



76.203/ZSO

MESTERSÉGES ÉR TRANSZPLANTÁTUM VALAMINT ENNEK
LÉTREHOZÁSA ÉS ALKALMAZÁSA

KIVONAT

A jelen találmány mesterséges ér transzplantátumot, valamint ennek az előállítására szolgáló módszert biztosít. A mesterséges ér transzplantátum egy olyan szintetikus tubuláris elem, mely endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek sokaságával burkolt lumenális felszínnel rendelkezik, az említett sejteket genetikailag úgy transzformáltuk, hogy legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljanak.

jellemző a lra 9

Bevon



76.203/ZSO

MESTERSÉGES ÉR TRANSZPLANTÁTUM VALAMINT ENNEK LÉTREHOZÁSA ÉS ALKALMAZÁSA

Az alábbiakban ismertetjük a jelen találmány hátterét.

A jelen találmány mesterséges ér transzplantátumokkal kapcsolatos. Részletesebben, a jelen találmány olyan genetikailag transzformált sejtekkel és ezek előállításával kapcsolatos, melyek hasznosak a javított mesterséges ér transzplantátumok létrehozásában. A jelen találmány ezen kívül a mesterséges ér transzplantátumok érbetegségek terápiájában való használatával is kapcsolatos.

Az alábbiakban az érbetegségeket ismertetjük röviden.

Az érbetegségek a fejlett világ betegségeinek és elhalálozásainak jelentős okai közé tartoznak, és így a populáció nagy részét érintik. A bypass sebészeti beavatkozásban gyakran vénás, artériás vagy szintetikus cső transzplantátumokat használnak az ilyen betegségek klinikai következményeinek csökkentésére azáltal, hogy lehetővé teszik, vagy helyreállítják a véráramot egy blokkolt vagy sérült véredények környékén. Becslések szerint évente több, mint 1 millió ilyen eljárást



hajtának végre a fejlett országokban, és az ilyen beavatkozások 30-50 %-a 5-7 éven belül kudarcba fullad (1-4).

Az alábbiakban az artériás ér transzplantátumokat ismertetjük.

Az artériás ér transzplantátumok hosszútávon tartósabbak, mint a vénás vagy a szintetikus ér transzplantátumok (5). Ennek ellenére az artériás ér transzplantátumokat csupán korlátozott klinikai körülmények között lehet alkalmazni, például aorta-szívkoszorúér bypass sebészeti beavatkozáskor. Egyre fokozódik az igény a tartós, biológiai szempontból kompatibilis felszínnel rendelkező szintetikus ér transzplantátumok iránt, melyek meghosszabbított ideig használhatók fel. A kis átmérőjű ér transzplantátum iránti igény különösen nagy a femorális artéria alatti lézióknál és olyan betegek esetében, akik korlátozott számú természetes érrel rendelkeznek, mint például a visszeres vagy korábban bypass beavatkozáson átesett betegek (2, 3). A politetrafluoretilén (PTFE) és a szintetikus ér transzplantátumok egyéb anyagai nagy népszerűségnek örvendenek, mivel az anyag biokompatibilis és tartós. A szintetikus anyag módosítását írták le számos állatokkal végzett kísérletben és néhány humán vizsgálatban (5-10).

A szintetikus ér transzplantátumok funkciójának és tartósságának növeléséhez autológ endoteliális sejteket (EC) használtak az ér transzplantátum implantáció előtti beoltásához. Az endoteliális sejtek jobb biokompatibilis felszínt biztosítanak, és hozzájárulhatnak a trombózissal szembeni hosszú távú védelemhez trombolitikus kapacitásuk révén (11, 12). Ezen kívül, az EC borítás megakadályozhatja az ér transzplantátumban kialakuló neointimális proliferációt és a gyulladásos reakciókat (13). Azonban ezideig a random, nagyszámú vizsgálat nem bizonyította, hogy az EC-vel való beoltás javíthatja az ér transzplantátum tartósságát (8-10).

Az ér transzplantátum implantáció előtti beoltásához használt endoteliális sejteket tipikusan a zsírszövet rövid vénás szegmenseiből



gyűjtik össze. Egyéb forrásként szolgálhatnak a transzgénikus állatok sejtjei, melyek humán jellemzőkkel vagy az egyes betegből származó autológ EC-kel rendelkeznek. Egyéb lehetséges EC forrásként szolgálnak a perifériás vérből vagy a csontvelőből izolált őssejtek.

A mesterséges ér transzplantátum tervezés és előállítás területén új stratégiákkal kísérleteznek a humán érbetegségek kezelésében használt mesterséges ér transzplantátumok hatékonyságának tovább fejlesztéséhez. A mesterséges ér transzplantátum luminális felszínének teljes endotelializálása még mindig nagyon lassú, és ez komoly hatással van az ér transzplantátum használhatóságára. Ezért, kiemelt feladat az ér transzplantátum burkolásának javítása, és az ér transzplantátum mátrixához való sejt tapadás javítása. A korábbi kísérletek, ahol EC-t oltottak a szintetikus ér transzplantátumokra, nem tökéletes endotelializálást eredményeztek, valamint sejt leválást a véráram körülményeinek való kitevés hatására.

Az ér transzplantátum endotelializálás javítására irányuló egyik legújabb technika az ér transzplantátum olyan genetikailag transzformált sejtekkel való burkolását célozza meg, mely sejtek jobb proliferációs kapacitással rendelkeznek (lásd például az 5.785.965 számú US szabadalmi alkalmazást).

Az csontvelő őssejtek differenciálódásának fokozásához és a rövid és megbízható módszerekhez, melyekben a mesterséges ér transzplantátum készítményekben használható EC létrehozását célozzák, az ilyen sejteket tipikusan vasculáris endoteliális növekedési faktor (VEGF) expressziós vektorral transzformálják, melyek azután a sejtekben expresszálnak, és így fokozhatják az EC izolálás és szaporodás hatékonyságát. Így, a specifikus EC mitogének, mint a VEGF, alkalmazása lerövidítheti a sejtek összegyűjtésétől a beoltásig terjedő időszakot, és lehetővé teszi az alacsonyabb kezdeti ér transzplantátum



beoltási sűrűségek alkalmazását is, miután a VEGF által indukált gyors proliferáció gyorsabb ér transzplantátum burkoláshoz vezet.

Az endoteliális sejt proliferáció és migráció a VEGF receptorok aktiválásával indítható meg (16). Bár három VEGF receptort azonosítottak és jellemeztek, a KDR receptor játszik kulcs szerepet az angiogén átállásban, mely proliferációból és migrációból áll (16, 17).

A VEGF meghatározott előnyt biztosít az egyéb, kevésbé EC-specifikus növekedési faktorokkal szemben, melyek fokozhatják az ér transzplantátum endotelializációját, miután az csökkent hatással van az egyéb vasculáris sejtekre, különösen a simaizom sejtekre (SMC), és mint ilyen csökkentik a káros stimuláló hatások potenciálját. Így a mesterséges ér transzplantátumra oltott, genetikailag módosított sejtek által felszabadított VEGF szaporítja az EC-t, azonban az SMC-t nem az anasztomozisos helyektől.

Bár a genetikailag transzfektált, és VEGF-et túlexpresszáló EC képes a fokozott szaporodásra a nem transzformált EC-hez viszonyítva, az ilyen transzformált sejteket magába foglaló mesterséges ér transzplantátumok funkcionálisan korlátozottak, mivel az ér transzplantátum lumen felületét burkoló transzformált sejtek nem képesek ellenállni az implantációt követő áramlási erőknek.

Az UP50 egy olyan új protein, melyet ha felületek, például szövettenyésztő műanyagok burkolására használnak, úgy tűnt, fokozza az EC felszínekhez való tapadási képességét (51). Ez a protein hat kalcium-kötő EGF-szerű doménből áll, melyek közül az egyik egy Arg-Gly-Asp (RGD) motívumot foglal magába. Erről a motívumról tudott, hogy részt vesz az integrinek, például az EC-n expresszált integrinek, specifikus kötésében, és így részt vesz az EC sejt mátrixhoz és egyéb sejtekhez való adhéziónak közvetítésében (52). Például, az ezen RGD szekvenciát tartalmazó szintetikus peptidekről tudott, hogy antagonizálják



az integrin kötést, és ily módon gátolják az olyan folyamatokat, mint az angiogenezis vagy a trombózis (53).

Az epidermális növekedési faktor (EGF) szerű motívumot megtalálták az érfal különféle extracelluláris mátrix (ECM) proteinjeiben (54) és részt vesz a kalcium-kötésben számos, az érfalban jelen levő ECM proteinnel (55). Ez a motívum jelen van a vér koaguláció szabályzóiban, a kis sűrűségű lipoprotein receptorban, a TGF- β kötő proteinben és a Notch-ban és ligandumaiban, melyek részt vesznek a celluláris differenciálódásban (56).

Bemutatták, hogy az embrionális vasculáris EGF-szerű ismétlődést tartalmazó protein (EVEC), a huán UP50 patkány homológja, az embrionális angiogenezis alatt expresszálódik. Ezen protein embriogenezis alatti expressziójáról kimutatták, hogy elsősorban az artériás érrendszerben zajlik, főként a fejlődő artériák ér SMC-jében. Kifejlett egerekben ezen protein expressziójáról bemutatták, hogy lefelé szabályozódik, kivéve a méh artériáiban. Egy ballon-sérült patkány modellben a carotid artéria EVEC expresszió felfelé szabályozódott (57). Ezek az eredmények az UP50 egy lehetséges szerepét jelzik az EC-SMC kölcsönhatásokban, ECM érésben és szaporodás szabályozásban. Így, az UP50 olyan új, adherens molekula, mely vasculáris ligandumként használható az EC adhéziónak közvetítésében integrin receptorain keresztül, és elősegítheti a vasculáris fejlődést és újramodellezést. Azonban az EC, szintetikus ér transzplantátumok endotelializációjának elősegítésében szerep vállalásra képes ilyen adhézións faktorok expresszálását célzó, genetikai módosításának stratégiájára még nem tettek kísérletet.

Így széles körben elismert, hogy szükségesek, és igen előnyösek az olyan mesterséges ér transzplantátumok, melyek képesek támogatni a véráramlást az implantáció után, és ennek ellenére mentesek a fent említett, korábbi ér transzplantátumok korlátaiktól.



Az alábbiakban összefoglaljuk a jelen találmányt.

A jelen találmány egy aspektusa szerint egy olyan mesterséges ér transzplantátumot biztosítunk, mely olyan endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek sokaságával burkolt luminális felszínnel rendelkező szintetikus tubuláris elemmel rendelkezik, ahol a sejteket genetikailag úgy transzformáltuk, hogy legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljanak.

A jelen találmány egy másik aspektusa szerint módszert biztosítunk egy egyén érrendszere legalább egy részének helyettesítésére vagy „bypassolására”, mely módszer során az egyén érrendszerébe egy mesterséges ér transzplantátumot ültetünk be oly módon, hogy folyadék kommunikáció legyen az érrendszer és a mesterséges ér transzplantátum között, a mesterséges ér transzplantátum endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek sokaságával burkolt luminális felszínnel rendelkező szintetikus tubuláris elemmel rendelkezik, ahol a sejteket genetikailag úgy transzformáltuk, hogy legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljanak.

A jelen találmány egy megint más aspektusa szerint egy mesterséges ér transzplantátum előállítására szolgáló módszert biztosítunk, mely az alábbiakból áll: (a) genetikailag transzformálunk endoteliális sejteket és/vagy simaizom sejteket, hogy legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljanak, és (b) az endoteliális sejteket és/vagy simaizom sejteket oltjuk és szaporítjuk a luminális felszínnel rendelkező szintetikus tubuláris elembe, míg a luminális felszínen elegendő burkolást kapunk.

A jelen találmány előnyös kiviteli alakjainak egy további jellemzője szerint az endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek sokaságának első részét genetikailag úgy transzformáljuk, hogy legalább egy sejt



proliferációs növekedési faktort expresszálnak, és az endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek sokaságának második részét genetikailag úgy transzformáljuk, hogy legalább egy celluláris tapadási faktort expresszálnak.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint a luminális felszín az alábbi anyagok valamelyikéből áll: politetrafluoretilén (PTFE), expandált politetrafluoretilén (ePTFE), poliészter rostok, Dacron™, feldolgozott állati véredény vagy bármilyen mesterséges tartó anyag, melyet az ér transzplantátum gyártásához használnak.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint a szintetikus tubuláris elem egy olyan belső keresztmetszeti terület, mely lényegében megfelel egy véredény belső keresztmetszeti területének.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint a szintetikus tubuláris elem belső keresztmetszeti területe körülbelül 7 – 700 mm² értékek között van.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint az endoteliális sejtek sokasága az alábbi forrásokból származik: véna szegmensből, csontvelőből, perifériás vér össejtekből, vagy keringő endoteliális sejtekből.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint a simaizom sejtek sokasága az alábbi forrásokból származik: humán rózsáér vénákból, és bal belső emlő artériákból, csontvelőből, vagy perifériás vér össejtekből.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint az endoteliális sejtek és/vagy a simaizom sejtek sokasága a mesterséges ér transzplantátumot kapó alanyból származik.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint az endoteliális sejtek és/vagy a simaizom sejtek sokasága egy humán vagy egy állati donor embrionális vagy érett szöveteiből származik.



A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint az endoteliális sejtek sokasága a belső lumenális felszínen összefüggő monoréteget képez.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint legalább egy proliferációs növekedési faktort választunk az alábbiak közül: VEGF, savas vagy bázikus FGF, HGF és bármely endoteliális növekedési faktor.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint legalább egy celluláris tapadási faktor DANCE, UP50, vitronectin, albumin, I-es kollagén, IV-es kollagén, fibronectin és laminin, vagy bármely egyéb olyan molekula, mely képes elősegíteni a celluláris tapadást az ér transzplantátum anyagához.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint az endoteliális sejtek és/vagy a simaizom sejtek sokaságát a továbbiakban genetikailag úgy transzformáljuk, hogy legalább egy marker polipeptidet is expresszáljanak.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint egy olyan nukleinsav expressziós szerkezetet biztosítunk, ahol (a) az első polinukleotid szegmens egy sejt proliferációs növekedési faktort kódol; és (b) egy második polinukleotid szegmens egy celluláris tapadási faktort kódol.

A jelen találmány egy megint más aspektusa szerint olyan nukleinsav expressziós szerkezetet biztosítunk, ahol (a) az első nukleinsav expressziós szerkezet magába foglal egy első polinukleotid szegmenst, mely egy sejt proliferációs növekedési faktort kódol; és (b) egy második nukleinsav expressziós szerkezetet, mely magába foglal egy második polinukleotid szegmenst, mely egy celluláris tapadási faktort kódol.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint az első és a második nukleinsav expressziós szerkezetek továbbá magukba foglalnak

legalább egy további polinukleotid szegmenst, mely egy marker polipeptidet kódol.

A jelen találmány egy megint más aspektusa szerint egy olyan kitet biztosítunk, mely tartalmaz legalább egy cső tartására szolgáló állványt, a legalább egy cső magába foglal egy olyan nukleinsav expressziós szerkezetet, ahol (a) az első nukleinsav expressziós szerkezet magába foglal egy első polinukleotidot, mely egy sejt proliferációs növekedési faktort kódol; és (b) egy második nukleinsav expressziós szerkezetet, mely magába foglal egy második polinukleotidot, mely egy celluláris tapadási faktort kódol.

A jelen találmány egy megint más aspektusa szerint egy olyan kitet biztosítunk, mely tartalmaz legalább egy cső tartására szolgáló állványt, a legalább egy cső magába foglal egy olyan nukleinsav expressziós szerkezetet, ahol a nukleinsav expressziós szerkezet magába foglal (a) egy első polinukleotidot, mely egy sejt proliferációs növekedési faktort kódol; és (b) egy második polinukleotidot, mely egy celluláris tapadási faktort kódol.

A jelen találmány egy megint más aspektusa szerint egy genetikailag transzformált endoteliális sejtek és/vagy a simaizom sejtek létrehozására szolgáló módszert biztosítunk, melynek során (a) endoteliális sejteket és/vagy a simaizom sejteket nyerünk egy emlős szövet forrásból; és (b) az endoteliális sejteket úgy transzformáljuk, hogy legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktor expresszálnak egy időben vagy külön-külön.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint a nukleinsav expressziós szerkezet továbbá tartalmaz legalább egy promóter szekvenciát, mely az első és a második polinukleotid szegmens legalább egyike expressziójának irányítására szolgál.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint az első polinukleotid szegmens transzkripciósan kötődik a második polinukleotid



szegmenshez, mivel az első és a második polinukleotid szegmens legalább egy promóter szekvencia egyetlen promóter szekvenciájának transzkripció szabályozása alatt áll.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint a nukleinsav szerkezet továbbá magába foglal egy kötő szekvenciát, melyet az első és a második polinukleotid szegmensek közé helyezünk.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint a kötő szekvencia IRES és egy proteáz hasítási felismerő hely lehet.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint legalább egy promóter eukarióta sejtekben funkcióképes.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint legalább egy promóter konstitutív promóter, vagy indukálható promóter vagy egy szövet specifikus promóter lehet.

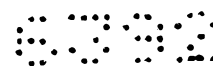
A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint a nukleinsav expressziós szerkezet továbbá tartalmaz még (c) egy első promóter szekvenciát, mely az első polinukleotid szegmens expressziójának irányítására szolgál; és (d) egy második promóter szekvenciát, mely a második polinukleotid szegmens expressziójának irányítására szolgál.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint az első promóter és a második promóter lehet konstitutív promóter, vagy indukálható promóter vagy egy szövet specifikus promóter.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint az indukálható promótereket ugyanaz az effector molekula szabályozhatja.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint a nukleinsav expressziós szerkezet tartalmaz még legalább egy további polinukleotid szegmenst, mely egy marker polipeptidet kódol.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint a marker polipeptid lehet szelekciós polipeptid vagy egy riporter polipeptid.



A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint a legalább egy polinukleotid szegmens transzkripciósan kötődik legalább egy első és egy második polinukleotid szegmens valamelyikéhez.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint legalább egy további polinukleotid szegmens transzkripciósan kötődik legalább egy első és egy második polinukleotid szegmens valamelyikéhez, egy kötő szegmenssen keresztül.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint a kötő szekvencia IRES és egy proteáz hasítási felismerő hely lehet.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint a legalább egy további polinukleotid szegmens transzlációsan fuzionál legalább egy első és egy második polinukleotid szegmens valamelyikéhez.

A jelen találmány egy megint más aspektusa szerint olyan transzformált endoteliális sejteket és/vagy a simaizom sejteket biztosítunk, melyeket genetikailag úgy transzformáljuk, hogy legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljanak.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint a transzformált endoteliális sejteket és/vagy a simaizom sejteket a továbbiakban genetikailag úgy transzformáljuk, hogy legalább egy marker polipeptidet is expresszáljanak.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint az endoteliális sejtek egy véna szegmensből, csontvelőből, perifériás vér őssejtekből vagy keringő endoteliális sejtekből származnak.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint az endoteliális sejtek vagy a simaizom sejtek humán vagy állati donor embrionális vagy érett szöveteiből származnak.

A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint a sejt proliferációs növekedési faktor VEGF, savas vagy bázisos FGF, HGF, vagy bármilyen egyéb endoteliális sejt növekedési faktor lehet.



A leírt előnyös kiviteli alakok további jellemzői szerint a celluláris tapadási faktor DANCE, UP50, vitronectin, albumin, I-es kollagén, IV-es kollagén, fibronectin és laminin, vagy bármely egyéb molekula lehet, mely képes az ér transzplantátum anyagához való celluláris tapadást fokozni.

A jelen találmány egy megint más aspektusa szerint, egy olyan mesterséges ér transzplantátumot biztosítunk, mely endoteliális sejtekkel és simaizom sejtekkel burkolt luminális felszínnel rendelkező szintetikus tubuláris elemet tartalmaz, az endoteliális sejtek és simaizom sejtek legalább egyikét genetikailag úgy transzformáltuk, hogy legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljon.

A jelen találmány egy megint más aspektusa szerint olyan módszert biztosítunk egy mesterséges ér transzplantátum előállításához, mely az alábbiakból áll: (a) endoteliális sejteket és simaizom sejteket biztosítunk, az endoteliális sejtek és simaizom sejtek legalább egyikét genetikailag úgy transzformáljuk, hogy UP50-et és VEGF-et expresszáljanak; és (b) ezt követően, vagy ezzel egy idejűleg az endoteliális sejteket és a simaizom sejteket a luminális felszínnel rendelkező szintetikus tubuláris elemen belül szaporítjuk, míg az endoteliális sejtek és a simaizom sejtek elegendő mértékben beburkolják a luminális felszínt.

A jelen találmány egy megint más aspektusa szerint olyan mesterséges ér transzplantátumot biztosítunk, mely endoteliális sejtek sokaságával burkolt luminális felszínnel és simaizom sejtek sokaságával burkolt külső felszínnel rendelkező szintetikus tubuláris elemet tartalmaz.

A jelen találmány előnyös kiviteli alakjai szerint az endoteliális sejtek sokaságát genetikailag úgy transzformáljuk, hogy legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljanak.



A jelen találmány előnyös kiviteli alakjai szerint a simaizom sejtek sokaságát genetikailag úgy transzformáljuk, hogy legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljanak.

A jelen találmány sikeresen kezeli a jelenleg ismert konfigurációk hibáit, amikor az érhelyettesítéshez vagy ér bypass eljáráshoz használható mesterséges ér transzplantátumot és ennek előállítására szolgáló módszert biztosít.

Az alábbiakban megadjuk a jelen találmányban szereplő rajzok rövid leírását.

A jelen találmányt a csatolt rajzokkal csupán a példa kedvéért írjuk le. A csatolt rajzokra való részletes hivatkozással azt hangsúlyozzuk, hogy a részletek csupán az előnyös kiviteli alakok példáiként és illusztratív céljaira szolgálnak, és azért adjuk meg ezeket, mert úgy véljük, a jelen találmány elmélete és fogalmi aspektusai így érthetőek meg a legjobban és legkönnyebben. Ebben a tekintetben nem szándékozunk a jelen találmány szerkezeti részleteit a jelen találmány alapvető megértéséhez szükségesnél részletesebben bemutatni. A tudomány e területén képzett szakember számára a rajzokból egyértelműen kiderül, hogyan lehet a jelen találmány különböző formáit a gyakorlatban megvalósítani.

Az 1. ábra a jelen találmány egy mesterséges ér transzplantátumának perspektívikus képét mutatja.

A 2. ábra egy folyamatábra, ami a jelen találmány hibrid biológiai-szintetikus ér transzplantátum megszerkesztésének stratégiáját mutatja be.

A 3a-b. ábrák a VEGF-GFP expressziójához való adenovirális és retrovirális sémát mutatja be (sorrendben 3a, és 3b ábrák).



A 4a-d. ábrák az Urine p50 protein (UP50) expressziójához való virális expressziós vektorok sematikus rajzát mutatják be. A 4a és a 4b. ábrák sorrendben az UP50 és az UP50-GFP expressziójához való adenovirális vektorokat, és a 4c. és 4d. ábrák sorrendben az UP50 és az UP50-GFP expressziójához való retrovirális vektorokat mutatják be.

Az 5a-b. ábrák a PTFE (politetrafluoretilén) ér transzplantátumok mikrofotóit mutatják be, a transzplantátumokat nukleáris célzott LacZ gént (5a. ábra) és VEGF és zöld fluoreszcensz protein (GFP) géneket (5b. ábra) kódoló rekombináns adenovirális vektorokkal fertőzött humán EC-vel oltottunk be.

A 6a-b. ábrák a PTFE (politetrafluoretilén) ér transzplantátumok mikrofotóit mutatják be, a transzplantátumokat nukleáris célzott LacZ gént (6a. ábra) és VEGF és zöld fluoreszcensz protein (GFP) géneket (6b. ábra) kódoló rekombináns retrovirális vektorokkal transzdukált humán EC-vel oltottunk be.

A 7a-d. ábrák az Ad.UP50-GFP-vel fertőzött EC (7a-b. ábrák) és SMC (7b-d. ábrák) mikrofotóit mutatják. A sejteket fény (7a. és 7c. ábrák) vagy fluoreszcensz mikroszkópiával (7b. és 7d. ábrák) tesszük láthatóvá.

A 8a-d. ábrák a retrovirálisan az UP50-GFP expressziójához transzdukált EC (8a. és 8b. ábrák) és SMC (8c. és 8d. ábrák) mikrofotóit mutatják. A sejteket fény (8a. és 8c. ábrák) vagy fluoreszcensz mikroszkópiával (8b. és 8d. ábrák) tesszük láthatóvá.

A 9a-b. ábrák az UP50 mRNS expresszió RT-PCR analízisének felvételeit mutatja be EC-ben és SMC-ben, melyeket adenovirálisan fertőztünk, hogy expresszálják az UP50-et (sorrendben 9a és 9b. ábrák). A 9a. ábrán a sávok a következők: 1. az UP50 DNS plazmid pozitív kontrollja; 2. a reverz transzkriptáz reakció negatív kontrollja; 3. a PCR reakció negatív kontrollja; 4. Ad.GFP fertőzött EC; 5. Ad.UP-GFP fertőzött EC; 6. nem fertőzött EC. A 9b. ábrán a sávok a következők: 1. pozitív kontroll plazmid UP50 cDNS; 2. a reverz transzkriptáz reakció negatív



kontrollja; 3. Ad.GFP fertőzött SMC; 4. Ad.UP50-GFP fertőzött SMC; 5. nem fertőzött SMC.

A 10a-b. ábrák az UP50 mRNS expresszió RT-PCR analízisének felvételeit mutatják be retrovirálisan transzdukált EC-ben és SMC-ben (sorrendben 10a. és 10b. ábrák). A 10a. ábra sávjai a következők: 1. Retro-GFP transzdukált EC; 2. az UP50-et expresszálására reterovirálisan fertőzött EC; 3. az UP50 DNS plazmid pozitív kontrollja. A 10b. ábra sávjai a következők: 1. marker; 2. nem transzdukált SMC; 3. retroGFP transzdukált SMC; 4. retro UP50-GFP transzdukált SMC.

A 11. ábra az UP50 expresszálására adenovirálisan fertőzött EC és SMC által történő UP50 protein expresszió Western immunolennyomat analízisének felvételét mutatja. A sávok a következők: 1. kontroll, nem fertőzött EC; 2. Ad.GFP fertőzött EC; 3. Ad.UP50-GFP fertőzött EC; 4. Ad.Ang1-GFP fertőzött EC; 5. kontroll, nem fertőzött SMC; 6. Ad.GFP fertőzött SMC; 7. Ad.UP50-GFP fertőzött SMC; 8. Ad.Ang1-GFP fertőzött SMC; 9. az UP50-GFP-t expresszáló 293-FLYA stabil transzformáns pozitív kontrollja.

A 12. ábra a retrovirálisan transzdukált EC és SMC UP50 protein expresszió Western immunolennyomat analízisének felvételét mutatja. A sávok a következők: 1. nem transzdukált EC; 2. retroGFP transzdukált EC; 3. retroUP50-GFP transzdukált EC; 4. nem transzdukált SMC; 5. retroGFP transzdukált SMC; 6. retroUP50-GFP transzdukált SMC; 7. az UP50-GFP-t expresszáló 293-FLYA stabil transzformáns pozitív kontrollja.

