



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 19 531 T2 2005.09.15**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 071 747 B1**

(51) Int Cl.7: **C12N 1/00**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 19 531.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/EP99/02347**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 920 605.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/054435**

(86) PCT-Anmeldetag: **07.04.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **28.10.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **31.01.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **18.08.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **15.09.2005**

(30) Unionspriorität:
98201247 17.04.1998 EP

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:
Société des Produits Nestlé S.A., Vevey, CH

(72) Erfinder:
BAUR, Markus, CH-1603 Aran, CH

(74) Vertreter:
Becker, Kurig, Straus, 80336 München

(54) Bezeichnung: **AUS NORMALEM MENSCHLICHEM HAUTGEWEBE IMMORTALIZIERTE ZELLINIEN**

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

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

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft neue, von normalen, menschlichen Hautgeweben abgeleitete, immortalisierte Zell-Linien, die verbesserte Differenzierungscharakteristiken aufweisen, ein neues Verfahren zur Herstellung dieser Linien und verschiedene Verwendungen, insbesondere im Bereich des Aufbaus einer künstlichen Haut.

Stand der Technik

[0002] Die Herstellung von immortalisierten Zell-Linien, die von menschlichen Hautgeweben abgeleitet wurden, ist bereits beschrieben worden. Im Allgemeinen basieren die zu diesem Zweck verwendeten Verfahren auf der Transformation menschlicher Hautzellen, beispielsweise von Keratinozyten und Melanozyten, die in vitro mit Mitteln gezüchtet wurden, welche die Eigenschaft der Immortalisierung verleihen. Die Immortalisierung betrifft die Herstellung von Zellen, die für längere, theoretisch für unbegrenzte Zeit, in vitro gezüchtet werden können. Diese Zellen werden auch als Dauer-Zell-Linien bezeichnet. Im Gegensatz dazu, sind die nicht-immortalisierten Zellen lediglich in der Lage eine bestimmte Anzahl von Zell-Teilungen in vitro durchzuführen. Die immortalisierten Zellen sind äußerst vorteilhaft, da sie eine stabile, potentiell nicht versiegende Quelle für Zellen mit definierten Eigenschaften liefern. Die klassischen Mittel zur Herstellung immortalisierter Zell-Linien und immortalisierter, menschlicher Haut-Zell-Linien umfassen insbesondere beispielsweise Viren, rekombinante Viren und Plasmide, die DNA-Sequenzen enthalten, welche die Eigenschaft der Immortalisierung verleihen.

[0003] Das gängigste Verfahren, um immortalisierte, menschliche Zell-Linien herzustellen, umfasst wahrscheinlich die Verwendung von Sequenzen des Simian Virus 40 (SV 40), und insbesondere der DNA des großen T-Antigens (T-Ag) von SV40, als Mittel zur Immortalisierung. So offenbaren beispielsweise Steinberg et al., *J. Cell Phys* 123, 117–125 (1985); US 4,885,238 (Reddel et al.); US 4,707,448 (Major); Stoner et al., *Cancer Res.*, 51, 365–371 (1991); Chopra et al., *In vitro Cell Dev. Biol.* 30A, 539–546 (1994); Chopra et al., *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 27A, 763–765 (1991); Christian et al., *Cancer Res.*, 47, 6066–6073 (1987); Rhim et al., *Science*, 227, 1250–1252 (1985); und Grubman et al., *Gastrointest. Liver Physiol.*, 29, G1060-G1070 (1994) die Verwendung von SV40 Vektoren sowie von Vektoren mit der Sequenz des großen T-Antigens von SV40 zur Herstellung immortalisierter, menschlicher Zell-Linien. Die Einführung derartiger Sequenzen wird im Allgemeinen erreicht, durch Infektion mit dem SV40 Virus oder einem Adenovirus-12/SV40 Hybridvirus oder durch Transfektion von Zellen mit einem rekombinanten Plasmid, welches das Long Terminal Repeat des Roux Sarkomvirus und die Early Region Ori-SV40 enthält, mit Hilfe

einer Copräßipitation in Gegenwart von Strontiumphosphat (siehe Brash et al., *Mol. Cell. Biol.*, 7, 2031–2034 (1987)).

[0004] Ein anderes bekanntes Verfahren zur Herstellung immortalisierter Zell-Linien, und insbesondere immortalisierter, menschlicher Keratinozyten, beinhaltet die Transfektion oder die Infektion von Zellen mit DNA-Sequenzen des humanen Papillomavirus (HPV). So beschreibt beispielsweise die US 5,376,542 (Schlegel) die Immortalisierung menschlicher Epithelzellen mit den E6- und E7-Genen, die aus HPV-16, 18, 31, 33 oder 35 isoliert wurden, oder mit dem E7-Gen alleine, um immortalisierte, nicht tumorigene Zell-Linien zu erzeugen. Darüber hinaus offenbaren Barbosa et al., *Oncogene*, 4, 1529–1532 (1989); und Münger et al., *J. Virol.* 63 (10), 4417–4421 (1989) die Verwendung der Gene E6 und E7 von HPV-16 und HPV-18 zur Herstellung von menschlichen immortalisierten Keratinozyten. Darüber hinaus beschreibt Dürst et al., *Oncogene*, 1, 251–256 (1987) die Immortalisierung von Keratinozyten mit dem Papillomavirus Typ 16.

[0005] Obwohl viele Gruppen immortalisierte Keratinozyten-Zell-Linien und deren Verwendung in in vitro Experimenten beschrieben haben, wiesen die immortalisierten Keratinozyten-Linien des Standes der Technik in der Regel eine oder mehrere Eigenschaften auf, die für deren Verwendung nachteilig war. So wiesen beispielsweise die im Stand der Technik beschriebenen, immortalisierten Keratinozyten eine oder mehrere der folgende Eigenschaften auf: (i) Verminderung oder Verlust der Expression von Differenzierungsmarkern, beispielsweise von Proteinen, die von normalen, differenzierten Keratinozyten exprimiert werden, (ii) veränderte Wachstumseigenschaften in der Gewebekultur, und (iii) Bildung eines schichtförmigen und polarisierten Epithels, das ein para-keratotisches Stratum corneum umfasst.

