(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 951239 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE PUBLIC

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 951239

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 11/10
C12N 11/04
C12N 5/00
C12N 5/08
A61K 35/30
A61K 35/34

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **22.09.1993**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **16.03.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **16.03.1995**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **22.09.1993 PCT/US1993/009023**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

28.09.1992 US 952249

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • **Brown University Research Foundation,** 42 Charlesfield Street, Providence, RI 02912, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • **Aebischer, Patrick,** Switzerland, SVEITSI, (CH)
2 • **Zielinski, Beth A.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Heinänen Oy Patenttitoimisto, Airport Plaza, Äyritie 8 D, 01510 Vantaa

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention
Kitosaanimatriisit kapseloituja soluja varten
Kitosanmatriser för inkapslade celler

KITOSAANIMATRIISIT KAPSELOITUJA SOLUJA VARTEN

Keksinnön tausta

Tämän keksinnön tekninen alue on hienojakoinen kitosaaniydinmatriisi eläviä soluja varten kapseloituna laitteisiin, jotka on tarkoitettu implantoitavaksi yksilöön.

Muutamia aineita on käytetty ydinmateriaalina solujen kapseloimiseksi mikropalloihin ja makrokapseleihin. Tyypillisesti ydinmateriaali on muodostettu geeliksi, johon solut on upotettu. Geeliytynyt ydin voidaan sitten edelleen kapseloida puoliläpäisevään membraaniin implantoitavan laitteen muodostamiseksi.

Ihanteellisen ydinmateriaalin tulisi tuottaa fysikaalinen tuki soluille niiden pitämiseksi tasaisesti dispergoituneena kaikkialle ytimeen. Jos solut pyrkivät kasautumaan ytimessä, kasautuman keskellä olevat solut voivat joutua hapen ja muiden ravinteiden puutteeseen ja tulla nekroottisiksi. Ydinmateriaalin pitäisi myös läpäistä riittävästi solujen erittämiä aineita siten, että hoidollinen aine voi diffundoitua ytimestä ulos ja implantoidun laitteen vastaanottajan kudokseen tai verivirtaan. Jos toivotaan solujen lisääntymistä tai erilaistumista ytimessä, ydinmatriisin pitäisi tuottaa myös fysikaalis-kemiallinen ympäristö, joka edistää noita solun toimintoja.

Yksi yleisesti käytetty ydinmateriaali on anioniaktiivinen polysakkaridikumi, natriumalginaatti, kuten se on julkaistu US-patenteissa 4 352 883 (Lim, F.), 4 689 293 (Goosen, M. F. A. et al.), 4 806 355 (Goosen, M. F. A. et al.), 4 789 550 (Hommel, M. et al.), 4 409 331 (Lim, F.) ja 4 902 295 (Walthall, B. J. et al.).

Muihin ydinmateriaaleihin sisältyvät kollageeni (US-patentti 4 495 288, Jarvis, A. P. et al.), agar, agaroosi, fibrinogeeni (US-patentti 4 647 536, Mosbach, K., et al.) ja fibronektiini tai laminiini (US-patentti 4 902 295, Walthall, B. J. et al.).

Tämän keksinnön ydinmateriaali on kitosaani, joka on

kitiinin johdannainen. Kitiini on katkaravun tai taskuravun kuoren tärkein aineosa ja sitä tuotetaan kaupallisesti äyriäisteollisuuden sivutuotteena.

Kitiini on lineaarinen polymeeri, joka koostuu 2-asetyyliamino-D-glukoosiyksiköistä. Termi "kitosaani" viittaa sellaisten kitiinistä peräisin olevien polymeerien perheeseen, jotka on osittain deasetyloitu vapaiden aminoryhmien riittävän määrän tuottamiseksi, jotta polymeeri on muuttunut liukoiseksi valittuihin vesipitoisiin happojärjestelmiin (Filar, L. J. et al., Hercules Research Center Contribution No. 1697, Wilmington, Delaware). Kitosaani on kaupallisesti saatavissa tuotteina, joissa deasetyloimisaste vaihtelee alle 75 %:sta ylöspäin. Kitosaanin liukoisuusaste tietyllä deasetyloimisasteella riippuu polymeerin moolimassasta, lämpötilasta ja happoliuottimen konsentraatiosta ja luonteesta (Filar, L. J., et al. edellä).

Kitosaania on käytetty kokeellisesti kovakalvon korvikkeena [Muzzarelli, R. et al., Biomaterials 9 : 247 - 252 (1988)]. Kovakalvo on kollageenipitoisesta sidekudoksesta muodostuva kerros, joka ympäröi aivoja kallon sisällä. Tässä kokeellisessa esimerkissä kitosaanin menestyksen katsottiin johtuvan siitä, että sen rakenteelliset tunnuspiirteet ovat samanlaisia kuin luonnossa esiintyvän ekstrasellulaarisen matriisin glykosaminoglykaanin aineosien. Kitosaanin läsnäollessa fibroblastit ja mesenkymaaliset vaskulaariset solut stimuloituivat vaeltamaan, lisääntymään ja erilaistumaan. Nämä solujen toiminnat ovat haavan paranemisen ja kudoksen uudelleen muodostumisen oleellisia osia. Kitosaanin on raportoitu olevan myös tehokas luun korjaamisessa ja ommelmateriaalina [Sapelli, P. L. et al. julkaisussa Chitin in Nature and Technology, toimittajat R. A. A. Muzzarelli et al., Plenum Press, N. Y. (1986); Nakajuma, M. et al., Jpn J Surg 16, 418 - 424 (1986)].

Ravintoliuosta, joka sisälsi nestemäistä kitosaania, lisättiin kasvaviin lihassoluviljelmiin, ja sen raportoitiin mahdollistavan lihassolujen kolmiulotteisen kasvun viljelmä-

maljoilla (Malette, W. G. et al., US-patentti 4 605 623). Kitosaani/kollageenimateriaalin raportoitiin olevan tehokas solujen substraattiadheesion ja lisääntymisen edistämiseksi viljelmässä (Miyata, T. et al, EP 0318286).

Kitosaania on käytetty varaston muodostamiseksi farmakologisesti aktiivisten makromolekyylien, kuten hormoonien, entsyymien ja proteiiniantigeenien, pitkittynyttä vapauttamista varten.

On julkaistu menetelmiä kitosaanin käyttämiseksi elävien solujen kapseloimiseksi (Daly, MM. et al., US-patentti 4 808 707; Rha, C. - K. et al., US-patentti 4 744 933; Rha, C. - K. et al., US-patentti 4 749 620; Schroder, U., US-patentti 4 713 249; Jarvis, A. P., US-patentti 4 803 168). Nämä menetelmät perustuvat kitosaanin kationiaktiivisten vapaiden aminoryhmien silloittamiseen ionisidoksin anioniaktiivisten lajien, kuten fosfaatti-ionien tai anioniaktiivisten polymeerien, kuten alginaatin, kanssa. Tässä määriteltynä termit "silloittaminen", "silloitettu" jne tarkoittavat ionisidoksia tai siltoja selvästi erottuvien kitosaaniketjujen välillä tai yksittäisen ketjun selvästi erottuvien alueiden välillä.

