



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 22 610 T2** 2005.12.15

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 994 185 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 22 610.4**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 308 203.1**

(96) Europäischer Anmeldetag: **18.10.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **19.04.2000**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **15.12.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.12.2005**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 5/08**
C12N 5/06

(30) Unionspriorität:

9843491 17.10.1998 KR

(73) Patentinhaber:

Yoon, Tai-Wook, Seodaemoon, KR

(74) Vertreter:

LOUIS, PÖHLAU, LOHRENTZ, 90409 Nürnberg

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

Yoon, Tai-Wook, Seodaemoon-Ku, KR

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Kultivierung von Langerhansinsel-Zellen**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Züchtung von Langerhans-Inseln, die sich für Transplantationszwecke eignen.

[0002] Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung Verfahren, mit dem die Langerhans-Inseln volumemäßig vermehrt werden können, sowie die Tatsache, dass eine Autotransplantation mit proliferierten Inseln die Inselregeneration über eine Inselreplikation und -neogenese stimulieren kann, was zu einer vollständigen Heilung von Diabetes führt.

[0003] Diabetes mellitus (üblicherweise einfach als Diabetes bezeichnet) ist eine komplexe Krankheit, die durch ein stark abnormales Muster des Kohlenhydratstoffwechsels gekennzeichnet ist, der zu einer Störung der Sekretion und/oder der Wirksamkeit von Insulin führt. In industrialisierten Ländern tritt Diabetes bei etwa 10 % der Bevölkerung auf. Tatsächlich stellt Diabetes die häufigste ernste Stoffwechselerkrankung in der Welt dar und betrifft einige hundert Millionen Personen.

[0004] Diabetes lässt sich in insulinabhängigen Diabetes oder nichtinsulinabhängigen Diabetes einteilen. Ein Fehlen oder eine unzureichende Menge von Eigeninsulin stellt ein charakteristisches Merkmal von insulinabhängigem Diabetes dar. Einige Diabetiker weisen normale Werte oder sogar über dem Normalwert liegende Konzentrationen an Insulin im Blut auf, zeigen aber eine sehr geringe Reaktion auf das Hormon. Diese Krankheitsform, die als nicht von Insulin abhängiger Diabetes bekannt ist, entwickelt sich typischerweise in einem späterem Lebensstadium als die insulinabhängige Form. Jedoch bedarf der Diabetes verursachende Mechanismus, mit dem diese beiden Typen unterschieden werden können, noch der Aufklärung.

[0005] Für die Behandlung sollten insulinabhängige Diabetiker ständig exogenes Insulin erhalten, da ihre Fähigkeit zur Erzeugung von Insulin stark verringert ist. Jedoch ist es praktisch unmöglich, kontinuierlich und im richtigen Ausmaß Insulin entsprechend den physiologischen Bedürfnissen des Patienten bereitzustellen. Noch schwieriger erweist sich die Tatsache, dass der Körper einen Insulin-Konzentrationsgradienten in der Weise aufweist, dass die Insulinkonzentration mit folgender Reihenfolge abnimmt: Leber-Portalvene, Leber, Lebervene, Aorta und Muskel; wobei aber eine Injektion von exogenem Insulin nicht zu einem derartigen Konzentrationsgradienten führt, was dann Nebenwirkungen hervorruft.

[0006] Die β -Zellen der Langerhans-Inseln sezernieren Insulin und 11 weitere Materialien. Somit kann eine Injektion lediglich von Insulin den Glucosespiegel im Blut verringern, jedoch eine Glukopenie und andere Komplikationen nicht verhindern. Da eines der Ziele bei der Behandlung von Diabetes darin besteht, den Glucosespiegel im Blut zu senken, werden häufig Mittel zur Senkung des Glucosespiegels im Blut verwendet. Diese Senkungsmittel sollten jedoch nicht über längere Zeiträume hinweg verschrieben werden, da sie zu Resistenzerscheinungen führen. Außerdem wurde festgestellt, dass Mittel zur Senkung von Glucose im Blut häufig ernsthafte Nebenwirkungen aufweisen.

[0007] Wie vorstehend erwähnt, ist Insulin dazu befähigt, den Glucosespiegel im Blut zu senken, wobei eine wesentlich geringere Resistenz entsteht als bei Verwendung von Mitteln zur Senkung von Glucose im Blut. Jedoch variiert die erforderliche Menge an Insulin in Abhängigkeit vom Zustand eines Patienten, so dass es sehr schwierig ist, rechtzeitig die richtige Dosis an Insulin zu verabreichen. Bei einer ungeeigneten Verabreichung von Insulin können anti-Insulin-Antikörper gebildet werden, was den Diabetes verschlimmert. Zur Heilung von Diabetes ist in letzter Zeit die Gewebetransplantation auf großes Interesse gestoßen. Beispielsweise werden Pankreas oder Langerhans-Inseln einem Patienten transplantiert, der an Diabetes leidet, um eine kontrollierte Menge an Insulin bereitzustellen, die für den Patienten erforderlich ist.

[0008] EP-A-0 363 125 beschreibt die Züchtung von humanen, fötalen Pankreaszellen zur Implantation bei Diabetikern.

[0009] In derartigen Fällen stellen jedoch Immunabstoßungsreaktionen ein ständiges Problem dar und müssen berücksichtigt werden. Wenn es zu Immunabstoßungsreaktionen kommt, werden den Patienten Immunsuppressoren verabreicht. Außerdem ist die Anzahl an Spendern für den bestehenden Bedarf nicht ausreichend.

[0010] Die Behandlung von Diabetes durch Verabreichung von Insulin wurde erstmals im Jahre 1921 von Banting und Beat durchgeführt, wobei ihnen aber eine Heilung der Krankheit aufgrund von diabetischen Komplikationen nicht gelang. Im Jahre 1966 transplantierte Lillihei von der Universität Minnesota erstmals einen

Teil des Pankreas einem Diabetiker. Im Jahre 1977 wurden 57 Patienten einer Transplantation unterzogen. Jedoch überlebten weniger als 10 % davon den Eingriff um ein Jahr oder mehr.

[0011] Neuere Entwicklungen von Immunsuppressoren haben die Überlebensrate von Empfängern von Pankreas- oder Nierentransplantaten auf bis zu 70 erhöht. Für die Transplantation von Langerhans-Inseln erreicht die Überlebensrate 90 %.

[0012] Der erste Punkt, der zu berücksichtigen ist, besteht in der Histokompatibilität zwischen Spender und Empfänger. Wenn eine Gewebetransplantation zwischen zwei Personen unterschiedlicher Histokompatibilität durchgeführt wird, kommt es zu Immunabstoßungsreaktionen, was im schlimmsten Fall zur Zerstörung der transplantierten Inseln führt. Im allgemeinen sind 50 Spender erforderlich, um für einen Empfänger die erforderliche Histokompatibilität aufzufinden. Bei der Transplantation von frischen Inseln wächst aus frisch isolierten Langerhans-Inseln eine große Menge an faserigen Geweben, die sich bei der Transplantation teilen und die Inseln umgeben, so dass die Fähigkeit der β -Zellen zur Sekretion von Insulin in Reaktion auf einen Stimulus stark abnimmt.

[0013] Auf dem Weg zur vorliegenden Erfindung haben die Erfinder folgende Überlegungen angestellt. Erstens benötigen Zellen oder Zellgruppen für eine in vitro-Proliferation einen Gehalt an Stammzellen oder Progenitorzellen und müssen in einem undifferenzierten Zustand vorliegen. Da in Langerhans-Inseln glücklicherweise zahlreiche Stammzellen oder Progenitorzellen vorliegen, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit zur undifferenzierten in vitro-Proliferation von Langerhans-Inseln.

[0014] Ferner müssen MHC-Antigene der Klasse II, die eine Immunabstoßung hervorrufen, in den proliferierten Langerhans-Inseln fehlen. Weil somit Blutzellen, die reich an MHC-Antigenen der Klasse II sind, aus Langerhans-Inseln beseitigt werden, lässt sich eine Immunabstoßung bei der Insel-Allotransplantation stark verringern. Je länger die Inseln in der Kultur verbleiben und proliferieren, desto mehr nehmen Immunabstoßungsreaktionen ab.

[0015] Schließlich entwickeln sich faserige Gewebe ausgehend von rohen Inseln und müssen von der in vitro proliferierten Insel leicht entfernbar sein.

[0016] Unter Ausnutzung der vorstehenden drei Punkte haben die Erfinder versucht, die Langerhans-Inseln in vitro zu vermehren, und zwar mit dem Ziel, sie so zu präparieren, dass sie leicht und erfolgreich einem Wirt für die Langzeitbehandlung von Diabetes transplantiert werden können.

[0017] Wenn die Langerhans-Inseln in einem Monolayer-Züchtungsverfahren gezüchtet wurden, vermehrten sie sich höchstens in einer Rate von 80 %. Sie sezernierten Insulin nur schlecht, so dass es unmöglich war, den Glucosespiegel im Blut zu steuern. Die Inseln sollten für eine erfolgreiche Transplantation mindestens fünf-fach vermehrt werden.

[0018] Intensive und gründliche Forschungsarbeiten, die von den Erfindern wiederholt durchgeführt wurden, führten zu dem Befund, dass bei einer in vitro-Züchtung in Medien mit einem Gehalt an verschiedenen biochemischen Materialien, die aus Ratten isolierten Langerhans-Inseln sich in hohen Raten vermehren, die zur Anwendung für Transplantationszwecke ausreichen, Blutzellen daraus freisetzen, so dass die Immunoabstoßung stark verringert wird, und gut genug funktionieren, so dass sie in erfolgreicher Weise weiterhin nach der erfindungsgemäßen Transplantation Insulin sezernieren.

[0019] Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren zur Vermehrung der Langerhans-Inseln in einem für Transplantationszwecke geeigneten Zustand bereitzustellen, wodurch eine stark verstärkte Behandlungswirkung für Diabetes erreicht werden kann.

[0020] Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zur Vermehrung der Langerhans-Inseln bereitgestellt, bei dem ein Kulturmedium mit Radikalfängern, Wachstumsfaktoren, einem Matrixmaterial, Nervenwachstumsfaktor (NGF), Zellwanderungs/Streuungsfaktoren (wie Hepatocyten-Wachstumsfaktor (HGF)), Antinekrosefaktoren oder Antiapoptosefaktoren, insulinartigem Wachstumsfaktor 1 (IGF 1), insulinartigem Wachstumsfaktor 2 (IGF 2), vaskulärem endotheliale Wachstumsfaktor (VeGF) und einem Zytoskelett-Aktivator (anti-Integrin-B1-Antikörper) zu geeigneten Züchtungszeitpunkten versetzt wird und die Proliferation für eine längere Zeitspanne durchgeführt wird, so dass die Langerhans-Inseln in Bezug auf Blutzellen verarmen und sich in ausreichender Weise vermehren, so dass sie für eine Transplantation geeignet sind.

