(19)

SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 934545 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 934545

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
A61K 35/12
A61L 27/00
C12N 5/00
C12N 11/04

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **22.04.1992**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **14.10.1993**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **01.12.1993**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **22.04.1992 PCT/US1992/003327**

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

25.04.1991 US 692403

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •**Brown University Research Foundation,** Box 1949, Graduate Center, 3rd Floor Brown University, 42 Charlesfield Street, Providence, R.I. 02912, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •**Dionne, Keith E.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •**Emerich, Dwaine F.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •**Hoffman, Diane,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 •**Scharp, David W.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
5 •**Lacy, Paul E.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
6 •**Aebischer, Patrick,** Barrington, RI 02802, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
7 •**Sanberg, Paul R.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
8 •**Christenson, Lisa,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
9 •**Hegre, Orion D.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
10 •**Vasconcellos, Alfred V.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
11 •**Lysaght, Michael J.,** USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
12 •**Gentile, Frank T.,** 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

Biologisesti yhteensoveltuva immunoeristetty välittäjä valitun terapeu ttisen tuotteen luovuttamiseksi

Biokompatibel immunoisolerad bärare för överlämnandet av en vald terap eutisk produkt

MENETELMÄ IMPLANTOITAVAN VÄLITTÄJÄN VALMISTAMISEKSI

Läheisesti yhteenkuuluva patenttihakemus

Tämä on patenttihakemuksen U.S.S.N 07/692 403, jätetty 25. huhtikuuta, 1991, jatko-osapatenttihakemus 35 USC 120:n alaisena.

Tausta

Monia kliinisiä terveydentiloja, puutoksia ja tautitiloja voidaan korjata tai lievittää antamalla potilaalle elävien solujen tuottamaa tekijää tai tekijöitä tai poistamalla potilaasta haitallisia tekijöitä, joita elävät solut metaboloivat. Monissa tapauksissa nämä tekijät voivat palauttaa tai korvata elimen tai kudoksen toiminnan heikentymisen tai puutteen. Esimerkkeihin tauti- tai puutostiloista, joiden etiologiaan sisältyy erittävän elimen tai kudoksen toiminnan puuttuminen, sisältyvät (a) diabetes, jossa haiman Langerhansin saarekkeiden insuliinin tuotanto on heikentynyt tai puuttuu; (b) lisäkilpirauhasen vajaatoiminta, jossa lisäkilpirauhashormonin tuotannon puuttuminen saa aikaan seerumin kalsiumpitoisuuksien alenemisen, josta on seurauksena vaikea lihasten tetania; (c) parkinsonismi, jossa dopamiinin tuotanto on vähentynyt ja (d) anemia, jolle on tunnusomaista punaisten verisolujen tuotannon puuttuminen johtuen erytropoietiinin puutteesta. Elimen tai kudoksen toiminnan heikentymisestä voi olla seurauksena muiden aineenvaihduntatoimintojen häviäminen. Esimerkiksi äkillisessä maksan toimintahäiriössä maksakudos muuttuu kykenemättömäksi poistamaan myrkkyjä, erittämään pois solun aineenvaihdunnan tuotteita ja erittämään oleellisia tuotteita, kuten albumiinia ja tekijä III:a. Bontempo, F. A. et al., Blood 69 : 1721 - 1724, (1987).

Muissa tapauksissa nämä tekijät ovat biologisen vasteen muuntajia, kuten lymfokiineja tai sytokiineja, jotka tehostavat potilaan immuunijärjestelmää tai toimivat tulehdusta estävinä aineina. Nämä voivat olla erityisen käyttökelpoisia yksilöillä, joilla on krooninen loistauti tai infektiotauti, ja ne voivat olla myös käyttökelpoisia tiettyjen syöpätautien hoitamiseksi. Voi myös olla toivottavaa, että potilaalle annetaan troofisia tekijöitä, kuten hermosolujen kasvutekijää tai insuliinin kaltaista kasvutekijä 1:tä tai 2:ta (IGF1 tai IGF2).

Monissa tauti- tai puutostiloissa sairastunut elin tai kudos on elin tai kudos, joka normaalisti toimii tuottaen vasteen spesifisten aineenvaihduntatuotteiden pitoisuuksien vaihtelulle, ylläpitäen siten homeostaasia. Esimerkiksi lisäkilpirauhanen muuntaa normaalisti lisäkilpirauhashormonin (PTH) tuotantoa vasteena seerumin kalsiumpitoisuuksien vaihteluille. Samoin ß-solut haiman

Langerhansin saarekkeissa muuntavat normaalisti insuliinin tuotantoa vasteena seerumin glukoosipitoisuuksien vaihteluille. Traditionaaliset hoidolliset ratkaisut tällaisten tautien hoitamiseksi eivät voi kompensoida normaalin kudoksen vastevaikutusta näihin vaihteluihin. Esimerkiksi hyväksytty diabeteksen hoito sisältää päivittäiset insuliiniruiskeet. Tämä hoito ei voi kompensoida seerumin glukoosipitoisuuksien nopeita, ohimeneviä vaihteluja, jotka ovat esimerkiksi rasittavan liikunnan tuottamia. Epäonnistuminen tällaisen kompensaation tuottamisessa voi johtaa tautitilan komplikaatioihin; tämä on erityisesti totta diabeteksen kohdalla. Jarret, R. J. ja Keen, J., Lancet (2): 1009 - 1012 (1976).

Siten monet tutkijat ovat yrittäneet muodostaa uudelleen elimen tai kudoksen toimintaa siirtämällä kokonaisia elimiä, elinkudosta tai soluja, jotka tuottavat eritystuotteita tai vaikuttavat aineenvaihdunnan toimintoihin. Lisäksi siirtäminen voi tuottaa ratkaisevia etuja, mutta sen soveltamista rajoittaa se, että suhteellisen pieni määrä elimiä on sopivia ja saatavissa siirrettäväksi. Yleensä potilaan immuunivasteen täytyy olla heikennetty kudossiirrännäisen immunologisen hylkimisreaktion torjumiseksi, josta on tuloksena siirrännäisen toiminnan häviäminen ja lopulta siirretyn kudoksen tai siirrettyjen solujen kuolio. Monissa tapauksissa kudossiirrännäisen täytyy pysyä toiminnallisena pitkän aikaa, jopa potilaan jäljellä olevan eliniän ajan. On sekä ei-toivottavaa että kallista pitää potilasta huomattavan pitkän aikaa tilassa, jossa immuunivaste on heikennetty.

Toivottava vaihtoehto tällaisille kudoksensiirtomenetelmille on solujen tai kudosten implantointi fysikaalisen esteen sisälle, joka tekee mahdolliseksi ravinteiden, jäteaineiden ja eritettyjen tuotteiden diffuusion, mutta estää immunologisen hylkimisreaktion sellulaariset tai molekulaariset efektorit. On tutkittu erilaisia laitteita, jotka suojaavat valitun tuotteen tuottavia kudoksia tai soluja immuunijärjestelmältä. Näihin laitteisiin sisältyvät suonenulkopuoliset diffuusiokammiot, suonensisäiset diffuusiokammiot, suonensisäiset ultrasuodatuskammiot ja mikrokapseloitujen solujen implantaatio. Scharp, D. W. et al, World J. Surg., 8 : 221 - 229, (1984). Näiden laitteiden on arveltu tuottavan merkittävän edun kudoksensiirtoalalla, koska ne saattaisivat vähentää tarvetta pitää potilasta tilassa, jossa immuunivaste on heikennetty, ja siten ne saattaisivat tehdä mahdolliseksi sen, että useammat potilaat voisivat ottaa vastaan elvyttäviä tai muuten hyödyllisiä siirrännäisiä tekemällä mahdolliseksi sellaisten luovuttajasolujen tai -kudoksen käytön, joita tavanomaisella kudoksensiirtotekniikalla ei ole voitu käyttää. Kuitenkaan mitkään näistä ongelman ratkaisuyrityksistä eivät ole olleet tyydyttäviä pitkä-aikaisen kudossiirrännäisen toiminnan tuottamiseksi. Menetelmää tarvittavien aineiden, kuten entsyymien ja hormoonien, sopivien määrien vapauttamiseksi tai muiden tarvittavien aineenvaihduntatoimintojen

tuottamiseksi pitkäksi aikaa ei ole vieläkään käytössä, mutta se olisi hyvin edullinen potilaille, jotka tarvitsevat pitkäaikaista hoitoa.

Yhteenveto keksinnöstä

Tämä keksintö kohdistuu menetelmään biologisesti yhteensopivan, immunoeristetyn, implantoitavan välittäjän valmistamiseksi. Tämä välittäjä on sopiva biologisesti aktiivisten solujen tai aineiden eristämiseksi elimistön suojamekanismeilta yksilöön implantoinnin jälkeen. Tämä välittäjä koostuu (a) ytimestä, joka sisältää eristetyt solut, joko suspendoituna nestemäiseen väliaineeseen tai immobilisoituna hydrogeelimatriisiin, ja (b) ympäröivän tai perifeerisen alueen ("vaipan"), joka koostuu läpäisyselektiivisestä matriisista tai membraanista eikä sisällä eristettyjä soluja ja on biologisesti yhteensopiva ja riittävä suojaamaan ytimessä olevia eristettyjä soluja immunologiselta hyökkäykseltä.

Tässä termi "yksilö" viittaa ihmiseen tai eläimeen.

Tässä määritettynä termi "kaksoismatriisin omaavat välittäjät" viittaa välittäjiin, joissa on soluja sisältävä ydin ja soluista vapaa ulkopuolinen vaippa. Yhdessä suoritusmuodossa matriisiydin on muodostettu hydrogeelistä, joka on silloitettu hydrogeelivaippaan, sopivasti sauvan muodossa tai muussa muodossa. Hydrogeelivaippa voi olla muodostettu itsenäisesti tuppena matriisin ympärille ilman silloitusta. Hydrogeeliydin ei ole välttämättä sitoutunut ulompaan vaippaan vastakkaisten ionivarausten avulla. Toisessa suoritusmuodossa ulkoinen vaippa on muodostettu termoplastisesta aineesta, joka ei ole sitoutunut ydinmatriisiin kemiallisen sidoksen avulla.

Tässä käytettynä, ellei toisin mainita, termi "solut" tarkoittaa soluja missä tahansa muodossa, mukaan luettuna, mutta rajoittumatta niihin, solut, jotka ovat pidättyneet kudokseen, soluryhmät ja yksilöllisesti eristetyt solut, ellei toisin määritetä.

Immunoeristetyn välittäjän ydin on muodostettu siten, että se tuottaa sopivan paikallisen ympäristön siihen eristetyille nimenomaisille soluille. Joissakin suoritusmuodoissa ydin käsittää nestemäisen väliaineen, joka on riittävä solujen ylläpitämiseksi. Nestemäiset ytimet ovat erityisen sopivia transformoitujen solujen, kuten PC12-solujen, ylläpitämiseksi. Muissa suoritusmuodoissa ydin käsittää geelimatriisin, joka immobilisoi ja jaottelee solut vähentäen siten tiheiden solurykelmien muodostumista. Geelimatriisi voi olla koostunut hydrogeelimatriisikomponentista tai ekstrasellulaarisista matriisikomponenteista.

Hydrogeelimatriisista valmistetut ytimet ovat erityisen sopivia solujen tai kudosten ylläpitämiseksi, jotka pyrkivät muodostamaan rykelmiä, kuten solut Langerhansin saarekkeissa tai adrenaaliset kromaffiinisolut. Matriisin viskositeetin pitäisi olla riittävä solujen dispersion säilyttämiseksi matriisin sisällä.

Mahdollisesti tämän välittäjän ydin voi sisältää aineita, jotka tukevat tai edistävät eristettyjen solujen toimintaa. Näihin aineisiin sisältyvät luonnolliset tai synteettiset ravinnelähteet, ekstrasellulaarisen matriisin (ECM) aineosat, kasvutekijät tai kasvua säätelevät aineet tai syöttäjäsolujen tai lisäsolujen populaatio tai O_2:n kantajat, kuten hemoglobiinit ja fluorihiilivedyt.

Aikaisemmin olemassa olevissa laitteissa ydin ja vaippa olivat sitoutuneet ionisidosten avulla vastakkaisen varauksen omaavien polymeerien välillä toisella kahdesta tavasta. (1) Rha'n laitteet (US-patentti 4 744 933) oli muodostettu varatusta sisäydinmateriaalista ja ulkovaippamateriaalista, jolla oli vastakkainen varaus. (2) Lim'in ja Sun'in laitteet (US-patentit 4 352 833 ja 4 409 331) sisälsivät poly-L-lysiinistä (PLL) muodostuvan välikerroksen, joka oli positiivisesti varautunut ja sitoi negatiivisesti varautuneen ytimen negatiivisesti varattuun vaippamateriaaliin. PLL-kerroksen jättäminen pois on edullista siinä mielessä, että PLL:n uskotaan olevan fibrogeeninen isännässä. PLL:llä voi myös olla ei-haluttuja kasvuvaikutuksia joihinkin soluihin. Keksinnön mukaisessa ratkaisussa hyödynnetyn laitteen vaipan läpäisyselektiivisyyttä voidaan siis valvoa paremmin kuin PLL:ä sisältävien laitteiden.

Tässä keksinnön mukaisessa ratkaisussa esitetty välittäjän vaippa on valmistettu aineesta, joka voi olla samaa kuin ytimen aine tai se voi olla erilaista. Kummassakin tapauksessa käytetty aine tuottaa tulokseksi ympäröivän tai perifeerisen alueen, joka on läpäisyselektiivinen, biologisesti yhteensopiva ja immunoeristetty. Vaippa voi olla muodostettu vapaasti ytimen ympärille ilman kemiallista sidosta tai vaihtoehtoisesti vaippa voi olla suoraan silloitettu ydinmatriisiin. Kummassakaan tapauksessa välittäjän muodostaminen ei vaadi polymeereja, joilla on vastakkainen varaus ytimeen nähden ja jotka ovat läsnä välikerroksessa tai vaipassa.

Edullisesti ydin ja ulkopuolinen vaippa muodostavat rajapinnan, joka on vapaa "ionisitoutumisesta" vastakkaisesti varattujen polymeerien välillä ja vapaa sen tyyppisestä välikerroksesta, jota on käytetty aikaisemman tekniikan tason mukaisissa mikrokapseleissa. Ionisitoutuminen viittaa yhden varauksen omaavan (positiinen tai negatiivinen) ytimen ja vastakkaisen varauksen omaavan vaipan (tai välikerroksen) ionivuorovaikutukseen.

Vaippa tekee mahdolliseksi sen, että aineet, joilla on ennalta määrätty enimmäiskoko, voivat kulkea läpi, mutta suurempikokoisten aineiden läpikulku estyy. Spesifisemmin ympäröivä tai perifeerinen alue tuotetaan siten, että sillä on ennalta määrätyn kokovaihtelualueen omaavia huokosia ja onkaloita, minkä seurauksena välittäjä on läpäisyselektiivinen. Molekyylipainon enimmäisraja (MWCO), joka on valittu nimenomaisen välittäjän tapauksessa, määrätään

osittain välittäjän implantaation jälkeen odotettavissa olevan immunologisen hylkimisreaktion tyypin ja laajuuden mukaan, ja osittain suurimman aineen molekyylikoon mukaan, jonka sallitaan kulkea sisään välittäjään ja/tai ulos siitä. Esimerkiksi aineita voidaan käyttää läpäisyselektiivisten membraanien tai hydrogeelimatriisien valmistamiseksi, jotka sallivat niiden molekyylien läpikulun, jotka ovat kooltaan enintään noin C1q:n koko; C1q on komplementin komponentti (noin 6,6 x 10^{-19} g, noin 400 kD), proteiini, joka tarvitaan sytolyyttisen komplementtihyökkäyskompleksin kokoonpanoa varten. Tässä tapauksessa aineet, jotka ovat pienempiä kuin C1q, voivat kulkea vapaasti. On myös mahdollista muodostaa läpäisyselektiivisiä matriiseja tai membraaneja, jotka sallivat niiden molekyylien läpikulun, joiden koko on enintään noin immunoglobuliini G:n koko (noin 2,475 x 10^{-19} g, noin 150 kD), ja sulkevat ulos suuremmat molekyylit. Lisäksi voidaan käyttää membraaneja tai hydrogeelejä, jotka sallivat niiden molekyylien läpikulun, joiden koko on enintään noin immunoglobuliini M:n koko (noin 1,65 x 10^{-18} g, noin 1 000 kD); tässä suoritusmuodossa suljetaan ulos vain hyvin suuret aineet, kuten solut.

Vaippa on myös biologisesti yhteensopiva. Se tarkoittaa sitä, että se ei aiheuta isännässä haitallista vastetta, joka on riittävä tuottamaan tuloksesi implantoidun välittäjän hylkimisen tai muuttamaan välittäjän toimintakyvyttömäksi. Myöskään vaippa ei aiheuta epäsuotuisia kudosvasteita, kuten fibroosia. Lisäksi ulkoinen pinta voidaan valita tai suunnitella siten, että se on erityisen sopiva valittuun paikkaan tapahtuvaa implantaatiota varten. Esimerkiksi ulkoinen pinta voi olla tasainen, täplitetty tai karkea riippuen siitä, onko ympäröivän kudoksen solujen kiinnittyminen toivottavaa. Muoto tai konfiguraatio voidaan myös valita tai suunnitella siten, että se on erityisen tarkoituksenmukainen valittua implantaatiopaikkaa varten.