Rha'n kapselit muodostetaan tiputtamalla kationiaktiivista kitosaaniliuosta anioniaktiiviseen alginaattiliuokseen. Kitosaanipolymeerien positiivisesti varautuneita vapaita aminoryhmiä kitosaanipisaran pinnalla vetävät puoleensa alginaattipolymeerien negatiivisesti varautuneet karboksylaattiryhmät muodostaen silloituksia kitosaanipisaran ja alginaattiliuoksen väliselle rajapinnalle. Rajapinnasta silloitetttu kitosaani-alginaatti muodostaa membraanin, joka sulkee sisäänsä nestemäisen kitosaaniytimen. Daly käyttää samaten rajapinnasta silloitettua kitosaania, jossa käytetyn alginaatin koostumus vaihtelee kapselin membraanin läpäisevyysominaisuuksien muuttamiseksi. Jarvis'in mikrokapselit muodostetaan silloittamalla ytimen kitosaanipolymeerit lisäämällä kaksi- tai moniarvoisia anioneja, sitten muodostamalla pysyviä rajapintasilloituksia suuren määrän

anioniaktiivisia ryhmiä sisältävän polymeerin, kuten polyasparagiinihapon tai polyglutamiinihapon, ulkopinnalle. Jarvis'in kapseleiden sisäydintä voidaan käyttää silloitetussa tilassa tai se voidaan nesteyttää uudelleen lisäämällä pienimolekyylipainoisia kationeja. Kaikissa näissä tapauksissa kitosaanin tärkein tehtävä on toimia yhtenä puolikkaana sähköisesti varautuneesta polymeeriparista, joka muodostaa rajapintasilloituksia, mistä seuraa kapselin membraanin tai seinän muodostuminen.

Edellä mainitun Schroderin kitosaanimatriisit muodostetaan kiteyttämällä hiilihydraattipolymeeri polymeerisen hilan muodostamiseksi. Näin muodostettuja kapseleita käytetään ei-elävien biologisesti aktiivisten aineiden vapauttamiseksi. Kiteyttämiseen käytettyjä menetelmiä pidetään yleisesti liian kovina elävien solujen kapseloimiseksi.

Kitosaanin tärkein kaupallinen tuottaja, Protan Laboratories, on julkaissut useita asiakirjoja solujen immobilisoimiseksi kitosaanigeelien sisään. Kaikissa näissä menetelmissä käytetään kitosaanin inotrooppista geelinmuodostusta (so. silloittamista) yhdistämällä kitosaani/soluliuos anioniaktiivisten lajien kanssa. Ehdotettuihin anioneihin sisältyvät polyfosfaatit, alginaatti, karrageeni ja rasvahapot, joissa on sulfaattiosuudet. (Technical bulletin: Chitosans for Cell Immobilization, Protan Laboratories, Redmont, WA). Silloitettua kitosaania ei ole kuitenkaan käytetty ydimateriaalina elävien solujen kapseloimiseksi kapseleihin, joissa on termoplastiset vaipat. Myöskään silloittamatonta hienojakoista kitosaania ei ole koskaan käytetty ydinmatriisina elävien solujen kapseloimiseksi kapselointilaitteisiin.

Siten tämän keksinnön kohde on uuden, ei-silloitetun hienojakoisen kitosaaniydinmatriisin tuottaminen elävien solujen kapseloimiseksi kapselointilaitteisiin.

Tämän keksinnön toinen kohde on hienojakoisen kitosaaniydinmatriisin tuottaminen kapseleihin, joissa on termoplastiset vaipat, jolloin kapselin seinän muodostaminen ei

ole riippuvainen kitosaanimatriisin läsnäolosta (esim. rajapintasilloituksen avulla) siten, että sekä vaipan että matriisin ominaisuudet voivat vaihdella ilman huolta, että ne vaikuttaisivat toisiinsa.

Keksinnön muut kohteet ja ominaispiirteet ilmenevät alan ammattilaisille seuraavasta yksityiskohtaisesta kuvauksesta ja liitteenä olevista patenttivaatimuksista, kun ne esitetään kuvien yhteydessä.

Yhteenveto keksinnöstä

Kuvataan kapselointilaite, jossa on hienojakoinen, oleellisesti silloittamaton kitosaaniydinmatriisi, joka on suljettu läpäisevän tai puoliläpäisevän vaipan sisään. Laite on käyttökelpoinen ydinmatriisin kitosaanihiukkasten väliin vangittujen elävien solujen ylläpitämiseksi, kasvamiseksi, lisääntymiseksi ja erilaistumiseksi.

Julkaistaan menetelmä kapselointilaitteen valmistamiseksi, jolloin valmistetaan kitosaaniliuos ja sekoitetaan se sitten elävien solujen kanssa. Kitosaani/soluseos kapseloidaan sitten läpäisevällä tai puoliläpäisevällä vaipalla kudokseen implantoitavan kapselointilaitteen muodostamiseksi. Sitten kitosaani saostetaan, jolloin muodostuu hienojakoinen kitosaaaniydinmatriisi, johon elävät solut ovat dispergoituneina. Vaihtoehtoisesti kitosaani saostetaan lisäämällä eläviä soluja ennen kapselointia.

Eläviin soluihin, joilla on erityistä käyttöä tässä keksinnössä, sisältyvät solut, jotka on valittu ryhmästä, joka koostuu neurosekretorisista solulinjoista, ß-soluista johdetuista solulinjoista, fibroblasteista, lihassoluista ja hermoston tukisoluista.

Lyhyt kuvaus piirroksista

Kuva 1 edustaa histologista poikkileikkausta synomologisen apinan aivoihin implantoidusta, PC12-soluja sisältävästä termoplastisesta makrokapselista. Kapseli ei sisällä ydinmatriisia.

Kuva 2 edustaa histologista poikkileikkausta implantoidusta termoplastisesta makrokapselista, joka sisältää

PC12-soluja upotettuna tämän keksinnön hienojakoiseen kitosaaniydinmatriisiin.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Tämä keksintö perustuu havaintoon, että kitosaani voidaan muodostaa kolmiulotteiseksi hienojakoiseksi matriisiksi liitettäväksi solujen kapselointilaitteisiin. Tämän keksinnön kitosaaniydinmatriisi on tulosta erillisten kitosaanihiukkasten käytöstä ilman merkittävää silloitusta tai muita kemiallisia liitoksia hiukkasten välillä. Vaikka tämän keksinnön sakka muodostetaan oleellisesti silloitteiden puuttuessa ja se on oleellisesti silloittamaton, tulisi pitää mielessä, että sakan pinnalla on todennäköisesti vapaita varauksia, jotka säilyvät silloitukseen käyttökelpoisina sopivissa olosuhteissa. Tämän keksinnön tarkoituksia varten termit "ilman merkittävää silloitusta" tai "oleellisesti silloittamaton" jne viittaavat kitosaaniin kokonaisuudessaan kapselointilaitteessa siten, että kitosaani on hienojakoista luonteeltaan ja yksittäiset polymeeriketjut eivät ole kytkeytyneet kovalenttisesti tai silloittuneet ionien avulla yhdeksi tai useammaksi geelinkaltaiseksi rakenteeksi.

Tämän keksinnön kitosaaniydinmatriisit vangitsevat solut hiukkasten väliin, mutta eivät jatkuvaan kolmiulotteiseen matriisiin kuten silloitetussa geelirakenteessa (esim. alginaatissa ionimuotoisen kalsiumin läsnäollessa). Tällaiset hienojakoiset kitosaanimatriisit voidaan tuottaa käyttäen liukoisen kitosaanin pH-arvosta riippuvaista saostamista ilman silloitteita.

Tämän keksinnön tarkoituksia varten termi "silloitetut kitosaanit" viittaa kiinteisiin aineisiin tai geeleihin, jotka ovat riippuvaisia ionivuorovaikutuksista polymeeriketjujen välillä niiden kiinteän tai geelimäisen luonteen säilyttämiseksi. Tällaisissa geeleissä solut ovat upotettuina enemmän tai vähemmän jatkuvaan kolmiulotteiseen matriisiin, joka on muodostettu kytkemällä kitosaaniketjut keskenään. Silloitetut kitosaanit muodostetaan yleensä silloitteiden läsnäollessa.

Rajapintasilloitukset eivät ole tämän keksinnön aihe ja vaikka niiden muodostumista ei määrätä, niiden olemassaolo ei yleensä vaikuta tämän keksinnön toimintaan. Muissa suoritusmuodoissa voidaan käyttää silloitetun kitosaanin pienen pieniä hiukkasia oleellisesti ilman hiukkasten välisiä silloituksia hienojakoisen kitosaanimatriisin muodostamiseksi. Tällaiset hiukkaset muodostetaan kuivaamalla silloitetut kitosaanigeelit ja sen jälkeen jauhamalla (esimerkiksi huhmaren ja survimen avulla) tulokseksi saatu rakenne hiukkaskokoon, joka on halkaisijaltaan alle 100 um, edullisesti alle 50 um ja edullisimmin vähemmän kuin niiden solujen koko, jotka hiukkasten on määrä vangita.

