekkel töltött hasonló BAO-kat tartunk fenn 14 napig, majd hisztológiailag vizsgáljuk. A kontrol, nem módosított BAO-kban a sejtek egyenetlenül nagy csoportokban helyezkednek el a rost teljes hosszában. Ezzel szemben mind a két típusú módosított rostban a sejtek egyenletesen oszlanak meg a membrán luminális felszíne mentén.

Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a poli(d-lizin) és a PepTite 2000 hatékonyak a sejtek BAO luminális felszínéhez való kapcsolódásának elősegítésében és így hatékonyab szabályozzák a sejtek eloszlását a BAO-n belül.

12. példa

ECM molekulák használata a neuroszférák szaporodásának szabályozásában

A 71-es átoltású neuroszférákat alapjában az 1. példa szerint állítjuk elő. Többüregű edényeket előburkolunk 0,5% agarózzal (Sea-Prep), hogy megakadályozzuk a neuroszférák műanyag edényekhez való kapcsolódását. A sejteket körülbelül 50000 sejt/üreg sűrűségben szélesztjük a tervezett mátrixokra a kísérletben. Az egyes mátrix körülmények esetében három üreget használunk; az üregek közül kettő PC-1 tápközeget (kontroll) és egy pedig neuroszférát + EGF tápközeget (EGF) tartalmaz.

Egy dermális eredetű 1-es típusú kollagént (Zydest, Collagen Biomedical, Palo Alto), egy tendon-eredetű 1-es típusú kollagént (Organogenesis), egy 1-es típusú kollagént (Vitrogen, Celtrix, Santa Clara) és agarózt használunk a sejt szaporodás szabályozásában elért hatékonyságuk meghatározására magukban, vagy lamininnel vagy PepTite 2000-rel vagy mindkettővel való kombinációban.

A 4. és 14. napon a sejteket fluoreszcein diacetát/propidium jodiddal (FDA/PI) való festéssel vizsgáljuk és a sejt életképességet, szaporodást és differenciálódást vizsgáljuk. Az Organogenesis kollagén PepTite 2000 és a laminin kombinációjának kitett sejtek mutatják a legnagyobb mértékű differenciálódást, körülbelül a sejtek 90%-a esett át differenciálódáson. Az agaróz peptid 2000 és laminin kombinációjának kitett sejtek körülbelül 80%-a differenciálódott.

13. példa

Egy inert állványzat alkalmazása a BAO-n belüli BHK sejtszám és sejt eloszlás szabályozására

Két PAN/PVC rost típust (alapjában véve a 2. példában leírtak szerinti) használunk: egy egyréteggel borított rostot, mely a külső felszínén permszelektív membránnal rendelkezik és egy egyréteggel borított rostot, mely a belső felszínén egy permszelektív membránnal rendelkezik.

Először PAN/PVC rostokat deglicerinizálunk és sterilizálunk 70%-os sterilre szűrt etanolban egy éjszakán keresztül. Ezután a rostokat steril vízzel öblítjük háromszor 1-2 órás időtartam alatt.

Ezután, 15%-os koncentrációjú poli(hidroxietil metakrilát) ("PHEMA") állványzat mátrixot készítünk oly módon, hogy 10 ml 95%-os etanolban (190 fokos, Quantum) feloldunk 1,5 g PHEMA-t. Ezenkívül egy 10% koncentrációjú poli(hidroxietil metakrilát-ko-metil metakrilát) ("PHEMA/MMA") állványzat mátrixot állítunk elő 1,0 g PHEMA/MMA 10 ml 95%-os etanolban való feloldásával. A polimerek még könnyebb feloldása céljából az oldatot keverjük és melegítjük.

A PHEMA vagy PHEMA/MMA oldatokat injekcióstűvel a PAN/PVC rostokba juttatjuk, melyeket ezután steril vízbe helyezünk. A megtöltött rostokat további 1 órán keresztül a vízben hagyjuk az állványzat precipitációjának biztosítása céljából, valamint az etanol magból való kidiffundálásának céljából. A rostok végeit levágjuk, mert ezek gyakran eltömődnek vagy PHEMA-val vagy PHEMA/MMA-val. A rostokat steril HBSS-t tartalmazó Petri csészékbe helyezzük. PHEMA-val, PHEMA/MMA-val töltött BAO-kat és a kontroll BAO-kat ily módon készítjük el.