Tämän välittäjän vaippa on lisäksi immunoeristetty. Se tarkoittaa sitä, että se suojaa välittäjän ytimessä olevat solut implantoidun välittäjän omaavan yksilön immuunijärjestelmältä. Se tekee siten (1) estämällä yksilön elimistön haitallisten aineiden pääsyn välittäjän ytimeen, (2) minimoimalla kosketuksen yksilön ja tulehduksellisten, antigeenisten tai muuten haitallisten aineiden välillä, joita voi olla läsnä ytimessä ja (3) tuottamalla tilaesteen, joka on riittävä immunologisen kosketuksen estämiseksi eristettyjen solujen ja yksilön immuunijärjestelmän haitallisten osien välillä. Tämän keksinnön mukaisesti valmistettu välittäjä eroaa Lim'in ja Sun'in mikrokapseleista [Lim, F., Sun, A. M., Science 210 : 908 - 910 (1980); Sun A. M., Methods in Enzymology 137: 575 - 579 (1988)] ulomman vaippansa suhteen, joka varmistaa, että solut eivät voi työntyä ytimestä ulos. Lim'in ja Sun'in kapseleilla oli haittapuolena, että osia

kapseloiduista soluista saattoi mahdollisesti työntyä ytimestä poly-L-lysiinikerroksen läpi ja siten aiheuttaa todennäköisemmin isännän immuunijärjestelmän aiheuttamia tulehduksellisia vasteita. Tämä mikrokapseliteknologia perustuu siihen, että läsnä on mahdollisesti bioaktiivisia ionisidoksia mikrokapseleiden muodostamiseksi. Ionimuotoisen luonteensa nojalla nämä mikrokapselit ovat alttiina huononemiselle implantaation jälkeen johtuen ionisidoksia koskevasta kilpailusta, joka tapahtuu isännän elimistössä kapselin implantaation jälkeen. Tämä ongelma minimoidaan tämän keksinnön suhteellisen ei-ioniaktiivisten makrokapseleiden avulla. Mainittujen makrokapseleiden muu etu on siinä, että ne kykenevät sisältämään enemmän soluja yhdessä laitteessa kuin on mahdollista mikrokapseliteknologiassa.

Ympäröivä tai perifeerinen alue (vaippa) voidaan valmistaa hydrogeelimatriisista tai muusta aineesta, kuten termoplastisesta membraanista. Se voidaan tehdä myös matriisi-membraani-komposiitista siten, että muodostuu läpäisyselektiivinen termoplastinen membraani, jossa on matriisin täyttämät huokoset.

Sopivasti ulkoinen vaippa voidaan muodostaa termoplastisesta materiaalista, jonka tiedetään olevan biologisesti yhteensopiva, kuten tässä kuvatuista materiaaleista. Lisäksi tässä voidaan käyttää muita vaippoja, joita on käytetty mikrokapselialalla, kuten alginaattia, joka on sopivasti silloitettu moniarvoisen ionin, kuten kalsiumin, avulla.

Immunoeristetty välittäjä on käyttökelpoinen (a) vapauttamaan erilaisia sellulaarisia tuotteita, mukaan luettuna suurimolekyylipainoiset tuotteet, niiden tarpeessa olevaan yksilöön ja/tai (b) tuottamaan tarvittavat aineenvaihduntatoiminnat yksilössä, kuten haitallisten aineiden poistamisen. Tämä välittäjä sisältää suuren määrän soluja siten, että muutaman tai yhden välittäjän implantaatio on riittävä tarvittavan aineen tai toiminnan tehokkaan määrän tuottamiseksi yksilössä. Tämän välittäjän tarjoama muu etu on takaisinsaannin käytännöllisyys.

Tämän keksinnön yhdessä suoritusmuodossa, joka on erityisen käyttökelpoinen Langerhansin saarekkeiden tapauksessa, tämän välittäjän sekä ydin että ympäröivä tai perifeerinen alue ovat hydrogeelejä, jotka voivat olla samanlaisen tai erilaisen koostumuksen omaavia hydrogeelejä.

Tämä keksintö koskee menetelmää biologisesti yhteensopivan, immunoeristetyn välittäjän valmistamiseksi. Ensimmäisessä suoritusmuodossa välittäjä muodostetaan suulakepuristamalla sisäkkäiset putket omaavasta suulakepuristussuuttimesta yhdessä aineet, jotka muodostavat ytimen ja ympäröivät tai perifeeriset alueet, olosuhteissa, jotka ovat riittävät ympäröivän tai peri-

feerisen alueen (ja ydinalueen) matriisin tai membraanin edeltäjän (edeltäjien) geeliytymiseksi, kovettumiseksi tai valamiseksi. Tämän yhteissuulakepuristussuoritusmuodon erityinen etu on siinä, että ytimessä olevat solut eristetään välittäjän muodostamishetkestä lähtien, jolloin varmistetaan, että ydinmateriaalit eivät saastu tai turmellu välittäjän käsittelyn aikana ennen implantaatiota. Yhteissuulakepuristusprosessin toinen etu on, että se varmistaa, että ympäröivä tai perifeerinen alue on vapaa soluista ja muista ydinmateriaaleista. Ympäröivän tai perifeerisen alueen läpäisevyysominaisuudet ja biologista yhteensopivuutta koskevat ominaisuudet määräytyvät sekä käytettyjen matriisin tai memraanin prekursorimateriaalien mukaan että olosuhteiden mukaan, joissa matriisi tai membraani muodostetaan.

Tämän menetelmän toisessa suoritusmuodossa immunoeristetty välittäjä muodostetaan vaiheittain. Esimerkiksi jos valmistettava immunoeristetty välittäjä sisältää eristettyjä soluja sisältävän hydrogeeliytimen, ydin voidaan muodostaa ensin ja ympäröivä tai perifeerinen matriisi tai membraani voidaan koota tai levittää myöhemmin. Käänteisesti ympäröivä tai perifeerinen matriisi tai membraani voidaan esimuodostaa ja sitten täyttää esimuodostetulla, eristettyjä soluja sisältävällä ydinmateriaalilla tai materiaaleilla, jotka muodostavat ytimen (so. ytimen prekursorimateriaaleilla). Välittäjä suljetaan tiiviisti siten, että ydinmateriaalit suljetaan täysin sisälle. Jos käytetään ytimen prekursorimateriaalia, välittäjä saatetaan sitten alttiiksi olosuhteille, joista on tuloksena ytimen muodostuminen.

Tämän keksinnön mukaista ratkaisua voidaan hyödyntää myös menetelmän biologisen tuotteen vapauttamiseksi tai metabolisen tai immunologisen toiminnan muuttamiseksi yksilössä, jolla on biologisen tuotteen tai muutetun metabolisen toiminnan tarve. Tämän keksinnön immunoeristetty välittäjä implantoidaan yksilöön (vastaanottajaan) käyttäen tunnettua tekniikkaa tai tunnettuja menetelmiä, jotka on valittu erityisen immunoeristetyn välittäjän ja implantaatiopaikan mukaan. Kun implantointi on toteutettu, biologisesti yhteensopivaan, immunoeristettyyn välittäjään eristetyt solut tuottavat halutun tuotteen (halutut tuotteet) tai toteuttavat halutun toiminnan (halutut toiminnat). Jos eristetyt solut vapauttavat tuotteet, ne kulkevat ympäröivän tai perifeerisen, läpäisyselektiivisen membraanin tai hydrogeelimatriisin läpi vastaanottajan elimistöön. Jos eristetyt solut tuottavat metabolisia toimintoja, metaboloitavat (esimerkiksi hajotettavat tai inaktivoitavat) aineet saapuvat välittäjään vastaanottajan elimistöstä ja poistetaan vastaanottajan verivirrasta.

Keksinnön mukaisella ratkaisulla voidaan lisäksi hyödyntää menetelmää solujen eristämiseksi biologisesti yhteensopivan, immunoeristetyn, im-

plantoitavan välittäjän sisään, jolloin solut suojataan välittäjässä immunologiselta hyökkäykseltä sen jälkeen kun välittäjä on implantoitu yksilöön. Vaikka jotkut immuunivasteiden pienimolekyylipainoiset välittäjät (esim. sytokiinit) voivat läpäistä membraanin, useimmissa tapauksissa näiden aineiden paikalliset tai verenkierrossa olevat pitoisuudet eivät ole riittävän suuria, jotta niillä olisi haitallisia vaikutuksia. Eristetyt solut suojataan vastaanottajan immuunijärjestelmän hyökkäykseltä ja implantoitua välittäjää ympäröivien kudosten mahdollisesti haitallisilta, tulehduksellisilta vasteilta. Välittäjän ytimessä eristettyjä soluja ylläpidetään sopivassa paikallisessa ympäristössä. Tällä tavoin tarvittavat aineet tai metaboliset toiminnat voidaan vapauttaa vastaanottajaan pitkän aikaa ja ilman tarvetta hoitaa vastaanottajaa vaarallisilla, immuunivastetta heikentävillä lääkkeillä.

Piirrosten lyhyt kuvaus

Kuva 1 on graafinen esitys, joka koskee erilaisen molekyylikoon omaavien tutkittavien liuenneiden aineiden läpäisyvyyksien eroja alginaattimatriisien läpi, jotka on muodostettu eri olosuhteissa.

Kuva 2 on graafinen esitys perifuusiotestin tuloksista, jotka koskevat immunoeristettyjen saarekkeiden funktionaalisuutta verrattuna suojaamattomiin saarekkeisiin, kun mainittuja saarekkeita on ylläpidetty in vitro neljän viikon ajan. Kuva 2A kuvaa tuloksia, jotka on saatu käyttäen immunoeristettyä välittäjää, jolla on hydrogeeliydinmatriisi ja perifeerinen vaippa, joka on valmistettu läpäisyselektiivisestä termoplastisesta membraanista. Kuva 2B kuvaa tuloksia, jotka on saatu käyttäen immunoeristettyä välittäjää, jolla on hydrogeeliydinmatriisi ja perifeerinen hydrogeelivaippa.

Kuva 3 on graafinen esitys, joka esittää vapautuneen insuliinin kokonaismäärää, ja määrää, joka on vapautunut ensimmäisen ja toisen vaiheen vasteiden aikana perifuusiotestissä, jota myös kuva 2 esittää. Kuva 3A kuvaa tuloksia, jotka on saatu käyttäen kaksoismatriisin omaavaa immunoeristettyä välittäjää ja kuva 3B esittää tuloksia, jotka on saatu käyttäen ydinmatriisin ja läpäisyselektiivisen membraanin omaavaa immunoeristettyä välittäjää.

Kuva 4 on graafinen esitys plasman glukoosipitoisuuksien vähenemisestä, joka on havaittu, kun immunoeristetyt ksenogeeniset saarekkeet on implantoitu hiiriin, joilla on streptotsotosiinilla aiheutettu diabetes, 60 päivän ajaksi. Käytetty immunoeristetty välittäjä oli konfiguraatioltaan, kuten esimerkissä 5 on kuvattu.

Kuva 5 on graafinen esitys insuliinin vapautumisesta perifuusiokokeessa, jossa käytettiin immunoeristettyä välittäjää, joka sisälsi rotan saarekesoluja ja oli konfiguraatioltaaan kuten esimerkissä 5 on kuvattu, jolloin saa-

rekkeet otettiin talteen in vivo viipymäajan jälkeen ja herkistettiin glukoosille käyttäen teofylliinistimulaatiota tai ilman sitä.

Kuva 6 on graafinen esitys plasman glukoosipitoisuuksien vähenemisestä, joka havaittiin, kun immunoeristetyt ksenogeeniset saarekkeet oli implantoitu hiiriin, joilla oli streptotsotosiinilla aiheutettu diabetes, 100 päivän ajaksi. Käytetty immunoeristetty välittäjä oli konfiguraatioltaan, kuten esimerkissä 4 on kuvattu.

Kuva 7 on graafinen esitys, joka koskee erilaisten tutkittavien liuenneiden aineiden läpäisyä alginaattimatriisin läpi. Läpäisyvyydet tutkittiin sen jälkeen, kun tutkittavia aineita oli varastoitu Hank'in liuoksessa 16 tunnin ja 160 tunnin ajan. Muutos läpäisyvyydessä johtuu C^{++}-ionien huuhtoutumisesta matriisista.

Kuva 8 on graafinen vertailu, joka koskee vastetta, joka kohdistuu rotan saarekkeiden glukoosiherkistykseen, jolloin rotan saarekkeet oli eristetty kaksoismatriisin omaaviin välittäjiin, joilla oli joko termoplastinen vaippa tai alginaattivaippa, viipymäajan jälkeen in vivo epäsopivissa ksenogeneettisissä vastaanottajissa (marsut).

Kuva 9 on graafinen esitys, joka koskee normaalin liikekäyttäytymisen osittaista palautumista rotilla, joilla oli kokeellisesti aiheutettu Parkinsonin taudin kaltainen käyttäytyminen, immunoeristetyn välittäjän implantaation jälkeen, kun mainittu välittäjä sisälsi adrenaalisia kromaffiinisoluja ydinmatriisissa ja sitä ympäröivä vaippa koostui läpäisyselektiivisestä, termoplastisesta membraanista.

Kuva 10 on graafinen esitys keskimääräisistä painon muutoksista, jotka on havaittu kinoliinihapolla vaurioitetuilla rotilla. Rotat, jotka olivat vastaanottaneet immunoeristetyt kapselit, jotka sisälsivät naudan adrenaalisia kromaffiinisoluja, säilyttivät painonsa merkitsevästi paremmin kuin muut vaurioitetut rotat.

Kuva 11 on graafinen esitys diabetesta sairastavien, ei-paastolla olevien hiirten plasman glukoosikonsentraatioista, sen jälkeen kun niihin oli implantoitu tyypin 2 akryylisekapolymeerista koostuvat ontot kuidut, jotka sisälsivät joko 1 000 rotan saareketta (A) tai 500 rotan saareketta (B), ja implantointi oli toteutettu joko vatsakalvonontelon sisäisesti (ympyrät) tai ihon alaisesti (neliöt).

Kuva 12 on graafinen esitys vaikutuksista veren glukoosiin diabetesta sairastavilla rotilla, joille oli implantoitu rotan saarekkeita, jotka oli kapseloitu litteän levyn käsittäviin laitteisiin.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Tämä keksintö koskee biologisesti yhteensopivaa, immuunieristettyä välittäjää, joka on sopiva implantoitavaksi yksilöön pitkäksi aikaa. Välittäjän biologisen yhteensopivuuden vuoksi se on sopiva biologisesti käyttökelpoisten solujen ja/tai aineiden pitkäaikaiseen eristämiseen elimistön erilaisilta suojaavilta järjestelmiltä. Tässä käytettynä termi "suojaavat järjestelmät" viittaa immunologisen hyökkäyksen tyyppeihin, jotka immuunijärjestelmä saa aikaan yksilössä, johon tämä välittäjä on implantoitu, ja muihin hylkimismekanismeihin, kuten fibroottiseen vasteeseen, vieraan elimistön vasteeseen ja muihin tulehduksellisen vasteen tyyppeihin, jotka vieraan kohteen läsnäolo yksilön elimistössä voi aiheuttaa. Välittäjän ja sen sisällön implantit, kuten tämä keksintö ne kuvaa, säilyttävät toiminnallisuutensa kauemmin kuin kolme kuukautta in vivo ja monissa tapauksissa kauemmin kuin vuoden. Lisäksi tämän keksinnön välittäjä voidaan valmistaa kooltaan riittävän suureksi, jotta se vapauttaa aineen koko hoidollisen annoksen yhdestä tai vain muutamasta (vähemmän kuin 10) implantoidusta ja helposti korvattavasta välittäjästä.

Tässä käytettynä termi "biologisesti yhteensopiva" viittaa yhteisesti sekä vahingoittumattomaan välittäjään että sen sisältöön. Erityisesti se viittaa implantoidun vahingoittumattoman välittäjän ja sen sisällön kykyyn välttää elimistön erilaisten suojaavien järjestelmien haitallisia vaikutuksia ja ne säilyvät toiminnallisina merkittävän pitkän aikaa. Immuunijärjestelmän aiheuttamien suojaavien vasteiden tai vieraan elimistön fibroottisen vasteen välttämisen lisäksi "biologisesti yhteensopiva" tarkoittaa myös sitä, että välittäjä ja sen sisältö eivät aiheuta spesifisiä ei-toivottuja sytotoksisia tai systeemisiä vaikutuksia, jotka voisivat esimerkiksi häiritä välittäjän ja sen sisällön toivottua toimintaa.

Biologisen yhteensopivuuden ja jatkuvan toiminnallisuuden kannalta tärkeitä ovat välittäjän morfologia, hydrofobisuus ja se, että välittäjän pinnalta puuttuvat ei-toivotut aineet tai että välittäjästä itsestään ei huuhtoudu ei-toivottuja aineita. Siten vältetään harjamaisia pintoja, taitteita, välikerroksia tai muita muotoja tai rakenteita, jotka saavat aikaan vieraan elimistön vasteen. Välittäjän muodostavat materiaalit ovat riittävän puhtaita siinä mielessä, että välittäjämateriaaleista sinänsä ei huuhtoudu ei-toivottavia aineita. Lisäksi välittäjän valmistamisen jälkeen vältetään välittäjän ulkopintojen käsittelyä nesteillä tai aineilla (esim. seerumilla), jotka voivat kiinnittyä tai absorboitua välittäjään ja sen jälkeen heikentää välittäjän biologista yhteensopivuutta.

Tämä keksintö koskee myös menetelmää implantoitujen solujen, kudosten tai muiden aineiden eristämiseksi tai suojaamiseksi immunologiselta hyökkäykseltä. Tämän keksinnön menetelmä ja välittäjä ovat käyttökelpoisia hyvin erilaisten solutuotteiden, mukaan luettuna suurimolekyylipainoiset tuot-

teet, vapauttamiseksi niitä tarvitsevaan yksilöön ja/tai tarvittavien aineenvaihduntatoimintojen tuottamiseksi yksilössä, kuten haitallisten aineiden poistaminen. Tuotteisiin, jotka voidaan vapauttaa käyttäen tätä välittäjää, sisältyy laaja valikoima tekijöitä, joita normaalisti erilaiset elimet tai kudokset erittävät. Esimerkiksi insuliini voidaan vapauttaa diabeettiseen potilaaseen, dopamiini potilaaseen, joka sairastaa Parkinsonin tautia, tai tekijä III tyypin A hemofiliapotilaaseen. Muihin tuotteisiin, jotka voidaan vapauttaa käyttämällä tätä välittäjää, sisältyvät troofiset tekijät, kuten erytropoietiini, kasvuhormoni, aine P ja neurotensiini. Toinen ryhmä tuotteita, jotka sopivat vapautettavaksi tämän välittäjän avulla, sisältää biologisen vasteen muuntajat, mukaan luettuna lymfokiinit ja sytokiinit. Voidaan myös vapauttaa vasta-aineita vasta-ainetta erittävistä soluista. Spesifisiin vasta-aineisiin, jotka voivat olla käyttökelpoisia, sisältyvät vasta-aineet kasvaimen spesifisiä antigeenejä vastaan. Vasta-aineiden vapautuminen voi olla myös hyödyllistä vähennettäessä yhdisteiden, kuten hormonien ja kasvutekijöiden, pitoisuuksia verenkierrossa. Nämä aineet ovat käyttökelpoisia hoidettaessa erilaisia tauteja, tulehdustiloja tai sairauksia ja syöpäsairauksia. Tätä välittäjää voidaan myös käyttää elintärkeiden aineenvaihduntatoimintojen palauttamiseksi tai lisäämiseksi, kuten esimerkiksi myrkkyjen tai haitallisten aineenvaihduntatuotteiden (kuten kolesterolin) poistamisen palauttamiseksi tai lisäämiseksi verivirrasta käyttäen soluja, kuten hepatosyyttejä. Tämän keksinnön menetelmä ja välittäjä tekevät mahdolliseksi solujen implantaation ilman samanaikaista tarvetta heikentää vastaanottajan immuunivastetta hoidon aikana. Käyttämällä biologisesti yhteensopivaa, immunoeristettyä välittäjää tiettyjen aineiden homeostaasi voidaan palauttaa tai sitä voidaan ylläpitää pitkiä aikoja. Tämä välittäjä voi sisältää suuren määrän soluja siten, että yhden välittäjän implantaatio voi olla riittävä tuottamaan tarvittavan aineen tai toiminnan tehokkaan määrän yksilössä.

