



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **323174**

(13) **B1**

(51) Int Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19975557	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1996.06.06 PCT/US96/09781
(22)	Inng.dag	1997.12.02	(85)	Videreføringsdag	1997.12.02
(24)	Løpedag	1996.06.06	(30)	Prioritet	1995.06.07, US, 481127
(41)	Alm.tilgj	1998.02.05			
(45)	Meddelt	2007.01.15			
(73)	Innehaver	California Institute of Technology, 1200 East California Boulevard, Pasadena, CA 92115, US			
(72)	Oppfinner	David J. Anderson, Altadena, CA, US			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO			

(54)	Benevnelse	Immortalisert patteredycellelinje og fremgangsmåte for immortalisering og dissimortalisering av celler			
(56)	Anførte publikasjoner	Geller et al., 1991, Journal of Cellular Biochemistry, Vol 45, pp. 279-283 WO A1 92/15694 WO A1 93/01283			
(57)	Sammendrag				

Fremgangsmåter og sammensetninger for kondisjonell immortalisering av celler blir beskrevet.

Oppfinnelsen angår immortalisert pattedyrcellelinje inneholdende eksogen nukleinsyre fremgangsmåter for immortalisering og disimmortalisering av celler.

5 Genterapi, der eksogen nukleinsyre ble tilsatt en celle for å korrigere genetiske defekter eller å behandle forstyrrelser, er et sterkt voksende felt. Ofte blir genterapi utført ved å anvende en pasients celler som en bærer for eksogen nukleinsyre; dvs. cellene kan bli fjernet fra en pasient, genetisk manipulert og gjeninnført i pasienten. Se f.eks. US-patent nr. 5.399.346.

10 Et problem med denne tilnærmelsen er at cellene som er fjernet generelt har en begrenset levetid i kultur, under fravær av videre genetisk manipulasjon. Fjernede cellelinjer blir således ofte transformert med et immortaliseringsgen slik som et oncogen. Dette tillater ubegrenset vekst og proliferasjon av cellene. Immortaliserte celler som inneholder oncogener er imidlertid uegnede transplantatkandidater, på grunn
15 av det er uønsket å innføre oncogener i en pasient.

WO A1 93/01283 beskriver at rekombinasesystemet kan benyttes for å fjerne uønskede gener i forbindelse med produksjon av transgene planter. WO A1 92/15694 beskriver bruk av et setespesifikt rekombinasesystem for å klippe ut et reportergen i forbindelse
20 med produksjon av transgene pattedyrceller. Videre omhandler Geller et al., 1991, Journal of Cellular Biochemistry, Vol. 45, s. 279-283 immortaliserte cellelinjer for genterapistudier. Den motholdte kjente teknikk beskriver ikke en immortalisert pattedyrcellelinje eller fremgangsmåte for å immortalisere og disimmortalisere celler slik det beskrives her i dokumentet.

25 Det er således et mål med oppfinnelsen å skaffe tilveie fremgangsmåter for å fremstille immortaliserte cellelinjer som blir dyrket og som er evigvarende ex vivo, og deretter kan induseres for å disimmortalisere, dvs. fjerne oncogenene før innføring i en pasient eller dyr.

30 I overensstemmelse med de foregående mål, skaffer oppfinnelsen tilveie en immortalisert pattedyrcellelinje som inneholder i genomet av nevnte celle eksogen nukleinsyre, kjennetegnet ved at den omfatter minst en første og en andre loxP-rekombinase målseter som flankerer et enkelt immortaliseringsgen, der loxP-målsetene
35 har evne til å formidle fjerning av immortaliseringsgenet når nevnte loxP-målseter kommer i kontakt med en Cre-rekombinase.

I et annet trekk omfatter de immortaliserte cellene ytterligere eksogen nukleinsyre som omfatter et seleksjonsmarkørgen, som kan være et positivt eller negativt seleksjonsmarkørgen. Cellene kan også inneholde et stoppsete, og et ytterligere seleksjonsmarkørgen, der det andre seleksjonsmarkørgenet ikke befinner seg mellom første og andre loxP-rekombinase måsete.

Et annet trekk omfatter oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en immortalisert celle som inneholder rekombinasemålseter som flankerer et immortaliseringsgen i genomet til den immortaliserte cellen, kjennetegnet ved at fremgangsmåten omfatter transformering av en celle med eksogen nukleinsyre som omfatter:

- a) et første loxP-rekombinasesete;
- b) et enkelt immortaliseringsgen; og
- c) et andre loxP-rekombinasesete;

slik at i fravær av en Cre-rekombinase blir den eksogene nukleinsyren inkorporert i genomet til cellen.

En foretrukken utførelsesform angår en fremgangsmåte kjennetegnet ved at nukleinsyren videre omfatter minst et seleksjonsmarkørgen.

En annen foretrukken utførelsesform angår en fremgangsmåte kjennetegnet ved at seleksjonsmarkørgenet er en negativ seleksjonsmarkør.

Videre omfatter oppfinnelsen en fremgangsmåte for disimmortalisering av en immortalisert celle som inneholder eksogen nukleinsyre, kjennetegnet ved at den omfatter loxP-rekombinasemålseter som flankerer et enkelt immortaliseringsgen i genomet av den immortaliserte cellen, og fremgangsmåten omfatter at man bringer loxP-rekombinasemålsetene i kontakt med en Cre-rekombinase.

I et ytterligere trekk ved oppfinnelsen skaffes det tilveie en fremgangsmåte for disimmortalisering av en immortalisert celle, kjennetegnet ved at den omfatter:

a) inkorporering av eksogen nukleinsyre som omfatter:

- i) et første loxP-rekombinasemålsete;
- ii) et enkelt immortaliseringsgen;

- iii) et negativt seleksjonsmarkørgen; og
- iv) et andre loxP-rekombinasemålsete;

inn i genomet av en celle for å produsere en immortalisert celle som inneholder et enkelt
5 immortaliseringsgen som kan fjernes i en orientering slik at fjerning av sekvensen
mellom loxP-rekombinasemålsetene fjerner immortaliseringsgenet og den negative
seleksjonsmarkør; og

- b) bringe nevnte loxP-rekombinasemålseter i kontakt med en Cre-rekombinase som
10 gjenkjenner loxP-rekombinasemålsetene slik at immortaliseringsgen og negativt
seleksjonsmarkørgen blir fjernet.

I en utførelsesform omfatter fremgangsmåten videre selektering for disimmortaliserte
celler i nærvær av et negativt seleksjonsmiddel.

15

I en annen utførelsesform omfatter den eksogene nukleinsyren et positivt seleksjonsgen.

Oppfinnelsen omfatter videre en fremgangsmåte for disimmortalisering av en
immortalisert celle, kjennetegnet ved at den omfatter:

20

- a) inkorporering av eksogen nukleinsyre som omfatter:

- i) et første loxP-rekombinasemålsete;
- ii) et enkelt immortaliseringsgen;
- 25 iii) et andre loxP-rekombinasemålsete; og
- iv) et negativ seleksjonsmarkørgen;

inn i genomet til en celle for å produsere en immortalisert celle som inneholder et
immortaliseringsgen som kan fjernes i en orientering slik at fjerning av sekvensen
30 mellom loxP-rekombinasemålsetene fjerner immortaliseringsgenet, hvilket resulterer i
ekspresjon av seleksjonsmarkør; og

- b) bringe nevnte loxP-rekombinasemålseter i kontakt med en Cre-rekombinase som
gjenkjenner loxP-rekombinasemålsetene slik at immortaliseringsgenet blir fjernet.

35

I en utførelsesform omfatter nukleinsyren et stoppsete.

I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten selektering for disimmortaliserte celler som uttrykker nevnte seleksjonsmarkørgen.

Oppfinnelsen angår videre en fremgangsmåte for disimmortalisering av en immortalisert
5 celle, kjennetegnet ved at den omfatter:

a) inkorporering av eksogen nukleinsyre som omfatter:

- i) et første loxP-rekombinasemålsete;
- 10 ii) et enkelt immortaliseringsgen;
- iii) et første seleksjonsmarkørgen;
- iv) et andre loxP-rekombinasemålsete; og
- v) et andre seleksjonsmarkørgen;

15 inn i genomet til en celle for å produsere en immortalisert celle som inneholder et immortaliseringsgen som kan fjernes i en orientering slik at når immortaliseringsgenet blir uttrykt, blir første seleksjonsmarkør også uttrykt og andre seleksjonsmarkørgen blir ikke uttrykt og når nevnte immortaliseringsgen blir fjernet, blir den andre seleksjonsmarkøren uttrykt; og

20

b) bringe nevnte loxP-rekombinasemålseter i kontakt med en Cre-rekombinase som gjenkjenner loxP-rekombinasemålsetene slik at immortaliseringsgenet blir fjernet.

Fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen kjennetegnes ved at kontakten skjer ved
25 transformering av de immortaliserte cellene med en vektor som koder for en Cre-rekombinase som gjenkjenner loxP-rekombinasemålsetene under betingelser der Cre-rekombinasen blir uttrykt.

Figurene 1A, 1B, 1C og 1D viser utforming av fire vektorer for kondisjonell
30 immortalisering. RTS er et rekombinasemålsete. MPCS er et multippelpolybindingskloningssete, inn i hvilket et immortaliseringsgen blir innsatt. STOP er en translasjons- eller transkripsjonsstoppsekvens. LTR er en viral lang terminalgjentakelse. SV40 er promoteren fra SV40.

35 Figurene 2A, 2B, 2C, 2D og 2E viser foretrukkede utførelsesformer. Figur 2(A) og 2(B) er to alternative utforminger av samme basisvektor. I begge vektorer blir immortaliseringsgenet, (f.eks. v-myc) satt inn i et multippelpolybindingskloningssete

(MPCS) flankert av RTS, dvs. loxP-seter eller FRT-seter. Nedstrøms for MPCS er det en «STOP» sekvens slik som TGAAGACCTGA utformet for å hindre translasjon av en nedstrøms selekterbar markør (alkalisk fosfatase, medikament-seleksjonsmarkører, celleoverflateproteiner, grønnfluoreserende protein, lacZ, etc.). Det er også en forskjellig medikamentseleksjonsmarkør for å selektere for initiell immortalisering av celler, histidinol, neomycin, hygromycin, etc. Medikament-seleksjonsmarkøren blir drevet av viral LTR og oncogenet med en intern promotor-forøker (2A) slik som SV40 forøker eller vice-versa (2B). Figur 2C er retmycgal vektoren som ble anvendt i eksemplene; immortaliseringsgenet som ble anvendt var v-myc, den andre selekterbare markøren var lacZ, og første selekterbare markør var histidinol. Figur 2D er rettknew.ap vektoren, der immortaliseringsgenet var v-myc, intern promotor var tk, første selekterbare markør var neo, og andre selekterbare markør var alkalisk fosfatase. Figur 2E er ret.INS.ap vektoren, hvori immortaliseringsgenet var v-myc, IRES i et internt ribosominngangssete, første selekterbare markør var neo og andre selekterbare markør var alkaliske fosfatase.