NGF-et szekretáló BHK sejteket (a 7. példában kerülnek leírásra) hozzáadott glutamint és antibiotikumot tartalmazó 10% DMEM-ben szaporítjuk. A sejteket óvatosan eltávolítjuk a

lombikokból 0,25% tripszin segítségével, mossuk és PC1 tápközegekben reszuszpendáljuk az 1×10^7 sejt/ml sűrűség elérése céljából.

A BHK-NGF sejteket 10000 sejt/ μ l mennyiségben töltjük a rostokba egy 22-es méretű Teflon katéter segítségével. A BAO-kat hevítéses lecsipentéssel zárjuk.

Az egyes típusokból öt BAO-t készítünk. Négyet egy 1 ml PC-1 tápközegek tartalmú 24 üregű lemezre helyezünk. Az ötödiket körülbelül 3-4 ml PC-1-et tartalmazó vertikális kémcsőbe helyezzük. 24 óra elteltével a vertikális kémcsőbe helyezett BAO-kat kinyitjuk a lumen mentén (longitudinális kereszt szekció) és 24 óra múlva fluoreszcensz diacetát/propidium jodiddal (FDA/PI) való festéssel analizáljuk a roston belüli sejt eloszlásra. Egy fluoreszcensz mikroszkóp alatti megfigyelés során az FDA az élő sejteket zöldre és a PI a nem élő sejteket pirosra festi.

A maradék BAO-kat két héten keresztül tenyésztjük. A BAO-kat környezeti O_2 értéken tartjuk 4 napig a bekapszulázás után, majd alacsony O_2 szinteken (50 mmHg) a vizsgálat hátralevő ideje alatt.

A BHK-NGF sejtek működőképességét úgy teszteljük, hogy mérjük az NGF szekréciót (ELISA módszerrel) 4, 7 és 14 nap után. A sejt PHEMA vagy PHEMA/MMA állványzatot tartalmazó BAO-k a vizsgálat ideje alatt tovább folytatták az NGF szekréciót. A hisztológiai és az NGF adatok is azt jelzik, hogy a PHEMA és PHEMA/MMA állványzat lehetővé teszi a BAO-kban elosztatott, funkcionálisan aktív életképes sejtek fenntartását. A 10% PHEMA-MMA állványzatok a legjobbak.

14. példa

Egy inert állványzat alkalmazása a BAO-ban levő PC12 sejtszám és sejt eloszlás szabályozása céljából

A PHEMA és PHEMA/MMA inert állványzatok hatékonyságát felmérjük a PC12 BAO-ban való eloszlásának szabályozásában mutatott hatékonyságukra is.

Az egyrétegű borítású rostokat alapjában véve a 2. példában leírtak szerint állítjuk elő. Ezek a rostok tipikusan az alábbi tulajdonságokkal rendelkeznek: 642 μm ID, 787 μm OD, 68 μm falvastagság, 100%-os kilökődési koefficiens (BSA), 22 ml/perc/ m^2 /mmHg hidraulikus permeabilitás.

A PHEMA és PHEMA/MMA inert állványzatokat ezekben a rostokban állítjuk elő alapjában véve a 13. példában leírtak szerint.

HL-1 tápközegben levő PC12 sejteket (1×10^7 sejt/ml) injektálunk a rostok lumenébe és a rostokat hővel zárjuk körülbelül 1 cm hosszúságú BAO-k létrehozása céljából. Az eszközöket 37 C° hőmérsékleten tartjuk környezeti nyomáson HL-1 tápközegben. A beágyazott sejtek működésének felméréséhez a BAO-kat az alap és a K^+ -által kiváltott katekolamin felszabadításra vizsgáljuk 1, 14 és 28 nappal a beágyazás után. Az eredményeket a 4A és 5A (alap felszabadulás) és a 4B és 5B (K^+ -által kiváltott felszabadulás) ábrák mutatják. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az inert PHEMA és PHEMA/MMA állványzatot tartalmazó BAO-kba beágyazott PC12 sejtek megtartják működőképességüket, amint azt a katekolamin felszabaduláson keresztül mértük.

A sejtek BAO-n belüli eloszlását 5 óra és 4 nap elteltével mérjük a rostok vertikális félbevágásával és a sejtek FDA/PI festésével. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a PHEMA és PHEMA/MMA állványzatok nem toxikusak és segítik a PC12 sejtek életképességét és működőképességét.