[0021] Die vorliegende Erfindung ist auch auf ein Verfahren zur in vitro-Züchtung und -Proliferation von isolierten endokrinen Zellen von Langerhans-Inseln abgestellt, so dass sie für eine Transplantation geeignet sind. Das Verfahren umfasst die Bereitstellung von lebensfähigen endokrinen Zellen von Langerhans-Inseln, einschließlich Zellen, die zur Differenzierung zu Insulin erzeugenden Zellen geeignet sind, und eines ersten Kulturmediums, das ein Grundmedium umfasst, das mit Serum, mindestens einem Radikalfänger, der aus der Gruppe Nicotinamid, Mannit oder Superoxid-dismutase ausgewählt ist; mindestens einem Wachstumsfaktor, der aus der Gruppe Insulin-Transferrin-Selenit-Komplex (ITS-Komplex), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), von Blutplättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor (PDGF), Thrombin, Linolsäure-Rinderserumalbumin (Linolsäure-BSA), Hydrocortison und Progesteron ausgewählt ist; und mindestens einen Antinekrose- oder Antiapoptosefaktor, der aus der Gruppe IGF 1, IGF 2 und VIGF ausgewählt ist, ergänzt ist, und das Züchten der endokrinen Zellen von Langerhans-Inseln, einschließlich von Zellen, die zur Differenzierung in Insulin erzeugende Zellen befähigt sind, für eine ausreichende Zeitspanne, z. B. 12 bis 36 h, in einem ersten Kulturmedium, zur Bildung eines ersten Kulturwachstums. Das erste Kulturwachstum wird gewonnen und bei Raumtemperatur in frischem Dulbecco-modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) oder serumfreiem Grundmedium mit einem Zytoskelett-Aktivator, wie anti-Integrin- β 1-Antikörper für etwa 45 bis 120 Minuten zur Bildung eines zweiten Kulturwachstums inkubiert. Das zweite Kulturwachstum wird sodann in einem Matrixmaterial suspendiert, um eine dreidimensionale Kulturwachstums Umgebung bereitzustellen, und ein zweites Züchtungsmedium, das das ergänzte Grundmedium umfasst und ferner zumindest mit Hypophysenextrakt versetzt ist, wird zugegeben und die Züchtung wird etwa 1 oder 2 Tage, z. B. 12 bis 60 h, fortgesetzt, um ein drittes Züchtungswachstum, das im Matrixmaterial dispergiert ist, bereitzustellen. Ein drittes Züchtungsmedium zur Züchtung des dritten Kulturwachstums im Matrixmaterial wird bereitgestellt und umfasst das ergänzte Grundmedium, jedoch ohne VeGF, wobei gegebenenfalls zum dritten Züchtungsmedium NGF und HGF zugesetzt werden, wenn die Inseln des dritten Kulturwachstums ein dickes Erscheinungsbild zeigen und das Zentrum der Inseln dunkel erscheint, oder wobei gegebenenfalls das dritte Kulturmedium mit NGF und anti-Integrin- β 1-Antikörper versetzt wird, wenn die Inseln ein zu stark verteiltes Erscheinungsbild zeigen, wonach anschließend für eine Zeitspanne von etwa 1 oder 2 Tagen, z. B. 12 bis 60 h, gezüchtet wird, um ein viertes Kulturwachstum zu bilden. Die Inseln werden sodann aus dem Matrixmaterial, das sich in einem geeigneten Gefäß befindet, gewonnen, und ein Enzym, wie Dispase, wird zu den gewonnenen Inseln gegeben, um etwaiges anhaftendes Gel zu lockern oder entfernen zu können. Nach einer Inkubation, z. B. von etwa 10 Minuten, erhält man ein inkubiertes Produkt. Das inkubierte Produkt wird sodann mehrfach vor- und zurückgesaugt, z. B. mindestens 3-mal, wie 5- bis 20-mal, um zu bewirken, dass das Gel, auf das durch das Enzym eingewirkt worden ist, von den Inseln entfernt wird, um dadurch die Fibroblasten der während des Vor- und Zurücksaugens erzeugten Kraft auszusetzen, was offensichtlich bewirkt, dass die Fibroblasten von der Oberfläche der Inseln getrennt werden, wodurch fibroblastenfreie Inseln entstehen.

[0022] Das vorstehende Verfahren dauert etwa sieben Tage und kann auf folgende Weise wiederholt werden. Ein viertes Züchtungsmedium, das das Grundmedium umfasst, das typischerweise mit Serum, Insulin-Transferrin-Natriumselenit (ITS), Linolsäure-BSA, Thrombin, epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), Nicotinamid, VeGF, IGF-1, IGF-2, Superoxiddismutase und Mannit ergänzt ist, wird bereitgestellt, und anschließend werden die fibroblastenfreien Inseln etwa 8 bis 12 h gezüchtet, um ein fünftes Kulturwachstum bereitzustellen. Das fünfte Kulturwachstum wird gewonnen und in einem fünften Züchtungsmedium, das DMEM und einen anti-Integrin- β 1-Antikörper umfasst, 45 bis 120 Minuten bei Raumtemperatur gezüchtet, um ein sechstes Kulturwachstum zu bilden. Das sechste Kulturwachstum wird in einem Matrixmaterial suspendiert, um eine dreidimensionale Kulturwachstums Umgebung zu erzeugen. Ein sechstes Züchtungsmedium, das das ergänzte Grundmedium und ferner zumindest einen weiteren Wachstumsfaktor enthält, wird zugesetzt. Eine Züchtung wird etwa 1 oder 2 Tage, z. B. 12 bis 60 Stunden durchgeführt, um ein siebtes Kulturwachstum, das im Matrixmaterial dispergiert ist, bereitzustellen.

[0023] Ein siebtes Kulturmedium, das ergänztes Grundmedium ohne VeGF umfasst, wird bereitgestellt, und gegebenenfalls mit Nervenwachstumsfaktor (NGF) und Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) versetzt, wenn die Inseln des siebten Kulturmediums ein dickes Erscheinungsbild zeigen und das Zentrum der Inseln ein dunkles Erscheinungsbild zeigt, oder gegebenenfalls wird das siebte Kulturmedium mit NGF und anti-Integrin- β 1-Antikörper versetzt, wenn die Inseln ein zu stark verteiltes Erscheinungsbild zeigen, und die Züchtung wird für eine Zeitspanne von 1 bis 2 Tagen beispielsweise 12 bis 60 Stunden durchgeführt, um ein achttes Kulturwachstum zu erzeugen. Die Inseln werden sodann aus dem Matrixmaterial gewonnen und ein Enzym, wie Dispase, wird zu den gewonnenen Inseln und zu etwaigem anhaftendem Gel gegeben und z. B. etwa 10 Minuten inkubiert, um ein inkubiertes Produkt bereitzustellen.

[0024] Das inkubierte Produkt wird sodann mehrfach vor- und zurückgesaugt, um zu bewirken, dass das Gel, auf das durch das Enzym eingewirkt worden ist, von den Inseln entfernt wird, um dadurch die Fibroblasten (so-

fern vorhanden) der während des Vor- und Zurücksaugens erzeugten Kraft auszusetzen, was bewirkt, dass die Fibroblasten von der Oberfläche der Inseln getrennt werden, wodurch eine erhöhte Anzahl an fibroblastenfreien Inseln entsteht.

[0025] Im vorliegenden Verfahren ist es bevorzugt, dass das im Medium verwendete Serum aus der gleichen Spezies gewonnen wird wie die zu vermehrenden Langerhans-Inseln. Wenn somit die Langerhans-Inseln von einer Ratte oder einem Menschen stammen, stammt das Serum ebenfalls von der Ratte bzw. vom Menschen, wobei vorzugsweise der prozentuale Anteil des Serums im Medium etwa 10 % beträgt. Beim Wachstumsfaktor, der dem zweiten und sechsten Züchtungsmedium zugesetzt wird, handelt es sich vorzugsweise um Hypophysenextrakt.

[0026] Das erfindungsgemäße Verfahren kann dazu herangezogen werden, lebensfähige endokrine Zellen von Langerhans-Inseln bereitzustellen, die zur Differenzierung zu insulinproduzierenden Zellen für eine Proliferation geeignet sind, wobei die Zellen von einem Patienten stammen, bei dem die Proliferation vorgenommen werden soll. Diese Zellen werden sodann durch Autotransplantation dem gleichen Patienten zurückgegeben. Dies führt zu einer Regeneration der Inseln im Patienten gemäß den nachstehenden Angaben.

[0027] Das erfindungsgemäße Verfahren kann auch ein Verfahren zur Entfernung von Fibroblasten umfassen, die an der Oberfläche von in vitro vermehrten Langerhans-Inseln wachsen, indem man eine Mehrzahl von proliferierten Inseln bereitstellt, die Fibroblasten aufweisen, die mit diesen in einer Gelmatrix wachsen. Die Inseln werden von der Gelmatrix zusammen mit den Fibroblasten, die mit den Inseln wachsen, gewonnen. Ein Enzym, wie Dispase, wird zu den gewonnenen Inseln und zu etwaigem Gel, das an der Oberfläche der gewonnenen Inseln haftet, gegeben. Anschließend wird eine Inkubation unter Bildung eines inkubierten Produkts durchgeführt. Das inkubierte Produkt wird sodann mehrfach vor- und zurückgesaugt, um zu bewirken, dass das Gel, auf das die Dispase eingewirkt hat, von den Inseln entfernt wird, wodurch die Fibroblasten der Kraft, die durch das Vor- und Zurücksaugen erzeugt wird, ausgesetzt werden, was dazu führt, dass die Fibroblasten von der Oberfläche der Inseln abgetrennt werden und fibroblastenfreie Inseln gebildet werden.

[0028] Die proliferierten fibroblastenfreien Inseln, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt worden sind, können zur Behandlung von Diabetes mellitus herangezogen werden, indem man die endokrinen Zellen der proliferierten Langerhans-Inseln einem Patienten, der an Diabetes mellitus leidet, transplantiert. Ferner umfasst die vorliegende Erfindung die Verwendung der proliferierten, fibroblastenfreien Inseln eines Patienten, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erzeugt worden sind, um Diabetes mellitus zu behandeln und Inseln im Patienten zu regenerieren, indem man die endokrinen Zellen der proliferierten Langerhans-Inseln durch Autotransplantation dem Patienten, der an Diabetes mellitus leidet, zuführt. Diese und weitere Ziele und Aspekte der Erfindung ergeben sich aus der folgenden Beschreibung von Ausführungsformen unter Bezugnahme auf die beigefügte Zeichnung.

[0029] [Fig. 1](#) ist eine 100-fache ($\times 100$) vergrößerte fotografische Aufnahme zur Darstellung von Blutzellen, die aus Inseln nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C freigesetzt worden sind.

[0030] [Fig. 2](#) ist eine fotografische Aufnahme ($\times 100$) zur Darstellung der Langerhans-Inseln, die in Abwesenheit von Radikalfängern gezüchtet worden sind.

[0031] [Fig. 3](#) ist eine fotografische Aufnahme ($\times 100$) zur Darstellung der Langerhans-Inseln, die in Gegenwart eines Radikalfängers gezüchtet worden sind.

[0032] [Fig. 4](#) ist eine fotografische Aufnahme ($\times 200$) zur Darstellung von Inseln, die in einem ergänzten Medium (VeGF, IGF-1, IGF-2) inkubiert wurden.

[0033] [Fig. 5](#) ist eine fotografische Aufnahme zur Darstellung der Inseln am zweiten Tag der Proliferation.

[0034] [Fig. 6](#) ist eine fotografische Aufnahme ($\times 100$) zur Darstellung des seitlichen Wachstums der Langerhans-Inseln, die im Medium mit einem Gehalt an anti-Integrin- $\beta 1$ -Antikörper vermehrt worden sind, am dritten oder vierten Tag.

[0035] [Fig. 7](#) ist eine fotografische Aufnahme ($\times 100$) zur Darstellung einer Insel, die in Gegenwart von Wanderungsfaktoren, z. B. HGF, gezüchtet worden sind, wobei das horizontale Wachstum oder die Ausbreitung der Insel am dritten oder vierten Tag dargelegt wird.