Suoritusmuodoissa, jotka koskevat hienojakoisen kitosaanin tuotantoa saostamalla, kitosaanin saostaminen saadaan aikaan edullisesti säätämällä reaktioseos sopivaan pH-arvoon. Kuitenkin käytännöllisesti katsoen minkä tahansa menetelmän, joka poistaa tai naamioi varauksen kitosaanin vapaissa aminoryhmissä, pitäisi olla sopiva. Tällaiset menetelmät koskevat useimmiten aminoryhmien reaktiota orgaanisten aineiden kanssa. Vaihtoehtoisesti biologisesti yhteensopivia, kitosaanin kanssa reagoimattomia vesiliukoisia polymeereja voidaan käyttää saostumisen aiheuttamiseksi. Sakka tuottaa solujen erottumisen ja sähköisesti varatun pinnan solujen vuorovaikutukselle. Sitten ydinmatriisi kapseloidaan membraanin tai vaipan sisään, joka viljelyssä tai implantoitaessa yksilöön sallii ravinteiden, jäteaineiden ja erittyneiden tuotteiden diffuusion, mutta joka on edullisesti immuunijärjestelmältä eristävä ja salpaa immunologisen hyljintäreaktion sellulaariset ja molekulaariset efektorit. Edullisesti ydinmatriisin ja vaipan välillä ei ole minkään tyyppistä kemiallista tai fysikaalista kytkentää tai sitoutumista.

Tässä määriteltynä termi "yksilö" viittaa ihmis- tai eläinkohteeseen. Tässä määriteltynä "kudos" viittaa soluihin, soluryhmittymiin, kudokseen tai kudosfragmentteihin, jotka ovat peräisin joko eläimiltä tai ihmisiltä.

Kitosaania on saatavissa muutamilta valmistajilta ja se voi vaihdella puhtaudeltaan ja deasetyloimis-%:n suhteen erien välillä ja valmistajien välillä. Huolimatta liukoisuusominaisuuksien pienistä eroista, monet näistä kitosaaneista ovat käyttökelpoisia tässä keksinnössä. Kuitenkin tulisi pitää mielessä, että pH-arvosta riippuvaiset liukoisuusominaisuudet pitäisi vahvistaa minkä tahansa tietyn kitosaanierän osalta. Esimerkiksi on verrattu Fluka-kitosaanihiutaleiden liukoisuusominaisuuksia 6 mM HEPES-puskurissa ja Protan Seacure Cl-kitosaania. Fluka-kitosaani saostuu pH-arvon ollessa > 6,3, kun taas Protan-kitosaani saostuu pH:n ollessa lähellä arvoa 6,8.

Yhdessä suoritusmuodossa valmistetaan kitosaanimatriisin muodostava aine liukoisena liuoksena, se sekoitetaan soluja sisältävän elatusaineen kanssa ja sitten käytetään yhteisekstruusioprosessissa termoplastisten tai muotonsa säilyttävien kapselointilaitteiden, kuten kuitujen tai tasaisten levyjen, muodostamiseksi. Muissa suoritusmuodoissa kitosaani/soluliuos lisätään esimuodostettuihin laitteisiin. Keksinnön matriiseja voidaan myös käyttää mikropallojen muodostamisessa ja esimuodostettujen kuitujen ja/tai kapseleiden täyttämiseen tuotannon jälkeen.

Tämän keksinnön kitosaanimatriisi on yhteensopiva useiden solutyyppien kanssa, jotka ovat käyttökelpoisia implantoitavissa laitteissa tautien, kuten diabeteksen, Parkinsonin taudin ja muiden neurologisten sairauksien, hoitamiseksi. Lisäksi kapseloidut myoblastit (varhaislihassolut) voivat olla käyttökelpoisia kudosta ravitsevien tai kasvattavien tekijöiden lähteenä perifeerisen hermon korjaamisen tai uudistumisen tukemiseksi.

Tässä termi "ydinmatriisi" viittaa biologisesti yhteensopivaan kolmiulotteiseen rakenteeseen, joka tukee tai voi lisätä solujen lisääntymistä ja/tai solujen erilaistumista.

Keksinnön kitosaaniydinmatriisi koostuu hienojakoisesta kitosaanista, joka tuottaa epäsäännöllisen rakennelman

tai toimii tällaisena rakennelmana, johon solut ovat vapaita kasvamaan. Matriisi tuottaa suuren kasvupinta-alan, joka ei rajoita solujen kykyä jakautua ja levitä.

Soluihin, jotka kasvavat hyvin tämän keksinnön matriisissa, sisältyvät CHO-solut, fibroblastit, lihassolut, neurosekretoriset solut, kuten PC12-solut, haiman ß-solut sekä NIT- ja RIN-solulinjat ja hermoston tukisolut, kuten astrosyytit. Soluja, jotka ovat yhteensopivia kitosaanimatriisin kanssa, voidaan muokata geneettisesti erittämään haluttua ainetta, joka on heterologinen yhteensopivan solun suhteen. Esimerkiksi fibroblastit, jotka on muokattu geneettisesti erittämään hermosolujen kasvutekijää (NGF), ovat yhteensopivia tämän keksinnön kitosaanimatriisin kanssa.

Kitosaani on tunnettu poly-n-glukosamiinina, jolla on suuri määrä vapaita aminoryhmiä. Kitosaania on kaupallisesti saatavissa eri muodoissa, jotka eroavat toisistaan vapaiden aminoryhmien määrän (deasetyloimis-%:n), puhtausasteen, moolimassajakautuman ja viskositeetin suhteen. Harjoitettaessa tätä keksintöä käytännössä edullisen kitosaanityypin moolimassa on 10 - 1 000 kd, edullisesti 100 - 300 kd. Pienemmät moolimassajakautumat voivat myös olla käyttökelpoisia.

Edullisesti kitosaanin deasetyloimisaste on noin 80 - 90 %, edullisesti 80 - 85 %. Suurempi deasetyloimisaste korreloi positiivisesti varautuneiden vapaiden aminoryhmien suuremman määrän kanssa. Deasetyloimis-% on tärkeä säädeltäessä kitosaanin pH-herkkää saostumista tämän keksinnön solu/kasvualustoista. Erityisesti kitosaanit, joiden deasetyloimis-% on < 50 %, osoittavat liukoisuutta laajemmalla pH:n vaihtelualuella (esim. pH 2 - 11), kun taas kitosaani, jonka deasetyloimis-% on 80 % (Seacure Cl Protan), on liukoinen pH-arvon ollessa 6,3 ja saostuu pH-arvon ollessa 6.8.

Liukoisen 1-%:isen kitosaanin viskositeetti, joka on pH-arvon ollessa 4,0 noin 20 - 80 cp, on edullinen. Erilaisten silloittamattomien kitosaanipolymeeriketjujen moolimassajakautuma erityisessä kitosaanivalmisteessa tai erässä

vaikuttaa merkitsevästi annetun konsentraation omaavan liuoksen viskositeettiin. Lisäksi kitosaaniliuoksessa läsnäolevilla kiinteillä aineilla (esim. suoloilla, hiilihydraateilla) tai kopolymeereilla sekä kitosaaniliuoksen itsensä todellisella konsentraatiolla on merkitsevä vaikutus viskositeettiin.

Kitosaaniliuoksen viskositeetti vaikuttaa kapselointilaitteiden täytettävyyteen ja saostusnopeuteen. Tällä on muutamia käytännöllisiä seurauksia laitteen valmistuksen ja täyttämisen kannalta. Koneellistettu kapselin valmistus, kuten yhteisekstruusioprosessi, joka on kuvattu myönnetyssä US-patentissa 07/461 991, Aebischer et al., vaatii kitosaaniliuosten pienemmän viskositeetin, joka on 10 - 150 cps (≈ 0,5 - 2 % kitosaania) verrattuna laitteen valmistukseen, joka koskee solu/kitosaaniliuoksen täyttämistä käsin ruiskuilla jne, jolloin viskositeetti on vähemmän kriittinen rajoitus ja voi olla niinkin suuri kuin 1 000 cps (≈ 5 - 10 % kitosaania).