A 13a-d. ábrák az Ad.UP50-GFP-vel (13b. és 13d. ábrák) vagy kontroll plazmiddal (13a. és 13a. ábrák) fertőzött EC-ben (13a. ábra és 13b. ábra) és SMC-ben (13c. ábra és 13d. ábra) való UP50 felszíni expresszió immunohisztokémiai analízisének fluoreszcensz mikrofotóit mutatják be.



A 14a-c. ábrák fluoreszcens scanning konfokális mikrofotók, melyek Ad.UP50-nel fertőzött EC-t (14a. ábra) vagy Ad.UP50-GFP-vel fertőzött EC-t (14b. és 14c. ábrák) mutatnak be. A 14b. és 14c. ábrák sorrendben a sejt-sejt kontaktusban vagy anélkül szaporodó EC-ben levő UP50 festődését mutatják be. A zöld és vörös fluoreszcencia sorrendben a GFP és az UP50 festődését képviselik.

A 15. ábra egy az Ad.UP50-GFP-fel fertőzött EC-vel létrehozott ECM-ben levő UP50 protein immunohisztokémiai analízisét ábrázoló fluoreszcens mikrofotók.

A 16a-b. ábrák az adenovirálisan fertőzött EC és SMC közös tenyésztésével létrehozott VEGF és UP50 expresszió (sorrendben 16a. és 16b. ábrák) Western immunolenyomat analízisét mutatják be. A sávok a következőket jelentik: 1. Ad.VEGF-GFP-vel fertőzött EC + Ad.UP50-GFP-vel fertőzött EC; 2. Ad.Ang1-GFP-vel fertőzött EC + Ad.UP50-GFP-vel fertőzött EC; 3. Ad.VEGF-GFP-vel fertőzött EC + Ad.UP50-GFP fertőzött SMC; 4. Ad.VEGF-GFP-vel fertőzött EC + Ad.Ang1-GFP-vel fertőzött SMC; 5. az UP50-et expresszáló 293-FLYA stabil transzfektáns pozitív kontrollja.

A 17a-b. ábrák a retrovirálisan fertőzött EC és SMC közös tenyésztésével létrehozott VEGF és UP50 expresszió (sorrendben 17a. és 17b. ábrák) Western immunolenyomat analízisét mutatják be. A sávok a következőket jelentik: A 17a. ábrán: 1. retroUP50-GFP transzdukált EC + retroGFP transzdukált EC; 2. retroVEGF-GFP transzdukált EC + retroUP50-GFP transzdukált EC; 3. retroVEGF-GFP transzdukált EC; 4. retroUP50-GFP transzdukált EC; 5. retroGFP transzdukált EC; 6. EC kontroll; 7. retroUP50-GFP transzdukált SMC + retroVEGF-GFP transzdukált EC; 8. retroUP50-GFP transzdukált SMC + retroGFP transzdukált EC; 9. SMC kontroll; 10 rekombináns VEGF pozitív kontroll. A 17b ábrán: 1. SMC kontroll; 2. retroGFP transzdukált SMC; 3. retroUP50-GFP transzdukált SMC + retroVEGF-GFP transzdukált EC; 4.



retroUP50-GFP transzdukált SMC + retroGFP transzdukált EC; 5. retroUP50-GFP transzdukált SMC; 6. VEGF kontroll; 7. UP50 kontroll.

A 18. ábra az UP50-GFP-t, a VEGF-GFP-t vagy a GFP-t kódoló adenovirális vektorokkal fertőzött EC proliferációját bemutató hisztogramm.

A 19a-c. ábrák a retroGFP-vel transzdukált EC-ben (19a. ábra) és a retroUP-GFP-vel transzdukált, majd ezt követően Ad.GFP-vel vagy Ad.VEGF-GFP-vel fertőzött EC-ben levő (sorrendben 19b. és 19c. ábrák) GFP expressziót bemutató mikrofotók.

A 20a-b. ábrák a retroUP50-GFP-vel transzdukált, majd közvetlenül utána adenovirális vektorokkal fertőzött EC-ben levő VEGF és UP50 protein expressziók Western immunoblot analízisét bemutató felvételek (sorrendben 20a. és 20b. ábrák). A sávok jelentése a következő. 1. az UP50-et stabilan expresszáló 293-FLYA pozitív kontrollja; 2. nem fertőzött kontroll EC; 3. Ad.GFP fertőzött EC; 4. Ad.VEGF-GFP-vel fertőzött EC; 5. retroUP50-GFP-vel transzdukált EC; 6. retroUP50-GFP-vel transzdukált, és Ad.GFP-vel fertőzött EC; 7. retroUP50-GFP-vel transzdukált és Ad.VEGF-GFP-vel fertőzött EC; C. a rekombináns VEGF pozitív kontrollja.

A 21a-h. ábrák fény (21a., 21c., 21e. és 21g. ábrák) vagy fluoreszcensz (21b., 21d., 21f. és 21h. ábrák) mikrofotók, melyek az AdGFP-vel (21a-d. ábrák) vagy az Ad.UP50-GFP-vel (21e-h. ábrák) fertőzött EC háromdimenziós in vitro angiogenezisét mutatják 100 ng/ml VEGF hozzáadásával (21c., 21d., 21g. és 21h. ábrák) vagy anélkül (21a., 21b., 21e. és 21f. ábrák). Az egyes kísérleti csoportok reprezentatív vizsgálatait bemutatjuk.

A 22a-h. ábrák az Ad.GFP-vel (22a-d. ábrák) vagy Ad.UP50-GFP + Ad.GFP-vel (22e-h. ábrák) fertőzött EC háromdimenziós in vitro angiogenezisét bemutató fény (22a., 22c., 22e. és 22g. ábrák) vagy fluoreszcensz (22b., 22d., 22f. és 22h. ábrák) mikrofotók, Ad.VEGF-GFP-



vel fertőzött EC 50 %-os közös tenyésztésével (22c., 22d., 22g. és 22h. ábrák) vagy anélkül (22a., 22b., 22e. és 22f. ábrák). Az egyes kísérleti csoportok reprezentatív vizsgálatait bemutatjuk.

A 23. ábra az Ad.UP50 (mély vörös oszlop), Ad.GFP (kék oszlop) vagy nem fertőzött (sárga oszlop) EC adhézión vizsgálatát bemutató hisztogramm. Két különböző, három ismételtsben végzett kísérletet mutatunk be.

A 24. ábra az EC, UP50-et tartalmazó ECM-hez való adhézióját bemutató hisztogramm. Az eredményeket korrigált OD értékeként mutatjuk a háttér érték kivonása után.

A 25a-g. ábrák az UP50-et túlexpresszálo, folyamatos nyírási stressznek kitett EC adhéziónját mutatják. A random kiválasztott mezők a kontroll nem fertőzött (25a. és 25b. ábrák), a retroGFP-vel fertőzött (25c. és 25d. ábrák), és a retroUP50-nel fertőzött (25e. és 25f. ábrák) EC-t mutatják 24 órával a ráztatás előtt (25a., 25c. és 25e. ábrák) és a ráztatás után (25b., 25d. és 25f. ábrák). A 25h. ábra a ráztatás után 24 órával megmaradó sejtek számát mutató hisztogramm. A kísérlet elvégzése előtt, az egyes csoportokból (UP50-GFP, GFP, és kontroll) két-két üreget megszámolunk. Az eredményeket a megmaradt sejtszám ráztatás megkezdése előtti teljes sejtszámhoz viszonyított százalékaként fejezzük ki.

A 26. ábra az in vitro laminális áramlási körülmények közé helyezett sejtek retenciójának tesztelésére szolgáló jelen találmányban alkalmazott rendszer sematikus bemutatása.

A 27a-d. ábrák a jelen találmányban alkalmazott rendszer különböző komponenseinek bemutatására szolgálnak, mely módszer a laminális áramlási körülmények közé helyezett sejtek retenciójának in vitro tesztelésére szolgál. A 27a. ábra az áramlási rendszert tartalmazó szövet tenyésztő inkubátort mutatja be, a 27b. ábra a nyomás és áramlás

monitorokat, a 27c. ábra az adat gyűjtő rendszert és a pumpát, és a 27d. ábra az endoteliális sejt beoltó készüléket mutatja be.

A 28a-d. ábrák a GFP (28a. és 28b. ábrák) vagy az UP50-GFP (28c. és 28d. ábrák) expresszáására retrovirálisan transzdukált EC-vel beoltott, és laminális áramlási rendszerben pulzáló laminális áramlási körülmények alá helyezett ePTFE szintetikus ér transzplantátumok fluoreszcensz mikrofotóit mutatják.

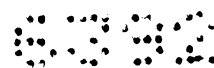
A 29. ábra egy genetikailag módosított humán EC-vel beoltott, és implantált ePTFE szintetikus ér transzplantátumot hordozó birka femorális artériát bemutató felvétel.

A 30a-b. ábrák a PTFE ér transzplantátum artériás anasztomózis sebészeti mezőjét, valamint a bal és jobb femorális artériába (sorrendben 30a. és 30b. ábrák) beültetett ér transzplantátum akadálymentességét bemutató angiogrammok.

A 31a-f. ábrák olyan fluoreszcensz mikrofotók, melyek az in vivo beültetett ér transzplantátumok luminális felszínén mutatkozó sejt retenciót mutatják be, ahol az ér transzplantátumokat a GFP (31a. és 31b. ábrák), a VEGF-GFP (31c. és 31d. ábrák) vagy az UP50-GFP (31e. és 31f. ábrák) expresszáására retrovirálisan transzdukált EC-vel oltjuk be. Két reprezentatív mezőt mutatunk be az egyes vizsgálati körülmények esetében.

Az alábbiakban bemutatjuk a jelen találmány előnyös kiviteli alakjait.

A jelen találmány egy olyan mesterséges ér transzplantátummal kapcsolatos, mely bypass károsodott és/vagy elzáródott véredények helyettesítésére használható, valamint ezen ér transzplantátum létrehozására és transzplantálására szolgáló módszerrel kapcsolatos. Specifikusan a jelen találmány emlős endoteliális sejtekkel burkolt szintetikus ér transzplantátumok létrehozására szolgáló módszerrel



kapcsolatos, mely ér transzplantátumok megvalósítható alternatívát jelentenek a jelenleg használt természetes és szintetikus ér transzplantátumokhoz.

A jelen találmány elméletei és kivitelezése jobban érthető a rajzokra és a csatolt leírásokra való hivatkozással.

A jelen találmány legalább egy kiviteli alakjának részletes leírása előtt, el kell fogadni, hogy a jelen találmány nem korlátozódik alkalmazásában a szerkesztés részleteire, és a következő leírásban megadott, vagy a rajzokban bemutatott komponensek elrendezésére. A jelen találmány megvalósítható más kiviteli alakokban, kivitelezhető vagy elvégezhető más módokon is. Azt is el kell fogadni, hogy a jelen találmányban használt kifejezések a jelen találmány leírását célozzák és nem tekinthetők korlátozó jellegűnek.

A mesterséges ér transzplantátumok széles körben felhasználhatók a sebészeti bypass eljárásokban. A jelenleg rendelkezésre álló mesterséges, vagy néhány természetes ér transzplantátumot sújtó korlátozások egyike az, hogy nem rendelkeznek hosszú élettartammal. Bár az endoteliális sejtek alkalmazása jelentősen fokozza a burkolt mesterséges ér transzplantátumok minőségét az általános teljesítmény javulása révén, valamint különösen a trombolitikus aktivitás javulása révén, az ilyen ér transzplantátumok tipikusan a vér áramlási erőinek következtében fellépő sejtburkolat elvesztésétől szenvednek, miután a burkoló sejtek nem képesek ellenállni az áramló vér által kiváltott nyírási erőknek.

Különböző kísérletet tettek az ér transzplantátum élettartamának növelésére. Az 5.785.965 számú US szabadalmi alkalmazásban a VEGF expresszálása céljából genetikailag transzformált endoteliális sejtekkel burkolt mesterséges ér transzplantátumot írtak le. Bár az ilyen sejtek jobb ér transzplantátum beoltási tulajdonságokkal rendelkeznek, amint azt az alábbiakban bemutatott példa részben leírjuk, a VEGF-et expresszáló



endoteliális sejtekkel beoltott ér transzplantátumok nem képesek tartósan ellenállni az áramló vér által kiváltott erőknek.

Az ér transzplantátum beoltási kísérletek közben a jelen találmány leírói felfedezték, hogy az endoteliális sejtek és/vagy a simaizom sejtek genetikailag transzformált populációja, melyek egy celluláris tapadási faktort, például az UP50-et közösen expresszálják, olyan celluláris növekedési faktorra együtt, mint a VEGF, vagy ha a genetikailag módosított endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek két alpopulációját összekeverjük – ahol az egyik a celluláris tapadási faktort, a másik pedig a növekedési faktort expresszálja – az előnyös a mesterséges ér transzplantátumok beoltásában való alkalmazáskor.

Amint az az alábbiakban megadott példák leírásában bemutatott eredményekből egyértelmű, egy celluláris tapadási faktor expressziója a sejtekkel beoltott ér transzplantátumban nem retardálja a sejt proliferációt, miközben jelentősen növeli az ilyen sejtek tapadását a mesterséges ér transzplantátum lumen felületéhez, és mint ilyen, jelentősen növeli az ér transzplantátum élettartamát. Ezen kívül, amint az egyértelmű a példa részben leírtak alapján, a celluláris tapadási faktor és a sejt proliferáció faktor együttes expressziója az ér transzplantátum lumen felületének olyan endoteliális sejtekkel való teljes beburkolásához vezet, melyek képesek ellenállni az áramló vér által kiváltott erőknek.

A korábbi ér transzplantátumokkal éles ellentétben, melyeket azért előkezeltek, hogy magukba foglaljanak egy celluláris tapadási faktort, például a fibronectint (35-37 és 39), egy celluláris tapadási faktor, például az UP50 expressziója ér transzplantátumra oltott sejtekből, egy olyan sejt proliferációs faktor, mint a VEGF, együttes expressziójával ezekből vagy más oltott sejtekből, lényegesen javítja a sejt-sejt és sejt-ér transzplantátum tapadást, és ez jelentősen javítja az ér transzplantátum élettartamát.



Ezen kívül, mivel a jelen találmány oltott sejtei által expresszált celluláris tapadási faktor(ok) a sejt-sejt és sejt-ér transzplantátum kölcsönhatásokat irányító extracelluláris mátrix részét képezik, az ilyen faktorok keringésbe való felszabadulása az ér transzplantátum implantálása után, minimalizálódik. Ezzel éles ellentétben, az ilyen faktorok beépülése az ér transzplantátum anyagába, amint az a korábbi ér transzplantátumokban megvalósul, az ilyen faktorok implantáció utáni keringésbe való felszabadulásához, és ezen faktorok gyors felhígulásához, és így az aktivitás elvesztéséhez vezethet.

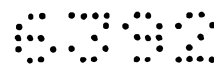
Az ér transzplantátum mobilizált tapadási faktorok ilyen felszabadulása szintén trombózishoz vezethet, mivel az ilyen faktorok aktivizálhatják a koagulációs rendszert és/vagy helyi gyulladást okoznak, melyek olyan folyamatok, amik lényegesen megrövidítik az ér transzplantátum életét és súlyosan kockáztatják a beteg egészségét.

Így a jelen találmány egy aspektusa szerint, és ahogy az 1. ábrán bemutattuk, egy olyan mesterséges ér transzplantátumot biztosítunk, melyre a későbbiekben 10 ér transzplantátumként hivatkozunk.

A 10 ér transzplantátum egy 12 szintetikus tubuláris elemet foglal magába, mely egy 14 luminális felszínnel rendelkezik. Előnyösen, a 12 szintetikus tubuláris elem egy körülbelül $7 - 700 \text{ mm}^2$ -es belső keresztmetszeti terület, vagy bármilyen keresztmetszeti terület, vagy átmérő, mely lényegében megegyezik a véredény belső keresztmetszeti területével, vagy átmérőjével.

A 14 luminális felszín az ezekre való korlátozás nélkül az alábbi anyagokból állíthatjuk elő: politetrafluoretilén (PTFE), expandált politetrafluoretilén (ePTFE), poliészter rostok, DacronTM, vagy lehet egy állatból vagy emberből származó feldolgozott véredény.

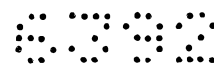
A 14 luminális felszín előnyösen gödröket és/vagy nyúlványokat jelentő szerkezeteket foglal magába, melyek elősegítik/fokozzák a sejtek ezekre való ráoltását.



Amint a példa szekcióban a későbbiekben bemutatjuk, a 14 luminális felszín 16 sejtek sokaságával burkoljuk, ideértve az endoteliális sejteket és/vagy a simaizom sejteket, melyek legalább egy részét genetikailag úgy transzformáltuk, hogy legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljanak.

Másik lehetőségként, a 14 luminális felszín burkolható endoteliális sejtekkel és adott esetben simaizom sejtekkel, melyek mindegyikét genetikailag úgy transzformáltuk, hogy legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljanak, miközben a 12 tubuláris elem 15 külső felszíne transzformált vagy nem transzformált simaizom sejtekkel burkolható. Egy ilyen konfiguráció lényegesen javíthatja az ér transzplantátum élettartamát és elfogadását.

A jelen találmány előnyös kiviteli alakjainak megfelelően a sejt proliferációs növekedési faktor például VEGF (AB021221 GenBank katalógusszám), savas vagy bázikus FGF (sorrendben S67291 és M27968 GenBank katalógusszámok), vagy HGF (D14012 GenBank katalógusszám), míg a celluláris tapadási faktor például az UP50 (1. számú szekvencia), DANCE (AF112152 GenBank katalógusszám), vitronectin (NM000638 GenBank katalógusszám), albumin (NM000477 GenBank katalógusszám), I-es kollagén (J00114 GenBank katalógusszám), IV-es kollagén (M15524 GenBank katalógusszám), fibronectin (X02761 GenBank katalógusszám), vagy laminin (NM005560 GenBank katalógusszám) lehet, vagy bármely egyéb molekula, mely képes elősegíteni az endoteliális sejtek/simaizom sejtek ér transzplantátum anyagához való tapadását. Az irodalmi hivatkozások szekcióban megadott 34-45 hivatkozások a továbbiakban olyan bizonyítékokként szolgálnak, melyek alátámasztják, hogy a fent említett



proliferációs növekedési faktorok és celluláris tapadási faktorok felhasználhatók a jelen találmány 10 ér transzplantátumában.

Előnyösen, amikor endoteliális sejteket és simaizom sejteket is használunk, a sejt proliferációs növekedési faktor specifikus az endoteliális sejtekre oly módon, hogy elkerüljük a simaizom sejtek nem kívánatos proliferációját.

A jelen találmány 10 ér transzplantátumának előállításához a 16 sejteket a 12 elemre oltjuk, vagy azon belül tenyésztjük, míg elérjük a 14 luminális felszín megfelelő mértékű burkolását. Előnyösen, a 16 sejteket olyan körülmények között tenyésztjük, melyek a 14 luminális felszínen egy összefüggő monoréteg kialakulásához vezetnek.

Számos beoltási eljárás használható a jelen találmány 10 ér transzplantátuma 14 luminális felszínének burkolására.

Azokban az esetekben, amikor endoteliális sejteket és simaizom sejteket is használunk, előnyös, ha a 14 luminális felszínt egymás után oltjuk be. Ilyen esetben, előnyösen transzformált vagy nem transzformált simaizom sejteket oltunk először, majd ezt követően transzformált endoteliális sejteket.

Másik lehetőségként a 10 ér transzplantátum beoltható transzformált simaizom sejtekkel, majd ezt követően beültethető a testbe és így lehetővé tesszük, hogy a keringő endoteliális sejtek beburkolják (endotelializálják) a 14 luminális felszínt.

Az is előnyös, ha a 16 sejteket sejt proliferációs növekedési faktorról és celluláris tapadási faktorról transzformáljuk, vagy másik lehetőségként az ilyen sejtek első részét a sejt proliferációs növekedési faktorról, míg ezen sejtek második részét a celluláris tapadási faktorról transzformáljuk.

A jelen találmányban használt endoteliális sejtek és simaizom sejtek származhatnak különböző emlős szövet forrásokból.



A jelen találmány egy előnyös kiviteli alakjának megfelelően, az endoteliális sejteket például egy véna szegmensből, csontvelő őssejtekből, perifériás vér őssejtekből, vagy keringő endoteliális sejtekből állítjuk elő.

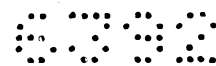
A jelen találmány egy másik előnyös kiviteli alakjának megfelelően, a simaizom sejteket például humán rózsaér vénákból, bal belső emlő artériákból, csontvelő őssejtekből vagy perifériás vér őssejtekből állítjuk elő.

Bármelyik esetben, a jelen találmány által használt sejteket tipikusan a 10 ér transzplantátum tervezett recipiense, vagy egy szingeneikus donor szöveteiből nyerjük ki.

Másik lehetőségként, xenogénikus szövet is felhasználható az ilyen sejtek kinyerésére, feltéve, hogy a 10 ér transzplantátum előállítása előtt vagy után megteesszük a szükséges lépéseket a sejt kilökődés elkerülése céljából. A kilökődés megelőzésére vagy csökkentésére szolgáló számos módszer ismert a tudomány e területén, ezért azt a továbbiakban nem részletezzük.

Amint azt a példa szekcióban, az alábbiakban részletesen leírjuk, a celluláris tapadási faktor egy celluláris növekedési faktor együttes expressziója képessé teszi a jelen találmány 10 ér transzplantátum 16 sejtjeit arra, hogy ellenálljanak az áramlási erőknek, ami normálisan a korábbi ér transzplantátumok luminális felszínéről a sejtek elvesztését eredményezné.

Így, a korábbi szintetikus ér transzplantátumoktól eltérően, a jelen találmány 10 ér transzplantátuma sikeresen felhasználható az érsebészeti eljárásokban, melyek a károsodott vagy elzáródott véredény helyettesítését vagy „bypassolását” célozza. Az ilyen eljárásokban a 10 ér transzplantátumot az egyén érrendszerébe implantáljuk oly módon, hogy folyadék kommunikáció jöjjön létre az érrendszer és a 10 ér transzplantátum között.



Amint korábban már említettük, a jelen találmány leírása szerinti transzformált endoteliális sejtek és/vagy a simaizom sejtek legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktort expresszálnak.

Az ilyen faktorokat kódolhatják a humán sejtekből vagy bármilyen egyéb emlős sejtekből származó szekvenciák, feltéve, hogy az expresszált faktorok funkcionálnak az endoteliális/simaizom sejtekben.

Az ilyen faktorok expresszálhatók a sejtekbe bejuttatott exogén polinukleotid szekvenciákból, vagy másik lehetőségként, az ilyen faktorok lehetnek a sejt által természetesen expresszált endogén faktorok, mely esetben a sejtet olyan szekvenciákkal transzformáljuk, melyek az endogén faktorok túlexpresszióját eredményezik.

A találmány szerinti használatban a „túlexpresszió” olyan expressziós szintekre utal, ami meghaladja a sejtben normálisan talált szinteket. A túlexpresszió megvalósítható oly módon, hogy egy endogén gén további kópiáit juttatjuk be a sejtbe, és így megnöveljük a sejtben expresszált endogén gén, vagy gének kópiaszámát, vagy enhancer szekvencia elemeket juttatunk be gén „knock-in” eljárásokkal, mely elemek felfelé szabályozzák az endogén gén transzkripcióját vagy translációját.

Az exogén polinukleotid szekvenciák előnyösen egy vagy több nukleinsav szerkezetet foglalnak magukba, melyeket a sejtek genetikai transzformálására használunk.

A jelen találmány szerinti használatban a „genetikai transzformálás” kifejezés exogén polinukleotid szekvenciák sejtbe való bejuttatására utal. Az ilyen szekvenciák integrálódhatnak a sejt genomjába, vagy másik lehetőségként az ilyen exogén szekvenciák átmeneti jelleggel létezhetnek a sejt sejtmagjában vagy citoplazmájában.

Így, a jelen találmány egy megint más aspektusa szerint olyan nukleinsav expressziós szerkezetet biztosítunk, mely hasznos a jelen



találmány 16 sejtjeinek létrehozásában. A szerkezet magába foglal egy első polinukleotid szegmenst, mely egy sejt proliferációs növekedési faktort kódol, valamint egy második polinukleotid szegmenst, mely egy celluláris tapadási faktort kódol.

A jelen találmány ezen aspektusa szerinti szerkezet magába foglalhat egy vagy több promóter szekvenciát is, melyek az első és a második polinukleotid szegmens expresszióját irányítják a transzformált sejtekben. Az ilyen promóter lehet bármilyen emlős funkcionális promóter, mely lehet konstitutív, szövet specifikus, vagy indukálható promóter.

Amint azt a továbbiakban, a példa szekcióban leírjuk, a sejt proliferációs növekedési faktor és a celluláris tapadási faktor előnyösen különböző időbeli mintákban expresszálódik.

Mint ilyen, a szerkezet két promóter szekvenciát foglal magába, melyek mindegyike egyetlen polinukleotid szegmens expresszióját irányítja. Előnyösen az ilyen promóterek indukálható promóterek, melyek ugyanazzal az effektor molekulával szabályozhatók. Előnyösen, a promóter szekvenciákat úgy választjuk meg, hogy az egyik promótert felfelé szabályozhatja egy effektor molekula, míg a második promótert lefelé szabályozhatja ugyanez az effektor molekula.

A megfelelő indukálható promóterek példái magukba foglalják, az ezekre való korlátozás nélkül a kémiai (effektor molekula) indukálható promótereket, például a Clontech-től a kereskedelemben beszerezhető Tet-On (TM) és a Tet-Off (TM) gén expressziós rendszerek által használt promótereket, vagy a nyírési stressz által indukált promótereket, mint amiket már leírtak (46-50).

Anélkül, hogy a fentieknek ellent mondanánk, előnyös az is, ha egyetlen promóter szekvenciát használ a jelen találmány szerkezete, feltéve, hogy az első és a második polinukleotid szegmensek transzkripcionálisan kötődnek és biztosítják, hogy a belső riboszóma



belépési hely (IRES) is rész vesz az átírt policisztomos üzenet második szegmense transzlációjának irányításában.

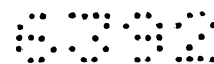
A jelen találmány ezen aspektusa szerinti szerkezet két polinukleotid szegmense transzlációsan fúzionált is lehet, feltéve, hogy egy proteáz hasítási helyet biztosítunk közöttük, ami lehetővé teszi az expresszázó sejtekben a két polipeptid hasítását és szeparálását.

Azt is előnyösnek tartjuk, ha a két polinukleotid szegmenst elkülönült nukleinsav szerkezetekbe helyezhetjük, melyek aztán közösen juttathatók be a sejtekbe.

Így a jelen találmány egy megint más aspektusa szerint a jelen találmány 16 sejtjeinek létrehozásában hasznos nukleinsav expressziós rendszert is biztosítunk. A jelen találmány ezen aspektusának szerkezet rendszere magába foglal egy első nukleinsav expressziós szerkezetet, mely magába foglalja a sejt proliferációs növekedési faktort kódoló első polinukleotid szegmenst, valamint egy második nukleinsav expressziós szerkezetet, mely magába foglalja a celluláris tapadási faktort kódoló második polinukleotid szegmenst.