- [0036] **Fig. 8A** und **8B** sind fotografische Aufnahmen ($\times 320$) zur Darstellung des Inselwachstums in sämtlichen Richtungen nach 10-tägiger erfindungsgemäßer Proliferation.
- [0037] **Fig. 9** ist eine fotografische Aufnahme zur Darstellung einer humanen Insel, die in vitro für eine Zeitspanne von 8 Tagen in Gegenwart von humanem Serum vermehrt worden ist.
- [0038] **Fig. 10** ist ein Diagramm zur Darstellung der Veränderung der DNA-Menge der Langerhans-Inseln in Abhängigkeit von der Züchtungszeit in Tagen.
- [0039] **Fig. 11A**, und **11B** und **11C** zeigen den Vorgang der Fibroblastenentwicklung und deren Verarmung in den Inseln. Zahlreiche Fibroblasten wachsen während der Inselproliferation aus der Insel heraus (**Fig. 11A**), selbst wenn die Inseln zum Zeitpunkt ihrer Gewinnung ein sauberes Erscheinungsbild zeigten. Die Fibroblasten wurden fast vollständig (**Fig. 11B**) und vollständig (**11C**) von den Inseln entfernt.
- [0040] **Fig. 12** zeigt die in vitro-Funktionen (Glucose-Reaktion) von frischen (quadratischen) und proliferierten (kreisförmigen) Inseln.
- [0041] **Fig. 13** ist ein Diagramm, bei dem die Glucose-Konzentrationen im Blut von diabetischen Ratten, die mit 1350 und 1650 gerade isolierten Inseln transplantiert worden waren, gemessen wurden und gegen die Zeit in Tagen aufgetragen wurden.
- [0042] **Fig. 14** zeigt das Profil der Glucosekonzentration im Blut einer mit Streptozotocin (STZ) induzierten diabetischen Ratte, die mit 500 proliferierten Ratteninseln transplantiert worden ist, im Laufe der Zeit in Tagen.
- [0043] **Fig. 15** ist ein Diagramm zur Darstellung der Glucosekonzentrationen (mg/dl) im Blut gegen die Zeit in Tagen, wobei ein Vergleich zwischen 500, 600, 800, 1000 und 1200 frischen Ratteninseln, die in die Milz von STZ-induzierten diabetischen Mäusen transplantiert worden waren, vorgenommen wurde, woraus sich ergibt, dass 800 Inseln die minimale Anzahl an Inseln darstellen, die zur Wiederherstellung und Aufrechterhaltung einer Normoglykämie erforderlich sind.
- [0044] **Fig. 16** ist eine fotografische Aufnahme ($\times 200$) einer frischen Insel, die in die Milz einer STZ-induzierten diabetischen Nacktmaus transplantiert worden ist.
- [0045] **Fig. 17** zeigt das Blut-Glucoseprofil von 150 bis 200 proliferierten Inseln, die in die Milzen von STZ-induzierten diabetischen Mäusen transplantiert worden sind, im Laufe der Zeit in Tagen.
- [0046] **Fig. 18** ist eine fotografische Aufnahme ($\times 400$) zur Darstellung einer proliferierten Insel, die in die Milz einer STZ-induzierten diabetischen Nacktmaus transplantiert worden ist.
- [0047] Zur näheren Erläuterung der vorliegenden Erfindung werden die **Fig. 1** bis **Fig. 18** vorgelegt und nachstehend beschrieben. **Fig. 1** zeigt die Inselzellen mit freigesetzten roten Blutkörperchen nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C in einem Medium von Rattenserum. **Fig. 2** und **Fig. 3** zeigen den Unterschied bei Züchtung in Abwesenheit bzw. in Gegenwart von Radikalfängern. In Abwesenheit eines Radikalfängers lagen zahlreiche tote Inselzellen an der Oberfläche der Insel vor (**Fig. 2**). In Gegenwart eines Radikalfängers zeigten die Inseln ein intaktes Erscheinungsbild ohne tote Zellen an der Oberfläche (**Fig. 3**). **Fig. 4** zeigt Inseln, die in einem mit VeGF, IGF-1 und IGF-2 ergänzten Medium inkubiert worden waren, um die Lebensfähigkeit der Inseln zu erhöhen. Die Ergänzungen wirken als antiapoptotische und antinekrotische Faktoren. Die Inseln erweisen sich als intakt, ohne dass tote Zellen an der Oberfläche auftreten. **Fig. 5** ist eine fotografische Aufnahme zur Darstellung der Inseln am zweiten Tag der Proliferation, wobei die Inseln eine glatte Oberfläche und eine hohe Lebensfähigkeit aufweisen. Das in **Fig. 6** verwendete Medium enthielt anti-Integrin- $\beta 1$ -Antikörper. Es sind wachsende Zellen zu sehen, die an der Oberfläche der Insel auftreten, die dann wie eine Maulbeere aussieht. **Fig. 7** zeigt den Einfluss der Zugabe von Wanderungsfaktoren, z. B. von hepatozytischem Wachstumsfaktor (HGF), zum Medium, was offensichtlich eine horizontale Verteilung der Inseln bewirkt. **Fig. 8A** und **8B** zeigen, dass das erfindungsgemäß verwendete Medium den Inseln ein Wachstum in sämtlichen Richtungen ermöglicht. Die vordere Gestalt (**Fig. 8A**) und die seitliche Gestalt (**Fig. 8B**) zeigen dicke und lange Knospen, die von der Insel ausgehen. **Fig. 9** zeigt eine humane Insel, die 8 Tage in vitro unter Verwendung der Ratteninsel-Proliferationsverfahren gemäß der vorliegenden Erfindung vermehrt worden sind. **Fig. 10** zeigt den Anstieg des DNA-Gehalts von in vitro proliferierenden Sprague-Dawley (SD)-Ratteninseln gegen die Anzahl der Inkubationstage. **Fig. 11A** zeigt die vor der Transplantation entfernten Fibroblasten (Vergrößerung $\times 200$). **11B** und **11C** zeigen die vor der Transplantation entfernten Fibroblasten (Vergrößerung 200-fach). **Fig. 12** zeigt die durch Glucose

stimulierte Insulinsekretion von frisch isolierten (quadratischen) und proliferierten (kreisförmigen) Inseln. **Fig. 13** ist ein Diagramm, bei dem die Blutglucose (mg/dl) gegen die Zeit in Tagen für 1650 (Kreis) und 1350 (Dreieck) frische Ratteninseln, die über die Leberportalvene einer STZ-induzierten diabetischen Ratte transplantiert worden sind, aufgetragen sind. **Fig. 14** ist ein Diagramm der Glucosespiegel im Blut (mg/dl) bei Auftragung gegen die Zeit in Tagen, wobei 0 den Transplantationstag von 500 proliferierten Ratteninseln in 4 Ratten bedeutet. **Fig. 15** ist ein Diagramm, bei dem die Glucosespiegel (mg/dl) im Blut gegen die Zeit aufgetragen sind und 500, 600, 800, 1000 und 1200 frische Ratteninseln verglichen werden, die in die Milz von STZ-induzierten diabetischen Mäusen transplantiert wurden. Die Zahlen geben die Anzahl an transplantierten Inseln an. 800 Inseln stellen die minimale Inselanzahl dar, die zur Wiederherstellung und Aufrechterhaltung von Normoglykämie erforderlich sind. Die Glucosespiegel im Blut der diabetischen Ratten, die mit den gerade isolierten Langerhans-Inseln transplantiert worden waren, wurden gegen die Zeit in Tagen aufgetragen.

[0048] **Fig. 16** ist eine fotografische Aufnahme ($\times 200$) einer frischen Insel, die in die Milz einer STZ-induzierten diabetischen Nacktmaus induziert worden war. Die Glucosekonzentration im Blut erholte sich und blieb 30 Tage aufrechterhalten. Anschließend wurde die Maus zur Gewinnung der transplantierten Insel getötet. Die Insel wurde geschnitten und mit einem insulinspezifischen Färbeverfahren gefärbt, um die Insel zu identifizieren.

[0049] **Fig. 17** ist ein Diagramm der Glucosespiegel im Blut (mg/dl), die gegen die Zeit in Tagen aufgetragen wurden, wobei verschiedene Anzahlen (200, 180, 150) von proliferierten Inseln, die in die Milz von STZ-induzierten diabetischen Mäusen transplantiert worden waren, verglichen wurden. Die Glucosekonzentrationen im Blut wurden mehrere Monate lang jeden zweiten Tag gemessen. Die bei diesem Versuch herangezogenen Mäuse wiesen kein funktionierendes Immunsystem auf. Jedoch wird bei einer von 2 Mäusen, die mit 150 bzw. mit 180 Inseln transplantiert worden waren, angenommen, dass das Immunsystem so gut funktionierte, dass es die implantierten Inseln angriff, was zu einem plötzlichen Anstieg der Glucosekonzentration im Blut nach etwa 25 Tagen führte.

[0050] **Fig. 18** ist eine fotografische Aufnahme ($\times 400$), die eine proliferierte Insel zeigt, die in die Milz einer STZ-induzierten diabetischen Nacktmaus transplantiert worden ist. Ein normoglykämischer Zustand wurde bei der Maus wiederhergestellt und blieb 3 Monate lang erhalten. Anschließend wurde die Maus getötet, um die Milz zu entfernen. Die Milz wurde geschnitten und mit einem insulinspezifischen Färbeverfahren gefärbt, um die transplantierte Insel zu identifizieren.

[0051] Vor der Züchtung können die aus dem Pankreas isolierten Langerhans-Inseln gelagert werden. Ferner müssen nach der Züchtung die proliferierten Langerhans-Inseln in geeigneter Weise gelagert werden, es sei denn, sie werden sofort verwendet. Zu diesem Zweck werden sie vorzugsweise in flüssigem Stickstoff eingefroren.

[0052] Dimethylsulfoxid (DMSO) eignet sich zum Schutz der Langerhans-Inseln beim Einfrieren. Zu einem zweckmäßigen oder geeigneten Zeitpunkt wird der gefrorene Vorrat der Langerhans-Inseln für die Züchtung aufgetaut.

[0053] Erfindungsgemäß enthält ein Züchtungssystem ein Matrixmaterial, um für die Langerhans-Inseln eine dreidimensionale Umgebung bereitzustellen. Unter diesen Umständen zeigen die Langerhans-Inseln ein hohes Maß an Proliferation. Für das Matrixmaterial können Collagen, komplexes Collagen, komplexes Schwanzcollagen oder ander Biogele (z. B. Matrigel®) oder dergleichen verwendet werden.

[0054] Das erfindungsgemäße Züchtungsmedium (Rattenserum für Ratteninseln und Humanserum für humane Inseln) enthält ferner einen Radikalfänger, der eine Schutzrolle für die proliferierten Zellen gegen eine Schädigung durch Radikale übernimmt. Nicotinamid, Mannit oder eine Superoxiddismutase werden als Radikalfänger dem Züchtungsmedium zugesetzt.

[0055] Wie vorstehend erwähnt, muss die Proliferationsrate für die Transplantation mindestens 500 % betragen. Zu diesem Zweck werden die isolierten Langerhans-Inseln in Gegenwart von Wachstumsfaktoren und Zellwanderungs/Zellstreuungs-Faktoren gezüchtet. Geeignete Wachstumsfaktoren werden aus der Gruppe, die aus Insulin-Transferin-Selenit (ITS), epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), von Blutplättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor (PDGF), Thrombin, Progesteron, Linolsäure-BSA, Hypophysenextrakt und Hydrocortison besteht, ausgewählt. Zu Beispielen für Zellwanderungs/Zellstreuungs-Faktoren gehören hepatischer Wachstumsfaktor (HGF) und tumorfördernder Aktivator (TPA).

[0056] Während der Züchtung gelangen die Blutzellen von den Langerhans-Inseln in das Medium. Bei fort-

schreitender Züchtung unterliegen die Blutzellen einer Nekrose. Da die Blutzellen MHC der Klasse II aufweisen, einen Hauptfaktor, der bei der Gewebetransplantation eine Immunabstoßung hervorruft, können die gezüchteten Langerhans-Inseln einem Wirt unter geringer Immunabstoßung (wenn überhaupt) transplantiert werden. Erfindungsgemäß wird der Zytoskelett-Aktivator anti-Integrin- β 1-Antikörper dem Kulturmedium zugesetzt, um die Inselproliferation zu verstärken.

[0057] Ein tieferes Verständnis der vorliegenden Erfindung ergibt sich aus den folgenden Beispielen, die zur Erläuterung der Erfindung dienen, jedoch nicht als Einschränkung aufzufassen sind.