[0006] Zur Behebung dieser Nachteile, schlägt die EP 780469 (Societe des Produits Nestle) ein neues Verfahren zur Immortalisierung von menschlichen Melanozyten oder Keratinozyten vor, bei dem zusätzlich zu einem neuen Kulturmedium der auf dem SV40-Virus basierende Vektor pLXSHD+SV40 (#328) oder der auf dem menschlichen Papilloma-Virus 1.6 (HPV-16) basierende Vektor pLXSHD+E6/E7 verwendet wird. Die derart erhaltenen immortalisierten Zellen bewahren die Fähigkeit zur Differenzierung und zur Expression von Proteinen und Enzymen, die von normalen differenzierten Melanozyten oder Keratinozyten exprimiert werden, selbst nach einer erhöhten Anzahl von Kultur-Passagen.

[0007] Trotz der Offenbarungen des Stands der Technik besteht weiterhin ein hoher Bedarf in der Praxis danach über menschliche immortalisierte Keratinozyten zu verfügen, die noch weiter verbesserte

Eigenschaften aufweisen. Derartige Zellen wären äußerst vorteilhaft für zahlreiche Verwendungen, insbesondere für Analysen, die in hohem Maße differenzierte Hautzellen erfordern.

Zusammenfassung der Erfindung

[0008] Die vorliegende Erfindung betrifft hierfür jegliche menschliche immortalisierte Keratinozyten-Zell-Linie, die mittels funktioneller Tumorgene immortalisiert ist, die mindestens aus dem SV40 Virus und dem menschlichen Papillomavirus 16 bestehen bzw. stammen, dadurch gekennzeichnet, dass sie

- (1) nicht tumorigenisch bzw. nicht tumorigen ist,
- (2) nach einer erhöhten Anzahl an Gewebekultur-Passagen die Fähigkeit zur Differenzierung und zur Expression von Proteinen und Enzymen behält, die von differenzierten normalen Keratinozyten exprimiert werden,
- (3) ein schichtförmiges, polarisiertes Epithel ausbildet, welches ein orthokeratosisches bzw. orthokeratosisches Stratum corneum umfasst, wenn sie bzw. das in einer organotypischen Kultur in einem serumfreien Medium und ohne eine Nährzellschicht gezüchtet wird.

[0009] Die vorliegende Erfindung hat auch als Aufgabe eine neues Verfahren zur Herstellung von immortalisierten Keratinozyten-Linien bereitzustellen, die von normalen Hautgeweben abgeleitet sind.

[0010] Eine zusätzliche Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin Verfahren zur Verwendung dieser erfindungsgemäßen Keratinozyten-Linien bereitzustellen, beispielsweise für immunologische, pharmakologische, photo- und chemotoxische Analysen von Hautreaktionen und zur Expression von heterologen Genen.

Figurenbeschreibung

[0011] [Fig. 1](#) stellt das vom SV40 Virus abgeleitete Konstrukt dar, nämlich das Plasmid pLXSHD+SV40 (#328), das zur Immortalisierung der erfindungsgemäßen Keratinozyten verwendet wird.

[0012] [Fig. 2](#) stellt das vom Virus Papilloma-Virus 16 abgeleitete Konstrukt dar, nämlich das Plasmid pLXSHD+E6/E7, das zur Immortalisierung der erfindungsgemäßen Keratinozyten verwendet wird.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0013] Die vorliegende Erfindung stellt nicht-tumorigene, immortalisierte Keratinozyten-Linien bereit, das heißt, die keine Tumore bilden, wenn sie beispielsweise in einer Menge von mindestens 2×10^6 Zellen pro Injektion unter die Haut eines Tiers injiziert werden.

[0014] Diese Linien bewahren auch nach einer erhöhten Anzahl an Passagen die Fähigkeit zur Differenzierung und zur Expression von Differenzierungsproteinen, die von normalen Keratinozyten exprimiert werden. Der Begriff "erhöhte Anzahl an Passagen" bezeichnet mindestens 10 Kultur-Passagen, vorteilhafterweise mindestens 20 bis 30 Passagen, vorzugsweise mindestens 50 Passagen und theoretisch eine unendliche Zahl an Passagen. Beispielsweise exprimieren immortalisierte Keratinozyten, die erfindungsgemäß hergestellt werden können, auch nach einer erhöhten Anzahl an Gewebekultur-Passagen Differenzierungsproteine, die aus Keratin K1/10, Keratin K14, Involucrin, Filaggrin und Loricrin bestehen.

[0015] Die erfindungsgemäßen immortalisierten Keratinozyten weisen ein Cytochrom p450 (CYP450) – Profil auf, das gleichartig, wenn nicht identisch zu dem von normalen Keratinozyten ist. Beispielsweise exprimieren erfindungsgemäße Zellen CYP450 1A1, 2E1, 2C18, und 3A5. Darüber hinaus exprimieren die erfindungsgemäßen immortalisierten Keratinozyten Phase II – Enzyme, beispielsweise die Glutathion-S-Transferase π (GST π), in einer Weise, die mit der von normalen, nicht-immortalisierten Keratinozyten vergleichbar ist.

[0016] Darüber hinaus exprimieren die erfindungsgemäßen immortalisierten Keratinozyten, nach einer Behandlung mit Phorbolestern Proteine und Enzyme, die eine Rolle bei der zellulären Oxidation und bei inflammatorischen Antworten spielen, beispielsweise die Superoxid-Dismutase (SOD) und die Typ I Kollagenase und den Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), in einer Weise, die mit der von normalen, differenzierten Keratinozyten gleichartig oder identisch ist. Ausgehend von diesen Charakteristika weisen diese Zelllinien eine äußerst interessante, reproduzierbare Quelle für immunologische, pharmakologische, Entzündungs-, photo- und chemotoxische Studien von Hautreaktionen auf.