Tämän keksinnön biologisesti yhteensopiva, immunoeristetty välittäjä sisältää (a) ytimen, joka sisältää biologisesti aktiivisen osuuden joko suspendoituna nestemäiseen väliaineeseen tai immobilisoituna hydrogeelin tai ekstrasellulaarisen matriisin sisään ja (b) ympäröivän tai perifeerisen alueen, joka koostuu läpäisyselektiivisestä matriisista tai membraanista (vaipasta), joka ei sisällä eristettyjä soluja ja on biologisesti yhteensopiva ja riittävä suojaamaan eristettyjä soluja ytimessä, mikäli läsnä, immunologiselta hyökkäykseltä.

Tämän keksinnön tarkoituksia varten biologisesti aktiivinen osuus on kudos, solu tai muu aine, joka kykenee tuottamaan biologisesti hyödyllisen vaikutuksen sen yksilön elimistössä, johon tämän keksinnön biologisesti aktiivisen osuuden sisältävä välittäjä, on implantoitu. Siten termi "biologisesti aktiivi-

nen osuus" sulkee piiriinsä solut ja kudokset, jotka erittävät tai vapauttavat biologisesti aktiivisen liuenneen aineen; solut ja kudokset, jotka tuottavat metabolisen kyvyn tai toiminnan, kuten spesifisten liuenneiden aineiden poistamisen verivirrasta; tai biologisesti aktiivisen aineen, kuten entsyymin, troofisen tekijän, hormonin tai biologisen vasteen muuntajan.

Kun biologisesti aktiivinen osuus biologisesti yhteensopivan, immunoeristetyn välittäjän ytimessä sisältää soluja, ydin muodostetaan siten, että se tuottaa sopivan paikallisen ympäristön siihen eristettyjen solujen jatkuvaa elinkykyisyyttä ja toimintaa varten. Tätä välittäjää voidaan käyttää hyvin erilaisten solujen tai kudosten immunoeristämiseen, ulottuen täysin erilaistuneista, ankkurista riippuvaisista soluista tai primaarisista kudoksista epätäydellisesti erilaistuneiden sikiökudosten tai neonataalisten kudosten kautta ankkurista riippumattomiin, transformoituihin soluihin ja solulinjoihin.

Monet transformoidut solut tai solulinjat eristetään edullisimmin välittäjän sisään, jolla on nestemäinen ydin. Esimerkiksi PC12-solut (jotka erittävät dopamiinia ja esitetään tässä käyttökelpoisina parkinsonismin hoitamiseksi) voidaan eristää välittäjän sisään, jonka ydin sisältää ravinneväliaineen ja mahdollisesti muiden tekijöiden nestemäisen lähteen solujen elinkykyisyyden ja toiminnan ylläpitämiseksi, kuten esimerkiksi naudan sikiön tai hevosen seerumia.

Sopivasti ydin voi koostua matriisista, jonka muodostaa hydrogeeli, joka stabiloi solujen aseman soluryhmissä. Termi "hydrogeeli" viittaa tässä silloittuneiden, hydrofiilisten polymeerien kolmiulotteiseen verkkoon. Verkko on geelin muodossa, joka koostuu olennaisilta osin vedestä, edullisesti geelin muodossa, jossa on enemmän kuin 90 % vettä, rajoittumatta tällaisiin geeleihin. Silloittuneita hydrogeelejä voidaan pitää myös kiinteinä aineina, koska ne eivät virtaa eivätkä muuta muotoaan ilman huomattavaa leikkausjännitystä.

Koostumukset, jotka muodostavat hydrogeelejä, jakaantuvat kahteen luokkaan tämän patenttihakemuksen tarkoituksia varten. Ensimmäisellä luokalla on negatiivinen nettovaraus ja siitä tyypillinen esimerkki on alginaatti. Toisella luokalla on positiivinen nettovaraus ja siitä tyypillisiä esimerkkejä ovat ekstrasellulaariset matriisikomponentit, kuten kollageeni ja laminiini. Esimerkkeihin kaupallisesti saatavissa olevista ekstrasellulaarisista matriisikomponenteista sisältyvät Matrigel™ ja Vitrogen™.

Esimerkin vuoksi solut, jotka eivät vaadi ankkurisubstraattia, ovat soluja, jotka kykenevät muodostamaan ryhmittymiä tai rykelmiä ja siten tuottavat ankkurin toinen toiselleen. Esimerkkejä ryhmittyvistä solutyypeistä ovat haiman saarekkeet, haiman beta-solulinjat, kiinalaisen hamsterin munasarjan

(CHO) solut ja adrenaaliset kromaffiinisolut. Nämä solut suljetaan sopivasti negatiivisesti varattuun matriisiin, kuten alginaattiin.

Fibroblastit säilyvät yleensä hyvin hengissä positiivisesti varatussa matriisissa ja siten ne suljetaan sopivasti ekstrasellulaarisen matriisin tyyppisiin hydrogeeleihin. Tietyt solutyypit pyrkivät lisääntymään nopeasti ja voivat kasvaa tilan yli, joka on käytettävissä ytimen sisällä, jos ne eivät osoita kasvun pysähtymistä. Jos eristetyt solut eivät osoita kasvun pysähtymistä sulauduttuaan yhteen, välittäjään sisään voidaan sisällyttää aineita, jotka aiheuttavat lepotilan. Joissakin tapauksissa hydrogeeliydin voi olla riittävä jatkuvan jakautumisen rajoittamiseksi. Esimerkiksi hydrogeelimatriisin prekursoriliuos voidaan sisällyttää, mutta sitä ei voida saattaa alttiiksi polymeroiville olosuhteille. Natriumalginaatin tapauksessa hydrogeeli muodostuu hitaasti implantaation jälkeen, kun kalsiumionit huuhtoutuvat ympäröivistä kudoksista. Vaihtoehtoisesti kasvua estäviä tekijöitä tai erilaistumisen stimulaattoreita voidaan liittää hitaasti hajoavan polymeerin, kuten polykarbonaatin, mikrohelmiin ja suspendoida yhdessä tuotetta erittävien solujen kanssa. Esimerkiksi tekijöitä NGF tai FGF voidaan käyttää PC-12-solujen erilaistumisen stimuloimiseksi ja solujen jakaantumisen lopettamiseksi.

Muut solut, erityisesti primaariset solut tai kudokset, pyrkimät kiinnittymään toisiinsa ja muodostamaan tiheitä rykelmiä, jotka kehittävät keskelleen kuolioalueita johtuen siitä, että ravinteet ja happi eivät pääse soluihin, jotka ovat rykelmöityneen massan sisällä. Nämä tiheät solumassat voivat muodostua hitaasti sen seurauksena, että solut kasvavat tiheiksi pesäkkeiksi, tai nopeasti juuri dispergoitujen solujen tai kudosten yhdistyessä uudelleen solun pinnan adheesioproteiinien välittäminä. Solut tai kudokset, jotka ovat aineenvaihdunnallisesti erittäin aktiivisia, ovat erityisen alttiina hapen tai ravinteiden puutteen vaikutuksille, ja kuolevat lyhyessä ajassa jouduttuaan suljetuksi rykelmän keskukseen. Monet umpierityskudokset, jotka ovat normaalisti tiheiden hiussuonten elättämiä, osoittavat tätä käyttäytymistä; Langerhansin saarekkeet ja adrenaaliset kromaffiinisolut ovat erityisen herkkiä. Solut tai kudokset, jotka osoittavat tätä käyttäytymistä, esiintyvät tyydyttävimmin välittäjissä, jotka sisältävät hydrogeelimatriisiytimen, joka on riittävä solujen tai kudoksen immobilisoimiseksi säilyttäen siten ravinteiden ja hapen pääsyn niiden enemmistöön. Muissa olosuhteissa immobilisoiva hydrogeelimatriisi saa aikaan vielä lisätoiminnan funktionaalisten yksiköiden tuottamiseksi tai säilyttämiseksi, joiden koko ja/tai muoto ovat sopivat eristettyjen solujen haluttujen ominaisuuksien säilyttämiseksi. Lisäksi ydinmatriisin läsnäolo tekee mahdolliseksi välittäjän sisällä olevien solujen

tai soluryhmittymien tasaisen jakautumisen ylläpitämisen (so. ydinmatriisi estää kerrostumisen ja vähentää sisällä olevien solujen liikkuvuutta).

Yksi erityisen edullinen hydrogeeliydinten käyttö koskee aktiivisesti jakautuvien solujen kapselointia. Alginaatti tai muut hydrogeelit voidaan sisällyttää kapseloitavien, aktiivisesti jakautuvien solujen suspensioihin. Kapseloinnin ja geelin muodostumisen jälkeen kapseloidut solut ovat jokseenkin immobilisoituja geelin sisällä ja uudet solut, jotka on tuotettu solun jakautumisen aikana, sijoittuvat lähelle emosolua. Tällä tavoin soluryhmiä tuotetaan ytimen sisällä. Tällainen kasvumenetelmä on edullinen solujen, kuten beta-soluista peräisin olevan NIT-solulinjan, tapauksessa. Ydinmatriisin puuttuessa solut pyrkivät kasvamaan kiinnittyneinä kapselointilaitteen sisäseinille, jolloin hyvin harvat solut kasvavat vapaasti laitteen ontelossa. Kasvu pelkästään kapselin seinillä johtaa solupopulaation kokoon, jota rajoittaa kapselin sisäseinän pinta-ala vastakohtana populaatioon, joka kasvaa välittäjän ontelon täyttämiseksi. Kun alginaatti sisältyy ytimeen, solun kasvu ei enää rajoitu kapselin sisäpintaan. Pikemminkin NIT-solujen erillisiä palloja tuotetaan kaikkialla ytimessä, mistä on tuloksena merkitsevästi suurempi solujen kokonaispopulaatio kuin populaatio, joka ilmenee alginaatin puuttuessa.

Myös ydinmatriisin läsnäollessa annettuun välittäjän tilavuuteen kuormattavien kudosfragmenttien kokoa rajoittaa keskellä olevan kuolion esiintyminen yksittäisissä fragmenteissa. Tämän keksinnön toisessa näkökohdassa kudosfragmenttien tai soluryhmien käyttökelpoista määrää, joka voidaan sijoittaa immunoeristetyn välittäjän sisään, voidaan lisätä preparoimlla solut paremmat diffuusio-ominaisuudet omaavaan muotoon. Yleensä tämä tarkoittaa kudosfragmenttien preparoimista kokoon, joka on halkaisijaltaan vähemmän kuin 75 µm ja optimaalisimmin noin 35 µm tai vähemmän peritoneaalisesti implantoitavien välittäjien tapauksessa. Solurykelmät tai ryhmät paremmat diffuusio-ominaisuudet omaavassa muodossa preparoidaan itsestään uudelleen rykelmöityvien solujen tapauksessa (esim. haiman saarekkeiden tai adrenaalisten kromaffiinisolujen tapauksessa) dispergoimalla entsymaattisesti kudos yhden solun ja pienten solurykelmien suspensioihin ja sen jälkeen antamalla niiden rykelmöityä uudelleen paremmat diffuusio-ominaisuudet omaavaan muotoon.

Tässä termi "rykelmöityminen" viittaa menetelmään solujen ryhmittymisen edistämiseksi. Soluja, jotka muodostavat ryhmittymiä, voidaan saada luonnossa esiintyvistä rykelmistä, kuten haiman saarekkeista, jotka dispergoidaan yhden solun tai pienen ryhmän suspensioiksi ja sen jälkeen niiden annetaan rykelmöityä uudelleen kuvattujen menetelmien mukaisesti. Vaihtoehtoisesti solut voidaan saada alunperin yksittäisinä soluina tai pieninä soluryhminä ja

sitten rykelmöidä halutun soluryhmäkoon muodostamiseksi. Tällaiset soluryhmät sisältävät yleensä noin 3 - 400 solua riippuen solun koosta ja rykelmöitymisominaisuuksista. Tyypillisesti ryhmä sisältää noin 10 - 50 solua. Uudellen rykelmöityneiden haiman saarekesolujen käyttö on edullista sopivien diffuusioominaisuuksien varmistamiseksi ytimen sisällä ja saarekkeen elinvoimaisuuden säilyttämiseksi. Uudelleen rykelmöityneet saarekkeet tekevät myös mahdolliseksi pienempien kapseleiden käytön. Esimerkiksi 500 ei-rykelmöitynyttä saareketta vaatisivat yleensä kapselin, jonka pituus on suunnilleen 14 cm (tiheys 2 %). Sitä vastoin kapselit, jotka sisältävät saarekkeet uudelleen rykelmöityneinä kokoon, joka on pienempi kuin käsittelemättömän saarekkeen koko, voivat olla jopa 1 - 2 cm:n pituisia tehokkaamman pakkauksen vuoksi. Tehokkaampi pakkaus sallii kuidun ulkopuolella pienemmän pO_2-arvon, joka on siedettävä ilman, että tuloksena on nekroottisia ytimiä. Rakenteella, joka sallii ulkopuolella alemman pO_2-arvon, on ainakin kaksi etua. Ensinnäkin voidaan käyttää pienempää kapselikokoa, joka sisältää saman määrän soluja, nimittäin implantin sisällä siedetään paremmin lisääntynyttä kudostiheyttä. Toiseksi voidaan käyttää menestyksellisesti implantaatiopaikkoja, joilla on tunnetusti alempi pO_2-arvo, kuten ihonalaisia paikkoja. Alginaattimatriisin läsnäolo varmistaa lisäksi sen, että rykelmät eivät liity uudelleen yhteen suuriksi solumassoiksi, joissa sisällä olevat solut voisivat jäädä ilman ravinteita ja/tai happea.

Haiman saarekesolut säilyttävät yhä toiminnallisuutensa ja erittävät insuliinia vasteena glukoosille lähes normaalilla tavalla entsymaattisen dispergoinnin ja uudelleen rykelmöitymisen jälkeen. Dispergoiduista saarekkeista peräisin olevat solut rykelmöidään uudelleen haluttuun ryhmittymäkokoon ennen niiden laittamista välittäjään. Uudelleen rykelmöiminen voidaan toteuttaa käyttäen menetelmiä, jotka on kuvattu julkaisussa Britt, Diabetes 34 : 898 - 903, tai käyttäen vastaavia menetelmiä. Saarekkeiden tapauksessa optimaalisen rykelmäkoon muodostaa pienin ryhmittymä, joka vielä säilyttää halutut fysiologiset ominaisuudet. Matriisi tai matriisin muodostavat aineet voidaan sitten lisätä soluihin ja yhdistelmä voidaan suulakepuristaa yhdessä biologisesti yhteensopiviksi välittäjiksi tai laittaa biologisesti yhteensopiviin välittäjiin. Mikäli välttämätöntä, sitten voidaan aiheuttaa matriisin muodostuminen. Edullisissa suoritusmuodoissa solujen annetaan rykelmöityä uudelleen 37 °C:n lämpötilassa yön yli sekoittamatta. Rykelmien kehittymistä seurataan valomikroskopian avulla, kunnes rykelmät saavuttavat koon, jonka halkaisija on 25 - 75 µm, edullisesti 35 µm. Soluihin lisätään sitten nestemäinen silloittumaton alginaatti, jonka konsentraatio on 0,5 - 2 %, solut saatetaan välittäjiin, välittäjät suljetaan tiiviisti, mikäli välttämätöntä, ja polymeroituminen aiheutetaan upottamalla välittäjä $CaCl_2$:iin.

Primaariset solut tai kudokset voivat olla käyttökelpoisia tämän keksinnön välittäjissä erilaisia lääketieteellisiä sovellutuksia varten. Säätelysyistä ja potilaan turvallisuutta koskevista syistä johtuen joskus voi olla hyödyllistä käyttää primaaristen viljelmien lähteinä eläimiä, joiden perinnöllisyys ja kehitystausta on huolellisesti kontrolloitu. Ei-haluttujen virusten, bakteerien ja muiden patogeenien läsnäoloa voidaan rajoittaa käyttämällä spesifisiä, patogeenivapaita ja gnotobioottisia eläinlähteitä. Viitteet ja menetelmät spesifisten patogeenivapaiden ja gnotobioottisten eläinjoukkojen perustamiseksi, hoitamiseksi ja käyttämiseksi esitetään julkaisuissa Maniats, O. P. et al., Can. J. Med. 42 : 428, (1978), Matthews, P. J. et al., Recent Advances in Germ Free Research 61 - 64, (1981), Tokai Univ. Press, ja National SPF Swine Accrediting Agency'n National Accreditation Standards -julkaisussa, Inc., Conrad, Iowa.