Beispiel I

Einfrieren von Langerhans-Inseln für die Lagerung und Auftauen der Inseln

[0058] 1 ml 10 % fötales Kälberserum (FCS)-Medium, das 2000 Langerhans-Inseln (Ratte) enthielt, wurde mit 0,5 ml 2 M DMSO versetzt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Verfahren der Zugabe von DMSO und das Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde weitere zweimal wiederholt: Beim ersten Mal mit 0,5 ml 2 M DMSO für eine Zeitspanne von 25 Minuten und beim zweiten Mal mit 0,5 ml 3 M DMSO für eine Zeitspanne von 15 Minuten. Anschließend ließ man das Medium 5 Minuten auf Eis und sodann 15 Minuten bei $-7,5^{\circ}\text{C}$ stehen. Dieses Medium wurde der Nukleisierung unter Verwendung einer vorher gekühlten Pinzette unterworfen und sodann 15 Minuten bei -15°C stehen gelassen. Die Temperatur wurde mit einer Geschwindigkeit von $0,2 - 0,3^{\circ}\text{C}$ pro Minute auf -35 bis -40°C verringert. Nach dem Erreichen der Temperatur wurde das Fläschchen, das das Medium enthielt, in einem Tank mit flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

[0059] Zum Auftauen wurde das im Tank mit flüssigem Stickstoff gelagerte Fläschchen in ein Kryofläschchen in einem Wasserbad von 37°C übertragen, bis die Eiskristalle aufzutauen begannen. Sodann wurde das Fläschchen auf Eis gestellt und stehen gelassen, damit sich die Langerhans-Inseln am Boden absetzen konnten. Der Überstand wurde unter Verwendung einer Pasteur-Pipette abgezogen. Die Langerhans-Inseln wurden mit 10 % FCS, das mit 1 ml 0,75 M Saccharose ergänzt war, versetzt und 30 Minuten auf Eis stehen gelassen. Sodann wurden die Langerhans-Inseln nacheinander mit 1 ml, 2 ml, 4 ml und 8 ml 10 % FCS versetzt. Nach jeder Zugabe ließ man die Langerhans-Inseln 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen. Der erhaltene Überstand wurde entfernt. Die verbleibenden Langerhans-Inseln wurden in einem Züchtungsmedium resuspendiert und bei 37°C gezüchtet. Dieser Vorgang kann für Langerhans-Inseln von Ratten, Mäusen, Menschen und dergleichen herangezogen werden.

Beispiel II

Proliferation der Langerhans-Inseln

[0060] In diesem Beispiel wurden die Langerhans-Inseln, die gemäß Beispiel I eingefroren und aufgetaut worden waren, verwendet. Jedoch könnten auch frisch isolierte Langerhans-Inseln verwendet werden, wie es für den Fachmann ersichtlich ist. Während der Inkubation wurde die Umgebungsluft mit 5 % CO_2 versetzt.

Serumpräparation

[0061] Rattenserum wurde zur Proliferation der Ratteninseln zum Medium gegeben. 2-5 ml Blut wurde einer Ratte entnommen und in ein 15 ml fassendes steriles Falcon-Röhrchen übertragen. Das Blut wurde 2-4 h bei Raumtemperatur stehen gelassen und sodann 10 Minuten mit 3.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1,5 bis 2 ml fassende Röhrchen übertragen, über Nacht bei 4°C stehen gelassen und sodann erneut auf die gleiche Weise zentrifugiert. Sodann wurde der Überstand bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt. Humane Inseln wurden im Medium bei einem Gehalt an 10 % humanem Serum anstelle von Rattenserum proliferiert, wobei die Vorbereitung auf die gleiche Weise erfolgte.

[0062] Das Grundmedium (50 ml) wurde durch Vermischen folgender Bestandteile hergestellt: 1,1 mg (100 μl) Pyruvat (Gibco brl); 0,25 μg (100 μl) Hydrocortison (Sigma); 100 Einheiten (100 μl) (1 ml) Penicilin/Streptomycin; 4,456 mg (4 μl) β -Mercaptoethanol (Sigma); 14,6 mg L-Glutamat (Gibco); 238,3 (1ml) Hepes-Buffer (Gibco); 100 mg (11 mM) Glucose (Sigma) plus DMEM zur Auffüllung auf ein Volumen von 50 ml.

Versuchsbeispiel II-I

Züchtung von Langerhans-Inseln unter basischen Bedingungen

Erster Tag:

[0063] 500 Inseln wurden unter basischen Bedingungen gezüchtet. Die frisch isolierten Inseln wurden über Nacht bei 37°C in 6 ml Grundmedium inkubiert, das mit 600 µl Rattenserum (10 %), 30 µg Insulin-Transferrin-Natriumselenit (ITS) (5 µg/ml, I-1884, Sigma USA), 6 mg Linolsäure-BSA (1 mg/ml, L-8384, Sigma USA), 60 ng (von Blutplättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor) PDGF (10 ng/ml, P8147, Sigma, USA), 600 ng Thrombin (100 ng/ml, T-4393, Sigma, USA) 60 ng (epidermaler Wachstumsfaktor) EGF (10 ng/ml, E-1264, Sigma USA), 187,2 mg 10⁻⁴ M Superoxid-dismutase (Produktnummer S-9636, Sigma, USA), 109,32 µg 10⁻⁴ M Mannit (M-9546, Sigma, USA), 61 mg (3 mM) Nicotinamid (N-0636, Sigma, USA), 12 ng (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) VeGF (2 ng/ml, V-7259, Sigma, USA), 600 ng (insulinartiger Wachstumsfaktor I und II) IGF-1 und IGF-2 (I-3769 bzw. I-213P, Sigma USA) ergänzt war.

Versuchsbeispiel II-II

Zweiter Tag:

1. Die 500 Inseln wurden 45 bis 120 Minuten bei Raumtemperatur mit 50 ng (25 ng/ml) anti-Integrin-β1-Antikörper (Katalognummer I-41720 Transduction Labs., USA) in 2 ml DMEM-Medium oder serumfreiem Grundmedium inkubiert.
2. Die Inseln wurden sodann in 200 µl 80 bis 100 % Matrigel® (Collaborative Biomedical Product, USA) suspendiert, um eine dreidimensionale Wachstums Umgebung bereitzustellen.
3. 2 ml des vorstehend ergänzten Grundmediums wurden zugegeben und ferner mit 100 µg Hypophysenextrakt (50 µg/ml, P-1167, Sigma, USA) ergänzt und 1 bis 2 Tage bei 37°C gezüchtet.

Versuchsbeispiel II-III

Dritter oder Vierter Tag:

[0064] Das Züchtungsmedium wurde mit frischem ergänzten Grundmedium, das die gleiche Zusammensetzung wie das Medium vom ersten Tag aufwies, mit der Ausnahme, dass kein VeGF zugesetzt wurde, ersetzt, wobei je nach der Inselgestalt dem Medium weitere Faktoren gemäß den folgenden Angaben zugesetzt wurden:

1. 20 ng (Nervenwachstumsfaktor) NGF (10 ng/ml, N-6009, Sigma, USA), 50 ng HGF (25 ng/ml, Collaborative Biomedical Product, USA, Charge 902287) wurden zu 2 ml des ergänzten Grundmediums gegeben, wenn die Inseln in der Mitte der Insel dick und dunkel wurden. Anschließend wurden die Inseln 1 oder 2 Tage im Medium gezüchtet; oder
2. 20 ng NGF und 100 ng anti-Integrin-β1-Antikörper (50 ng/ml) wurden zu 2 ml ergänztem Grundmedium gegeben, wenn die Inseln ein ausgebreitetes Erscheinungsbild zeigten. Anschließend wurde eine 1- bis 2-tägige Züchtung vorgenommen.

[0065] Ein mit 200-facher Vergrößerung mit einem Mikroskop aufgenommenes Bild ist in [Fig. 9](#) dargestellt.

[0066] Nach 6 oder 7 Tagen wurde folgende Züchtungssequenz mit den Inseln durchgeführt.

Siebter Tag:

[0067] Die Inseln wurden aus dem dreidimensionalen Gel gewonnen. Die Fibroblasten wurden unter Verwendung von Dispase gemäß dem nachstehend beschriebenen Verfahren entfernt. Die gewonnenen Inseln wurden über Nacht in einer schwimmenden Kultur gezüchtet, d.h. die Inseln wurden nicht in einem Medium, z. B. einem Gelmedium, fixiert. Das Züchtungsmedium bestand aus 6 ml des vorstehend beschriebenen ergänzten Grundmediums, das mit 600 µl Rattenserum (10%), 30 µg Insulin-Transferrin-Natriumselenit (ITS), 6 mg Linolsäure-BSA (1 mg/ml), 600 ng Thrombin (100 ng/ml T-4393 Sigma USA), 60 ng EGF, 101 ng Nicotinamid, 12 ng VeGF, 600 ng IGF-1, 600 ng IGF-2, 187,2 mg 10⁻⁴ M Superoxid-dismutase (Sigma) und 109,32 µg 10⁻⁴ M Mannit ergänzt worden war.

Achter Tag:

[0068] Die Inseln wurden in frischem DMEM, das mit 50 ng anti-Integrin- β 1-Antikörper ergänzt worden war, 45 bis 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2. Die Inseln wurden in Matrigel® suspendiert, um sie in einer dreidimensionalen Umgebung zu züchten.
3. 2 ml des ergänzten Grundmediums wurden mit 100 μ g Hypophysenextrakt ergänzt und 1 bis 2 Tage bei 37°C gezüchtet.

Neunter oder Zehnter Tag:

1. Ergänztetes Grundmedium wurde gemäß den vorstehenden Angaben hergestellt, mit der Ausnahme, dass VeGF nicht verwendet wurde.
2. Je nach der Inselgestalt, wurden die Inseln 2 bis 3 Tage im vorstehenden Medium gezüchtet, wobei die Faktoren, die für das Züchtungsmedium des dritten oder vierten Tages vorgegeben wurden, zugesetzt wurden.

Vierzehnter Tag:

1. Die Inseln wurden aus dem Gel unter Verwendung von Dispase gemäß den nachstehenden Angaben gewonnen und wie am siebten Tag behandelt. Diese Stufe dient hauptsächlich zur Freisetzung der Inseln aus dem Gel. Wenn jedoch Fibroblasten verbleiben sollten, wurden diese ebenfalls von der Oberfläche der Inseln entfernt.
2. Die Inseln wurden bei 37°C in einer schwimmenden Kultur (Inseln nicht in einer Matrix fixiert) in einem Medium mit der gleichen Zusammensetzung wie am ersten Tag inkubiert. Diese Inseln können transplantiert werden, werden aber vorzugsweise der nachstehend beschriebenen Entfernungsbildung unterzogen.

Versuchsbeispiel III

[0069] Während der Züchtung wurden die DNA-Mengen der Langerhans-Inseln jeden zweiten Tag gemessen. Ihre relativen Mengen wurden gegen die Züchtungszeit auf der Grundlage des Tages, an dem die Langerhans-Inseln isoliert wurden, aufgetragen. Wie aus [Fig. 10](#) ersichtlich, zeigten die Langerhans-Inseln eine Proliferation bis zu etwa 1000 % am 14. Tag der Züchtung.

Beispiel IV

Test auf die in vivo-Funktion der Langerhans-Inseln

Versuchsbeispiel IV-1

Glucosespiegel im Blut von diabetischen Ratten nach Transplantation mit frisch isolierten Langerhans-Inseln

[0070] Hierfür erhielten Ratten eine intraperitoneale Injektion von Streptozotocin (STZ) in einer Dosierung von 53 bis 55 mg pro kg Körpergewicht. Der Glucosespiegel im Blut wurde 2 Wochen lang jeden Tag geprüft. Wenn der Glucosespiegel im Blut 250 ng/mg erreicht hatte, wurden die Sprague/Dawley (SD)-Ratten als diabetisch eingestuft.

[0071] 5,5 ml Collagenase X1 (0,7 mg/ml, Typ X1, Sigma, USA) wurden in den Pankreas von gesunden Ratten durch eine Injektion über den gemeinsamen Gallengang eingeführt, um den Pankreas zu erweitern und ihn 17 Minuten bei 37°C zu digerieren. Anschließend wurde der digerierte Pankreas dreimal mit Dulbecco-modifizierten Eagle-Medium (DMEM) gewaschen. Die Langerhans-Inseln wurden daraus isoliert und in einem diskontinuierlichen Rinderserumalbumin (BSA)-Konzentrationsgradienten gewonnen. Die gewonnenen Langerhans-Inseln wurden mit DMEM bis zu einem Gesamtvolumen von 100-150 μ l versetzt.

[0072] Mit 1 ml-Spritzen wurde die erhaltene Lösung in die Leber-Portalvene der diabetischen Ratten, die durch intraperitoneale Injektion von Entobal (Hanlim Pharmacy Co., Ltd., Korea) in einer Dosierung von 60 mg pro kg Körpergewicht anästhesiert worden waren, injiziert.