[0017] Darüber hinaus bilden die erfindungsgemäßen immortalisierten Keratinozyten-Linien, wenn sie in einer organotypischen Kultur in einem Serum-freien Medium [beispielsweise das NR2 Medium von Biofluids Inc., USA, das mit EGF (5 ng/ml), Vitamin C (38 μ g/ml) und CaCl₂ (1,5 mM) angereichert ist] und ohne Schicht von Nährzellen (ohne Fibroblasten) gezüchtet werden, ein schichtförmiges und polarisiertes Epithel, das keratinisierte Oberflächenschichten aufweist, was im Allgemeinen als Stratum corneum bezeichnet wird, das eine orthokeratotische Morphologie aufweist, was bedeutet, dass dieses Stratum corneum ohne Kernzellen, das heißt Zellen, die ihren Kern enthalten, vorliegt.

[0018] Die Gewinnung eines schichtförmigen und polarisierten Epithels mit immortalisierten Keratinozyten ist zuvor lediglich unter klassischen Kulturbe-

dingungen, d.h. über ein Verfahren, das ein Kälber-serumhaltiges Medium und eine Schicht mit Nährzellen verwendet (Lechner et al., *Virology*, 185, 536–571 (1991), erreicht worden. Indessen bildeten die immortalisierten Linien damals keine normalen keratinisierten Oberflächenschichten. Beispielsweise ist von Zell-Linien, die mit dem Papillomavirus 16 oder 18 oder E6/E7 immortalisiert wurden, bekannt, dass sie sehr schlecht organisierte Epithel bilden (Blanton et al., *Am. J. Pathol.*, 138, 673–685, 1991; Hudson et al., *J Virol.*, 64, 519–526, 1990; McCane et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85, 7169–7173, 1988; Woodworth et al., *Oncogene*, 7, 619–626, 1992).

[0019] Die in der EP 780469 (Societe des Produits Nestle) beschriebenen Linien bildeten hingegen beim Züchten in einer organotypischen Kultur in einem serumfreien Medium und ohne Schicht von Nährzellen ein schichtförmiges und polarisiertes Epithel mit normalen keratinisierten Oberflächenschichten, das jedoch eine para-keratotische Morphologie aufweist, was bedeutet, dass das Stratum corneum noch Zellen mit deren Kern enthält.

[0020] Die erfindungsgemäßen immortalisierten Keratinozyten absorbieren ebenso exogene, essentielle Fettsäuren (AGE, *acides gras essentiels*) und weisen eine Ungesättigtheit bzw. Desaturierung und eine Ketten-Ausdehnung bzw. -Verlängerung der AGE auf, die in perfekter Weise mit denjenigen von normalen Keratinozyten übereinstimmen.

[0021] Im Allgemeinen können die erfindungsgemäßen immortalisierten Keratinozyten durch das folgende Verfahren erhalten werden:

- (i) Zubereiten einer aus menschlicher Haut gewonnenen Probe, um für die Kultur geeignete primäre Keratinozyten zu erhalten;
- (ii) Kultur dieser primären Keratinozyten in einem serumfreien Medium, vorzugsweise in dem Medium NR-3 (in der EP 780469 beschrieben) auf Kulturplatten, die eine die Fixierung und das Wachstum der Zellen fördernde Beschichtung aufweisen, wobei die Beschichtung Fibronectin, BSA bzw. SAB und Typ 1-Kollagen umfasst;
- (iii) Austauschen des serumfreien Mediums, so dass ein optimales konfluentes Keratinozyten-Wachstum auf Kulturplatten erreicht wird, wobei die Beschichtung auf den Kulturplatten weiter aufrechterhalten wird;
- (iv) Trennen von Keratinozyten in Kultur von Melanozyten und Überführen der abgetrennten Keratinozyten in ein Infektionsmedium, vorzugsweise in das Medium NR-3 und vorzugsweise nach einer Behandlung der Zellen mit einer Trypsin und EDTA enthaltenden Zusammensetzung unter Verwendung von Kulturplatten, die in gleichartiger Weise beschichtet sind;
- (v) Infizieren von Zellen mit funktionellen Tumorigenen von mindestens zwei verschiedenen Viren,

wie dem SV40 Virus und dem menschlichen Papilloma-Virus 16;

(vi) Überführen von immortalisierten Keratinozyten in ein serumfreies Proliferations-Medium, auf zuvor in gleichartiger Weise beschichtete Kulturplatten, vorzugsweise das Medium NR-2 oder NR-3 (Medien, die in der EP 780469 beschrieben sind, deren Zusammensetzung unter Bezugnahme in die vorliegenden Beschreibung eingegliedert wird); und

(vii) Überführen von immortalisierten Keratinozyten nach erfolgter Proliferation in ein geeignetes Differenzierungs-Medium mit hohem Calciumgehalt (1,5 mM), vorzugsweise in das Medium NR-2, das mit EGF (5 ng/ml) und Vitamin C (38 µg/ml) angereichert ist.

[0022] Genauer gesagt umfasst ein Schritt, der vor Schritt (i) stattfindet, gewöhnlich die Gewinnung von menschlichen Hautgewebeproben von normalen, menschlichen Spendern, beispielsweise von Proben, die während eines chirurgischen Eingriffs oder eines Eingriffs in der Kinderheilkunde gewonnen werden. Die Immortalisierung einer einzigen Probe von Hautzellen, d.h. einer autologen Probe von Hautzellen, erlaubt die Herstellung von immortalisierten Linien von Keratinozyten, die definierte Merkmale aufweisen, beispielsweise ein bestimmtes Rezeptorprofil, das für einen bestimmten Spender charakteristisch ist.

[0023] Die Hautgewebeprobe wird anschließend im Schritt (i) derart verarbeitet, dass sie für die in vitro Kultur geeignet ist. Diese Verarbeitung wird vorzugsweise derart durchgeführt, dass die Hautgewebeprobe zunächst gewaschen wird, beispielsweise unter Verwendung des Mediums, das für die Kultur verwendet wird. Vorzugsweise wird dieser Vorgang im NR-2 Medium durchgeführt, das ein serumfreies Medium darstellt und dessen genaue Zusammensetzung in der EP 780469 beschrieben wird, das sich als vorteilhaft für die Kultur von normalen Keratinozyten erwiesen hat. Nach dem Waschen wird die Hautgewebeprobe vorzugsweise rasiert, beispielsweise mit Hilfe eines Dermatoms, und anschließend in kleine Stücke geschnitten.