Yhdessä suoritusmuodossa keksinnön ydinmatriisin muodostamiseksi kitosaani liuotetaan ensin vesipitoiseen happoliuokseen, jonka pH-arvo on suunnilleen 2 - 4. Voidaan käyttää erilaisia happoja, kuten omenahappoa, sitruunahappoa, meripihkahappoa, askorbiinihappoa, etikkahappoa tai suolahappoa, happaman vesiliuoksen valmistamiseksi. Kitosaania on saatavissa useista lähteistä (Fluka Chemical Corp., jne). Edullinen kitosaanilähde on Protan's SeaCure Cl.

Kitosaanin liuettua happamaksi tehtyyn liuokseen pH-arvo nostetaan tasolle, joka riittävän lähellä fysiologista pH:ta, jonka solut sietävät, mutta joka on vielä riittävän matala kitosaanin liukoisuuden ylläpitämiseksi. Edullisesti kitosaaniliuoksen pH saatetaan arvoon noin 6,3 - 6,5 käyttäen biologisesti yhteensopivaa puskuria, kuten HEPES-puskuria, TRIS-puskuria tai yksiemäksistä fosfaattia. Taulukossa 1 esitetään yhteenveto joidenkin tässä järjelmässä käyttökelpoisten biologisesti yhteensopivien puskureiden ominaisuuksista. On suositeltavaa, että valitaan suhteellisen

heikko puskuriaine, jolla on käyttökelpoinen puskurointialue, joka sisältää kitosaaniliuoksen saostumis-pH:n. Heikon puskurin käyttö helpottaa pH:n säätämistä arvoon 7,4, joka on välttämätön kitosaanin saostumisen aloittamiseksi sekä solujen elinkykyisyyden säilyttämiseksi (solujen alttiinaolo pH-arvolle, joka on muu kuin 7,4, pitäisi minimoida). Tämän keksinnön tarkoituksia varten kitosaanin saostuminen tapahtuu edullisesti pH-alueella 6,5 - 6,8, tarkka arvo vaihtelee riippuen asetyloimisasteesta ja vastaioneista, joita on läsnä nimenomaisessa käytettävässä kitosaanierässä. Sen vuoksi on aina hyödyllistä luonnehtia tarkat pH-olosuhteet uuden kitosaanierän saostamista varten. Jos käytetään fosfaattipuskureita, niiden pitäisi olla yksiemäksisiä, vaikka niiden käyttö ei olekaan edullista. Multifosfaatteja pitäisi vältää, koska ryhmät, kuten tripolyfosfaatti, johtavat kitosaanin silloittumisen ei-toivottuun määrään.

Taulukko 1. Sopivat puskurit

Puskuri	Puskurointialue
BES	6.2 - 7,6
BIS-TRIS	5,7 - 7,1
HEPES	6,6 - 8,0
PIPES	6,0 - 7,4
TAPSO	6,8 - 8,0
TES	6,5 - 7,9

Sitten kitosaaniliuos sekoitetaan (suunnilleen suhteessa 1 : 1 tilavuuden mukaan) elatusaineeseensa suspendoitujen solujen kanssa. Ei-toivotun silloittumisen minimoimiseksi kaikissa tässä keksinnössä käytettävissä elatusaineissa pitäisi olla läsnä minimaalisesti tai ei lainkaan negatiivisesti varautuneita polyelektrolyyttejä (esim. alginaattia) tai moniarvoisia anioneja (esim. polyfosfaattia). Solujen läsnäolo elatusaineessa edistää osaltaan lisäksi puskurivaikutuksia, joten pitäisi toteuttaa kokeellinen testaus kitosaanin saostamisen vaativan optimaalisen puskuroinnin aikaansaamiseksi.

Solubilisoidun kitosaanin kanssa sekoitetut solut

suljetaan sitten implantaatiolaitteisiin, jotka ovat joko mikropalloja tai makrokapseleita. Mikropallot voidaan muodostaa minkä tahansa Sefton'in, US-patentti 4 353 888, menetelmän mukaisesti. Kun tarkoitus on muodostaa makrokapseleita, edullisia menetelmiä ovat menetelmät, jotka on julkaistu vireillä olevassa US-patenttihakemuksssa, Aebischer et al., ja hyväksytyssä US-patenttihakemuksssa 07/461 944.

Sitten implantaatiolaite pannaan elatusaineeseen, jokan pH-arvo on noin 7,4, mikä aiheuttaa kitosaanin saostumisen. Saostunut kitosaani muodostaa täten hienojakoisen kolmiulotteisen matriisin mikropallon tai makrokapselin sisällä solujen ollessa upotettuna siihen.

Toisessa suoritusmuodossa kiinteä kitosaani on läsnä soluliuoksessa ennen solujen saattamista kapseliin. Tässä suoritusmuodossa kiinteän kitosaanin hienojakoisen koon täytyy olla yhteensopiva kapseliin saattamisen kanssa. Liukoisen kitosaanin lisääminen soluliuokseen ja pH-arvon säätäminen siten, että kitosaani saostuu liuoksesta, johtavat yleensä hiutalemaiseen sakkaan. Solut ja saostunut kitosaani voidaan sitten sekoittaa tai hämmentää suspensioksi ja lisätä suoraan kapseleihin.

Kitosaanin käyttö termoplastisissa tai muissa laitteissa, joissa kapselin seinän ja/tai laitteen läpäisyselektiivisten ominaisuuksien muodostuminen ei ole riippuvainen kitosaanimatriisin läsnäolosta (esim. rajapintasilloituksen avulla), tarkoittaa, että joko ulkomembraanin (esim. vaipan) tai matriisin ominaisuudet voivat vaihdella ilman huolta siitä, että ne vaikuttavat toisiinsa. Siten ulomman vaipan moolimassarajaa voidaan muuntaa ilman kompensoivia tai vastaavia muutoksia kitosaaniydinmateriaalissa. Samoin matriisin muodostamiseen käytetyn kitosaanin identiteetti ja ominaisuudet (esim. deasetyloimis-%, viskositeetti, moolimassajakautuma) voidaan valita perustuen pelkästään sen vaikutuksiin solun toiminnallisuuteen ja elinkykyisyyteen. Samoin ei ole välttämätöntä todeta sen vaikutuksia laitteen membraanin ominaisuuksiin (so. kuten olisi välttämätöntä Rha'n (US-pa-

tentti 4 744 933) mikropallolaitteissa).

Kapseloituja PC12-soluja voidaan viljellä hermosolujen kasvutekijän (NGF) läsnäollessa tai ilman sitä. Kummassakin tapauksessa kitosaanin lisääminen on hyödyllistä. Tämän keksinnön mukaisesti kapseloidut PC12-solut osoittavat parantunutta elinkykyisyyttä havaitun nekroosin määrän ollessa vain vähäistä 8 viikon kuluttua sekä in vivo että in vitro. Kapseloidut PC12-solut, joita viljellään in vitro tämän keksinnön kitosaanimatriiseissa ja hermosolujen kasvutekijän läsnäollessa, erilaistuvat polygonaalisiksi solutyypeiksi ja kehittävät laajalle ulottuvat neuriitit. Tämä on vastakohta PC12-soluille, jotka on kapseloitu ilman mitään ydinmatriisia ja jotka pyrkivät olemaan pallomaisia ulkonäöltään, jolloin neuriitteja on vain muutama, jos lainkaan. Omat tutkimuksemme ovat myös osoittaneet, että noin 1,5 % kitosaania, joka on silloitettu trifosfaatin avulla, pyrkii olemaan liian tiheä solujen kasvun tukemiseksi riittävästi termoplastisen kapselin sisällä. Monet solut, esimerkiksi PC12-solut, pyrkivät normaalisti kasvamaan yhdellä pinnalla viljelmässä eivätkä suosi pallomaisia ryhmittymiä, kuten on havaittu käytettäessä silloitettua kitosaania. PC12-solujen erilaistuminen voi olla välttämätöntä joidenkin haluttujen hoidollisten aineiden, kuten dopamiinin, tuottamiseksi sekä solujen kasvun rajoittamiseksi.

