



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 36 747 T2** 2007.10.04

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 011 697 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 36 747.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/06125**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 913 223.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/042356**

(86) PCT-Anmeldetag: **27.03.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **01.10.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **27.12.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **04.10.2007**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **A61K 35/26** (2006.01)

**C12N 1/00** (2006.01)

**C12N 13/00** (2006.01)

**C12Q 1/02** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**824968 27.03.1997 US**

(73) Patentinhaber:

**Palsson, Bernhard O., La Jolla, Calif., US**

(74) Vertreter:

**Patentanwaltskanzlei Vièl & Wieske, 66119  
Saarbrücken**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**Palsson, Bernhard O., La Jolla, CA 92037, US**

(54) Bezeichnung: **ZIELGERICHTETES SYSTEM ZUR ENTFERNUNG VON TUMORZELLEN AUS ZELLPOPULATIONEN**

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**

ren.

**HINTERGRUND DER ERFINDUNG****GEBIET DER ERFINDUNG**

**[0001]** Diese Erfindung bezieht sich auf Verfahren und Apparate zur spezifischen Isolierung von Tumorzellen aus einer Population von Nicht-Tumorzellen. Insbesondere bezieht sich diese Erfindung auf Verfahren und Apparate zur spezifischen Markierung und anschließender individueller Tötung von Tumorzellen mit einem fokussierten Hochenergiestrahl wie zum Beispiel einem Laserstrahl.

**BESCHREIBUNG DES STANDES DER TECHNIK**

**[0002]** Die hematopoietische Stammzell-Transplantation ist eine schnell wachsende Therapie auf der ganzen Welt. Hematopoietische Stammzellen sind Zellen, die sich im Knochenmark befinden und zur Produktion von all den im Körper vorhandenen Blutzellen führen. In 1995 wurden in den Vereinigten Staaten über zwanzigtausend hämatopoetische Stammzell-Transplantationen durchgeführt. Insbesondere ist die Behandlung von Brustkrebs mit autologen hematopoietischen Stammzell-Transplantationen eine verbreitet angewandte Krebstherapie geworden.

**[0003]** Die Metastasenbildung von Tumoren ist ein bekannter Prozess, bei dem Tumorzellen ihren ursprünglichen Platz verlassen und sich auf andere Teile des Körpers ausbreiten. Einmal zu einer neuen Stelle transportiert, beginnt die Tumorzelle zu wachsen und die neue Stelle zu besiedeln und somit einen neuen Tumor zu erzeugen. Eine Behandlung für Patienten mit metastatischen Tumoren beinhaltet das Sammeln ihrer hematopoietischen Stammzellen und dann das Behandeln des Patienten mit hohen Dosen von Strahlentherapie oder Chemotherapie. Diese Behandlung ist angelegt, alle Tumorzellen des Patienten zu zerstören, hat aber die Nebenwirkung, auch alle ihre hematopoietischen Zellen zu zerstören. Daher werden, sobald der Patient behandelt worden ist, die autologen Stammzellen wieder in den Körper zurückgebracht.

**[0004]** Wenn jedoch die Tumorzellen von der primären Tumorstelle aus metastasiert haben, besteht eine große Wahrscheinlichkeit, dass einige Tumorzellen die gesammelte hematopoietische Zellpopulation kontaminieren werden. In einem solchen Fall beinhalten die gesammelten hematopoietischen Stammzellen kontaminierende Tumorzellen. Es ist von Bedeutung einen Mechanismus zur Abtötung von allen metastasierenden Tumorzellen vor der Rückführung der Stammzellen in den Patienten zu finden. Falls irgendeine lebende tumorigene Zelle in den Patienten zurückgeführt wird, können sie zu einem Rezidiv füh-

**[0005]** Das Problem des Entfernens von Tumorzellen aus hematopoietischen Zellen während traditioneller Prozeduren des Sammelns von Knochenmark ist berichtet worden (Campana, D. et al., Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodological advances and clinical significance, Blood, 1995 März 15, 85(6): 1416–1434). Ähnliche Probleme wurden auch gefunden, wenn andere versuchten, die Tumorzellen mit der neueren Methode der Leukaphorese von mobilisierten peripheren Blutzellen zu entfernen (Brugger, W. et al., Mobilization of tumor cells and hematopoietic progenitor cells into peripheral blood of patients with solid tumors, Blood, 83(3): 636–640, 1994).

**[0006]** In jeder dieser Prozeduren bewegte sich die Anzahl der kontaminierenden Tumorzellen von etwa 10 bis 5.000 Tumorzellen pro vier Millionen gesammelter mononukleärer Zellen, abhängig von dem zur Mobilisierung verwendeten chemotherapeutischen Arzneimittel-Regime. Mononukleäre Zellen wurden durch diskontinuierliche Dichtegradienten-Zentrifugation der gesamten hematopoietischen Zellsammlung erhalten. Die gesamte Zahl der von einem Patienten gesammelten Zellen ist normalerweise in der Größenordnung von 10 Milliarden Zellen. Somit variiert die totale Tumobelastung in einer Ernte von der unteren Grenze von etwa 25 Tausend Zellen bis zu der oberen Grenze von etwa 12 Millionen Zellen.

**[0007]** Es konnte durch genetische Markierung gezeigt werden, dass diese kontaminierenden Tumorzellen zum Tumorrezidiv beitragen (Rill, ER et al., Direct Demonstration That Analogous Bone Marrow Transplantation for Solid Tumors Can Return a Multiplicity of Tumorigenic Cells, Blood, 84(2): 380–383, 1994). Somit existiert ein großer Bedarf an effizienten Methoden zum Entfernen aller Tumorzellen von einem hematopoietischen Zelltransplantat (Gulati, SC et al., Rationale for purging in autologous stem cell transplantation. Journal of Hematotherapy, 2(4): 467–471, 1993). Eine schnelle und zuverlässige Methode zum Entfernen aller kontaminierenden Tumorzellen würde die Wirksamkeit der hematopoietischen Stammzell-Transplantation für eine wachsende Zahl an Patienten verbessern.

**[0008]** Andere haben versucht, die kontaminierenden Tumorzellen von Sammlungen hematopoietischer Stammzellen zu entfernen, aber haben das nur mit limitiertem Erfolg bewältigt. Mehrere Verfahren zum Purging der Tumorzellpopulationen aus den gesammelten Stammzellen sind vorgeschlagen und getestet worden (A. Gee, Editor Bone Marrow Processing and Purging, Teil 5, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1991). Somit ist die alle diesen Purgingverfahren zugrunde liegende Idee, die malignen Zellen abzutrennen oder zu zerstören, während gleichzeitig

die hematopoietischen Stammzellen, die zur hematopoietischen Rekonstitution in die Transplantationspatienten benötigt werden, bewahrt werden.

**[0009]** Einige Firmen und Ärzte haben versucht, unter Verwendung von Immunoaffinitäts-Beads-basierender Selektion, die malignen Zellen aus den Populationen der Nicht-Tumorzellen zu reinigen. In diesem Verfahren wird die gesamte Zellpopulation mit den Immunoaffinitäts-Beads in Kontakt gebracht. Zum Beispiel, um Tumorzellen aus hematopoietischen Zellen zu isolieren, trennt eine erste (positive) CD34-Selektion hematopoietische Zellen von Tumorzellen. Die Bindung von für hematopoietische Zellen spezifischer Anti-CD34-Antikörper an die Immunoaffinitäts-Beads erlaubt dem Arzt diese Zellen spezifisch aus Populationen von Nicht-hematopoietischen Zellen zu entfernen. In einigen Fällen wird auch eine negative Immunoaffinitäts-Beads-basierende Selektion an Tumor- oder Epithelzell-Markern durch Konjugation Tumor-spezifischer Antikörper an die Beads ausgeführt.

**[0010]** Eine weitere Methode, die für das Entfernen von Tumorzellen aus Nicht-Tumorzellpopulationen ausprobiert wurde, beinhaltete die Immunokonjugation eines toxischen Wirkstoffes an einen Antikörper, der nur für die Tumorzellen eine Spezifität besitzt. In diesem System wurden Antikörper an chemotoxische Wirkstoffe, Toxine oder Radionuklide gebunden und dann mit der gesammelten Zellpopulation in Kontakt gebracht. Unglücklicherweise wurden durch diese Behandlung nicht alle Tumorzellen abgetötet.

**[0011]** Andere Systeme zur Isolierung von Tumorzellen aus Nicht-Tumorzellpopulationen haben die unspezifischen Bindungseigenschaften von hematopoietischen Zellen als Grundlage der Abtrennung verwendet. Zum Beispiel verwendeten Dooley et al. diese adhesiven Eigenschaften, um hematopoietische Zellen durch Tiefbett-Filtration anzureichern (Dooley DC et al., A novel inexpensive technique for the removal of breast cancer cells from mobilized peripheral blood stem cell products, *Blood*, 88(10) Suppl 1: 252a, 1996). Es wurde jedoch gefunden, dass einige der Tumorzellen mit den hematopoietischen Zellen zusammen isolierten und somit die Tür für ein potentiell Rezidiv bei dem Patienten öffneten.

**[0012]** Weiterhin wurden zytotoxische Wirkstoffe, wie 4-Hydroxyperoxy-cyclophosphamid (4HC), verwendet, um selektiv Tumorzellen abzutöten, ohne die hematopoietischen Stammzellen zu schädigen. Unglücklicherweise führte dieses System auch zu geringeren Ernten an hematopoietischen Zellen, da die zytotoxischen Wirkstoffe einige der Nicht-Tumorzellen schwächten oder zerstörten.