15. példa

Egy NWPF alkalmazása a sejt adhézió és differenciálódás elősegítése céljából a BAO-ban

Hat típusú NWPF-et (Reemay, Tennessee) próbálunk ki: #2470, #2295, #2024, #2055, #2033, #2250 (Reemay #-ok). A kapott szövet lemez formában van; korongokat vágunk ki, hogy illeszkedjen a 24 üregű lemezekhez. Az NWPF korongokat 1% nátrium dódecil szulfátba (SDS) (w/v) merítjük 6 órán keresztül, majd 3-szor vízzel mossuk. Ezután a korongokat 1% kénsavba mártjuk (v/v H₂O-ban) 13 órán keresztül (egy éjszakán át), majd háromszor mossuk vízzel. A papír törülközőn megszárított korongokat ezután autoklávozással sterilezzük.

A korongokat 3 sejttípussal oltjuk be a sejt adhézió tesztelése céljából: BHK, AT-3 és TSA sejtekkel. Körülbelül 100000 sejtet adunk egy a fenti 6 NWPF korongok egyikét PC1 tápközegben tartalmazó 24 üregű lemezhez. Egy szérum mentes tápközeget használunk a sejtek adhéziójának tesztelése céljából a szérum következményei nélkül (a TSA sejteket kivéve). Négy nap után a BHK és az AT-3 sejtek adhézióját FDA/PI-vel vizsgáljuk. A sejtek megnyúlt morfológiával rendelkeznek és úgy tűnik, hogy a Reemay #2250 és 2055 NWPF-hez kapcsolódnak. 10 nap után a BHK sejtek szaporodnak legjobban a #2250 NWPF-en. Az

AT-3 sejtek legjobban a 2024-hez és a 2295-höz kapcsolódnak. Az AT-3 sejtek legjobban a 2024-en nőnek 10 nap után. A TSA sejtek (10% FCS-ben) 1 nap után megnyúlt morfológiával rendelkeznek amikor a #2250, #2055 NWPf-en nőnek és legjobban a #2024-en szaporodnak 7 nap után a TSA sejtek legjobban a #2055-ön szaporodnak.

16. példa

Mátrix anyagban szuszpendált mikrohordozókon levő SV40/DbetaH-NGF sejtek

A dopamin beta-hidroxiláz (DbetaH) gén (Hoyle et al., J. NeuroSci., 14, pp. 2455-63, 1994) szabályzó elemeit használjuk az SV40 T antigén (tsa58)(DbetaH-SV) és a humán növekedési faktor (DbetaH-hNGF) transzgenikus egerekben való koexpressziójának irányítására. A kiméra gén koexpressziója neoplazmákat eredményez a mellékvese velőállományban és a noradrenerg szimpatikus ganglionokban. Egy az ezen egerek egyikének ciliáris régiójából származó tumort felboncolunk és a tumor szövetet mechanikailag disszociáljuk és sejt tenyésztetbe (DMEM, 10% FBS, 37 C° , 5% CO₂) helyezzük. Két eltérő sejt típus - nagy lapos fibroblaszt-szerű sejtek és kis fázis-fényes sejtek extenzív neurit nyúlványokkal - van jelen a kezdeti tenyész periódusban. A kis sejtek katekolaminerg neuron tulajdonságokat mutatnak ideértve a neurofilament-L-lel és -M-mel és a tirozin hidroxilázzal szembeni immunoreaktivitást. Ezekben a sejtekben az SV40 T-antigénnel szembeni immunoreaktivitás is jelen van szemben a fibroblaszt-szerű

sejtekkel, melyek negatívak ezekre a markerekre. A sejteket hetente átoltjuk.

A sejteket egy CultisPers-en szaporítjuk a 10. példában leírtak szerint és vagy alginátban (1,5%) vagy agaróz (1%) mátrixban szuszpendáljuk. Az alginát mátrix esetében az alginátot kereszt kötésekkel látjuk el oly módon, hogy a készüléket 1%-os vizes kalcium klorid oldatba merítjük 5 percig a bekapszulázás után. A sejt/CultisPers/mátrix elegyet PAN/PVC üreges rostokba töltjük a 10. példában leírtak szerint.