Mahdollisesti matriisiydin voi sisältää myös aineita, jotka tukevat tai edistävät eristettyjen solujen toimintaa. Esimerkiksi voidaan sisällyttää ekstrasellulaarisen matriisin (ECM) aineosia eristettyjen solujen spesifisen kiinnittymisen tai adheesion edistämiseksi. ECM-aineosien yhdistelmä, joka on erityisen sopiva tietyn tyyppisten solujen suosimiseksi on neuvottu julkaisussa Kleinman et al., US-patentti 4 829 000, (1989). Ydinmatriisi voidaan tuottaa liukoisten tai vapautuvien aineiden, kuten kasvutekijöiden tai kasvua säätelevien aineiden tai luonnollisten tai synteettisten, eristettyjen solujen ravinteiden tai hapen saantia lisäävien tai parantavien aineiden, varastoksi. Siten se voi toimia samalla tavoin kuin luuydin-ECM, jonka on raportoitu käyttäytyvän myeloidiperäisten spesifisten kasvutekijöiden, kuten granulosyytti-makrofagiyhdyskuntaa stimuloivan tekijän (gmcsf), hitaasti vapauttavana varastona. Gordon, M. Y. et al., Nature 326 : 403 - 405, (1987). Siten ydinmatriisi voi toimia kasvutekijöiden (esim. prolaktiinin tai insuliinin kaltaisen kasvutekijä 2:n), kasvua säätelevien aineiden, kuten transformoivan kasvutekijä ß:n (TGFß) tai retinoblastomageeniproteiinin tai ravinteiden kuljetusta edistävien aineiden (esim. perfluorihiilivetyjen, jotka lisäävät liuenneen hapen konsentraatiota ytimessä) varastona. Tietyt näistä aineista ovat myös sopivia sisällytettäväksi nestemäisiin väliaineisiin.

Lisäksi syöttäjäsolujen tai lisäsolujen populaatio voidaan eristää yhdessä välittäjään. Esimerkiksi hepatosyytit voidaan eristää yhdessä endoteliaalisten lisäsolujen kanssa; Cai, Z. et al., Artificial Organs, 12 (5) : 388 - 393, (1988), tai sekoittaa saarekesolujen kanssa, Ricordi C. et al., Transplantation 45 (6) : 1148 - 1151, (1987), tai adrenaaliset kromaffiinisolut voidaan eristää yhdessä lisäsolujen kanssa, jotka tuottavat hermosolujen kasvutekijää (NGF), ainetta, jota kromaffiinisolut tarvitsevat. Jälkimmäisessä tapauksessa lisäsoluina voidaan käyttää fibroblasteja, joihin on transfektoitu NGF:N ekspressiovektori.

Tätä välittäjää voidaan käyttää myös varastona tarvittavien lääkkeiden tai biologisten hoitavien aineiden vapauttamiseksi säädellysti. Tällaisissa tapauksissa ydin sisältää suuren konsentraation valittua lääkettä tai biologista hoitavaa ainetta solujen tai kudosten sijasta. Lisäksi vastaanottajaan voidaan myös implantoida satelliittivälittäjiä, jotka sisältävät aineita, jotka valmistavat tai luovat vastaanottavaisen ympäristön elimistön alueelle, johon eristettyjä soluja sisältävä, biologisesti yhteensopiva, immunoeristetty välittäjä implantoidaan. Tällaisissa tapauksissa immunoeristettyjä soluja sisältävä välittäjä implantoidaan alueella satelliittivälittäjien ohella, jotka vapauttavat säädeltyjä määriä esimerkiksi ainetta, joka alentaa tai estää vastaanottajan tulehduksellista vastetta (esim. tulehdusta estäviä steroideja), tai ainetta, joka stimuloi hiussuoniverkoston kasvua (so. angiogeeninen tekijä).

Tämän välittäjän ympäröivä tai perifeerinen alue (vaippa) on läpäisyselektiivinen, biologisesti yhteensopiva ja immunoeristetty. Se tuotetaan siten, että se on vapaa eristetyistä soluista ja ympäröi täydellisesti (so. eristää) ydintä, estäen siten kosketuksen ytimen ja vastaanottajan elimistön minkä tahansa solujen välillä.

Mitä tulee vaipan läpäisyselektiiviseen luonteeseen, se on muodostettu sillä tavoin, että sillä on MWCO-vaihtelualue, joka on sopiva välittäjän implantaation jälkeen odotettavissa olevan immunologisen reaktion sekä tyypin että laajuuden osalta sekä välittäjään sisään ja ulos kulkevan, halutun suurimman aineen molekyylikoon osalta. Välittäjän implantaation jälkeen vastaanottajan mahdollisesti aikaansaamien immunologisten hyökkäysten tyyppi ja laajuus riippuvat osaksi välittäjään eristetyn osuuden tyypistä (tyypeistä) ja osaksi vastaanottajan identiteetistä (so. miten läheisesti vastaanottaja on geneettisesti sukua biologisesti aktiivisen osuuden lähteeseen). Kun implantoitu kudos on vastaanottajan suhteen allogeeninen, immunologinen hylkiminen voi edetä suureksi osaksi vastaanottajan immuunisolujen soluvälitteisen hyökkäyksen kautta implantoituja soluja vastaan. Kun kudos on vastaanottajan suhteen ksenogeeninen, vallitsevana voivat olla molekulaarinen hyökkäys vastaanottajan sytolyyttisen komplementtihyökkäyskompleksin muodostumisen kautta sekä vasta-aineen vuorovaikutus komplementin kanssa.

Ympäröivän alueen MWCO:n täytyy siten olla riittävän pieni, jotta niiden aineiden pääsy estyy, jotka tarvitaan näiden hyökkäysten kuljettamiseksi ytimeen, mutta kuitenkin riittävän suuri, jotta on mahdollista, että tarvittava aine vapautuu vastaanottajan elimistöön. Siten on ilmeistä, että MWCO:n ei tarvitse olla ankarasti rajoitettu vaihtelualueeseen, joka sulkee pois immunoglobuliini G:n ytimestä. Itse asiassa on monia tapauksia, joissa suuremmat MWCO-arvot

eivät ole vain sallittavia, vaan myös edullisia. Todellakin suuremmat MWCO-arvot tekevät mahdolliseksi sen, että laaja valikoima hyödyllisiä tuotteita voi vapautua immunoeristetyistä soluista, sekä sen, että tällaisten solujen käyttö voi tuottaa suurimolekyylipainoisten aineiden aineenvaihdunnallisen kontrollin.

Siten sopivissa tapauksissa perifeerinen tai ympäröivä alue voidaan valmistaa materiaaleista, jotka muodostavat läpäisyselektiivisiä membraaneja tai hydrogeelimatriiseja, jotka sallivat niiden molekyylien läpikulun, joiden koko on enintään noin C1q:n koko (noin 6,6 x 10^{-19} g, noin 400 kD), suurin proteiini, joka tarvitaan komplementtihyökkäyskompleksin kokoamiseksi. Siten mikä tahansa solutuote tai aineenvaihduntatuote, jonka koko on suurin piirtein C1q:n kokoa pienempi, voi kulkea vapaasti välittäjän läpi. Muissa tapauksissa voi yhä olla toivottavaa, että immunoglobuliinit suljetaan pois. Tällaisissa tapauksissa voidaan käyttää materiaaleja, jotka muodostavat matriiseja ja membraaneja, joiden läpi molekyylit, joiden koko on sama tai suurempi kuin immunoglobuliini G:n koko (noin 2,475 x 10^{-19} g, noin 150 kD), eivät voi kulkea läpi. Solutuotteet tai aineenvaihduntatuotteet, jotka ovat molekyylipainoltaan pienempiä kuin noin 2,475 x 10^{-19} g, (noin 150 kD), kulkevat vielä välittäjän läpi. Vielä muissa tapauksissa, joissa potilaan immuunivaste on heikennetty tai joissa implantoitu kudos on syngeeninen potilaan suhteen, ei todennäköisesti kohdata voimakasta immunologista hyökkäystä ja suurimolekyylipainoisen molekyylin läpikulku voi olla toivottava. Näissä jälkimmäisissä tapauksissa voidaan käyttää materiaaleja, jotka sallivat kaikkien niiden molekyylien läpikulun, joiden koko on enintään noin immunoglobuliini M:n koko (noin 1,65 x 10^{-18} g, noin 1 000 kD). Nämä materiaalit estävät vain hyvin suurten aineiden, kuten solujen, läpikulun.

Keksinnön toisessa näkökohdassa on havaittu, että voidaan käyttää vaipan molekyylipainon enimmäisrajaa, joka on huomattavasti suurempi kuin aikaisemmin on arveltu, samalla säilyttäen kapseloitujen solujen elinkykyisyys ja toiminta.

Tämä sallii makrokapseleiden käytön sovellutuksissa, joissa solut erittävät ainetta, jolla on suuri molekyylipaino. Tätä tarkoitusta varten voidaan käyttää makrokapselia, jonka molekyylipainon enimmäisrajat ovat yli 1,32 x 10^{-19} - 1,65 x 10^{-19} g:sta (80 - 100 kD) jopa 3,3 x 10^{-19} - 1,65 x 10^{-18} g:aan (200 - 1 000 kD) tai 3,3 x 10^{-18} g:aan (2000 kD) tai jopa enemmän, tämän keksinnön mukaisesti.

Koskien ympäröivän tai perifeerisen alueen (vaipan) biologista yhteensopivuutta, tämä ominaisuus tuotetaan tekijöiden yhdistelmän avulla. Ensinnäkin välittäjän muodostamiseen käytetyt aineet ovat aineita, jotka on valittu perustuen niiden kykyyn olla yhteensopivia implantoidun välittäjän vstaanottajan

kudosten kanssa tai niiden hyväksymiä. Käytetään aineita, jotka eivät ole haitallisia vastaanottajalle tai eristetylle biologisesti aktiiviselle osuudelle. Edullisiin aineisiin sisältyvät palautuvasti tai palautumattomasti geeliytyvät aineet (esim. aineet, jotka muodostavat hydrogeelejä) ja veteen liukenemattomat, termoplastiset polymeerit. Erityisen edullisia termoplastisia polymeeriaineita ovat aineet, jotka ovat kohtuullisen hydrofobisia, so. aineet, joiden liukoisuusparametri on 8 - 15, edullisemmin 9 - 14 (joulea/m^3)^{½}, määritettynä julkaisun Brandrup, J. et al., Polymer Handbook, 3. painos, (1989), John Wiley & Sons, NY, mukaan. Valitaan polymeeriaineet, joiden liukoisuusparametri on riittävän matala siten, että ne ovat liukoisia orgaanisiin liuottimiin, ja yhä riittävän suuri siten, että ne jakautuvat sopivan membraanin muodostamiseksi. Tällaisten polymeeriaineiden pitäisi olla vapaita labiileista nukleofiilisistä osuuksista ja erittäin kestäviä hapettavia aineita ja entsyymejä vastaan myös stabiloivien aineiden puuttuessa. Täytyy ottaa huomioon myös viipymäaika in vivo, joka on aiottu nimenomaisen immunoeristetyn välittäjän tapauksessa; täytyy valita aineet, jotka ovat riittävän stabiileja joutuessaan alttiiksi fysiologisille olosuhteille ja rasituksille. On olemassa monia hydrogeelejä ja termoplastisia aineita, jotka ovat riittävän stabiileja, myös pitkiä viipymäaikoja in vivo, kuten kauemmin kuin yksi tai kaksi vuotta. Esimerkkeihin stabiileista aineista sisältyvät alginaatti (hydrogeeli) ja PAN/PVC (termoplastinen aine).

Toiseksi biologisesti yhteensopivan, immunoeristetyn välittäjän valmistuksessa käytettävät aineet ovat joko vapaita uuttuvista, pyrogeenisistä tai muuten haitallisista, ärsyttävistä tai immunogeenisistä aineista tai ne on puhdistettu perusteellisesti tällaisten haitallisten aineiden poistamiseksi. Sen jälkeen ja välittäjän koko valmistuksen ja ylläpidon ajan ennen sen implantointia on noudatettava suurta huolellisuutta välittäjän turmeltumisen tai saastumisen estämiseksi aineilla, jotka voisivat vaikuttaa haitallisesti sen biologiseen yhteensopivuuteen.

Kolmanneksi välittäjän ulkoinen konfiguraatio, mukaan luettuna sen pinnan rakenne, muodostetaan siten, että se tuottaa optimaalisen rajapinnan vastaanottajan kudosten kanssa implantoinnin jälkeen. Tämä parametri määräytyy osittain implantointipaikan mukaan. Esimerkiksi jos välittäjä tulee sijaitsemaan vastaanottajan vatsakalvonontelossa, sen pinnan tulee olla tasainen. Kuitenkin jos se upotetaan vastaanottajan pehmeisiin kudoksiin, sen pinnan tulee olla kohtalaisen karkea tai täplitetty. Määräävä tekijä tulee olemaan se, onko toivottavaa antaa vastaanottajan solujen kiinnittyä välittäjän ulkopintaan vai täytyykö välttää tällaista kiinnittymistä. Avoinrakenteinen tai sienenkaltainen pinta voi edistää hiussuonten kasvua sisään, kun taas tasainen pinta voi estää

fibroblastien liiallista kasvua. Fibroblastien liiallista kasvua tulee välttää, paitsi silloin kun hiussuonten kasvu on liian vähäistä, koska silloin voi tuloksena olla huonosti läpäisevän peruskalvon muodostuminen välittäjän ympärille ja eristettyjen solujen erottaminen seinällä kosketuksesta vastaanottajan elimistön kanssa.

Tiettyjen välittäjän geometristen muotojen on myös havaittu herättävän spesifisesti vieraan elimistön fibroottisia vasteita ja niitä pitäisi välttää. Siten välittäjien ei pitäisi sisältää rakenteita, joissa on välikerroksia, kuten harjapintoja tai taitteita.Yleensä välittäjän vastakkaisten pintojen tai reunojen joko samasta välittäjästä tai vierekkäisistä välittäjistä tulisi olla vähintään 1 mm:n päässä toisistaan, edullisesti kauempana kuin 2 mm:n ja edullisimmin kauempana kuin 5 mm:n päässä toisistaan. Edullisiin suoritusmuotoihin sisältyvät sylinterit, "U"-muotoiset sylinterit ja litteät levyt tai "voileivät".

Biologisesti yhteensopivan, immunoeristetyn välittäjän ympäröivä tai perifeerinen alue (vaippa) voi sisältää mahdollisesti aineita, jotka vähentävät tai estävät implantoituun välittäjään kohdistuvaa paikallista tulehduksellista vastetta ja/tai muodostavat tai vaalivat implantoiduille soluille tai kudoksille sopivaa paikallista ympäristöä. Esimerkiksi voitaisiin sisällyttää vasta-aineita immuunivasteen yhtä tai useampaa välittäjää vastaan. Matriisin prekursoriliuokseen voidaan sisällyttää saatavissa olevia, mahdollisesti käyttökelpoisia vasta-aineita, kuten vasta-aineita lymfokiineille, kasvaimen kuoliotekijälle (TNF) ja interferonille (IFN). Samoin voidaan sisällyttää tulehdusta estävä steroidi. Christensen, L. et al., J. Biomed. Mat. Res. (23) : 705 - 718, (1989); Christensen, L., Ph. D. - väitöskirja, Brown Universitity, (1989); mainitut julkaisut liitetään tähän viittauksena. Vaihtoehtoisesti voidaan sisällyttää aine, joka stimuloi verisuonten muodostumista (hiussuoniverkoston kasvua); tämä voi olla erityisen toivottavaa, kun eristetyt solut tai kudokset vaativat läheistä kosketusta vastaanottajan verivirran kanssa toimiakseen kunnolla (esim. Langerhansin insuliinia tuottavat saarekkeet). Matriisiin voidaan sisällyttää myös solu, joka on käsitelty geeniteknologian avulla erittämään vasta-aineita.

Koskien immunoeristämisen käsitettä ympäröivä tai perifeerinen alue suojaa biologisesti aktiivisen osuuden implantoidun välittäjän omaavan yksilön immuunijärjestelmältä estämällä yksilön elimistön haitallisten aineiden pääsyn välittäjän ytimeen ja tuottamalla fysikaalisen esteen, joka on riittävä haitallisen immunologisen kosketuksen estämiseksi eristetyn osuuden ja yksilön immuunijärjestelmän välillä. Tämän fysikaalisen esteen paksuus voi vaihdella, mutta se on aina riittävän paksu suoran kosketuksen estämiseksi solujen ja/tai aineiden välillä esteen kummallakin puolella. Tämän alueen paksuus on yleen-

sä 5 - 200 mikronia; 10 - 100 mikronin paksuudet ovat edullisia ja 20 - 50 mikronin paksuudet ovat erityisen edullisia. Immunologisen hyökkäyksen tyyppeihin, jotka voidaan estää tai minimoida käyttämällä tätä välittäjää, sisältyvät makrofagien, neutrofiilien hyökkäykset, solujen immuunivasteet [esim. luonnolliset tappajasolut ja vasta-aineesta riippuvainen, T-solun välittämä sytoloyysi (ADCC)], ja humoraalinen vaste (esim. vasta-aineesta riippuvaisen komplementin välittämä sytolyysi).

Kuten edellä on selostettu, vastaanottajan immunologisen vasteen tyyppiin ja laajuuteen implantoitua välinettä vastaan vaikuttaa vastaanottajan suhde eristettyyn, biologisesti aktiiviseen osuuteen. Esimerkiksi jos eristetyt aineet sisältävät syngeenisiä soluja, ne eivät aiheuta voimakasta immunologista reaktiota, ellei vastaanottaja sairasta autoimmuniteettia suhteessa nimenomaiseen solu- tai kudostyyppiin, joka on välittäjässä. On olemassa useita tauti- tai puutostiloja, joilla on hiljattain määritetty olevan autoimmuunietiologia ja joista merkittävin on tyypin I insuliinista riippuvainen diabetes mellitus, jossa yksilön immuunijärjestelmä tuhoaa insuliinia erittäviä haiman saarekkeiden ß-soluja. Fan, M.-Y. et al., Diabetes, 39 : 519 - 522, (1990).