**[0013]** In anderen Verfahren wurden sensibilisierende Wirkstoffe, wie Merocyanin, mit den Zellpopulationen

gemischt, die anschließend belichtet wurden, um spezifisch die Tumorzellen abzutöten (Lydaki et al., Merocyanine 540 mediated photoirradiation of leukemic cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology* 32(1-2): 27-32, 1996). Auch Gazitt et al. verwendeten Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS), um hematopoietische Stammzellen von Tumorzellen zu trennen (Gazitt et al., Purified CD34+ Lin -Thy+ stem cells do not contain clonal myeloma cells, *Blood*, 86(1): 381-389, 1995). Wie bekannt ist, sortiert die Durchflusszytometrie eine Zelle nach der anderen und trennt physikalisch ein Set markierter Zellen von einem weiteren zweiten Set Zellen. Jedoch ist gezeigt worden, dass individuelle Neurone nach ihrer Beladung mit den in der Durchflusszytometrie verwendeten adsorbierenden Farbstoffen abgetötet werden können (Miller, J. P. und Selverston A. I. Rapid Killing of Single Neurons by irradiation of Intracellularly injected dye *Science*, 206: 702-702, 1979). Somit ist die Verwendung von FACS, um Zellpopulationen zu trennen, nicht vorteilhaft, da die Zellausbeuten sehr gering sein können.

**[0014]** In einem weiteren Protokoll offenbarten Clarke et al. die Verwendung von Adenovirus-vermitteltem Transfer von Suizid-Genen zur selektiven Abtötung von Tumorzellen (Clarke et al., A recombinant bcl-xs adenovirus selectively induces apoptosis in cancer cells but not in normal bone marrow cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(24): 11024-11028, 1995).

**[0015]** Jedoch basieren die meisten der oben angeführten Verfahren auf der Verabreichung einer Gesamtpopulation basierenden Tumorzellabtrennungs- oder Abtötungs-Strategie. Unglücklicherweise töten oder entfernen die oben angeführten Tumorpurgung-Verfahren der Gesamtpopulationen nicht alle der kontaminierenden Tumorzellen aus der gesammelten Zellpopulation. Im besten Fall verbleibt die restliche Tumorbelastrung bei 1 bis 10 Tumorzellen pro 100.000 der in der anfänglichen Sammlung vorhandenen Zellen (Lazarus et al., Does in vitro bone marrow purging improve the outcome after autologous bone marrow transplantation? *Journal of Hematology*, 2(4): 457-466, 1993).

**[0016]** Deshalb ist, sogar unter Verwendung der besten vorhandenen Techniken, die Zahl der restlichen Tumorzellen, die in den Patienten während der autologen Stammzell-Transplantation zurückgeführt werden, in der Größenordnung von 10 bis 2.000 Zellen. Angesichts des schnellen exponentiellen Wachstums von Tumorzellen, können solche in dem Transplantat verbleibenden Tumorzellen schnell zu einem Rezidiv des Patienten führen.

**[0017]** Noch eine weitere Methode, die Lasertechnologie verwendet, ist in U.S. Patentschrift Nummer 4,395,397 von Shapiro beschrieben. In der Shapiro-Methode werden markierte Zellen in ein Durch-

flusszytometer gestellt, das einen Fluoreszenzdetektor zur Identifikation der markierten Tumorzellen besitzt. Ein Laserstrahl wird zum Abtöten der markierten Zellen benutzt, wenn diese den Detektor passieren. Diese Methode leidet unter einer Anzahl von Nachteilen. Erstens, sobald eine ungewollte Zelle den Detektor/Laser-Bereich passiert hat, gibt es keinen Weg zu kontrollieren, ob die Zerstörung erfolgreich beendet wurde. Falls eine Tumorzelle der Zerstörung entgeht, wird sie unweigerlich dem Patienten wieder zugeführt. Zweitens, der Brennfleckdurchmesser des Laserstrahls ist notwendigerweise größer als der Querschnitt des Flüssigkeitsstromes. Dementsprechend werden viele Zellen in dem Bereich einer ungewollten Zelle durch den Laserstrahl zerstört, einschließlich gesunder Zellen.

**[0018]** Eine weitere Methode, die Laserstrahltechnologie benutzt, ist in U.S.-Patentschrift Nummer 5,035,693 bei Kratzer beschrieben. In diesem Verfahren werden markierte Zellpopulationen auf ein sich bewegendes Band gestellt. Die markierten Zellen werden nachfolgend durch einen Detektor identifiziert und über einen Laserstrahl zerstört. Jedoch hat dieses System viele der selben Nachteile wie das Shapiro-Verfahren. Zum Beispiel, da die Zellen auf dem Band nach dem Detektor nur in eine Richtung sich bewegen ist das Verfahren nicht reversibel. Somit, falls eine einzelne Tumorzelle der Feststellung entgeht, wird sie in den Patienten zurückgeführt.

**[0019]** Somit, trotz ausführlicher Bemühungen und vieler innovativer Vorgehensweisen, besteht ein großer und wachsender Bedarf für Verfahren und Systeme zur Auslöschung geradezu jeder Tumorzelle aus einer gesammelten Zellpopulation. Das hierin beschriebene System und das Verfahren erfüllen diesen Bedarf.

#### KURZDARSTELLUNG DER ERFINDUNG

**[0020]** Diese Erfindung stellt ein gerichtetes System und ein Verfahren zur individuellen Identifizierung und Zerstörung von kontaminierenden Tumorzellen in einer Zellpopulation bereit. Durch Verwenden des Systems der vorliegenden Erfindung kann praktisch jede Tumorzelle identifiziert und individuell zerstört werden. Somit können autologe hematopoietische Zelltransplantationen und ähnliche medizinische Techniken ohne Rückführung irgendwelcher kontaminierender Tumorzellen ausgeführt werden.

**[0021]** Tumorzellen können mit der offenbarten Erfindung unter Verwendung mehrerer Vorgehensweisen identifiziert werden. Eine Ausführungsform schließt eine zerstörungsfreie Markierungsmethode ein, so dass alle lebensfähigen Tumorzellen unter einem Mikroskop von den Nicht-Tumorzellen zu unterscheiden sind. In dieser Ausführungsform kann ein tumorspezifischer Fluorochrom-konjugierter Antikör-

per verwendet werden, um spezifisch jede der Tumorzellen, jedoch nicht eine der hematopoietischen Zellen zu markieren. Die markierten Tumorzellen werden dann mikroskopisch innerhalb der Population der Nicht-Tumorzellen identifiziert. Ein schmaler Hochleistungslaserstrahl wird danach auf jede der identifizierten Tumorzellen fokussiert und ein kurzer, tödlicher Lichtpuls abgegeben. Die nächste Tumorzelle wird dann identifiziert und abgetötet und so weiter, bis jede markierte Tumorzelle zerstört ist.

**[0022]** In einer weiteren Ausführungsform wird ein Antikörper, der selektiv an hematopoietische Zellen bindet, aber nicht an Tumorzellen, verwendet, um hematopoietische Stammzellen zu identifizieren. Alle von den Tumorzellen (z. B. solche, die keinen Marker aufnehmen) werden so identifiziert und danach mit einem schmalen Hochleistungslaserstrahl abgetötet.

**[0023]** Noch ein weiteres Beispiel ist ein Verfahren zur Eliminierung von Tumorzellen innerhalb einer Population von Zellen, die Nicht-Tumorzellen einschließen. Solche Verfahren schließen ein: a) Markieren der Zellpopulation, so dass die Tumorzellen von den Nicht-Tumorzellen unterschieden werden können; b) Lokalisieren von einer der Tumorzellen unter Bezug auf die Markierung, und c) Abtöten der Tumorzelle durch Anwenden eines Pulses von einer kontrollierten Energiequelle auf die lokalisierte Tumorzelle.

**[0024]** Ein zusätzliches Beispiel ist ein Verfahren zur Anreicherung der Anzahl der Stammzellen in einer hematopoietischen Zellpopulation. Ein solches Verfahren schließt ein: a) Markieren der hematopoietischen Zellpopulation mit einem Stammzell-spezifischen Marker, und b) Anwenden eines Hochenergie-laser-Lichtpulses auf mindestens eine der nicht markierten Zellen in der Population.

**[0025]** Noch ein weiteres Beispiel ist ein Verfahren zur Herstellung isolierter hematopoietischer Zellen zur Rückführung in einen Patienten. Ein solches Verfahren schließt ein: a) Markieren der Tumorzellen innerhalb der isolierten hematopoietischen Zellen mit einem Tumorzell-spezifischen Marker; und b) Anwenden eines Hochenergielaser-Lichtpulses auf mindestens eine der markierten Zellen in der Population.

**[0026]** Ein weiteres Beispiel ist ein in vitro Verfahren zur Sicherstellung, dass eine erste Population von Zellen aus einer zweiten Population von Zellen eliminiert worden ist. Ein solches Verfahren schließt ein: Markieren der ersten Zellpopulation, so dass die erste Zellpopulation von der zweiten Population an Zellen unterschieden werden kann; Platzieren der ersten Population der Zellen und der zweiten Population der Zellen in eine stationäre Position auf einer Fläche; Lokalisieren einer Zelle in der ersten Population der Zellen unter Bezug auf den Marker; Anwenden eines ersten Pulses von einer kontrollierten Energie-

quelle auf die eine Zelle, Bestimmen, ob die eine Zelle durch den ersten Puls abgetötet wurde; und Anwenden eines zweiten Pulses von einer kontrollierten Energiequelle, falls die eine Zelle nicht abgetötet wurde.

#### KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

**[0027]** [Fig. 1](#) zeigt ein Diagramm einer Ausführungsform eines automatisierten Systems zur spezifischen zielgerichteten Erfassung markierter Zellen. Dieses System beinhaltet einen Computer, eine Kamera, eine Breitband-Lichtquelle und einen Laser.

**[0028]** [Fig. 2](#) zeigt ein Diagramm einer weiteren Ausführungsform eines automatisierten Systems zur spezifischen zielgerichteten Erfassung und Abtötung markierter Zellen.