[0073] 1650 (Inseläquivalente (IEQ) 2750) und 1350 (IEQ 2400) frische Wistar-Kyoto (WK)-Ratteninseln wurden in die Leber von mit Streptozotocin induzierten diabetischen Ratten mit einem Gewicht von 175 g über die

Leber-Portalvene transplantiert. 1650 frische Inseln reichten aus, um einen normalen glykämischen Zustand wiederherzustellen und aufrecht zu erhalten, wobei aber 1350 frische Inseln zur Wiederherstellung und Aufrechterhaltung eines normalen glykämischen Zustands nicht ausreichten; vgl. [Fig. 13](#). Daher stellen 1650 frische Inseln die erforderliche Mindestanzahl an Inseln dar.

Versuchsbeispiel IV-II

Glucosespiegel im Blut nach Transplantation von in vitro proliferierten Ratteninseln

[0074] Das Verfahren von Versuchsbeispiel III-I wurde unter Verwendung der gleichen Langerhans-Inseln wie in Beispiel II wiederholt, die aber in einem Medium, das mit Kollagen, Radikalfängern, Zellwanderungs/Streufaktoren, Wachstumsfaktoren und anti-Integrin- β -Antikörper ergänzt worden war, proliferiert.

[0075] Die Glucosespiegel im Blut der mit 500 proliferierten Ratteninseln transplantierten Rattenwirte wurden gemessen und gegen die Zeit aufgetragen. Die Messungen des Glucosespiegels im Blut sind in [Fig. 14](#) dargestellt. Es ist ersichtlich, dass 500 proliferierte Langerhans-Inseln vollständig die Funktion erfüllten, den normalen glykämischen Zustand wiederherzustellen und aufrechtzuerhalten, so dass eine ausreichende Insulinmenge sezerniert wurde, um auf die Glucosespiegel der Wirte im Blut angemessen zu reagieren.

Versuchsbeispiel IV-III

Glucosekonzentrationsprofil von STZ-induzierten diabetischen Mäusen bei Transplantation mit einer verschiedenen Anzahl an frischen Ratteninseln

[0076] Frische Ratteninseln wurden in verschiedener Anzahl in die Milz von STZ-induzierten diabetischen Nacktmäusen transplantiert, um die minimale Anzahl an Inseln festzustellen, die zur Wiederherstellung und Aufrechterhaltung eines normalen glykämischen Zustands erforderlich war. Die Glucosekonzentrationen im Blut der meisten Mäuse wurden gemessen und gegen die Zeit aufgetragen. Die Ergebnisse sind in [Fig. 15](#) dargestellt. Die Figur zeigt das Profil der Glucosekonzentrationen im Blut gegen die Zeit in Tagen. Mindestens 800 frische Inseln sind zur Wiederherstellung und Aufrechterhaltung des normalen glykämischen Zustands erforderlich.

[0077] Das Profil des Glucosespiegels im Blut von STZ-induzierten diabetischen Mäusen von [Fig. 15](#) beruht auf STZ-induzierten diabetischen Mäusen, die mit proliferierten Ratteninseln transplantiert waren.

[0078] Die von Sprague-Dawley (SD)-Ratten isolierten Langerhans-Inseln wurden im gleichen Medium wie in Beispiel II proliferiert.

[0079] Etwa 150-200 proliferierte Ratteninseln wurden in die Milz von STZ-induzierten diabetischen Nacktmäusen transplantiert. Die 150-200 proliferierten Ratteninseln reichen bezüglich der Anzahl aus, um den normalen glykämischen Zustand wiederherzustellen und wieder aufrechtzuerhalten.

[0080] Die Inseln wurden in die Milz von STZ-induzierten diabetischen Nacktmäusen transplantiert. Die Glucosespiegel im Blut der Wirtsmäuse wurden gemessen und gegen die Zeit in Tagen aufgetragen. Die Ergebnisse sind in [Fig. 17](#) dargestellt. Im Vergleich zu [Fig. 15](#) zeigten in vitro proliferierte Inseln (5-6 Tage) eine 3- bis 5-fach höhere in vivo-Funktion als frische Inseln.

[0081] Wie vorstehend ausgeführt, lassen sich Langerhans-Inseln unabhängig davon, ob sie gerade aus dem Pankreas isoliert worden sind oder aus einem gefrorenen Zustand aufgetaut worden sind, bei Züchtung in einem in Bezug auf die Spezies ähnlichem Serum (d.h. Rattenserum oder Humanserum für Ratten- bzw. humane Langerhans-Inseln) volumenmäßig proliferieren, wobei das Medium mit Radikalfängern, Kollagen, Wachstumsfaktoren und Zellwanderungs/Zellstreuungs-Faktoren ergänzt ist. Ferner verarmen die Langerhans-Inseln, die für eine lange Zeitspanne im ergänzten Medium gezüchtet werden, in Bezug auf Blutzellen, so dass sie transplantiert werden können und in Bezug auf eine Wiederherstellung und Aufrechterhaltung des normalen glykämischen Zustands günstig wirken.

Versuchsbeispiel V

In vitro-Funktion (Glucosereaktion von proliferierten Inseln)

[0082] Frische und proliferierte Ratteninseln wurden 1 h mit 2,7 und 16,7 mM Glucose inkubiert. Unter Verwendung eines 125 I-Insulin-Kits wurde die Konzentration des sezernierten Insulins gemessen.

[0083] Proliferierte Inseln reagieren nahezu überhaupt nicht auf eine geringe Glucosekonzentration und sehr stark auf hohe Glucosekonzentrationen. Dagegen reagieren frische Inseln stärker auf eine geringe Glucosekonzentration und weniger auf eine hohe Glucosekonzentration als proliferierte Inseln (vgl. [Fig. 12](#)). Die Ergebnisse zeigen, dass in vitro-proliferierte Inseln wünschenswertere funktionelle Eigenschaften als frische Inseln aufweisen und daher proliferierte Inseln als Autotransplantationsmaterial verwendet werden können.

Versuchsbeispiel VI

Fibroblastenentfernung

[0084] Bei frischen Inseln besteht die Wahrscheinlichkeit zu einer Kontamination mit Fibroblasten, selbst wenn sie in reinem Zustand gesammelt worden sind, wie aus der Tatsache ersichtlich ist, dass zahlreiche Fibroblasten während der Proliferation aus den Inseln herauswachsen. Die Fibroblasten werden vor der Inseltransplantation vollständig entfernt, wie aus **Fig. 11C** ersichtlich ist. Die Inseln werden während der Proliferation in einem Gel (z. B. Matrigel®) dispergiert. Nach etwa 7 oder 14 Tagen werden die Inseln aus dem Gel gewonnen und mit 400 µl Dispase (Collaborative Biomedical Products, USA, Cat. 40235) versetzt und etwa 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend werden die Inseln mehrmals vor und zurückgesaugt, was dazu führt, dass das Gel, durch die Einwirkung der Dispase von den Inseln befreit wird, wodurch die Fibroblasten der während des Vor- und Zurücksaugens ausgeübten Kraft ausgesetzt werden, was dazu führt, dass die Fibroblasten von der Oberfläche der Inseln getrennt werden und fibroblastenfreie Inseln erzeugt werden.

[0085] Die Inseln proliferierten bis zum 5- und 10-fachen während der ersten bzw. zweiten Woche bei der in vitro-Züchtung. Diese proliferierten Inseln zeigten ein erstrebenswerteres in vitro Glucose-Reaktionsmuster als frische Inseln. Ihre Transplantationsergebnisse zeigten, dass diese Inseln eine 3- bis 4-fach höhere Fähigkeit zur Wiederherstellung und Aufrechterhaltung eines normalen glykämischen Zustands als frische Inseln aufwiesen. Diese Daten lassen darauf schließen, dass in vitro-proliferierte Inseln eine bessere Quelle für eine Transplantation zur Behandlung von Diabetes darstellen als frische Inseln. Infolgedessen lassen sich erfindungsgemäß große Menge der Langerhans-Inseln erzeugen. Somit stellt eine Transplantation unter Verwendung der erfindungsgemäß proliferierten Inseln eine vielversprechende therapeutische Maßnahme zur Behandlung von Diabetes dar.

Versuchsbeispiel VII

Durch Insel-Autotransplantation stimulierte Inselregeneration

[0086] Durch eine Insel-Autotransplantation wurde ein normaler glykämischer Zustand wiederhergestellt und aufrechterhalten. Bei den diabetischen Ratten kam es zu einer Inselneubildung. Eine exogene Insulininjektion stimulierte keine Inselneubildung. Jedoch stimuliert eine Insel-Autotransplantation die Inselneubildung.

[0087] In der nachstehenden Tabelle sind der Insulingehalt, die Anzahl und die Größe von Inseln, die von Ratten und Mäusen gewonnen wurden, die entweder einer Pankresektomie (Spalten 2 und 3) unterzogen worden waren oder die nach der Transplantation in diabetische Mäuse/Ratten transplantiert worden waren (Spalten 4, 5 und 6), aufgeführt. Die Inseln waren entweder frisch (Spalten 4 und 5) oder nach dem erfindungsgemäßen Verfahren 6 Tage gezüchtet/proliferiert (Spalte 6). Bei der Transplantation (TX) handelt es sich um eine Insel-Autotransplantation. Die Ergebnisse in den Spalten 5 und 6 zeigen, dass die transplantierten Inseln, die entweder in frischem Zustand vorliegen oder erfindungsgemäß proliferiert worden sind, zu einer Inselregeneration im Pankreas führen.

	Pankreasektomie		Frisch	Frisch	Autotrans-plantation
	80-90% Pankreas-ektomie am Tag 0	2 Monate nach 90 % Pankreas-ektomie	25 Tage instabiler Glucosewert im Blut nach TX von 1450 Inseln in die Leber	25 Tage stabiler normaler glykämischer Zustand, kontrolliert durch TX von 1650 frischen Inseln in die Leber	13 Monate normaler glykämischer Zustand nach TX von 500 proliferierten Inseln in die Leber
Anzahl der gewonnenen Inseln	113 (IEQ 223)	235 (IEQ 505)	70 (IEQ 100) aus Pankreas	226 (IEQ 168) aus Pankreas	164 (IEQ 264) aus Pankreas
Inselgröße	Keine Daten ermittelt da ein normaler Zustand vorliegt	Sehr groß	Variation von klein bis sehr groß	Kleine Inseln (90-119) unreif	Sehr groß
Vorhandendes Insulin	Hoch	Hoch	Hoch	Nieder	Hoch

[0088] Dies wird durch die folgenden experimentellen Ergebnisse belegt (vgl. die vorstehende Tabelle).

1. 1350 frische Ratteninseln wurden in die Leber einer STZ-induzierten diabetischen Ratte über die hepatische Portalvene transplantiert. Die Glucosekonzentration im Blut fiel 35 Tage später allmählich auf den normalen glykämischen Zustand ab. Die Werte bewegten sich 20 Tage im Bereich von 200 und erreichten schließlich 1 bis 2 Tage einen normalen glykämischen Zustand, wie aus [Fig. 13](#) ersichtlich ist. Inseln wurden aus dem Pankreas gewonnen und mit Dithizon tief gefärbt.

2. 1650 frische Ratteninseln wurden syngen in die Leber einer STZ-induzierten diabetischen Ratte transplantiert. Die Ratte erreichte einen normalen glykämischen Zustand und hielt diesen 25 Tage aufrecht, wie aus [Fig. 13](#) ersichtlich ist. Nach dem Töten wurden 226 (IEQ 168) kleine Inseln gewonnen. Sie färbten sich nicht mit Dithizon. Die Pankreasinseln waren unreif und konnten durch Neogenese entstanden sein. Vergleicht man schließlich beide Fälle, so ergibt anscheinend ein durch Insel-Autotransplantation wiederhergestellter normaler glykämischer Zustand eine günstige Umgebung für eine Inselneubildung und -replikation durch Sekretion verschiedener natürlicher Substanzen.