Figurene 3A, 3B og 3C viser immortalisering/disimmortaliseringskonstruksjoner ved å anvende negative seleksjonsmarkører for å sikre at alle cellene har blitt disimmortalisert. Figur 3A utnytter immortaliseringsgenet som seleksjonsmarkør for transformasjon; alternativt kan klonal analyse ved å anvende eksponering til en negativ seleksjonsmiddel tjene som markør for transformasjon. Figur 3B anvender en positiv seleksjonsmarkør som markør for transformasjon. De positive og negative seleksjonsmarkørgenene kan bli lokalisert i en hvilken som helst rekkefølge. Figur 3C tilfører en rekombinase under kontroll av en inducerbar promotor; et positivt seleksjonsgen kan også bli tilsatt. Disse genene kan igjen bli lokalisert i en hvilken som helst rekkefølge. Promoterne for transkripsjon av gener forskjellig fra rekombinase er ikke vist, da de kan bli lokalisert i tallrike lokaliteter.

Figur 4A og 4B viser anvendelse av to forskjellige rekombinaser og RTS. Figur 4A muliggjør ekspresjon av immortaliseringsgenet og første seleksjonsmarkørgen, der andre seleksjonsmarkørgen ikke er uttrykt inntil eksisjon mellom de to RTS1. Ved RTS 1 eksisjon, blir andre seleksjonsmarkørgen uttrykt, og tillater seleksjon for disimmortaliserte celler. Forut for transplantasjon vil eksponering til rekombinasegenkjenne RTS 2 eksistere andre seleksjonsmarkør, og således minimalisere eksogen nukleinsyre. Figur 4B er tilsvarende, med unntagelse av at ytterligere eksogent gen er inkludert, f.eks. som kode for et terapeutisk middel. Celler kan således bli transplantert med det uttrykte eksogene genet, og ved et senere tidspunkt blir cellene eksponert til den andre rekombinase for å fjerne eksogent gen.

Figur 5 viser en kondisjonell immortaliseringskonstruksjon som unngår anvendelse av et STOP sete ved å anbringe RTS i midten av en seleksjonsmarkørgen. RTS må være inkludert i eksoner, som ved eksisjon, en av RTS forblir i genomet. Ved transformasjon av celler med denne konstruksjonen, blir immortaliseringsgenet og første seleksjonsmarkørgen transkribert ved å anvende en andre promoter. Immortaliserte celler blir deretter selektert på basis av første seleksjonsmarkør. Ved eksponering til en rekombinase som gjenkjenner RTS, blir immortaliseringsgenet og første seleksjonsmarkør fjernet, sammen med en av RTS setene. Andre seleksjonsmarkør blir transkribert, ved andre RTS blir fjernet som et resultat av RNA splittsignaler som blir gjenkjent av det cellulære maskineriet i vertscellene. Dette tillater at andre seleksjonsmarkørgen blir transkribert.

Figur 6A og 6B viser anvendelse av en induserbar promoter med rekombinasegenet. Figur 6A og 6B tilsvarer konstruksjonen som er vist i figur 1C, men med et rekombinasegenet under kontroll av en induserbar promoter. Figur 6a viser en konstruksjon som vil la rekombinasegenet være igjen i genomet etter eksisjon, og figur 6B viser en konstruksjon som eliminerer rekombinasegenet.

Oppfinnelsen er rettet mot immortaliserte celler og fremgangsmåter og sammensetninger for kondisjonell immortalisering av celler. «Kondisjonell immortalisering» menes her en prosess der cellene blir immortalisert slik at de kan bli disimmortalisert ved et senere tidspunkt. Under visse betingelser, blir således cellene immortalisert; under forskjellige betingelser, som angitt under, er cellene ikke lenger immortaliserte, de returnerer til deres normale aldringsmønster, og vokser og prolifererer ikke lenger uendelig i cellekultur. Slik det er kjent innenfor fagområdet, menes med uttrykket «immortalisert» her at cellene har blitt transformert med et immortaliseringsgen, slik at ekspresjon av immortaliseringsgenet gir evnen til å vokse og proliferere hovedsakelig uendelig i kultur.

Med «immortaliseringsgen» menes her et gen som overviner aldringsmekanismen i en celle, og tillater at cellen blir subdyrket hovedsakelig i det uendelige. Immortaliseringsgenet er velkjent innenfor fagområdet. Generelt er immortaliseringsgenet eksogent i forhold til cellene som blir anvendt, og integrert i genomet til cellen. Eksempler på immortaliseringsgener innbefatter: (1) kjerneoncogener slik som v-myc, N-myc, T antigen og Ewing's sarcoma oncogen (Fredericksen et al., (1988) Neuron 1:439-448; Bartlett, P. et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3255-3259 og Snyder, E.Y. et

- al. (1992) *Cell* (68:33-51), (2) cytoplasmiske oncogener som bcr-abl og neurofibromin (Solomon, E. Et al. (1991) *Science* 254:1153-1160), (3) membran oncogener som neu og ret (Aaronson, A.S.A (1991) *Science* 254: 1153-1161), (4) dominante mutasjoner av tumorsuppressorgener som mutant p53 og mutant Rb (retinblastoma) (Weinberg, R.A. (1991) *Science* 254: 1138-1146) og (5) andre immortaliserende gener som Notch dominant negativ (Coffman, C.R. et al. (1993) *Cell* 23: 659-671); (5) vekstfaktorer; (6) vekstfaktorreseptorer; og (7) anti-celledøds gener som Bcl2. Spesielt foretrukkede oncogener innbefatter v-myc og SV40 T antigen.
- 10 Med «disimmortalisering» menes en prosess der hele eller deler av immortaliseringsgenet til en immortalisert celle blir fysisk fjernet fra genomet til cellen, og tillater at cellen returnerer til en mer normal aldringssyklus, slik at den ikke lenger vokser og prolifererer uendelig i kultur. En disimmortalisert celle kan ha hele eller deler av den kondisjonelle immortaliseringskonstruksjonen fjernet. Slik det er kjent innenfor
- 15 fagområdet, i forbindelse med beskrivelsen her, kan det lages mange kondisjonelle immortaliseringskonstruksjoner, hvilket resulterer i forskjellige mengder av eksogen nukleinsyre igjen i cellegenomet. I en foretrukket utførelsesform blir hele immortaliseringsgenet fjernet fra en disimmortalisert celle.
- 20 Fremgangsmåtene ved kondisjonell immortalisering og disimmortalisering ifølge oppfinnelsen blir gjennomført ved å anvende et sete-spesifikt rekombinase system. Flere slike systemer er kjent, inkludert Cre rekombinase fra bakteriofag P1 og FLP («flip») rekombinase fra *Saccharomyces cerevisiae*. Cre-systemet utnytter Cre-rekombinase, som er et 38 kDa protein, og to 34 basepar rekombinase målseter (RTS), betegnet loxP.
- 25 Rekombinasjonen kan foregå mellom direkte gjentagende loxP-seter på samme molekyl for å eksisere intervenerende DNA segment. Se Sauer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5166 (1988); Sauer et al., *Nuc. Acids Res.* 17:147 (1989); Lakso et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6232; Hoess et al., *J. Mol. Biol.* 181:351-362 (1985); Abremski et al., *Cell* 32: 1301 (1983); Sternberg et al., *J. Mol. Biol.* 150:467-486 (1981); og Orban et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6861 (1992). FLP-systemet utnytter FLP protein og to FLP rekombinasjonsmålseter (betegnet FRT innenfor fagområdet; vist her som RTS) som består av to 13 inverterte basepar gjentakelser og en 8 basepar avstandsholder (se f.eks. O’Gorman, *Science* 251:1351 (1991); Jayaram, *PNAS USA* 82:5875-5879 (1985); Senecof et al., *PNAS USA* 82:7270 (1985); og Gronostajski et al., *J. Biol.*
- 35 *Chem.* 260:12320 (1985)).

Med «rekombinasemålsete» (RTS) menes her en nukleinsyresekvens som er gjenkjent av en rekombinase for eksisjon av intervenerende sekvens. Det er underforstått at de to RTS er nødvendig for eksisjon. Når cre rekombinase ble anvendt, omfatter hver RTS et loxP-sete; når loxP-setene ble anvendt er tilsvarende rekombinase cre rekombinase.

- 5 Dette innebærer at rekombinasen må korrespondere til eller gjenkjenne RST. Når FLP rekombinase ble anvendt omfatter hver RTS et FLP rekombinasjonsmålsete (FRT); når FRT-sete ble anvendt, er tilsvarende rekombinase FLP rekombinasen.

- 10 Ved å anvende disse rekombinasesystemene kan immortaliseringsgenet som er innsatt i en vertscelle bli fjernet ved eksponering for passende rekombinase. Kondisjonelle immortaliseringskonstruksjoner blir innsatt i en celle i en orientering som resulterer i ekspresjon av immortaliseringsgenet. For alle utførelsesformene trenger ikke vertscellene å uttrykke nukleinsyre, og inneholder fortrinnsvis ikke nukleinsyre som kode for passende rekombinase forut for tilsetning av eksogen nukleinsyre ifølge
15 oppfinnelsen. Ved et senere tidspunkt blir rekombinasen uttrykt og kommer i kontakt med rekombinasemålsetene for å fjerne intervenerende immortaliseringsgen.