#### DETAILLIERTE BESCHREIBUNG

**[0029]** Ein zielgerichtetes Verfahren zum Entfernen kontaminierender Tumorzellen aus einer Population von Nicht-Tumorzellen wird bereitgestellt. Wie oben diskutiert, bezieht sich dieses Verfahren auf medizinische Prozeduren, wodurch Zellpopulationen entfernt werden und dann in Patienten als Teil eines therapeutischen Regimes zurückgeführt werden. Allgemein wendet das zielgerichtete Verfahren zuerst eine Markierung an, die als ein Marker zur mikroskopischen Identifizierung und Lokalisierung der kontaminierenden Tumorzellen fungiert.

**[0030]** Der gewählte zelluläre Marker kann jede Markierung sein, die eine kontaminierende Tumorzelle, die sich innerhalb einer Population von Nicht-Tumorzellen befindet, identifiziert und unterscheidet. Zum Beispiel können Anti-Tumor Antikörper, die an ein Fluorochrom konjugiert sind, als spezifische Markierungen benutzt werden (Siehe Kapitel 10 in A. Gee, Editor, Bone Marrow Processing and Purging, Teil 5, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1991). Zahllose Tumorspezifische Marker sind auf einer großen Auswahl an tumorigenen Zellen gefunden worden. Zum Beispiel sind viele Oberflächenmarker, die spezifisch für epitheliale Zellen sind, an kontaminierenden Brustkrebszellen in gesammelten hematopoietischen Zellpopulationen gefunden worden. Solche Antikörper können verwendet werden, um Brustkrebszellen innerhalb hematopoietischer Zellpopulationen zu identifizieren und machen sie somit zum Ziel für die Abgabe eines tödlichen Energiepulses. Ähnlich können andere Tumorspezifische Fluorochrom-konjugierte Antikörper verwendet werden, um andere Typen an kontaminierenden Tumorzellen zu identifizieren.

**[0031]** Es sollte beachtet werden, dass, falls kein spezifischer Marker für die Tumorzellpopulation erhältlich ist, das Verfahren in einer „inversen“ Art und

Weise ausgeführt werden kann. Spezifische Marker für Nicht-Tumorzellpopulationen können zum Identifizieren solcher Zellen, die nicht tumorigen sind, verwendet werden. Zum Beispiel, in hematopoietischen Zellpopulationen kann der CD34-Zellmarker verwendet werden, um nur die hematopoietischen Zellen anzufärben, aber nicht die nicht-hematopoietischen Tumorzellen. Jede Zelle, die nicht den Marker aufweist, wird dann durch die Abgabe eines fokussierten Energiepulses abgetötet. Die verbleibende lebensfähige Zellpopulation wird nur die Zellen enthalten, die den Zellmarker besaßen (z. B. CD34).

**[0032]** Nachdem die Tumorzellen identifiziert sind, wird eine kontrollierte Energiequelle, wie ein Laser, kollimiertes oder fokussiertes Nicht-Laserlicht, Hochfrequenz-Energie, beschleunigtes Teilchen, fokussierte Ultraschallenergie, Elektronenstrahl oder eine andere Strahlung verwendet, um einen zielgerichteten tödlichen Energiepuls abzugeben, der individuell jede der Tumorzellen abtötet. Da die Tumorzellen spezifisch und eindeutig innerhalb einer Population von Nicht-Tumorzellen identifiziert werden können, kann das Verfahren verwendet werden, um gerade nur die kontaminierenden Tumorzellen auszulöschen.

**[0033]** In einer Ausführungsform des zielgerichteten Verfahrens, werden die Tumorzellen durch simultane Fluoreszenz- und Laser-Belichtung abgetötet. In einem ersten Schritt wird die Zellpopulation mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt, der spezifisch für Tumorzellen ist. Zum Beispiel könnten Antikörper, die spezifisch für Tumorzellen sind und an ein fluoreszierendes Molekül gekoppelt, in dieser Ausführungsform verwendet werden. Die Zellpopulation wird dann durch ein entsprechendes Licht (z. B. ultraviolettes Licht) belichtet, so dass die fluoreszierenden Tumorzellen innerhalb der Population der Nicht-Tumorzellen identifiziert werden können.

**[0034]** Die markierten Zellen werden dann in eine Petri-Schale eingebracht und innerhalb des Systems gestellt. Wenn das System in einem automatischen Modus ist, leuchtet ein Fluoreszenzlicht und eine CCD-Kamera fängt an, Videobilder der Zellen in der Schale aufzunehmen. Ein auf einem angeschlossenen Computer laufendes Programm beginnt die Bildaufnahmen zu analysieren und jede einzelne der fluoreszierenden Zellen zu identifizieren. Jede Zelle wird zielgerichtet erkannt und mit einem Laserstrahl zerstört. Der Computer bestätigt, dass jede Zelle abgetötet ist durch Aufzeichnen der Änderung der Fluoreszenz bevor und nachdem der Laser aktiviert worden ist.

**[0035]** In einer weiteren Ausführungsform werden kontaminierende Zellen in Biopsien von Krebspatienten entfernt. Die in vitro Etablierung von primären menschlichen Tumorzelllinien aus vielen Tumortypen

wird erschwert durch die Anwesenheit von kontaminierenden primären Zellpopulationen, die überlegene in vitro Wachstumseigenschaften gegenüber Tumorzellen haben. Zum Beispiel repräsentieren kontaminierende Fibroblasten eine größere Herausforderung in der Etablierung vieler Krebszelllinien. Das offene System könnte verwendet werden, um besonders die kontaminierenden Zellen zu markieren und zu zerstören, während die aus der Biopsie stammenden Tumorzellen intakt zurückbleiben. Entsprechend werden die eher aggressiven primären Zellen nicht überhand nehmen und die Krebszelllinie zerstören.

**[0036]** In einer verwandten Einsatzmöglichkeit könnte das vorliegende System verwendet werden, um kontaminierende Zellen in Inokulationen zur Gewebezüchtung und für Zelltherapie-Anwendungen zu entfernen. Zellkontaminationsprobleme existieren in der Etablierung von Primärzellkulturen für Anwendungen in der Gewebezüchtung und in der Durchführung von zellulären Therapien. Insbesondere sind Chondrozyten-Therapien für Knorpelschäden erschwert durch Verunreinigungen in den Zellpopulationen, die aus Knorpelbiopsien erhalten wurden. Entsprechend könnte das vorliegende System verwendet werden, um spezifisch diese Zelltypen aus den Inokulaten zu entfernen. Zum Beispiel kann eine Knorpelbiopsie entnommen werden und die Probe unter herkömmlichen Bedingungen angezogen werden. Die wachsende Kultur wird dann mit einem spezifischen Marker für die kontaminierenden Zellen angefärbt. Die gesamte Zellpopulation wird dann in das nachfolgend beschriebene System gestellt und die markierten, kontaminierenden Zellen werden zerstört.

**[0037]** In einer weiteren Ausführungsform kann das signifikante Risiko und der Schweregrad des Graft-versus-Host-Disease („Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion“) (GvHD) im Rahmen der allogenen Humanen Stammzell-(HSC)Transplantation bekämpft werden. Durch Verwendung des hierin beschriebenen Systems ist es möglich, den T-Zellgehalt eines Patienten zu definieren und zu kontrollieren. Dieser Typ der Kontrolle ist besonders kompliziert mit der existierenden Technologie, da die Überdepletion der T-Zellen in einem Verlust des bekannten „Graft-versus-Leukemia“-Effektes resultiert, der in allogenen Transplantationen beobachtet wird. Somit ist ein gewisser Spiegel an T-Zellen vorteilhaft für den Patienten, um, zum Beispiel, Leukämiezellen anzugreifen. Jedoch führt ein zu hoher T-Zellspiegel zu allgemeinen Angriffen des Immunsystems auf die Gewebe des Empfängers. Das vorliegende System und die Verfahren sind fähig zur präzisen Kontrolle der Zahl der T-Zellen in jeder allogenen Transplantation.

**[0038]** Eine Ausführungsform eines automatisierten zielgerichteten Systems **10** ist in [Fig. 1](#) veranschau-

licht. Ein Computersystem **12** kommuniziert durch ein Kabel **14** mit einer Kamera **16**. Das Computersystem kann jeder kommerziell erhältliche Computer sein, der Videodaten empfangen und analysieren kann. Ein Beispiel eines solchen Computersystems ist ein Intel Pentium Pro Computer der mit der Software Microsoft Windows 95 läuft.

**[0039]** Obwohl eine Videokamera in der in [Fig. 1](#) offenbarten Ausführungsform dargestellt ist, kann die Kamera **16** jeder Typ von Bilderfassungsausrüstung sein, die dem Fachmann bekannt ist. Die Kamera **16** ist auf eine Halterung **20** montiert, so dass sie in einer allgemein vertikalen Orientierung in Bezug zum Boden gehalten wird.

**[0040]** Die Linse **22** von Kamera **16** ist so entworfen, dass sie mit einem Mikroskop **24**, durch ein Augenteil **26** zusammen passt. Somit wird jede Bildaufnahme, die in das Mikroskop **24** übertragen wird, durch das Augenteil **26** zu der Linse **22** der Kamera **16** gesendet.

**[0041]** Die Kamera **16** überträgt die Bildaufnahmen, die sie aufnimmt zu dem Computer **12** durch das Kabel **14**. Auf diese Weise erfasst und analysiert der Computer **12** jegliche Bildaufnahmen, die dem Mikroskop präsentiert werden. Zum Beispiel, kann das Mikroskop **24** auf Zellen in einer Schale **30** fokussiert sein. Die Bildaufnahmen der Zellen werden von dem Mikroskop **24** auf die Kamera **16** übertragen und letztendlich zu dem Computer **12** gesendet. Der Computer **12** kann dann die Software ausführen, um die Bildaufnahmen, die aufgenommen wurden, zu analysieren.