A jelen találmány szerkezete vagy szerkezet rendszere előnyösen további polinukleotid szegmenseket is magába foglal, melyek marker géneket, szelekciós marker géneket és más hasonlókat kódolnak, hogy lehetővé tegyék a transzformált sejtek szelektálását és/vagy a sejt proliferációs növekedési faktor és/vagy a celluláris tapadási faktor expressziójának nyomon követését. A megfelelő riporter gének példái magukba foglalják az ezekre való korlátozás nélkül a beta-galaktózidázt, a luciferázt, a GFP-t és más hasonlókat. A szelekciós markerekre példák az antibiotikum rezisztencia gének és más hasonlóak.

Előnyös, hogyha a sejt proliferációs növekedési faktor és/vagy a celluláris tapadási faktor expressziójának nyomon követéséhez a riporter gént transzkripciósan vagy transzlációsan a faktort kódoló polinukleotid szegmenshez fúzionálva biztosítjuk, vagy egy olyan promóter szekvencia



transzkripció szabályozása alá is helyezhető, mely azonos a faktor transzkripcióját irányító szekvenciával.

Előnyös, ha a sejt proliferációs növekedési faktort és/vagy a celluláris tapadási faktort kódoló polinukleotid szegmensek egy a kereskedelemben beszerezhető expressziós vektor rendszerbe ligálhatók, mely alkalmas az emlős sejtek transzformálására és ezen faktorok transzformált sejteken belüli expressziójának irányítására. Az is előnyös, ha az ilyen kereskedelemben beszerezhető vektor rendszerek könnyen módosíthatók általában használatos rekombináns technikákkal, melynek során a meglevő promótereket és/vagy enhancer szekvenciákat helyettesítjük, duplikáltatjuk, vagy mutáltatjuk, és/vagy bármilyen további polinukleotid szekvenciákat juttatunk be.

A megfelelő emlős expressziós vektorok közé tartoznak az ezekre való korlátozás nélkül a pcDNS3, a pcDNS3,1(+/-), a pZeoSV2(+/-), a pSecTag2, a pDisplay, a pEF/myc/cyto, a pCMV/myc/cyto, a pCR3,1, melyek az Invitrogen-től szerezhetők be, a pCI, mely a Promega-tól, a pBK-RSV és pBK-CMV, melyek a Stratagen-től, és a pTRES, mely a Clontech-től szerezhető be, valamint ezek származékai.

Amint azt korábban már említettük, a jelen találmány transzformált sejtjei magukba foglalhatnak olyan exogén polinukleotid szekvenciákat is, amelyek az endogén módon kódolt faktorok túlexpresszáálásához vezetnek.

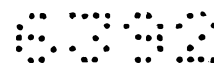
Így, a jelen találmány egy megint más aspektusának megfelelően, olyan nukleinsav szerkezetet, vagy szerkezet rendszert biztosítunk, mely az endogén módon kódolt faktorok expresszióját felfelé szabályozza. Egy ilyen szerkezet vagy szerkezet rendszer magába foglalhat transzkripció szabályzó szekvenciákat, melyeket, ha cisz pozícióban biztosítjuk a sejt proliferációs növekedési faktort és/vagy a celluláris tapadási faktort kódoló endogén szekvenciákhoz képest, felfelé szabályozhatják ezek transzkripcióját.



Másik lehetőségként, az ilyen szerkezet, vagy szerkezetek transzlációs szabályozó szekvenciákat is kódolhatnak, melyeket, ha transz pozícióban biztosítjuk a sejt proliferációs növekedési faktort és/vagy a celluláris tapadási faktort kódoló endogén szekvenciákhoz képest, felfelé szabályozhatják ezek transzkripcióját.

A standard gén „knock-in” technikák felhasználhatók arra, hogy ciszható transzkripció szabályzó szekvenciákat juttassanak be az endoteliális sejtek vagy simaizom sejtek genomjába. A gén „knock-in” technika áttekintéséhez lásd például az 5.487.992, az 5.646.764, az 5.387.742, az 5.360.735, az 5.347.075, az 5.298.422, az 5.288.846, az 5.221.778, az 5.175.385, az 5.175.384, az 5.175.383, a 4.736.866 számú US szabadalmi alkalmazásokat, valamint Burke and Olson, *Methods in Enzymology*, 194:251-270, 1991; Capecchi, *Science* 244:1288-1292, 1989; Davies et al., *Nucleic Acids Research*, 20(11) 2693-2698, 1992; Dickinson et al., *Human Molecular Genetics*, 2(8):1299-1302, 1993; Duff and Lincoln, „Insertation of a pathogenic mutation into a yeast artificial chromosome containing the human APP gene and expression in ES Cells”, *Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders*, 1995; Huxley et al., *Genomics*, 9:742-750, 1991; Jacobovits et al., *Nature*, 362:255-261, 1993; Lamb et al., *Nature Genetics*, 5:22-29, 1993; Pearson and Choi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90:10578-82; Rothstein, *Methods in Enzymology*, 194:281-301, 1991; Schedl et al., *Nature*, 362:258-261, 1993; Strauss et al., *Science*, 259:1904-1907, 1993; valamint a WO 94/23049, a WO93/14200, a WO 94/06908 és a WO94/28123 számú szabadalmi alkalmazások szintén biztosítanak információkat.

A jelen találmány nukleinsav szerkezetei bejuttathatók az endoteliális/simaizom sejtekbe bármilyen standard emlős transzformációs módszer segítségével. Az ilyen módszerek magukba foglalják, az ezekre való korlátozás nélkül, a közvetlen DNS felvételi technikákat és a vírus



vagy liposzóma által közvetített transzformációt (részletes ismertetéshez lásd például a „Methods in Enzymology” Vol. 1-317, Academic Press).

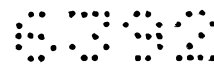
Így, a jelen találmány javított mesterséges ér transzplantátumot biztosít, melyet belülről olyan genetikailag transzformált sejtek burkolnak, melyek egy celluláris növekedési faktort és egy celluláris tapadási faktort expresszáló endoteliális és/vagy simaizom sejteket foglalnak magukba. A celluláris tapadási faktor celluláris növekedési faktoron túli expressziója lehetővé teszi, hogy a transzformált sejtek nagyobb erővel tapadjanak a mesterséges ér transzplantátum luminális felszínéhez, és így tartós celluláris burkolatot hozzanak létre, ami megnövelt időtartamon keresztül ellent tud állni az implantációt követően a mesterséges ér transzplantátum luminális felszínére gyakorolt áramlási erőknek.

A jelen találmány további céljai, előnyei és új tulajdonságai nyilvánvalóak lesznek a tudomány e területén képzett szakember számára a következőkben megadott példák tanulmányozása után, mely példákkal nem szándékoztuk a jelen találmány körét korlátozni. Ezen kívül, a jelen találmány különböző kiviteli alakjai és aspektusai a fenti leírások és a későbbiekben megadott igénypontok alapján kísérletesen alátámasztják a következőkben megadott példákat.

A következőkben példákkal mutatjuk be a jelen találmányt.

A következőkben megadjuk a példákra való hivatkozásokat, melyek a fentiekben megadott leírással együtt a jelen találmány illusztrálására és nem korlátozására szolgálnak.

Általában a jelen találmányban használt nomenklatúra és a jelen találmányban alkalmazott laboratóriumi eljárások molekuláris, biokémiai, mikrobiológiai és rekombináns DNS technikákat foglalnak magukba. Az ilyen technikákat alaposan megmagyarázzák az irodalomban. Példaként lásd a következőket: „Molecular Cloning: A Laboratory Manual” Sambrook et al., (1989); „Current Protocols in Molecular Biology” Vol I-III, Ausubel,



R, M., ed., (1994); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, „A Practical Guide to Molecular Cloning”, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., „Recombinant DNS” Scientific American Books, New York; Birren et al., (eds) „Genome Analysis: A Laboratory Manual Series” Vol.1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); módszerek, amiket például az alábbiakban írtak le: 4.666.828, 4.683.202, 4.801.531, 5.192.659 és 5.272.057 számú US szabadalmi alkalmazások; „Cell Biology: A Laboratory Handbook”, Vol. I-III, Cellis, J. E., ed (1994); „Current Protocols in Immunology” Vol. I-III, Coligan J.E., ed. (1994); Stites et al., (eds.), „Basic and Clinical Immunology” (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds.), „Selected Methods in Cellular immunology” W. H. Freeman and Co., New York (1980); a rendelkezésre álló immunvizsgálatokat alaposan leírták a szabadalmakban és a tudományos irodalomban, lásd például a 3.791.932, a 3.839.153, a 3.850.752, a 3.850.578, a 3.853.987, a 3.867.517, a 3.879.262, a 3.901.654, a 3.935.074, a 3.984.533, a 3.996.345, a 4.034.074, a 4.098.876, a 4.879.219, az 5.011.771 és az 5.281.521 számú US szabadalmi alkalmazásokban; „Oligonucleotid Synthesis” Gait, M.J. ed. (1984); „Nucleic Acid Hybridization” Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); „Transcription and Translation” Hames, B.D. and Higgins S. J., eds. (1984); „Animal Cell Culture” Freshney, R.I. ed. (1986); „Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986); „A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., (1984); és „Methods in Enzymology” Vol. 1-317, Academic Press; „PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., „Strategies for Protein Purification and Characterization – A Laboratory Course Manual” CSHL Press (1996); melyek mindegyike a hivatkozás révén teljes egészében részét képezi a találmánynak. Egyéb általános hivatkozásokat is megadunk a jelen leírásban. Az ezekben leírt eljárások,



úgy véljük jól ismertek a tudomány e területén, és a kényelem kedvéért adjuk meg az olvasónak. Az ezekben szereplő információk a hivatkozás révén részét képezik a találmánynak.

Bár a jelen találmányt ennek specifikus kiviteli alakjaival együtt írtuk le, egyértelmű, hogy számos alternatíva, módosítás és variáció lesz nyilvánvaló a tudomány e területén képzett szakember számára. Ennek megfelelően, szándékunk szerint az összes ilyen alternatíva, módosítás és variáció a csatolt igénypontok szellemébe és széles körébe tartozik. Az ezen specifikációban említett összes publikáció, szabadalom, szabadalmi alkalmazás és a katalógusszámokon megadott szekvencia a hivatkozás révén teljes egészében a jelen találmány részét képezi, olyan mértékben, mintha az egyes publikációk, szabadalmak, szabadalmi alkalmazások vagy katalógusszámon megadott szekvenciák esetében specifikusan és egyenként megemlégettük volna, hogy a hivatkozás révén részét képezik a jelen találmánynak. Ezen kívül, az idézések, vagy bármilyen a jelen találmányban szereplő referencia nem értelmezhető annak elismeréseként, hogy az ilyen hivatkozások elsőbbséget élveznek a jelen találmánnyal szemben.

1. példa

Az ér transzplantátumok létrehozásának stratégiája

A jelen találmány javított szintetikus ér transzplantátuma (1. ábra) előnyeinek demonstrálása céljából, szükség volt a vasculáris sejtek genetikai transzformációs stratégiájának létrehozására, valamint olyan kísérletek megtervezésére, melyek az itt leírt megközelítés kivitelezhetőségét bizonyítják. Ezért a 2. ábrán bemutatott folyamatábra leírja azokat a kísérleteket, melyeket a jelen találmány megnövelt élettartamú ér transzplantátumok létrehozására szolgáló módszereinek kapacitása demonstrálása céljából végzünk el.



2. példa

Az ér transzplantátumok genetikai módosítására szolgáló virális vektorok megszerkesztése

Két típusú virális vektort használunk a vasuláris sejtekbe való gén transzferáláshoz; az első egy nagy hatékonyságú rekombináns adenovirális rendszer, ami magas szintű transzgén expresszióhoz vezet. A rekombináns adenovirális készítmények azzal az előnnyel bírnak, hogy kevésbé komplexek, mint az egyéb vektorok, mint például az adeno-rokon vektorok (AAV) és a lentivirális alapú vektorok (21, 22), és más virális vektor rendszerektől el térően, az adenovirális vektorok felhasználhatók az ér transzplantátumok celluláris beoltása után is, mivel a sejt osztódás nem alapvető fontosságú a transzgén expresszióhoz. A másik alkalmazott vektor a GALV glikoproteinnel pszeudotipizált retrovirális vektor. Az ilyen pszeudotipizált vektorok nagy affinitást mutatnak a humán és a birka EC és SMC-vel szemben (23), és az adenovirális vektoroktól eltérően a retrovirális vektorokkal végzett transzdukció stabil transzgén expresszióhoz, és a leány sejtekben a gén expresszió transzmissziójához vezet.

Ennélfogva, virális vektorokat készítettünk a pro-endotelializálási faktorokat túlexpresszáló genetikailag módosított vasculáris sejtek előállításához, melyeket az ér transzplantátumok beoltásához használunk, amint azt az alábbiakban leírjuk.

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.

A LacZ gént kódoló rekombináns adenovirális vektorokat az alábbiak szerint hozzuk létre.

A bakteriális nukleáris-célzott β -galaktozidáz gén expressziójához való rekombináns adenovirális vektorokat több lépésben hozzuk létre,



melyek magukba foglalják a rutin prokarióta klónozást és a homológ rekombinációs eljárást a 293-sejtvonalban. Egy a bakteriális β -galaktozidáz gént (LacZ)(Clontech, CA, USA) tartalmazó 3700 bázispár hosszúságú HindIII-BamHI fragmentet a pCA3 plazmidba inzertáljuk a konstitutív expresszióhoz a CMV közvetlen-korai promóter szabályozása alatt. A kapott plazmidot a pJM17 plazmiddal ko-transzfectáljuk a 293 sejtekbe, melyek konstitutívan expresszálják az adenovirális E1 gént. A pJM17 plazmid tartalmazza az adenovírus genomot, kivéve az E3 régiót, és ideértve a vírus E1 régiójában egy inzeret (pBRX). A β -galaktozidáz kódoló pCA3 és a pJM17 közötti homológ rekombináció a transzfectió után a pJM17 E1 régióját a pCA3-ból származó CMV- β -galaktozidázra cseréli. A plakk képződés a ko-transzfectió után 2-4 héttel következik be, ami után az egyes plakkokat izoláljuk, és a virális extraktumokat amplifikáljuk belőlük a 293 sejtek fertőzésével. Az egyes vírus törzs oldatok titereit plakk vizsgálattal határozzuk meg 293 sejtekben és körülbelül 10^{10} pfu/ml vírus titert nyerünk. A transzfectánsok β -galaktozidáz expresszióját X-gal festéssel erősítjük meg.

A VEGF és GFP géneket kódoló rekombináns bicisztonos adenovirális vektorokat az alábbiak szerint hozzuk létre.

A VEGF₁₆₅-öt és a GFP géneket kódoló rekombináns adenovirális vektorokat hordozó vektorokba való rutin prokarióta klónozással szerkesztjük meg, amit 293 sejtekben való homológ rekombináció követ. A humán VEGF₁₆₅ cDNS-t (GenBank AB021221 katalógusszám) tartalmazó 600 bázispár hosszúságú BamHI fragmentet, ideértve a szekrécióhoz való jel szekvenciát (ami Dr. J. Abraham kedves ajándéka, Scios Nova, Mountain View, CA) a pQBI-CMV5-GFP (QBI, Canada) hordozó vektor BglII helyére inzertáljuk, és így létrehozuk a CMV5-VEGF₁₆₅-IRES-EGFP hordozó vektort (3a. ábra). A pQBI-CMV5-GFP expressziós plazmid magába foglalja az Ad5 genom egy bal karját (16%),



az E1 régióban egy deléción, ami egy hCMV5 inzertet tartalmaz. A CMV5-VEGF₁₆₅-IRES-EGFP hordozó vektort a pJM17 plazmiddal az E1 gént konstitutívan expresszáló 293 sejtekbe ko-transzfectáljuk. A pJM17 plazmid magába foglal egy adenovirális genomot, nem tartalmaz E3 régiót, és tartalmaz a vírus E1 régiójában egy inzertet (pBRX). A transzfectiót követő CMV5-VEGF₁₆₅-IRES-EGFP és a pJM17 közötti homológ rekombináció az E1 régiót és a pBRX inzertet a CMV5-VEGF₁₆₅-IRES-EGFP-ből származó expressziós kazettára cseréli. A plakk képződés a kotranszfectió után 2-4 héttel következik be, ami után az egyes plakkokat izoláljuk és a virális kivonatokat a 293 sejtek fertőzésével amplifikáljuk. Az egyes virális törzs oldatok titerét a 293 sejtekben végzett plakk vizsgálattal határozzuk meg, a titer körülbelül 10^{10} pfu/ml. A transzgen expressziót a fertőzött sejt-kondicionált tápközeg Western immunolennyomat analízisével erősítjük meg.

A humán VEGF-et és GFP-t kódoló pszeudotipizált retrovirális vektorokat az alábbiak szerint hozzuk létre.

A GFP és a humán VEGF₁₆₅ gént kódoló rekombináns retrovirális vektorokat a pLXSN plazmidba (#K1060-B, Clontech, USA) való klónozással szerkesztjük meg két lépésben. Az első lépésben egy VEGF₁₆₅-öt (GenBank AB021221 katalógusszám) kódoló 600 bázispár hosszúságú BamHI fragmentet inzertálunk a pIRES2-EGFP plazmid (#6029-1, Clontech) BamHI helyére. Másodszor egy a VEGF₁₆₅-öt, IRES-t és EGFP-t kódoló szekvenciákat tartalmazó 2,0 kB méretű EcoRI-MunI fragmentet klónozzunk a pLXSN plazmid EcoRI restrikciós helyére és így létrehozuk az LXSN-VEGF₁₆₅-IRES-EGFP vektort (3b. ábra). A retrovirális vektor létrehozásához 293E3 ekotróp csomagoló sejteket átmenetileg transzfectálunk LXSN-VEGF₁₆₅-EGFP-vel. 48 óra után a G418-rezisztens termelő sejtek konfluens tenyészetből származó felülúszót összegyűjtjük, szűrjük (0,45 μ m), majd PA317 amfotróp



csomagoló sejtek transzdukálására használjuk. A transzdukált PA317 sejteket G418 szelekció (300 mg/ml) mellett tenyésztjük és 48 óra múlva a felülúszót összegyűjtjük és a TEFLYGA csomagoló sejtek transzdukálására használjuk, melyek GALV köpeny glikoproteint expresszálnak, hogy pszeudotipizált vírust hozzunk létre, ami nagy hatékonysággal képes az EC-t és az SMC-t transzdukálni. A transzdukált TEFLYGA sejtek G418 szelekciója (400 µg/ml) után az egyedülálló telepeket összegyűjtjük és EGFP és VEGF₁₆₅ expresszióra szkríneljük. Az egyes telepek vírus titereit TE671 sejt transzdukcióval határozzuk meg, és azt találtuk, hogy 10^5 – 10^6 pfu/ml értékek között vannak. A legnagyobb titert eredményező telepeket szelektáljuk és a frissen összegyűjtött felülúszókat transzdukcióhoz használjuk.

Az alábbiakban bemutatjuk az UP50 gént kódoló rekombináns adenovirális vektorok létrehozását.

A humán UP50 gént expresszáló rekombináns adenovirális vektort (amit Y. Shaul-tól kaptunk, Weizmann Institute) a fent leírtak szerint szerkesztjük meg. A humán UP50 cDNS-t (1. számú szekvencia) tartalmazó 1361 bázispár hosszúságú BglII fragmentet a pCA3 plazmidba inzertáljuk. A transzgént tartalmazó pCA3 plazmidot pJM17 plazmiddal ko-transzfectáljuk 293 sejtekbe. Az expressziós plazmid és a pJM17 plazmid közötti homológ rekombináció, valamint azt ezt követő transzfectió az E1 régiót a pCA3 plazmidból származó expressziós kazettára cseréli, és így létrehozza a CMV5-UP50 hordozó vektort (4a. ábra). A plakk képződés 2-4 héttel a ko-transzfectió után következik be. Az egyedi plakkokat izoláljuk és a virális kivonatokat a 293 sejtek fertőzésével amplifikáljuk. A virális törzs oldatok titerei körülbelül 10^{11} pfu/ml értéket mutatnak. A transzgén expressziót a fertőzött sejt kondicionált tápközeg Western immunolenyomat analízisével határozzuk meg.



Az alábbiakban bemutatjuk az UP50 és a GFP géneket kódoló rekombináns adenovirális vektorok létrehozását.

A humán UP50 és GFP géneket közösen expresszáló rekombináns adenovirális vektorokat módosított AdEasy eljárással (28) hozzuk létre. Az UP50 cDNS 1361 bázispár hosszúságú BglII fragmentjét a pAdTrack-CMV hordozó vektor BglII helyére inzertáljuk a CMV promóter szabályozása alatt. A hordozó vektor egy további, a transzgéntől downstream irányban levő CMV promóter szabályozása alatt kódolja a GFP-t. Az inzertet tartalmazó hordozó vektort PmeI emésztéssel linearizáljuk és a Qiaquick gél extrakciós kittel (Qiagen, Germany) tisztítjuk. A kompetens BJ5183 sejteket inzertet tartalmazó hordozó vektorral és pAsEasy-1 plazmiddal ko-transzfectáljuk elektroporációval és az UP50-GFP-t kódoló, rekombináns adenovirális vektort tartalmazó pozitív klónokat (4b. ábra) PCR-ral szelektáljuk, majd restriktions térkép analízissel vizsgáljuk. A rekombináns adenovirális plazmidokat PacI emésztéssel linearizáljuk, tisztítjuk és 293 sejtekbe transfectáljuk Lipofectamine 2000-ret (Gibco BRL, USA) használva. A transfectió után 7 nappal, citopátiás hatás lép fel és azt találtuk, hogy a sejtek 100 %-a expresszálja a GFP-t. A sejteket összegyűjtjük, és a virális extraktumokat tovább amplifikáljuk 293 sejtekben. Az egyes virális törzs oldatok titerét sorozatos hígítási vizsgálattal meghatározzuk 293 sejtekben és a titereket körülbelül 10^{11} pfu/ml értékűnek találtuk. A transzgén expresszióját a fertőzött sejt kondicionált tápközeg Western immunolennyomat analízisével megerősítjük.

Az alábbiakban bemutatjuk az UP50 expressziójához vagy az UP50 és az EGFP ko-expressziójához való retrovirális vektorok megszerkesztését.

A humán UP50 gént kódoló LXS-UP50 rekombináns retrovirális vektort (4c. ábra) úgy szerkesztjük meg, hogy a humán UP50 cDNS 1361

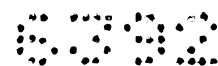


bázispár hosszúságú BglII fragmentjét a pLXSN plazmid (#K1060-B, Clontech, USA) BamHI helyére inzertáljuk a Mo-MULV 5' hosszú terminális ismétlődés (LTR) szabályozása alatt.

Az UP50 és EGFP géneket kódoló bicisztronos rekombináns retrovirális vektort két lépésben klónozzuk a pLXSN plazmidba. Az első lépésben egy a pIRES-EGFP plazmidból (Clontech, #6029-1) kimetszett 1400 bázispár hosszúságú IRES-EGFP EcoRI-HpaI fragmentet inzertálunk az EcoRI-HpaI emésztett pLXSN plazmidba a pLXSN-IRES-EGFP kontroll plazmid létrehozása céljából. A második lépés a pLXSN-UP50-IRES-EGFP (4d. ábra) plazmid megszerkesztéséből áll, melynek során a humán UP50 EcoRI fragmentet (1361 bázispár) a pLXSN-IRES-EGFP plazmid EcoRI helyére klónozzuk. A gén expressziót ezekben a szerkezetekben a Mo-MULV 5' hosszú terminális ismétlődés (LTR) szabályozza.

Az alábbiakban leírjuk az UP50-et kódoló pszeudotipizált rekombináns retrovirális vektorok létrehozását.

A retrovirális vektor létrehozáshoz a pLXSN-UP50-EGFP vektort vagy a pLXSN-UP50 vektort 293FLYA csomagoló sejtekbe transzfektáljuk Lipofectamine-t (Gibco BRL, USA) használva. 48 óra után a virális termelő sejtek konfluens tenyészetek felülúszóját összegyűjtjük, szűrjük (0,45 μ m) és hozzáadjuk 293FLY10A vagy a 293 FLYGALV csomagoló sejtekhez. A transzdukált sejteket G418 szelekció mellett (400 μ g/ml) tenyésztjük és az egyedi telepeket összegyűjtjük és EGFP expresszióra szkrínéljük invertált fluoreszcensz mikroszkópot használva, és UP50 expresszióra szkrínéljük a transzdukált sejt kondicionált tápközeg Western immunolenyomat analízisével. Az egyes telepek vírus titerét a TE671 sejtek transzdukálásával határozzuk meg, és a titereket körülbelül 10^6 pfu/ml értékűnek találtuk. A legmagasabb



titerekkel rendelkező telepekből származó felülúszót frissen összegyűjtjük az EC és SMC transzdukálásához.

Az alábbi eredményeket kaptuk.

A virális vektor létrehozásának eredményei a következők: Az I. táblázatban felsorolt vektorokat az UP50 és a VEGF₁₆₅ génekkel végzett EC és SMC transzferálásához használjuk. A 3a., 4a. és 4b. ábrák az adenovirális VEGF₁₆₅-GFP, az UP50 és az UP50-GFP expressziós vektorokat mutatják be, melyeket megszerkesztettünk, és a 3b., 4c. és 4d. ábrák a retrovirális VEGF₁₆₅-GFP, UP50 és UP50-GFP expressziós szerkezeteket mutatják, a jelen találmánynak megfelelően.

I. táblázat

Virális rendszer	Csomagoló sejtvonala	Kódolt gén(ek)	Jelölés	Titer
Adenovírus		GFP	Ad.GFP	10 ¹⁰ pfu/ml
Adenovírus		VEGF-IRES-GFP	Ad.VEGF-GFP	10 ¹⁰ pfu/ml
Adenovírus		UP50-GFP	Ad.UP50-GFP	5 x 10 ¹⁰ pfu/ml
Adenovírus		UP50	Ad.UP50	Függő
Pszidotipizált retrovírus	TEFLYGA	GFP	RetroGFP	10 ⁶ ffu
Pszidotipizált retrovírus	TEFLYGA	VEGF-IRES-GFP	RetroVEGF-GFP	5 x 10 ⁵ ffu
Pszidotipizált retrovírus	293FLYGA	UP50-IRES-GFP	RetroUP50-GFP	10 ⁶ ffu
Pszidotipizált retrovírus	293FLYGA10A	UP50-IRES-GFP	RetroUP-GFP	10 ⁶ ffu
Pszidotipizált retrovírus	293FLYGA	UP50	RetroUP50	10 ⁶ ffu



3. példa

A pro-endotelializáló faktorok expressziója mesterséges ér transzplantátumok beoltására használt vasculáris sejtekben

Egyre fokozódik az igény a biokompatibilis felszínekkel rendelkező és nagy krónikus akadálymentességi arányokkal rendelkező szintetikus ér transzplantátumok iránt. A szintetikus PTFE ér transzplantátumok nagy népszerűségnek örvendenek anyaguk biokompatibilitásának és tartósságának köszönhetően. A szintetikus ér transzplantátumok tartóssága és alkalmassága fokozható, ha luminális felszínüket EC-vel burkoljuk. Az ilyen sejtek optimális biokompatibilis felszín hoznak létre, hosszútávú védelmet biztosítanak a trombózissal szemben trombolitikus kapacitásuknak köszönhetően (11, 12) és megakadályozzák a neointimális proliferációt és a gyulladásos reakciókat a szintetikus ér transzplantátumokban (13).