Fibroblastit muodostavat toisen hoidollisesti käyttökelpoisen solutyypin, joka säilyy elävänä ja toimii parhaiten kapseloituna kolmiulotteiseen kasvumatriisiin. Fibroblastit ovat liikkuvia luonteeltaan ja ne vaativat sopivan substraatin, jolla liikkua. Lisäksi fibroblastien lisääntyminen vaatii substraatin, jonka pinnalle ne voivat ankkuroitua.

Fibroblastit ovat tarkoituksenmukaisen soluisäntä tiettyjen geneettisesti muokattujen proteiinien, kuten hermosolujen kasvutekijän (NGF), ilmentämiseksi. Fibroblastit, jotka erittävät hermosolujen kasvutekijää, voidaan implantoida kohteeseen kroonisten etenevien hermoston rappeumati-

lojen, kuten Alzheimerin taudin, hoitamiseksi.

Hermosolujen kasvutekijää erittävät fibroblastit säilyvät hyvin hengissä, kun ne on kapseloitu tämän keksinnön kitosaanimatriisiin. Elinkykyisyyden lisäksi tämän keksinnön kitosaaniydinmatriisi edistää hermosolujen kasvutekijää erittävien fibroblastien toiminnan ylläpitämistä. Samalla kun nämä fibroblastit silloitetuissa alginaatti-ydinkapseleissa menetttävät kykynsä erittää hermosolujen kasvutekijää yhden viikon kuluttua, samat solut kapseloituna tämän keksinnön kitosaaniydinlaitteeseen säilyttävät kykynsä erittää hermosolujen kasvutekijää neljän viikon ajan.

Soluviljelyn alan ammattilainen kykenee identifioimaan muut käyttökelpoiset solutyypit, jotka voivat erilaistua tai lisääntyä kapseloituna tämän keksinnön kitosaanimatriisiin.

Esimerkki 1

Kitosaaniliuoksen valmistaminen

Suuren moolimassan omaavan kitosaanin hiutaleet, 2-amino-2-deoksi-(1 -> 4)-ß-D-glykapyranaani (Fluka Chemical Corp., Ronkonkoma, NY) autoklavoitiin veden alla steriilisyyden varmistamiseksi. Steriloinnin jälkeen 6 g kitosaania yhdistettiin välittömästi suunnilleen 250 ml:n kanssa 1-%:ista askorbiinihappoa 0,8-%:isessa suolaliuoksessa ja aineosia pyöritettiin suurella nopeudella teollisuuden käyttöön tarkoitetussa Waring 1M -sekoittimessa, jolloin lopulliseksi tilavuudeksi saatiin 300 ml. Tässä kohdin jonkin verran kitosaania jäi liukenemattomaksi, jolloin lopulliseksi konsentraatioksi saatiin 1,5 - 2 %. Tuotetta sekoitettiin kaksi viiden minuutin jaksoa, minkä jälkeen valmistettiin 50 ml 60 mM HEPES-puskuriliuosta (N-2-hydroksietyylipiperatsiini-N'-2-etaanisulfonihappoa, Sigma) 0,8-%:iseen suolaliuokseen ja saatu puskuriliuos lisättiin kitosaaniin. Tämä vaihe tuotti 10 mM:n lopullisen puskurointikapasiteetin. Kitosaaniliuoksen jäähdyttäminen oli tarpeen pH-arvon 6,3 ylläpitämiseksi.

Esimerkki 2

Fibroblastien kapselointi

R208F-kontrollifibroblasteja viljeltiin DMEM-elatusaineessa, joka oli täydennetty 10 %:lla naudan sikiön seerumia (Gibco, Grand Island, NY) ja 100 yksiköllä/ml streptomysiiniä/penisilliiniä (Sigma, St. Louis, MO). R208N.8-fibroblasteja, jotka oli muokattu geneettisesti infektoimalla retrovirusvektorilla, joka oli kooditettu hermosolujen kasvutekijän (NGF) sekvenssillä, ylläpidettiin DMEM-elatusaineessa, joka sisälsi 10 % naudan sikiön seerumia, 1 mg/ml Geneticin-tuotetta (Gibco) ja 100 yksikköä/ml streptomysiiniä/penisilliiniä. Geneticin tuhoaa valikoivasti eitransfektoidut solut puhtaan viljelmän ylläpitämiseksi. Molempia solutyyppejä pidettiin noin 37 °C:n lämpötilassa vedellä kyllästetyssä, 5 % CO_2:a sisältävässä inkubaattorissa. R208N.8- ja R208F-solulinjat olivat X. Breakfieldin ja P. Shortin antama lahja.

Ennen kapselointia kitosaanilla sekä kontrollifibroblastisolulinja että muokattu fibroblastisolulinja korjattiin talteen inkuboimalla niitä 0,05-%:isen trypsiinin kanssa HBSS-liuoksessa 3 minuutin ajan. Sitten sentrifugoitiin kierrosnopeudella 800 g, minkä jälkeen 2 x 10^6 solua/ml soluja suspendoitiin uudelleen 200 ul:aan niiden vastaavia elatusaineita. Solususpensiot lisättiin 300 ul:aan kitosaanimatriisiliuosta, joka oli valmistettu esimerkin 1 mukaan ja seos valettiin polyakryylinitriili/polyvinyylikloridikuidun (PAN/PVC-kuitu) sisään menetelmän mukaan, joka on kuvattu Aebischerin et al. US-patentissa 4 892 538. Kuitu jaettiin erillisiin osiin ja kuidun päät suljettiin tiiviisti käyttäen lämpötiivistysmenetelmää. Sitten kapseleita inkuboitiin fysiologisessa suolaliuoksessa muutamien pesujen ajan, jotka kestivät noin 5 minuuttia kukin saaden aikaan kitosaanin saostumisen. Kaikki soluja sisältävät kitosaanikapselit siirrettiin elatusaineisiin, jolloin R208N.8- ja R208F-solulinjoja pidettiin kostutetussa 5 % CO_2:a sisältävässä inkubaattorissa 37 °C:n lämpötilassa. Sa-

manlaiset kapselit valmistettiin käyttäen 2 % alginaattia kitosaanin tilalla. Alginaattiliuos saatiin yhtiöltä Kelco HV, Kelco N. J., ja se valmistettiin menetelmän mukaan, joka on kuvattu julkaisussa Aebischer et al., Brain Research, 560 : 43 - 49 (1991).

Kapseloituja soluja pidettiin viljelmässä neljä viikkoa. Solut lisääntyivät kitosaanissa koko ajan ja solujen kuolema oli miminaalista.

Kapseloiduista fibroblasteista määritettiin biologisesti seuraavalla tavalla biokemiallinen toiminnallisuus 2 - 4 viikon kuluttua kapseloinnista. Biologinen määritys perustuu PC12-solujen vasteeseen, joka kohdistuu hermosolujen kasvutekijään, joka saa aikaan neuriittien laajenemisen kasvamaan ulos PC12-soluista kohti hermosolujen kasvutekijän suurempaa konsentraatiota. Jotta voitiin tutkia, jatkoivatko geneettisesti muokatut fibroblastit, R208N.8-fibroblastit, NGF:n ilmentämistä ja erittämistä ylläpidettäessä niitä kapseleissa, kapseleita viljeltiin 2 viikon ajan yhdessä kapseloimattomien PC12-solujen kanssa, joita kasvatettiin kollageenilla päällystetyillä kudosviljelmämaljoilla ja niiden vaikutusta PC12-soluihin seurattiin.