**[0042]** Der Computer **12** steht auch durch ein zweites Kabel **32** mit einem Laser **34** in Datenübertragung. Der Laser ist an einem elektronisch gesteuerten Drehteil **36** befestigt, so dass seine Position relativ zu der Auflage **20** durch von dem Computer **12** erhaltene Signale geändert werden kann. Wie gezeigt, kann der Laser **34** justiert werden, um einen Lichtstrahl durch das Mikroskop **24** zu richten, während die Zielzelle dauerhaft ortsfest ist. Zusätzlich kann der Laser **34** gedreht werden, um einen Lichtstrahl direkt zu Schale **30** zu senden.

**[0043]** In dem Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung hat der Begriff „Schale“ eine breite Bedeutung. Er ist vorgesehen, jede Fläche zu umfassen, die fähig ist, eine dünne Schicht Flüssigkeit, wie zelluläres Medium, zurückzuhalten. Die Schale kann in einer Kühlvorrichtung enthalten oder daran angeschlossen sein, um die Flüssigkeit in der Schale unterhalb der Umgebungstemperatur während dem Ablauf der hierin beschriebenen Verfahren zu halten. Es kann auch wünschenswert, aber nicht essentiell, sein, die Oberfläche der Flüssigkeit mit einer inerten Atmosphäre, wie Stickstoff oder Argon zu bedecken.



**[0044]** Obwohl die in [Fig. 1](#) dargestellte Ausführungsform zum Ausrichten des Lasers ein elektronisch gesteuertes Drehteil **36** enthält, werden andere Verfahren erahnt. Zum Beispiel könnte ein elektronisch gesteuerter Spiegel zwischen dem Laser und seinem Ziel platziert werden, so dass die Rotation des Spiegels verwendet wird, um den Laser auszurichten. Andere Mechanismen zum Ausrichten des Lasers, wie Strahlteiler, Spiegel oder Prismen, die auf dem Fachgebiet bekannt sind, sind ausersehen, innerhalb des Bereiches der Erfindung eingeschlossen zu werden.

**[0045]** Eine Breitband-Lichtquelle **40** ist durch einen Adapter **42** auch mit dem Mikroskop **24** in Verbindung. Der Adapter **42** gestattet den Lichtemissionen von der Breitband-Lichtquelle die Belichtung der Zellen, die in der Schale **30** platziert sind. Breitband-Lichtquellen sind auf dem Fachgebiet gut bekannt und viele unterschiedliche Typen könnten innerhalb des automatischen zielgerichteten Systems **10** untergebracht werden, um markierte Zellen, die auf der Schale **30** platziert sind, zu belichten.

**[0046]** Unterhalb, und die Schale **30** tragend, ist eine Computergesteuerte, verstellbare Ablage **48**. Der Computer **12** kann Signale entlang eines Datenübertragungskabels **49** senden, welche die Ablage **48** veranlassen, ihre Position relativ zu Laser **34** und Mikroskop **24** zu ändern. Somit kann, um spezifisch Zellen zielgerichtet zu erfassen, der Computer **12** Signale entlang Kabel **49** zu der Ablage **48** senden, die veranlassen, dass die Schale **30** in eine bestimmte Position gerollt wird. Durch Kalkulation der korrekten Position kann der Laser auf eine bestimmte Zelle durch Bewegen von Schale **30** in eine gewählte Position ausgerichtet werden. Die Koordinaten der ausgewählten Position können durch den Computer **12** aus der Analyse der Zellbilder, die von der Kamera **16** erfasst wurden, bestimmt werden.

**[0047]** Die auf dem Computer **12** laufende Software erfasst die Bildaufnahmen, die durch das Kabel **14** von der Kamera **16** übertragen werden. Falls ein Set markierter Zellen in die Schale **30** platziert wird, dann wird die Kamera **16** ein Bild der markierten Zellen aufnehmen. Wie oben diskutiert, können die Zellen mit der Breitband-Lichtquelle **40** belichtet werden. Durch Überlagerung eines zweidimensionalen Gitters über das durch den Computer gesammelte Bild, kann die Software die X/Y-Koordinaten der Zellen, die markiert sind, durch Suchen nach dunklen Flecken, die den Durchmesser eines Zellquerschnittes haben, bestimmen. Die Software kalkuliert dann die kartesischen Koordinaten der markierten Zellen und richtet den Laser **34** spezifisch auf diese Koordinaten aus. Durch Ausstrahlen eines kurzen Hochenergieimpulses kann der Laser selektiv jede der markierten Zellen töten und nicht eine der nicht markierten Zellen beschädigen.

**[0048]** Das Computersystem **12** kann auch Sensoren besitzen, die fluoreszierende Signale von gefärbten Tumorzellen detektieren und dann die Koordinaten der Position der ersten zu zerstörenden Tumorzelle kalkulieren. Das Computersystem richtet dann eine fokussierte Energiequelle, wie einen Laser- oder Elektronenstrahl, auf die kalkulierte Position der ersten Tumorzelle aus. Die angepeilte Tumorzelle wird dadurch spezifisch innerhalb der Population der Nicht-Tumorzellen zerstört. Dies wird durch die Tatsache erleichtert, dass die Zielzelle während des Verfahrens dauerhaft ortsfest ist.

**[0049]** In einem weiteren beispielhaften System, werden die Zellen zum Verschieben auf einem computergesteuerten X-Y-Tisch unter einem Mikroskop mit einer angeschlossenen CCD-Digitalkamera befestigt. Der Laser ist an dem Mikroskop so befestigt, dass er auf eine spezifische fixierte Stelle innerhalb des Betrachtungsfeldes ausgerichtet ist. Der Computer scannt dann kontinuierlich über die erste Reihe der Zellen in der X-Richtung, bis eine gefärbte Tumorzelle sichtbar ist.

**[0050]** Der Computer bewegt dann den X-Y-Tisch, bis die Tumorzelle in dem Zielgebiet des Lasers ist, der Laser wird gepulst, um die Zelle zu zerstören, dann wird der X-Y-Tisch auf seine vorherige Position zurückgefahren und entlang der X-Richtung bewegt, bis eine erste Reihe der Zellen gescannt ist und alle Tumorzellen innerhalb dieser Reihe zerstört sind.

**[0051]** Der X-Y-Tisch wird dann in der Y-Richtung bewegt, bis eine zweite Reihe sichtbar ist, die die erste Reihe für einige Zellen überlappt. Der Tisch wird dann in der X-Richtung bewegt, die Tumorzellen, wie oben beschrieben, zerstört und die Prozedur wiederholt, bis die gesamte Zellpopulation gescannt worden ist. Bevorzugt identifiziert und erfasst die Computer-Software die Zellen automatisch. Jedoch ist auch in Erwägung gezogen, dass ein Anwender-gesteuertes Zeigergerät (z. B., Rollkugel, Steuerhebel oder Maus) verwendet werden könnte, um die Tumorzellen auf einem Bildschirm zu lokalisieren und zu markieren und/oder die Bewegung des X-Y-Tisches zu steuern. Natürlich sind viele Variationen des Computerkontrollsystems möglich, einschließlich alternativer Verfahren zum Scannen der Zellen und dem Bewegen des Lasers relativ zu dem Mikroskop (z. B., nur in der Y-Richtung oder irgendwo innerhalb des Feldes). Es ist auch ins Auge gefasst, dass die Schale/der Tisch dauerhaft ortsfest verbleiben könnte und die Mikroskop/Laser-Kombination sich bewegt, um die markierten Zellen gezielt zu erfassen.

**[0052]** Zum Beispiel kann der Mikroskopkopf und das Laser-Zielsystem bewegt werden, während die Flasche oder Petri-Schale, die die Zellen enthält, ortsfest auf einer Fläche ist. Zusätzlich kann das Lasersystem entweder von oder oberhalb der Zellpopu-

lation feuern. Da das Laser-Zielsystem durch ein Mikroskop fokussiert ist, kann der Laserstrahl auf unterschiedliche fokale Ebenen gerichtet werden. Somit können Zellen, die bei unterschiedlichen senkrechten Höhen liegen, spezifisch durch Zielen des Laserstrahls auf unterschiedliche fokale Ebenen abgetötet werden. Zum Beispiel kann, sobald der Computer mittels eines Detektors eine Zelle bei einer bestimmten X- und Y-Koordinate identifiziert hat, der Laser in verschiedene fokale Ebenen bei diesen Koordinaten abgefeuert werden. Dies stellt sicher, dass die Zelle, ganz gleich, wo sie in der senkrechten Ebene lokalisiert ist, durch den Laser abgetötet wird.

**[0053]** Die gesamte Population der Tumorzellen kann automatisch zerstört werden durch die Wiederholung der zielgerichteten Prozedur für jede Tumorzelle in der Population. Die Prozedur des Markierens, des Identifizierens und des Tötens jeder Tumorzelle kann auch manuell ausgeführt werden, wobei jede markierte Tumorzelle mikroskopisch durch einen Anwender identifiziert wird und der Laserstrahl dann durch den Anwender auf die belichteten Tumorzellen fokussiert wird. Ein kombiniertes Laser/Mikroskop-System, dass das manuelle zielgerichtete Erfassen der Zellen gestattet, ist von Photonic Instruments (Arlington Heights, IL) erhältlich.

**[0054]** Zum Beispiel kann ein Nikon7 Diaphot-300 Mikroskop, dass die Visualisierung von aufeinanderfolgenden benachbarten Feldern gestattet, verwendet werden, um die gesamte Zellpopulation in einer vernünftigen Zeit anzusehen. Eine beispielhafte Zellpopulation von  $1,5 \times 10^8$  Zellen, bei Konfluenz, wird eine Fläche von 300 cm<sup>2</sup> besetzen. Unter der Annahme eines Beobachtungsfeldes von  $2 \times 1,5$  mm bei einer Vergrößerung von 4 $\times$ , müsste das Mikroskop eine 100 $\times$ 100-Matrix oder 10.000 Felder insgesamt scannen. Ein manueller Anwender kann vielleicht 500–1.000 Felder pro Stunde scannen, somit würde die gesamte manuelle Prozedur ungefähr 10–20 Stunden dauern. Die automatisierte Prozedur würde viel schneller sein.