A beoltott mesterséges ér transzplantátumok endotelializálása optimalizálásához való hatékony megközelítés során pro-endotelializálási faktorokat túlexpresszáló, genetikailag módosított vasculáris sejteket használunk. Ennélfogva, a vasculáris sejteket úgy módosítjuk genetikailag, hogy túlexpresszálják az ilyen faktorokat, ahogy azt az alábbiakban leírjuk, azért, hogy gyorsítsuk a vasculáris ér transzplantátumok beoltását és maximalizáljuk a ráoltott sejtek, implantáció utáni proliferációját, ami a szintetikus ér transzplantátum luminális felszínének vasculáris sejtekkel való maximális burkolásához vezet.

Az alábbiakban bemutatjuk a primer humán vasculáris sejtek szövettenyésztését.

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.



Humán rózsáér véna EC-t (HSVEC) gyűjtünk humán rózsáér véna 5 cm hosszú vénás szegmenseiből, kollagenázos emésztés segítségével, a korábban leírtaknak megfelelően (29). Izolált HSVEC-et tenyésztünk, 20 % összegyűjtött humán szérummal, 2 mM L-glutaminnal (Biological Industries, Israel), 100 egység/ml penicillinnel (Biological Industries, Israel), 0,1 mg/ml sztreptomicinnel (Biological Industries, Israel), 100 µg/ml heparinnal (Sigma, USA) és 2 ng/ml bFGF-fel (Neufeld professzor kedves ajándéka) kiegészített M199 tápközeget (Gibco BRL, USA) tartalmazó, zselatin borítású edényekben. A 3-9 átoltságból származó sejteket összegyűjtjük, hogy biztosítsuk a fenotípusos stabilitást, melyet a von Willebrand faktor (Zymed, USA) immunohisztokémiai detektálásával követünk nyomon.

A humán rózsáér véna SMC-t (HSVSMC) explantum tenyésztéssel szaporítjuk humán rózsáér vénákból és bal belső emlő artériákból (HLSMC). A sejteket 10% összegyűjtött humán szérummal, 2 mM L-glutaminnal, 100 egység/ml penicillinnel, 0,1 mg/ml sztreptomicinnel és 2 ng/ml bFGF-fel kiegészített Dulbecco-féle Módosított Eagles Tápközegben (DMEM)(Gibco BRL, USA) szaporítjuk. Az SMC-t immunohisztokémiai analízissel azonosítjuk specifikus anti-simaizom α -aktin antitesteket (Zymed, USA) használva.

Az alábbiakban leírjuk a sejtvonalak szövettenyésztését

A 293-FLYA, 293-FLY10A, 293-FLYGALV és TEFLYGA burkoló sejtvonalakat (Dr. F.L. Cosset-Lion-tól kaptuk, Franciaország) 10% FCS-sel (Biological Industries, Israel), 2 mM L-glutaminnal, 100 egység/ml penicillinnel, 0,1 ng/ml streptomicinnel, 6 µg/ml blaszticidinnel (Sigma, USA) és 6 µg/ml phleomicinnel (Sigma, USA) kiegészített DMEM-ben tenyésztjük.

A PA317, 293E3 burkoló sejtvonalakat (Dr. J. Exelrodtól kaptuk, Haddasa, Israel) 10% FCS-sel, 2 mM L-glutaminnal, 100 egység/ml



penicillinnel, 0,1 mg/ml streptomicinnel kiegészített DMEM-ben tenyésztjük.

Az alábbiakban bemutatjuk az EC és a vasculáris SMC rekombináns adenovirális vektorokkal való fertőzését.

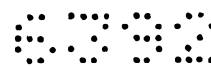
Az eljáráshoz a következő anyagokat és módszereket alkalmazzuk.

Az endoteliális sejteket és az SMC-t rekombináns adenovirális vektorokkal fertőzzük az alábbiakban leírtak szerint: a sejteket 70%-os konfluencia szinten oltjuk fibronectinnel (Sigma, USA) előburkolt (4,5 µg/ml) lemezekre 20 órával a fertőzés előtt, és komplett táptalajon (M20) tenyésztjük őket. A fertőzés napján a tenyésztápközeget friss szérumentes M199 tápközzel helyettesítjük és a rekombináns vírust adunk hozzá 3000 MOI érték mellett (azaz 3000 vírus részecske/sejt mennyiségben (=MOI)). A sejteket 90 percen keresztül inkubáljuk 20 percenként enyhe döntéssel, ami után a vírust tartalmazó tápközeget M20 komplett tenyésztápközzel helyettesítjük. A fertőzési arányt a GFP expresszió láthatóvá tételével követjük nyomon fluorszcensz GFP szűrővel (GFP-LP, Nikon) felszerelt fluoreszcensz inverz mikroszkópot használva (TE200 Nikon, Japan).

Az alábbiakban bemutatjuk az EC és SMC rekombináns retrovirális vektorokkal való transzdukcióját.

Az eljárásban a következő anyagokat és módszereket használjuk.

Az EC és SMC retrovirális vektorokkal való transzdukcióját az alábbiak szerint végezzük al. Az EC-t vagy SMC-t (4-9 átvitel) 10^5 sejt/35-mm-es üreg mennyiségben oltjuk olyan lemezekre, melyet 4,5 µg/ml fibronectinnel burkoltunk, és komplett tenyésztápközzel szaporítjuk őket 24 órán keresztül. A sejteket a transzdukció előtt egy órával oly módon pre-kondicionáljuk, hogy a tenyésztápközeget szérumentes, 0,1 mg/ml DEAE-dextránt (Sigma, USA) tartalmazó, M199



tápközegre cseréljük. A pre-kondicionálás után a sejteket háromszor mossuk foszfát pufferelt sóoldatban (PBS). A transzdukciót a sejtek vírust termelő burkoló sejtek frissen összegyűjtött és szűrt felülúszóival (0,45 µl) való 4 órás inkubálásával végezzük el. Az inkubálás végén a vírust tartalmazó tápközegét M20 tenyésztápközeggel helyettesítjük.

4. példa

A PTFE ér transzplantátumok EC-vel való beoltása

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.

Humán EC-t oltunk 50-60 %-os konfluencia mellett 20 órával a transzdukció előtt. A sejteket a korábbiakban leírtak szerint transzdukáljuk GFP-t vagy UP50-GFP-t kódoló retrovirális vektorokkal, majd az ér transzplantátum beoltására használjuk a G418 szelektálás (300 µg/ml) után, mely homogén sejt populáció létrehozását célozza. A sejteket (2×10^5 sejt/1 cm² mennyiségben) fibronectinnel (4,5 µg/ml) burkolt ePTFE ér transzplantátumokra oltjuk. Az oltási eljárást horizontálisan rotáló eszköz segítségével végezzük 45 rotáció/óra érték mellett 4 órán keresztül 37°C hőmérsékleten, ezután a beoltott ér transzplantátumokat 200 egység/ml penicillint és 0,2 mg/ml sztreptomocint tartalmazó M199 tenyésztápközegbe helyezzük. A transzplantátum beoltás hatékonyságát a beoltáshoz használt sejtek GFP termelésének fluoreszcensz mikroszkópos detektálásával értékeljük.

Az eredmények a következők.

A LacZ és VEGF-GFP expressziója virális vektorokkal transzformált humán EC-ben és szintetikus ér transzplantátumokra való oltás során a következő: Azt találtuk, hogy az Ad.LacZ-vel fertőzött humán EC-vel beoltott PTFE ér transzplantátumok β -galaktozidázt expresszálnak (5a. ábra), ahogy azt egy X-gal kolorimetriás vizsgálattal meghatároztuk. Azt



találtuk, hogy az Ad.VEGF-GFP-vel fertőzött humán EC-vel beoltott ér transzplantátumok transzgént expresszálnak, amint azt a GFP-expresszázó sejtek fluoreszcensz mikroszkópos detektálásával meghatároztuk (5b. ábra). A transzgén expressziót a fertőzés után 24 órával analizáljuk.

A nukleáris-célzott LacZ-t kódoló TGA retrovirális vektorral (F. Cosset kedves ajándéka) fertőzött humán EC-vel oltott PTFE ér transzplantátumok úgy tűnik β -galaktozidázt expresszálnak (6a. ábra) amint azt X-gal kolorimetriás vizsgálattal meghatároztuk. Azt találtuk, hogy a retroVEGF-GFP-vel fertőzött humán EC-vel oltott ér transzplantátumok transzgént expresszálnak, amint azt a GFP-t expresszázó sejtek fluoreszcensz mikroszkópos detektálásával meghatároztuk (6b. ábra). A transzgén expressziót a fertőzés után 24 órával analizáljuk.

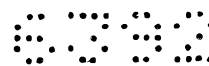
Az eredmények ezért azt mutatják, hogy a jelen találmány adenovirális és retrovirális vektorai képesek mesterséges ér transzplantátumra oltott primer humán EC-ben a transzgének, mint például a VEGF pro-endotelializációs faktor expresszióját irányítani.

5. példa

Csontvelő összejt VEGF-et kódoló vektorokkal való fertőzése

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.

A csontvelő összejteket a korábban leírtak (17, 30) szerint gyűjtjük össze és fertőzzük VEGF-GFP-t kódoló rekombináns adenovirális vektorral. A differenciálódást a fertőzött sejtek morfológiai elemzésével és a von Willebrand faktor immunohisztokémiai detektálásával követjük nyomon.



6. példa

A gén expresszió szabályozása a beoltás után

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat ésmódszereket használjuk.

Egy effektor-szabályozható expressziós rendszert használunk a transzgén, például a VEGF és az UP50 expressziójának szabályozása céljából, EC-ben. Például, tetraciklint használunk a VEGF expresszió lefelé történő szabályozásához és az UP50 felfelé történő szabályozásához, azáltal, hogy ezeket a proteinek olyan promóterek szabályozó ellenőrzése alatt expresszáljuk, melyeket a tetraciklin sorrendben felfelé és lefelé szabályoz. Egy ilyen rendszerrel a beoltott sejtek egy proteint expresszálnak, például VEGF-et az első héten, amikor szükség van a sejt proliferációra, míg a tetraciklin sebészeti beavatkozás után egy héttel való alkalmazása lefelé szabályozza a VEGF expressziót és felfelé szabályozza az UP50 expressziót, ily módon növeli a sejtek ér transzplantátumhoz való tapadását (31).

A rekombináns protein expresszió elemzését az alábbiakban részletezzük.

A VEGF protein szintjeit a beoltott ér transzplantátum-kondicionált felülúszó ELISA módszerrel való vizsgálatával elemezzük 24 órán keresztül. Hasonló módszereket használunk az UP50 protein szintjeinek méréséhez.

7. példa

Az endoteliális sejtek mennyiségi morfolometriája

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat ésmódszereket használjuk.

Az inkubálási időszak végén az ér transzplantátumokat hosszanti irányban felvágjuk, és fluoreszcensz mikroszkóppal megvizsgáljuk,



lefényképezzük és a képeket kép-elemző rendszert (Image pro Plus, Media cyberbetics, USA) használva feldolgozzuk.

8. példa

t-PA és urokinase mérések

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.

A t-PA szintet és aktivitást a beoltott ér transzplantátumok összegyűjtött felülúszóiban határozzuk meg. A t-PA és az urokináz szintjeit ELISA módszerrel teszteljük, míg a t-PA aktivitást a korábban leartak szerint mérjük (32).

9.példa

Az ér transzplantátumokból való sejt kinyerés

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.

A PTFE ér transzplantátumokból a sejteket EDTA-tripszinnel végzett emésztéssel nyerjük ki. A sejteket az emésztés után megszámoljuk és fibronectinnel előburkolt szövet-tenyésztő lemezen újra szélesztjük az életképesség értékelése céljából. Feljegyezzük a szélesztéstől a teljes konfluenciáig eltelő időtartamot. A pszeudotipizált retrovirális vektorokkal transzdukált sejtekben ELISA módszert, és a jelen találmányban leart különböző módszereket használva nyomon követjük a VEGF és UP50 expressziót.

10. példa

A transzgén expresszió detektálása genetikailag módosított vasculáris sejtekben

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.



Az alábbiakban leírjuk az UP50 mRNS transzkripció RT-PCR alanizisét. Teljes RNS-t izolálunk az EC-ből és SMC-ből 48 órával az UP50-t kódoló adenovirális és retrovirális vektorokkal való transzformálás után, PURESCRIPT RNS izolációs kitet (Gentra systems, USA) használva és az RNS koncentrációt a 260 nm hullámhosszúságon mért abszorbanciából számítjuk ki.

A cDNS szintézishez 1 µg RNS-t összekeverünk 500 ng random hexamerrel, a keveréket 70°C hőmérsékletre melegítjük 10 percig, majd jégen lehűtjük. A reakcióelegy 0,4 mM dNTP-eket, 5 egység AMV-reverz transzkriptázt (RT)(Promega), 5 mM DTT-t, 32 egység RN-áz-out-ot (Gibco BRL) tartalmaz, és RT puffert (Promega) adunk az előmelegített RNS-hez. A reakcióelegyet 2 órán keresztül inkubáljuk 38°C hőmérsékleten, majd 15 percig 95°C hőmérsékleten. A PCR reakciót 50 µl-es térfogatban hajtjuk végre 7 µl RT reakcióelegy keverékkel, 20 pmol sense-primerrel:

5'-

GAAGATCTTGACATGCCAGGAATAAAAAGGATACTC-3' (2. számú szekvencia), 20 pmol anti-sense primerrel: 5'-

GAAGATCTTCAGAAATGGGTACTGCGACACATATATCCGCAGTCG-3' (3. számú szekvencia), 240 mmol dNTP-kel, 1 U Ex-Taq DNS polimerázzal (Takara, Japan) és a gyártók által biztosított reakció pufferrel. A PCR reakciót az alábbiak szerint végezzük el: 2 percig tartó inkubálás 94°C hőmérsékleten, amit a következőkben leírt 10 ciklus követ: 94°C/30 másodperc -> 50°C/30 másodperc -> 72°C/60 másodperc. Ezt 21 ciklus követi: 94°C/30 másodperc -> 60°C/30 másodperc -> 72°C/60 másodperc + 5 másodperc/ciklus -> 72°C/10 perc. Az RT-PCR termékeket elektroforézissel analizáljuk 1%-os agaróz gélben.



Az alábbiakban leírjuk az UP50 és VEGF protein expresszió western immunolenyomat analízisét.

Az adenovirálisan vagy retrovirálisan transzformált EC és SMC UP50 vagy VEGF protein expresszióját a transzformált sejt-kondicionált tápközeg Western immunolenyomat analízisével határozzuk meg. A tenyésztápközeget szérum-mentes tápközzel helyettesítjük 24 órával a transzformáció után és a sejteket további 24 órán keresztül szaporítjuk. A transzformált sejt-kondicionált tápközeg (CM) mintáit (30 µl) 10 % SDS poliakrilamid gélen végzett elektroforézissel szeparáljuk redukáló körülmények között. A szeparált proteint elektrolenyomatoljuk nitrocellulóz membránra (Schleicher & Schuell). A lenyomatokat blokkoló oldattal (0,1% szeparált tejet és 0,3% Tween-20-at tartalmazó TBS (TBST)) való inkubálással blokkoljuk 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten, gyenge rázatás mellett. Ezután, a lenyomatokat blokkoló oldattal hígított primer antitesttel inkubáljuk 2 órán keresztül, szobahőmérsékleten. Affinitás tisztított poliklonális nyúl anti-UP50 antitestet (#9855, rendelésre gyártott, Sigma, Israel)(1:5000) használunk az UP50 detektálásához és poliklonális nyúl anti-VEGF₁₆₅ antitestet (#SC 152 Santa-Cruz, USA)(1:700) használunk a VEGF detektálásához.

A primer antitesttel való inkubálást követően, a lenyomatokat háromszor mossuk TBST-vel és TBST-vel hígított anti-nyúl peroxidáz-konjugált szekunder antitesttel (Sigma, USA) inkubáljuk 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. TBST-vel végzett háromszori mosás után a specifikus proteint a lenyomatok ECL reagenssel (Sigma, USA) való előhívásával és röntgen filmen való exponálásával vizualizáljuk.

Az UP50 expressziót immunohisztokémiai analízissel elemezzük. Adenovirálisan fertőzött EC-t és SMC-t oltunk fibronectinnel (4,5 µl/mg) előburkolt kamra-tárgylemezre (Lab-Tek, USA) és 24 órán keresztül tenyésztjük. Az adenovirális fertőzés után 48 órával a sejteket oly módon fixáljuk, hogy szobahőmérsékleten inkubáljuk őket 20 percen keresztül



4% paraformaldehidben, majd kétszer mossuk őket PBS-sel. A sejteket ezután a tárgylemezek mikrosütőben 5 percig tartó 1 mM EDTA-ban (pH 8,0) való melegítésével denaturáljuk. A mintákat Histostain-Plus kittel szállított (Zymed, USA) blokkoló oldatot használva blokkoljuk gyártók útmutatásának megfelelően. Blokkolás után a sejteket affinitás tisztított anti-UP50-nel (1:50) inkubáljuk 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten. A mintákat ezután háromszor mossuk PBS-T-vel (0,3% Tween-20-at tartalmazó PBS), majd PBS-T-ben 1:400-ra hígított rhodamin-konjugált kecske anti-nyúl IgG antitesttel (#SC 2091, Santa Cruz, USA) inkubáljuk 1 órán keresztül. A sejteket háromszor mossuk PBS-T-vel és montírozó tápközzel (H-1000, Vector Laboratories, USA) borítjuk. A mintákat a sejtekben levő GFP és rhodamin fluoreszcenz szkennig konfokális (MRC-1024, BioRad) mikroszkópos detektálásával vizualizáljuk.

Az UP50 ECM-ben való immunohisztokémiai analíziséhez az UP50 gént kódoló, rekombináns adenovirális vektorral fertőzött endoteliális sejteket úgy indukáljuk az ECM létrehozása céljából, hogy dextránt adunk a tenyésztápközzeghez. Az EC réteg eltávolítása után (melyhez 20 mM NH_4OH oldatot használunk), az ECM-et rhodamin alapú immunofestésnek vetjük alá anti-UP50 antitestet használva.

Az alábbi eredményeket kapjuk.

Az alábbiakban leírjuk az UP50 EC-ben és SMC-ben való expressziójának analízisét. Az EC és SMC UP50-GFP-t kódoló rekombináns adenovírussal való fertőzése transzgén expressziót eredményez (sorrendben 7b és 7d ábrák), amint azt a GFP vizualizációjával meghatároztuk. Az EC és SMC UP50-GFP-t kódoló retrovirális vektorral való transzdukciója hasonlóan a GFP protein termelését demonstrálja (8b. és 8d. ábrák).

Az UP50 mRNS transzkripcióját RT-PCR analízissel detektáljuk Ad.UP50-GFP-vel fertőzött EC-ben és EMC-ben (sorrendben 9a és 9b.



ábrák), és az UP50-GFP-t kódoló retrovirális vektorral genetikailag módosított EC-ben és SMC-ben (sorrendben 10a. és 10b. ábrák).

Az UP50 protein (60 kD) expressziót Western immunolenyomat analízissel detektáljuk az EC és SMC UP50-GFP-et kódoló adenovirális (11. ábra) és retrovirális (12. ábra) vektorokkal való fertőzése után.

Az UP50 proteint Ad.UP50-fertőzött EC-bens és SMC-ben detektáljuk, amint azt immunohisztokémiai meghatároztuk (sorrendben 13b. és 13d. ábrák). A citoplazmás festést Ad.UP50-GFP-vel fertőzött sejtekben detektáljuk, míg nem detektálunk festődést az Ad.UP50 fertőzött sejtekben, így demonstrálva, hogy az UP citoplazmás expressziója magas szintű.

Konfokális mikroszkópiát használunk az UP50 sub-celluláris elhelyezkedésének elemzéséhez fertőzött EC-ben. Az UP50 expresszióját Ad.UP50-GFP fertőzött endoteliális sejtekben detektáljuk a citoplazmában és a sejt membránban (14b. és 14c. ábrák) és szálak szerkezetként detektáljuk a konfluens sejtekben (14b. ábra). Az UP50 citoplazmás szálak expressziója nem-konfluens sejtekben azt jelenti, hogy az UP50 kapcsolatban állhat a citoskeletonnal (sejtvázal), és szerepe lehet a sejt-sejt vagy sejt-ECM kölcsönhatásokban.

Az UP50 protein jelenlétét az UP50-GFP-t kódoló adenovirális vektorral fertőzött EC által létrehozott ECM-ben immunohisztokémiai analízissel detektáljuk (15. ábra).

Ezek az eredmények azt demonstrálják, hogy a jelen találmány retrovirális és adenovirális expressziós vektorai képesek az UP50 celluláris tapadási faktor expresszióját indukálni vasculáris sejtekben. Ezért, az ilyen szerkezetek expresszázó EC-t és az SMC-t használjuk a funkcionális elemzésekben, melyek azt a célt szolgálják, hogy kimutassuk, hogy az UP50-et expresszázó vasculáris sejtek képesek jobb



szintetikus ér transzplantátumokat létrehozni, ha azokat az ér transzplantátumokra oltjuk.

11. példa

Az adenovirálisan fertőzött EC és SMC közös tenyészteteinek UP50 és VEGF protein expressziója

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.

Az EC adenovirálisan fertőzött közös tenyészteteit vagy az adenovirálisan fertőzött EC és SMC közös tenyészteteit 24 órán keresztül tenyésztjük a fertőzést követően szérummal kiegészített tenyésztápközegben, majd tovább tenyésztjük szérum mentes tenyésztápközegben további 24 órán keresztül. A felülúszóban levő proteineket elektroforetikusan szeparáljuk 10% SDS poliakrilamid gélen és a szeparált proteineket elektrolenyomatoljuk nitrocellulóz mambránokra. A lenyomatokat anti-VEGF vagy anti-UP50 antitestekkel inkubáljuk. A peroxidáz-konjugált szekunder antitesteknek való exponálás után a lenyomatokat ECL reagensekkel előhívjuk, majd röntgen filmen exponáljuk.

Az alábbi eredményeket kaptuk.

Az Ad.VEGF-GFP-fel fertőzött és az Ad.UP50-GFP-fel fertőzött EC vagy SMC közös tenyésztetei a VEGF és UP50 hasonló szintű expresszióit demonstrálja (sorrendben 16a. és 16b. ábrák).

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a jelen találmány módszere képes közösen létrehozni EC mitogén VEGF és az UP50 EC adhézios faktort, valamint képes ezeket a proteineket termelni a genetikailag módosított EC és SMC közös tenyészteteivel. Ennélfogva a jelen találmány javított módszert biztosít a mesterséges ér transzplantátumok endoteliális sejtekkel való beoltására.

Az alábbiakban, a retrovirálisan fertőzött EC és SMC közös tenyészetek által expresszált VEGF és UP50 proteinek Western lenyomat analízisét mutatjuk be.

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.

A különböző retrovírusokkal fertőzött EC közös tenyészeit, vagy a fertőzött EC és SMC kevert tenyészeit szérummal kiegészített tenyésztápközegben tenyésztjük 24 órán keresztül, a fertőzés után, majd a sejteket további 24 órán keresztül tenyésztjük szérum mentes tenyésztápközegben. A szaporító tenyésztápközeg mintáit (30 µl) 10% SDS poliakrilamid gélen szeparáljuk és elektrolenyomatoljuk nitrocellulóz membránon. A lenyomatokat anti-VEGF vagy anti-UP50 antitestekkel inkubáljuk. A peroxidáz konjugált szekunder antitestnek való exponálás után a lenyomatokat ECL reagensekkel előhívjuk, és röntgen filmen exponáljuk.

Az alábbi eredményeket kapjuk.

Az UP50 és VEGF expressziójára retrovirálisan fertőzött SMC és EC közös tenyészeitének analízise sorrendben azt demonstrálja, hogy a VEGF és az UP50 protein közösen expresszálódik, amint azt Western immunolenyomat analízissel meghatároztuk (17a. és 17b. ábrák).

Ezek, és a fent leírt adenovirális vektorok alkalmazásával nyert eredmények ezért azt demonstrálják, hogy a jelen találmány virális expressziós vektorai hatékonyan irányíthatják a VEGF és az UP50 proteinek expresszióját. Ezek az eredmények azt is bemutatják, hogy a retrovirális vagy adenovirális vektorok segítségével genetikailag módosított vasculáris sejtek közös tenyészeit túlexpresszálhatják a VEGF és az UP50 proteineket. Így, a jelen találmány adenovirális és retrovirális expressziós vektorainak alkalmazása, valamint a mitogén és adhéziót indukáló molekulákat expresszáló, genetikailag módosított



vasculáris sejtek kevert tenyészetének alkalmazása nagy mértékben alkalmas a hosszú élettartamú és akadálymentes, szintetikus ér transzplantátumok előállításában.

12. példa

A vasculáris sejtekben túlexpresszált rekombináns VEGF és UP50 funkcionális elemzése

Az alábbiakban bemutatjuk az EC proliferációs vizsgálatát.

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.

Az endoteliális sejteket (5-11 átvitel) 30 %-os konfluenciánál (10^4 sejt/üreg) oltjuk 4,5 $\mu\text{g/ml}$ fibronectinnel előburkolt 24 üregű lemezekre, 24 órával az adenovirálisan fertőzés előtt. A sejteket Ad.UP50-GFP-vel, Ad.GFP-vel vagy Ad.VEGF₁₆₅-GFP-vel fertőzzük. A 90 percig tartó adenovirális vektoroknak való, 37°C hőmérsékleten végzett exponálás után szérumot tartalmazó tenyésztápközeget adunk hozzá és 16-18 órával később a tenyésztápközeget 2% humán szérumot és 2 ng/ml bFGF-et tartalmazó M199 tenyésztápközeggel helyettesítjük. A vizsgálatot háromszori ismétlésben végezzük, és a proliferációt XTT kolorimetriás vizsgálattal mérjük a fertőzés utáni 7. napon.

Az alábbi eredményeket kapjuk.

A fertőzés majdnem 100%-os transzgént expresszáló sejteket eredményez, ahogy azt a citoplazmás GFP expresszióval detektáltuk. Az eredményeket a nem fertőzött sejtekhez viszonyított relatív értéként mutatjuk be. Amint az a 18. ábrán látható, az UP50 transzgén túlexpresszió nincs gátló vagy proliferatív hatással a sejtek szaporodási sebességére. Bár az adenovirálisan fertőzött csoportban (Ad.GFP, AD. UP50-GFP) mért értékek valamivel magasabbak, mint a nem fertőzött, kontroll csoportban mért eredmények, az UP50 expresszió hatása nem



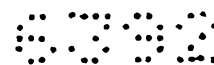
szignifikáns. Nincs szignifikáns különbség az Ad.GFP-vel fertőzött és az Ad.UP50-GFP-vel fertőzött EC eredményei között. Az Ad.VEGF₁₆₅-GFP-vel való fertőzés szignifikáns proliferációt indukál az egyéb fertőzött EC csoportokhoz képest.

Az alábbiakban bemutatjuk az EC, UP50-et túlexpresszáló EC-vel létrehozott, SMC-hez való tapadását.

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.

Az alábbiakban bemutatjuk az ECM EC általi indukcióját. Az EC-t fibronectinnel előburkolt 48 üregű lemezekre oltjuk (10^4 sejt/üreg) 24 órával a fertőzés előtt. A sejteket Ad.UP50-GFP-fel vagy Ad.GFP-vel fertőzzük, a korábban leírtak szerint. Fertőzés után a sejteket 4% dextrán 42000-rel (Sigma, USA) kiegészített M20 tenyésztápközegben szaporítjuk 7 napon keresztül. Ezen fertőzéses időszak után a tenyésztápközeget aspiráltatjuk a fertőzött sejtekről és a mátrixot létrehozó sejteket 20 mM NH_4OH -val lecsupaszítjuk, körülbelül 5 perces kezeléssel. A sejt lízis után az ECM-burkolt üregeket háromszor mossuk PBS-sel és PBS-ben tároljuk 4°C hőmérsékleten.