Yhden viikon kuluttua neuriittien laajeneminen oli huomattavaa sekä kitosaanikapseloitujen R208N.8-fibroblastien ja alginaattikapseloitujen R208F-fibroblastien kummassakin yhteisviljelmässä. Kapseloiduilla kontrollifibroblasteilla, R208F, sekä kitosaani- että alginaattikontrolleilla, ei ollut vaikutusta PC12-solujen erilaistumiseen.

Kahden viikon kuluttua PC12-solut yhteisviljelmässä kitosaanilla kapseloitujen R208N.8-solujen kanssa ylläpitivät erilaistunutta tilaansa. Sitä vastoin PC12-solut yhteisviljelmässä alginaatilla kapseloitujen R203N.8-solujen kanssa olivat vetäneet neuriittinsa takaisin ja saavuttivat uudelleen erilaistumattoman morfologiansa. Kapseloidut kontrollifibroblastit säilyivät inaktiivisina neurotroofisesti.

Tämä osoittaa, että fibroblastit, jotka on muokattu geneettisesti ilmentämään hermosolujen kasvutekijää, säilyt-

tävät kykynsä ilmentää heterologista proteiinia, kun niitä ylläpidetään kapseloituna tämän keksinnön kitosaanimatriisissa.

Esimerkki 3

PC12-solujen kapselointi

PC12-soluja viljeltiin RPMI-elatusaineessa, joka oli täydennetty 10 %:lla lämmön avulla inaktivoitua hevosen seerumia, 5 %:lla naudan sikiön seerumia (Hazelton, Lenexa, KS) ja 100 yksiköllä penisilliiniä/streptomysiiniä. PC12-solujen viljelmiä kasvatettiin suspensioviljelmässä vedellä kyllästetyssä, 7 % CO_2:a sisältävässä inkubaattorissa 37 °C:n lämpötilassa.

PC12-solut saatiin viljelmämaljalta trituroimalla varovasti elatusainetta solususpension muodostamiseksi. Suspensiot sentrifugoitiin kierrosnopeudella 800 g, minkä jälkeen 2 x 10^6 solua/ml soluja suspendoitiin uudelleen 50 ul:aan niiden vastaavaa elatusainetta. Solususpensiot lisättiin 250 ul:aan kitosaanimatriisiliuosta, joka oli valmistettu esimerkin 1 mukaan ja seos valettiin PAN/PVC-kuidun sisään, kuten esimerkissä 2. Kuitu jaettiin erillisiin osiin ja kuidun päät suljettiin tiiviisti käyttäen lämpötiivistysmenetelmää. Sitten kapseleita inkuboitiin fysiologisessa suolaliuoksessa 3 minuutin ajan aiheuttaen kitosaanin saostumisen. Soluja sisältävät kitosaanikapselit siirrettiin elatusaineisiin ja niitä ylläpidettiin kostutetussa, 7 % CO_2:a sisältävässä inkubaattorissa 37 °C:n lämpötilassa. Samanlaiset kapselit valmistettiin käyttäen 2 % alginaattia kitosaanin sijasta.

Kapseloituja PC12-soluja ylläpidettiin viljelmässä 4 viikon ajan, jona aikana solut lisääntyivät kitosaanimatriisissa ja solujen kuolema oli minimaalista. PC12-solut kaliumin stimuloimissa olosuhteissa vapauttivat 1 - 2 nanomolaarisia konsentraatioita dopamiinia 4 viikon kuluttua. PC12-solut kapseleissa, joissa oli alginaattiytimet, olivat myös eläviä 4 viikon kuluttua. Kuitenkin solut esiintyivät pienissä pallomaisissa rykelmissä alginaatissa. Näky-

vissä oli vähän tai ei lainkaan neuriittisia ekstroneja.

Esimerkki 4

Saostetun kitosaanimatriisin läsnäollessa kapseloitujen PC12-solujen elinkykyisyys in vivo

PC12-soluja on aikaisemmin kapseloitu ilman ydinmatriisia ja kapselit on implantoitu jyrsijöiden ja ei-ihmiskädellisten aivoihin. Solut säilyvät elävinä ja voivat parantaa parkinsonismin oireita muutamissa mallijärjestelmissä. Kuitenkin ydinmatriisien puuttuessa PC12-solut kasautuvat muodostaen suuria rykelmiä, jotka kehittävät nekroottisia ytimiä eivätkä jatka merkittäviä neuriittisia prosesseja. Nämä kokeet oli suunniteltu PC12-solujen esiintymisen ja kasvuominaisuuksien vertailemiseksi niiden kasvaessa saostettujen kitosaaniydinmatriisien läsnäollessa ja ilman niitä.

PC12-soluja viljeltiin suspensioviljelmisssä, ne kerättiin talteen, huuhdottiin RPMI-elatusaineella, sentrifugoitiin ja päällysneste dekantoitiin pois.

Liuotettiin 4,4 g Fluka High MW -kitosaania 150 ml:aan steriiliä 0,85-%:ista suolaliuosta 70 °C:n lämpötilassa sekoittaen voimakkaasti. Liuoksen pH säädettiin arvoon 6,2 käyttäen 45 ml 100 mM HEPESillä puskuroitua suolaliuosta (pH-arvo 8,0). Liuos suodatettiin steriilisti 0,22 um:n millihuokossuodattimen läpi.

Kitosaaniliuos sekoitettiin sitten yhtä suuren tilavuuden kanssa RPMI-elatusainetta ja seos käytettiin solupelletin suspendoimiseksi uudelleen konsentraatioon 5 x 10^6 solua/ml. Solut/kitosaaniliuos (≈ 1 000 ul) ekstrudoitiin yhdessä PAN/PVC:n kanssa puoliläpäiseväksi PAN/PVC-kuiduksi (sisähalkaisija ≈ 700 um, ulkohalkaisija ≈ 950 um, MWCO ≈ 60 kd). Kuidut viimeisteltiin sopiviin dimensioihin (1,1 ± 0,1 cm) ja suljettiin tiiviisti rypyttämällä päät ja käyttämällä lämpöa sulkemiseen. Tiivisteet suljettiin sitten PAN/PVC:ssä (15 g PAN/PVC : 85 g DMSO). Soluja pidettiin viljelmässä RPMI-elatusaineessa + 6 um:ssa insuliinia 24 - 48 tunnin ajan ennen implantaatiota.

Kontrollikapselit valmistettiin käyttäen samaa menetelmää paitsi että käytettiin Hepes-puskuroitua suolaliuosta ilman kitosaania.

Kapseloidut PC12-solut implantoitiin ketamiinilla nukutettujen synomologisten apinoiden tyvitumakkeeseen. Kallon avaaminen toteutettiin käyttäen vakiohuuhtelua 0,9-%:isella steriilillä suolaliuoksella. Injektiokoordinaatit olivat (suhteessa keskilinjaan):

CI = 21,0 mmA x 4,5 mmL (14,5 mmV)

PI = 23,0 mmA x 9,0 mmL (14,0 mmV)

P2 = 19,0 mmA x 10,0 mmL (12,0 mmV)

P3 = 15,5 mmA x 11,5 mmL (13,0 mmV)

Teflonkanyylin kärki, joka oli erityisesti suunniteltu kapselin varustamiseksi minimaalisella liikkumavaralla ja joka sisälsi sulkijan, oli asetettu sopiviin koordinaatteihin aivojuovioon. Sulkija poistettiin ja kapseli pantiin kanyyliin ja sijoitettiin aivojuovioon. Sitten kanyyli poistettiin, kolme muuta kapselia aetettiin samalla tavoin viereisille aivojuovion alueille. Implantaation jälkeen kovakalvo suljettiin ja kallon siirre asetettiin paikalleen ja varmistettiin ja ommeltiin.

Neljä viikkoa implantaation jälkeen kapselit otettiin pois ja toteutettiin histologinen analyysi. Niissä kapseleissa, jotka sisälsivät tämän keksinnön kitosaaniydinmatriisin, solut olivat eläviä ja pieniä rykelmiä oli jakautuneena pitkin kapselin pituutta. Kapseleissa, joissa ei ollut kitosaaniytimiä, PC12-solut olivat kasautuneet suuriin rykelmiin, joissa oli nekroottisia ytimiä.