A sejttel töltött BAO-kat egy szérum mentes tápközegben tartjuk fenn. Meghatározott időintervallumokban a készülékeket mossuk a HBSS-ben történő 30 perces inkubáljást megelőzően. Az alap tápközegét összegyűjtjük és HPLC-ED-vel L-dopára vizsgáljuk. A készülékek folytatják az L-dopa szekretálását 80, napon is in vitro.

17. példa

Genetikailag módosított mioblasztok NGF szekréciója differenciálódás után

Az egér C₂C₁₂ mioblaszt sejteknek megvan az az előnye, hogy gyorsan osztódó sejtek, i vitro nagy mennyiségben szaporíthatók, proteinek expresszálása céljából transzferálhatók, és a szelektált klónok izolálhatók. Az egér C₂C₁₂ sejtek post-mitotikus állapotba differenciálhatók alacsony szérum tartalmú tápközegnek való kitevésen keresztül. Ezek a sejtek így kedvezően ágyazhatók be azokhoz a sejtekhez képest, melyek proliferációja nem szabályozható -- ez utóbbi

sejtek addig folytatják osztódásukat, míg megtöltik a kapszulát és hulladék akkumuláció figyelhető meg több hónap elteltével.

A transzfektált C₂C₁₂ mioblaszt vonal azon képességét teszteljük, hogy folytatják-e a hNGF szekréciót miután a miotubulusokba való fúzió bekövetkezett.

C₂C₁₂ mioblaszt sejteket (ATCC) transzfektálunk egy hNGF génnel Lipofektamin reagenst használva a gyártók utasításának (Gibco) megfelelően. A sejteket 1 mg G418-cal szelektáljuk 2 héten keresztül, majd NGF termelésre teszteljük. A sejteket körülbelül 260 sejt/cm² sűrűségben oltjuk T75 lombikokba és fedővel ellátott vagy fedő nélküli 24 üregű lemezekre. A sejteket hetente kétszer DMEM-mel és 10% FBS-sel tápláljuk. A sejteket az 1., 5., 8., és a 13. napon gyűjtjük össze és ekkor az NGF szekréciót megmérjük. Az eredményeket a 2. táblázat mutatja.

2. táblázat

Az NGF szekréció C₂C₁₂ szkrínelésének időbeli lefolyása

Sejtvonal	Tenyészetben	%	%	NGF
	szekréció eltölt. idő	konfluencia	fúzió	
szülői	1 nap	25	0	nt
	3/23/95			
+NGF	1 nap	25	0	nt
	3/23/95			
szülői	5 nap	40	0	nt
+NGF	5 nap	30	0	nt
szülői	8 nap	98	5	***
+NGF	8 nap	90	1	0,0018
szülői	13 nap	1000	80	nd
+NGF	13 nap	100	50	0,014

% fúzió = miotubulusokká alakuló mioblaszt sejtek

"+NGF" = a hNGF génnel transzfektált C₂C₁₂ sejteket jelzi

"szülői" = nem transzfektált C₂C₁₂ sejteket jelent

az NGF szekréciót pg/ml/sejt/24 óra értékben fejezzük ki

nt = nem teszteltük

nd = nem detektáltuk

* 8 nap = a sejtek mérete nő, négy fúziót hoznak létre

* 8 nap = több a fúzió a tenyész edényekben mint a T lombikokban (áramlás citometriát végeztünk a lombikokkal)

Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a transzfektált mioblasztok tovább folytatják a kívánt heterológ termék szekretálását, azaz az NGF szekretálását a miotubulusokká való terminális differenciálódás után.

18. példa

A genetikailag módosított mioblasztok differenciálódás után CNTF-t szekretálnak

Az egér C₂C₁₂ mioblasztokat a humán CNTF gént tartalmazó pNUT expressziós vektorral transzfektáljuk (Baetge et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, pp. 5454-58, 1986). A hCNTF gén expressziójának szintjét és a faktor bioaktivitását Northern lenyomat technikával, ELISA vizsgálattal és embrionális gerincvelő motoneuron tenyészeteken végzett ChAT aktivitással analizáljuk. Azt találtuk, hogy egy C₂C₁₂ klón megközelítő szekréciója 0,2 g CNTF/10 sejt/nap. A hCNTF szekréció sebessége nem változik a C₂C₁₂ mioblasztok differenciálódásával. Végül a C₂C₁₂-hCNTF képes volt megmenteni a motoneuronokat az axotomia által indukált sejt pusztulástól. Az újszülöttek arc nukleuszainak morfológiai vizsgálata, az axotomia után egy héttel, azt jelzi, hogy az arc motoneuronok csupán 13,4 %-a maradt meg a kontroll állatokban, míg a hCNTF folyamatos felszabadulása a motoneuronok 22,7 %-ának túlélését eredményezte.