- Seleksjonsmarkørgener blir fortrinnsvis anvendt for å detektere eller selektene vellykket immortalisering og disimmortalisering. Ekspresjon av en første seleksjonsmarkør tillater
20 f.eks. deteksjon av vellykket immortalisering; dette innebærer at markørgenet blir uttrykt når immortaliseringsgenet har blitt integrert i cellegenomet. Ekspresjon av en seleksjonsmarkør, fortrinnsvis forskjellig fra første seleksjonsmarkørgen, indikerer eksisjon av immortaliseringsgenet, slik det blir detaljbeskrevet i det etterfølgende. Disse seleksjonsmarkørene kan enten være positive eller negative seleksjonsmarkører. Slik det
25 er kjent innenfor fagområdet, menes «seleksjonsmarkørgen» eller ekvivalenter gener som tillater seleksjon eller deteksjon av celler som inneholder genet. «Positiv seleksjon» refererer til en prosess der bare celler som inneholder den positive seleksjonsmarkøren vil overleve ved eksponering til positiv seleksjonsmiddel eller bli markert eller detektert. Medikamentresistens er f.eks. en vanlig positiv seleksjonsmarkør; celler som
30 inneholder medikamentresistensgen vil vokse på medium som inneholder medikamentet, og de celler som ikke inneholder resistensgenet vil dø. Egnede medikamentresistensgener er histidinol dehydrogenase, neomycin-resistens, hygromycin-resistens, og puromycin-resistens, blant andre. Andre positive seleksjonsmarkørgener innbefatter gener som tillater sortering eller screening av celler. Disse genene innbefatter
35 alkaliske fosfatasegen, genet for grønnfluorescerende protein, lacZ gen, og overflatemarkører som CD8, blant andre. I en utførelsesform som er beskrevet under, kan immortaliseringsgenet selv tjene som en positiv seleksjonsmarkør.

I en ytterligere utførelsesform blir negative seleksjonsmarkører anvendt. «Negativ seleksjon» refererer til en prosess der celler transfektert med en negativ seleksjonsmarkør blir drept og eksponering til et passende negativt seleksjonsmiddel som dreper celler inneholdende den negative seleksjonsmarkør. Celler som f.eks. inneholder herpes simplex virus-tymidinkinase (HSV-tk) gen er sensitive for gancyklovir (GANC). På tilsvarende måte gjør Gpt genet celler sensitive overfor 6-tioxantin. Når det er passende posisjonert i en kondisjonell immortaliseringskonstruksjon, kan det negative seleksjonsmarkørgenet bli anvendt til å isolere celler som har blitt disimmortalisert. Dette innebærer at den negative seleksjonsmarkør blir uttrykt med immortaliseringsgenet, slik at dersom immortaliseringsgenet fremdeles er tilstede, vil cellene bli drept.

Kondisjonelle immortaliserings-disimmortaliseringsvektorer og teknikker foregår vanligvis som følger. Genkonstruksjoner som ble anvendt for immortalisering blir satt opp på en sånn måte at en første transformasjon med eksogen nukleinsyre resulterer i immortalisering. Cellene kan bli dyrket og forsterket og andre gener kan bli tilsatt som angitt over. I noen tilfeller, når cellene er stamceller, unntatt humane totipotente stamceller, kan immortaliserte celler bli differensiert om ønskelig. Forut for transplantasjon eller ved et senere tidspunkt, blir cellene manipulert slik at immortaliseringsgenet blir eksisert; dvs. cellene blir disimmortalisert.

I en foretrukket utførelsesform blir kloningsvektoren som introduserer immortaliseringsgenet i cellen konstruert slik at immortaliseringsgenet, eventuelle seleksjonsmarkører, promotere og RTS integreres i genomet samtidig. Dette innebærer at ytterligere integrering av DNA i genomet ikke er nødvendig for å forenkle disimmortalisering. Alternativt kan immortaliseringsgenet bli innført til genomet med hensiktsmessige flankeringssekvenser for å tillate konstruksjon av homologe rekombinasjonsvektorer for å innføre ytterligere nødvendige sekvenser.

I en foretrukket utførelsesform forekommer disimmortalisering som et resultat av en videre introduksjon av eksogen nukleinsyre som koder for rekombinase i cellen, som angitt under.

I en utførelsesform vil foreliggende oppfinnelse skaffe tilveie kondisjonelt immortaliserte cellelinjer. Disse immortaliserte cellelinjene inneholder nukleinsyre som omfatter mange forskjellige kondisjonelle immortaliseringskonstruksjoner som angitt

under. Disse immortaliserte cellelinjene kan bli laget ved transformering av minst en celle med nukleinsyre som omfatter konstruksjoner i oppfinnelsen.

Disse kondisjonelt immortaliserte cellelinjene kan bli anvendt i flere metoder for
5 disimmortalisering som angitt under.

I en annen utførelsesform inneholder cellelinjene nukleinsyre som omfatter rekombinasemålseter som flankerer et immortaliseringsgen i genomet i cellene. Disse målcellene må være i en orientering slik at RTS har evne til å formidle eksisjon av
10 immortaliseringsgenet når RTS blir brakt i kontakt med en rekombinase. I fravær av rekombinase som gjenkjenner RTS, blir immortaliserings-genet inkorporert i cellens genom og uttrykt, for å frembringe en immortalisert cellelinje. Når RTS er eksponert for tilsvarende rekombinase, forekommer eksisjon av sekvensen mellom RTS-ene. Siden denne sekvensen inneholder immortaliseringsgenet, resulterer eksisjonshendelsen i et
15 tap av gen, dvs. disimmortalisering.

I en ytterligere utførelsesform skaffer oppfinnelsen tilveie immortaliserte cellelinjer som inneholder nukleinsyre som omfatter et første rekombinasemålsete, et immortaliseringsgen, en negativ seleksjonsmarkørgen, et andre rekombinasemålsete,
20 som generelt vist i fig. 3A. Som over i fravær av rekombinase som gjenkjenner RTS'ene, blir immortaliseringsgenet inkorporert i cellens genom og uttrykt, for å frembringe en immortalisert cellelinje. RTS'ene har evne til å formidle eksisjon av immortaliseringsgenet når RTS'ene bringes i kontakt med en rekombinase. I en foretrukket utførelsesform er immortalisering og negative seleksjonsmarkørgener
25 flankert av RTS. Ved transformasjon blir immortaliseringsgen og negativ seleksjonsmarkør uttrykt, og transformerte celler kan bli selektert på basis av immortalisering eller uttrykt av den negative seleksjonsmarkøren. Ved eksponering for eller kontakt med en rekombinase som gjenkjenner RTS, blir immortaliseringsgen og negativ seleksjonsmarkør eksisert, og disimmortaliserte celler kan bli selektert ved
30 eksponering for negativ seleksjonsmiddel. Disimmortaliserte celler vil således overleve, og de som fremdeles inneholder immortaliseringsgenet og negative seleksjonsmarkørgen vil dø.

I en ytterligere utførelsesform skaffer oppfinnelsen tilveie immortaliserte cellelinjer som
35 inneholder nukleinsyre som omfatter et første rekombinasemålsete, et immortaliseringsgen, et seleksjonsmarkørgen, og et andre rekombinasemålsete. Som angitt over i fravær av rekombinase som gjenkjenner RTS'ene, blir

immortaliseringsgenet inkorporert i genomet av cellen og uttrykt, for å skape en immortalisert cellelinje. RTS har evnen til å formidle eksisjon av immortaliseringsgenet der RTS kommer i kontakt med en rekombinase. I en utførelsesform er orienteringen av konstruksjonen fortrinnsvis slik at i fravær av en rekombinase, blir

5 immortaliseringsgenet uttrykt, men seleksjonsmarkørgenet blir ikke. Dette blir fortrinnsvis gjort ved tilsetning av et STOP sete til konstruksjonen, slik som vist i figur 1 og 4, skjønt også vist i figur 5, kan også bli gjennomført ved å ha en av RTS'ene i midten av seleksjonsmarkørgenet i introner. Ved eksponering for en rekombinase som gjenkjenner RTS'ene, blir intervenierende sekvens eksisert, og resulterer i tap av

10 immortaliseringsgen og ekspresjon av seleksjonsmarkørgen, og tillater således seleksjon av disimmortaliserte celler. Orientering av konstruksjonen er slik at ved transformasjon, blir immortaliseringsgen og seleksjonsgen uttrykt, og tillater således seleksjon for immortalisering. Ved eksponering for en rekombinase som gjenkjenner RTS, blir immortaliseringsgen og seleksjonsgen eksisert, og resulterende celler kan bli selektert

15 for disimmortalisering ved tap av seleksjonsgenet.

I en ytterligere utførelsesform frembringer oppfinnelsen immortaliserte cellelinjer om inneholder nukleinsyrer som omfatter et første rekombinasemålsete, et

20 immortaliseringsgen, et første seleksjonsmarkørgen, et andre rekombinasemålsete, og et andre seleksjonsmarkørgen. I denne utførelsesformen er orienteringen av konstruksjonen slik at ved transformasjon, blir immortaliseringsgen og første seleksjonsmarkørgen uttrykt, og det andre seleksjonsmarkørgenet blir ikke. Dette blir fortrinnsvis gjennomført ved tilsetning av et STOP sete til konstruksjonen, selv om det som over kan bli gjort på alternative måter. Ved eksponering eller i kontakt med en

25 rekombinase som gjenkjenner RTS, blir immortaliseringsgen og første seleksjonsmarkørgen eksisert, og andre seleksjonsmarkør blir uttrykt. Dette tillater seleksjon av disimmortaliserte celler på basis av det andre seleksjonsmarkørgen.

Flere spesifikke utførelsesformer er vist i figurene, som utnytter en foretrukket retroviral

30 kloningsvektor med enten Cre/loxP eller FLP/FRT rekombinasesystemene. Personer med kunnskap innenfor fagområdet vil forstå at mange konstruksjoner vil resultere i dannelse av immortaliserte celler som i det etterfølgende kan bli disimmortalisert, bare noen av disse er vist i figurene.