**[0055]** Sobald die gesamte Population der Zellen mit einem Identifizierungssagens, wie einem Fluoreszenz-markierten Antikörper, behandelt worden ist und dann durch einen Energieimpuls getötet, wird die Zellpopulation entsprechend den individuellen klinischen Anforderungen des Patienten gewaschen. Die Population der behandelten Zellen ist danach fertig, um in den ausgewählten Patienten transplantiert zu werden. Wie oben diskutiert, ist der Patient normalerweise dieselbe Person, wie der Originalspender der Zellpopulation.

**[0056]** Eine bevorzugte fokussierte Energiequelle für die zielgerichtete Methode ist ein Laser, der Lichtwellenlängen im Bereich von 375 bis 900 Nanometer aussendet. Ein solcher Laser wird bei Photonic In-

struments (Arlington Heights, IL) hergestellt. Wie bekannt ist, stellen Laser eine monochromatische Lichtquelle mit hoher spezifischer Bündelung bereit, was es möglich macht, einen mikroskopisch fokussierten Energiestrahл auszurichten, der nur einen Durchmesser von 0,5 Mikrometer hat.

**[0057]** Hohe Präzision, sowohl hinsichtlich der räumlichen und zeitlichen Auflösung, in der Lieferung von Lichtenergie kann bei vorgegebenen Wellenlängen erreicht werden. Die vorteilhafteste Wellenlänge, die eine bestimmte Tumorzelle abtöten wird, kann experimentell bestimmt werden und für die vorteilhaftesten Ergebnisse angewandt werden. Zusätzlich können die Impulslängen von ungefähr 10–100 Nanosekunden verwendet werden, um spezifisch nur eine einzelne Zelle in der Population zu töten.

**[0058]** Als eine Alternative können Breitband-Lichtquellen (z. B. wie von einer Xenonlampe erhalten) durch die Anwendung einer automatischen Blende schmal fokussiert werden, um eine kontrollierte Energiequelle bereitzustellen. Eine Hochleistungs-Breitband-Lichtquelle kann auf Bereiche so schmal wie ein Quadratmikrometer fokussiert werden und somit selektiv verwendet werden, um eine einzelne Tumorzelle innerhalb einer Population von Nicht-Tumorzellen zu töten.

**[0059]** Die Leistung der Lichtquelle, und die Dauer des Lichtimpulses, kann abgeglichen werden, um das gewünschte Ergebnis des spezifischen Tötens einer bestimmten Tumorzelle zu erreichen. Die Laserimpulsdauer kann so kurz wie 2 bis 6 Nanosekunden sein und die Lichtenergie kann mit bis zu 50 Mikrojoule und mehr abgegeben werden. Jedoch wird die gesamte Menge der Lichtenergie, die für die vorgesehene Zielzelle bereitgestellt wird, bevorzugt so gewählt, dass kein wesentliches Sieden des angepeilten zellulären Materials oder des umgebenden Mediums verursacht wird.

**[0060]** Lokales Erhitzen des Zellmediums bis zum Siedepunkt kann verursachen, dass das Beobachtungsfeld trübe wird und somit ein automatisches Zielerfassungssystem unterbrechen. Zusätzlich besteht das Risiko, dass Nicht-Tumorzellen, die neben der angepeilten Zelle lokalisiert sind, beschädigt werden. In einer Ausführungsform wird die gesamte abgegebene Lichtstärke minimal die Zellmembran aufbrechen, was eventuell zum Zelltod durch den Verlust an cytoplasmatischen Verbindungen führt. Alternativ kann die gesamte Lichtstärke so gewählt werden, dass sie irreversibel zelluläre Verbindungen beschädigt und somit zum Zelltod ohne Zerstörung von der Zellmembran führt.

**[0061]** Um mikroskopisch die Zellen zu beobachten, kann die gesamte Zellpopulation zweckmäßigerweise auf eine nominell flache Fläche platziert werden,



so dass eine große Zahl der Zellen in einer einzelnen fokalen Ebene erscheint. Die Dichte der Zellen auf dieser Fläche kann im Prinzip bei jedem Wert sein. Jedoch sollte die Zelldichte so hoch wie möglich sein, um die gesamte Flächenausdehnung, die für das Verfahren benötigt wird, zu minimieren. Falls die kontaminierenden Zellen deutlich identifizierbar sind, kann die gesamte Zellpopulation bei Konfluenz auf der Fläche untergebracht werden (etwa 500.000 Zellen pro Quadratzentimeter).

**[0062]** Wenn die Population der gesammelten Zellen hematopoietische Zellen sind, die als Teil einer Knochenmarktransplantation entfernt wurden, dann gestattet die Anreicherung nur der gewünschten Stammzellen die Beobachtung in einer kleineren Gesamtfläche. Zum Beispiel, um eine CD34-angereicherte Population von 350 Millionen (5 Millionen pro Kilogramm eines 70-kg Patienten) hematopoietischen Zellen zu beobachten, beträgt die benötigte Gesamtfläche ungefähr 700 Quadratzentimeter. Wenn jedoch die Anreicherungsprozeduren der hematopoietischen Stammzellen das Screenen auf multiple Stammzell-spezifische Marker einschließt, würde die Gesamtzahl der Zielzellen abnehmen und dadurch eine kleinere Gesamtfläche für die zielgerichtete Prozedur benötigen. Wie bekannt ist, können hematopoietische Populationen für Stammzellen basierend auf der Expression der Stammzellmarker Thy-1, CD38, CD15, CD11b, Gly-A, CD3 oder CD19 angereichert werden. Zusätzlich können die Zellen durch die gut bekannten Techniken der Tiefbett-Filtration oder Gegenstrom-Schlammung angereichert werden.

**[0063]** Falls die Erkennung der Tumorzellen bei Zellkonfluenz nicht behindert ist, kann es wünschenswert sein, die Zielzellpopulation bei Subkonfluenz zu halten, um so Kollateralschaden an benachbarten Zellen zu minimieren. Da jedoch die Gesamtzahl der Zellen groß ist, verglichen mit der Zahl der Tumorzellen, kann geringer Kollateralschaden an umgebenden Zellen toleriert werden. Erkennung und Lokalisierung der markierten Tumorzellen in einem dreidimensionalen Raum unter Verwendung der konfokalen Mikroskopie würde die Notwendigkeit einer ebenen Fläche aufheben und die Identifizierung und Fokussierung der tödlichen Lichtquelle kann in einem Volumen, in dem die Zellen platziert sind, stattfinden.

**[0064]** Nachdem die Tumorzellen spezifisch zerstört worden sind, kann die Zelldebris durch Waschen der Zellen bei tiefer Temperatur entfernt werden. Abhängig von der vorausberechneten Länge der Prozedur, kann die Zielzellpopulation auf 4°C gekühlt werden, so dass der Vorgang der Entfernung der Kontaminanten nur mit einer minimalen Verminderung in den physiologischen Funktionen der Nicht-Tumorzellpopulation stattfindet. Dies kann besonders wichtig sein, wenn Nicht-Tumorzellen hematopoietische Zellen

sind, da sie bei Raumtemperatur einem Abbau unterliegen. Eine thermoelektrische Kühlvorrichtung kann während dieser Prozedur verwendet werden, um die Zellpopulation zu kühlen.

**[0065]** Wie bekannt ist, eliminiert das Abkühlen der Zellpopulation auf 4°C alle Zellbewegung. Die Fläche, auf der die Zellen platziert sind, kann auch mit polykationischen Verbindungen wie Poly-L-Lysin überzogen sein, so dass die Zellen fest anhaften.

**[0066]** Das nachfolgende Beispiel veranschaulicht eine Ausführungsform des zielgerichteten Verfahrens zum Entfernen von Tumorzellen aus einer Population hematopoietischer Zellen.

#### BEISPIEL 1

#### HEMATOPOIETISCHE STAMMZELL-TRANSPLANTATION

**[0067]** Ein Patient mit einem metastasenbildenden Tumor und der eine autologe Knochenmarktransplantation benötigt, ist durch einen Arzt ermittelt worden. Als ein erster Schritt in der Behandlung, wird der Patient einer Prozedur zur Knochenmarksammlung unterzogen. In dieser Prozedur liegt der Patient unter Vollnarkose in einem Operationsraum. Der posteriore Beckenkamm des Patienten wird dann durch den Chirurgen mehrfach punktiert und das Knochenmark abgesaugt.

**[0068]** Die Sammlungsprozedur resultiert in der Rückgewinnung von ungefähr  $1 \times 10^9$  hematopoietischen Zellen. Die gesammelten Zellen werden auf hematopoietische Zellen angereichert, indem sie zuerst über eine Immunoaffinitäts-Säule geleitet werden, die auf Zellen selektiert, die das für hematopoietische Zellen spezifische CD34-Oberflächenantigen besitzen. Um die gesammelte Zellpopulation noch weiter auf Stammzellen anzureichern, wird eine zweite Selektion durchgeführt mittels Durchfluss der gesammelten Zellen über eine Immunoaffinitäts-Säule, die den Anti-Stammzell-Antikörper Thy-1 gebunden enthält.

**[0069]** Nach herkömmlicher Elution von der Säule, wird die angereicherte hematopoietische Zellpopulation danach mit CD34-Antikörper in Kontakt gebracht, die mit einem Fluorochrom konjugiert worden sind. Die markierten Antikörper binden spezifisch an die hematopoietischen Zellen, aber nicht die Tumorzellen. Die Zellpopulation wird bei Konfluenz dann auf eine nominal ebene Fläche platziert. Die Zelldichte beträgt bei einer monomolekularen Schicht ungefähr 500.000 Zellen pro Quadratzentimeter. Ein ultraviolette Licht, das den Fluorochrom-konjugierten CD34-Antikörper beleuchtet, wird angeschaltet, um die hematopoietischen Zellen zu identifizieren.