Syngeenisiä soluja tai kudoksia on harvoin saatavissa. Monissa tapauksissa saatavissa voi olla allogeenisiä tai ksenogeenisiä soluja tai kudoksia (jotka voivat olla saman lajin tai eri lajin luovuttajilta kuin tuleva vastaanottaja). Immunoeristetty välittäjä tekee mahdolliseksi tällaisten solujen tai tällaisen kudoksen implantoinnin ilman samanaikaista tarvetta heikentää vastaanottajan immuunivastetta. Sen vuoksi tämä välittäjä tekee mahdolliseksi sen, että voidaan käsitellä paljon useampia yksilöitä kuin tavanomaisella kudoksensiirtotekniikalla voidaan käsitellä. Esimerkiksi tyypin 1 diabetesta sairastavia potilaita on paljon enemmän kuin ihmisluovuttajan saarekkeita on siirrettävissä (vuonna 1990 vähemmän kuin noin 4 000 sopivaa kuollutta elimenluovuttajaa oli käytettävissä USA:ssa kaikkiin elinsiirtoihin). Siasta tai naudasta peräisin olevien saarekkeiden saanti on paljon suurempi; jos nämä ksenosaarekkeet immunoeristetään sopivasti tämän keksinnön mukaisesti, paljon suuremman potilasjoukon diabeettista tilaa voidaan korjata. Siirrettyyn ksenokudokseen kohdistuvan immuunivasteen tyypin ja voimakkuuden odotetaan eroavan vasteesta, joka tavataan, kun syngeeninen tai allogeeninen kudos on implantoitu vastaanottajaan. Tämä hylkiminen voi edetä ensisijaisesti solujen välittämänä tai komplementin välittämänä hyökkäyksenä; määräävät parametrit saatetaan tuntea huonosti nimenomaisessa tapauksessa. Kuitenkin kuten edellä on huomautettu, IgG:n sulkeminen pois välittäjän ytimestä ei ole immuunisuojan koetinkivi, koska IgG yksin on riittämätön kohteena olevien solujen tai kudosten sytolyysin tuottami-

seksi. Käyttäen tämän keksinnön makrokapseleita, edullisesti allogeenisen kudoksen, mutta myös ksenografтien tapauksessa, on mahdollista vapauttaa tarvittavat suurimolekyylipainoiset tuotteet tai tuottaa aineenvaihdutatoiminnat, jotka koskevat suurimolekyylipainoisia aineita, edellyttäen, että immunologisen hyökkäyksen välittämiseksi välttämättömät, ratkaisevat aineet suljetaan pois immunoeristetystä välittäjästä. Nämä aineet voivat sisältää komplementtihyökkäsykompleksikomponentin C1q tai ne voivat sisältää fagosyyttisiä tai sytotoksisia soluja; tämä immunoeristetty välittäjä tuottaa suojaavan esteen näiden haitallisten aineiden ja eristettyjen solujen välillä. Siten tätä immunoeristettyä välittäjää voidaan käyttää myös allogeenisistä tai ksenogeenisistä soluista tai kudoksesta peräisin olevien tuotteiden vapauttamiseksi, joiden molekyylikoot vaihtelevat laajalla alueella, kuten insuliinin, lisäkilpirauhashormonin, interleukiini 3:n, erytropoietiinin, albumiinin, transferriinin ja tekijä III:n vapauttamiseksi.

Tämän keksinnön muussa suoritusmuodossa tuotetaan menetelmät hermojen rappeutumisen aiheuttamien tautien hoitamiseksi. Esimerkkeihin ihmisen taudeista, joiden otaksutaan olevan yhteydessä hermojen rappeutumiseen, sisältyvät Alzheimerin tauti, Huntingtonin korea, AIDS:iin liittyvä dementia ja Parkinsonin tauti.

Hermojen rappeutumistiloja koskevat eläinmallit perustuvat siihen, että spesifinen vaurio voi vahingoittaa tai tuhota hermosoluja. Joissakin tapauksissa tämä voi johtaa hermosolujen tuhoutumisen ryöppyyn, joka vaikuttaa troofisesti niistä välillä riippuvaisiin (interdependent) hermosoluihin pitkin ratoja, jotka ovat vastuussa spesifisistä aivotoiminnoista.

Strategia hermojen rappeutumistilan hoitamiseksi käsittää kasvutekijöiden tai troofisten tekijöiden antamisen paikallisesti (1) post-synaptisten hermosolujen vaurion lisääntymisen estämiseksi ja (2) vaurion kohteeksi joutuneiden solujen elinkykyisyyden parantamiseksi. Aineisiin, joiden tiedetään parantavan hermosolujen elinkykyisyyttä, sisältyvät perussidekudossolujen kasvutekijä, siliaarinen neurotroofinen tekijä, aivoperäinen neurotroofinen tekijä, neurotrofiini 3, neurotensiini ja aine P.

Yhdessä hermojen rappeutuman eksitotoksisuuden eläinmallissa ruiskutetaan glutamaattianalogia, kinoliinihappoa, stereotaksisesti aivojen alueeseen, joka tunnetaan aivojuoviona ja/tai basaalisina ganglioina, jotta tuotetaan neuropatologia ja oireet, jotka ovat samanlaisia kuin Huntingtonin tautia sairastavilla potilailla. Sekä mallille että todelliselle Huntingtonin taudille on tunnusomaista liikekontrollin kannalta välttämättömien hermosolujen vaurio.

Lisäksi yksi Huntingtonin taudin varhaisista oireista on painon menetys [Sanberg, P. R. et al., Med. J. Aust., 1, 407 - 409, (1981)). Samanlaisia

vaikutuksia on havaittu myös mallijärjestelmässä [Sanberg, P. R. et al., Exp. Neurol., 66, 444 - 466, (1979)]. Kinoliinihapon epänormaalin suuria pitoisuuksia on havaittu myös AIDS:iin liittyvässä dementiassa.

Tämän keksinnön mukaisesti sopivalle aivoalueelle tuotetaan troofisia tekijöitä implantoimalla välittäjä, joka sisältää eläviä soluja, jotka erittävät tarkoituksenmukaista tekijää. Sopivasti solut ovat adrenaalisia kromaffiinisoluja, joiden tiedetään erittävän vähintään yhtä tekijää, perussidekudossolujen kasvutekijää. Kromaffiinisolut voivat erittää muitakin, vielä identifioimattomia troofisia tekijöitä. On myös huomattava, että tämä keksinnön suoritusmuoto on erillään kromaffiinisolujen käytöstä neurotransmitterin, dopamiinin, erittämiseksi Parkinsonin taudin oireiden parantamiseksi. Hermosolujen kasvutekijää erittävät solut, kuten fibroblastit, jotka on geeniteknologian avulla käsitelty ilmentämään NGF-tekijää, edustavat vaihtoehtoista hoitoa tähän kinoliinihapolla aiheutettuun hermojen rappeutumiseen. Myeliinistä preparoidut Schwannin solut voidaan kapseloida ja implantoida sopivalle aivojen alueelle Parkinsonin tautiin liittyvän hermojen rappeutumisen estämiseksi.

Keksinnön muussa suoritusmuodossa eläinmalli käsittää fimbria-forniksen vaurion. Erityisesti septohippokampusjärjestelmän hermosolut aksotomoidaan (axotomized), mikä johtaa rappeutumiseen ja solun kuolemaan. Tämän mallin oletetaan vastaavan sen tyyppisiä vaurioita, jotka aiheuttavat Alzheimerin taudin ihmisellä. Sopivasti kasvutekijää, hermosolujen kasvutekijää (NGF), tuotetaan implantoimalla välittäjä, joka sisältää soluja, jotka erittävät hermosolujen kasvutekijää. Voidaan käyttää astrosyyttejä, jotka on tehty kuolemattomiksi (esim. transformoimalla Large T -antigeenin avulla) ja käsitelty geeniteknologian avulla ilmentämään NGF-tekijää. Edullisesti solut ovat fibroblasteja, jotka on käsitelty geneettisesti tuottamaan rekombinatti-NGF:ää. Fibroblastit säilyvät parhaiten hengissä ytimessä, joka koostuu matriisimateriaalista, joka jäljittelee ekstrasellulaarista matriisia, kuten kollageeni- tai laminiinityypiset hydrogeelit. Ydintä ympäröi immunoeristetty vaippa, joka sallii hapen ja ravinteiden diffuusion ytimessä oleviin soluihin ja myös eritetyn NGF:n diffuusion vaipan läpi vastaanottajan elimistöön. Välittäjäimplantti estää kolinergisten hermosolujen kuoleman määritettynä niiden hermosolujen lukumääränä, jotka sisältävät koliiniasetyleenitransferaasia (ChAT), elinkykyisten kolinergisten hermosolujen indikaattoria.

Fimbria-fornix-vauriot aiheuttavat myös mallin eläimillä käytöksen puutteita, jotka havaitaan helpoimmin oppimiseen ja muistiin liittyvissä tehtävissä. On raportoitu, että NGF:n pitkäaikainen antaminen rotille, joilla on fimbria-fornix-vauriot, kiihdyttävät eläimen käyttäytymisen palautumista [Wills, B. et al.,

Behav. Brain Res., 17, 17 - 24, (1985)]. Tässä keksinnössä hermosolujen kasvutekijää (NGF) erittäviä soluja sisältävän välittäjän implantointi tuottaa käytännöllisen tavan vapauttaa hermosolujen kasvutekijää jatkuvasti vaurioituneen eläimen sopivalle aivojen alueelle. Analogisesti tämän keksinnön välittäjä tarjoaa uudistavan ja/tai ennaltaehkäisevän hoidon käytännöllisen muodon Alzheimerin tautia sairastaville potilaille, joiden tilaa voidaan parantaa vapauttamalla jatkuvasti hermosolujen kasvutekijää spesifisille aivojen alueille.

Tämä immunoeristetty välittäjä voidaan muodostaa erilaisiin muotoihin ja sopivien materiaalien yhdistelmiin. Ensisijainen näkökohta valittaessa välittäjälle erityistä konfiguraatiota solujen läsnäollessa, on hapen ja ravinteiden pääsy eristettyihin soluihin tai kudoksiin ja jäteaineenvaihdutatuotteiden, myrkkyjen ja eritetyn tuotteen läpikulku välittäjästä. Immunoeristetty välittäjä voi edustaa mitä tahansa muotoa, joka on tarkoituksenmukainen biologisen aktiivisuuden ylläpitämiseksi ja tuotteen tai toiminnan vapautumisen sallimiseksi, mukaan luettuna esimerkiksi sylinterimäinen, suorakulmainen, levynmuotoinen, tilkunmuotoinen, munanmuotoinen, tähtimäinen tai pallomainen muoto. Lisäksi välittäjä voi olla kelattu tai kääritty verkonkaltaiseksi tai sisäkkäin asetelluksi rakenteeksi. Jos välittäjä on tarkoitus ottaa takaisin implantoinnin jälkeen, niin edullisia eivät ole muodot, jotka pyrkivät johtamaan välittäjän (välittäjien) siirtymiseen implantaatiopaikalta, kuten pallomaiset välittäjät, jotka ovat riittävän pieniä kulkeakseen vastaanottajan verisuonissa. Tietyt muodot, kuten suorakulmiot, tilkut, levyt, sylinterit ja litteät levyt tarjoavat paremman rakenteellisen kokonaisuuden ja ovat edullisia, kun välittäjän takaisinsaanti on toivottavaa.

Tämän välittäjän täytyy tuottaa vähintään yhteen suuntaan riittävä minkä tahansa ytimessä olevien eristettyjen solujen läheisyys vastaanottajan ympäröiviin kudoksiin, mukaan luettuna vastaanottajan verivirta, eristettyjen solujen elinkykyisyyden ja toiminnan ylläpitämiseksi. Kuitenkaan välittäjän muodostamiseen käytettyjen materiaalien diffuusiorajoitukset eivät kaikissa tapauksissa yksin määrää sen muotorajoja. Voidaan käyttää tiettyjä lisäaineita, jotka muuttavat tai lisäävät perusvälittäjän diffuusio-ominaisuuksia tai ravinteiden tai hapen kuljetusominaisuuksia. Esimerkiksi sisäinen väliaine voidaan täydentää hapella kyllästetyillä perfluorihiilivedyillä, vähentäen siten välitöntä kosketustarvetta veren kantaman hapen kanssa. Tämä tekee mahdolliseksi sen, että eristetyt solut tai kudokset pysyvät elinkykyisinä, samalla kun esimerkiksi angiotensiinigradientti vapautuu välittäjästä ympäröiviin kudoksiin stimuloiden hiussuonten kasvua. Viitteet ja menetelmät perfluorihiilivetyjen käyttämiseksi annetaan julkaisuissa Faithful, N. S., Anaesthesia, 42 : 234 - 242 (1987) ja NASA Tech Briefs MSC-21480, U.S.Govt. Printing Office, Washington, D. C., 20402, jotka

liitetään tähän viittauksena. Vaihtoehtoisesti kloonattujen solulinjojen, kuten PC12-solujen, tapauksessa, geeniteknologian avulla käsitellyt hemoglobiinisekvenssit voidaan lisätä solulinjoihin paremman hapen varastoinnin tuottamiseksi. Vol. 15 #1, sivu 54, NPO-17517 NASA Tech Briefs.

Yleensä happea kantavien lisäaineiden puuttuessa solujen ollessa läsnä välittäjän maksimietäisyys pintaan on enintään 2 mm vähintään yhteen suuntaan, jolloin edullinen on maksimietäisyys 800 mikronia. Voidaan tarvita yksi tai useampi välittäjä halutun vaikutuksen tuottamiseksi vastaanottajassa.

Immunoeristetyn välittäjän vaipan paksuuden pitäisi olla riittävä, jotta välittäjien läsnäoloon kohdistuva potilaan immuunivaste estyy. Tätä tarkoitusta varten välittäjien minimipaksuus on 1 µm tai enemmän ja se on vapaa soluista.

Lisäksi välittäjiin voidaan lisätä lujittavia rakenteellisia elementtejä. Nämä rakenteelliset elementit voidaan tehdä siten, että ne ovat läpäisemättömiä ja sopivan muotoisia tehden mahdolliseksi välittäjän sitomisen tai ompelemisen vastaanottajan kudoksiin. Tietyissä olosuhteissa nämä elementit voivat toimia ympäröivän tai perifeerisen alueen sulkemiseksi tiiviisti (esim. sylinterimäisen välittäjän päissä tai levynmuotoisen välittäjän reunoissa) täydentäen ydinmateriaalien eristämisen (esim. valettu termoplastinen pidike). Monien muotojen tapauksessa on toivottavaa, etteivät nämä rakenteelliset elementit sulje sisäänsä läpäisyselektiivisen ympäröivän tai perifeerisen alueen merkittävän suurta alaa.

Yhdessä edullisessa suoritusmuodossa tämän keksinnön implantoitava, immunoeristetty välittäjä on kooltaan ja kestävyydeltään riittävä otettavaksi takaisin täydellisesti implantoinnin jälkeen. Vastakohtana tällaisille mikrokapseleille, joiden tyypillinen, maksimaalinen, käytännöllinen tilavuus on suuruusluokkaa 1 µl, tämän keksinnön edullista immunoeristettyä välittäjää kutsutaan "makrokapseliksi". Tällaisten makrokapseleiden ytimen edullinen minimitilavuus on noin 1 - 10 µl ja käytöstä riippuen niitä on helppo valmistaa tilavuuteen, joka on yli 100 µl.

Takaisinsaannin kannalta mikropallot ovat yleensä vähemmän käytännöllisiä kuin makrokapselit. Esimerkiksi jotta mikropalloihin kapseloitu kudos tuottaa hoidollisen annoksen insuliinia, mikropallojen määrää täytyy lisätä siinä määrin, että merkittävä takaisinsaanti tulee mahdottomaksi. Lisäksi mikropalloon sijoitetun kudoksen tilavuuden lisäys vaatii vastaavan pinta-alan lisäyksen. Koska pinta-ala määrätään asteikolla r^2, kun taas tilavuus määrätään asteikolla r^3, pallossa kapseloidun kudoksen tilavuuden kasvaessa tarvittava kapselin ko-

ko riittävän pinta-alan tuottamiseksi ravinteiden diffundoitumiseksi kapseloituun kudokseen tulee pian mahdottomaksi toteuttaa.

Makrokapseleilla, jotka ovat sylinterin tai litteän levyn muodossa, ei ole näitä rajoituksia, koska tilavuus kasvaa suhteellisemmin pinta-alaan nähden siten, että ravinteiden ja lisääntyneiden kudosmäärien tuottamien tuotteiden diffuusiokuljetus voidaan mukauttaa lisäämällä pinta-alaa lisäämättä tarpeettomasti välittäjän kokoa. Jos esimerkiksi tarvitaan noin 10 000 saareketta/potilaan kehonpaino-kg normoglykemian palauttamiseksi diabetespotilaalla, niin potilaaseen täytyy siirtää 1 000 - 10 000 mikrokapselia/paino-kg (esim. 1 - 10 saareketta/kapseli). Tätä mikrokapseleiden lukumäärää ei voitaisi vaivatta saada takaisin, mikäli takaisinsaantia vaaditaan. Sitä vastoin tämän keksinnön makrokapselit voivat säilyttää enemmän kuin 1 000 - 500 000 saareketta tai enemmän/välittäjä. Edullinen suoritusmuoto vaatisi vähemmän kuin 5 - 10 välittäjää/potilas, mistä seuraa, että makrokapselit saadaan helpommin takaisin kuin suuri määrä mikrokapseleita.

Tämän keksinnön makrokapselit eroavat mikrokapseleista (Sun, A. M., supra; Rha, C. - K., US-patentti 4 744 933) siinä suhteessa, että makrokapselit kykenevät sisältämään yli 10^4 solua ja ylläpitämään niitä elinkykyisessä tilassa. Pisaramenetelmät, joita käytetään mikrokapseleiden valmistuksessa solujen elinkykyisyyden varmistamiseksi, rajoittavat välttämättä solujen lukumäärän/kapseli alle 10^4 soluun.

Tämä keksintö koskee myös menetelmää immunoeristetyn välittäjän valmistamiseksi. Kuten edellä on huomautettu, välittäjä voi tuottaa implantaation erilaisille solu- tai kudostyypeille, mukaan luettuna täysin erilaistuneet, ankkurista riippuvaiset, fetaaliset tai neonataaliset tai transformoidut, ankkurista riippumattomat solut tai kudokset. Immunoeristettävät solut preparoidaan joko luovuttajasta (so. primaarisista soluista tai kudoksista, mukaan luettuna aikuisen solut tai kudokset, neonataaliset ja fetaaliset solut ja kudokset) tai soluista, jotka kahdentuvat in vitro (so. kuolemattomaksi tehdyt solut tai solulinjat, mukaan luettuna geneettisesti muunnetut solut). Kaikissa tapauksissa preparoidaan riittävä määrä soluja tarvittavan tuotteen tehokkaiden pitoisuuksien tuottamiseksi tai tarvittavan aineenvaihduntatoiminnan tuottamiseksi tehokkaassa määrin, yleensä steriileissä olosuhteissa, ja niitä ylläpidetään tarkoituksenmukaisesti (esim. tasapainotetussa suolaliuoksessa, kuten Hank'in suolaliuoksessa tai ravinne-elatusaineessa, kuten Ham'in F12-elatusaineessa) ennen eristämistä.