35 I en foretrukket utførelsesform er de kondisjonelle immortaliseringskonstruksjoner som vist i figurene 1 og 2. En kloningsvektor blir først konstruert som inneholder: en første selekterbar markør med en første promoter; en andre promoter; et multipl

polybindingskloningssete (MPCS), flankert av rekombinasemålseter (RTS); og en andre selekterbar markør. Immortaliseringsgenet som vanligvis er et oncogen, blir innsatt i MPCS, sammen med en eventuell STOP sekvens som forhindrer ekspresjon av den andre selekterbare markør. STOP sekvensene slik som TGACTGACCTGA er kjent innenfor fagområdet. I fravær av en rekombinase, blir således immortaliseringsgenet uttrykt ved å anvende den andre promoteren og den første selekterbare markør blir uttrykt ved å anvende første promoter. Dette tillater seleksjon av transformerte, immortaliserte celler, men STOP sekvensen forhindrer ekspresjon av den andre markøren. De immortaliserte cellene kan bli klonet og dyrket, og ytterligere gener tilsatt om ønskelig. For disimmortalisering, blir ekspresjon (fortrinnsvis forbigående) av passende rekombinase gjennomført ved å anvende teknikker som er velkjent innenfor fagområdet. Dette resulterer i eksisjon av rekombinase målsetene, MPCS som inneholder immortaliseringsgen og STOP sekvensen. Det andre selekterbare markørgenet blir således nå uttrykt, og disimmortaliserte celler kan bli selektert på basis av dette markørgenet.

I figur 1A blir første selekterbare markør translatert via første promoter (eller alternativt) fra en promoter internt til LTR), og immortaliseringsgenet innsatt i MPCS blir drevet av den andre promoteren. I fravær av en rekombinase forhindrer STOP sekvensen translasjon av den andre selekterbare markør. Ved eksponering for rekombinasen blir immortaliseringsgenet og STOP sekvensen eksisert, og tillater at den andre selekterbare markøren blir drevet av den andre promoteren. I figur 1B blir translasjon av immortaliseringsgenet drevet ved intern LTR promoter, den første selekterbare markør blir translatert via SV40 promoter eller ekvivalenter, men STOP sekvensen forhindrer translasjon av den andre selekterbare markør. Ved eksponering for rekombinase, blir immortaliseringsgen og STOP sekvens eksisert, og tillater translasjon av den andre selekterbare markør. I figur 1C, blir den første selekterbare markør og immortaliseringsgen translatert via enten en første promoter eller LTR promoter, men STOP sekvensen forhindrer translasjon av den andre selekterbare markør. Ved eksponering for rekombinase blir immortaliseringsgen og STOP sekvens eksisert, hvilket tillater translasjon av andre selekterbare markør via promoter eller LTR. I figur 1D foregår translasjon av grønnfluoresensprotein og immortaliseringsgen via LTR promoter (eller en annen promoter). Grønnfluoresensprotein tjener som en seleksjonsmarkør. Ved eksponering for rekombinase blir immortaliseringsgen og grønnfluoreserende proteinkodende sekvens eksisert. Cellene kan bli selektert først ved tilstedeværelse av grønnfluoreserende protein og deretter ved dens fravær.

RTS ble eksponert for eller kommer i kontakt med en rekombinase på en hvilken som helst av mange måter. Med «eksponert» eller «brakt i kontakt med rekombinase som gjenkjenner RTS» menes her at rekombinaseproteinet må reagere med RTS på en måte som tillater eksisjon av sekvensen mellom RTS'ene. Alt som er nødvendig er at

5 rekombinaseproteinet er tilstede i cellen som inneholder RTS. Dette kan bli gjort ved å uttrykke rekombinase-kodende gen i cellene som inneholder kondisjonelle immortaliseringskonstruksjoner som angitt under.

I en foretrukket utførelsesform er ekspresjon av rekombinasen forbigående, siden

10 setespesifikk rekombinasjon vanligvis er rask og effektiv. Forbigående ekspresjon ble oppnådd på mange måter som er velkjent innenfor fagområdet som innbefatter men ikke er begrenset til transfeksjon av plasmid DNA ved kalsiumfosfatutfelling, elektroporering, lipofeksjon eller andre fysikalsk-kjemiske metoder, transduksjon ved å anvende en retroviral virus, eller ekspresjon fra en annen rekombinant viral vektor slik

15 som adenovirus. Adenoviral ekspresjon er særlig foretrukket siden høye ekspresjonseffekter er vanlige.

I en alternativ utførelsesform blir genet som koder for rekombinasen plassert under kontroll av en induserbar promoter og er del av immortalisering/-

20 disimmortaliseringskonstruksjonen. En induserbar promoter operasjonelt bundet til rekombinasegenet kan generelt være inkludert i en hvilken som helst av utførelsesformene som er vist i figurene.

Generell konstruksjon av denne type er vist i figurene 6 og 3C. Figur 6A tilsvarer figur

25 1C med en indusertbart promoter/rekombinasegen tilført, som vil forbli i genomet. Figur 6B tilsvarer figur 1C når rekombinasen blir eksisert. Siden bare en liten mengde rekombinase er nødvendig for å resultere i eksisjon av sekvensene mellom RTS'ene, er det ønskelig å anvende tett regulerte promotere for å unngå premature rekombinasjonshendelser. Transkripsjonsstoppsignaler som flankerer rekombinasen er også ønskelig.

30 Rekombinasjon og eksisjon av immortaliseringsgenet, og fortrinnsvis rekombinasegenet, foregår når passende induseringsbetingelser blir administrert.

I en foretrukket utførelsesform blir negative seleksjonsmarkører anvendt, eller en kombinasjon av positive og negative seleksjonsmarkører. Negative seleksjonsmarkører

35 er særlig nyttige for å hindre transplantasjon av immortaliserte celler. Negative seleksjonsmarkører kan f.eks. bli uttrykt sammen med immortaliseringsgenet. Etter disimmortalisering blir cellene eksponert for det negative seleksjonsmidlet, slik som

GANC, som dreper enhver celle som fremdeles inneholder HSV-tk genet som er nær knyttet til immortaliseringsgenet. Spesielle eksempler er vist i figur 3. I figur 3A flankerer RTS et immortaliseringsgen og et negativt seleksjonsgen. Som beskrevet over tjener immortaliseringsgenet som første seleksjonsmarkør. Alternativt kan klonale kolonier som inneholder det negative seleksjonsgenet bli identifisert ved å anvende negative seleksjonsmarkører; dette innebærer at klonale kolonier blir anvendt til å identifisere opprinnelige kolonier som inneholder negative seleksjonsgen. Promoter(e) som ble anvendt for å drive ekspresjon av immortalisering og negative seleksjonsgener kan bli lokalisert på hver side av første RTS. Når den kommer i kontakt med en rekombinase, blir immortaliseringsgen og negativt seleksjonsgen eksisert, og cellen blir disimmortalisert. Enhver gjenværende immortalisert celle kan bli drept ved eksponering av de antatte disimmortaliserte cellene for det negative seleksjonsmidlet; i det tilfellet med herpes simplex virus tymidinkinasegen, kan f.eks. cellene bli eksponert til GANC. Dette reduserer og potensielt eliminerer gjenværende immortaliserte celler, hvilket er ønskelig når cellene skal bli anvendt til transplantasjon. Denne konstruksjonen er særlig foretrukket siden det resulterer i meget lite, om noe eksogen nukleinsyre gjenværende i cellens genom, noe som også er ønskelig ved transplantasjon. I figur 3B er det positive seleksjonsgen inkludert i konstruksjonen for å selektene for immortaliserte celler. I figur 3C er systemet tilsvarende som i figur 3a med unntagelse av at rekombinasen under kontroll av en induserbar promoter er inkludert, og eliminerer behov for ytterligere genetisk manipulering.

I en foretrukket utforming blir STOP seter anvendt til å forhindre translasjon av seleksjonsmarkører forut for disimmortalisering, slik det generelt er anvendt over for en lang rekke konstruksjoner. Alternativt, som vist i figur 5, er det mulig å forhindre ekspresjon av funksjonelle seleksjonsmarkører ved å anbringe RTS i midten av seleksjonsmarkørgenene. Denne metoden baseres på pålitelig eksisjon av en av RTS ved rekombinase og den andre via mRNA prosessering, siden eventuelle gjenværende nukleotider mest sannsynlig vil resultere i leserammeforskyvningsmutasjoner og således en ikke-funksjonell seleksjonsmarkør.

I en ytterligere utførelsesform blir mer enn et sett av RTS anvendt. Dette kan bli gjort ved ytterligere sett av RTS som blir gjenkjent av samme rekombinase eller alternativt ved anvendelse av RTS som blir gjenkjent av en ulik rekombinase.

Når ytterligere sett av RTS for samme rekombinase blir anvendt, må man være nøye med utforming av konstruksjoner slik at eksisjon mellom to hvilke som helst RTS gir et

ønsket eller målbart resultat. Siden eksisjon kan forekomme mellom to hvilke som helst RTS, er det mulig at en enkel RTS med flankerende eksogen nukleinsyre vil være igjen i genomet.

- 5 I en foretrukket utførelsesform blir sett av RTS fra forskjellige rekombinaser anvendt. Dette kan være av særlig nytte når ytterligere eksogener er inkludert i genomet. Ved f.eks. anvendelse av konstruksjoner som er vist i fig. 4A, blir immortaliserte celler selektert ved å anvende første seleksjonsmarkør. For disimmortalisering blir rekombinasen som gjenkjenner RTS setene anvendt, og disimmortaliserte celler
- 10 selektert ved å anvende den andre seleksjonsmarkøren. Det andre seleksjonsgenet kan bli transskribert ved å anvende første promoter, i dette tilfellet vil den bli skrudd på bare ved disimmortalisering, eller dens egne promoterer, som tillater transskripsjon under immortaliserte og disimmortaliserte betingelser. Disimmortaliserte celler som uttrykker eksogent protein blir transplantert. Ved et senere tidspunkt, f.eks. når det eksogene
- 15 genproduktet ikke lenger er nødvendig, resulterer eksponering for den andre rekombinasen i eksisjon av den andre seleksjonsmarkøren og det eksogene genet. Alternativt kan det eksogene genet bare være nødvendig ex vivo, og i dette tilfellet kan den andre rekombinasen bli anvendt forut for transplantasjon. Som for andre konstruksjoner som er beskrevet, vil de som har kunnskap innenfor fagområdet ha evne
- 20 til å konstruere mange tilsvarende funksjonelle konstruksjoner ved å benytte foreliggende beskrivelse.