**[0070]** Ein Anwender zielt dann mit einem Laserlicht von einem Stickstoff-Laser. Ein Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 375 Nanometer und einer Impulsdauer von fünf Nanosekunden wird verwendet, um manuell jede Tumorzelle, die dadurch identifiziert wurde, dass sie nicht fluoreszierte, zielgerichtet zu erfassen und zu töten.

**[0071]** Sobald die nicht fluoreszierenden Tumorzellen zerstört worden sind, wird die verbleibende Population gefrierkonserviert. Bevor die Zellen zurückgeführt werden, bekommt der Patient eine chemotherapeutische Behandlung, um die Tumorzellen zu zerstören, die sich metastasierend im gesamten Körper des Patienten gebildet haben. Dieser Behandlung folgend, werden die isolierten Zellen für die Rückführung durch schnelles Auftauen bei 37°C vorbereitet. Die Tumorzell-freien hematopoietischen Stammzellen werden dann in den Patienten transplantiert. Der Patient erholt sich anschließend ohne Remission des ursprünglichen Krebses.

**[0072]** Obwohl die Prozeduren der Knochenmarksammlung und Rückführung gewöhnlich durch einen Arzt ausgeführt werden, benötigt der Anwender des Verfahrens der vorliegenden Erfindung keine medizinische Ausbildung.

#### BEISPIEL 2

**[0073]** Ein Experiment wurde durchgeführt, um zu bestimmen, ob Propidiumiodid (PI) zur Bestätigung, dass eine Zielzelle, in einer Population von Zellen, durch Laserbehandlung abgetötet wurde, benutzt werden könnte. Wie dem Fachmann bekannt ist, ist Propidiumiodid spezifisch für doppelsträngige Nukleinsäuren. Da PI in den Kern von toten Zellen diffundieren kann, aber nicht die Membran von lebenden Zellen durchdringen kann, haben wir untersucht, ob die Lebensfähigkeit der Zielzellen durch den Aufbau der PI Färbung in ihren Kernen bestätigt werden kann.

**[0074]** Weiterhin hat PI ein Absorptionsmaximum bei 493 nm, welches nahe dem Absorptionsmaximum des Markers Phycoerythrin (PE) bei 480 nm liegt. Somit könnten PI und PE durch die selbe Wellenlänge des Lichtes aktiviert werden. Darüber hinaus hat PI ein Emissionsmaximum von 617 nm, das weit genug entfernt liegt, um es von dem von PE bei 578 nm zu unterscheiden. Somit könnte ein positiver PE-Messwert unterschieden werden, sogar wenn PE-markierte Antikörper an die Zelle gebunden wären.

#### ZELLINIE

**[0075]** Die humane hematopoietische Zelllinie KG1a wurde von der American Type Culture Collection (Rockville, MD) erhalten. Die Zellen wurden ge-

frierkonserviert entgegengenommen und dann schnell aufgetaut und in IMDM (Life Technologies, Grand Island, NY) suspendiert, das 4 mM L-Glutamin, 3,024 g/L Natriumbicarbonat und 20% fötales Kälberserum enthält. Die Zelllinie wurde alle 3 bis 4 Tage passagiert und in einem Inkubator bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> gehalten (wie durch die ATCC Richtlinien empfohlen).

#### ZELLFÄRBUNG

**[0076]** Die KG1a-Zellen wurden durch direkte Immunfluoreszenz-Färbung von Oberflächenantigenen unter Verwendung eines Phycoerythrin-(PE)konjugierten monoklonalen Antikörpers gegen das humane CD34 Membranantigen gefärbt, wie in den Richtlinien des Herstellers empfohlen (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Die markierten KG1a-Zellen (Ziele) wurden mit nicht markierten KG1a-Zellen (Kontrollpopulation) in einem Verhältnis von 1:100 gemischt.

**[0077]** Propidiumiodid (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) wurde auf eine Endkonzentration von 5 µg/ml in eine Zellsuspension von 1 × 10<sup>6</sup> Zellen/ml hinzugegeben. Jeweils ein 20-µl Aliquot einer gemischten Zellsuspension von 1 × 10<sup>6</sup> Zellen/ml wurde in die Vertiefungen von einer 384-Well Platte (Nalgen Nunc International, Naperville, IL) gegeben und, nach 30 Minuten zum Absetzen der Zellen, Bilderfassung und Laser-Ablation durchgeführt.

#### BILDAUFNAHME DER ZELLEN

**[0078]** [Fig. 2](#) veranschaulicht ein schematisches Diagramm von einer Ausführungsform eines Laser-Ablations-Systems **75**. Das System schließt eine Ladungskopplungsspeicher-(CCD)Kamera **77** ein, die mit einem Personal-Computer **80** verbunden ist. Der Personal-Computer **80** war eine SGI D<sub>2</sub> Workstation (Silicon Graphics, Mountain View, CA). Digitalisierte Bildaufnahmen wurden eingefangen mit der gekühlten CCD-Kamera **77** (Photometrics Inc., Tucson, AZ), die in einem invertierten Diaphot 300 Fluoreszenz-Mikroskop (Nikon Inc., Melville, NY) mit einem 20×-Objektiv **84** installiert worden ist.

**[0079]** Ein selektiver Fluoreszenzfilter **86** (Set B2A; Chroma Technologie Corp., Brattleboro, VT) wurde verwendet, um ein klares PE-Emissionsbild zu erfassen. Die erfassten Bildaufnahmen wurden dargestellt und prozessiert mit der auf dem Personal-Computer **80** laufenden isee<sup>TM</sup> Software (IONvision Corp., Durham, NC).

**[0080]** Die Software stellte eine komplette Automatisierung für das System bereit, einschließlich Folgewerkzeug-Bedienung, Z-Richtungsfokus, Koordination der Regionen von Interesse z. B. Ziele) und Lasersteuerung. Es waren 63 Bildbetrachtungsfelder für

jede Vertiefung der 384-Well Platte und die schrittweise Bewegung zwischen den Feldern wurde korrekt durch die Folgewerkzeug-Software routine innerhalb isee™ gesteuert. Jede Zielzelle **90** in dem Betrachtungsfeld wurde unter vorgegebenen Parametern wie Helligkeit, Größe und Form, identifiziert und ihre Standorte wurden koordiniert und durch eine Merkmal-Extraktionsfunktion in der isee™ Software markiert. Während der Prozedur verblieben die Zielzellen stationär auf der Fläche **92** ihrer Flaschen.

#### Laser-Ablation

**[0081]** Ein zertifizierter Klasse-IIb Stickstofflaser **94**, Gerätetyp VSL-337 (The Laser Science Inc., Newton, MA), ausgestattet mit einem Strahlteiler **96** und einer Coumarin 440 Farbstoff-Zelleneinheit **98** (Photonic Instruments, Arlington Heights, IL) wurde zum Abtöten der einzelnen Zellen verwendet. Der Strahlteiler **96** liess das Licht von Laser **94** passieren, aber reflektierte das blaue Licht, das von einer Quecksilberdampflampe **99** abgestrahlt wurde. Somit wurde Licht von der Quecksilberdampflampe **99** und Laser **94** entlang des selben Weges zu den Zielzellen **90** gesendet.

**[0082]** Das von der Quecksilberdampflampe abgestrahlte Licht hat einen Wellenlängenbereich zwischen 450 nm und 490 nm. Jedoch wurde, wie in [Fig. 2](#) dargestellt, das blaue Licht der Quecksilberdampflampe **99** durch ein D470/40-Exzitationsfilter **100** (Chroma Technology Corp., Brattleboro, VT) geführt, um die PE-Konjugate, die an dem CD34-Oberflächenantigen der KG1a-Zellen hängen, zu aktivieren. Entsprechend transportiert derselbe Weg auch das Anregungslicht und das Laserlicht.

**[0083]** Die Kombination von Laserlicht und Anregungslicht der Quecksilberdampflampe wurde dann in einen zweiten Strahlteiler **102** geleitet. Der Strahlteiler **102** lenkt das Licht von dem Laser **94** und der Quecksilberdampflampe **99** durch das Mikroskop-Objektiv **84** auf die Zielzelle **90**. Der Strahlteiler **102** leitet auch das Licht, das durch die markierte Zielzelle ausgestrahlt wird durch einen Filter **104** und in die CCD-Kamera **77**.

**[0084]** Es sollte beachtet werden, dass während einer normalen Prozedur das Laserlicht nur für kurze Zeitpunkte ausgesendet wird. Im Gegensatz dazu wird normalerweise das Licht der Quecksilberdampflampe konstant ausgestrahlt, so dass jede der markierten Zellen Licht reflektieren wird durch den Strahlteiler **102**, Filter **104** und in die CCD-Kamera **77**.

**[0085]** Ein Impulsgenerator **105** ist mit dem Laser **94** verbunden, um den kürzesten Ladungsimpuls des Laserlichtes bereitzustellen, der notwendig ist, um die Zielzelle **90** zu töten. Kürzere Impulslängen sind

eher wünschenswert, da hier eine geringere Chance besteht, dass umgebende Zellen durch lokale Erhitzung des Zellmediums geschädigt werden.

**[0086]** Digitale Bildaufnahmen von einem Feld der gefärbten Zielzellen wurden erfasst und ihre Standorte wurden durch das isee™-Softwaresystem koordiniert und markiert. Da die Quecksilberdampflampe **99** ein Breitbandlicht produziert, dass jede markierte Zelle in der Schale zur Fluoreszenz anregt, war das Computersystem in der Lage, ein gesamtes Bildfeld zu einem Zeitpunkt zu erfassen und zu prozessieren.