Tämän keksinnön muun näkökohdan mukaisesti makrokapseleilla on muoto, joka pyrkii vähentämään etäisyyttä makrokapselin keskuksen ja vaipan lähimmän osuuden välillä, jolloin tarkoituksena on mahdollistaa ravinteiden

helppo pääsy potilaasta soluun tai potilaan proteiinien pääsy käsiteltäväksi soluun, joka tuottaa aineenvaihduntatoiminnan, kuten vuorovaikutuksen kolesterolin kanssa tai vastaavaa. Tässä suhteessa ei-pallomainen muoto on edullinen, kuten pitkä putki tai litteä levy tai vastaava. Optimaalinen muoto tätä tarkoitusta varten voidaan laskea tunnetun tekniikan avulla, joka esiteään tässä.

Neljä tärkeätä tekijää, jotka vaikuttavat tämän keksinnön biologisesti yhteesopivan, immunoeristetyn välittäjän ytimeen pantavien solujen lukumäärään tai kudoksen määrään (so. kuormitustiheyteen), ovat: (1) välittäjän koko ja geometria, (2) mitoottinen aktiivisuus välittäjässä, (3) viskositeettivaatimukset ytimen valmistamiseksi ja/tai kuormaamiseksi ja (4) ennen implantaatiota vaadittavat määritykset ja edellytykset.

Viitaten ensimmäiseen näistä tekijöistä (kapselin koko ja geometria) ratkaisevien ravinteiden ja aineenvaihduntatuotteiden diffuusio soluihin sekä jätetuotteiden diffuusio solusta pois ovat ratkaisevia solujen jatkuvan elinkykyisyyden kannalta. Koska diffuusiona tapahtuvaa pääsyä välittäjän sisältöön rajoittaa välittäjän pinta-ala, erimuotoisten ja -kokoisten välittäjien pinta-alan ja tilavuuden väliset suhteet ovat ratkaisevia määritettäessä sitä, kuinka paljon elinkykyistä kudosta voidaan ylläpitää välittäjässä. Happivaatimus on metabolisten vaatimusten joukossa, jotka koskevat aineiden diffuusiota välittäjään. Spesifisten solujen happivaatimukset täytyy määrittää valitun solun tapauksessa. Menetelmät ja viitteet happiaineenvaihdunnan määrittämiseksi on annettu julkaisussa Wilson D. F. et al., J. Biol. Chem., 263 : 2712 - 2718, (1988). Saarekesolujen happivaatimusta on käytetty kytkettyihin diffuusioreaktiomalleihin, joissa lasketaan diffuusiokuljetus ympäröivästä kudoksesta välittäjän seinän ja kudososaston (ytimen) läpi ja sitä käytetään saarekesolujen odotetun elinkykyisyyden laskemiseksi joukossa erikokoisia ja -muotoisia välittäjiä menetelmän mukaan, joka on esitetty julkaisussa Dionne, K. E., Ph. D. -väitöskirja, Massachusetts Institute of Technology, (1989). Käsittelemättömien haiman saarekkeiden tapauksessa nämä laskelmat ovat hyvin sopusoinnussa kokeellisten havaintojen kanssa. Kun kysymyksessä on sylinterimäinen välittäjä, jonka ulkohalkaisija on 900 mikronia ja joka on implantoitu vatsakalvononteloon ($pO_2 \approx 45$ - 50 mmHg), optimaalinen solun kokonaistilavuus on enintään 20 %, edullisesti 1 - 15 %, edullisimmin noin 5 %, välittäjän tilavuudesta. (Jos tämä kapseli olisi 20 cm:n pituinen, sen tilavuus olisi 100 mm^3). Jotta saataisiin sama pinta-ala käyttäen yhtä palloa, esimerkiksi verrattavissa olevien kudosmäärien ylläpitäminen vaatisi 1,047 mm^3:n tilavuuden. Kun kysymyksessä on 400 mikronin sylinterimäinen välittäjä, optimaalinen solutilavuus on 35 - 65 % välittäjän kokonaistilavuudesta ja edullisesti se on 35 %. Nämä laskelmat ottavat huomioon myös

hapen osapaineen implantaatiopaikassa. Implantaatiopaikoissa, joissa hapen paine on vähemmän kuin vatsakalvossa (esimerkiksi ihon alla $pO_2 \approx 20$), vaaditaan pienempiä kuormitustiheyksiä. Implantaatio valtimoihin (pO_2 95 mmHg) ja aivoihin ($pO_2 > 75$ mmHg) tekee mahdolliseksi suuremman kudostilavuuden ylläpitämisen välittäjäyksikköä kohden. Muut välittäjän muodot, kuten levynmuotoinen tai pallomainen välittäjän muoto, ovat myös mahdollisia ja optimaaliset solutilavuudet voidaan laskea samoin näiden geometrioiden tapauksessa. Todellisissa kuormitustiheyksissä ei oteta huomioon vain näitä diffuusionäkökohtia, vaan myös muita näkökohtia, jotka annetaan seuraavassa.

Koskien toista tekijää (solujen jakautumista), jos valittujen solujen odotetaan olevan aktiivisesti jakautuvia ollessaan välittäjässä, niin ne jatkavat jakautumista, kunnes ne täyttävät käytettävissä olevan tilan, tai kunnes ilmiöt, kuten kosketuksen estäminen, rajoittavat jakautumista. Kahdentuvien solujen tapauksessa välittäjän geometria ja koko valitaan siten, että välittäjän ytimen täydellinen täyttyminen ei johda kriittisten ravinteiden puutteeseen johtuen diffuusiorajoituksista. Yleensä välittäjät, jotka täytetään soluilla tai kudoksella yhteensulautumiseen saakka, eivät ole poikkileikkaukseltaan enempää kuin 250 mikronia siten, että sisällä olevilla soluilla on vähemmän kuin 15 solua niiden ja ulkoisen diffuusiopinnan välillä, edullisesti vähemmän kuin 10 solua ja edullisemmin vähemmän kuin 5 solua.

Yleensä kun kysymyksessä ovat solut, joiden ei odoteta jakautuvan välittäjässä, kuten kromaffiinisolut, haiman saarekesolut ja vastaavat, tarkoituksenmukaiset solutiheydet lasketaan edellä lueteltujen diffuusionäkökohtien avulla.

Koskien kolmatta tekijää (ydinmateriaalien viskositeettia) solut, joilla on tiheys, joka vie enintään 70 % välittäjän tilavuudesta, voivat olla elinkykyisiä, mutta soluliuoksilla tällä konsentraatiovaihtelualueella olisi huomattava viskositeetti. Solujen lisääminen hyvin suuren viskositeetin omaavassa liuoksessa välittäjään voisi olla erityisen vaikeata. Yleensä sekä kaksivaiheisia menetelmiä että yhteissuulakepuristusmenetelmiä varten, joita käsitellään jäljempänä, solujen kuormitustiheydet, jotka ovat enemmän kuin 30 %, ovat harvoin käyttökelpoisia, ja yleensä optimaaliset kuormitustiheydet ovat 20 % ja vähemmän. Kun kysymyksessä ovat kudosten fragmentit, on tärkeätä sisällä olevien solujen elinkykyisyyden säilyttämiseksi, että otetaan huomioon samat yleiset suuntaviivat kuin edellä ja kudosfragmenttien halkaisijan ei pitäisi ylittää 250 mikronia, jolloin sisällä olevilla soluilla on vähemmän kuin 15, edullisesti vähemmän kuin 10 solua, niiden ja lähimmän diffuusiopinnan välillä.

Lopuksi koskien neljättä tekijää (preimplantaatio- ja määritysvaatimukset), monissa tapauksissa tarvitaan tietty aika välittäjän valmistamisen ja implantaation välillä. Esimerkiksi voi olla tärkeätä, että välittäjän biologinen aktiivisuus määritetään. Siten mitoottisesti aktiivisten solujen tapauksessa edullisena kuormitustiheytenä pidetään myös solujen lukumäärää, joka täytyy olla läsnä määrityksen toteuttamiseksi.

Useimmissa tapauksissa ennen implantaatiota in vivo voi olla tärkeätä käyttää in vitro -määrityksiä biologisesti aktiivisen osuuden tehon määrittämiseksi välittäjässä. Välittäjät, jotka sisältävät mielenkiintoisen osuuden, voidaan rakentaa ja analysoida käyttäen mallijärjestelmiä. Tämän keksinnön edullisessa suoritusmuodossa glukoosin diffuusiota välittäjään käytetään insuliinin vapautumisen stimuloimiseksi haiman saarekesoluista. Insuliinin ilmestymistä välittäjän ulkopuolelle seurataan käyttämällä sopivaa spesifistä radioimmunomääritystä. Tällaiset menetelmät tekevät mahdolliseksi välittäjän tehon määrittämisen solu- tai yksikkötilavuutta kohden.

Seuraten edellä esitettyjä suuntaviivoja välittäjän kuormaamiseksi ja välittäjän tehon määrittämiseksi, todellinen välittäjän koko implantointia voidaan sitten määrittää erityisen käyttökohteen vaatiman biologisen aktiivisuuden määrän mukaan. Siinä tapauksessa, että erittävät solut vapauttavat hoidollisia aineita, käytetään alalla tunnettuja tavanomaisia annostusnäkökohtia ja kriteerejä tarvittavan eritettävän aineen määrän määrittämiseksi. Huomioon otettaviin tekijöihin sisältyvät: vastaanottajan koko ja paino, solujen tuottavuus tai funktionaalinen taso ja, mikäli tarkoituksenmukaista, sen elimen tai kudoksen normaali tuottavuus tai aineenvaihdunnallien aktiivisuus, jonka toiminta korvataan tai jonka toimintaa parannetaan. On myös tärkeätä ottaa huomioon, että osa soluista ei ehkä kestä elävänä immunoeristämis- ja implantaatiomenetelmiä, ja että onko vastaanottajalla aikaisempi sairaustila, joka voi häiritä implantin tehoa. Voidaan vaivatta valmistaa tämän keksinnön välittäjiä, jotka sisältävt monta tuhatta solua. Edullisissa suoritusmuodoissa hoidollisesti tehokkaat, immunoeristetyt välittäjät, joita käytettiin insuliinin tuottamiseksi insuliinin puuttesta kärsivillä rotilla, sisälsi suuruusluokaltaan 1 000 saareketta. Voidaan myös valmistaa sopivasti suurempia välittäjiä tämän keksinnön menetelmän mukaisesti. Immunoeristettyjen välittäjien mahdollisesti suuren tilavuuden vuoksi monien sairaustilojen hoito vaatii vain yhden tai enimmillään muutaman (vähemmän kuin 10) implantoidun välittäjän sopivan hoidollisen annoksen tuottamiseksi. Suuren määrän soluja sisältävien, vain muutamien hoidollisesti tehokkaiden implantoitavien välittäjien käyttö tuottaa yksinkertaisen välittäjän takaisinsaannin, mikä on monissa sovellutuksissa edullista mikropallomuotoihin ja muihin pieniin muotoihin

nähden, jotka vaativat suuren määrän välittäjiä. Tämän keksinnön immunoeristetty makrokapseli kykenee varastoimaan 10 000 - 100 000 solua, jopa 500 000 solua tai enemmän, yksittäisessä muodossa tai ryhmän muodossa riippuen solujen tyypistä.

Tekniikka ja menetelmät valitun tuotteen tuottavien solujen tai kudosten eristämiseksi ovat alan ammattimiesten tuntemia tai ne voidaan sovittaa tunnetuista menetelmistä vain rutiinitutkimusten avulla. Esimerkiksi Langerhansin saarekkeet voidaan eristää suuren eläimen haimasta (esimerkiksi ihmisen tai sian haimasta) käyttäen mekaanisen laajentamisen ja kollagenaasidigestion yhdistelmää, kuten on kuvattu julkaisussa Scharp, D. W. et al., US-patentti 4 868 121 (1989). Saarekkeet voidaan eristää pienistä eläimistä, kuten rotista, käyttäen menetelmää, joka on kuvattu julkaisussa Scharp, et al., Diabetes, 29 : suppl. 1, 19 - 30, (1980). Samoin hepatosyytit voidaan eristää maksakudoksesta käyttäen kollagenaasidigestiota, ja sen jälkeen kudosfraktiointia, kuten on kuvattu julkaisussa Sun, A. M. et al., Biomat. Art. Cells, Art. Org., 15 (2) : 483 - 496, (1987). Adrenaaliset kromaffiinisolut voidaan eristää käyttäen menetelmää, joka on kuvattu julkaisussa Livett, B. G., Physiology Reviews, 64 : 1103 - 1161, (1984). Monia solutuotteita, jotka on vaikea hankkia käyttäen primaarisia luovuttajakudoksia, voidaan tuottaa käyttäen kuolemattomaksi tehtyjä soluja tai solulinjoja. Kuolemattomaksi tehdyt solut ovat soluja, jotka kykenevät kahdentumaan rajattomasti, mutta jotka osoittavat kosketuksen estämistä jouduttuaan yhteen eivätkä ne ole kasvaimia aiheuttavia. Esimerkki kuolemattomaksi tehdystä solulinjasta on rotan feokromosytoomasolulinja PC12. Transformoituja soluja tai solulinjoja voidaan käyttää samalla tavoin. Transformoidut eivät todennäköisesti ole pelkästään kuolemattomaksi tehtyjä soluja siinä mielessä, että ne eivät osoita kosketuksen estämistä jouduttuaan yhteen ja muodostavat kasvaimia, kun ne implantoidaan allogeeniseen isäntään. Kuolemattomaksi tekeminen voi tehdä mahdolliseksi harvinaisten tai tunnetusti hauraiden solu- tai kudostyyppien käytön valitun tuotteen tai aineenvaihduntatoiminnan vapauttamiseksi pitkäaikaisesti. Sopivat tekniset menetelmät solujen tekemiseksi kuolemattomiksi on kuvattu julkaisuissa Land H. et al., Nature 304 : 596 - 602, (1983) ja Cepko, C. L., Neuron 1 : 345 - 353, (1988). Ehdolla oleviin solulinjoihin sisältyvät geeniteknologian avulla käsitellyt betasolulinjat, jotka erittävät insuliinia, kuten NIT-solut [Hamaguchi, K. et al., Diabetes 40 : 842, (1991)], RIN-solut [Chick, W. L. et al., PNAS 74 : 628 - 632, (1977)], ATT-solut [Hughes, S. D. et al., PNAS USA 89 : 688 - 692, (1992)], CHO-solut [Matsumoto, M. et al., PNAS USA 87 : 9133 - 9137, (1990)] ja beta-TC-3-solut [Tal, M. et al., Molec. and Cell Biol. 12 : 422 - 432, (1992)]. Lisäksi rekombinanttisoluja tai -solulinjoja voidaan

tuottaa uusien tuotteiden tai toimintojen tai niiden yhdistelmien tuottamiseksi käyttäen laajaa valikoimaa teknisiä menetelmiä, jotka ovat alan ammattimiesten tuntemia.

Esimerkiksi fibroblastit voidaan transfektoida valitun tuotteen (esim. hermosolujen kasvutekijän, erytropoietiinin, insuliinin tai tekijä III:n) ekspressiovektorilla. Pitäisi kuitenkin myöntää, että rekombinanttiproteiinin ilmentyminen solulinjatyypissä, joka ei normaalisti ilmennä proteiinia, voi johtaa säätelemättömään ilmentymiseen, joka ei ehkä ole toivottavaa tiettyjen lääketieteellisten sovellutusten tapauksessa.

Voidaan myös käyttää B-soluhybridoomia, jotka erittävät valittua monoklonaalista vasta-ainetta, tai T-soluhybridoomia, jotka erittävät valittua lymfokiinia. Voi olla erityisen toivottavaa vapauttaa monoklonaalinen vasta-aine tai sen fraktio, joka neutraloi säätelemättömän biologisen vasteen muuntajan biologisen aktiivisuuden käyttäen tätä keksintöä. Geeniteknologian avulla käsiteltyjä soluja, jotka erittävät näiden biologisen vasteen muuntajien reseptoreiden liukoisia fragmentteja, voidaan käyttää samalla tavoin. Tietyn biologisen vasteen muuntajien säätelemättömyys tai ylituotanto on osallisena tiettyjen syöpätautien etiologiassa.

Jos immunoeristettävät solut ovat kahdentuvia soluja tai solulinjoja, jotka ovat sopeutuneet kasvamaan in vitro, on erityisen edullista muodostaa näiden solujen solupankki. Solupankin erityinen etu on, että se on samasta viljelmästä tai samasta solujen erästä preparoitujen solujen lähde. Se tarkoittaa, että kaikki samasta solujen lähteestä peräisin olevat solut on saatettu alttiiksi samoille olosuhteille ja rasituksille. Sen vuoksi solupullot voidaan käsitellä identtisinä klooneina. Kudostensiirron yhteydessä tämä helpottaa suuresti identtisten tai korvattavien immunoeristettyjen välittäjien tuotantoa. Se tekee myös mahdolliseksi yksinkertaistetut testausmenetelmät, jotka varmistavat, että implantoidut solut ovat vapaita retroviruksista ja vastaavista. Se voi myös tehdä mahdolliseksi välittäjien rinnakkaisen seuraamisen in vivo ja in vitro, tehden siten mahdolliseksi tekijöiden vaikutusten tutkimisen koskien in vivo -oloaikaa.