3. Die syngen mit 500 proliferierten Inseln transplantierten Ratten blieben 13 Monate lang normoglykämisch, wie aus [Fig. 14](#) ersichtlich ist. 164 große Inseln (IEQ 264) wurden gewonnen und tief mit Dithizon gefärbt. Die Ergebnisse zeigen, dass neogene (Pankreas-Inseln) bis zu großen reifen Inseln über einen langen Zeitraum hinweg heranwuchsen und die Insel-Autotransplantation die Inselregeneration verstärkt und die Inselreifung stimuliert.

904. Ratten mit % Pankreasektomie blieben zwei Monate lang normoglykämisch. 235 große Inseln wurden aus dem restlichen Pankreas gewonnen. Die Inseln wurden tief mit Dithizon gefärbt. Sie schienen aus der Inselregeneration zu stammen und wuchsen zwei Monate lang.

905. Ratten mit % Pankreasektomie blieben zwei Tage normoglykämisch. Inseln wurden aus dem restlichen Pankreas gewonnen.

6. Bei Ratten mit 90 % Pankreasektomie wurden 113 (IEQ 223) Inseln aus dem verbleibenden Kopfteil des Pankreas am Tag der Pankreasektomie gewonnen. Auf der Basis der Ergebnisse der Pankreasektomie hängen die Inselregenerationsrate und -größe vom Ausmaß des Inselmangels ab.

[0089] Eine Insel-Proliferationsforschung wird mit dem Endziel zur Behandlung eines diabetischen Patienten durch Insel-Autotransplantation unter Bereitstellung einer ausreichenden Anzahl an Inseln für das Transplantat durchgeführt. Die vorliegende Erfindung stellt die erforderliche Anzahl an Inseln bereit, da sie in erfolgreicher Weise eine in vitro-Inselproliferation ermöglicht. Einer der Hauptgründe für das Versagen von Transplantationen besteht nämlich darin, dass die Anzahl an Inseln, die zur Transplantation bei einem diabetischen Patienten zur Verfügung steht, ungenügend ist. Dieses Problem wird erfindungsgemäß überwunden.

[0090] Obgleich die vorliegende Erfindung unter Verwendung von Ratten- und Mäuseinseln entwickelt wurde, fällt die Anwendung der vorliegenden Erfindung auf die Vermehrung von humanen Inseln unter den Umfang der Lehre der Erfindung, wie es für den Fachmann ersichtlich ist.

Patentansprüche

1. Verfahren zur in vitro-Züchtung und -Vermehrung von isolierten Langerhans-Inseln-Endokrinzellen, die für Transplantationszwecke geeignet sind, wobei das Verfahren folgendes umfasst:

- (a) lebensfähige Langerhans-Inseln-Endokrinzellen unter Einschluss von Zellen, die zur Differenzierung zu Insulin erzeugenden Zellen befähigt sind, werden bereitgestellt;
- (b) ein erstes Kulturmedium wird bereitgestellt, das folgendes umfasst: ein mit Serum ergänztes Grundmedium; mindestens einen Radikalfänger, der unter Nicotinamid, Mannit und Superoxid-dismutase ausgewählt ist; mindestens einen Wachstumsfaktor, der unter Insulin-Transferin-Selenit (ITS), epidermalem Wachstumsfaktor (EGF), von Blutplättchen abgeleiteter Wachstumsfaktor (PDGF), Thrombin, Linolsäure-BSA, Hydrocortison und Progesteron ausgewählt ist; und mindestens einen Antinekrose- oder Antiapoptosefaktor, der unter insulinartigem Wachstumsfaktor-1 (IGF 1) und -II (IGF 2) und vaskulärem endotheliale Wachstumsfaktor (VeGF) ausgewählt ist;
- (c) die Langerhans-Inseln-Endokrinzellen werden für einen Zeitraum von etwa 1 Tag im ersten Kulturmedium gezüchtet, um ein erstes Kulturwachstum zu erzeugen;
- (d) das erste Kulturwachstum wird gewonnen und etwa bei Raumtemperatur in frischem Dulbeco-modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) oder serumfreiem Grundmedium mit anti-Integrin- β 1-Antikörper 45 bis 120 Minuten gezüchtet, um ein zweites Kulturwachstum zu erzeugen;
- (e) das zweite Kulturwachstum wird in einem Matrixmaterial suspendiert, um eine dreidimensionale Kulturwachstumsumgebung bereitzustellen, ein zweites Kulturmedium wird zugesetzt, das das ergänzte Grundmedium und ferner mindestens Hypophysenextrakt enthält, und eine 1- bis 2-tägige Züchtung wird durchgeführt, um ein drittes Kulturwachstum, das im Matrixmaterial dispergiert ist, zu erzeugen;
- (f) ein drittes Kulturmedium zur Züchtung des dritten Kulturwachstums im Matrixmaterial wird bereitgestellt, wobei das dritte Kulturmedium das ergänzte Grundmedium ohne vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VeGF) enthält, und gegebenenfalls wird das dritte Kulturmedium mit Nerven-Wachstumsfaktor (NGF) und Hepatozyten-Wachstumsfaktor (HGF) versetzt, wenn die Inseln des dritten Kulturwachstums ein dickes Erscheinungsbild zeigen und das Zentrum der Inseln ein dunkles Erscheinungsbild zeigt, oder das dritte Kulturmedium wird mit (NGF) und anti-Integrin- β 1-Antikörper versetzt, wenn die Inseln ein zu stark verteiltes Erscheinungsbild zeigen, und die Züchtung wird für eine Zeitspanne von etwa 1 bis 2 Tagen durchgeführt, um ein viertes Kulturwachstum zu erzeugen;
- (g) die Inseln aus dem Matrixmaterial werden gewonnen, ein Enzym wird zu den gewonnenen Inseln und zu etwaigem haftendem Gel zugegeben und eine Inkubation wird durchgeführt; und
- (h) das inkubierte Produkt wird abgesaugt, um eine Entfernung des Gels, auf das das Enzym eingewirkt hat, von den Inseln zu bewirken, wodurch die Fibroblasten der während des Absaugvorgangs erzeugten Kraft ausgesetzt werden, was bewirkt, dass die Fibroblasten von der Oberfläche der Inseln unter Bildung von fibroblastenfreien Inseln getrennt werden.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Serum von der gleichen Spezies wie die Langerhans-Inseln erhalten wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die Langerhans-Inseln von einer Ratte stammen und es sich beim verwendeten Serum um etwa 10 % Rattenserum handelt, oder von einem Menschen stammen und es sich beim verwendeten Serum um etwa 10 % Humanserum handelt.

4. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Langerhans-Inseln-Endokrinzellen in Stufe (a) von einem Patienten für eine Autotransplantation stammen.

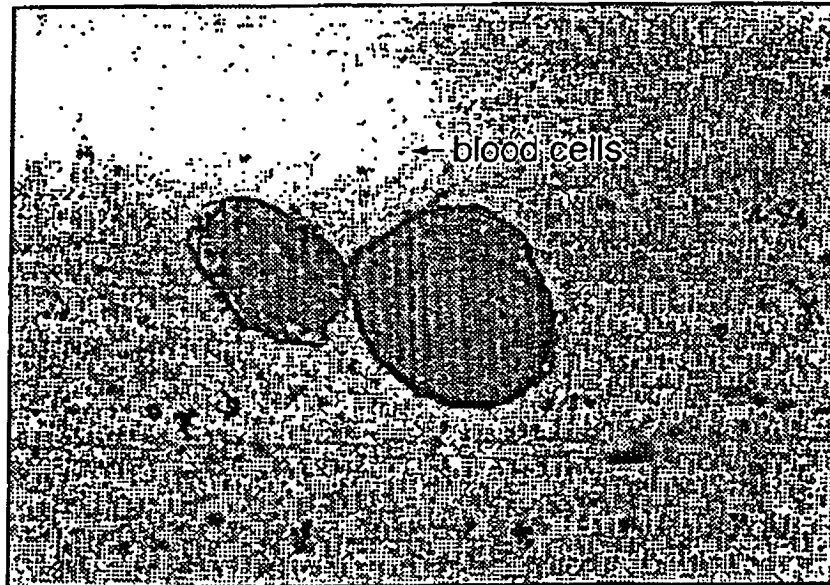
5. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, ferner umfassend:

- (i) ein viertes Kulturmedium wird bereitgestellt, das das Grundmedium umfasst, das mit Serum, Insulin-Transferin-Natriumselenit (ITS), Linolsäure-BSA, Thrombin, EGF, Nicotinamid, VeGF, IGF-1, IGF-2, Superoxid-dismutase und Mannit ergänzt ist;
- (j) die fibroblastenfreien Inseln werden etwa 8 bis 12 Stunden gezüchtet, um ein fünftes Kulturwachstum zu erzeugen;
- (k) ein fünftes Kulturmedium wird bereitgestellt, das DMEM mit einem Integrin- β 1-Antikörper umfasst, und das fünfte Kulturwachstum wird 45 bis 120 Minuten bei Raumtemperatur gezüchtet, um ein sechstes Kulturwachstum zu erzeugen;

- (l) das sechste Kulturwachstum wird in einem Matrixmaterial suspendiert, um eine dreidimensionale Kulturwachstumsumgebung bereitzustellen, ein sechstes Kulturmedium wird zugesetzt, das das ergänzte Grundmedium und ferner mindestens Hypophysenextrakt enthält, und eine 1- bis 2-tägige Züchtung wird durchgeführt, um ein siebtes Kulturwachstum, das im Matrixmaterial dispergiert ist, zu erzeugen;
- (m) ein siebtes Kulturmedium zur Züchtung des siebten Kulturwachstums, das im Matrixmaterial dispergiert ist, wird bereitgestellt, wobei das siebte Kulturmedium das ergänzte Grundmedium ohne vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VeGF) umfasst, und gegebenenfalls wird das siebte Kulturmedium mit Nervenwachstumsfaktor (NGF) und Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) versetzt, wenn die Inseln des siebten Kulturmediums ein dickes Erscheinungsbild zeigen und das Zentrum der Inseln ein dunkles Erscheinungsbild zeigt, oder gegebenenfalls wird das siebte Kulturmedium mit NGF und anti-Integrin- β 1-Antikörper versetzt, wenn die Inseln ein zu stark verteiltes Erscheinungsbild zeigen, und die Züchtung wird für eine Zeitspanne von 1 bis 2 Tagen durchgeführt, um ein achtes Kulturwachstum zu erzeugen; und
- (n) die Inseln aus dem Matrixmaterial werden gewonnen, ein Enzym wird zu den gewonnenen Inseln und zu etwaigem haftenden Gel zugegeben und eine Inkubation wird durchgeführt;
- (o) das inkubierte Produkt wird abgesaugt, um eine Entfernung des Gels, auf das das Enzym eingewirkt hat, von den Inseln zu bewirken, wodurch die Fibroblasten der während des Absaugvorgangs erzeugten Kraft ausgesetzt werden, was bewirkt, dass die Fibroblasten von der Oberfläche der Inseln unter Bildung einer erhöhten Anzahl von fibroblastenfreien Inseln getrennt werden.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Fig.1.



blood cells: Blutzellen

Fig.2.



Fig.3.

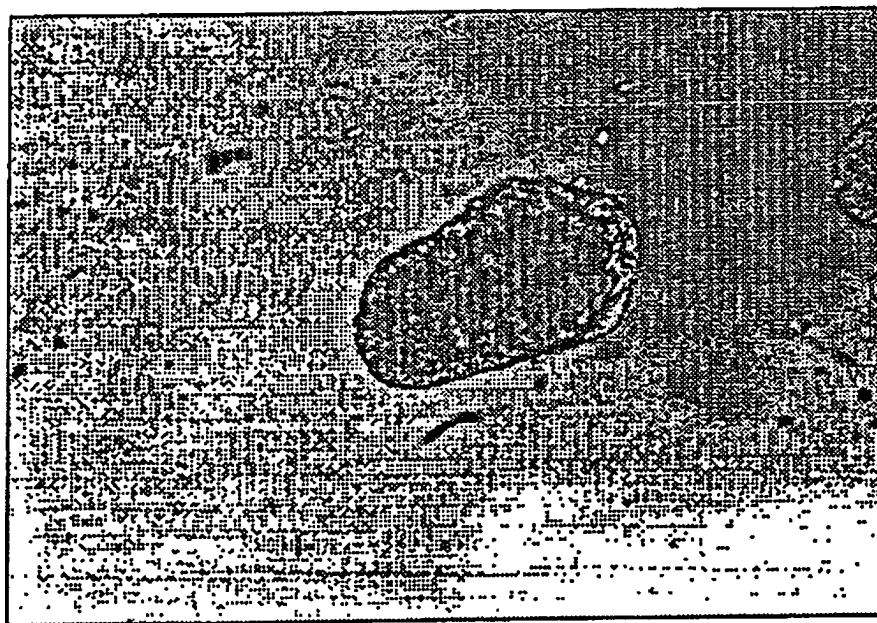


Fig.4.