**[0087]** Während die Zellen durch kurze Lichtimpulse von dem Laser beschossen werden, stellte ein senkrecht beweglicher Z-Motor **110** einen Mechanismus zur spezifischen Fokussierung des Laserlichtes auf unterschiedliche Fokusebenen in der Schale bereit. Der Z-Motor **110** ist ein elektronisch gesteuerter Motor, angebaut an Objektiv **84**. Der Z-Motor ist so verbunden, dass das Objektiv **84** in der senkrechten Richtung auf und ab bewegt werden kann, um den Laser genau in die verschiedenen Fokusebenen zu fokussieren. Weiterhin kann der Z-Motor durch das Computersystem **80** gesteuert werden, um den Laserlichtimpuls von dem unteren Ende der Zielzelle **90** bis zum oberen Ende der Zielzelle zu fokussieren. Das Fokussieren des Laserimpulses mit dem Z-Motor gleicht die Variationen der Zellposition in der senkrechten Richtung aus, die durch unvollkommen ebene Flächen der Gewebekulturplatten verursacht wurden.

#### BESTIMMUNG DER ERFOLGREICHEN ZELLZERSTÖRUNG

**[0088]** Nachdem jede Zelle mit dem Laser gepulst wurde, analysierte der Computer das Spektrum bei dem PI-Emissionsmaximum von 617 nm. Falls die Zelle durch den Laser getötet wurde, würde ein Emissionspeak bei 617 nm an dem ursprünglichen Standort der Zelle gefunden werden. Wenn ein PI-Emissionspeak nicht gefunden wurde, würde der Laser einen weiteren Impuls von Lichtenergie auf den Zellstandort senden. Auf diese Weise wurde abgesichert, dass jede Tumorzelle in der Population getötet worden ist.

#### SCHLUSSFOLGERUNG

**[0089]** Diese Erfindung gestattet Ärzten ein effektives Behandeln von Patienten, die hematopoietische Zelltransplantationen benötigen, ohne das Risiko eines Rezidivs aufgrund der Rückführung von krebserregenden Zellen. Das hierin beschriebene zielgerichtete Verfahren stellt eine Methode für das komplette oder nahezu komplette Entfernen von kontaminierenden Tumorzellen aus einer hematopoietischen Stammzell- oder anderen Zellpopulation bereit.

**[0090]** Die Erfindung kann in anderen spezifischen Formen ausgeführt werden, ohne von ihrem Wesen oder den essentiellen Eigenschaften abzuweichen. Die beschriebenen Ausführungsformen werden in jeder Hinsicht nur als veranschaulichend und nicht als restriktiv angesehen. Der Bereich der Erfindung ist deshalb eher durch die angefügten Ansprüche als durch die vorangehenden Beschreibungen angezeigt. Alle Forderungen, die unter die Bedeutung und den Bereich der Äquivalenz der Ansprüche fallen, sind in ihrem Geltungsbereich einzuschließen.

### Patentansprüche

1. In-vitro-Verfahren zur Entfernung von Tumorzellen von innerhalb einer Zellpopulation, die Nicht-Tumorzellen einschließt, wobei das Verfahren diese Schritte umfasst:

- a) Markieren der Zellpopulation, so dass die Tumorzellen von den Nicht-Tumorzellen unterschieden werden können,
- b) Belichtung der Zellpopulation,
- c) Bildaufnahme der belichteten Zellen mit einer Kamera,
- d) Verwendung der Bildaufnahme um wenigstens die zweidimensionalen Koordinaten einer Tumorzelle in der belichteten Zellpopulation in Bezug auf die Bildaufnahme und die Markierung zu bestimmen und
- e) Tötung der Tumorzelle durch Anwendung eines Impulses von einer gesteuerten Energiequelle auf die vorher bestimmten Koordinaten der Tumorzelle, während sich die Tumorzelle in einer wesentlich ortsfesten Lage auf einer Oberfläche befindet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei Schritte d) und e) für jede Tumorzelle in der Population von Nicht-Tumorzellen wiederholt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Nicht-Tumorzellen eine Population von hematopoietischen Zellen sind.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Population von hematopoietischen Zellen eine Population von Zellen umfasst, die aus hematopoietischen Stammzellen angereichert worden ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die hematopoietische Stammzellenpopulation basierend auf der Formel des CD34-Oberflächenproteins angereichert wird.

6. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die hematopoietische Stammzellenpopulation basierend auf der Formel eines Zellmarkers angereichert wird, der aus der Gruppe, die aus Thy-1, CD38, CD15, CD11b, Gly-A, CD3 und CD19 besteht, ausgewählt ist.

7. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die angereicherte Zellpopulation durch Verwendung von Tief-

bett-Filtration oder Gegenstrom-Schlämmung erzeugt wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei Schritte d) und e) unter Steuerung eines Computers ausgeführt werden.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die gesteuerte Energiequelle ein Laser ist.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Wellenlänge des von dem Laser emittierten Lichts zwischen 375 Nanometern und 900 Nanometern liegt.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Markierung für die Tumorzellen spezifisch ist.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Tumorzellen in einer hematopoietischen Zellpopulation, isoliert von einem Patienten, durch Anwendung eines Hochenergie-Laserlichtimpulses markiert, örtlich festgelegt und getötet werden.

13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei der angewandte Schritt automatisch unter Hilfe eines Computers ausgeführt wird.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Markierung für die Nicht-Tumorzellen spezifisch ist.

15. In-vitro-Verfahren zur Anreicherung der Anzahl von Stammzellen in einer hematopoietischen Zellpopulation, wobei dieses Verfahren diese Schritte umfasst:

- a) Markieren der hematopoietischen Zellpopulation mit einer Stammzellen spezifischen Markierung,
- b) Belichten der hematopoietischen Zellpopulation,
- c) Bildaufnahme der belichteten hematopoietischen Zellen mit einer Kamera,
- d) Verwendung der Bildaufnahme, um wenigstens die zweidimensionalen Koordinaten jeder der unmarkierten Zellen in der hematopoietischen Zellpopulation durch Bestimmung ihrer Lage auf dem Bild zu berechnen und
- e) Anwendung eines Hochenergie-Laserlichtimpulses auf die berechneten Koordinaten von wenigstens einem der unmarkierten Zellen in der Population, während sich die Stammzelle in einer wesentlich ortsfesten Lage auf einer Oberfläche befindet.

16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei der Anwendungsschritt die Anwendung eines Hochenergie-Laserlichtimpulses auf in der Hauptsache alle unmarkierten Zellen in der Population umfasst.

17. Verfahren nach Anspruch 15 oder 16, wobei die stammzellenspezifische Markierung CD34 ist.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17, wobei die von dem Laser emittierte Lichtwellenlänge zwischen 375 Nanometern und 900 Nanometern liegt.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 18, wobei der Anwendungsschritt unter Steuerung eines Computers ausgeführt wird.

20. In-vitro-Verfahren zur Entfernung einer ersten Zellpopulation von einer zweiten Zellpopulation, wobei das Verfahren diese Schritte umfasst:

- a) Markieren der Zellpopulation, so dass die erste Zellpopulation von der zweiten Zellpopulation unterschieden werden kann,
- b) Belichten der Zellen,
- c) Bildaufnahme der belichteten Zellen mit einer Kamera,
- d) Verwendung der Bildaufnahme, um wenigstens die zweidimensionalen Koordinaten einer Zelle der ersten Zellpopulation in Bezug auf die Bildaufnahme und die Markierung zu bestimmen, und
- e) Anwendung einer tödlichen Energiedosis auf die bestimmten Koordinaten der Zelle, während sich die Zelle in einer wesentlich ortsfesten Lage auf einer Oberfläche befindet.

21. Verfahren nach Anspruch 20, das ferner diese Schritte umfasst:

- f) Bestimmen, ob die eine Zelle durch die tödliche Energiedosis getötet wurde und
- g) Anwendung einer zweiten tödlichen Dosis auf die Koordinaten der Zelle, wenn die Zelle nicht getötet worden ist.

22. Verfahren nach Anspruch 20 oder 21, wobei Schritt c) die Sichtbarmachung aufeinanderfolgender angrenzender Gebiete umfasst, um am Ende die gesamte Zellpopulation zu überblicken.

23. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 22, wobei die Markierung für die erste Zellpopulation spezifisch ist.

24. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 22, wobei die Markierung für die zweite Zellpopulation spezifisch ist.

25. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 24, wobei die tödliche Energiedosis von einer Laserquelle oder einer Breitband-Lichtquelle ist.

26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei der Laser Lichtwellenlängen im Bereich von 375 bis 900 Nanometern transmittiert.

27. Verfahren nach Anspruch 25, wobei der Laser ein zertifizierter Klasse IIIb Stickstofflaser **94** (Modell VSL-337) ist.

28. Verfahren nach einem der Ansprüche 25 bis 27, wobei bei Schritt e) der Laser in verschiedene Brennebenen auf den zweidimensionalen Koordinaten einer in Schritt d) bestimmten Zelle geschossen wird.

29. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Breitband-Lichtquelle eine Xenonlampe ist.

30. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Breitband-Lichtquelle eine Quecksilberlampe ist, die Licht transmittiert, das einen Wellenlängenbereich zwischen 450 und 490 nm hat.

31. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 30, wobei sich die Zellpopulation auf einer wesentlich flachen Oberfläche befindet.

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 31, wobei die Zellpopulation wesentlich konfluent auf einer Oberfläche ist.

33. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 32, wobei die Zellpopulation als eine solide Einzelschicht von Zellen auf einer Oberfläche vorliegt.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 33, wobei Schritte c) und d) für jede markierte oder unmarkierte Zelle von der ersten Population, die in dem Bild eingefangen ist, wiederholt werden.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 34, wobei das Tötungsverfahren wenigstens teilweise unter Steuerung eines Computers durchgeführt wird.

36. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 35, wobei die erste Zellpopulation Tumorzellen und die zweite Zellpopulation Nicht-Tumorzellen umfasst.

37. Verfahren nach Anspruch 36, wobei jede Tumorzelle in der Zellpopulation getötet ist.

38. Verfahren nach Anspruch 36 oder 37, wobei die Ziel-Zellpopulation im Stadium der Subkonfluenz ist.

39. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 38, wobei die zweite Zellpopulation hematopoietische Zellen umfasst.

40. Verfahren nach Anspruch 39, wobei die hematopoietische Zellpopulation mit hematopoietischen Stammzellen angereichert ist.