Extracelluláris mátrix adhéziós vizsgálatot végzünk el az alábbiak szerint: az EC-t 10 mM EDTA oldatban való inkubálással leválasztjuk, a mátrixot M199 tenyésztápközeggel mossuk, majd Ad.UP50-GFP-vel, Ad.GFP-vel fertőzött CM-ben, vagy nem fertőzött EC-ben inkubáljuk, sorrendben 15 percig. Ezen inkubálás után az EC-t ECM-mel burkolt üregekbe oltjuk (2×10^4 sejt/üreg mennyiségben). Az Ad.UP50-GFP-vel fertőzött EC-vel létrehozott ECM-re oltott, sejteket Ad.UP50-GFP-vel fertőzött sejtekből létrehozott CM-ben inkubáljuk. Az Ad.GFP-vel fertőzött sejtek által létrehozott ECM-re oltott sejteket Ad.-GFP-vel fertőzött sejtekből gyűjtött CM-mel inkubáljuk, és a nem fertőzött sejtekből létrehozott ECM-re oltott kontroll csoport sejtjeit nem fertőzött sejt-kondicionált tenyésztápközeggel inkubáljuk. A sejteket további 30 percig



inkubáljuk, hogy lehetővé tegyük a sejtek tapadását, majd PBS-sel mossuk őket. A megmaradt adherens sejtek mennyiségi meghatározását XTT kolorimetriás vizsgálattal határozzuk meg.

Hasonló kísérletet hajtunk végre retroUP50-GFP-vel transzdukált EC-ből létrehozott ECM-et használva.

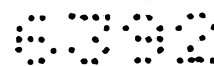
Az alábbiakban bemutatjuk az UP50 celluláris fiziológiára és közös tényezőkre kifejtett hatásait.

Az feltételeztük, hogy megvalósítható az UP50 és a VEGF közös expressziója. Ezért a VEGF vagy az UP50 expresszáására fertőzött EC közös tényezőit teszteljük az expresszió szintjeire mindkét protein esetében, miután összekevertük az Ad.UP50-GFP-vel fertőzött sejteket az Ad.UP50-GFP-vel fertőzött EC-vel az alábbiakban leírtak szerint.

Az UP50-GFP-t, GFP-t kódoló retrovirális vektorral transzdukált endoteliális sejteket vagy a kontroll, nem transzdukált sejteket 48 órán keresztül inkubáljuk az adenovirális fertőzés előtt. A fertőzést Ad.VEGF-GFP-vel vagy Ad.GFP-vel végezzük el. A sejteket 24 órán keresztül inkubáljuk a vírust tartalmazó tenyésztápközegben, majd a tenyésztápközeget szérum mentes tápközeggel helyettesítjük és a sejteket további 24 órán keresztül inkubáljuk. A szaporító tápközeg mintáit (30 μ l) 10% SDS poliakrilamid gélen szeparáljuk, a szeparált proteinek elektrolyomatoljuk nitrocellulóz membránra és a lenyomatokat anti-VEGF-fel vagy anti-UP50-nel inkubáljuk. A peroxidáz-konjugált szekunder antitestnek való kitevés után a lenyomatokat ECL reagenseket használva előhívjuk, és röntgen filmen exponáljuk.

Az alábbi eredményeket kapjuk.

Az alábbiakban bemutatjuk a retrovirális és adenovirális vektorokkal egymás után genetikailag módosított EC általi UP50 és VEGF expresszió analízisét.



Azok az endoteliális sejtek, melyeket retrovirálisan transzdukáltunk, hogy UP50-GFP-t expresszálganak, majd ezt követően VEGF-GFP-t kódoló adenovirális vektorral fertőztünk, magasabb szinten expresszálgák a GFP-t, mint a csupán az UP50-GFP-t kódoló retrovirális vektorral fertőzött sejtek, ahogy azt fluoreszcensz mikroszkópiával meghatároztuk (sorrendben 19b. és 19a. ábrák).

Az UP50 expresszáására retrovirálisan transzdukált, majd ezt követően a VEGF géneket kódoló adenovirális vektorral fertőzött EC Western immunolennyomatolási elemzése azt jelzi, hogy az ilyen sejtek képesek együtt expresszálni a VEGF és az UP50 proteineket (sorrendben a 20a. és 20b. ábrák).

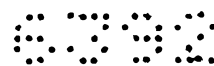
Ezért ezek az eredmények azt mutatják, hogy az EC, VEGF és UP50 mitogén és adhéziót-indukáló proteinek közös expresszáását célzó, sorrendben egymást követő retrovirális transzdukciója és adenovirális fertőzése nagy mértékben alkalmas a hosszú élettartamú és akadálymentes szintetikus ér transzplantátumok előállítására. Az EC ilyen duális virális genetikai módosításának alkalmazását támogatja az ezáltal termelt megnövekedett GFP szint, amint azt korábban tárgyaltuk.

Az alábbiakban leírjuk az UP50 EC szaporodásra kifejtett hatását háromdimenziós kollagén tenyészet in vitro angiogenezisben.

A szintetikus ér transzplantátumok VEGF és UP50 – sorrendben - mitogén és pro-adhéziós faktorokat túlexpresszálgó EC-vel való beoltása igen kívánatos a hosszú élettartamú és akadálymentes szintetikus ér transzplantátumok létrehozásában. Ennélfogva, ezen faktorok az EC proliferáció indukálására kifejtett kombinált hatásait az alábbiak szerint vizsgáljuk meg.

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.

Az in vitro angiogenezist kollagén gélekben adenovíussal fertőzött EC szferoidokat használva mennyiségileg határozzuk meg. Az EC



szferoidok létrehozását a korábban leírtak szerint végezzük el (33). Az endoteliális sejteket 0,25% (tömeg/térfogat) kabroximetil-cellulózt tartalmazó tenyésztápközegben szuszpendáljuk és nem-szövettenyésztő kultúra kezelt, kerek aljú 96 üregű lemezeken (Nunc, Denmark) tenyésztjük 24 órán keresztül, 37°C hőmérsékleten, 5% CO₂ alatt, mely idő alatt a szuszpendált sejtek üregenként egyetlen, meghatározott méretű és sejtszámú szferoidot hoznak létre (körülbelül 750 sejt/szferoid). Az így léte hozott szferoidokat kollagén gélekbe ágyazzuk. A kollagén törzsoldatot a felhasználás előtt készítjük el oly módon, hogy összekeverünk 8 térfogat savas patkány farok kollagén kivonatot (2 mg/ml értékre ekvilibráljuk, 4°C), 1 térfogat 10x M199-cel (Gibco BRL, USA). A pH értéket 7,4-re állítjuk 0,34N NaOH hozzáadásával. A szferoidok kollagén gél polimerizációja előtti leülepedésének megakadályozása céljából 1 térfogat kollagén törzsoldatot összekeverünk 1 térfogat szobahőmérsékletű, 40% humán szérumot és 0,5% (tömeg/térfogat) karboximetil-cellulózt tartalmazó M199 tenyésztápközeggel. A szferoidokat tartalmazó géleket (20-30 szferoid/gél) gyorsan, előmelegített 24-üregű lemezekre helyezzük át, és hagyjuk, hogy bekövetkezzen a polimerizáció. A géleket 37°C hőmérsékleten inkubáljuk 5% CO₂-ben és az EC proliferációját a gélekben mikrofotókkal dokumentáljuk digitális video kamerát (DXM1200 Nikon, Japan) használva. Az egyes csoportokból legalább 40 szferoid csírázását analizáljuk.

Az alábbi eredményeket kaptuk.

Az Ad.GFP-vel vagy az Ad.UP50-GFP-vel fertőzött EC szferoidjai esetében (sorrendben 21b. és 21f. ábrák) alacsony alapvonal csírázási aktivitást tapasztaltunk, amit az exogén VEGF hozzáadása erősen stimulál (sorrendben 21d. és 21h. ábrák). Az Ad.UP50-GFP-vel fertőzött EC szferoidjai (21f. ábra) esetében azt találtuk, hogy magasabb



alapvonal csírázási aktivitással rendelkeznek, mint az Ad.GFP-vel fertőzött EC (21b. ábra).

Az Ad.GFP-vel és Ad.GFP+Ad.UP50-GFP-vel fertőzött EC szferoidjai (sorrendben 22b. és 22f. ábrák) esetében alacsony alapvonal csírázási aktivitást találtunk, melyet az Ad.GFP-vel és Ad.VEGF-fel fertőzött EC 50%-os közös tenyészeiben való szaporítás stimulál (sorrendben 22d. és 22h. ábrák). A legmagasabb csírázási szintet az Ad.UP50-GFP-vel és az Ad.VEGF-GFP-vel fertőzött EC közös tenyészeiben figyeltünk meg (22h. ábra).

Ezért azt a következtetést lehet levonni, hogy az UP50 VEGF-fel való közös túlexpresszállása szinergista növekedéshez vezet az EC csírázásban, hacsak a VEGF által közvetítettéhez hasonlítjuk.

Ezek az eredmények ezért azt mutatják, hogy az UP50 VEGF-fel való egyidejű közös túlexpresszállása az EC-ben nagy mértékben alkalmas a hosszú élettartamú és akadálymentes szintetikus ér transzplantátumok előállítására, mivel a faktorok ilyen kombinációját expresszálló EC erősen fokozott proliferatív kapacitást mutat.

13. példa

Az UP50 túlexpresszállás EC szintetikus ér transzplantátumokoz való tapadására kifejtett hatása, in vitro.

A fokozott adhézión tulajdonságokkal rendelkező EC-vel beoltott szintetikus ér transzplantátumok igen kívánatosak, mivel az EC-vel oltott transzplantátumok tudomány területének korábbi fő problémája az, hogy ezek nem tartják meg hatékonyan a rájuk oltott sejteket. Ennélfogva, az EC tapadóképeségének fokozását célzó EC pro-adhézión UP50 faktor túlexpresszállás hatékonyságát az alábbiak szerint elemezzük.

Az alábbiakban leírjuk az UP50 túlexpresszió adhézióra kifejtett hatását in vitro tenyésztett EC-ben a tripszinizációt követően.

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.

Az UP50 Ad.UP50-GFP-vel fertőzött EC-ben való biológiai aktivitását sejt retenciós sebességgel vizsgáljuk tripszinizáció után. Az endoteliális sejteket 70-80%-os konfluencia mellett ($6-7,5 \times 10^4$ sejt/üreg) oltjuk 12-üregű lemezekre, 24 órával az adenovirális fertőzés előtt. A sejteket fertőzzük (3×10^3 pfu/sejt) a korábban leírtak szerint, Ad.UP50-GFP-vel vagy Ad.GFP-vel és kontrollként nem fertőzött sejteket használunk. A fertőzés után a sejteket M20 tenyésztápközegben szaporítjuk 4 napon keresztül. A sejteket PBS-sel mossuk és az adhéziós vizsgálatot a sejtek tripszinizációjával végezzük el 0,001% EDTA-t tartalmazó 0,0025% tripszint használva. Három perces, szobahőmérsékleten való inkubálás után a tripszint semlegesítjük komplett tenyésztápközeg (M20) hozzáadásával. A sejteket háromszor mossuk PBS-sel, majd 300 μ l M20 tápközeget adunk hozzá a sejtekhez. A továbbra is tapadó sejtek mennyiségi meghatározását a kontroll, nem tripszinizált sejtek százalékaként, kolorimetriás XTT vizsgálattal határozzuk meg.

Az alábbi eredményeket kapjuk.

A rekombináns adenovirális fertőzést követő UP50 expresszió szignifikánsan növeli a sejt megtartást (60%) az Ad.GFP-vel fertőzött sejtekhez képest (40%), vagy a kontroll, nem fertőzött sejtekhez képest (20%)(23. ábra).

Az UP50 túlexpresszálas ECM-hez való sejt adhézióra kifejtett hatását az alábbiakban mutatjuk be.

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.



Az EC-t 10mM EDTA oldattal leválasztjuk, 0,1% BSA-t (Sigma, USA), 10mM HEPES-t tartalmazó M199 tenyésztápközzel mossuk és sorrendben Ad.UP50-GFP-vel vagy Ad.GFP-vel fertőzött EC-ből, vagy nem fertőzött EC-ből származó CM-mel inkubáljuk 15 percig. Inkubálás után a sejteket ECM burkolt üregekbe (2×10^4 sejt/üreg) oltjuk. Az ECM-re oltott sejteket - melyeket Ad.UP50-GFP-vel fertőzött EC-ből hozunk létre - Ad. UP50-GFP-vel fertőzött sejtekből származó CM-ben inkubáljuk. Az Ad.GFP-vel fertőzött sejtekkel létrehozott ECM-re oltott sejteket Ad.GFP-vel fertőzött sejtekből gyűjtött CM-mel inkubáljuk, a nem fertőzött sejtekkel létrehozott ECM-re oltott sejtek kontroll csoportját nem fertőzött sejt kondicionált tápközzben inkubáljuk. A sejteket további 30 percig inkubáljuk, hogy lehetővé tegyük a sejt tapadást, majd PBS-sel mossuk. A továbbra is tapadó sejtek mennyiségi meghatározását kolorimetriás XTT vizsgálattal határozzuk meg.

Az alábbiakban bemutatjuk az eredményeket.

A korábban bemutatott, szekretált UP50-nek, és ECM-kötött UP50-nek való exponálás (15. ábra) az EC sejtek adhéziónak 30%-nál nagyobb növelését eredményezte a kontroll csoporthoz képest (24. ábra).

Az alábbiakban bemutatjuk az UP50 túlexpresszálas EC retencióra kifejtett hatását folyamatos nyírási stressz mellett.

Az UP50 EC-re kifejtett adhéziót elősegítő aktivitását sejt retenciával vizsgáljuk folyamatos nyírási stressz alatt, amit úgy valósítunk meg, hogy a tenyész lombikokat rázógépen rázatjuk az alábbiakban leírtaknak megfelelően.

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.

Humán rózsaeér véna EC-t (8-11átoltás) oltunk (10^5 sejt/35 mm-es üreg) mennyiségben, majd M20-ban szaporítjuk 60-80%-os konfluencia eléréséig. A sejteket Ad.UP50-GFP-vel vagy Ad.GFP-vel (MOI 3000)



fertőzzük a korábban leírtak szerint, és a nem fertőzött sejtek szolgálnak kontrollként. A sejteket további 30 percig szaporítjuk, hogy biztosítsuk a transzgén expressziót a nyírási stressznek való kitevés előtt. A kísérlet előtt az egyes csoportokból (Ad. UP50-GFP, Ad.GFP, Kontroll) 2 üreget összegyűjtünk tripszin-EDTA használatával, és a sejteket megszámloljuk. Hogy a sejteket teljesen befedjük a ráztatás alatt 5 ml M20 tenyésztápközeget adunk az egyes üregekhez. A lemezeket a rázógépre helyezzük a CO₂ inkubátor belsejébe, és 20-24 órán keresztül inkubáljuk intenzív ráztatás mellett (körülbelül 140 ciklus/perc). Ráztatás után, a sejteket ötször mossuk PBS-sel. A sejteket tripszin-EDTA-t használva összegyűjtjük és hemacitométerrel megszámloljuk. A vizsgálatot párhuzamosan retrovirális vektorokkal transzdukált sejtekkel is elvégezzük.

Az alábbi eredményeket kapjuk.

A 25a-g. ábrákon (morfometria) és a 25h. ábrán (sejt számolás) bemutatott eredmények azt mutatják, hogy a retrovirális transzdukció általi UP50 túlexpresszió növeli a folyamatos nyírási stressznek kitett EC tapadását. Az UP50-et expresszáló sejtek között a sejtek 98 %-a a lemezhez tapadt állapotban marad a GFP-t expresszáló EC-hez (72% $\pm$ 1%) és a nem transzdukált EC-hez (69 $\pm$ 2%) képest. Hasonló eredményeket kaptunk az UP50 expressziója céljából adenovirálisan fertőzött EC-vel (az eredményeket nem mutatjuk be).

14. példa

A szintetikus ér transzplantátumra oltott, áramlási körülményeknek kitett, genetikailag módosított vasculáris sejtek adhézioja.

A szintetikus ér transzplantátumok beolthatók az EC mitogén faktorok expresszálását célzó genetikailag módosított vasculáris



sejtekkel, hogy hosszú élettartamú és akadálymentes ér transzplantátumokat hozzunk létre. A jelen találmánynak megfelelően az ér transzplantátum beoltását EC adhéziót elősegítő faktorokkal végezzük, hogy fokozottan hosszú élettartamú és akadálymentes ér transzplantátumokat hozzunk létre. Így az ér transzplantátumok ilyen sejtekkel való beoltását és pulzáló áramlási körülmények között való tesztelését az alábbiakban leírtak szerint végezzük el.

Az alábbiakban leírjuk a humán EC retencióját ePTFE ér transzplantátumokon pulzáló áramlási körülmények között.

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.

Az ér transzplantátumokat az alábbiak szerint oltjuk be.

Az UP50-GFP expresszálására retrovirálisan transzdukált EC-t (2×10^5 sejt/ 1 cm^2) fibronectinnel (4,5 mg/ml) előburkolt ePTFE ér transzplantátumokra oltjuk. Ezt a beoltási eljárást 37°C hőmérsékleten hajtjuk végre, 4 órán keresztül, horizontálisan rotáló készülékben, mely 45 rotáció/óra értéken rotál. A beoltott ér transzplantátumokat ezután 20 órán keresztül antibiotikumokkal kiegészített M199 tenyésztápközegben tartjuk.

Az alábbiakban bemutatjuk az áramlási készüléket.

A sematikus a 26. ábrán bemutatott áramlási rendszer egy pulzáló vér pumpából (Harvard készülék #1421, USA), rugalmas „tygon” csövekből, kompenzációs tartályból és szintetikus ér transzplantátumokból áll, amint azt képszerűen a 27. ábrán bemutatjuk. A rendszer nyomását a nyomás monitoron követjük nyomon (#742 Mennen Medical, Germany). Az ér transzplantátumokon keresztüli áramlást Doppler-alapú áramlási rendszerrel követjük nyomon (#T106 Transonic Systems Inc., USA). Az áramlási és nyomás értékeket nyomon követjük és online feljegyezzük. A nyomás és áramlási adatokat adat gyűjtő



rendszerrel analizáljuk, mely online mutatja a kiszámított nyírási erőket az ér transzplantátumon belül. Az áramláshoz használt ePTFE ér transzplantátumok 5-12 cm hosszúságúak és 6 mm átmérőjűek (GORE Co., USA).

Az áramlási körülmények a következők.

A beoltott ér transzplantátumokat laminális áramlási körülményeknek vetjük alá. Az áramlást úgy állítjuk be, hogy 45 percre elérje a 120/75 (90 Hgmm középértéke) fiziológiai vérnyomást, 150-200 ml/perc áramlási sebesség és 60 löket/perc értékű pumpálás mellett. Az ér transzplantátumokat mikroszkópos dokumentációt és morfometriás analízist használva értékeljük. A kísérlet második fázisában az ér transzplantátumokat különböző áramlási körülmények között exponáljuk összesen 30 percig. Az áramlási körülményeknek való exponálás után a GFP-t expresszáló sejtek számának retencióját úgy értékeljük, hogy hosszanti irányban felvágjuk az ér transzplantátumokat és fluoreszcenz fotomikrográfiával megvizsgáljuk a luminális felszín random kiválasztott mezőit.

Az alábbi eredményeket kapjuk.

Az ér transzplantátumok majdnem teljes borítását detektáljuk a retroGFP és retroUP50-GFP transzdukált sejtek fluoreszcenz mikroszkópiájával (sorrendben 28a. és 28b. ábrák) a pulzáló laminális áramlási körülményeknek való exponálás előtt. Ezt a pulzáló laminális áramlási körülményeknek való exponálás követi. Azok az ér transzplantátumok, melyeket az UP50-GFP expresszálására retrovirálisan transzdukált EC-vel burkoltunk magasabb sejt retenciót mutatnak, mint azok az ér transzplantátumok, melyeket a GFP expresszálására retrovirálisan transzdukált EC-vel burkoltunk, és



ugyanilyen áramlási körülményeknek vetettünk alá (sorrendben a 28b. és 28d. ábrák).

Az UP50 gén transzfer utáni megnövekedett sejt adhézió ezen eredményei alátámasztják a jelen találmányban leírt módszert, melyben olyan sejtekkel beoltott ér transzplantátumokat használunk, mely sejtek túlexpresszálják az UP50-et, ami a sejt burkolás fokozását szolgálja áramlási körülmények között.

15. példa

A mesterséges ér transzplantátumokra oltott, genetikailag módosított EC retenciója in vivo áramlási körülmények között.

A következőkben bemutatjuk a genetikailag módosított humán EC-vel burkolt ePTFE ér transzplantátumok rövid távú implantációját birka artériákban.

A pro-endotelializációs faktorok expresszáására genetikailag módosított, és szintetikus ér transzplantátumokra oltott humán EC adhéziójának tesztelésére való realisztikus modellként az ilyen faktorokat túlexpresszálo humán EC-vel oltott ér transzplantátumokat in vivo birka artériákban teszteljük az alábbiak szerint.

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.

Kis kaliberű ePTFE ér transzplantátumokat (6 mm) oltunk humán EC-vel, melyeket retrovirális transzdukcióval genetikailag úgy módosítottunk, hogy túlexpresszálják a GFP-t, az UP50-GFP-t vagy a VEGF₁₆₅-GFP-t, 36 órával az implantáció előtt.

Éheztetett (12 órán keresztül) kifejlett birkát gyógyszerrel előkezelünk inramusculárisan adott 10 mg diazepam injekcióval és 500-600 mg intravénásan adott nátrium-pentobarbital, majd légcsövét csövet vezetünk. Az aneszteziát 1-2 % isoflurán belélegeztetéssel tartatjuk fenn. Operáció előtt 600 mg aspirint alkalmazunk. A kísérlet alatti



nyomon követő rendszer vérnyomásmérőt, pulzus oximetriát, és ECG-t foglal magába. Heparint (300 U/kg) injektálunk intravénásan a szisztémás antikoagulációhoz, amit az ér transzplantátum implantációhoz az artériák exponálása és preparálása követ. Az eljárás alatt 30 percenként vérmintát veszünk és a heparinizáció hatékonyságát értékeljük a részleges thromboplastin idő (PTT) mérésével.

A beoltott ér transzplantátumokat vég-oldal proximális és disztális helyzetben ülteti be a birka femorális artériába egy szívsebész szakértő, amint azt a 29. ábrán bemutatjuk. Az ér transzplantátumokat két órára vér áramlás hatásának exponáljuk a begyűjtés előtt.

A beoltott ér transzplantátumokat ezután bilaterálisan vég-oldal pozícióban implantáljuk a birka femorális és femorális artériákba. A femorális artéria egyik oldalán a beültetett ér transzplantátumot beoltottuk retroGFP-vel transzdukált EC-vel, a másik oldalon a beültetett ér transzplantátumot retroUP50-GFP-vel transzdukált EC-vel oltottuk be (femorális artériák). A femorális artériákban a beültetett ér transzplantátumot az egyik végén retroVEGF₁₆₅-GFP-vel transzdukált EC-vel, a beültetett ér transzplantátum másik végén retroUP50-GFP-vel transzdukált EC-vel oltottuk be. A beültetett ér transzplantátumok akadálymentességét 30 perccel az implantált ér transzplantátumok véráramnak való kitevése után és az ér transzplantátum begyűjtése előtt értékeljük közvetlen kitapintással, az áramlás méréseket Doppler áramlás mérővel (Transonic Animal Research Flowmeter, NY, USA), valamint szelektív angiográfiát használva végezzük (30. ábra).

A femorális ér transzplantátumon belüli áramlási sebességek mindkét oldalukon hasonlóak (körülbelül 50 ml/perc, 38%-a a femorális véráramlásnak). A carotid transzplantátumon keresztüli áramlás, ami magasabb a kísérlet elején, bilaterálisan csökken a két órás kísérlet végére az anasztomózis helynél fellépő trombózisnak köszönhetően (szekunder sebészeti komplikáció). A femorális és karotid ér



transzplantátumokat a beültetés utáni második órában összegyűjtjük. Mindkét ér transzplantátumot összegyűjtjük és az ér transzplantátumok lumenális felszínein levő celluláris retenciót fluoreszcensz mikroszkópiával elemezzük.

Az ér transzplantátum eltávolítása után a birkákat intravénás kálium-klorid alkalmazásával elpusztítjuk.

Az összes kísérletet a Technion ITT (Haifa, Israel) állatvédelmi és kísérlet végrehajtási törvényeknek megfelelően végezzük el.

Az alábbi eredményeket kapjuk.

Az UP50-GFP-t vagy VEGF-GFP-t túlexpresszázó sejtekkel beoltott ér transzplantátumok világosan nagyobb ér transzplantátumokhoz tapadó sejtszámot mutatnak az in vivo véráramlásnak való exponálás után, mint amit csak a GFP-t túlexpresszázó sejtek esetében tapasztaltunk, amint azt a GFP expresszió fluoreszcensz mikroszkópos láthatóvá tételével meghatároztuk (31. ábra). Az UP50-et túlexpresszázó sejtekkel beoltott ér transzplantátumok nagyobb megtapadt sejtszámot mutatnak, mint a GFP-t vagy a VEGF-et túlexpresszázó sejtekkel beoltott ér transzplantátumok.

Ezek az eredmények a statikus vagy áramlásos körülmények között végzett in vitro adhézión vizsgálatokból nyert eredményekkel egyetértésben, amint azt fent leírtuk, meggyőzően bizonyítják, hogy az EC, UP50 EC adhézión elősegítő faktor túlexpresszázására szolgáló genetikai módosítása ezen sejtek erősen fokozott adhéziónához vezet. Ezért, az ilyen genetikailag módosított sejtek szintetikus ér transzplantátumok beoltására való használata igen előnyös hosszú élettartamú és akadálymentes ér transzplantátumok létrehozásához.

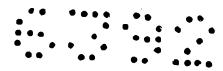
Az alábbiakban leírjuk a genetikailag módosított, autológ EC-vel beoltott mesterséges ér transzplantátumok hosszútávú implantációját birkákban.

Az eljáráshoz az alábbi anyagokat és módszereket használjuk.



A donor birkák hátsó lábából származó rövid vénás szegmensekből begyűjtött endoteliális sejteket laboratóriumban expandáljuk és virális vektorokkal genetikailag módosítjuk. A genetikailag módosított sejteket ér transzplantátumokra oltjuk és ezeket vég-vég pozícióban proximálisan és disztálisan autológ donor birkák femorális artériába implantáljuk. A genetikailag módosított sejtekkel beoltott ér transzplantátumot egy femorális artéria egyik oldalára implantáljuk, míg a csupán marker gént expresszáló sejtekkel beoltott ér transzplantátumot a femorális artéria másik oldalára implantáljuk. Hosszú távú és rövid távú (3, 7, 30 nap) kísérleteket végzünk el, hogy detektáljuk a sejt tapadást és a lokális trombózist és gyulladást. A hosszú távú ér transzplantátum élettartamot és akadálymentességet a 7., a 30. és a 180. napon ($n=5$ a VEGF és $n=5$ az UP50 esetében) értékeljük oly módon, hogy külsőleg mérjük az áramlást Doppler áramlásmérőt (Transonic Animal Research Flowmeter, NY, USA) használva. A megfigyelési periódus végén az ér transzplantátumokat kinyerjük és a neointimális képződést a kereszt szekciók morfológiai méréseivel értékeljük, a sejtek tapadását a marker gén expresszió detektálásával teszteljük.