Fig.5.

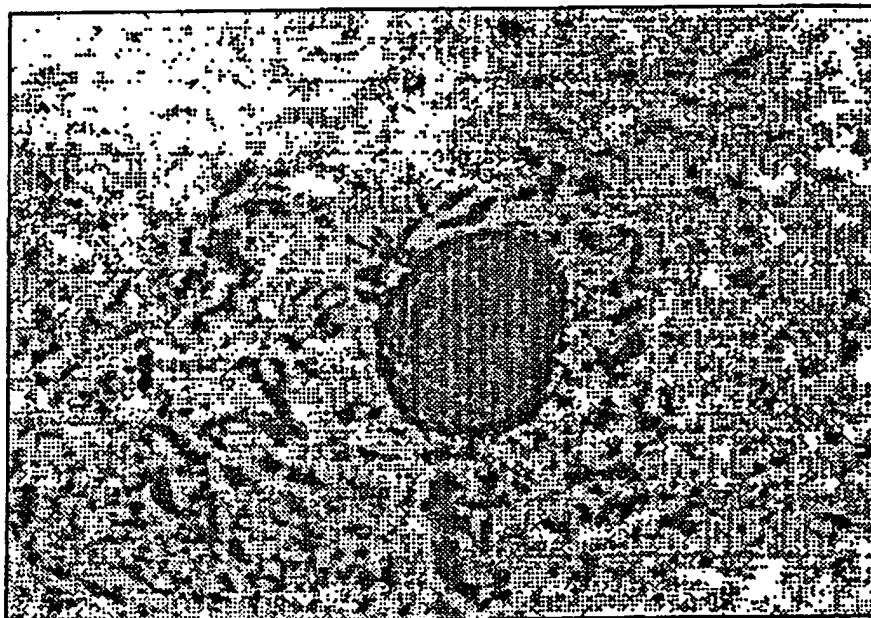


Fig.6.

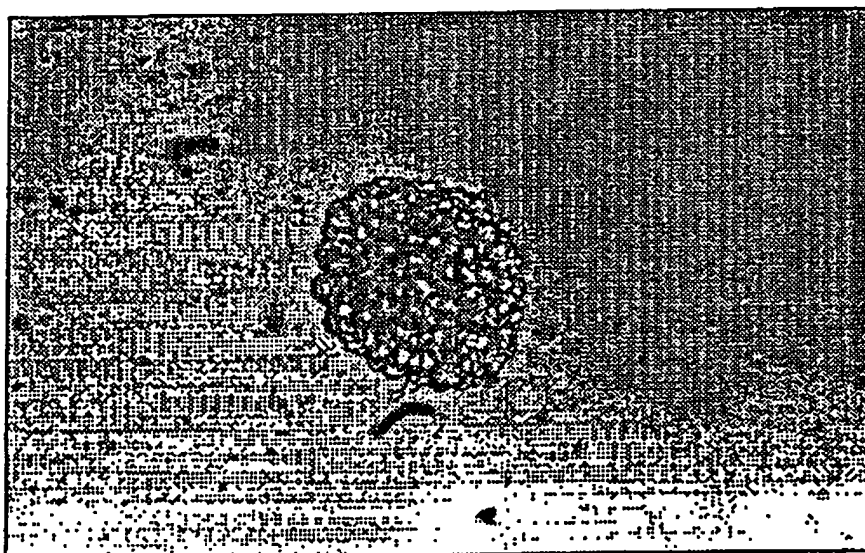


Fig.7.

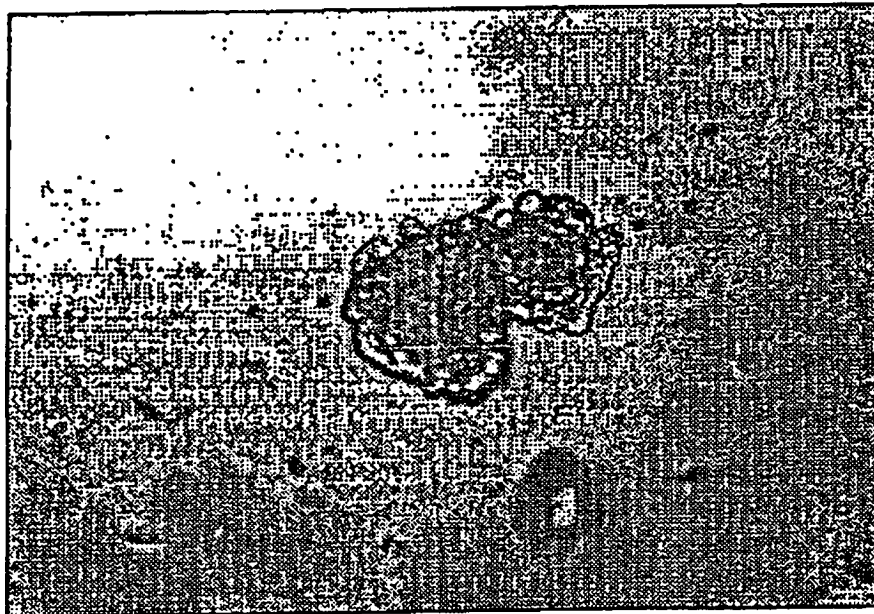


Fig.8(A).



Fig.8(B).

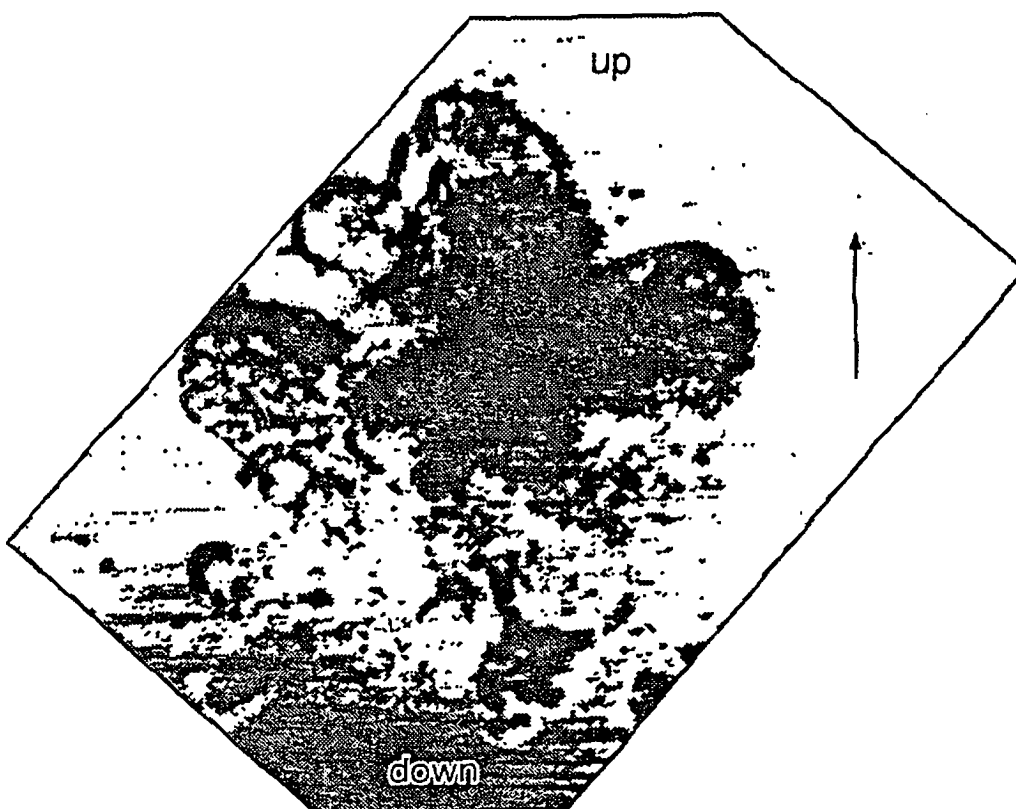


Fig.9.



Fig.10.

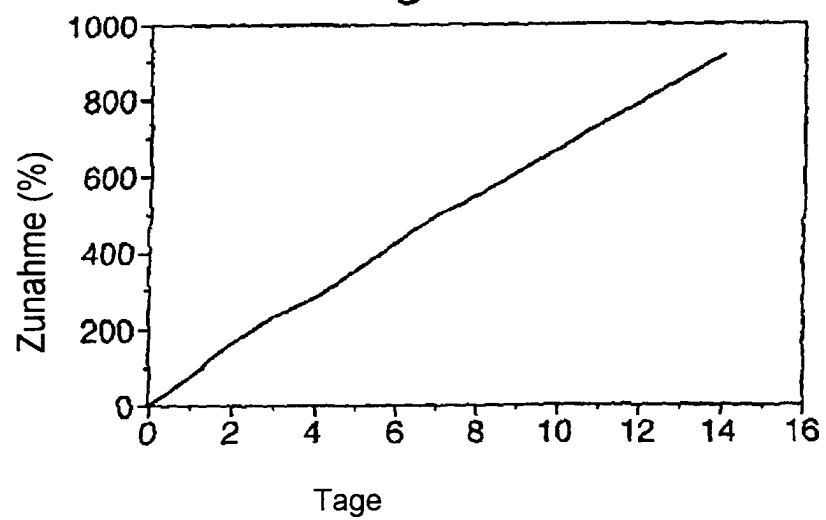


Fig.11(A).



Fig.11(B).

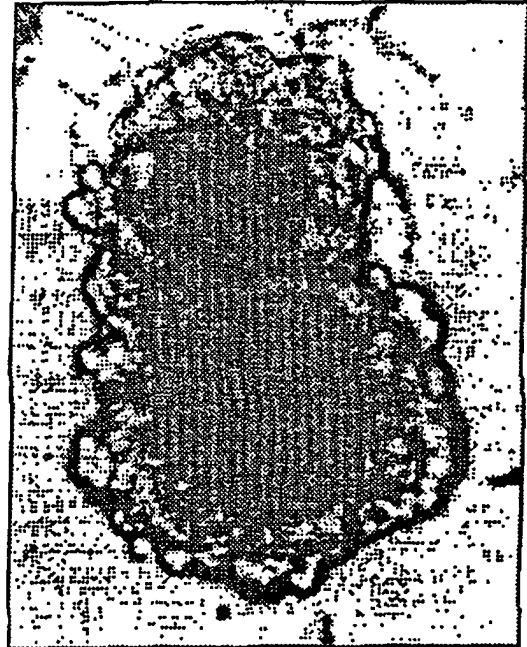


Fig.11(C).

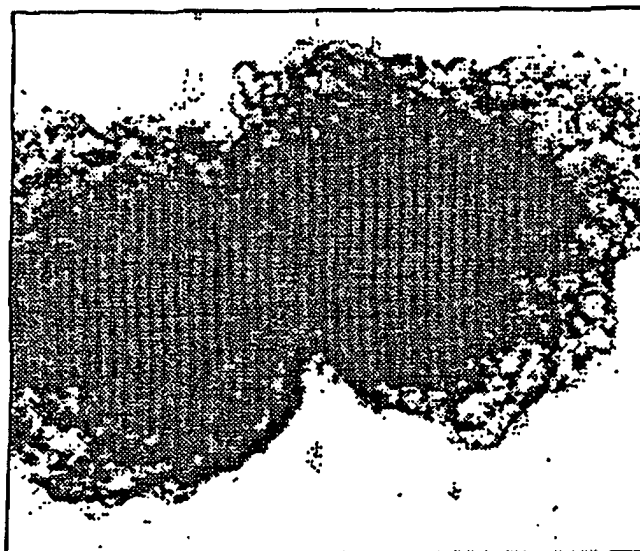


Fig.12.