PC12-solujen parantunut elinkykyisyys tämän keksinnön kitosaanimatriisissa nähdään helposti verrattaessa kuvia 1 ja 2. Kuva 1 esittää PC12-solujen hyvin suuria rykelmiä termoplastisesta kapseli-implantista ilman ydinmatriisia. Useita valkoisia nekroottisia soluytimiä (so. kuolleita soluja) on selvästi silminnähtävissä solurykelmässä ylhäällä vasemmalla. Kuva 2 esittää PC12-soluja, jotka on upotettu tämän keksinnön saostettuun kitosaaniydinmatriisi-implanttiin.

Yleensä solurykelmät kuvassa 2 ovat paljon pienempiä eikä nekroosista ole merkkiäkään.

Esimerkki 5

Saostettujen kitosaaniydinmatriisien valmistus kolmiulotteista PC12-solujen kiinnittymis/ylläpito-esikapselointia varten

Otettiin 8 ml solususpensiota, joka sisälsi 0,5 - 1 x 10^6 solua/ml PC12-soluja, viljelmäpulloista (trituroitu pos rotan hännän kollageenisubstraatti), pantiin 15 ml:n kartiomuotoiseen sentrifugiputkeen ja sekoitettiin 2 ml:n kanssa 2-%:ista kitosaaniliuosta (Fluka HV) 25 mM HEPES:issä isotonisessa suolaliuoksessa, pH-arvo 6,4. Solu/kitosaaniliuosta sekoitettiin varovasti käänteisesti, kunnes hiutalemainen sakka havaittiin.

Sitten solu/kitosaaniliuos pantiin 100 mm:n petrimaljalle ja sitä viljeltiin staattisessa viljelmässä 37 °C:n lämpötilassa, 7 % CO_2:a, PC12-elatusaineessa. Solujen havaittiin kasvavan viinirypäletertun muotoisissa rykelmissä hiutalemaisen saostuneen kitosaanin sisällä.

Viiden päivän kuluttua viljelmässä PC12-solujen/kitosaanin rakennelmat kerättiin talteen sentrifugoimalla kierrosnopeudella 500 x g kartiomuotoisissa sentrifugiputkissa. Näissä olosuhteissa yksittäisiä soluja jäi suspendoituneena päällysnesteeseen ja PC12-solujen/kitosaanin kompleksi muodosti pelletin. Puolet elatusaineesta dekantoitiin sitten ja korvattiin tuoreella elatusaineella (ilman kitosaania). PC12-solujen/kitosaanin kompleksi joko asetettiin uudelleen maljalle tässä kohdin tai suspendoitiin ja pantiin esimuodostettuihin PAN/PVC-kapseleihin tiheyden ollessa 5 - 10 x 10^6 solua/ml.

Patenttivaatimukset

1. Kapselointilaite elävien solujen ylläpitämiseksi, kasvamiseksi, proliferoitumiseksi tai erilaistumiseksi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää kolmiulotteisen hienojakoisen, oleellisesti silloittamattoman kitosaaniydinmatriisin, joka on suljettu läpäisevän tai puoliläpäisevän vaipan sisään.

2. Soluviljelmä, t u n n e t t u siitä, että sitä ylläpidetään patenttivaatimuksen 1 mukaisessa matriisissa.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen soluviljelmä, t u n n e t t u siitä, että se käsittää solut, jotka on valittu ryhmästä, joka koostuu neurosekretorisista solulinjoista, ß-soluista johdetuista solulinjoista, fibroblasteista, lihassoluista ja hermoston tukisoluista.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen soluviljelmä, t u n n e t t u siitä, että neurosekretoriset solulinjat ovat PC12-soluja, ß-soluista johdetut solulinjat ovat NIT- tai RIN-soluja ja hermoston tukisolut ovat astrosyyttejä.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen laite, t u n n e t t u siitä, että vaippa koostuu termoplastisesta materiaalista.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen laite, t u n n e t t u siitä, että hiukkaset on muodostettu saostamalla kitosaaniliuos.

7. Menetelmä kudokseen implantoitavan laitteen valmistamiseksi, joka sisältää eläviä soluja vaipalla varustetussa ydinmatriisissa, t u n n e t t u siitä, että

(a) valmistetaan liuos, joka sisältää liuennutta kitosaania;

(b) sekoitetaan kohdan (a) liuos elävien solujen kanssa seoksen muodostamiseksi;

(c) kapseloidaan kohdan (c) seos läpäisevällä tai puoliläpäisevällä vaipalla laitteen muodostamiseksi ja

(d) saostetaan kitosaani laitteessa hienojakoisen kitosaaniydinmatriisin muodostamiseksi, johon mainitut elävät solut ovat dispergoituneena.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitut solut on valittu ryhmästä, joka koostuu neurosekretorisista solulinjoista, ß-soluista johdetuista solulinjoista, fibroblasteista, lihassoluista ja hermoston tukisoluista.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että neurosekretoriset solulinjat ovat PC12-soluja, ß-soluista johdetut solulinjat ovat NIT- tai RIN-soluja ja hermoston tukisolut ovat astrosyyttejä.

10. Patenttivaatimuksen 7 mukaisen menetelmän mukaisesti valmistettu, soluja ydinmatriisissa sisältävä implantoitava laite.

11. Menetelmä kudokseen implantoitavan laitteen valmistamiseksi, joka sisältää eläviä soluja vaipalla varustetussa ydinmatriisissa, t u n n e t t u siitä, että

(a) valmistetaan kitosaanin vesiliuos;

(b) sekoitetaan kohdan (a) liuos elävien solujen kanssa, jotta muodostuu seos, jolla on ensimmäinen pH-arvo;

(c) kapseloidaan kohdan (b) seos läpäisevällä tai puoliläpäisevällä vaipalla laitteen muodostamiseksi, ja

(d) saostetaan kitosaani oleellisesti silloittamattomassa muodossa laitteen sisällä säätämällä ensimmäinen pH-arvo toiseksi pH-arvoksi, joka on suurempi kuin mainittu ensimmäinen pH-arvo ja joka on myös vaaraton mainituille soluille.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitut solut on valittu ryhmästä, joka koostuu neurosekretorisista solulinjoista, ß-soluista johdetuista solulinjoista, fibroblasteista, lihassoluista ja hermoston tukisoluista.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että neurosekretoriset solulinjat ovat PC12-soluja, ß-soluista johdetut solulinjat ovat NIT- tai RIN-soluja ja hermoston tukisolut ovat astrosyyttejä.

14. Patenttivaatimuksen 11 mukaisen menetelmän mukaisesti valmistettu, soluja ydinmatriisissa sisältävä implan-

toitava laite.

15. Menetelmä kudokseen implantoitavan laitteen valmistamiseksi, joka sisältää eläviä soluja vaipalla varustetussa ydinmatriisissa, t u n n e t t u siitä, että

(a) valmistetaan liuos, jossa on liuennutta kitosaania;

(b) aiheutetaan kitosaanin saostuminen sekoittamalla kohdan (a) liuos elävien solujen kanssa ilman silloitusta aiheuttavia aineita seoksen muodostamiseksi, jossa on hienojakoista kitosaania;

(c) kapseloidaan kohdan (b) seos läpäisevällä tai puoliläpäisevällä vaipalla laitteen muodostamiseksi.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että mainitut solut on valittu ryhmästä, joka koostuu neurosekretorisista solulinjoista, ß-soluista johdetuista solulinjoista, fibroblasteista, lihassoluista ja hermoston tukisoluista.

17. Patenttivaatimuksen 16 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että neurosekretoriset solulinjat ovat PC12-soluja, ß-soluista johdetut solulinjat ovat NIT- tai RIN-soluja ja hermoston tukisolut ovat astrosyyttejä.