[0024] Die sich daraus ergebenden Hautschnitte werden anschließend vorzugsweise zu Dermis und Epidermis getrennt. Dies kann mit einem körperlichen Mittel und/oder einem enzymatischen Mittel erreicht werden. Beispielsweise kann dies über eine Trypsinbehandlung erreicht werden, beispielsweise indem man die Hautgewebeproben in eine Trypsinlösung (beispielsweise von etwa 0,5%), die EDTA enthält (beispielsweise etwa 0,1%), für eine Zeit taucht, die ausreicht, um die Abtrennung der Zellen zu bewirken, beispielsweise für eine Zeit von etwa 30 bis 60 Minuten bei einer Temperatur von 37°C oder aber während einer Nacht bei 4°C.

[0025] Die Dermis wird abgetrennt und die Epidermis wird anschließend in ein Suspensionsbewirkungsmedium gelegt. Vorzugsweise enthält das Suspensionsbewirkungsmedium eine Lösung mit einem Sojatrypsinnhibitor (SBTI, inhibiteur de trypsine de soja) und wird mit den Zellen für eine ausreichende Zeit in Kontakt gebracht, üblicherweise für etwa 5 Minuten, um das Trypsin zu inaktivieren und die Freisetzung bzw. Lösung der Zellen zu bewirken. Ein Gewebekulturmedium, vorzugsweise das (in der EP 780469 beschriebene) serumfreie NR-2 Medium und ein Filter (beispielsweise ein Filter von 100 mm) werden anschließend hinzugefügt, um die gewünschten Zellen, das heißt die Keratinozyten, zu gewinnen.

[0026] Die sich daraus ergebenden primären Keratinozyten, die im Schritt (i) gewonnen wurden, werden anschließend zum Aussäen in einem serumfreien Medium verwendet, vorzugsweise das (in der EP 780469 beschriebene) NR-3 Medium, und zwar in einer geeigneten Zelldichte, vorzugsweise etwa $1,2 \times 10^4$ Zellen/cm², auf zuvor beschichteten Kulturplatten. Allerdings ist es möglich, diese Zellkonzentration in einer großen Bandbreite zu variieren. Die Kulturplatten werden vorzugsweise mit einer aufrechterhaltenen Beschichtung, deren Zusammensetzung die Fixierung und das Wachstum von Keratinozyten überraschenderweise gesteigert hat, genauer einer Lösung von Fibronectin, BSA und Typ I Kollagen versehen.

[0027] Im Schritt (iii) wird das Kulturmedium so oft wie nötig ersetzt, um ein optimales Zellwachstum zu erreichen. Vorzugsweise wird das Medium etwa alle zwei Tage ersetzt. Allerdings kann dies in Abhängigkeit von der bestimmten Hautgewebeprobe variieren. Nachdem eine praktisch vollständige Konfluenz erreicht worden ist, beispielsweise etwa 90% Konfluenz, was gewöhnlich nach einer Zeit von etwa 10 bis 14 Tagen passiert, werden die Keratinozyten und Melanozyten getrennt. Dies kann durch ein beliebiges Mittel erreicht werden, das eine angemessene Abtrennung der Zellen ohne eine ungünstige Wirkung auf die Melanozyten und Keratinozyten ermöglicht. Dies kann beispielsweise über eine Differential-Behandlung mit Trypsin durchgeführt werden. Vorzugsweise werden die Melanozyten oder Keratinozyten mit einer Trypsin/EDTA-Lösung behandelt, und anschließend in das Selektionsmedium überführt. Im Falle der Keratinozyten werden die Zellen vorzugsweise während einer Zeit von etwa 5 bis 10 Minuten mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,025%/0,01%) behandelt und werden anschließend im Schritt (iv) verwendet, um dann in das NR-3 Medium auf zuvor beschichtete Platten ausgesät zu werden.

[0028] Die Keratinozyten werden anschließend mit dem Immortalisierungsmittel behandelt. Die Zellen können bis zur Durchführung der Immortalisierung auch eingefroren werden, beispielsweise in flüssi-

gem Stickstoff. Die Infektion und die Immortalisierung werden vorzugsweise durchgeführt, indem funktionelle Tumorgene von mindestens zwei verschiedenen Viren, wie das T-Ag vom SV40 Virus und das E6/E7 von HPV 16, verwendet werden. Diese Gene können jeweils in einem unabhängigen retroviralen Konstrukt mitgeführt werden, beispielsweise durch den retroviralen Vektor pLXSHD+SV40 (#328), der in der [Fig. 1](#) dargestellt ist und der von Stockshlaeder et al. beschrieben wurde (GeneBank, Zugangs-Nr. M64753; Human Gen. Therapy, 2, 33–39, 1991) und durch den retroviralen Vektor pLXSHD+E6/E7, der in [Fig. 2](#) dargestellt ist.

[0029] Der retrovirale Vektor pLXSHD+SV40 (#328) enthält unter anderen Sequenzen die Sequenz T-Ag von SV40, die Sequenzen der 5' und 3' langen terminalen Wiederholungen von SV40, die Sequenzen von pBR322, welche die Replikation von E. coli ermöglichen, einen mehrfachen Klonierungszyklus, eine Polyadenylierungssequenz von SV40.

[0030] Der Vektor pLXSHD+E6/E7 enthält statt des für das T-Antigen kodierenden Gens das Fragment NcoI/CfoI des E6/E7-Gens, das vom Human-Papillomavirus 16 stammt.

[0031] Nach der Immortalisierung werden die Zellen anschließend der während der Kultur nötigen Zahl von Passagen unterzogen und die sich daraus ergebenden immortalisierten Zellen werden anschließend in ein Proliferationsmedium im Schritt (vi) überführt. Diese Überführung wird vorzugsweise bei der zweiten Passage durchgeführt. Das Proliferationsmedium kann ein serumfreies Medium und vorzugsweise das Medium NR-2 oder NR-3 sein. Die immortalisierten Zellen werden so auf Kulturplatten gezüchtet, die zuvor in aufrechterhaltener bzw. ununterbrochener Weise beschichtet worden sind, wobei die Beschichtung erneut eine Lösung von Fibronectin, BSA und Typ I Kollagen umfasst.