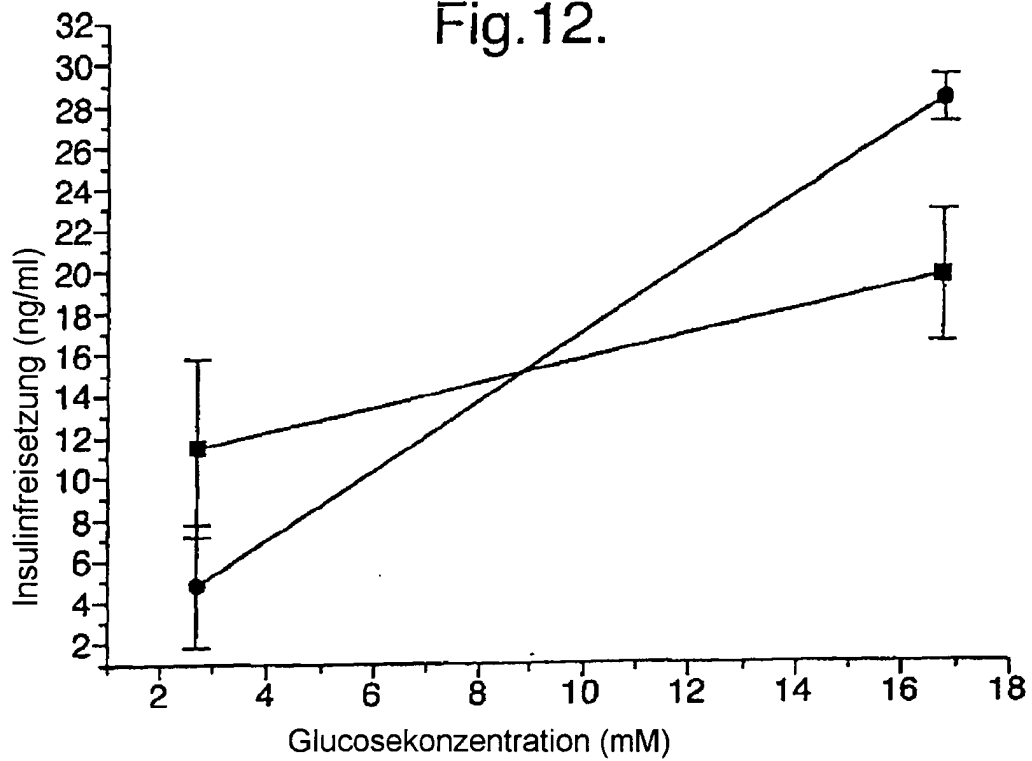


Fig.13.

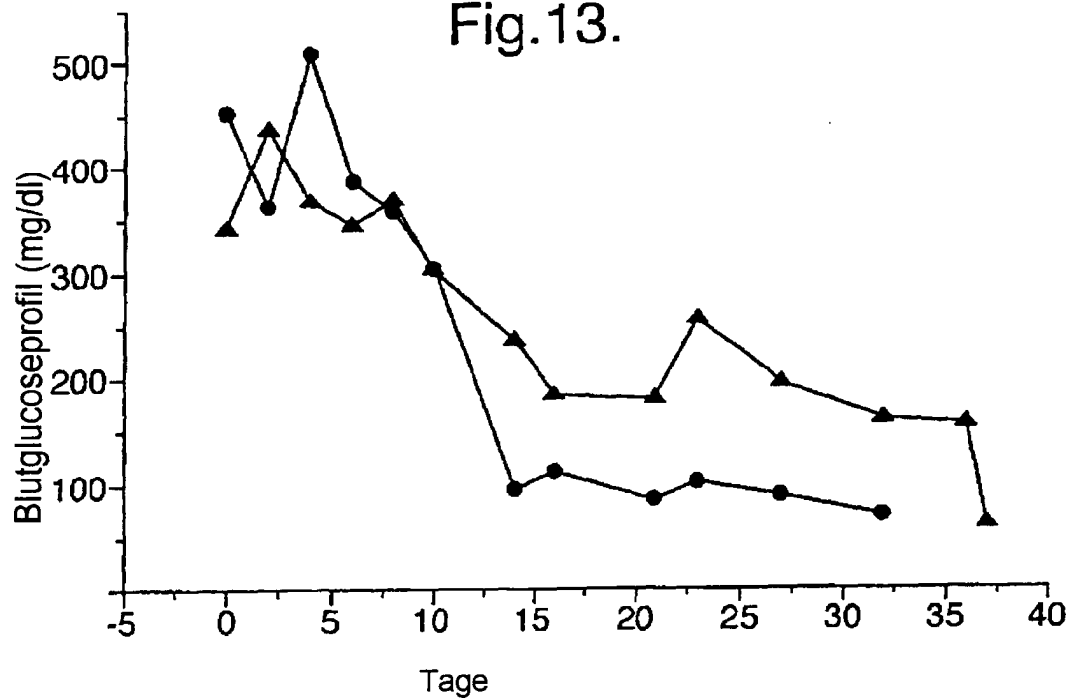


Fig.14.

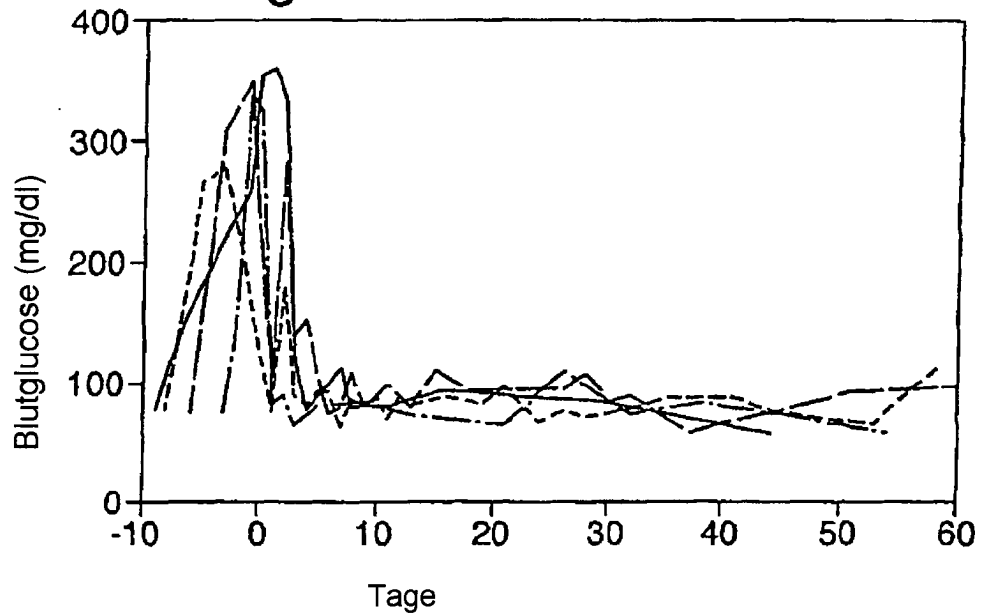


Fig.15.

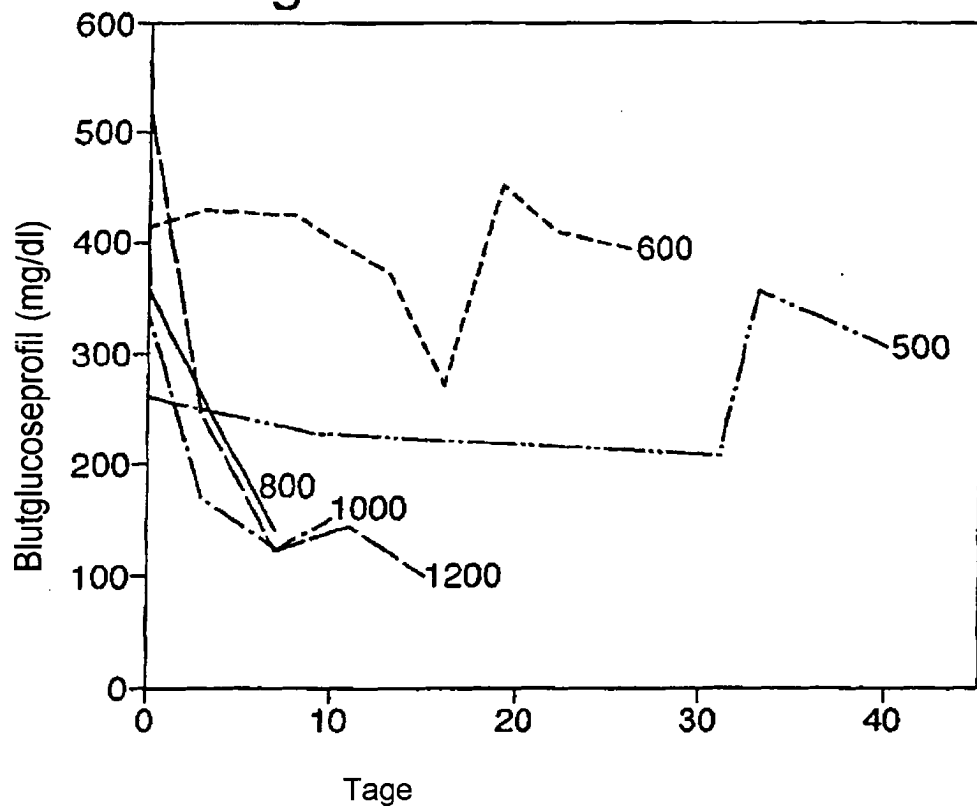


Fig.16.



Fig.17.

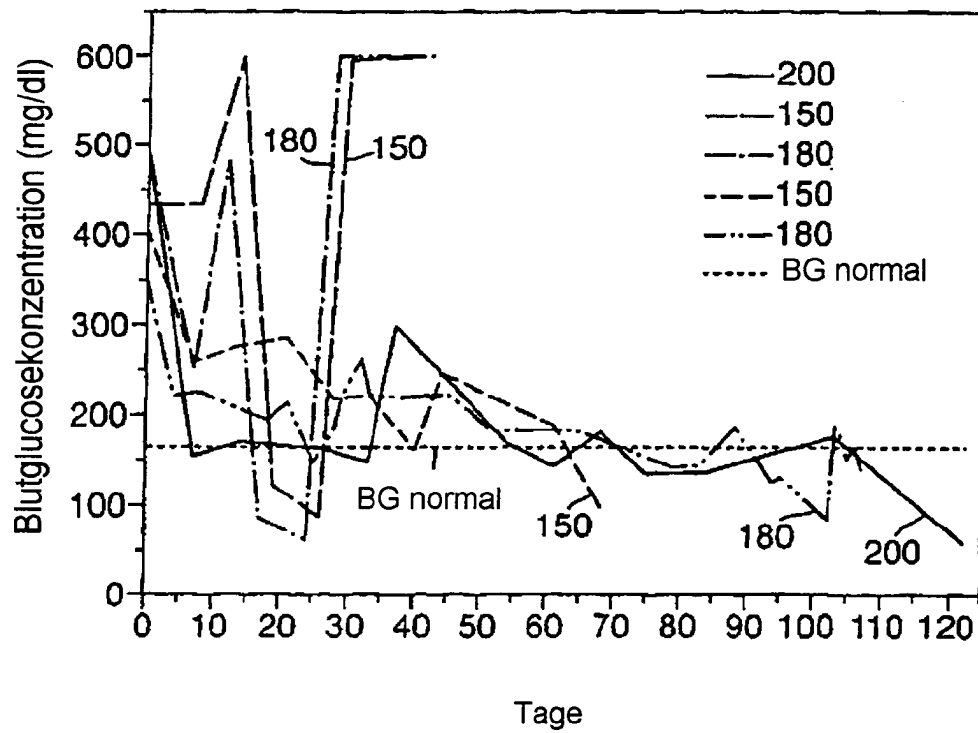


Fig.18.