SZEKVENCIA LISTA

(1) ÁLTALÁNOS INFORMÁCIÓ:

(i) FELTALÁLÓ: CytoTherapeutics, Inc.

(ii) A TALÁLMÁNY CÍME: A MESTERSÉGES BIOLÓGIAI SZERVEKBE BEZÁRT SEJTEK SZAPORODÁSÁNAK SZABÁLYOZÁSÁRA SZOLGÁLÓ MÓDSZEREK ÉS KÉSZÍTMÉNYEK

(iii) A SZEKVENCIA SZÁMA: 4

(iv) LEVELEZÉSI CÍM:

- (A) CÍMZETT: James F. Haley, Jr., FISH & NEAVE
- (B) UTCA: 1251 Ave of Americas
- (C) VÁROS: New York
- (D) ÁLLAM: New York
- (E) ORSZÁG: USA
- (F) IRÁNYÍTÓSZÁM: 10020-1104

(iv) SZÁMÍTÓGÉPES LEOLVASÁSI FORMA:

- (A) HORDOZÓ TÍPUSA: Floppy lemez
- (B) SZÁMÍTÓGÉP: IBM PC kompatibilis
- (C) OPERÁCIÓS RENDSZER: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, #1.25 verz.

(vi) A JELEN TALÁLMÁNY ADATAI:

- (A) ALKALMAZÁSI SZÁM:
- (B) IKTATÁSI DÁTUM:
- (C) OSZTÁLYOZÁS:

(vii) ELSŐBBSÉGI ADATOK:

- (A) ALKALMAZÁSI SZÁM: US 08/279,773
- (B) IKTATÁSI DÁTUM: 1994 július 20.
- (C) ALKALMAZÁSI SZÁM: US 08/432,698
- (D) IKTATÁSI DÁTUM: 1995 május 9.

(viii) ÜGYVÉDI/IRODA ADATOK:

- (A) NÉV: Haley Jr. James F.

(B) REGISZTRÁCIÓS SZÁM: 27,794

(C) REFERENCIA/DOKUMENTUM SZÁM: CTI-22 CIP PCT

(ix) TELEKOMMUNIKÁCIÓS ADATOK:

(A) TELEFON: (212) 596-9000

(B) TELEFAX: (212) 596-9090

(2) AZ 1. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMEZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 9 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) **TOPOLÓGIA:** lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: peptid

(iii) HIPOTETIKUS: nincs

(iv) ANTI-SENSE: nincs

(xi) AZ 1. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Cys Asp Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg

1

5

(2) A 2. SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMEZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 6 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) **TOPOLÓGIA:** lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: peptid

(iii) HIPOTETIKUS: nincs

(iv) ANTI-SENSE: nincs

(xi) A 2. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Arg Gly Asp Ser Pro

1

5

(2) A 3. SZÁMÚ SZEKVENCIA AADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMEZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 19 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: peptid

(iii) HIPOTETIKUS: nincs

(iv) ANTI-SENSE: nincs

(xi) A 3. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val Ala Val Ser

1

5

10

15

Ala Asp Arg

(2) A 4. SZÁMÚ SZEKVENCIA AADATAI:

(i) A SZEKVENCIA JELLEMEZŐI:

(A) HOSSZÚSÁG: 5 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁLTÍPUS: egyszálú

(D) TOPOLOGIA: lineáris

(ii) A MOLEKULA TÍPUSA: peptid

(iii) HIPOTETIKUS: nincs

(iv) ANTI-SENSE: nincs

(xi) A 4. SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

Gly Gly Gly Gly Gly

1

5

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Egy mesterséges biológiai szerven belül a sejtek eloszlásának szabályozására szolgáló módszer azzal jellemezve, hogy a sejteket egy olyan kezelésnek vetjük alá, mely gátolja a sejtek szaporodását, vagy elősegíti a sejt differenciálódást, a kezelés a gazdába való in vivo implantációkor hatékonynak bizonyul.