18. Patenttivaatimuksen 15 mukaisen menetelmän mukaisesti valmistettu, soluja ydinmatriisissa sisältävä implantoitava laite.

19. Soluviljelmälaite, t u n n e t t u siitä, että se sisältää

(a) suuren määrän eläviä soluja;

(b) kolmiulotteisen matriisin, mainitun matriisin sisältäessä hienojakoista kitosaania, joka on oleellisesti silloittamatonta ja

(c) puoliläpäisevän tai läpäisevän vaipan, joka sulkee sisäänsä (a):n ja (b):n.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen soluviljelmälaite, t u n n e t t u siitä, että mainitut solut on valittu ryhmästä, joka koostuu neurosekretorisista solulinjoista, ß-soluista johdetuista solulinjoista, fibroblasteista, lihas-

soluista ja hermoston tukisoluista.

21. Patenttivaatimuksen 20 mukainen soluviljelmälaite, t u n n e t t u siitä, että neurosekretoriset solulinjat ovat PC12-soluja, ß-soluista johdetut solulinjat ovat NIT- tai RIN-soluja ja hermoston tukisolut ovat astrosyyttejä.

22. Menetelmä kudosviljelmän inokuloimiseksi, t u n n e t t u siitä, että

(a) liuotetaan ennalta määrätty määrä kitosaania vesiliuokseen;

(b) sekoitetaan kohdan (a) liuos elävien solujen kanssa silloitusta aiheuttavien aineiden puuttuessa;

(c) suljetaan kohdan (b) seos läpäisevän tai puoliläpäisevän membraanin sisään;

(d) aiheutetaan kohdan (c) tuotteessa olevan kitosaanin saostuminen ilman oleellista silloittumista hienojakoisen, oleellisesti silloittamattoman kitosaaniytimen muodostamiseksi;

(e) viljellään soluja hienojakoisessa kitosaanissa eläviä soluja sisältävän matriisin muodostamiseksi ja

(f) inokuloidaan kudosviljelmä kohdan (e) soluja sisältävällä matriisilla.

23. Menetelmä kudosviljelmän inokuloimiseksi, t u n n e t t u siitä, että

(a) liuotetaan ennalta määrätty määrä kitosaania vesiliuokseen;

(b) aiheutetaan kitosaanin saostuminen sekoittamalla kohdan (a) liuos elävien solujen kanssa silloitusta aiheuttavien aineiden puuttuessa seoksen muodostamiseksi, joka sisältää hienojakoista kitosaania;

(c) suljetaan kohdan (b) seos läpäisevän tai puoliläpäisevän membraanin sisään;

(d) viljellään soluja hienojakoisessa kitosaanissa eläviä soluja sisältävän matriisin muodostamiseksi ja

(e) inokuloidaan kudosviljelmä kohdan (d) soluja sisältävällä matriisilla.

24. Kiinteä kolmiulotteinen laite elävien solujen ylläpitämiseksi, viljelemiseksi ja lisääntymiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää eläviä PC12-soluja dispergoituneena hienojakoiseen, oleellisesti silloittamattomaan kitosaaniydinmatriisiin, joka on suljettu termoplastisen vaipan sisään.

25. Implantoitava immunoeristetty laite biologisesti aktiivisen tuotteen tai toiminnan tuottamiseksi yksilöön, t u n n e t t u siitä, että mainittu immunoeristetty laite sisältää:

(a) ytimen, joka sisältää PC12-soluja dispergoituna hienojakoiseen, oleellisesti silloittamattomaan kitosaaniydinmatriisiin, mainittujen solujen ollessa kykeneviä erittämään valittua biologisesti aktiivista tuotetta tai tuottamaan valitun biologisen toiminnan yksilössä ja

(b) mainittua ydintä ympäröivän ulkoisen vaipan, joka on muodostettu termoplastisesta materiaalista, joka ei sisällä mainittuja soluja ulottuneena siitä ulospäin, sallien yksilön ja ytimen välillä mainitun vaipan läpi aineiden kulun, joka vaaditaan mainitun biologisen tuotteen tai toiminnan tuottamiseksi, jolloin mainittu ydin ja mainittu vaippa eivät sisällä silloitusta niiden välillä olevalla rajapinnalla.



FIG. 1

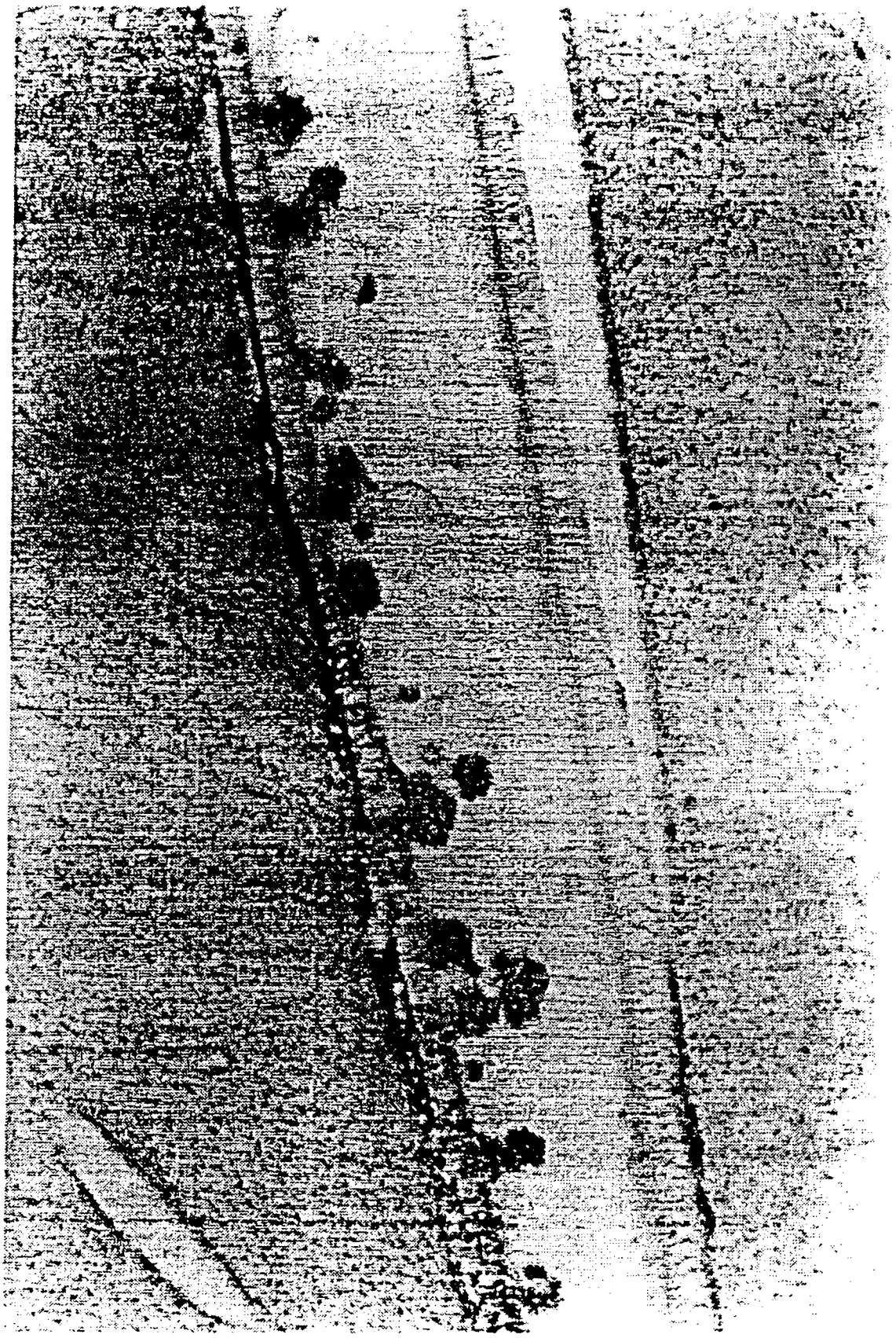

FIG. 2