[0032] Nach Vermehrung der immortalisierten Zellen im Proliferationsmedium (vorzugsweise NR-2) werden die Keratinozyten im Schritt (vii) in eine Umgebung überführt, welche die Differenzierung von normalen und immortalisierten Keratinozyten hervorruft, vorzugsweise in eine Umgebung, welche die in der Haut angetroffenen Bedingungen simuliert, wobei derart die Organisation der Keratinozyten zu einem schichtförmigen und polarisierten Epithel hervorgerufen wird, das normale, keratinisierte Oberflächenschichten aufweist. Hierfür kann man die Zellen in einem serumfreien Medium mit einem hohen Gehalt an Kalzium züchten, wie in dem Medium NR-2, das etwa 1,5 mM Kalzium, etwa 5 ng/ml EGF und etwa 38 µg/ml Vitamin C umfasst, wobei die Kultur auf den Platten während zwei bis drei Wochen an der Phasengrenzfläche Gas-Flüssigkeit durchgeführt wird, beispielsweise auf Platten mit 12 Vertiefungen

Falcon Nr. 3043, wobei jede Vertiefung einen Einsatz Falcon Nr. 3180 aufweist, in dem sich die Keratinozyten an der Phasengrenzfläche Gas-Flüssigkeit entwickeln. Das Gas besteht aus der Atmosphäre, die in dem Innenraum des Einsatzes enthalten ist, wenn dieser frei von Nährmedium ist. Die Flüssigkeit ist das Nährmedium, das in der Vertiefung enthalten ist, wobei dieses Medium durch die Membran des Einsatzes durchgeht, auf der sich die Keratinozyten entwickeln.

[0033] Hinsichtlich der Eigenschaften der erfindungsgemäßen immortalisierten Keratinozyten sind diese in perfekter Weise für immunologische, pharmakologische, photo- und chemotoxische Studien von Hautreaktionen geeignet. Beispielsweise können die erfindungsgemäßen immortalisierten Keratinozyten-Linien für Analysen verwendet werden, welche differenzierte Hautzellen erfordern, beispielsweise bei Studien zur Barrierenfunktion (Keratinisation) eines rekonstruierten Hautgewebes, bei Metabolismusstudien von differenzierten Keratinozyten (Fettsäuremetabolismus, Antioxidansmetabolismus), bei Studien hinsichtlich der Wirkungen von Ultraviolett-Bestrahlung auf Hautzellen, bei Studien hinsichtlich der Wirkungen potentieller Haut-Reizstoffe und -Sensibilisatoren auf Hautzellen, bei Studien zum Lipid-Metabolismus, bei einer topischen Behandlung und/oder bei einer Behandlung durch ein Medium mit xenobiotischen Mitteln (beispielsweise kosmetischen Ölen, beim Auswählen möglicher schützender Verbindungen, beispielsweise von Photo-Schutzstoffen), bei Studien zur Entzündung und zur Hautreizung, usw.

[0034] Darüber hinaus sind die erfindungsgemäß hergestellten Keratinozyten-Linien nützlich um potentielle Anti-Krebs-Verbindungen und potentielle Verbindungen zur Behandlung von Hauterkrankungen auszuwählen. Dies umfasst gewöhnlich das in Kontakt bringen der Zell-Linie mit derartigen Verbindungen während einer gegebenen Zeitspanne und die Bestimmung der möglichen Induktion von irgendwelchen schädlichen Auswirkungen, beispielsweise Genotoxizität, Bildung eines DNA-Addukts, Mutagenität, Zelltransformation oder Zytotoxizität.

[0035] Außerdem haben die immortalisierten Keratinozyten-Linien der vorliegenden Erfindung eine Nützlichkeit bei Untersuchungen zur DNA-Mutagenese, Tests zur Selektion von Hautmutagenen Mitteln, Tests zur Identifikation von Mitteln, die Chromosomen verändern, Untersuchungen zur malignen Transformation, Studien der zellulären Biochemie (beispielsweise Tests der Aktivierung von CYP450), der Selektion von Verbindungen und Zusammensetzungen, beispielsweise von Cocktails von essentiellen Fettsäuren, die an allergischen Reaktionen und an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, Tests zur Aktivierung der Kollagenase (im Zusammenhang mit der Entzündung), an der TNF α beteiligt ist, und bei

der Detektion von Interleukin.

[0036] In Anbetracht der Tatsache, dass die erfindungsgemäßen Linien ein orthokeratotisches Stratum corneum bilden, sind diese insbesondere dafür ausgelegt, bei der Herstellung einer künstlichen Haut mitzuwirken, die für die vorstehend erwähnten Studien zur Mutagenität, immunologische, pharmakologische, photo- und chemo-toxische Studien ausgelegt ist. Diese Haut kann einzig durch ein Epithel aus erfindungsgemäßen Keratinozyten gebildet werden, vorzugsweise umfasst sie jedoch auch Kollagen, Fibroblasten, sogar Melanozyten, so dass sie sich besser an die Struktur von beispielsweise normaler menschlicher Haut annähert.

[0037] Darüber hinaus sind erfindungsgemäßen Keratinozyten-Linien zur Expression von rekombinanten Proteinen, beispielsweise von menschlichen Proteinen und Polypeptiden, ebenso wie zur Herstellung von RNA und DNA geeignet.

[0038] Unter den erfindungsgemäß hergestellten, immortalisierten Keratinozyten-Linien wurde lediglich die Linie DK7-NR als Beispiel am 19. März 1998 bei der Collection Nationale de Culture de Microorganismes (C.N.C.M.) unter der Adresse 25 rue de Docteur Roux, 75724 Paris, Frankreich gemäß dem Budapest Abkommen hinterlegt, wobei sie die Hinterlegungs-Nr. CNCM I-1996 erhalten hat. Diese Hinterlegung erfolgte gemäß dem Budapest Abkommen. Alle Einschränkungen hinsichtlich der Verfügbarkeit dieser Zell-Linie werden unwiderruflich aufgehoben werden, sobald das Patent bezüglich der vorliegenden Anmeldung oder einer anderen Anmeldung erteilt wird, die das Prioritätsrecht dieser Anmeldung beansprucht.