2. Az 1. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a kezelés során a sejteket egy szabályozható promóterhez működőképesen kapcsolódó szaporodást elősegítő génnel transzformáljuk oly módon, hogy a proliferációt elősegítő gén expressziója a gazdába való in vivo implantáció során gátolható.

3. A 2. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a szaporodást elősegítő gén egy onkogént jelent.

4. Az 1. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a kezelés során a sejteket egy szabályozható promóterhez működőképesen kapcsolódó szaporodást szuppresszáló génnel transzformáljuk oly módon, hogy a proliferációt szuppresszáló gén expressziója a gazdába való in vivo implantáció során következik be de in vitro gátolni lehet.

5. A 4. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a proliferációt gátló gén egy a p53 gént és az RB gént magába foglaló csoportból szelektált tumor gátló gének közül szelektáljuk.

6. Az 1. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a kezelés során a sejteket egy szabályozható promóterhez működőképesen kapcsolódó differenciálódást indukáló génnel transzformáljuk oly módon, hogy a differenciálódást indukáló gén expressziója bekövetkezhet egy gazdába való in vivo implantáció során, azonban in vitro gátolható.

7. A 6. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a differenciálódást indukáló gént a nagy mobilitású csoport kromoszóma 14-es protein képviseli.

8. Az 1. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a kezelés során a sejteket egy proliferációt gátló vegyület hatásának, vagy egy differenciálódást indukáló vegyület hatásának kitesszük.

9. A 8. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a proliferációt gátló vegyületet, vagy a differenciálódást indukáló vegyületet a forbol észtert, a heparint, a TGF-betát, az aszkorbátot, a mitomycint, a BrdU-t, a PGE₁-et, a dbcAMP-t, az Ara-C-t, a nikotinamidot és az SPG-t magába foglaló csoportból szelektáljuk.

10. Az 1. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a kezelés során a sejteket a proliferációt stimuláló vegyület vagy a differenciálódást gátló vegyület hatása alól kivesszük.

11. A 10. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a proliferációt stimuláló vegyületet, vagy a differenciálódást gátló vegyületet az EGF-t, a TGF- α -t, és az amfiregulint magába foglaló csoportból szelektáljuk és a sejteket a neurális törzs sejtek képviselik.

12. Módszer a mesterséges biológiai szerven belüli sejtek eloszlásának szabályozására azzal jellemezve, hogy a mesterséges biológiai szerv legalább egy szaporodási felszínét egy olyan kezelésnek vetjük alá, mely a sejt szaporodást gátolja vagy a sejt differenciálódást elősegíti, a kezelés egy gazdába való in vivo implantáció során hatékonyak bizonyul.

13. A 12. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a kezelés során a szaporító felületet legalább egy extracelluáris mátrix molekula hatékony mennyiségével burkoljuk.

14. Az 1. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a kezelés során a sejteket egy hidrogél mátrixban szuszpendáljuk a mesterséges biológiai szerven belül a mátrix egy proliferációt-gátló vagy egy differenciálódást indukáló peptidből vagy peptid szekvenciából származik.

15. A 14. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a hidrogél mátrix egy RGD-tartalmú szekvenciát, (ArgGlyAsp; a 2. számú szekvencia AA₂-AA₄-e), egy YIGSR-tartalmú szekvenciát (TyrIleGlySerArg; az 1. számú szekvencia AA₅-AA₉-e) és egy IKVAV-tartalmú szekvenciát (IleLysValAlaVal; a 3. számú szekvencia AA₁₁-AA₁₅-e) magába foglaló csoportból szelektált peptiddel származtatott agarózt tartalmaz.

16. Az 1. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a kezelés során egy mikrohordozót a mesterséges biológiai szerven belül szuszpendálunk.

17. Módszer a mesterséges biológiai szerven belüli sejtek eloszlásának szabályozására azzal jellemezve, hogy a mesterséges biológiai szerv legalább egyik szaporító felszínét kitesszük egy olyan kezelés hatásának, mely a sejtek ezen felszínhez való kapcsolódását elősegíti.