Bár a jelen találmányt specifikus kiviteli alakjaival egyetértésben írtuk le, egyértelmű, hogy számos alternatíva, módosítás és variáció nyilvánvaló a tudomány e területén képzett szakember számára. Ennek megfelelően, szándékunk szerint a jelen találmány magába foglalja az összes alternatívát, módosítást és variációt, mely a jelen találmány körébe és a csatolt igénypontok széles körébe tartozik. Az összes publikáció, szabadalom, szabadalmi alkalmazás, valamint az ezekben leírt szekvencia, és/vagy a jelen találmányban GenBank katalógusszámon említett összes szekvencia a jelen specifikációban való hivatkozás révén teljes egészében a jelen találmány részét képezi, ugyanolyan mértékben, mintha az egyes publikációk, szabadalmi alkalmazások, szabadalmak vagy szekvenciák specifikusan és egyenként



jelölve lennének, hogy részét képezik a jelen találmánynak a hivatkozás révén. Ezen kívül, a jelen találmányban megadott bármely hivatkozás idézése vagy meghatározása nem tekinthető annak elismeréseként, hogy az ilyen hivatkozások elsőbbséget élveznek a jelen találmánnyal szemben.



Az alábbiakban megadjuk a jelen találmányban használt irodalmi hivatkozásokat.

A további hivatkozások a találmány leírásában találhatók meg.

1. VA Study Group 141. Comparative evaluation of prosthetic, reversed, and in situ vein bypass grafts in distal popliteal and tibial-peroneal revascularization. Arch Surg 1988;123:434-8.
2. Londrey GL, Ramsey DE, Hodgson KJ, Barkmeier LD, Sumer DS. Infrapopliteal bypass for severe ischemia: comparison of autogenous vein composite, and prosthetic grafts. J Vasc J 1991;13:631-6.
3. Darling RC, Linton RR. Durability of femoropopliteal reconstructions. Am J Surgery 1972;123:472-79.
4. Rutherford RB, Nishikimi N. Graft thrombosis and thromboembolic complications. In Rutherford RB ed. Vascular Surgery. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co;1989:501-510.
5. Eickhoff JH, Broome A, Ericsson BF, et al. Four years results of a prospective, randomized clinical trial comparing PTFE and modified human umbilical for below knee femoropopliteal bypass. J Vasc Surg 1987;6:506-511.
6. Meinhart J, Deutsch M, Zilla P. Eight years of clinical endothelial cell transplantation. Closing the gap between prosthetic grafts and vein grafts. ASAIO 1999;43:M515-21.
7. Falk J, Townsend LE, Vogel LM, Boyer M, et al. Improved adherence of genetically modified endothelial cells to small diameter expanded PTFE grafts in canine model. J Vasc Surg 1998;27:902-8.
8. Magometschnigg H, Kadletz M, Vodrazka M, et al. Prospective clinical study with in vitro endothelial cell lining of expanded



polytetrafluoroethylene grafts in crural repeat reconstruction. *J Vasc Surg* 1992;15:527-35.

9. Noishiki Y, Tomizawa Y, Yamane Y, Matsumoto A. Autocrine angiogenic vascular prosthesis with bone marrow transplantation. *Nature Medicine* 1996;2:90-93.

10. Clowes AW. Improving the interface between biomaterials and the blood – the gene therapy approach. *Circulation* 1996;93:1319-1320.

11. Dichek DA, Anderson J, Kelly AB, Hanson SR, Harker LA. Enhanced in vivo antithrombotic effects of endothelial cells expressing recombinant plasminogen activators transduced with retroviral vectors. *Circulation* 1996;93:301-309.

12. Gillis-Haegerstrand C, Frebelius S, Haegerstrand A, Swedenberg J. Cultured human endothelial cells seeded on expanded PTFE support thrombin mediated activation of protein C. *J Vasc Surg* 1996;24:226-34.

13. Pasic M, Muller-Glauser W, Odermatt B, Lachat M, Seifert B, Turina M. Seeding with omental cells prevents late neointimal hyperplasia in small-diameter grafts. *Circulation* 1995;92:2605-2616.

14. Edelman ER. Vascular tissue engineering. *Circ Res* 1999;85:11157

15. Leung DW, Cachians G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic factor. *Science* 1989;246:1306-1309.

16. Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997;277:48-50.

17. Huang XL. et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 1999, 264:133

18. Sapienza P, di Marzo L, Cucina A, et al. Release of PDGF-BB and bFGF by human endothelial cells seeded on ePTFE vascular grafts. *J Surg Res* 1998;75:24-9.



19. Van Belle E, Tio FO, Couffinhal T, Maillard L, Passeri J, Isner JM. Stent endothelialization. *Circulation* 1997;95:438-448.
20. Folkman J: Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs [editorial; comment.]. *Circulation* 1998;97:1108-1110
21. Anderson WF. Human gene therapy. *Nature* 392;25-30.
22. Mulligan RC: The basic science of gene therapy. *Science* 260:926-932, 1993.
23. Cosset F-L, Russell SJ. Targeting retrovirus entry. *Gene Therapy* 1996;3:946-956.
24. Nakamura T, Ruiz-Lozano P, Lindner V, et al. DANCE, a novel secreted RGD protein expressed in developing, atherosclerotic, and balloon injured arteries. *JBC* 1999; 274,:22476-22483.
25. Huber TS, Welling TH, Sarkar R, Messina LM, Stanley JC. Effects of retroviral-mediated t-PA gene transfer and expression on adherence and proliferation of canine endothelial cells seeded onto ePTFE. *J Vasc Surg* 1995;22:795-803.
26. Dunn PF, Newman KD, Jones M, Jamada I, Shayani V, Virmani R, Dichek DA. Seeding of vascular grafts with genetically modified endothelial cells; secretion of recombinant T-PA results in decreased seeded cell retention in vitro and in vivo. *Circulation* 1996;93:1439-1446.
27. Zilla P, Greisler HP (Eds). *Tissue engineering of vascular prosthetic grafts*. RG Landes Company, Austin, Texas, USA 1999.
28. He TC. et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:2509.
29. Flugelman MY. et al., *Circulation Research* 1992, 70:348.
30. Asahara T. et al., *EMBO J*. 1999, 18:3964.
31. Agha-Mohammadi S. and Lotze MT. *J Clinical Investigations* 2000, 105: 1177.
32. Dichek DA. et al, *Blood* 1991, 77:533.
33. Korff T. et al. *J Cell Biol*. 1998, 143:1341.



34. Steele JG, Johnson G, Norris VD, Underwood PA. Adhesion and growth of cultured human endothelial cells perfluorosulphonate: role of vitronectin and fibronectin in cell attachment. *Biomaterials* 1991 Aug;12(6):531-9.
35. Y. Marois, M.F. Sigot-Luizard and R. Guidoin, Endothelial cell behavior on vascular prosthetic grafts: effect of polymer chemistry, surface structure, and surface treatment. *Asaio, J.* 45 4 (1999), pp. 272-280.
36. G.W. Bos, N.M. Scharenborg, A.A. Poot, G.H. Engbers, J.G. Terlingen, T. Beugeling, W.G. Van Aken and J. Feijen, Adherence and proliferation of endothelial cells on surface-immobilized albumin-heparin conjugate. *Tissue Eng.* 43 (1998), pp. 267-279.
37. G.W. Bos, N.M. Scharenborg, A.A. Poot, G.H. Engbers, T. Beugeling, W.G. van Aken and J. Feijen, Proliferation of endothelial cells on surface-immobilized albumin-heparin conjugate loaded with basic fibroblast growth factor. *J. Biomed. Mater. Res.* 44 3 (1999), pp. 330-340.
38. H.M. Carr, R. Vohra, H. Sharma, J.V. Smyth, O.B. Rooney, P.D. Dodd and M.G. Walker, Endothelial cell seeding kinetics under chronic flow in prosthetic grafts. *Ann, Vasc. Surg.* 10 5 (1996), pp. 469-475.
39. R. Vohra, G.J. Thomson, H.M. Carr, H. Sharma and M.G. Walker, Comparison of different vascular prostheses and matrices in relation to endothelial seeding. *Br. J. Surg.* 78 4 (1991), pp. 417-420.
40. G.B. Koveker, L.M. Graham, W.E. Burkel, R. Sell, T.W. Wakefield, K. Dietrich and J.C. Stanley, Extracellular matrix preparation of expanded polytetrafluoroethylene grafts seeded with endothelial cells: influence on early platelet deposition, cellular growth, and luminal prostacyclin release. *Surgery* 109 3 Part 1 (1991), pp. 313-319.
41. J.E. Hasson, D.H. Wiebe, J.B. Sharefkin, P.A. D'Amore and W.M. Abbott, Use of tritiated thymidine as a marker to compare the



effects of matrix proteins on adult human vascular endothelial cell attachment: implications for seeding of vascular prostheses. *Surgery* 100 5 (1986), pp. 884-892.

42. R.B. Patterson, J.D. Keller, E.B. Silberstein and R.F. Kempczinski, A comparison between fibronectin and Matrigel pretreated ePTFE vascular grafts. *Ann Vasc. Surg.* 3 2 (1989), pp. 160-166.

43. H.M. Carr, R. Vohra, M. Welch, O.B. Rooney, H. Sharma and M.G. Walker, Fibronectin binding to gelatin-impregnated Dacron (Gelseal) prostheses. *Artif. Organs* 16 4 (1992), pp. 342-345.

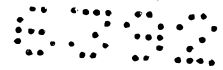
44. A. Sank, K. Rostami F. Weaver, D. Ertl, A. Yellin, M. Nimni and T.L. Tuan, New evidence and new hope concerning endothelial seeding of vascular grafts. *Am. J. Surg.* 164 3 (1992), pp. 199-204.

45. G.J. Thomson, R.K. Vohra, M.H. Carr and M.G. Walker, Adult human endothelial cell seeding using expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts: a comparison of four substrates. *Surgery* 109 1 (1991), pp. 20-27.

46. Braddock M, Schwachtgen JL, Houston P, Dickson MC, Lee M.J. Campbell CJ. Fluid Shear Stress Modulation of Gene Expression in endothelial Cells. *News Physiol Sci.* 1998 Oct;13:241-246.

47. Morimoto M, Kume N, Miyamoto S, Ueno Y, Kataoka H, Minami M, Hayashida K, Hashimoto N, Kita T. Lysophosphatidylcholine induces early growth response factor-1 expression and activates the core promoter of pdgf-a chain in vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* 2001 May;21(5):771-6.

48. Ogasawara A, Arakawa T, Kaneda T, Takuma T, Sato T, Kaneko H, Kumegawa M, Hakeda Y. Fluid Shear Stress-induced cyclooxygenase-2 Expression Is Mediated by C/EBP beta, cAMP-response element-binding Protein, and AP-1 in Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *J Biol Chem.* 2001 Mar. 9;276(10):7048-54.



49. Lin K, Hsu PP, Chen BP, Yuan S, Usami S, Shyy JY, Li YS, Chien S. Free in PMC. Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress. Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Aug 15;97(17):9385-9.

50. Houston P, White BP, Campbell CJ, Braddock M. Delivery and a expression of fluid shear stress-inducible promoters to the vessel wall: applications for cardiovascular gene therapy. Hum Gene Ther. 1999 Dec 10;10(18):3031-44.

51. Nakamura T. et al., J Biol Chem. 1999, 274:22476.

52. Shattil, SJ., and Ginsberg, MH. J. Clin. Invest. 1997, 100:S91.

53. Hynes, RO., Cell 1992, 69:11.

54. Doolittle RF. et al., Nature 1984, 307:558.

55. Selander-Sunnerhagen, M. et al., J. Biol. Chem. 1992, 267:19642.

56. Apella E. et al. FEBS Lett 1988 231:1.

57. Kowal RC. et al., Circ Res. 1999, 84:1166.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy egy szintetikus cső alakú elemből áll, melynek luminális felszínét számos endoteliális sejttel és/vagy simaizom sejttel burkoltuk, melyeket genetikailag úgy transzformáltunk, hogy legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljanak.
2. Az 1. igénypont szerinti mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy az említett endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek sokaságának első részét genetikailag úgy transzformáltuk, hogy legalább egy említett sejt proliferációs növekedési faktort expresszáljon, valamint ahol az említett endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek említett sokaságának második részét úgy transzformáltuk, hogy legalább egy említett celluláris tapadási faktort expresszáljon.
3. Az 1. igénypont szerinti mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy az említett luminális felszín politetrafluoretilén (PTFE), expandált politetrafluoretilén (ePTFE), poliészter rostokból, DacronTM, és feldolgozott állati véredényből készül.
4. Az 1. igénypont szerinti mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy az említett szintetikus tubuláris elem lényegében a véredény belső keresztmetszeti területével megegyező belső keresztmetszeti területet jelent.
5. A 4. igénypont szerinti mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy az említett szintetikus tubuláris elem belső keresztmetszeti területe körülbelül 7 – 700 mm² között van.



6. Az 1. igénypont szerinti mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy az endoteliális sejtek említett sokasága véna szegmensből, csontvelő őssejtekből, perifériás vér őssejtekből és keringő endoteliális sejtekből származik.

7. Az 1. igénypont szerinti mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy az endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek említett sokasága a mesterséges ér transzplantátumot kapó személyből származik.

8. Az 1. igénypont szerinti mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy az endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek említett sokasága humán vagy állati donorból származik.

9. Az 1. igénypont szerinti mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy az endoteliális sejtek említett sokasága az említett belső lumenális felszínen összefüggő monoréteget képez.

10. Az 1. igénypont szerinti mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy az említett legalább egy sejt proliferációs növekedési faktor VEGF-et, savas vagy bázisos FGF-et vagy HGF-et jelent.

11. Az 1. igénypont szerinti mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy az említett legalább egy celluláris tapadási faktor UP50-et, DANCE-t, vitronectint, albumint, I-es kollagént, IV-es kollagént, fibronectint vagy Laminint jelent.

12. Az 1. igénypont szerinti mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy az endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek említett



sokaságát úgy transzformáltuk genetikailag, hogy a továbbiakban legalább egy marker polipeptidet is expresszáljanak.

13. Transzformált endoteliális sejt vagy simaizom sejt azzal jellemezve, hogy a sejteket úgy transzformáltuk genetikailag, hogy legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljanak.

14. A 13. igénypont szerinti transzformált endoteliális sejt vagy simaizom sejt azzal jellemezve, hogy ezeket a sejteket genetikailag úgy transzformáltuk, hogy legalább egy marker polipeptidet is expresszáljanak.

15. A 13. igénypont szerinti transzformált endoteliális sejt vagy simaizom sejt azzal jellemezve, hogy az említett endoteliális sejt egy véna szegmensből, csontvelő őssejtekből, perifériás vér őssejtekből vagy keringő endoteliális sejtekből származik.

16. A 13. igénypont szerinti transzformált endoteliális sejt vagy simaizom sejt azzal jellemezve, hogy az említett endoteliális sejt vagy simaizom sejt humán vagy állati donorból származik.

17. A 13. igénypont szerinti transzformált endoteliális sejt vagy simaizom sejt azzal jellemezve, hogy az említett sejt proliferációs növekedési faktor VEGF-et, savas vagy bázisos FGF-et vagy HGF-et jelent.

18. A 13. igénypont szerinti transzformált endoteliális sejt vagy simaizom sejt azzal jellemezve, hogy az említett celluláris tapadási faktor



UP50-et, DANCE-t, vitronectint, albumint, I-es kollagént, IV-es kollagént, fibronectint vagy Laminint jelent.

19. Mesterséges ér transzplantátum előállítására szolgáló módszer azzal jellemezve, hogy az alábbi lépésekből áll:

- (a) az endoteliális sejteket és/vagy simaizom sejteket genetikailag transzformáljuk oly módon, hogy legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljanak; és
- (b) az említett endoteliális sejteket és/vagy simaizom sejteket luminális felszínnel rendelkező szintetikus tubuláris elemekkel szaporítjuk, míg az említett luminális felszínen elegendő endoteliális sejt és/vagy simaizom sejt borítást kapunk.

20. A 19. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az (a) lépést úgy végezzük el, hogy az említett endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek első részét oly módon transzformáljuk genetikailag, hogy legalább egy említett sejt proliferációs növekedési faktort expresszáljanak, és oly módon transzformáljuk genetikailag az említett endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek második részét, hogy legalább egy említett celluláris tapadási faktort expresszáljanak.

21. A 19. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett (a) lépés az említett (b) lépést megelőzi.

22. A 19. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett (b) lépés az említett (a) lépést megelőzi.



23. A 19. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett endoteliális sejtek egy véna szegmensből, csontvelő őssejtekből, perifériás vér őssejtekből vagy keringő endoteliális sejtekből származnak.

24. A 19. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett mesterséges ér transzplantátum luminális felszínét áramlási erők hatásának tesszük ki.

25. A 19. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az említett mesterséges ér transzplantátumot bypass sebészeti beavatkozásban használjuk.

26. Nukleinsav expressziós szerkezet azzal jellemezve, hogy magába foglal:

- (a) egy sejt proliferációs növekedési faktort kódoló első polinukleotid szegmenst; és
- (b) egy celluláris tapadási faktort kódoló második polinukleotid szegmenst.

27. A 26. igénypont szerinti nukleinsav expressziós szerkezet azzal jellemezve, hogy tartalmaz még legalább egy promóter szekvenciát is az említett első és az említett második polinukleotid szegmensek legalább egyike expressziójának irányításához.

28. A 27. igénypont szerinti nukleinsav szerkezet azzal jellemezve, hogy az említett első polinukleotid szegmenst transzkripcióval az említett második polinukleotid szegmenshez kapcsoljuk, ahol az említett első és második polinukleotid szegmens az említett legalább egy promóter szekvencia egyetlen promóter szekvenciájának transzkripciós szabályozása alatt áll.

29. A 28. igénypont szerinti nukleinsav szerkezet azzal jellemezve, hogy az említett első és az említett második polinukleotid szegmensek közé helyezve még egy kötő szekvenciát is tartalmaz.

30. A 29. igénypont szerinti nukleinsav szerkezet azzal jellemezve, hogy az említett kötő szekvencia IRES-t vagy egy proteáz hasítási felismerő helyet tartalmaz.

31. A 26. igénypont szerinti nukleinsav expressziós szerkezet azzal jellemezve, hogy az említett legalább egy promóter eukarióta sejtekben funkcióképességgel rendelkezik.

32. A 26. igénypont szerinti nukleinsav expressziós szerkezet azzal jellemezve, hogy az említett legalább egy promóter egy konstitutív promótert, egy indukálható promótert vagy egy szövet specifikus promótert jelent.

33. A 26. igénypont szerinti nukleinsav expressziós szerkezet azzal jellemezve, hogy az alábbiakat tartalmazza:

- (a) egy első promóter szekvenciát, mely az említett első polinukleotid szegmens irányítására szolgál; és
- (b) egy második promóter szekvenciát, mely az említett második polinukleotid szegmens expressziójának irányítására szolgál.

34. A 33. igénypont szerinti nukleinsav expressziós szerkezet azzal jellemezve, hogy az említett első promóter és az említett második promóter egy konstitutív promótert, egy indukálható promótert vagy egy szövet specifikus promótert jelent.

35. A 34. igénypont szerinti nukleinsav expressziós szerkezet azzal jellemezve, hogy az említett indukálható promótert ugyanaz az effektor molekula szabályozhatja.

36. A 26. igénypont szerinti nukleinsav expressziós szerkezet azzal jellemezve, hogy legalább egy további polinukleotid szegmenst tartalmaz, mely egy marker polipeptidet kódol.

37. A 36. igénypont szerinti nukleinsav expressziós szerkezet azzal jellemezve, hogy az említett marker polipeptid egy szelekciós polipeptidet, vagy egy riporter polipeptidet jelent.

38. A 36. igénypont szerinti nukleinsav expressziós szerkezet azzal jellemezve, hogy az említett legalább egy további polinukleotid szegmens az említett első és említett második polinukleotid szegmens egyikéhez transzkripciósan kötődik.

39. A 36. igénypont szerinti nukleinsav szerkezet azzal jellemezve, hogy az említett legalább egy további polinukleotid szegmens az említett első és említett második polinukleotid szegmens egyikéhez a kötő szegmensen keresztül transzkripciósan kötődik.

40. A 39. igénypont szerinti nukleinsav szerkezet azzal jellemezve, hogy az említett kötő szegmens szekvencia IRES-t vagy egy proteáz hasítási felismerő helyet tartalmaz.

41. A 36. igénypont szerinti nukleinsav szerkezet azzal jellemezve, hogy az említett legalább egy további polinukleotid szegmens az említett első és az említett második polinukleotid szegmens legalább egyikéhez transzlációsan fúzionálódik.



42. Egy nukleinsav expressziós szerkezet rendszer azzal jellemezve, hogy

- (a) egy első nukleinsav expressziós szerkezetet tartalmaz, mely magába foglal egy első polinukleotid szegmenst, mely egy sejt proliferációs növekedési faktort kódol; és
- (b) egy második nukleinsav expressziós szerkezetet, mely magába foglal egy második polinukleotid szegmenst, mely a celluláris tapadási faktort kódolja.

43. A 42. igénypont szerinti nukleinsav expressziós szerkezet rendszer azzal jellemezve, hogy az említett első és említett második nukleinsav expressziós szerkezetek egyike még tartalmaz legalább egy további polinukleotid szegmenst, mely egy marker polipeptidet kódol.

44. A 42. igénypont szerinti nukleinsav expressziós szerkezet rendszer azzal jellemezve, hogy tartalmaz még legalább egy promóter szekvenciát, mely az említett első és említett második polinukleotid szegmens legalább egyikének az expresszióját irányítja.

45. A 42. igénypont szerinti nukleinsav expressziós szerkezet rendszer azzal jellemezve, hogy az említett legalább egy promóter szekvencia eukarióta sejtekben funkcióképes.

46. A 42. igénypont szerinti nukleinsav expressziós szerkezet rendszer azzal jellemezve, hogy az említett legalább egy promóter szekvencia egy konstitutív promótert, egy indukálható promótert vagy egy szövet specifikus promótert tartalmaz.



47. A 43. igénypont szerinti nukleinsav expressziós szerkezet rendszer azzal jellemezve, hogy az említett marker polipeptid egy szelekciós polipeptidet vagy egy riporter polipeptidet jelent.

48. A 43. igénypont szerinti nukleinsav expressziós szerkezet rendszer azzal jellemezve, hogy az említett legalább egy további polinukleotid szegmens az említett első és említett második polinukleotid szegmens legalább egyikéhez transzkripciósan kötődik.

49. Kit azzal jellemezve, hogy legalább egy csövet tartalmazó állványt foglal magába, az említett legalább egy cső egy nukleinsav expressziós szerkezet rendszert foglal magába, az említett nukleinsav expressziós szerkezet rendszer az alábbiakból áll:

- (a) egy első nukleinsav expressziós szerkezetből, mely egy első polinukleotidot tartalmaz, mely egy sejt proliferációs növekedési faktort kódol; és
- (b) egy második nukleinsav expressziós szerkezetből, mely egy második polinukleotidot tartalmaz, mely a celluláris tapadási faktort kódolja.

50. Kit azzal jellemezve, hogy legalább egy csövet tartalmazó állványt foglal magába, az említett legalább egy cső egy nukleinsav expressziós szerkezet rendszert foglal magába, az említett nukleinsav expressziós szerkezet az alábbiakból áll:

- (a) egy első polinukleotidból, mely egy sejt proliferációs növekedési faktort kódol; és
- (b) egy második polinukleotidból, mely a celluláris tapadási faktort kódolja.



51. Genetikailag transzformált endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek létrehozására szolgáló módszer azzal jellemezve, hogy

- (a) az endoteliális sejteket és/vagy simaizom sejteket egy emlős szövet forrásból nyerjük ki; és
- (b) az említett endoteliális sejteket és/vagy simaizom sejteket úgy transzformáljuk, hogy legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljanak.

52. Egy személy érrendszere legalább egy részének bypass eljáráshoz vagy helyettesítéséhez való módszer azzal jellemezve, hogy a módszer során az egyén érrendszerébe egy mesterséges ér transzplantátumot ültetünk be oly módon, hogy folyadék kommunikáció jöjjön létre az érrendszer és az említett mesterséges ér transzplantátum között, mely egy olyan szintetikus cső alakú elemet foglal magába, mely endoteliális sejtek és/vagy a simaizom sejtek sokaságával burkolt lumenális felszínnel rendelkezik; a sejteket genetikailag úgy transzformáltuk, hogy legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljanak.

53. Az 52. igénypont szerinti módszer azzal jellemezve, hogy az endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek említett sokaságának első részét úgy transzformáljuk genetikailag, hogy legalább egy említett sejt proliferációs növekedési faktort expresszáljanak, valamint az említett endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek említett sokaságának második részét úgy transzformáljuk genetikailag, hogy legalább egy említett celluláris tapadási faktort expresszáljanak.

54. Az 52. igénypont szerinti mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy az említett szintetikus tubuláris elem egy belső



keresztmetszeti területet tartalmaz, mely lényegében egy véredény belső keresztmetszeti területének felel meg.

55. Az 54. igénypont szerinti mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy az említett szintetikus tubuláris elem belső keresztmetszeti területe körülbelül $7 - 700 \text{ mm}^2$ között van.

56. Egy mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy egy szintetikus tubuláris elemet tartalmaz, mely endoteliális sejtekkel és simaizom sejtekkel burkolt luminális felszínnel rendelkezik, az említett endoteliális sejtek és simaizom sejtek legalább egyikét úgy transzformáltuk genetikailag, hogy legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljanak.

57. Mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy egy szintetikus tubuláris elemet tartalmaz, mely olyan endoteliális sejtek sokaságával burkolt luminális felszínnel rendelkezik, mely sejteket úgy transzformáltunk genetikailag, hogy UP50-et és VEGF-et expresszáljanak.

58. Mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy egy szintetikus tubuláris elemet tartalmaz, mely olyan simaizom sejtek sokaságával burkolt luminális felszínnel rendelkezik, mely sejteket úgy transzformáltunk genetikailag, hogy UP50-et és VEGF-et expresszáljanak.

59. Mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy egy szintetikus tubuláris elemet tartalmaz, mely olyan endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek sokaságával burkolt luminális felszínnel

rendelkezik, mely sejteket úgy transzformáltunk genetikailag, hogy UP50-et és egy sejt proliferációs növekedési faktort expresszáljanak, mely savas vagy bázikus FGF vagy HGF lehet.

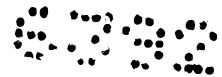
60. Mesterséges ér transzplantátum előállítására szolgáló módszer azzal jellemezve, hogy a következőkből áll:

- (a) genetikailag transzformálunk endoteliális sejteket és/vagy simaizom sejteket, hogy UP50-et és VEGF-et expresszáljanak; és
- (b) az említett endoteliális sejteket és/vagy simaizom sejteket egy luminális felszínnel rendelkező szintetikus tubuláris elem belsejében szaporítjuk, míg az említett luminális felszínt az említett endoteliális sejtek és/vagy simaizom sejtek megfelelő mértékben beburkolják.