- I en ytterligere utførelsesform blir to rekombinaser anvendt til faktisk å eliminere all eksogen nukleinsyre forut for transplantasjon. Ved f.eks. å anvende konstruksjoner som
- 25 er vist i fig. 4B, blir immortaliserte celler selektert ved å anvende den første seleksjonsmarkør. For disimmortalisering blir rekombinasen som tilsvarer RTS 1 setene brakt i kontakt med konstruksjonen, og cellene selektert på basis av den andre seleksjonsmarkøren som blir transskribert fra den første promoter. Cellene kan deretter komme i kontakt med en andre rekombinase som gjenkjenner RTS 2 setene forut for
- 30 transplantasjon, for å eliminere alle bortsett fra et enkelt RTS sete. Selv om eksisjonshendelsen er meget effektiv, kan tap av seleksjonsmarkøren ved å anvende klonale kolonier bli anvendt for seleksjon.

- I en utførelsesform vil rekombinasjonshendelsen eksistere første selekterbare markør.
- 35 Dette kan være foretrukket i situasjoner der de disimmortaliserte cellene skal bli transplantert, og det er ønskelig å minimalisere introduksjon av eksogene gener i en pasient.

- I en foretrukket utførelsesform er første selekterbare markør et medikament resistensgen som histidinoldehydrogenase, neomycin-resistens, hydromycin-resistens og puromycin-resistens blant andre. I denne utførelsesformen er den andre selekterbare markøren et
- 5 gen som vil tillate sortering eller screening av celler, og kan inkludere alkalisk fosfatasegen, genet for grønnfluorescerende protein, lacZ gen, overflatemarkører som CD8, eller en hvilken som helst av genene som er angitt for første selekterbare markør, så lenge første og andre selekterbare markør er forskjellige gener i en enkelt celle. I noen utførelsesformer kan transformasjonsfrekvensen være så høy at enten første eller
- 10 andre selekterbare markører kan bli eliminert, selv om det generelt er fordelaktig å bevare minst den andre selekterbare markør dersom disimmortaliserte celler er beregnet for transplantasjon, siden det er ønskelig å sikre at ingen celler som inneholder onkogene blir overført til dyr. I en utførelsesform blir en enkel seleksjonsmarkør anvendt, f.eks. en markør slik som grønnfluorescerende protein som tillater celledatering. I denne
- 15 utførelsesformen blir markøren uttrykt når immortaliseringsgenet blir innført, og transformerte celler blir separert fra ikke-transformerte celler ved celledatering. Ved disimmortalisering blir markørgenet eliminert, og cellene blir sortert på nytt, med disimmortaliserte celler som mangler markøren.
- 20 I en ytterligere utførelsesform blir immortaliserte celler selektert på basis av fenotype. Immortaliseringsgenet kan f.eks. tjene som første selekterbare markør, siden celler som ikke inneholder genet vil vokse uendelig i kultur og kan bli eliminert på denne basis. Alternativt kan markørene bli detektert ved å anvende klonale analyse; f.eks. når HSV-TK genet blir anvendt, kan klonene bli analysert for TK-aktivitet.
- 25 Slik den ble anvendt her refererer begrepene «genetisk-konstruert celle» eller «rekombinant celle» til en celle inn i hvilken fremmed (dvs. ikke-naturlig forekommende) nukleinsyre, f.eks. DNA har blitt innført. Med «fremmed» eller «heterolog» eller «eksogen» nukleinsyre menes her nukleinsyre som ikke normalt finnes
- 30 i cellens genom, eller er i en form som normalt ikke finnes i genom. Immortaliseringsgener slik som onkogene er rekombinasemålseter kan således ikke normalt bli funnet i vertscellens genom, og således blir immortaliserte celler som inneholder disse sekvensene genetisk konstruert. I noen utførelsesformer blir
- kondisjonelt immortaliserte celler manipulert til å uttrykke en eller flere ytterligere
- 35 eksogene gener. Slike gener kan normalt være inneholdt i genom, dvs. homologe men ikke uttrykt i en merkbar grad, eller heterologe, dvs. som man ikke normalt finner i genom. Homolog vekstfaktorgener kan f.eks. bli innført i en celle i en form som ikke

normalt finnes i genomet; dvs. sammen med regulatoriske sekvenser slik som promotere som tillater ekspresjon av vekstfaktor ved nivåer som man normalt observerer i cellen, eller i celletyper som normalt uttrykker vekstfaktor. Heterologe gener kan alternativt bli innført. Kondisjonelt immortaliserte celler ifølge oppfinnelsen kan således bli genetisk

5 konstruert for å inneholde mer enn en eksogen nukleinsyresekvens.

Kondisjonelle immortaliseringskonstruksjoner og metoder ifølge oppfinnelsen kan også inneholde ytterligere eksogene gener som er terapeutisk fordelaktige. Gener som koder for vekstfaktorer kan f.eks. bli innført for å forenkle overlevelse av transplanterte celler,

10 eller for behandling av pasienten. Neurotrofiner som innbefatter nervevekstfaktor (NGF), neurotrofin-3 (NT3), neurotrofin-4 (NT4) og jern-avledede neurotrofinfaktor (BDNF) kan f.eks. være nyttig. I det tilfellet der celler som er forskjellig fra nerveceller ble anvendt, innbefatter passende eksogene gener de som kode for vekstfaktorer, slik som human vekstfaktor, epidermisk vekstfaktor, neurale vekstfaktorer, etc.; cytokiner,

15 enzymer og enzymhemmere; interferoner slik som α , β eller γ -interferoner; koaguleringsfaktorer (Faktor VIII); ADA; anti-celledødsgener; og andre proteiner.

Cellene kan f.eks. bli immortalisert for ex vivo manipulasjoner slik som innføring av fremmed DNA som koder for terapeutiske midler, og deretter disimmortalisert, og

20 tillater introduksjon i en pasient av genetisk konstruerte celler som uttrykker et terapeutisk middel. Alternativt er cellene selv terapeutiske midler og blir transplantert for å erstatte syke eller døende celler, f.eks. i Parkinsons sykdom.

I en utførelsesform blir cellene fjernet fra en pasient med en genetisk defekt og

25 konstruert for å inneholde minst en kopi av et korrigert gen før gjeninnføring i cellene ved å anvende fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen. Genetiske forstyrrelser som kan bli behandlet på denne måte er kjent innenfor fagområdet.

I tillegg til immortaliseringsgenet, har cellene ifølge oppfinnelsen ytterligere eksogen nukleinsyre, slik det er mer beskrevet i detalj nedenfor. Denne eksogene nukleinsyren innbefatter minst to rekombinasemålseter, og fortrinnsvis seleksjons(markør)gener, transkripsjonstermineringsseter, bindingssekvenser og andre gener av interesse som er beskrevet over.

30

35 Fremmed nukleinsyre eller eksogen nukleinsyre kan bli innført ved hjelp av mange teknikker som er kjent innenfor fagområdet, inkludert men ikke begrenset til, kalsium-fosfat-formidlet transfeksjon, DEAE-formidlet transfeksjon, mikroinjeksjon, retroviral

transformasjon, adenoviral transformasjon, herpes viral transformasjon, protoplastfusjon og lipofeksjon.

I en foretrukket utførelsesform blir fremmed DNA innført i cellene ved å anvende teknikken med retroviral transfeksjon. Rekombinante retrovirus er blitt anvendt for å innføre immortaliseringsgener, seleksjons- eller markørgener, rekombinasemålseter og rekombinase. Rekombinante retrovirus blir produsert i innpakkingscellelinjer for å produsere kultursupernatanter som har en høy titer av viruspartikler (generelt 10^5 til 10^6 pfu/ml). Rekombinante virale partikler blir anvendt for infisere kulturer av celler eller deres opphav ved inkubering av cellekulturer med medium inneholdende virale partikler som kjent innenfor fagområdet. Etter retroviral infeksjon blir cellene rensset og dyrket i standardmedium. De infiserte cellene blir deretter analysert for opptak og ekspresjon av fremmed DNA. Cellene kan være gjenstand for selektive betingelser som selekterer for celler som har tatt opp og uttrykt en selekterbar markørgen.

I en foretrukket utførelsesform er kloningsvektoren en retroviral vektor, og utnytter lange terminale gjentakelser (LTR) som vist i figurene. Alternative utførelsesformer utnytter tradisjonelle ekspresjonsplasmider, herpes virus-baserte vektorer og adenovirusbaserte vektorer, såvel som andre ekvivalenter som er velkjente innenfor fagområdet.

I en annen utførelsesform blir fremmed DNA innført ved å anvende teknikker som kalsium-fosfat-formidlet transfeksjon slik det er kjent innenfor fagfeltet. For eksempel blir et kalsium-fosfat-presipitat inneholdende kondisjonelle immortaliseringskonstruksjoner ifølge oppfinnelsen fremstilt ved å anvende teknikken ifølge Wigler et al. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:1373-1376. Kulturer av celler ble etablert i vevsdyrkingsskåler. 24 timer etter utsåing av cellene, blir kalsiumfosfatpresipitatet inneholdende ca. 20 µg/ml fremmed DNA tilsatt. Cellene ble inkubert ved romtemperatur i 20 minutter. Vevsdyrkningsmedium inneholdende 30 µM kloroquin ble tilsatt og cellene ble inkubert over natten ved 37°C. Etter transfeksjon blir cellene analysert for opptak og ekspresjon av fremmed DNA. Cellene kan bli utsatt for seleksjonsbetingelser som selekterer for celler som har tatt opp og uttrykt et selekterbar markørgen.

Ovennevnte teknikk kan bli gjennomført mer enn en gang på en spesiell celle; disse teknikkene kan f.eks. bli anvendt for å innføre immortaliseringsgenet med rekombinanseseter, og deretter innføre ytterligere eksogen nukleinsyre til de

immortaliserte cellene, slik som et hvilket som helst ekspresjonsplasmid som koder for en rekombinase.