[0039] Andere erfindungsgemäße Kennzeichen werden im Laufe der folgenden Beschreibungen von Ausführungsbeispielen erscheinen, die zum Zwecke der Veranschaulichung der vorliegenden Erfindung gegeben werden und die nicht einschränkend sind. Die Handhabung der Zellen, die Herstellung der Vektoren, die Transformation der Zellen und alle anderen technischen Vorgehensweisen werden in Abwesenheit gegenteiliger Anweisungen gemäß den Protokollen durchgeführt, die in der Veröffentlichung von Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989) beschrieben sind.

Beispiel 1 Herstellung und Charakterisierungen von Linien

[0040] Brust-Hautproben werden entnommen. Nach der Trennung des dermalen Kompartiments und des epidermalen Kompartiments, wird die Dermis in kleine Fragmente von 0,2 x 0,2 mm geschnitten und auf einer Kulturplatte von 6 cm mit Serum fi-

xiert. Dulbeccos minimales essentielles Medium (DMEM, 10% fetales Kälberserum) wurde nach 2 bis 4 Stunden hinzugegeben. Diese Explant-Kultur wurde anschließend inkubiert, bis ein übermäßiges Wachstum von Fibroblasten beobachtet werden konnte. Die konfluenten Fibroblast-Kulturen wurden geteilt und vermehrt, um eingefrorene Reservekulturen zu erhalten.

[0041] Die primären Zellen werden auf Kultur-Gefäßen ausgesät, die in aufrechterhaltener Weise mit einer "Cocktail"-Beschichtung beschichtet sind, die im Stand der Technik für Bronchialzellen beschrieben worden ist (Lechner et al., J. Tiss. Cult. Meth. 9, 43-49 (1985)). Nach Erreichen einer praktisch vollständigen Konfluenz, beispielsweise einer Konfluenz von 90%, was üblicherweise nach einer Zeitspanne von etwa 10 bis 14 Tagen erfolgt, werden die Keratinozyten und die Melanozyten getrennt. Hierfür wird die Kultur mit einer Lösung aus Trypsin/EDTA (0,025%/0,01%) während 5 Minuten behandelt, wobei anschließend die Melanozyten, die sich als erste von den Keratinozyten getrennt haben, gesammelt werden. Die primären Keratinozyten werden dann in gewünschter Zell-Zahl in einem serumfreien Medium NR-3 mittels beschriebener, beschichteter Kulturgefäße gezüchtet (das NR-3 Medium begünstigt das Wachstum von Keratinozyten im Vergleich zu Melanozyten).

[0042] Anschließend werden die Kapsidbildungszellen (cellules d'encapsulation) "packaging cell live 3T3-fibroblasts" mit den Plasmiden pLXSHD+SV40 (#328) und pLXSHD+E6/E7 gemäß dem Protokoll von Pfeiffer et al. (Meth. Cell Sci., 17, 83-89, 1995) transfiziert, abgesehen davon, dass das Virus nach der Kapsidbildung in einer im DMEM-Medium mit 10% foetalem bovinem Serum wachsenden Zell-Linie gewonnen wurde. Anschließend werden die Keratinozyten mit den Viren infiziert, derart dass eine Immortalisierung hervorgerufen wird. Während der Infizierung wird das serumfreie PC-1 Medium ebenso verwendet, das in der Veröffentlichung von Pfeiffer et al. verwendet wird.

[0043] Nach einer Immortalisierung werden die immortalisierten Keratinozyten in das Proliferationsmedium NR-2 oder NR-3 überführt, wobei zuvor beschichtete Kultur-Gefäße verwendet werden. Nach einer Proliferation von Zellen bis zu der erwünschten Zellzahl werden die Zellen in ein für die Kultur von normalen und immortalisierten Keratinozyten geeignetes Differenzierungsmedium überführt (NR-2).

[0044] Es konnte gezeigt werden, dass die immortalisierten Keratinozyten ein verbessertes Zellwachstum bei einer erhöhten Passagenzahl aufweisen, das mit den für die Zell-Linien der EP 780469 Beschriebenen gleichartig ist.

[0045] Die Expression von CYP450 1A1, 1A2, 3A5, 2E1, 2B6, 2A6 und 2D6 wird in Hautzellen analysiert, die aus normalen und immortalisierten Keratinozyten bestehen, durch einen Print-Transfer durch eine DNA-Polymerase-Kettenreaktion bei Umgebungstemperatur (Expression von mRNA bzw. ARNm). Das in immortalisierten Keratinozyten exprimierte CYP 450 Profil ist in besonderer Weise gleichartig, sogar identisch mit dem von normalen Keratinozyten.

[0046] Die Zell-Linien sprechen auf den CYP450-Induktor, der aus Benz(a)pyren besteht, wie die nicht-immortalisierten Zellen selbst bei erhöhten Passagen-Zahlen an.

[0047] Die Differenzierungsmarker werden mittels spezifischer Antikörper gegen T-Ag, Involucrin, Filaggrin, Loricrin, Vimentin und die Keratine K4, K7, K8, K10/1, K13, K14, K17, K18, und K19 analysiert. Die stärkste Differenzierungsfähigkeit konnte für die Linie DK7-NR gezeigt werden.

[0048] Die Glutathion-S-Transferase (GST) wird mittels Western-Blot und Northern-Blot analysiert. Alle Keratinozyten-Linien exprimieren in starkem Maße Messenger-RNA für GST π . Das Expositionsprofil von GST α , GST μ und GST π ist bei den Zell-Linien gleichartig wie das von normalen Keratinozyten.