61. Mesterséges ér transzplantátum előállítására szolgáló módszer azzal jellemezve, hogy a következőkből áll:

- (a) endoteliális sejteket és simaizom sejteket biztosítunk, az említett endoteliális sejtek és simaizom sejtek legalább egyikét genetikailag úgy transzformáljuk, hogy UP50-et és VEGF-et expresszáljanak; és
- (b) ezt követően, vagy ezzel egy időben az említett endoteliális sejteket és simaizom sejteket egy luminális felszínnel rendelkező szintetikus tubuláris elem belsejében szaporítjuk, míg az említett luminális felszínt az említett endoteliális sejtek és simaizom sejtek megfelelő mértékben beburkolják.

62. Mesterséges ér transzplantátum azzal jellemezve, hogy tartalmaz egy szintetikus tubuláris elemet, mely endoteliális sejtek sokaságával burkolt luminális felszínnel és simaizom sejtek sokaságával burkolt külső felszínnel rendelkezik.



63. A 62. igénypont szerinti mesterséges ér transplantátum azzal jellemezve, hogy az említett endoteliális sejtek sokaságát genetikailag úgy transzformáltuk, hogy legalább egy sejt proliferációs növekedési faktort és legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljanak.

64. A 62. igénypont szerinti mesterséges ér transplantátum azzal jellemezve, hogy az említett simaizom sejtek sokaságát genetikailag úgy transzformáltuk, hogy legalább egy celluláris tapadási faktort expresszáljanak.

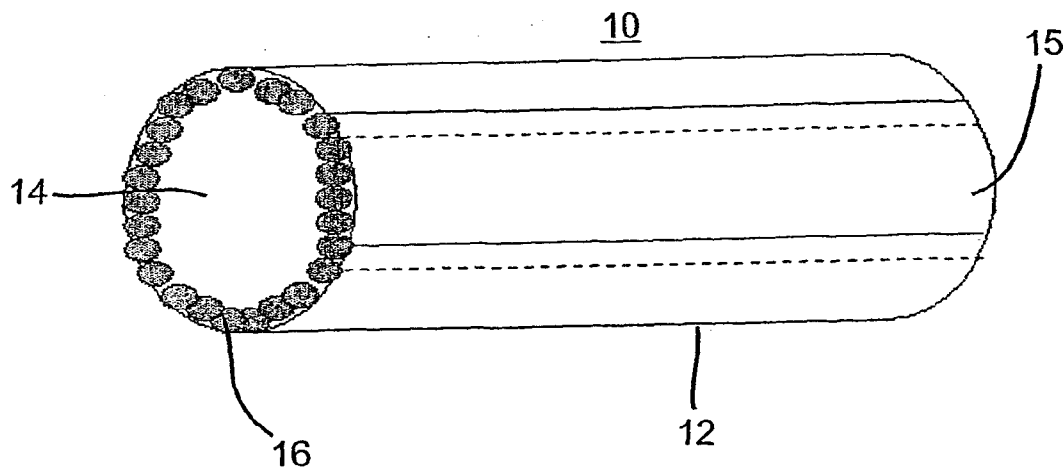
A meghatalmazott

Szentpéteri Zsolt
szabadalmi ügyvivő
az S.B.G. & K. Szabadalmi Ügyvivői Iroda
tagja
H-1062 Budapest, Andrássy út 113.
Telefon: 461-1000 Fax: 461-1099

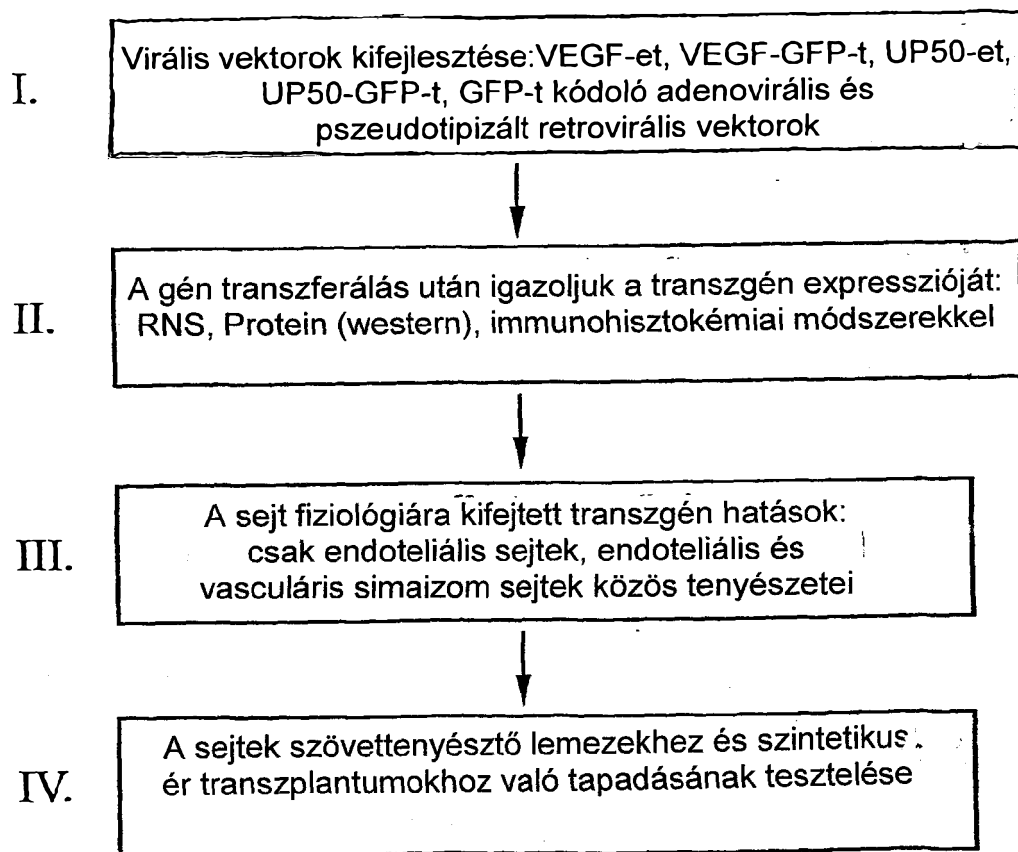
88 oldal
21 oldal
2 oldal mérk.

111 oldal
Bensz

1/21

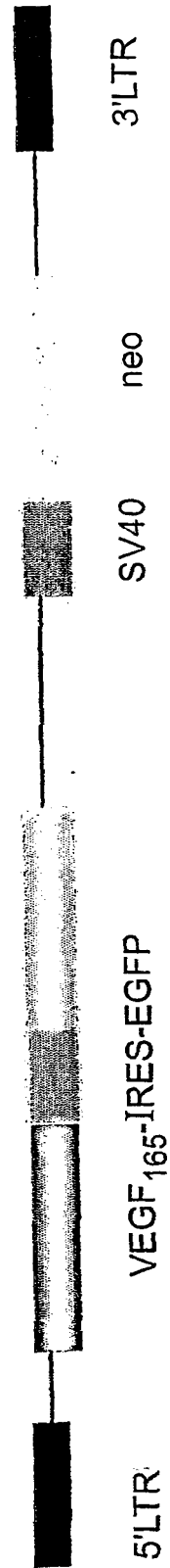
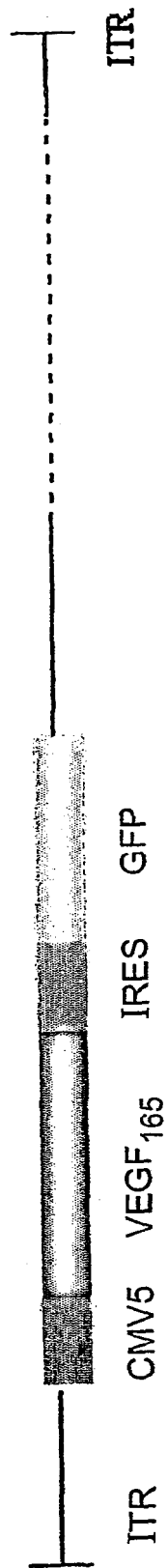