Kaikissa tapauksissa on tärkeätä, etteivät välittäjän sisällä olevat solut tai kudokset ole saastuneet tai turmeltuneet. Jos halutaan välittäjä, jolla on matriiriydin, solut sekoitetaan steriileissä olosuhteissa sopivan määrän kanssa biologisesti yhteensopivaa, geeliytyvää hydrogeelimatriisin prekursoria. On olemassa lukuisia luonnollisia ja synteettisiä hydrogeelejä, jotka ovat sopivia käytettäväksi tämän keksinnön biologisesti yhteensopivassa, immunoeristetyssä välittäjässä. Sopiviin luonnosta peräisin oleviin hydrogeeleihin sisältyvät kasviperäiset kumit, kuten alkalimetallialginaatit ja agaroosi, ja muut kasviperäiset

aineet, kuten selluloosa ja sen johdannaiset (esim. metyyliselluloosa). Eläinkudoksesta peräisin olevat hydrogeelit, kuten gelatiini, ovat myös käyttökelpoisia. Vaihtoehtoisesti ydinmatriisi voidaan tehdä ekstrasellulaarisen matriisin (ECM) komponenteista, kuten Kleinman et al. ovat kuvanneet US-patentissa 4 829 000, (1989). Sopiviin synteettisiin hydrogeeleihin sisältyvät polyvinyylialkoholi, etyleenin-vinyylialkoholin lohkosekapolymeeri, natriumpolystyreenisulfonaatti, vinyyli-metyyli-tribentsyyliammoniumkloridi ja polyfostatseeni (Cohen, S. et al., J. Anal. Chem. Soc., 112 : 7832 - 7833, (1990).

Jos aiotaan muodostaa kaksoismatriisin omaava, immunoeristetty välittäjä, ympäröivä tai perifeerinen alue voidaan tehdä hydrogeelistä, joka on valittu edellä luetelluista matriisin prekursoreista. Jos välittäjän ympäröivän tai perifeerisen alueen on määrä käsittää läpäisyselektiivinen membraani, niin silloin voidaan käyttää muita prekursorimateriaaleja. Esimerkiksi ympäröivä tai perifeerinen alue voidaan tehdä veteen liukenemattomista, biologisesti yhteensopivista termoplastisista polymeereista tai sekapolymeereista. Monet Michaels'in US-patentissa 3 615 024, (1971), opettamista polymeereista tai sekapolymeereista täyttävät nämä kriteerit, ja mainittu patentti liitetään tähän viitteenä. Edullinen membraanin valuliuos sisältää polyakrylonitriili-polyvinyylikloridisekapolymeerin (PAN/PVC) liuotettuna veteen sekoittuvaan liuottimeen, dimetyylisulfoksidiin (DMSO). Tämä valuliuos voi sisältää mahdollisesti hydrofiilisiä tai hydrofobisia lisäaineita, jotka vaikuttavat valmiin membraanin läpäisykykyä koskeviin ominaispiirteisiin. PAN/PVC-sekapolymeerin tapauksessa edullinen hydrofiilinen lisäaine on polyvinyylipyrrolidoni (PVP). Muihin sopiviin polymeereihin sisältyvät polyakrylonitriili (PAN), polymetyylimetakrylaatti (PMMA), polyvinyylidifluoridi (PVDF), polyetyleenioksidi, polyolefiinit (esim. polyisobutyleeni tai polypropyleeni), polysulfonit ja selluloosajohdannaiset (esim. selluloosa-asetaatti tai selluloosabutyraatti). Näille ja muille sopiville polymeereille ja sekapolymeereille yhteensopivat, veteen sekoittuvat liuottimet on neuvottu US-patentissa 3 615 024.

Edullisessa suoritusmuodossa ydintä ympäröi biologisesti yhteensopiva hydrogeelimatriisi, joka on vapaa soluista, työntyen ulospäin ulommasta kerroksesta. Tämän keksinnön makrokapselit eroavat Rha'n, Lim'in ja Sun'in mikrokapseleista (Rha, C. K. et al., US-patentti 4 744 933; Sun, A. W., supra) siinä, että (1) solut suljetaan pois täydellisesti makrokapselin ulommasta kerroksesta, ja (2) makrokapselin ulomman kerroksen paksuuden osalta. Molemmat ominaisuudet myötävaikuttavat kapseloitujen solujen immunoeristykseen tässä keksinnössä. Rha'n mikrokapselit muodostettiin käyttäen ioniaktiivisen ydinliuoksen ionivuorovaikutusta ioniaktiivisen polymeerin kanssa, jolla oli vas-

takkainen varaus. Lim'in ja Sun'in mikrokapselit muodostettiin sitomalla ulkoinen hydrogeelivaippa ytimeen poly-L-lysiini-välikerroksen (PLL-välikerroksen) avulla.

Lim'in ja Sun'in mikrokapseleissa välikerroksena oleva PLL-kerros ei ollut riittävän paksu taatakseen, että osia kapseloiduista soluista ei olisi tunkeutunut kerroksen läpi ja sen toiselle puolelle. PLL-kerroksen läpi tunkeutuvat solut ovat mahdollisia immuunivasteen kohteita. Kaikki nämä kapselit, mukaan luettuna Rha'n julkaisemat kapselit, kärsivät myös seuraavista muista rajoituksista: (a) ne ovat pyöreitä ja (b) ulomman kerroksen muodostaminen on riippuvainen suorasta ionisitoutumisesta tai polyamidisitoutumisesta sisäkerroksen tai ydinmateriaalin kanssa. Pyöreästä muodosta ja suorasta ionisitoutumisesta polymeerien välillä aiheutuvat haittapuolet on kuvattu edellä.

Rha'n, Lim'in ja Sun'in kapseleiden tapauksessa, koska sisällä olevan aineen kemiallisen identiteetin määrää joko ulkokerroksen valinta tai PLL, kyky vaihdella kasvuolosuhteita näiden kapseleiden sisäpuolella on suuresti rajoitettua. Koska usein vallitsevat spesifiset kasvuolosuhteet, jotka täytyy täyttää spesifisten solutyyppien kapseloimiseksi menestyksellisesti, näillä kapseleilla on yleensä rajoitettu käyttö tai ne vaativat huomattavasti kokeilua sopivien ulkokerrosten vakiinnuttamiseksi käyttöön tietyn sisällä olevan aineen tapauksessa. Sitä vastoin tässä keksinnössä ydinmateriaalin identiteetti ei aseta ankaria rajoituksia ulkovaippamateriaalin identiteetille ja päinvastoin. Tämä tekee mahdolliseksi sen, että sisempi hydrogeelimateriaali voidaan valita kriteerien mukaan, jotka ovat tärkeitä solun elinkykyisyyden ja kasvun kannalta, ja ulkovaipan materiaali voidaan valita perustuen immunoeristäviin ominaisuuksiin, biologiseen yhteensopivuuteen ja/tai valmistusnäkökohtiin.

Rha'n, Lim'in ja Sun'in mikrokapseleilla on suurempi mahdollisuus biologiseen yhteensopimattomuuteen, fibrogeneesiin ja välittäjän turmeltumiseen kuin tämän keksinnön makrokapseleilla. Erilaisten biologisten järjestelmien tiedetään vuorovaikuttavan mikrokapseleiden eheyteen vaadittavien ionisidosten kanssa ja katkovan niitä. PLL herättää epäsuotuisia kudosreaktioita kapselia kohtaan. Aivan erityisesti tämä on fibroottinen vaste. Siten jos ulkokerroksessa on mikä tahansa murtuma, jos ulkokerros ei ole riittävän paksu, jos PLL-kerros alkaa hajota tai jos ulkokerros sulkee sisäänsä kapseloituja soluja, jotka ovat riittävän lähellä sen ulkopintaa, mikrokapseli voi laukaista fibroottisen vasteen. Tässä termiä "fibrogeeninen" käytetään viittaamaan kapseleihin tai materiaaleihn, jotka herättävät fibroottisen vasteen implantaatiopaikassa. Kuten tässä on esitetty, tämän keksinnön immunoeristetyn, ei-fibrogeenisen makrokapselin ulkoinen vaippa voidaan muodostaa eri tavoin.

Yhdessä suoritusmuodossa ydin esimuodostetaan silloittamalla hydrogeelimatriisi käyttäen silloittavaa ainetta, edullisesti moniarvoista kationia, kuten kalsiumia. Kuitenkin voidaan myös käyttää muita tunnettuja hydrogeelin silloittavia aineita. Silloittamisen jälkeen ydin kastetaan hydrogeelin liuokseen toisen kerroksen muodostamiseksi, joka on ytimessä olevista soluista vapaa ja joka silloitetaan samanaikaisesti tai sen jälkeen sopivasti samalla tavoin. Tässä suoritusmuodossa ydinmateriaalin silloittaminen vaippamateriaalin kanssa toteutetaan käytteän silloittavaa ainetta. Esimerkiksi kun ydin- ja vaippamateriaalit ovat molemmat negatiivisesti varautuneita hydrogeelejä, ydin ja vaippa silloitetaan toistensa kanssa käyttäen niiden molemminpuolista vetovoimaa silloittavan aineen, edullisesti kalsiumin, positiivisiin varauksiin. Ydin ja vaippa voidaan muodostaa saman tyyppisestä tai eri tyyppisestä hydrogeelistä, edellyttäen, että molemmilla on sama varaus. Erityisesti tätä välittäjää ei muodosteta käyttäen suoraa ionisitoutumista anioniaktiivisten ja kationiaktiivisten polymeerien välillä, kuten on kuvattu US-patentissa 4 744 933 (Rha, CK, et al., toukokuun 17. päivä, 1988). Tässä termi "suora ionisitoutuminen" viittaa kemiallisen sitoutumisen tyyppiin, jossa kaksi vastakkaisen varauksen omaavaa polymeeria vetää toisiaan puoleensa vastakkaisesti varautuneiden osuuksiensa vuoksi. Tämä suoritusmuoto eroaa Rha'n suoritusmuodosta, koska tässä suoritusmuodossa sekä ydinmateriaalilla että vaippamateriaalilla on sama varaus ja niiden liittyminen yhteen tapahtuu vastakkaisen varauksen omaavan silloittavan aineen avulla. Tämä suoritusmuoto voi olla mikrokapselin tai makrokapselin muodossa, mutta tässä esitetyistä syistä johtuen makrokapselimuoto on edullinen.

Tämä välittäjä voidaan muodostaa yhteissuulakepuristamalla tai saattaa kokoon vaiheittain. Suulakepuristustekniikka, jota voidaan käyttää tämän välittäjän muodostamiseksi, on opetettu vireillä olevassa US-patenttihakemuksessa 07/461 999, jätetty tammikuun 8. päivä, 1990, joka liitetään tähän patenttivaatimuksena. Esimerkiksi yhteissuulakepuristuslaitetta, joka on vastaava kuin julkaisussa U.S.S.N 07/461 999 neuvottu laite, käytetään kohteena olevan välittäjän valmistuksessa. Laitteella on sisäkkäiset putket omaava suulakepuristussuutin, jolloin kummankin putken (sisällä olevan ja ulomman) aukko on sopivasti yhdistetty steriileihin kammioihin ytimen ja ympäröivän alueen materiaalien vapauttamiseksi. Suutin voi olla mitä tahansa muotoa, joka on sopiva immunoeristetyn välittäjän tuottamiseksi, jonka muoto on tarkoituksenmukainen immobilisoitavien solujen aineenvaihdunnallisten tarpeiden ja niitä ympäröivän matriisin läpäisyvyyden ja lujuuden kannalta. Esimerkiksi suutin voi olla ympyränmuotoinen, ellipsinmuotoinen, tähtimäinen tai raonmuotoinen. Mahdollisesti sisäkkäiset putket ovat samankeskisiä. Suuttimen laajimman au-

kon täytyy olla oikeassa suhteessa maksimaalisen diffuusiosyvyyden kanssa, joka on muodostettavan laitteen kannalta tarkoituksenmukainen, mukaan luettuna eristettyjen solujen tai kudosten aineenvaihdunnalliset tarpeet ja ytimen ja perifeeristen alueiden materiaalit. Kun ytimen ja perifeeristen alueiden materiaalit suulakepuristetaan sisä- ja ulkokammioista suuttimen vastaavien putkien kautta olosuhteissa, jotka ovat riittävät ympäröivän tai perifeerisen alueen (ja ytimen alueen) matriisin tai membraanin prekursorin (prekursoreiden) geeliytymiseksi, kovettumiseksi tai valamiseksi, niin muodostuu keskeytymättömästi pitkänomaista välittäjää, joka on haluttua muotoa. Välittäjän pituutta ja siten sen tilavuutta tai vetävyyttä voidaan kontrolloida, jotta saadaan välittäjiä, joilla on tarkoituksenmukainen koko nimenomaista aiottua käyttöä varten. Tällä tavoin yhteissuulakepuristuksen avulla muodostettu immunoeristetty välittäjä on erityisen edullinen, koska suulakepuristuksen käyttö varmistaa sen, että ytimen solut eristetään välittäjän muodostamishetkestä lähtien. Siten se varmistaa myös sen, että ydinmateriaalit eivät saastu tai turmellu välittäjän käsittelyn aikana ennen implantointia. Lisäksi suulakepuristusmenetelmän luonne on sellainen, että se varmistaa, että ympäröivä tai perifeerinen alue (vaippa) on vapaa ytimessä olevista aineista, mukaan luettuna solut, varmistaen siten, että nämä solut ovat immunoeristettyjä, kun välittäjä implantoidaan yksilöön. Ympäröivän tai perifeerisen alueen läpäisyvyyttä, molekyylipainon enimmäisrajaa ja biologista yhteensopivuutta koskevat ominaispiirteet määräytyvät sekä valitun matriisin tai membraanin prekursorimateriaalien mukaan, joita käytetään, ja olosuhteiden mukaan, joissa matriisi tai membraani muodostetaan.

Yhteissuulakepuristetut välittäjät voidaan muodostaa käyttäen hydrogeelimatriisiydintä ja termoplastista vaippaa tai hydrogeelivaippaa. Tällaiset makrokapselit voidaan muodostaa käyttäen ydintä ja vaippaa, jotka ovat samanlaista tai erilaista hydrogeeliä ja jotka voivat olla silloitettu toisiinsa tai eivät ole silloitettu toisiinsa.

Viitaten tämän keksinnön membraanien ja geelien läpäisyselektiivisyyteen käytetään fraasia "molekyylipainon enimmäisraja" (MWCO). Myönnetään, että on olemassa monta menetelmää, jotka ovat käytettävissä molekyylipainon enimmäisrajan määrittämiseksi läpäisyselektiivisen membraanin tapauksessa. Riippuen käytettävästä menetelmästä saman membraanin osalta voidaan saada jonkin verran erilaisia MWCO-arvioita. Tämän keksinnön yhteydessä, MWCO viittaa tässä tuloksiin, jotka on saatu tässä kuvatuista empiirisistä määrityksistä käyttäen spesifisiä merkintäaineita, jotka on kuvattu määrityksen spesifisissä olosuhteissa. Muut menetelmät MWCO:n määrittämiseksi tässä

keksinnössä täytyy kalibroida tämän keksinnön menetelmän suhteen menetelmien mukaan, jotka ovat alan ammattimiesten tuntemia.

Jos muodostetaan kaksoismatriisin omaava immunoeristetty välittäjä (esim. alginaattimatriisi), ympäröivän matriisin läpäisykyky voidaan määrittää säätämällä käytetyn matriisin prekursorin (esim. natriumalginaatin) konsentraatio ja/tai geelinmuodostusaineen (alginaatin tapauksessa kaksiarvoinen kationi, kuten Ca^{++}) konsentraatio, joka on läsnä upotuskylvyssä, johon materiaalit yhteissuulakepuristetaan.

Jos halutaan immunoeristetty välittäjä, jonka ympäröivä tai perifeerinen alue on termoplastisesta membraanista, huokoskoon vaihtelualue ja jakautuma voidaan määrittää vaihtelemalla prekursorimateriaalin liuoksen (valuliuoksen) kiinteiden aineiden pitoisuutta, veteen sekoittuvan liuottimen kemiallista koostumusta tai mahdollisesti sisällyttämällä hydrofiilinen tai hydrofobinen lisäaine valuliuokseen, kuten US-patentissa 3 615 024 opetetaan. Huokoskoko voidaan myös säätää vaihtelemalla koagulantin ja/tai kylvyn hydrofobisuutta. Tyypillisesti valuliuos sisältää polaarisen orgaanisen liuottimen, joka sisältää liuenneen, veteen liukenemattoman polymeerin tai sekapolymeerin. Tämä polymeeri tai sekapolymeeri saostuu joutuessaan kosketukseen liuottimeen sekoittuvan, vesipitoisen faasin kanssa muodostaen läpäisyselektiivisen membraanin rajapinnan kohtaan. Huokoskoko membraanissa riippuu vesipitoisen faasin diffuusionopeudesta liuotinfaasiin: hydrofiiliset tai hydrofobiset lisäaineet vaikuttavat huokoskokoon muuttamalla tätä diffuusionopeutta. Kun vesipitoinen faasi diffundoituu edelleen liuottimeen, jäljellä oleva polymeeri tai sekapolymeeri saostuu muodostaen juosteisen tuen, joka antaa valmiille välittäjälle mekaanisen lujuuden. Välittäjän ulkoinen pinta määräytyy samoin olosuhteiden mukaan, joissa liuennut polymeeri tai sekapolymeeri saostuu (so. saatetaan alttiiksi ilmalle, mikä muodostaa avoimen, juosteisen tai sienenkaltaisen ulkopinnan, upotetaan vesipitoiseen saostuskylpyyn, mikä tuottaa tulokseksi tasaisen, läpäisyselektiivisen kaksoiskerroksen, tai saatetaan alttiiksi ilmalla kyllästetylle vesihöyrylle, mikä tuottaa tulokseksi välikerrosrakenteen). Jälleen on helposti ymmärrettävää, että tämä menetelmä immunoeristetyn välittäjän muodostamiseksi varmistaa sen, että perifeerinen tai ympäröivä membraani on vapaa ytimessä olevista soluista, joiden halutaan olevan eristettyjä sen yksilön immuunijärjestemältä, johon välittäjä on tarkoitus implantoida.

Välittäjän pinnan rakenne on riippuvainen osaksi siitä, sijaitseeko suulakepuristussuutin kylvyn yläpuolella vai onko se upotettu siihen; jos suutin on kylvyn pinnan yläpuolella, muodostuu PAN/PVC:n muodostama karkea ulkopinta, kun taas jos suutin on upotettu kylpyyn, muodostuu tasainen ulkopinta.