- Slik det er kjent innenfor fagområdet kan en lang rekke egnede promoterer bli anvendt ifølge oppfinnelsen. Spesielt nyttige promoterer innbefatter men er ikke begrenset til intern promoterforøker av LTR av retrovirus, SV40 promoter og vev- eller celletypespesifikke promotere, særlig promotere spesifikk for celletypen som skal bli kondisjonelt immortalisert.
- Egnede celler som kan bli anvendt for å gjennomføre de kondisjonelle immortaliseringsmetoder ifølge oppfinnelsen innbefatter en hvilken som helst celletype som ikke produserer en rekombinase som gjenkjenner rekombinasemålesekvensen som ble anvendt i konstruksjonene ifølge oppfinnelsen. Cellene blir delt slik at de fortrinnsvis har evnen til å bli infisert med en retroviral vektor. Egnede celler er, pattedyrceller slik som primat, fugl, svin, kveg, hund, katt og hest f.eks. og mer spesifikt humane celler. Særlig foretrukkede celletyper av stamceller slik som neural, hemopoetiske, pankreatiske, hepatiske, epidermale, intestinale, osteogene og olfaktoriske stamceller, idet særlig foretrukkede stamceller er naturlig creststamceller og hemopoietiske stamceller. Humane totipotente stamceller er unntatt. Egnede ikke-stamceller innbefatter pankreatiske øyceller, fibroblaster, osteoklaster, osteoblaster, epidermiske og dermale celler, og endotelceller, hepatocytter, erytroblaster, skjelettmuskelceller, glatte muskelceller, hjertemuskelceller, melanocytter, lymfocytter (B, T), myeloide celler og gliaceller.
- I en foretrukket utførelsesform er fenotype, vekst, og livslengde til de disimmortaliserte celler identiske med samme celletype i fravær av en hvilken som helst genetisk manipulasjon; det innebærer at en disimmortalisert celle er identisk med utgangscellen, forut for immortalisering. I alternative utførelsesformer kan cellene ha endrede karaktertrekk.
- Det skal bemerkes at i noen tilfeller har utgangscellene et forlenget livsløp in vivo; dvs. de kan eksistere i vertedyret, men har ikke evne til å dele seg uendelig ex vivo. Øyceller synes f.eks. således å være en viss levetid i mennesket. Øyceller kan fremdeles kreve immortalisering for ex vivo vekst og proliferasjon i cellekultur. Stamceller slik som neurale stamceller kan leve i lengre tidsperioder, og har evne til begrenset cellefornyelse in vitro, men må bli immortalisert med et immortaliseringsgen for uendelig

vekst og proliferasjon i cellekultur. Uendelig ekspansjon av immortaliserte celler kan tillate generering av «universale donorcellelinjer» for behandling av mange pasienter.

- Det er underforstått at dersom det ikke er gjenstand for nye dyrkingsbetingelser,
- 5 resulterer celledelingen av en immortalisert celle i to vesentlig identiske datterceller; det er immortaliserte celler ved definisjon som har evne til uendelig regenerering. Celledeling av immortaliserte stamceller slik som f.eks. naturlig creststamceller resulterer således i to neurale creststamceller, begge like udifferensierte. Ved eksponering til visse eksperimentelle eller fysiologiske betingelser, vil disse stamceller
- 10 gjennomgå delvis eller fullstendig differensiering.

Slik det er kjent innenfor fagfeltet, vil dyrkningsbetingelser som er egnet for immortaliseringscellelinjer variere avhengig av celletype.

- 15 Kondisjonelle immortaliseringsmetoder i oppfinnelsen kan benyttes i en lang rekke anvendelser, slik det er velkjent for personer med kunnskap innenfor fagområdet.

- I en utførelsesform er de kondisjonerte immortaliserte cellene stamceller unntatt humane totipotente stamceller, og i en foretrukket utførelsesform er cellene naturlig
- 20 creststamceller og multipotente neurale stamceller slik det er beskrevet i WO 94/02593 her innbefattet med referanse. Slik det er velkjent innenfor fagområdet, kan naturlige stamceller, som fører til dannelse av glia og neuroner i sentralt og perifert nervesystem, bli transplantert eller implantert for å danne nye neuroner og glia. Erstatning av motorneuroner og deres assosierte gliaceller i ryggmargen ved akutt traumatisk
- 25 motorskade eller erstatning av døende dopaminerge neuroner i midthjernen for behandling av Parkinsons sykdom er begge aktive områder som blir drevet i pre-kliniske studier. En annen anvendelse av transplantasjon av genetisk immortaliserte celler er for genterapi; cellene kan bli genetisk modifisert før transplantasjon for å uttrykke et manglende genprodukt med påfølgende transplantasjon av disse cellene til den spesielle
- 30 hjerneregionen som avleverer genproduktet i det området på kroppen der det er nødvendig. Bevis for prinsippet for slike genterapimetoder har allerede blitt demonstrert i dyremodeller som anvender arvelig mucopolysakkaridose som et testsystem.

- I en alternativ utførelsesform kan celler som er forskjellig fra stamceller bli
- 35 immortalisert for ex vivo vekst og deretter disimmortalisert forut for gjeninnføring i kroppen. US-patent nr. 5.387.237 beskriver f.eks. en biokunstig pancreas som omfatter en plastsylinder fylt med pancreatiske øyceller fra svin. Disse svineøycellene kan bli

immortalisert for ex vivo vekst og proliferasjon, og tillater uniformitet over tid, og deretter disimmortalisert forut for innføring i kroppen. Personer med kunnskap innenfor fagområdet erkjenner at en hvilken som helst variasjon av slike systemer kan utnytte foreliggende oppfinnelse.

5

Disse metodene kan f.eks. bli anvendt i enhver ex vivo genterapiteknikk, slik som de som er beskrevet generelt i US-patent nr. 5.299.346. Enhver celle som skal bli transplantert til en pasient, om det er menneske eller dyr, kan være gjenstand for kondisjonelle immortaliseringsmetoder, med etterfølgende disimmortalisering forut for

10 transplantasjon. I en utførelsesform blir celler fjernet fra pasienten som de skal bli transplantert til; i andre utførelsesformer er celler fra andre pasienter eller andre dyr. For eksempel kan griseøyneceller bli kondisjonelt immortalisert og disimmortalisert forut for transplantasjon til et menneske som beskrevet i US-patent nr. 5.387.237.

- 15 Metoder for innføring eller transplantering av disimmortaliserte celler slik som stamceller i et vertsdyr eller pattedyr blir således beskrevet. Transplantasjonsteknikker er velkjente innenfor fagområdet, og kan bli utført med disimmortaliserte celler. Disimmortaliserte celler kan således f.eks. bli transplantert inn i en vert for å evaluere det terapeutiske potensiale av cellene, eller for å behandle en neurologisk forstyrrelse i
- 20 nervesystemet. I en foretrukket utførelsesform er cellene neurale stamceller og forstyrrelsen er neurologisk forstyrrelse i det perifere nervesystem.

- I tillegg kan den immortaliserte cellelinjen bli anvendt til å screene medikamenter som kan påvirke utvikling, differensiering og/eller funksjon av cellene. Disse innbefatter
- 25 både småmolekylære organiske farmasøytiske midler såvel som vekstfaktorer.

- Disimmortaliserte celler er særlig nyttig i transplantat- eller implantatanvendelse, siden immortaliserende oncogener blir fjernet forut for innføring i kroppen, og således elimineres muligheten for dannelse av tumorer som et resultat av immortaliseringsgenet.
- 30 Fremgangsmåten i oppfinnelsen kan anvendes både for human terapi og for veterinæranvendelser, f.eks. for human anvendelse av ikke-humane celler. Metoder og konstruksjoner fra oppfinnelsen kan således bli anvendt med celler fra slike dyr som mennesker, griser, primater, gnagere som mus og rotter, hunder, kveg og sau.
- 35 Det følgende blir presentert som eksempler og må ikke betraktes som begrensende for rekkevidden av oppfinnelsen.

EKSEMPLER

I dette eksemplet ble en standard moloney gnagerleukemivirus retroviral vektor anvendt og modifisert. En standard rekombinant replikasjonsinkompetent retroviral vektor som
 5 innehar v-myc oncogenet ble modifisert for å plassere loxP-seter som flankerer v-myc kodende sekvens og for å plassere en β -galactosidase kodende sekvens nedstrøm (3') til loxP-v-myc-loxP sekvensene. Ytterligere eksperimenter utnytter andre seleksjonsmarkører som innbefatter alkalisk fosfatase, neomycinresistens og både grønnfluorescensprotein (GFP) og en «humanisert» versjon av GFP, kalt grønn lanterne
 10 protein (GLP) som er ti ganger mer sensitiv enn GFP (for å muliggjøre anvendelse av fluorescens-aktivert cellesortering). Disse modifikasjonene ble gjennomført ved standard molekylære biologiske prosedyrer som er kjent innenfor fagområdet og involverer restriksjonsenzym, spalting, ligering, PCR amplifisering, bakteriell transformasjon, plasmidisolering og ytterligere karakterisering og sekvensering.

15 For å bekrefte at denne modifiserte rekombinante retrovirale konstruksjonen faktisk hadde evne til å produsere rekombinante infeksiose virale partikler, ble følgende eksperimenter først gjennomført. For å produsere infeksiose replikasjonsinkompetente viruspartikler, ble konstruksjonen transfektert inn i innpakkingslinjen BOSC 23. Etter
 20 forbigående transfeksjon av BOSC 23 celler, ble tre dager senere supernatanter fra disse transfekterte cellene inneholdende retrovirale partikler samlet. Titer av infeksiose virus i disse supernatantene var mellom 10^5 og 10^6 pfu/ml. Disse virale supernatantene ble deretter anvendt for å infisere NIH 3T3 celler. Farging av disse cellene flere dager etter infeksjon med et antistoff mot avian v-myc bekreftet at mange av disse cellene uttrykte
 25 v-myc oncogener. Fiksering og farging av søsterkulturer med Xgal reagens bekreftet, at som forutsatt fra utforming av vektor, uttrykket ingen av de infiserte cellene β -galaktosidase. Dette eksperimentet viste derfor to viktige ting: 1) at konstruksjonen hadde evne til å bli pakket i infektios retrovirus og 2) at v-myc oncogenkodende sekvenser inneholdt i vektoren kunne bli transkribert og translatert til protein i infiserte
 30 celler.

Transfeksjon av cre enzymet til disse retroviralt infiserte cellene resulterte i eksisjon av v-myc kodende sekvenser og ledsagende aktivering av β -galaktosidase enzymaktivitet. Dette ble gjennomført ved transfektering av retroviralt infiserte celler med en
 35 ekspresjonskonstruksjon hvori cre rekombinase var under kontroll av cytomegalovirus CMV forøker. 24 til 48 timer etter deres transfeksjon ble cellene fiksert og prosessert for Xgal farging. Denne fargingen viser at mange av de retroviralt infiserte cellene nå viste

β -galaktosidase enzymaktivitet slik det fremkom ved blått reaksjonsprodukt i deres kjerne. Ingen β -galaktosidaseaktivitet ble observert i kontrollkulturer transfektert med samme CMV ekspresjonsvektor som mangler de cre kodende sekvenser. Farging av cre transfekterte celler med antistoff mot v-myc oncogen bekreftet at disse transfekterte cellene ikke lenger uttrykte v-myc oncogenet, slik det ble forventet basert på eksisjon fra provirus ved cre rekombinasen.