41. Verfahren nach Anspruch 40, wobei die angereicherte hematopoietische Population eine CD34-angereicherte Population ist.

42. Verfahren nach Anspruch 40, wobei der An-

reicherungsprozess hematopoietischer Stammzellen die Suche nach stammzellspezifischen Markern einschließt.

43. Verfahren nach einem der Ansprüche 39 bis 42, wobei die hematopoietischen Zellen durch Verwendung von Tiefbett-Filtration oder Gegenstrom-Schlämmung weiter angereichert werden.

44. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 35, wobei die erste Zellpopulation Nicht-Tumorzellen und die zweite Zellpopulation Tumorzellen umfasst.

45. Verfahren nach Anspruch 44, wobei jede Tumorzelle in der Zellpopulation getötet wird.

46. Verfahren nach Anspruch 44 oder 45, wobei die Ziel-Zellpopulation im Stadium der Subkonfluenz ist.

47. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 35, um Verunreinigungen in den Zellpopulationen zu entfernen, die von in vitro weiter gewachsenen Biopsien abgeleitet sind.

48. Verfahren nach Anspruch 47, wobei die Biopsie eine Knorpel-Biopsie ist und wobei die Biopsie eine in vitro gewachsene Knorpel-Biopsie ist.

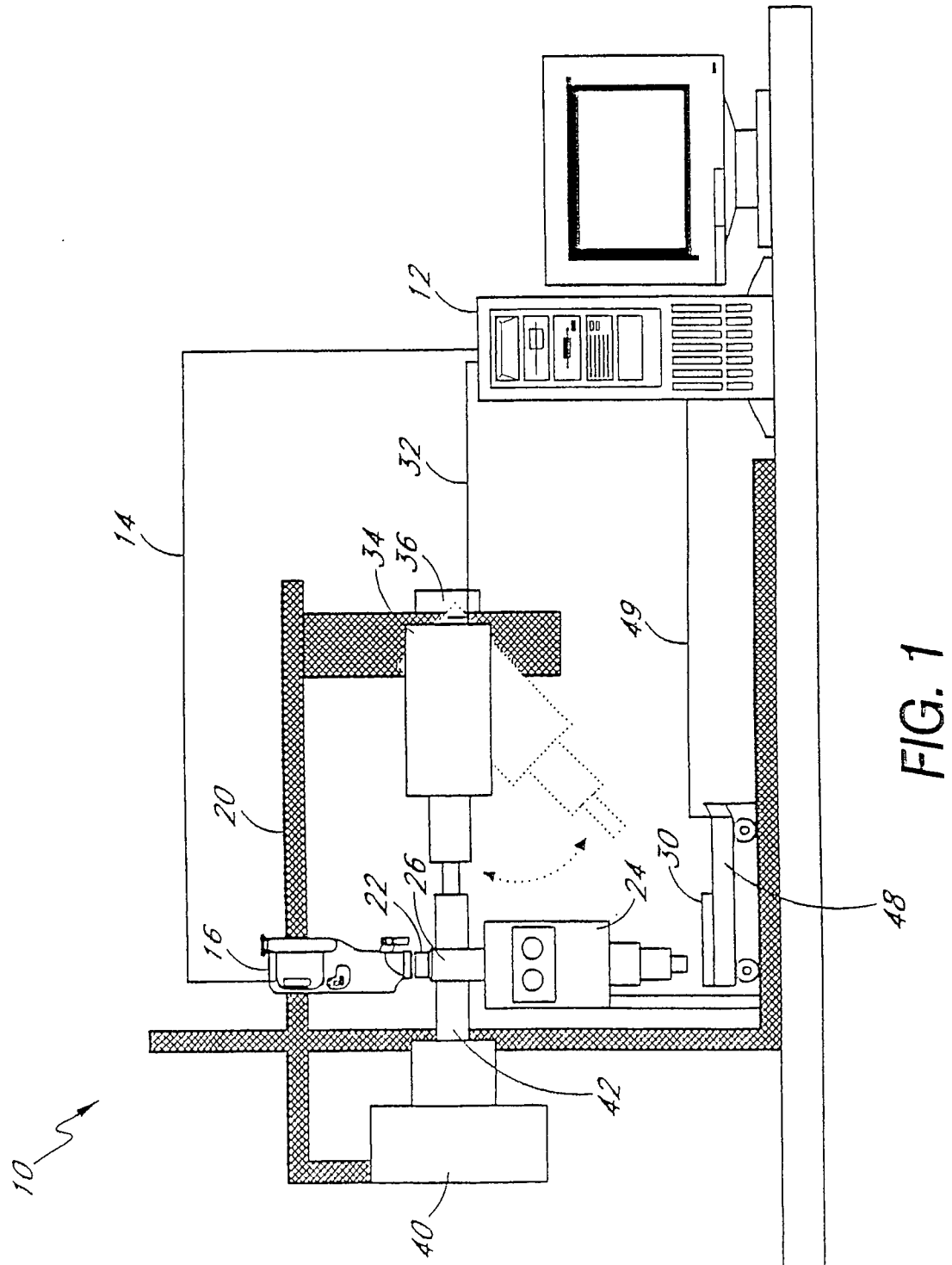
49. Verfahren nach Anspruch 47, wobei die Biopsie eine Krebs-Biopsie ist und wobei das Verfahren ein In-vitro-Verfahren ist, um Nicht-Tumorzellen wie beispielsweise Fibroblasten aus einer In-vitro-Krebszellenlinie zu entfernen.

50. Verfahren nach Anspruch 47, wobei die Biopsie ein allogenes menschliches Stammzellentransplantat ist und wobei das Verfahren ein In-vitro-Verfahren ist, um die Anzahl von T-Zellen in einem in vitro gewachsenen allogenen menschlichen Stammzellentransplantat zu steuern.

51. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 50, wobei Zellen der übriggebliebenen Zellpopulation lebensfähig sind.

52. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 51, wobei die gesamte in Schritt e) abgegebenen Lichtleistung zelluläre Komponenten irreversibel schädigt und somit ohne Zerstörung des Zellmembrans zum Zelltot führt.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen





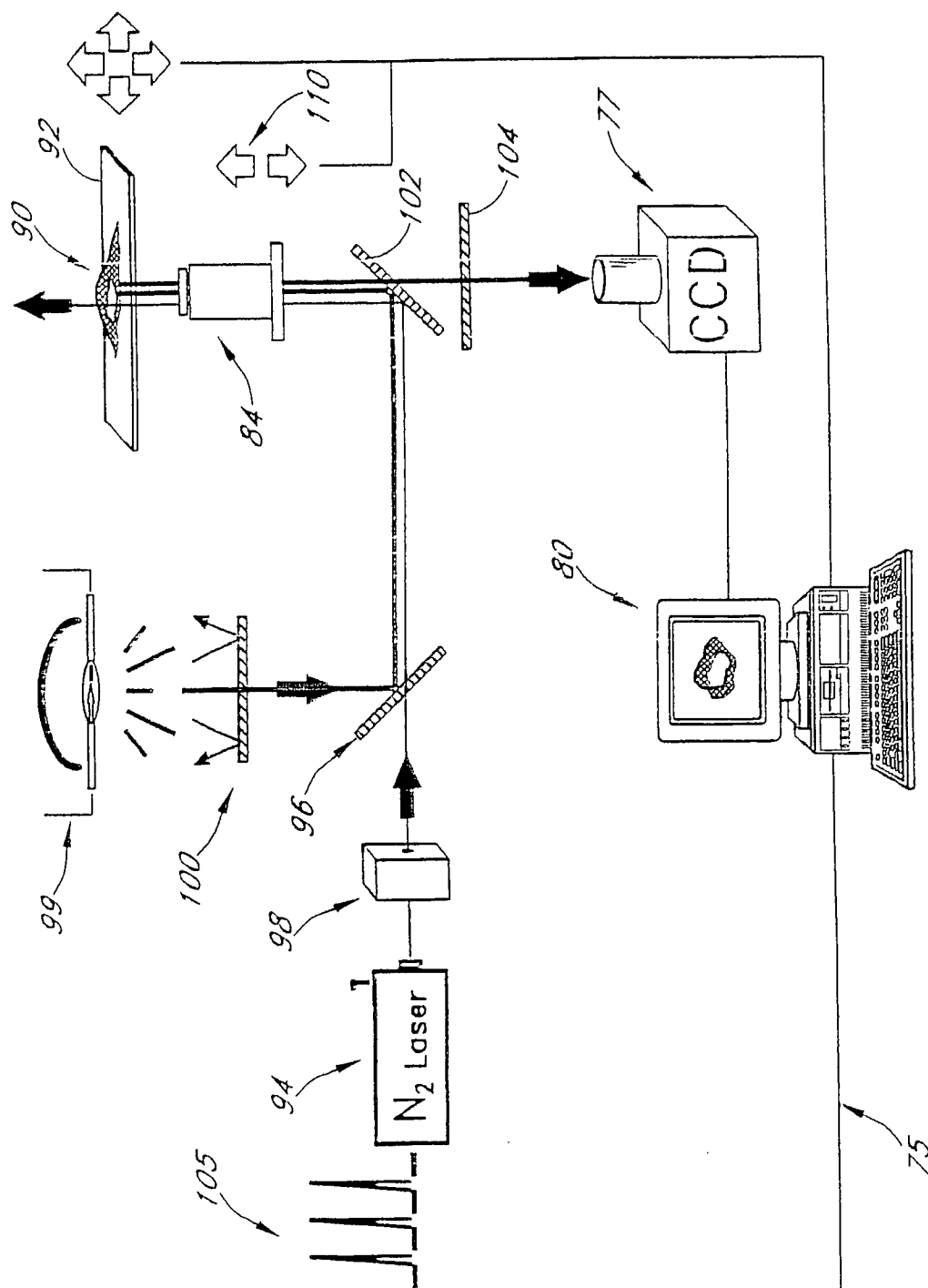


FIG. 2