[0049] Zur Analyse und zum Vergleich der Desaturierung und der Ausdehnung von essentiellen Fettsäuren bzw. AGE, die zu Keratinozyten hinzugegeben werden, werden immortalisierte Keratinozyten (und normale Keratinozyten mit Linolsäure (LA, acide linoléique, 15 μ m) und α -Linolensäure (LN, acide α -linoléique, 15 μ m) behandelt. Für diese Experimente wird das NR-2 Medium (Biofluids Inc.), das frei von AEG ist, verwendet. Die Zellkulturen werden nach Erreichen der Konfluenz behandelt und von dem Medium in ein NR-2 Medium mit einem hohen Gehalt an Kalzium (1,5 mM) überführt. Die Zellen werden während 4 Tagen mit den essentiellen Fettsäuren bzw. AGE (nach 2 Tagen erneuert) behandelt. Die Analyse der essentiellen Fettsäuren bzw. AGE erfolgt durch Extraktion und Auftrennung der Phospholipide durch CCM (chromatographie sur couche mince, Dünnschichtchromatographie) und durch Quantifizierung von Fettsäuremethylestern durch CGL (chromatographie gaz-liquide, Gas-Flüssigkeitschromatographie). Die Bildung der Ungesättigtheit und die Verlängerungsprodukte von LA (20:4n-6 und 22:4n-6) und von LN (20:5n-3, 22:5n-3 und 22:6n-3) konnten aufgezeigt werden. Dieses metabolische Profil ist in Übereinstimmung mit dem, das bei normalen Keratinozyten beobachtet worden ist.

[0050] Alle Zell-Linien waren hypo-diploid, wobei die meisten der Chromosomen-Zählungen in dem Intervall der diploiden Zellen waren. Andere Zellen als die analysierten Zell-Linien wurden in den Kultu-

ren nicht erfasst. Dieses Ergebnis bestätigt die Reinheit der Zell-Linien und die Abwesenheit einer Zell-Kontamination aus anderen Quellen.

[0051] Die Tumorigenität von immortalisierten Keratinozyten wird durch eine subkutane Injektion (1–2 Mio. an Keratinozyten) in nackten Mäusen bestimmt. Die untersuchten Keratinozyten-Linien, und insbesondere die Linie DK7-NR, sind bei nackten Mäusen nicht tumorigen.

Beispiel 2 Aufbau eines Epithels

[0052] Das NR-2 Medium, das 750.000 Zellen einer Zell-Linie gemäß Beispiel 1 enthält, wird bereitet, wobei 0,5 ml dieses Mediums in Einsätze Falcon Nr. 3180 gegeben werden und diese in den Vertiefungen der Platten Falcon Nr. 3043 angeordnet werden, die schon 2 ml an frischem NR-2 Medium enthielten, und die Keratinozyten werden während zwei Tagen unter das Wachstum von Keratinozyten begünstigenden Bedingungen gezüchtet. Am dritten Tag wird das in dem Einsatz enthaltene Medium entnommen und die Zellen werden an der freien Luft gelassen. Das Medium wird in den Vertiefungen alle zwei Tage periodisch mit NR-2 Medium gewechselt, das mit EGF (5 ng/ml), Vitamin C (38 µg/ml) und CaCl₂ (1,5 mM) angereichert ist. Nach 2–3 Wochen Kultur an der Grenzfläche Gas-Flüssigkeit, wird das derart gebildete Epithel gesammelt, in Pikrinsäure fixiert und seine Morphologie analysiert.

[0053] Die Ergebnisse zeigen, dass die Keratinozyten-Zell-Linien, insbesondere die Linie DK7-NR, ein schichtförmiges und polarisiertes Epithel bilden, das keratinisierte Oberflächenschichten aufweist (Stratum corneum). Die Basalschicht des schichtförmigen und polarisierten Epithels, die im Allgemeinen Stratum basale genannt wird, enthält Zellen mit annähernd würfelförmiger Morphologie, die zu der von normalen Zellen identisch ist. Das Stratum corneum weist eine orthokeratotische Morphologie auf, was bedeutet, dass es frei von Zellen, die einen Kern enthalten, ist. Die Bildung der ortho-keratotischen Zellschicht war bis zu diesem Zeitpunkt mit anderen bekannten immortalisierten Zell-Linien nicht möglich. So bildet beispielsweise die Linie DK2-NR (EP780469) bei identischen Bedingungen ein para-keratotisches Stratum corneum, was bedeutet dass die Schicht von verhornten Zellen noch Zellen mit einem Kern enthält. Lediglich die orthokeratotische Morphologie des Stratum corneum spiegelt die normale Situation menschlicher Haut wieder. Tatsächlich ist ein para-keratotisches Stratum corneum charakteristisch für eine anormale Hypertrophie des Epithels, die zu Störungen, derart wie beispielsweise Psoriasis oder Neoplasie führt.

Beispiel 3 Reizungstest

[0054] Die in Beispiel 1 erhaltenen Zell-Linien, insbesondere die Linie DK7-NR, werden in dem Medium NR-2 gezüchtet. Die Induktion des "Stress-Gens" TNFα (Tumornekrosefaktor alpha) nach einer Behandlung mit Haut-Reizmitteln, die aus PMA (12-Myristat-13-acetat-phorbol) und aus UV-B (Ultraviolett-Strahlung B) besteht, wird durch das Northern-Print-Transfer-Verfahren und durch biologische Tests untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Zell-Linien und insbesondere die Linie DK7-NR auf PMA und auf UV-B ansprechen und das TNFα-Protein sogar nach einer erhöhten Zahl an Passagen exprimieren.

Beispiel 4 Aufbau einer künstlichen Haut

[0055] Die Membran in einem Einsatz Falcon Nr. 3180 wird durch ein Blatt Hyaluronsäure-benzylester ersetzt (Hyaff 11). Der Boden des Einsatzes wird mit primären menschlichen Fibroblasten angesät (0,1 × 10⁶ Zellen in 0,2 ml Medium), es wird 30 Minuten Ruhen gelassen, der Einsatz wird mit DMEM-Medium gefüllt, das 10% fetales Kälberserum enthält, es wird bei 37°C unter einer Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid während mehrerer Tage inkubiert, der Einsatz wird geleert, und es werden dorthin 0,5 ml an NR-2 Medium, das 750.000 Zellen der Zell-Linie DK7-NR enthält, zugegeben, es werden die Einsätze in die Vertiefungen der Platten Falcon Nr. 3043 gegeben, die schon 2 ml an frischem NR-2 Medium enthielten, und die Zellen werden während zwei Tagen unter Bedingungen kultiviert, die das Wachstum von Keratinozyten begünstigen. Am dritten Tag wird das in dem Einsatz enthaltene Medium entnommen und die Zellen werden an freier Luft gelassen. Das Medium in den Vertiefungen wird periodisch alle zwei Tage mit NR-2 Medium ausgewechselt, das mit EGF (5 ng/ml), Vitamin C (38 µg/ml) und CaCl₂ (1,5 mM) angereichert ist. Nach zwei bis drei Wochen Kultur an der Phasengrenze Gas-Flüssigkeit, wird die Bildung einer künstlichen Haut mit den Charakteristika einer normalen Haut beobachtet.