18. A 17. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a kezelés az alábbiakból áll: egy vegyületet a szaporodási felülethez származtatjuk vagy adszorbeáltatjuk és a vegyületet a poli(d-lizin)-t, egy RGD-tartalmú szekvenciát, (ArgGlyAsp; a 2. számú szekvencia AA₂-AA₄-e), egy YIGSR-tartalmú szekvenciát (TyrIleGlySerArg; az 1. számú szekvencia AA₅-AA₉-e) és egy IKVAV-tartalmú szekvenciát (IleLysValAlaVal; a 3. számú szekvencia AA₁₁-AA₁₅-e) magába foglaló csoportból szelektáljuk.

19. A 17. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a kezelés a mesterséges biológiai szerven belül egy inert állványrendszer létrejöttét magába foglalja.

20. A 19. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az inert állványrendszert a poli(hidroxietilmetakrilát)-ot, és a poli(hidroxietilmetakrilát-ko-metilmetakrilát)-ot magába foglaló csoportból szelektált vegyületből létrehozzuk.

21. Módszer a mesterséges biológiai szerven belüli sejtek eloszlásának szabályozására azzal jellemezve, hogy a mesterséges biológiai szerv legalább egyik szaporító felszínét kitesszük egy olyan kezelés hatásának, mely a sejtek ezen felszínhez való kapcsolódását gátolja.

22. A 21. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a kezelés a PEO-PDMS szaporító felszínre való származtatását vagy adszorbeálását magába foglalja.

23. Az 1. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy a kezelés során a sejteket egy proliferációt gátló UV sugárzási dózis hatásának vetjük alá.

24. Egy mesterséges biológiai szerv azzal jellemezve, hogy

- (a) egy biokompatibilis, preszelektív burkot, és
- (b) élő sejtek egy magját foglalja magába, ahol a sejteket egy olyan kezelés hatásának tesszük ki, az 1. - 23. igénypont bármelyike szerint, hogy a mesterséges biológiai szerven belül

a sejtek eloszlása a gazdába való implantáció során szabályozhatóvá válik.

25. Egy rekombináns DNS molekulával transzformált sejt azzal jellemezve, hogy magába foglal

(a) egy az expresszió során sejt osztódást indukálni képes proliferációt elősegítő gént,

(b) egy a proliferációt elősegítő génhez működőképesen kapcsolódó Mx-1 promótert, ahol az említett sejt a szaporodásra indukálható ha interferon proliferációt elősegítő gén expressziójának eléréséhez elegendő mennyiségének hatása alá vetjük.

26. A 25. igénypont szerinti sejt azzal jellemezve, hogy a proliferációt elősegítő gént az SV40 nagy T antigénje képviseli.

27. Egy rekombináns DNS molekulával transzformált transzgenikus emlős azzal jellemezve, hogy

(a) egy az expresszió során a sejt osztódást indukálni képes preoliferációt elősegítő gént,

(b) és a proliferációt elősegítő génhez működőképesen kapcsolódó Mx-1 promótert magába foglal.

28. A 27. igénypont szerinti transzgenikus emlős azzal jellemezve, hogy a proliferációt elősegítő gént az SV40 nagy T antigén képviseli.

29. Utódok azzal jellemezve, hogy a 27. igénypont szerinti transzgenikus emlős leszármazottait jelentik.

30. Egy izolált sejt azzal jellemezve, hogy a 27. vagy a 29. igénypont szerinti transzgenikus emlősből izolált sejtet jelent.

31. Egy feltételesen halhatatlanná tett sejt létrehozására szolgáló módszer azzal jellemezve, hogy a következő lépéseket foglalja magába:

(a) egy sejtet egy olyan DNS molekulával transzformálunk, mely egy az expresszációkor a sejt osztódást indukálni képes proliferációt elősegítő gént és egy a proliferációs génhez működőképesen kapcsolódó Mx-1 promótert tartalmaz oly módon, hogy az említett transzformált sejt szaporodásra indukálható ha egy interferon olyan mennyiségének hatása alá vetjük, mely elegendő ahhoz, hogy a proliferációt elősegítő gén expreszióját eredményezze,

(b) az említett transzformált sejteket tenyésztjük.

A meghatalmazott

ifj. Szentpéteri Ádám

szabadalmi ügyvivő
az S.B. S. & K. Nemzetközi
Szabadalmi Iroda tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 34-24-950; Fax: 34-24-323

Beidek Tolaván