Disse eksperimentene indikerer således at cre rekombinasen har evne til å eksisere v-myc oncogeneksekvensen fra en integrert provirus i et pattedyrcelegenom og at denne eksisjon av oncogener resulterer i ledsagende aktivering av nedstrømsreportergen, i dette tilfellet β -galaktosidase som forventet basert på utforming av denne vektoren.

Ekspresjon av v-myc oncogen fra denne retrovirale konstruksjonen produserte funksjonelle v-myc sekvenser som hadde evne til immortalisering av en primær celletype. Dette ble gjort ved å anvende primære museembryofibroblaster. Fibroblaster ble isolert og dyrket ved standardprosedyre og dette infisert med retroviral vektor som koder for det modifiserte v-myc oncogen flankert av loxP sekvenser inneholdende β -galactosidasemarkøren nedstrøms. Denne vektoren blir referert til som retmycgal og er vist i fig. 2C. De infiserte cellene ble plasert under seleksjon ved dyrking av disse i nærvær av 6 mM histidin. Retroviral vektor inneholder også histodinol dehydrogenasegen. Celler som uttrykker det integrerte provirus vil derfor overleve i nærvær av 6 mM histidin mens uinfiserte celler vil dø. En kontrollplate med uinfiserte celler ble gjennomført i fravær av 6 mM histidin for sammenligning av veksthastigheter mellom uinfisert og infiserte celler. Etter fire til fem ukers vekst i kultur som involverer tilnærmet seks passasjer, var en klar forskjell synlig mellom histidinresistent myc infiserte celler og uinfiserte celler. De uinfiserte kontrollfibroblastene hadde ved dette tidspunkt nådd sin alderdom og hadde flatet ut og deling var stoppet. I motsetning til disse fortsatte cellene infisert med retmycgal retroviral konstruksjonen å utvise robust proliferasjon i kulturen. Fiksering og farging av noen av disse cellene med antistoff mot v-myc viste ekspresjon av avian v-myc oncogen i kjernene til disse infiserte fibroblastene, og bekrefter at deres immortaliseringstilstand skyldes ekspresjon av v-myc oncogenet. Som forventet ble ingen β -galaktosidaseaktivitet påvist i cellene.

Disse eksperimentene ble gjentatt ved å anvende neomycinmedikamentresistens som første selekterbare markør, da his systemet var for sensitivt.

Myc kodende sekvenser kunne bli eksisert fra genomet av de etablerte infiserte cellene ved transfeksjon av en cre ekspresjonskonstruksjon inn i cellene. Eksisjon av myc resulterte i ledsagende aktivering av β -galaktosidasegenet, slik det ble vist tidligere i tilfellet med forbigående infiserte celler. Etter transfeksjon av CMV cre konstruksjonen
5 inn i disse cellene, var mange blå celler detekterbare ved Xgal farging. Disse data viser derfor at cre rekombinase har evne til å eksistere v-myc kodende sekvenser og aktivering av ekspresjon av nedstrøms markør β -galaktosidase selv i stabilt infiserte primære celler som har blitt passert minst seks ganger. Det som er viktigere er at de indikerer at ekspresjon av v-myc kodende sekvenser fra integrert provirus faktisk har evne til
10 funksjonell immortalisering av disse primære musefibroblastene som forventet.

I tillegg, mens konvensjonelle metoder for innføring av rekombinase (dvs. DNA formidlet genoverføring) resulterte i 5-10% av cellene ble disimmortalisert, resulterte anvendelse av adenoviral vektor kodende Cre rekombinase i at omtrent 50% av cellene
15 ble disimmortaliserte.

I tillegg ble naturlig creststamceller i henhold til WO/94/02593 likeledes immortalisert, ved å anvende noe som første selekterbare markør og alkalisk fosfatasegen som andre selekterbare markør.

20 Som oppsummering viser dette eksemplet at det ved anvendelse av primære museembryofibroblaster er mulig å immortalisere primære celler ved infisering av disse med retnycgal retroviral vektor og andre vektorer for stabil passering av disse immortaliserte cellene i minst seks generasjoner, og deretter å disimmortalisere cellene
25 ved eksisering av oncogen myc sekvenser fra deres genom ved transfeksjon av disse cellene med en cre ekspresjonskonstruksjon.

P a t e n t k r a v

30

1.

Immortalisert pattedyrcellelinje som inneholder i genomet av nevnte celle eksogen nukleinsyre, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter minst en første og en andre loxP-rekombinase målseter som flankerer et enkelt
35 immortaliseringsgen, der loxP-målsetene har evne til å formidle fjerning av immortaliseringsgenet når nevnte loxP-målseter kommer i kontakt med en Cre-rekombinase.

2.

Immortalisert cellelinje ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at den eksogene nukleinsyren videre omfatter et seleksjonsmarkørgen.

5

3.

Immortalisert cellelinje ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t
v e d at seleksjonsmarkørgenet er en negativ seleksjonsmarkørgen.

10 4.

Immortalisert cellelinje ifølge krav 2, k a r a k t e r i s e r t
v e d at nukleinsyren videre omfatter et stoppsete.

5.

15 Immortalisert cellelinje ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t
v e d at den eksogene nukleinsyren videre omfatter et første seleksjonsmarkørgen
og et andre seleksjonsmarkørgen.

6.

20 Immortalisert cellelinje ifølge krav 5 k a r a k t e r i s e r t v e d
at andre seleksjonsmarkørgen ikke er mellom første og andre loxP-rekombinase
målseter.

7.

25 Fremgangsmåte for å fremstille en immortalisert celle som inneholder
rekominasemålseter som flankerer et immortaliseringsgen i genomet til den
immortaliserte cellen, k a r a k t e r i s e r t v e d at
fremgangsmåten omfatter transformering av en celle med eksogen nukleinsyre som
omfatter:

30

- a) et første loxP-rekombinasesete;
- b) et enkelt immortaliseringsgen; og
- c) et andre loxP-rekombinasesete;

35 slik at i fravær av en Cre-rekombinase blir den eksogene nukleinsyren inkorporert i
genomet til cellen.

8.

Fremgangsmåte ifølge krav 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at nukleinsyren videre omfatter minst et seleksjonsmarkørgen.

5 9.

Fremgangsmåte ifølge krav 8, k a r a k t e r i s e r t v e d at seleksjonsmarkørgenet er en negativ seleksjonsmarkør.

10.

10 Fremgangsmåte for disimmortalisering av en immortalisert celle som inneholder eksogen nukleinsyre, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter loxP-rekombinasemålseter som flankerer et enkelt immortaliseringsgen i genomet av den immortaliserte cellen, og fremgangsmåten omfatter at man bringer loxP-rekombinasemålsetene i kontakt med en Cre-rekombinase.

15

11.

Fremgangsmåte for disimmortalisering av en immortalisert celle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

20 a) inkorporering av eksogen nukleinsyre som omfatter:

- i) et første loxP-rekombinasemålsete;
- ii) et enkelt immortaliseringsgen;
- iii) et negativt seleksjonsmarkørgen; og
- 25 iv) et andre loxP-rekombinasemålsete;

30

inn i genomet av en celle for å produsere en immortalisert celle som inneholder et enkelt immortaliseringsgen som kan fjernes i en orientering slik at fjerning av sekvensen mellom loxP-rekombinasemålsetene fjerner immortaliseringsgenet og den negative seleksjonsmarkør; og

b) bringe nevnte loxP-rekombinasemålseter i kontakt med en Cre-rekombinase som gjenkjenner loxP-rekombinasemålsetene slik at immortaliseringsgenet og negativt seleksjonsmarkørgen blir fjernet.

35

12.

Fremgangsmåte ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten videre omfatter selektering for disimmortaliserte celler i nærvær av et negativt seleksjonsmiddel.

5

13.

Fremgangsmåte ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at den eksogene nukleinsyren videre omfatter et positivt seleksjonsgen.

10 14.

Fremgangsmåte for disimmortalisering av en immortalisert celle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

a) inkorporering av eksogen nukleinsyre som omfatter:

15

- i) i)et første loxP-rekombinasemålsete;
- ii) et enkelt immortaliseringsgen;
- iii) et andre loxP-rekombinasemålsete; og
- iv) et negativ seleksjonsmarkørgen;

20

inn i genomet til en celle for å produsere en immortalisert celle som inneholder et immortaliseringsgen som kan fjernes i en orientering slik at fjerning av sekvensen mellom loxP-rekombinasemålsetene fjerner immortaliseringsgenet, hvilket resulterer i ekspresjon av seleksjonsmarkør; og

25

b) bringe nevnte loxP-rekombinasemålseter i kontakt med en Cre-rekombinase som gjenkjenner loxP-rekombinasemålsetene slik at immortaliseringsgenet blir fjernet.

15.

30 Fremgangsmåte ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at nukleinsyren videre omfatter et STOP-sete.

16.

35 Fremgangsmåte ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at fremgangsmåten videre omfatter selektering for disimmortaliserte celler som uttrykker nevnte seleksjonsmarkørgen.

17.

Fremgangsmåte for disimmortalisering av en immortalisert celle,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter:

5 a) inkorporering av eksogen nukleinsyre som omfatter:

- i) i) et første loxP-rekombinasemålsete;
- ii) et enkelt immortaliseringsgen;
- iii) et første seleksjonsmarkørgen;
- 10 iv) et andre loxP-rekombinasemålsete; og
- v) et andre seleksjonsmarkørgen;

inn i genomet til en celle for å produsere en immortalisert celle som inneholder et
immortaliseringsgen som kan fjernes i en orientering slik at når immortaliseringsgenet
15 blir uttrykt, blir første seleksjonsmarkør også uttrykt og andre seleksjonsmarkørgen blir
ikke uttrykt og når nevnte immortaliseringsgen blir fjernet, blir den andre
seleksjonsmarkøren uttrykt; og

b) bringe nevnte loxP-rekombinasemålseter i kontakt med en Cre-rekombinase som
20 gjenkjenner loxP-rekombinasemålsetene slik at immortaliseringsgenet blir fjernet.