1. ábra

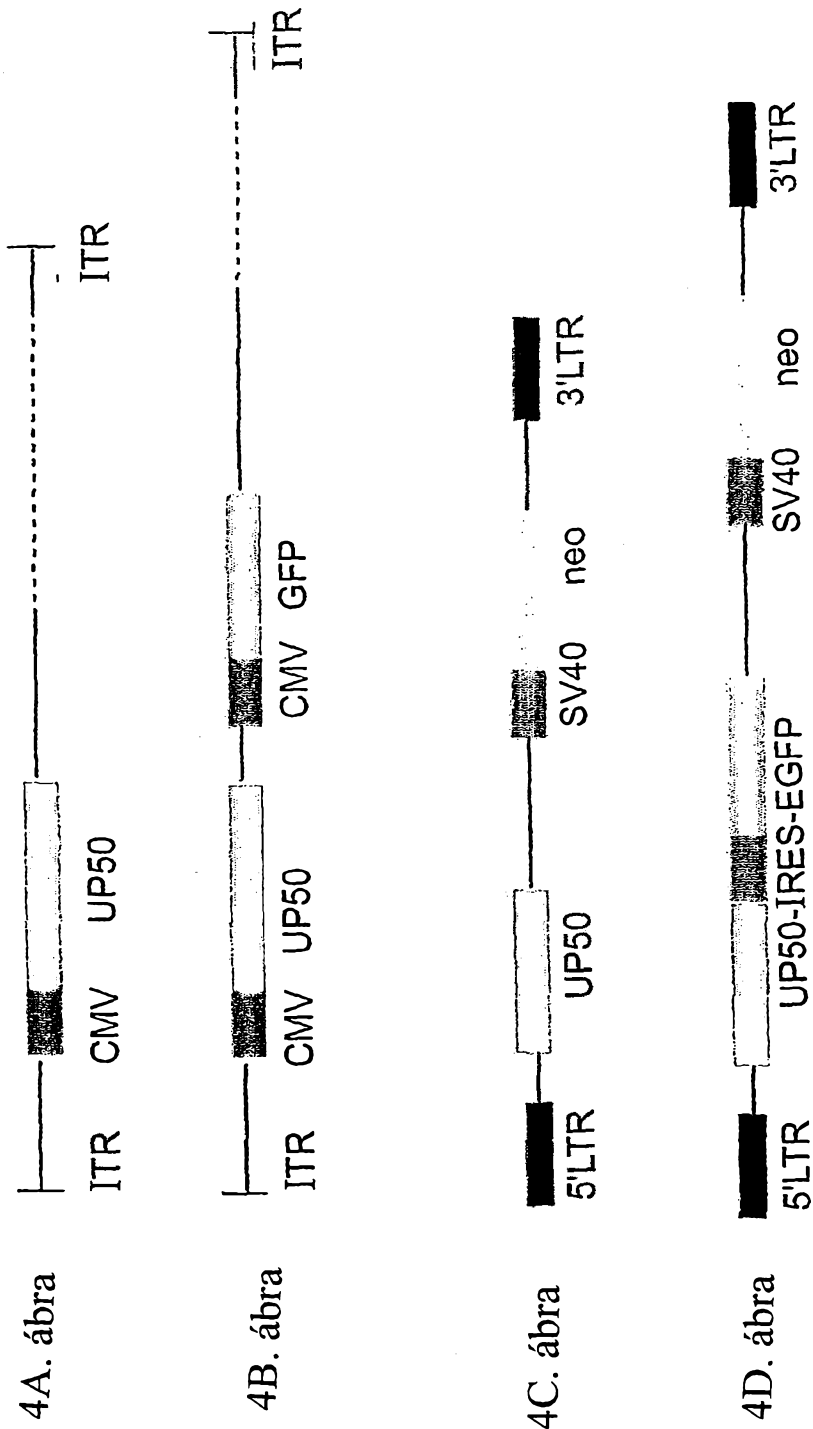


2. ábra

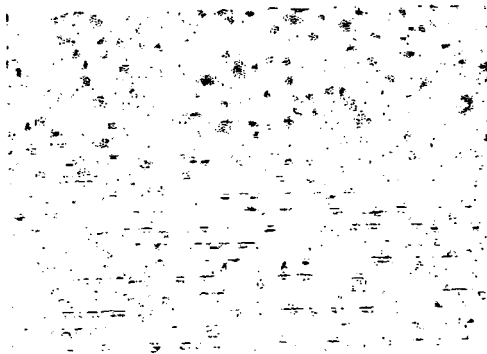
2/21



3/21



4/21



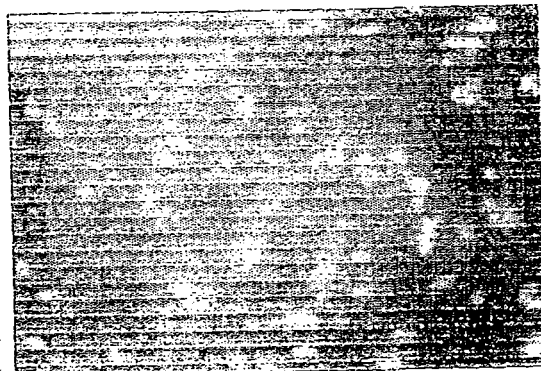
5A. ábra



5B. ábra

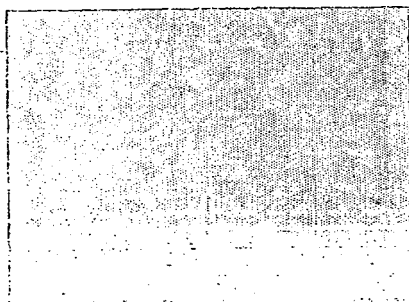


6A. ábra



6B. ábra

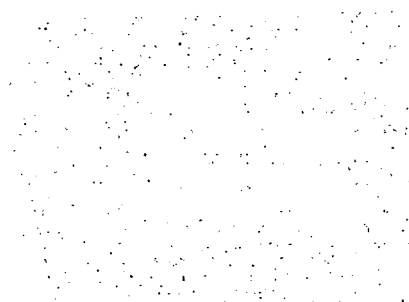
5/21



7A. ábra



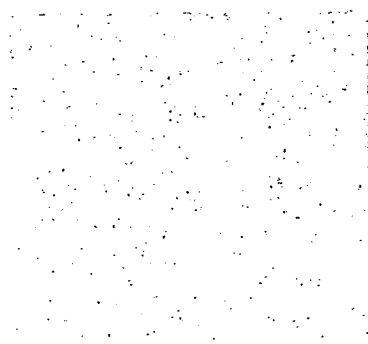
7B. ábra



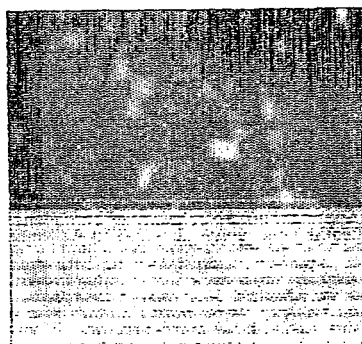
7C. ábra



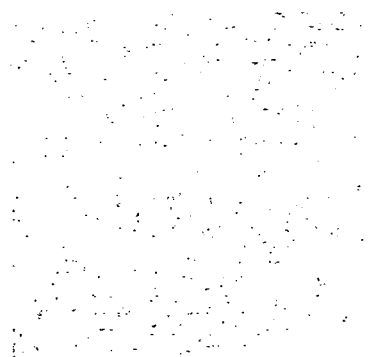
7d. ábra



8A. ábra



8B. ábra



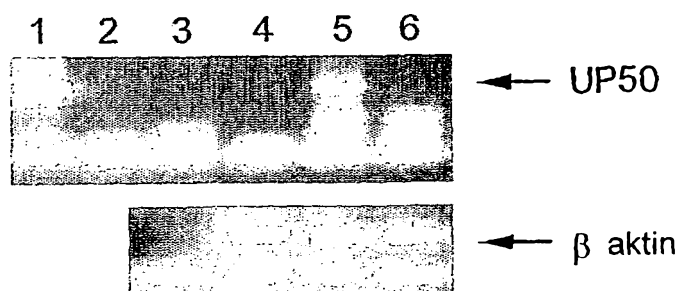
8c. ábra



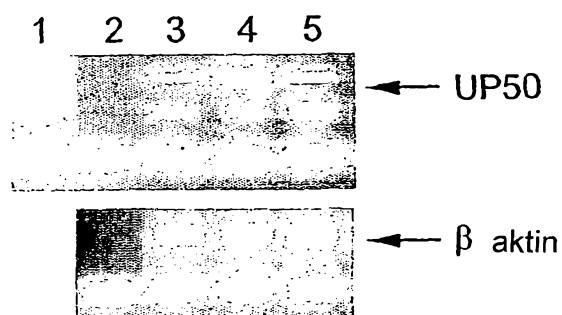
8D. ábra

6/21

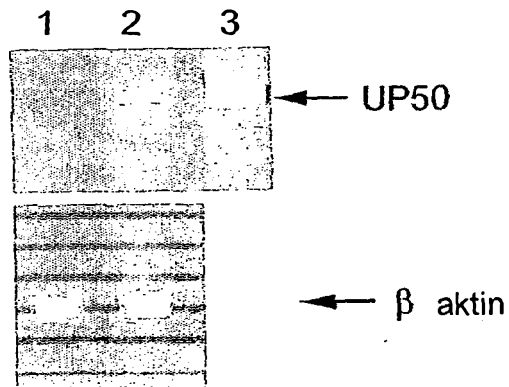
9A. ábra



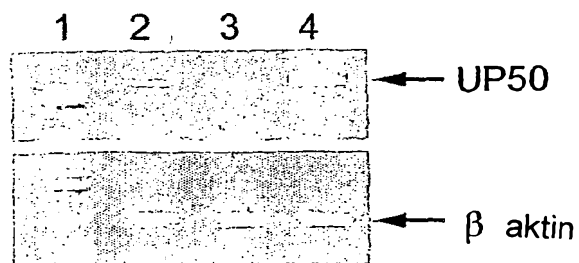
9B. ábra



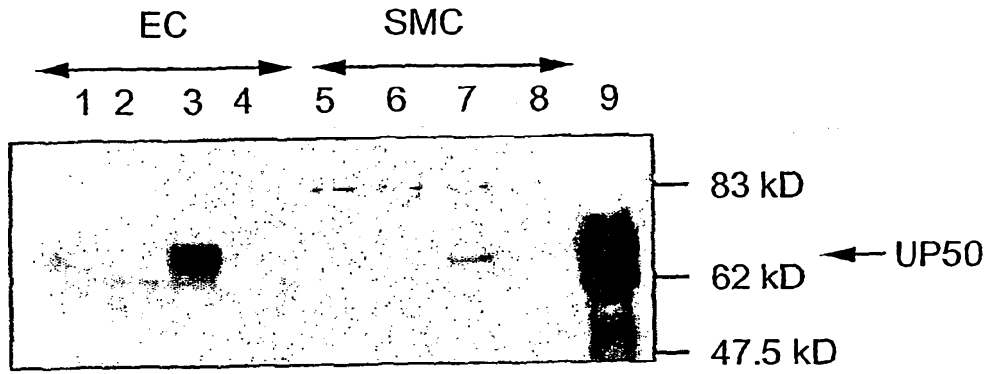
10A. ábra



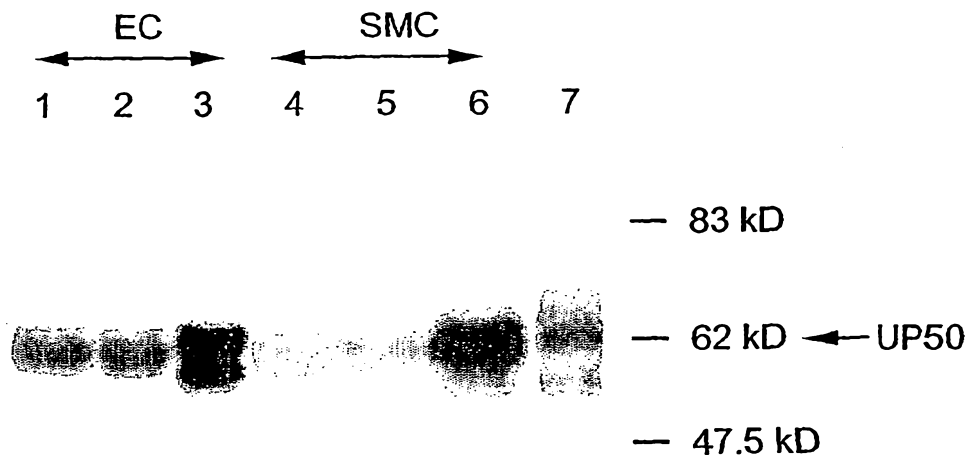
10B. ábra



7/21

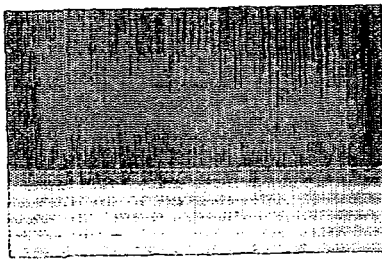


11. ábra



12. ábra

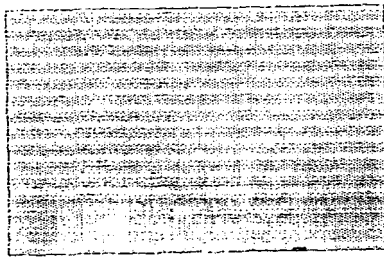
8/21



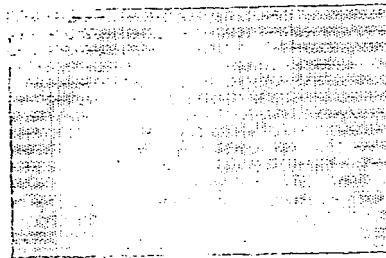
13A. ábra



13B. ábra



13C. ábra



13D. ábra

rAdGFP

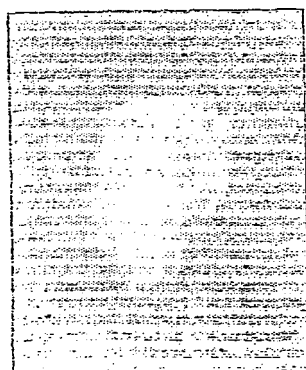


14A. ábra

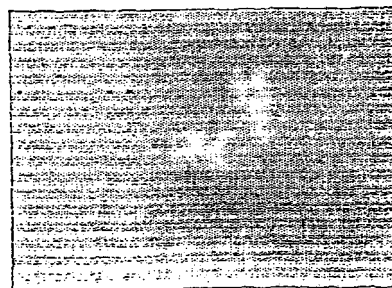
rAdUP50



14B. ábra



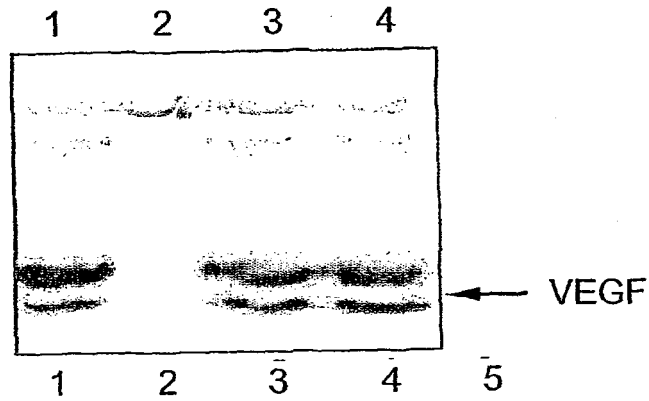
14C. ábra



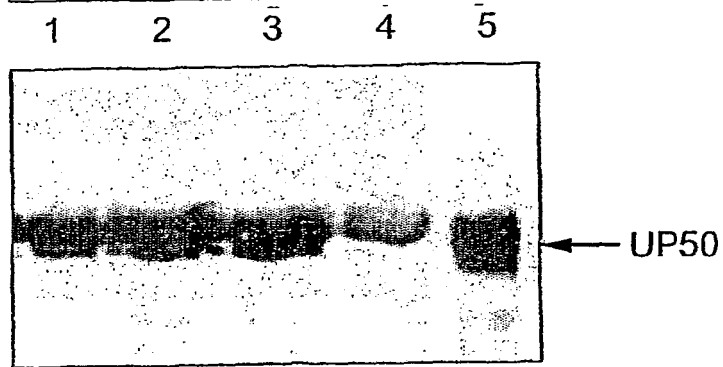
15. ábra

9/21

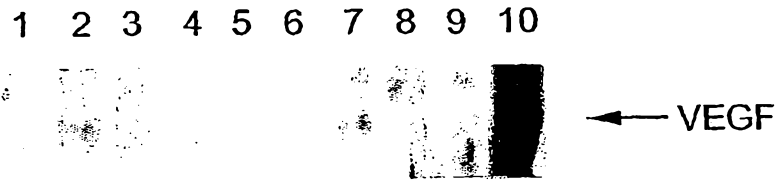
16A. ábra



16B. ábra

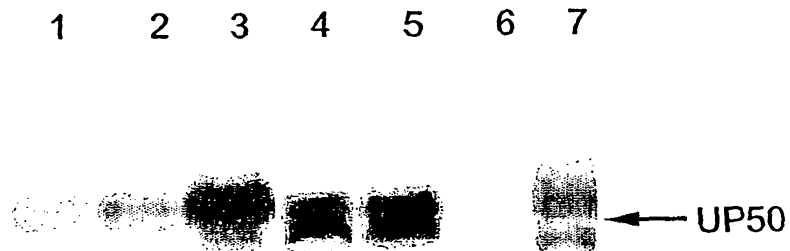


17A. ábra

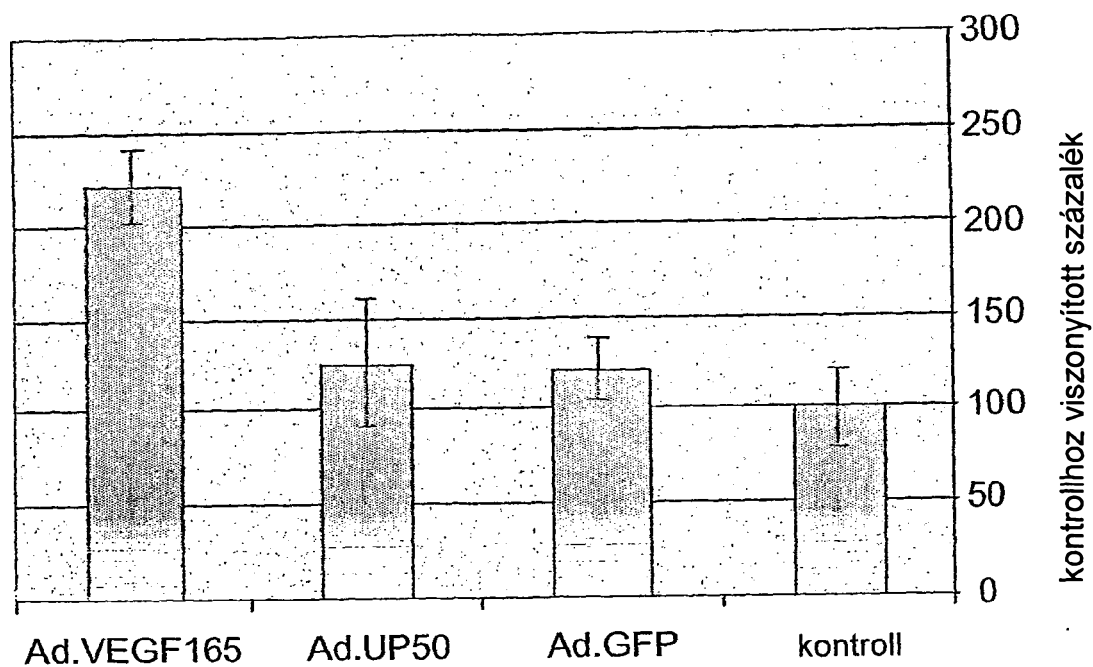


B

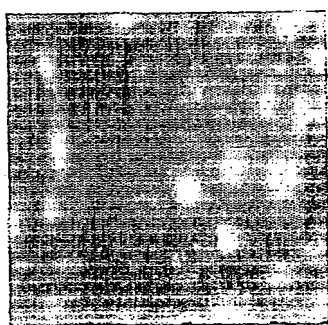
17B. ábra



10/21



18. ábra



19A. ábra



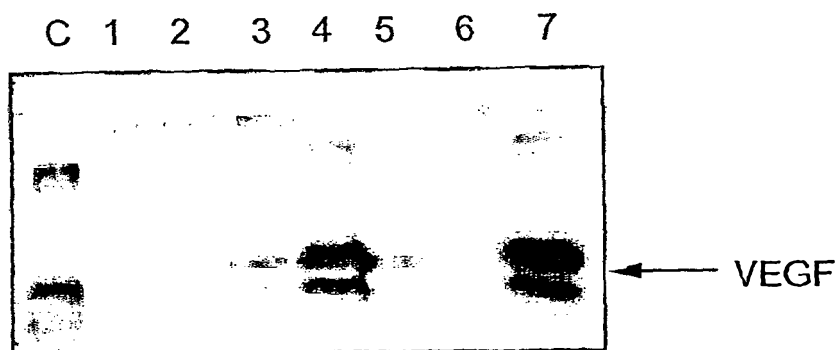
19B. ábra



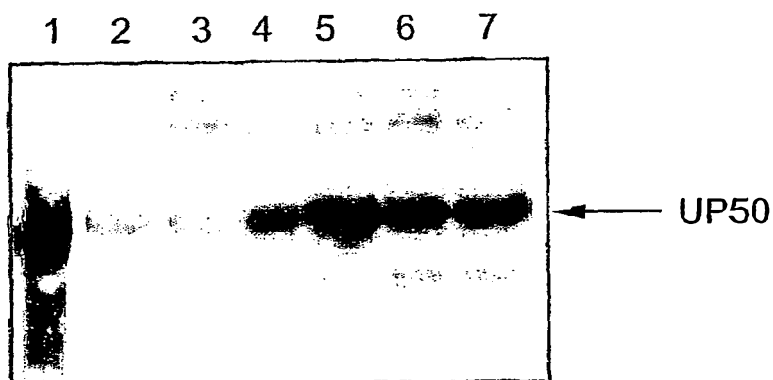
19C. ábra

11/21

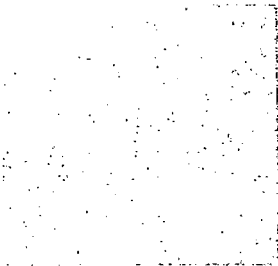
20A. ábra



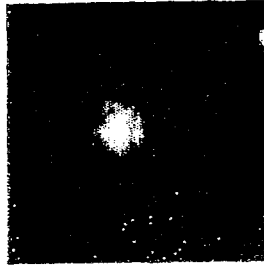
20B. ábra



12/21



21A. ábra



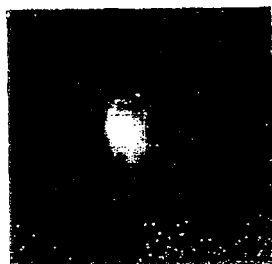
21B. ábra



21C. ábra



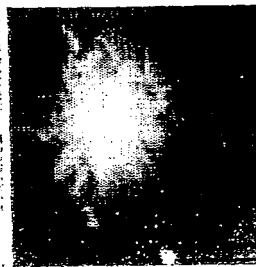
21D. ábra



21E. ábra

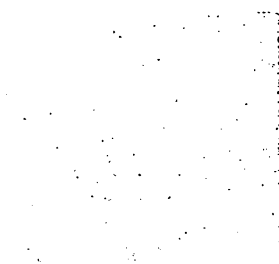


21F. ábra



21G. ábra

21H. ábra



22A. ábra



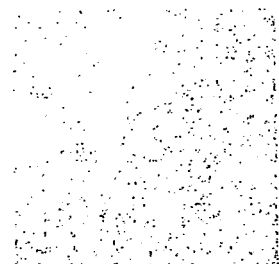
22B. ábra



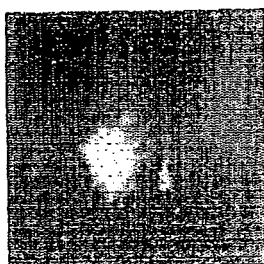
22C. ábra



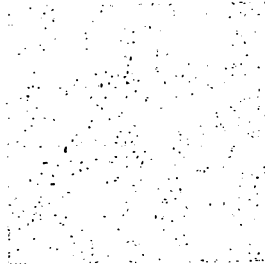
22D. ábra



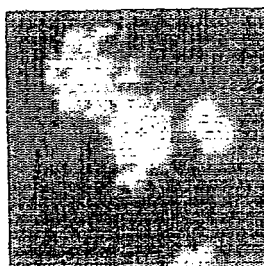
22E. ábra



22F. ábra

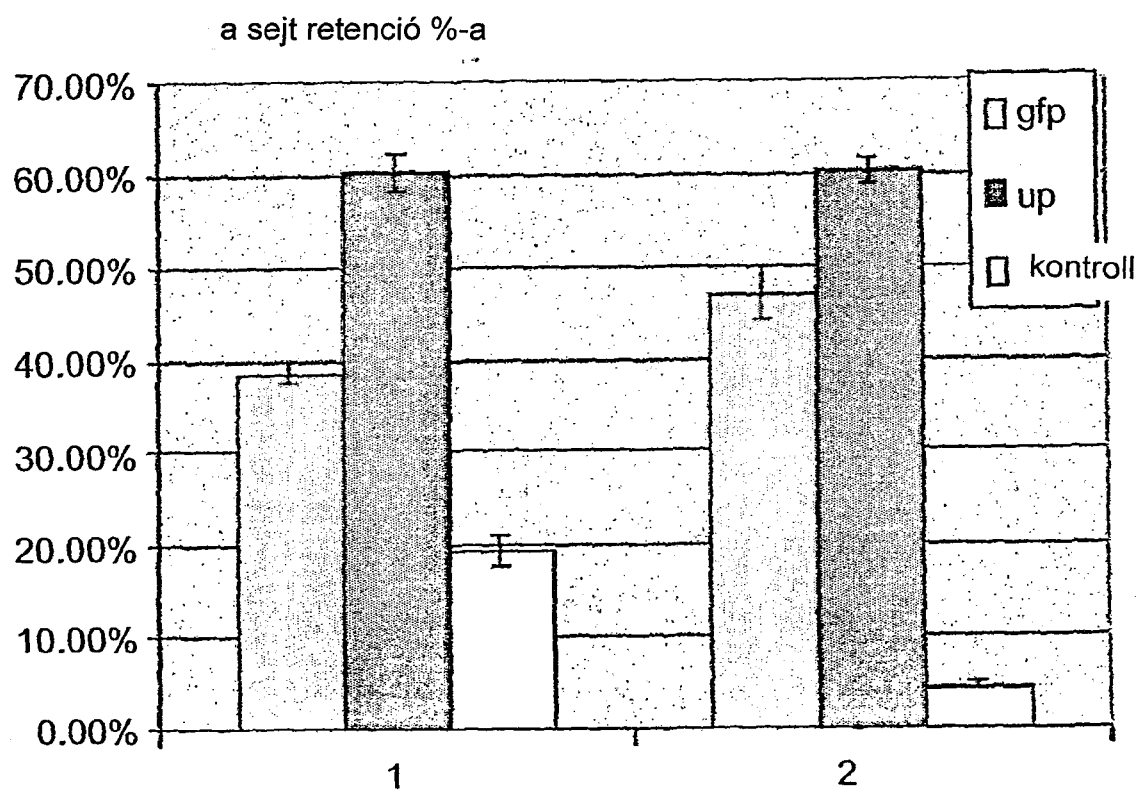


22G. ábra



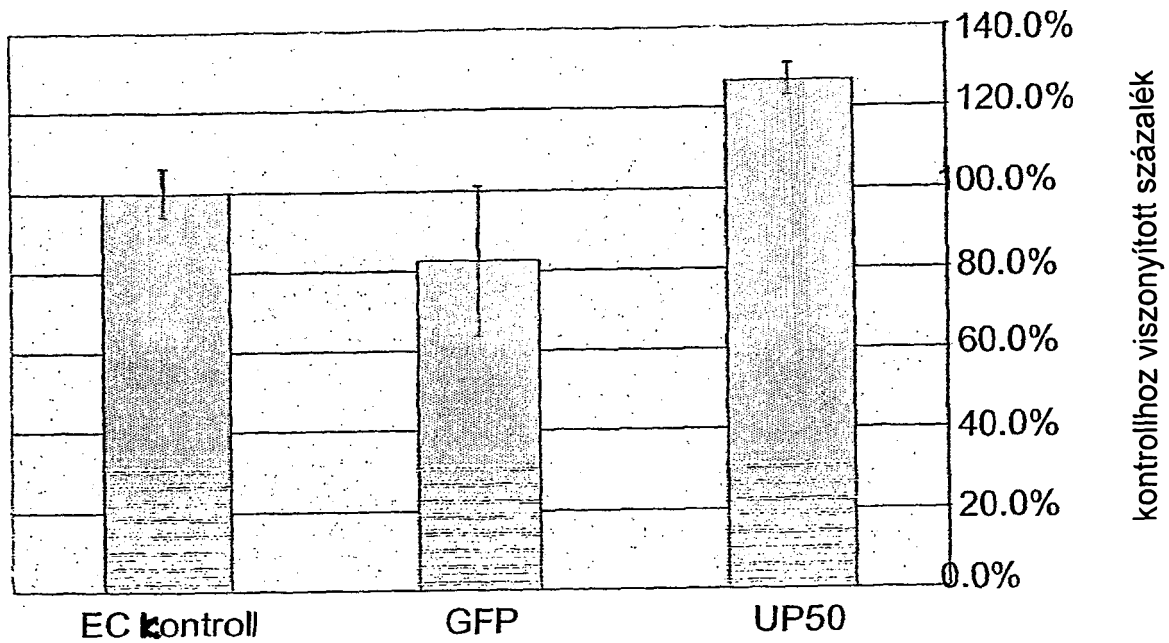
22H. ábra

14/21



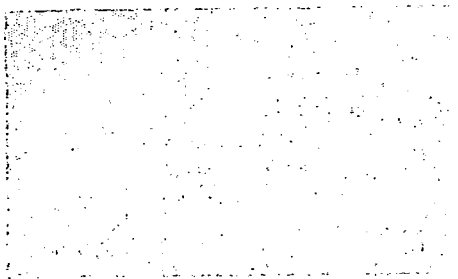
23. ábra

15/21

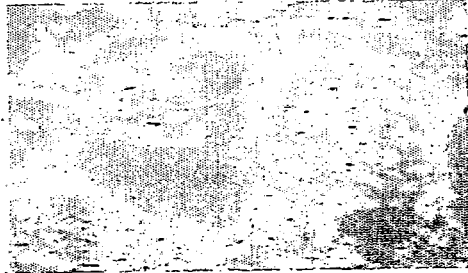


24. ábra

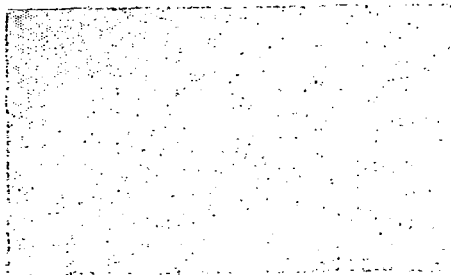
16/21



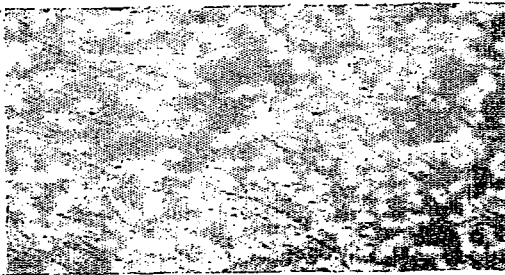
25A. ábra



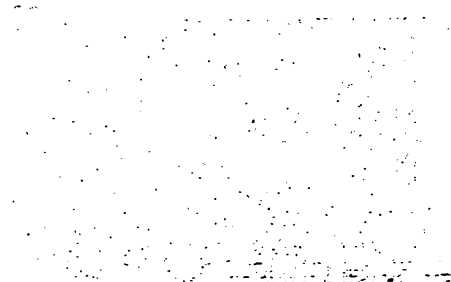
25B. ábra



25C. ábra



25D. ábra

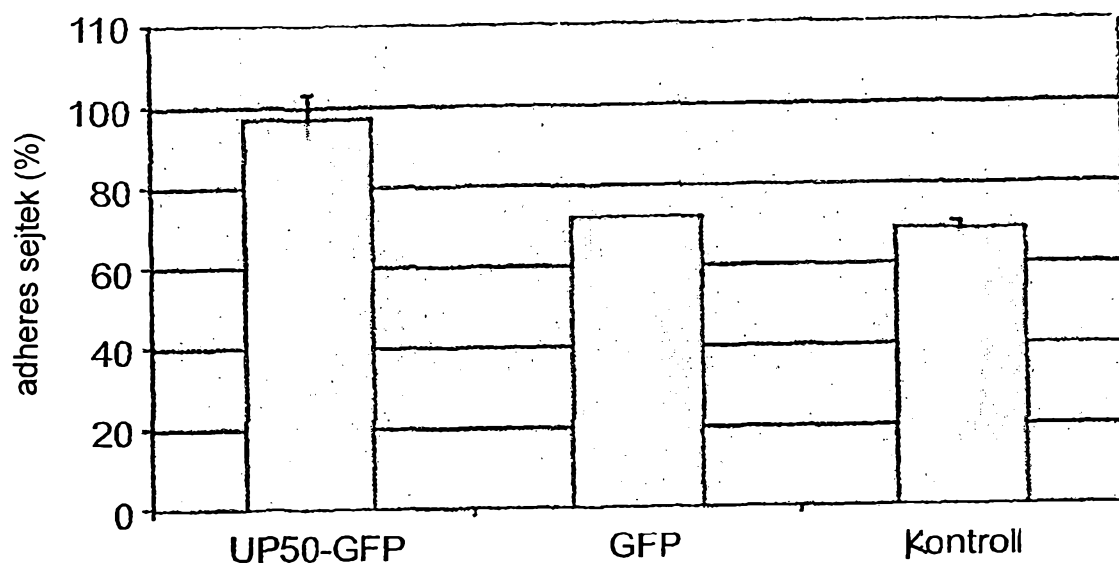


25E. ábra

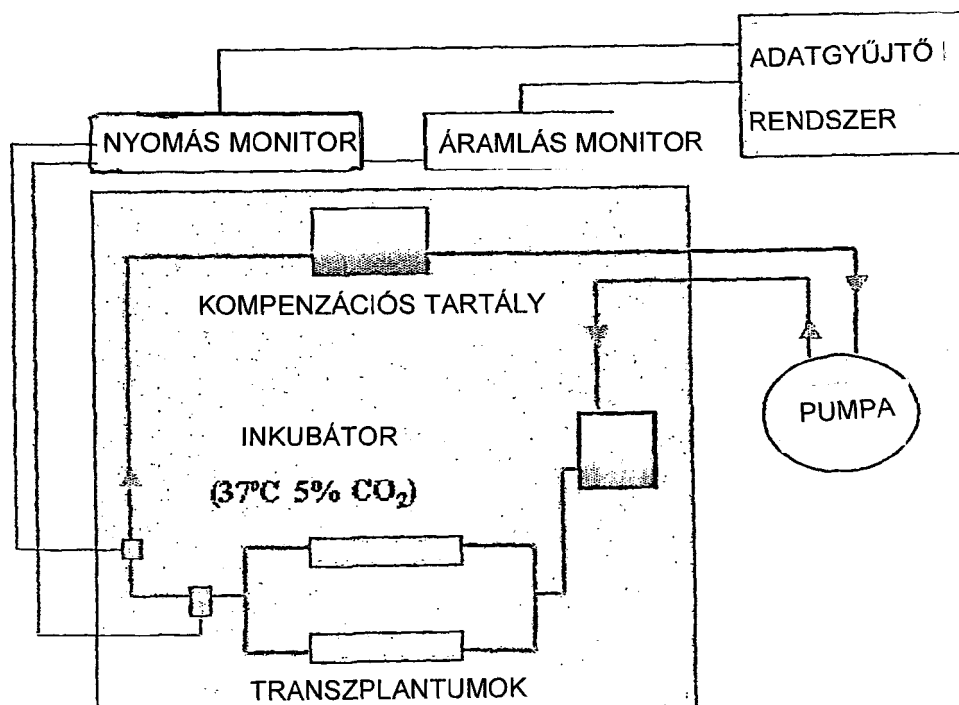


25F. ábra

17/21

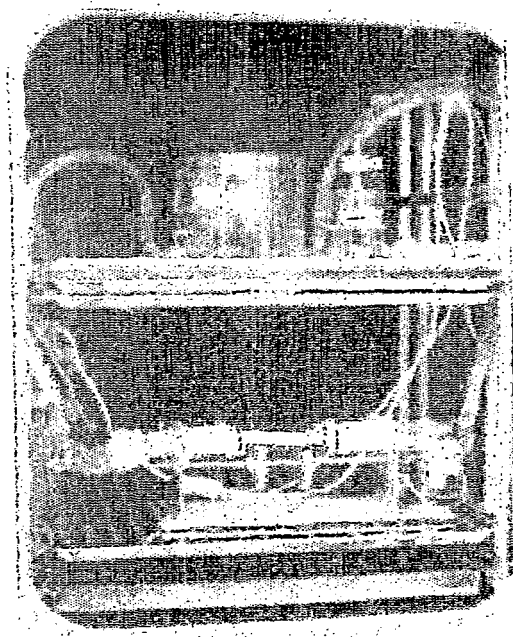


25G. ábra



26. ábra

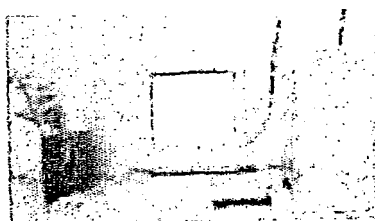
18/21



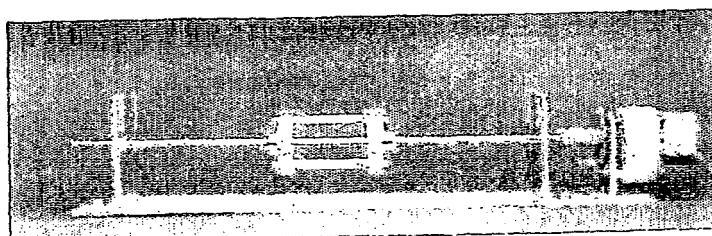
27A. ábra



27B. ábra

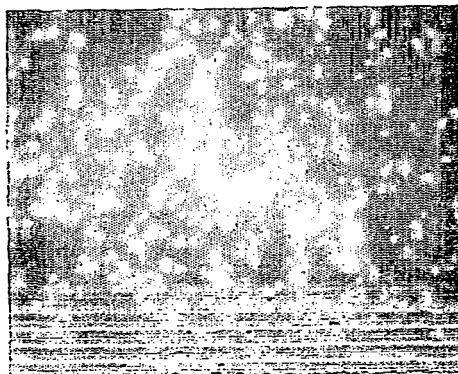


27C. ábra

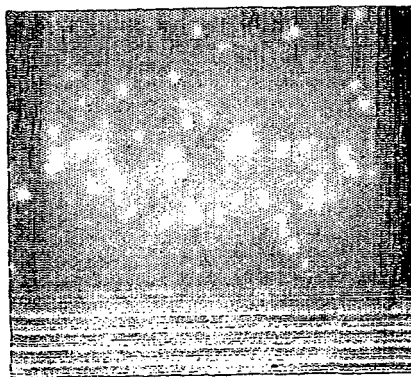


27D. ábra

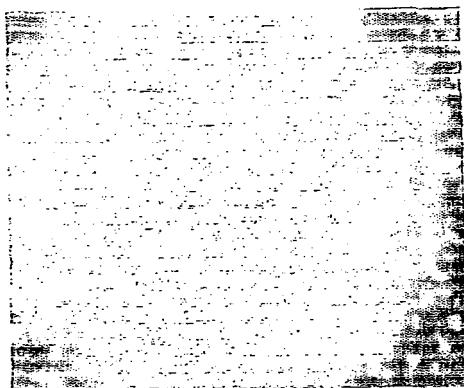
19/21



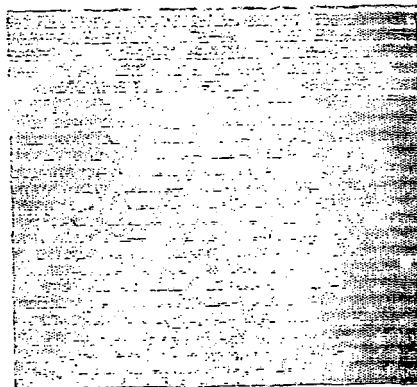
28A. ábra



28B. ábra

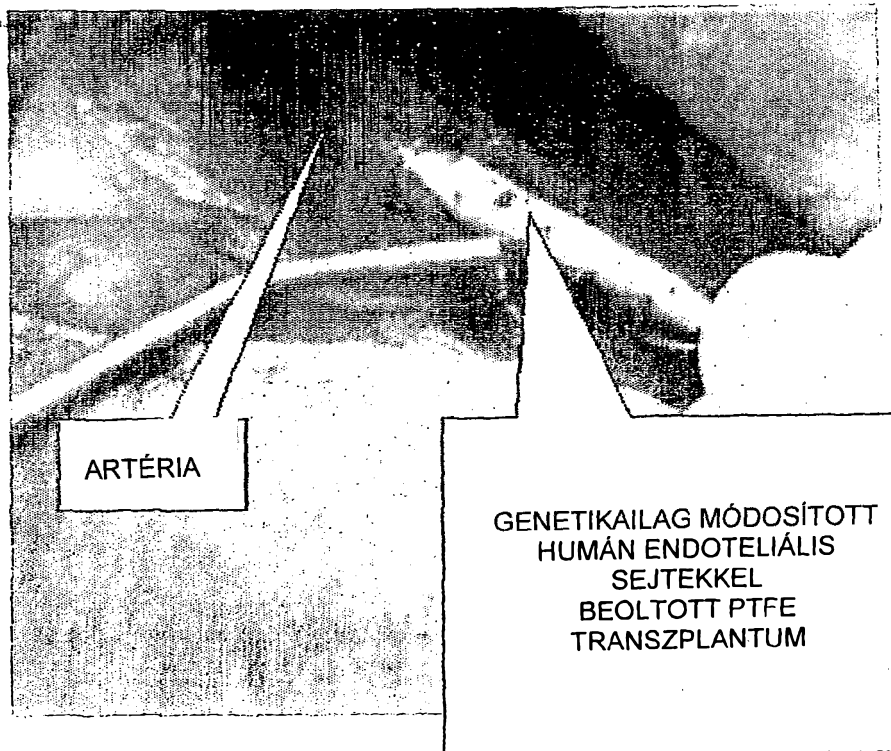


28C. ábra

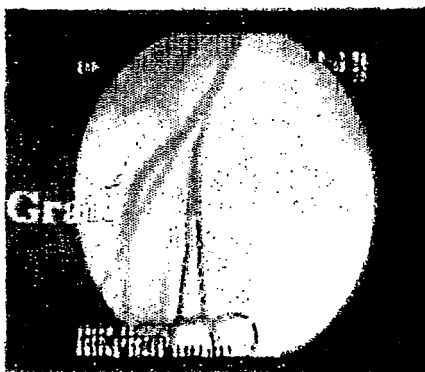


28D. ábra

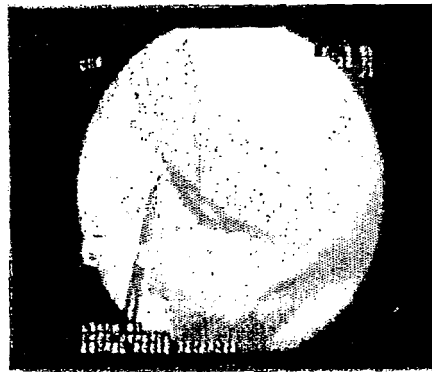
20/21



29. ábra

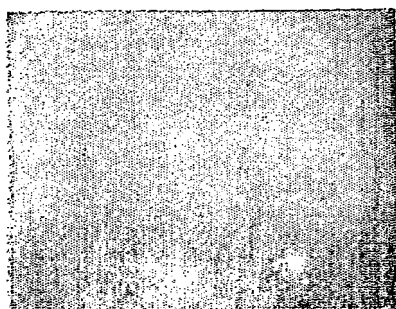


30A. ábra

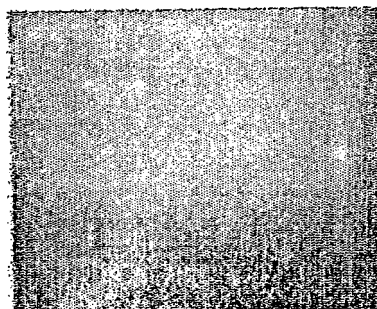


30B. ábra

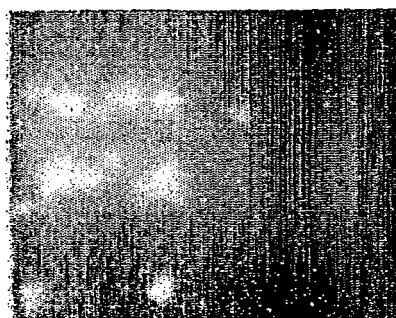
21/21



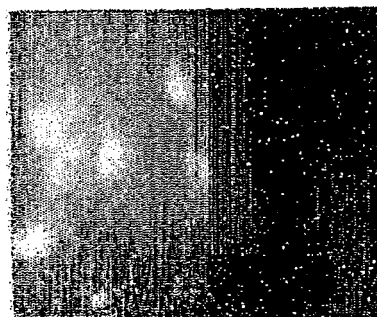
31A. ábra



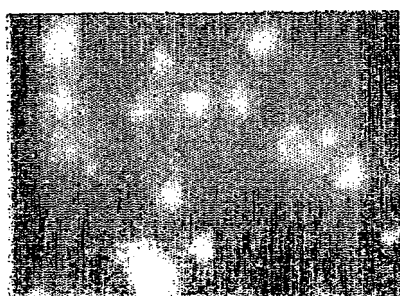
31B. ábra



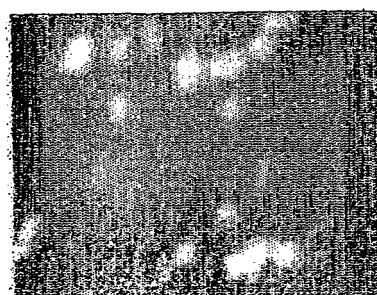
31C. ábra



31D. ábra



31E. ábra



31F. ábra