Patentansprüche

1. Menschliche Keratinozyten-Zelllinie, immortalisiert mittels funktioneller Tumorgene, die mindestens aus dem SV40 Virus und dem menschlichen Papillomavirus 16 bestehen, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie

- (1) nicht tumorigenisch ist;
- (2) auch nach einer erhöhten Anzahl von Gewebekultur-Passagen die Fähigkeit zur Differenzierung und zur Expression der Proteine und der Enzyme behält, die von differenzierten normalen Keratinozyten exprimiert werden, wobei die Anzahl an Gewebekultur-Passagen mindestens 10 Kultur-Passagen umfassen, und

(3) ein schichtförmiges, polarisiertes Epithel ausbildet, welches ein orthokeratosiches stratum corneum umfasst, das in einer organotypischen Kultur in einem Serum-freien Medium und ohne eine Nährzellschicht gezüchtet wird.

2. Menschliche Keratinozyten-Zelllinie nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass jedes funktionelle Tumorgen in einem unabhängigen retroviralen Konstrukt enthalten ist.

3. Menschliche Keratinozyten-Zelllinie nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um den Stamm DK7-NR mit der Hinterlegungsnummer CNCM I-1996 gemäß dem Budapester Abkommen handelt.

4. Verbessertes Verfahren zur Immortalisierung menschlicher Hautzellen zur Gewinnung immortalisierter Keratinozyten, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren die folgenden Schritte umfasst

- (i) Zubereiten einer aus menschlichem Hautgewebe gewonnenen Probe für eine in vitro Kultur;
- (ii) Gewinnen von Keratinozyten aus der zubereiteten Hautgewebeprobe und Animpfen eines Serum-freien Wachstumsmediums mit den Keratinozyten auf Kulturplatten, die mit einer Fibronectin, Type 1-Kollagen und BSA umfassenden Beschichtung versehen sind, die die Fixierung und das Wachstum der Zellen fördert;
- (iii) Austauschen des Mediums, so dass ein optimales konfluentes Wachstum der Zellen in Kultur erreicht wird, wobei die Beschichtung auf den Kulturplatten weiter aufrechterhalten wird;
- (iv) Überführen der Keratinozyten von einem Serum-freien Selektionsmedium auf zuvor in vergleichbarer Weise beschichtete Kulturplatten;
- (v) Infizieren der Keratinozyten unter Verwendung von funktionellen, von mindestens dem SV40 und dem menschlichen Papilloma-Virus 16 abgeleiteten Tumorgenen,
- (vi) Überführen der so erhaltenen immortalisierten Keratinozyten in ein Serum-freies Proliferations-Medium, das für die Proliferation der immortalisierten Keratinozyten geeignet ist, auf zuvor in gleichartiger Weise beschichtete Kulturplatten, und
- (vii) Überführen der so erhaltenen Keratinozyten nach erfolgter Proliferation in ein Serum-freies Differenzierungs-Medium mit hohem Calciumgehalt, auf zuvor in gleichartiger Weise beschichtete Kulturgefäße.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass jedes funktionelle Tumorgen in einem unabhängigen retroviralen Konstrukt enthalten ist.

6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass die verwendeten, retroviralen Konstrukte die Vektoren pLXSHD+SV40 (#328) und die pLX SHD+E6/E7 sind, wobei der retrovirale Vektor

pLXSHD+SV40 (#328) die Sequenz T-Ag des SV40 enthält, die Sequenzen der 5' und 3' langen terminalen Wiederholungen von SV40, die Sequenzen von pBR322, die die Replikation von E. coli, einen mehrfachen Klonierung Zyklus ermöglichen, eine Polyadenylierungs-Sequenz von SV40 und andere Sequenzen, und wobei der Vektor pLXSHD+E6/E7, anstelle des Gens, das das Antigen T kodiert, das NcoI/CfoI-Fragment des Gens E6/E7 des humanen Papilloma Virus 16 enthält.

7. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Serum-freie Medium in den Schritten (ii), (iv) oder (vi) das NR-3 Medium ist.

8. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Differenzierungs-Medium in Schritt (vii) das modifizierte NR-2 Medium darstellt, mit einem Calciumgehalt von mindestens 1,5 mM.

9. Verwendung von Keratinozyten nach Anspruch 1 für immunologische, pharmakologische, photo- und chemotoxische Analysen von Hautreaktionen und zur Expression von heterologen Genen.

10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass der Stamm DK-7NR, mit der Hinterlegungsnummer CNCM I-1996 gemäß dem Budapester Abkommen, verwendet wird.

11. Künstliche Haut, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Keratinozyten-Zelllinie nach Anspruch 1 enthält.

12. Künstliche Haut nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass sie den Stamm DK7-NR mit der Hinterlegungsnummer CNCM I-1996 gemäß dem Budapester Abkommen enthält.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Fig. 1

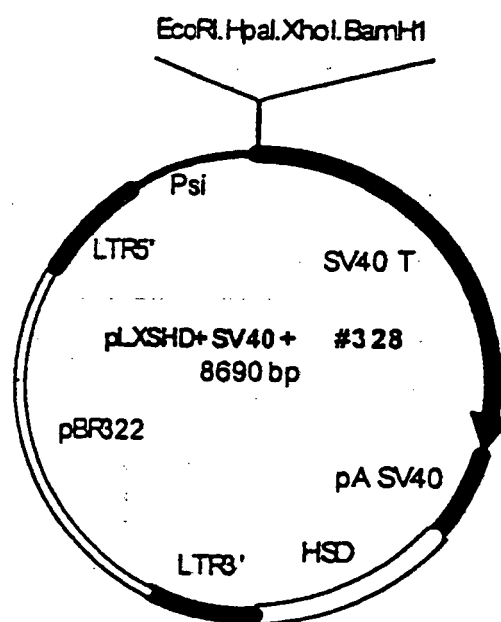


Fig. 2