18.

Fremgangsmåte ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at
nukleinsyren videre omfatter et STOP-sete.

25

19.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 10 - 18,
k a r a k t e r i s e r t v e d at kontakten skjer ved transformering
av de immortaliserte cellene med en vektor som koder for en Cre-rekombinase som
30 gjenkjenner loxP-rekombinasemålsetene under betingelser der Cre-rekombinasen blir
uttrykt.

20.

Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 10 - 18,
35 k a r a k t e r i s e r t v e d at den eksogene nukleinsyren videre
omfatter et gen for en Cre-rekombinase som gjenkjenner nevnte loxP-
rekombinasemålseter, hvori Cre-rekombinasegenet er operasjonelt bundet til en

induserbar promoter, og nevnte kontakt skjer ved dyrking av immortaliserte celler under betingelser der Cre-rekombinasen blir uttrykt.

21.

- 5 Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 10 - 20,
k a r a k t e r i s e r t v e d at nukleinsyren videre omfatter et
ytterligere eksogent gen.

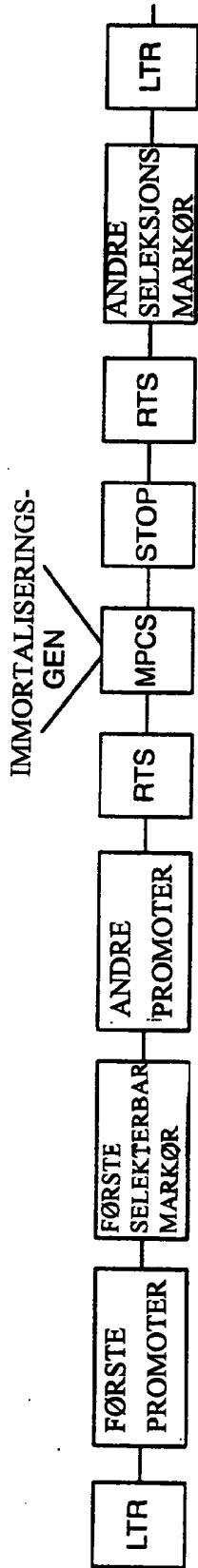


FIG. 1A

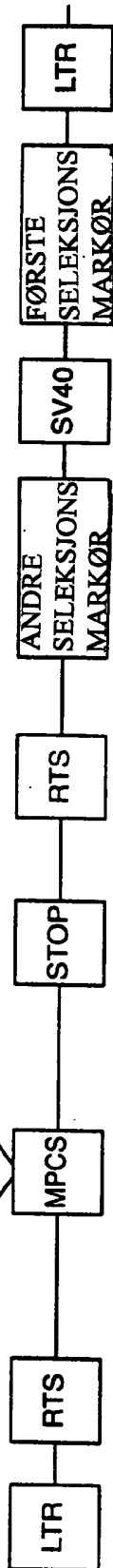


FIG. 1B



FIG. 1C



FIG. 1D

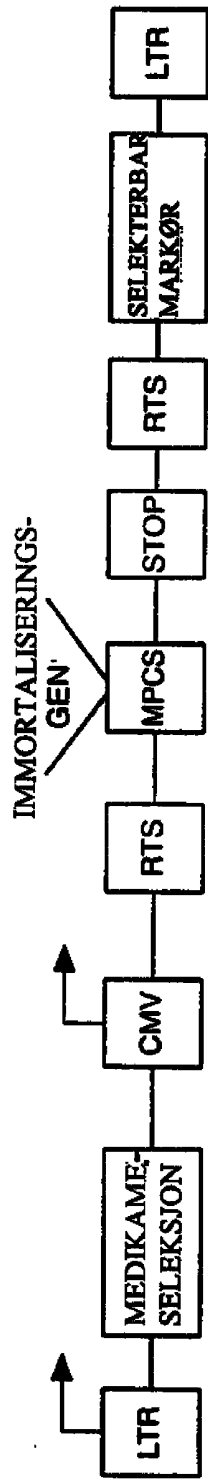


FIG. 2A

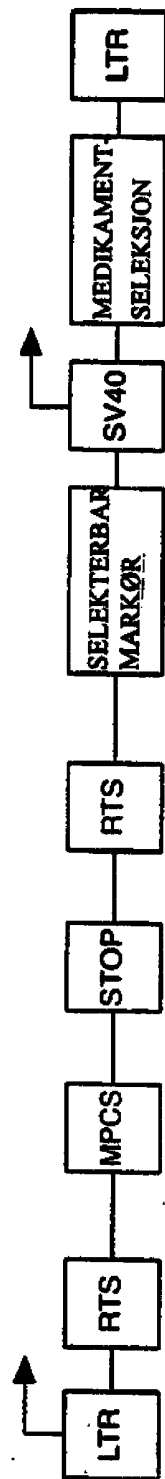


FIG. 2B

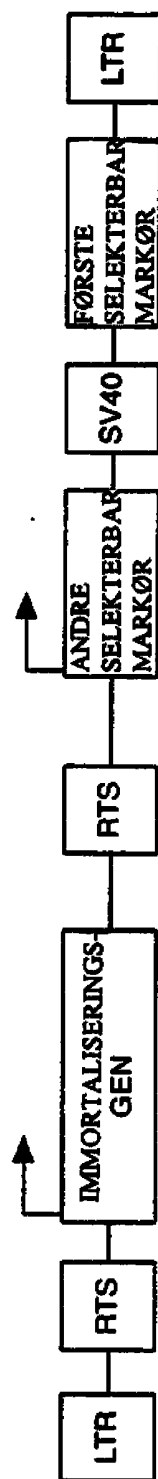


FIG. 2C

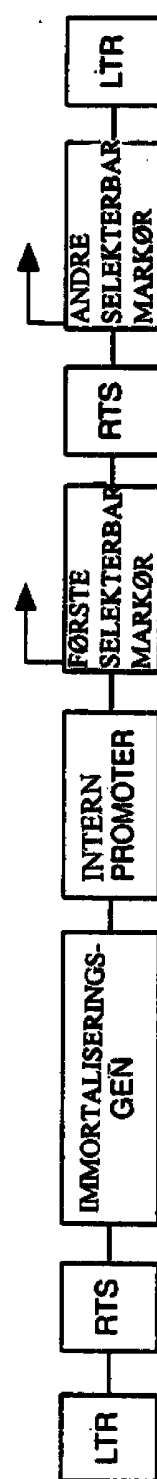
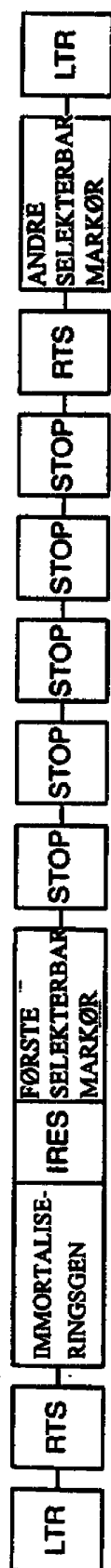
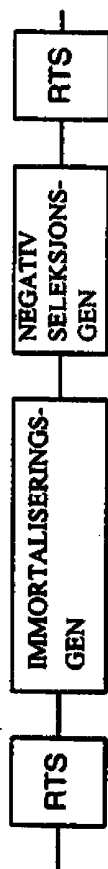


FIG. 2D

**FIG. 2E****FIG. 3A****FIG. 3B****FIG. 3C**

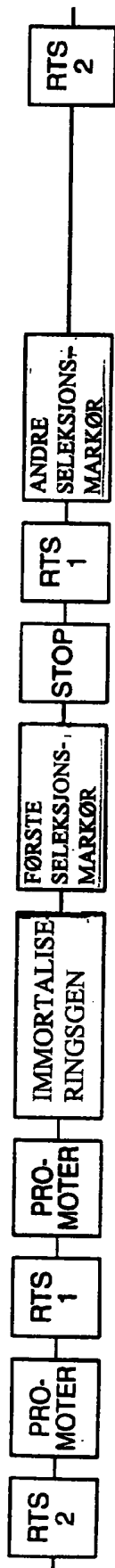


FIG. 4A

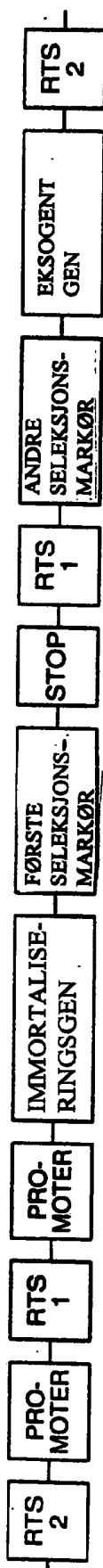


FIG. 4B

4 / 5

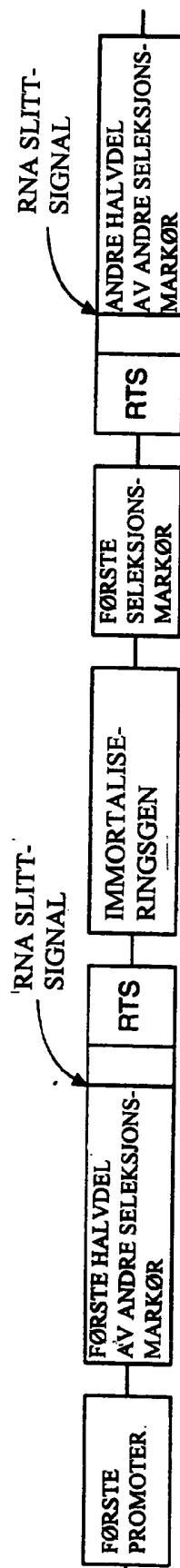


FIG. 5

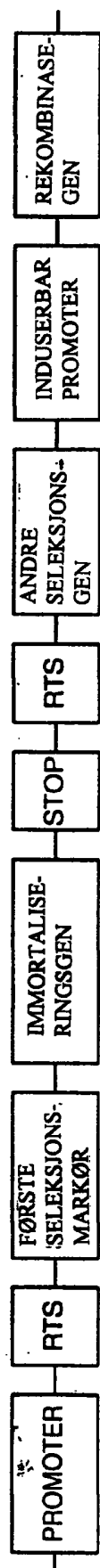


FIG. 6A

5 / 5



FIG. 6B