Immunoeristetty välittäjä voidaan myös muodostaa vaiheittain. Kun kysymyksessä ovat välittäjät, joissa ydin sisältää eristettävien solujen lisäksi hydrogeelimatriisin, ydin voidaan muodostaa ensin ja ympäröivä tai perifeerinen matriisi tai membraani voidaan laittaa kokoon tai levittää myöhemmin. Matriisiydin voidaan muodostaa joko suulakepuristamalla tai valamalla muottiin. Edullisessa suoritusmuodossa tilkun- tai levynmuotoinen välittäjä muodostetaan suulakepuristamalla vaiheittain kalanteroidut levyt. Tässä suoritusmuodossa ydinmateriaalin muodostama levy kerrostetaan perifeerisen alueen materiaalin levyn päälle, sitten se peitetään perifeerisen alueen materiaalin toisella levyllä. Sitten välittäjän reunat tiivistetään rypyttämällä, puristamalla, kuumentamalla, tiivistämällä biologisesti yhteensopivalla liimalla tai sitomalla esimuodostettuun, biologisesti yhteensopivaan, läpäisemättömään pidikkeeseen tai käyttäen edellä esitettyjen menetelmien yhdistelmiä.

Käänteisesti ympäroivä tai perifeerinen matriisi tai membraani voidaan esimuodostaa, täyttää aineilla, jotka muodostavat ytimen (esimerkiksi käyttäen ruiskua), ja sen jälkeen tiivistää sillä tavoin, että ytimen aineet tulevat täysin suljetuiksi sisään. Välittäjä voidaan sitten saattaa alttiiksi olosuhteille, jotka saavat aikaan ydinmatriisin muodostumisen, jos matriisin prekursorimateriaali on läsnä ytimessä. Vaihtoehtoisesti tilkun- tai levynmuotoinen matriisiydin voidaan muodostaa valamalla muottiin, sitten kerrostaa läpäisyselektiivisestä membraanista muodostettujen levyjen väliin ja tiivistää tai kiinnittää pidikkeillä siten, kuin edellä on kuvattu, ydinmateriaalien eristämiseksi täydellisesti.

Yksinkertaisen, jatkuvan hydrogeelimatriisin tapauksessa on myös mahdollista tuottaa sekä immunoeristäminen ja ylläpito tai immobilisaatio. Esimerkiksi tämä voidaan toteuttaa sisällyttämällä eristetyt solut välittäjän sisään jakautuneena samankeskiseen gradienttiin ytimeen siten, että välittäjän perifeerinen alue on vapaa immobilisoiduista soluista. Tämän luonteiset immunoeristetyt välittäjät voidaan valmistaa ainakin kahdella tavalla. Ensinnäkin solujen seos suspendoituna hydrogeelimatriisin prekursorin liuokseen, seoksen ollessa tiheämpi kuin eristetyt solut, voidaan suulakepuristaa yksinkertaisen suulakepuristuslaitteen suuttimesta. Tällä tavalla solut pakotetaan muodostuvan välittäjän ydinalueeseen. Vaihtoehtoisesti solujen ja matriisin prekursorin seos voidaan suulakepuristaa sisäkkäiset putket omaavan suuttimen ydinaukosta vapauttamalla samanaikaisesti geelinmuodostusaineen (esimerkiksi alginaatin, kalsiumkloridin liuoksen) virta ulomman suuttimen kautta, jolloin välittäjän pinta ja äärireunat polymeroituvat ensin pakottaen siten suspendoidut solut ytimeen.

Tämän keksinnön yhdessä edullisessa sovellutuksessa solut muodostetaan rykelmöittämällä luonnolliset soluryhmät uudelleen muotoon, joka

sopeutuu lisättyyn pakkaukseen tilavuusyksikköä kohden, kuten edellä on kuvattu.

Tällaisille uudelleen rykelmöityneille ryhmille on edullisesti tunnusomaista ratkaisevien liuenneiden aineiden parantunut diffuusio ryhmän sisällä oleviin soluihin ja niistä pois verrattuna luontaisiin soluryhmiin.

Minkä tahansa edellä kuvatun menetelmän avulla saatua, juuri muodostettua immunoeristettyä välinettä voidaan ylläpitää steriileissä olosuhteissa ei-pyrogeenisessä, seerumista vapaassa, määritellyssä ravintoaineessa tai tasapainotetussa suolaliuoksessa noin 37°C:n lämpötilassa ennen implantointia. Tiettyjen solutyyppien ja/tai viljelyolosuhteiden tapauksessa alemmat lämpötilat (20 - 37°C) voivat olla optimaalisia. Voidaan myös käyttää muita ylläpitolämpötiloja ja elatusainekoostumuksia, jotka ovat sopusoinnussa solujen hyvän elinkykyisyyden kanssa. Vaihtoehtoisesti välittäjä voidaan kylmäsäilöä jäähdytysaineen avulla nestemäiseen typpeen, jos kylmältä suojaava aine, kuten glyseriini, on lisätty matriisiin (Rajotte, R. V. et al., Transplantation Proceedings, 21 : 2638 - 2640, (1989). Tällaisessa tapauksessa välittäjä sulatetaan ennen käyttöä ja sen annetaan tasapainottua steriileissä olosuhteissa, kuten edellä on kuvattu.

Biologisesti yhteensopivan, immunoeristetyn välittäjän implantointi toteutetaan myös steriileissä olosuhteissa. Yleensä immunoeristetty välittäjä implantoidaan vastaanottajan elimistössä paikkaan, joka sallii eritetyn tuotteen tai toiminnan tarkoituksenmukaisen vapautumisen vastaanottajaan ja ravinteiden vapautumisen implantoituihin soluihin tai kudokseen, ja sallii pääsyn välittäjään poistamista ja/tai korvaamista varten. Arvellaan olevan edullista tarkistaa, että välittäjän sisään immobilisoidut solut toimivat asianmukaisesti ennen implantointia ja sen jälkeen; alalla hyvin tunnettuja määrityksiä tai diagnostisia testejä voidaan käyttää näihin tarkoituksiin. Esimerkiksi voidaan käyttää ELISA-menetelmää (entsyymi-sitoutuneen immunosorbentin määritys), kromatografista tai entsymaattista määritystä tai biologista määritystä, joka on spesifinen eritetyn tuotteen suhteen. Haluttaessa implantin eritystoimintaa voidaan valvoa ajan mittaan ottamalla vastaanottajasta tarkoituksenmukaisia näytteitä (esim. seerumia) ja tutkimalla ne.

Keksintöä kuvataan edelleen seuraavien esimerkkien avulla, joita ei katsota rajoittaviksi millään tavoin.

Esimerkki 1. Solujen preparoiminen immunoeristystä varten

Soluja, jotka olivat peräisin solulinjoista tai primaarisista lähteistä, ylläpidettiin in vitro ennen immunoeristystä. (Joissakin tapauksissa soluja varastoitiin kylmäsäilöttyinä (cryopreserved) ja sitten ne sulatettiin ja mukautettiin il-

manalaan in vitro). Inkubointiolosuhteet vaihtelevat spesifisten solutyyppien osalta, mutta ne ovat helposti alan ammattimiesten selvitettävissä seuraten vain rutiinikokeita. Langerhansin saarekkeet saatiin käyttäen Scharp'in et al. (supra) menetelmiä ja niitä ylläpidettiin 37°C:n lämpötilassa ilmakehässä, jossa oli 5 % CO_2:a ja 95 % ilmaa elatusaineessa, joka koostui ravinnelihaliemestä [esim. Ham's F12 (GIBCO)] täydennettynä seerumilla (esim. 25 % hevosluovuttajan seerumia tilavuuden mukaan). Saarekkeita ylläpidettiin viljelmässä käyttäen petrimaljoja 24°C:n lämpötilassa ennalta määrätty aika menetelmän mukaan, joka on kuvattu julkaisussa Lacy, P. E. et al., Science, 204 : 312 - 313, (1979). Ennen immunoeristystä saarekkeet otettiin talteen, väkevöitiin kieputtamalla petrimaljaa, ne suspendoitiin uudelleen Hank'in tasapainotettuun suolaliuokseen (HBSS). Pestyt saarekkeet suspendoitiin uudelleen riittävään tilavuuteen HBSS-liuosta, jotta saatiin lopullinen saareketiheys, joka tarvittiin immunoeristetyn välittäjän muodostamiseksi, joka sisälsi halutun määrän saarekkeita ja jolla oli tarkoituksenmukainen koko ja muoto implantointia varten ja sen jälkeen normoglykemian (veren normaalin glukoosipitoisuuden) palauttamiseksi diabetespotilaalla. Tämän menetelmän solujen preparoimiseksi ennen immunoeristystä otaksutaan poistavan antigeenin esiintuovat solut saarekekudoksesta ja siten vähentävän välittäjän ulkopintaan kohdistuvaa immunologista vetovoimaa, joka voisi rajoittaa välittäjän toimintaa ja kestoaikaa.

Esimerkki 2. Erilaiset molekyylipainon enimmäisrajat omaavien hydrogeelimatriisien muodostaminen

Ohutta alginaattikalvoa, joka oli valmistettu liuoksesta, jossa oli 1 % natriumalginaattia (paino/tilavuus) vedessä, silloitettiin 6 minuutin ajan käyttäen joko (1) 1-%:ista (paino/tilavuus) tai (2) 2,0-%:ista (paino/tilavuus) $CaCl_2$:n vesiliuosta. Levy tehtiin asettamalla nestekalvo lasilevylle käyttäen terää (draw down blade), jossa oli 0,2 mm:n liikkumisvara, sitten tuote upotettiin $CaCl_2$:n vesiliuokseen. Kalvosta leikattiin levy käyttäen 47 mm:n leikkausmeistiä. Levy pantiin sekoitettuun Amicon suodatuskennoon ja sitä käytettiin useiden liuotettujen merkitsijöiden liuosten suodattamiseksi 69 kPa:n (10 psi) paineessa. Mitattiin liuotetun merkitsijän konsentraatio pidättyneestä aineesta (C_r = pidättyneen aineen alku- ja loppukonsentraation keskiarvo) ja samoin läpäisseestä aineesta (C_p). Jokaisen hydrogeelin hylkäämiskerroin laskettiin seuraavasti:

$$R = 1 - C_p/C_r$$

Siten liuotetulla aineella, joka hylätään täysin, on kerroin 1 ja käänteisesti aineella, joka kulkee täydellisesti hydrogeelin läpi, on kerroin 0. Liuoksen (1) tapauksessa tuloksena saatu hydrogeeli läpäisi Dextran-liuoksen (Poly Sciences Corp.) $3{,}3 \times 10^{-18}$ g:aan (2 000 kD:iin) saakka (hylkäämiskerroin 0,64).

Liuoksen (2) tapauksessa tuloksena saatu hydrogeeli oli lähes läpäisemätön saman Dextran-liuoksen suhteen. Kuva 1 kuvaa seuraavien muiden liuotettujen aineiden läpäisyä näiden kahden hydrogeelin läpi. Naudan seerumin albumiini (Bovine Serum Albumin, BSA, ICN Biochemicals), vitamiini B12 (ICN Biochemicals), α-kymotrypsiini (ICN Biochemicals), Apoferritin (Sigma). Likimääräiset molekyylipainot on annettu suluissa kuvassa.

Esimerkki 3. Kaksoismatriisin omaavan immunoeristetyn välittäjän muodostaminen

Steriileissä olosuhteissa valmistettiin 2-%:inen natriumalginaatin liuos fysiologiseen suolaliuokseen (PS; 150 mM NaCl:n suhteen). Aikuisista rotista eristettyjen haiman saarekkeiden steriili suspensio CRML1066 (GIBCO) -viljelyelatusaineessa laimennettiin suhteessa 1 : 1 alginaattiliuoksella, jolloin lopulliseksi alginaatin konsentraatioksi saarekesuspensiossa saatiin 1 %. Saarekesuspensio suulakepuristettiin yhden kammion suulakepuristussuuttimesta 1-%:iseen $CaCl_2$-kylpyyn. Heti kun alginaatin polyionit oli silloitettu (likimäärin 2 min) ja immobilisoituja saarekkeita sisältävä ydin muodostunut, ydin pantiin 2-%:iseen alginaattiliuokseen. Ydin vedettiin sitten putkeen, jonka halkaisija oli likimäärin 500 mikronia suurempi kuin ydin, ja suulakepuristettiin sitten uudelleen toiseen silloituskylpyyn, jossa oli 2-%:ista alginaattia, ympäröiden ydin vaipalla, joka oli muodostunut erillisestä, soluista vapaasta alginaattimatriisikerroksesta silloitettuna ytimeen. Näin muodostettu makrokapseli on sylinterimäinen, jonka pituus oli 30 mm, ytimen halkaisija oli 800 mm ja ytimen väli vaippaan 1 mm. Ytimen tilavuus oli 15 mm. Ydin sisälsi 300 saareketta muodostaen tilavuuden, joka oli 10,6 % ytimen kokonaistilavuudesta.

Esimerkki 4. Kaksoismatriisin omaavan immunoeristetyn välittäjän muodostaminen yhteissuulakepuristamalla

Steriileissä olosuhteissa valmistettiin 2-%:inen natriumalginaattiliuos fysiologiseen suolaliuokseen (PS; 150 nM NaCl:n suhteen). Steriili, täysikasvuisista rotista eristetty haiman saarekkeiden suspensio CRML1066-elatusaineessa laimennettiin suhteessa 1 : 1 alginaattiliuoksella, jotta saarekesuspension lopulliseksi alginaattikonsentraatioksi saatiin 1 %.

Saarekesuspensio pantiin kaksi sisäkkäistä putkea käsittävän suulakepuristuslaitteen sisäkammioon, suulakepuristuslaitteen ollessa edellä kuvattua muotoa, jolloin suulakepuristuslaitteen sisemmän putken halkaisija oli 500 mikronia ja ulomman putken halkaisija 600 mikronia. Tämän laitteen ulompaan kammioon pantiin steriili, 1-%:inen natriumalginaattiliuos fysiologisessa suolaliuoksessa.

Suuttimen kärki oli upotettu kylpyyn, joka sisälsi fysiologisessa suolaliuoksessa steriilin, 1-%:isen $CaCl_2$-liuoksen, joka aiheuttaa alginaatin kovettumisen tai geeliytymisen silloittamalla alginaattipolyionit. Kammiohin kuormatut aineet suulakepuristettiin yhdessä tähän kylpyyn, jolloin muodostui jatkuvasti alginaattisylinteri, joka sisälsi alginaattimatriisin ja immobilisoitujen saarekkeiden muodostamana ydinalueen ja alginaattimatriisin muodostaman ympäröivän alueen, joka oli vapaa soluista. Vaipan ulkohalkaisija oli 1,2 mm. Ytimen sisähalkaisija oli 1,0 - 1,05 mm. Ytimen saarekkeiden kokonaistilavuus oli 0,8 mm^3 (200 saareketta). Ytimen kokonaistilavuus oli 25,98 mm^3. Saarekkeiden tilavuus oli 3 % ytimen kokonaistilavuudesta. Molekyylipainon enimmäisraja (MWCO) 1-%:isen alginaatin tapauksessa oli kuten kuvassa 1 on kuvattu. Kuitenkin MWCO voi nousta ajan kuluessa samoin kuin kuvassa 7 johtuen jatkuneesta Ca^{++}-ionin siirtymisestä pois paikaltaan. Ytimen alginaatti oli silloitettu vaipan alginaatin kanssa.

Ympäröivän alueen suhteellista paksuutta muunnettiin säätämällä nopeuksia, joilla aineet suulakepuristettiin suuttimen ydinputkesta ja ulommasta putkesta. Yleensä kun virtaus ytimessä lisääntyi, seinän paksuus väheni. Kun virtaus ulommassa putkessa lisääntyi, seinän paksuus lisääntyi. Käytettyjen virtausnopeuksien vaihtelualueet olivat samat sekä ytimelle että ulommalle putkelle (0,3 - 1,5 ml/min). Sylinterin päät suljettiin tiiviisti kastamalla sylinteri ensin steriiliin, 2-%:iseen natriumalginaattikylpyyn, sitten steriiliin, 1-%:iseen $CaCl_2$-kylpyyn. Näin muodostettua immunoeristettyä välittäjää säilytettiin steriilissä kudosviljelmän elatusaineessa ennen implantointia.

Esimerkki 5. Ydinmatriisin ja läpäisyselektiivisen membraanin omaavan immunoeristetyn välittäjän muodostaminen yhteissuulakepuristamalla

Rotan saarekkeiden suspensio valmistettiin 1-%:iseen alginaattiin, kuten esimerkissä 3 on kuvattu, ja pantiin yhteissuulakepuristuslaitteen sisempään kammioon. Ulompi kammio täytettiin membraanin valuliuoksella, joka sisälsi 12,5 % (paino/paino) PAN/PVC:tä DMSO:ssa (dimetyylisulfoksidissa). Suuttimen kärki oli asetettu joko vakioetäisyydelle kylvyn yläpuolelle tai upotettu kylpyyn, joka sisälsi fysiologisessa suolaliuoksessa steriilin, 1-%:isen $CaCl_2$-liuoksen, joka aiheutti alginaattiydinmatriisin kovettumisen tai geeliytymisen ja samanaikaisesti valuliuoksen kovettumisen läpäisyselektiiviseksi membraaniksi. Välittäjän ulkopinnan tunnusmerkit määräytyivät sen mukaan, oliko suutin asetettu kylvyn pinnan yläpuolelle vai alapuolelle. Kun suutin oli asetettu kylvyn yläpuolelle ja alttiina matalalle ilman suhteelliselle kosteudelle (RH), muodostui anisotrooppinen membraani, jolla oli karkea, nahkamainen ulkopinta, mutta kun

suutin oli upotettu kylpyyn, muodostui membraani-kaksoiskerros, jolla oli tasainen pinta. Vaihtoehtoisesti kun suutin oli asetettu kylvyn yläpuolelle ja kuitu saatettiin alttiiksi suurelle ilman suhteelliselle kosteudelle (RH), muodostui edellisten välimuoto. Kammioihin laitetut aineet suulakepuristettiin yhdessä tähän kylpyyn, mikä sai aikaan sen, että muodostui jatkuvasti sylinterimäistä välittäjää, joka sisälsi alginaattimatriisin ja immobilisoitujen saarekkeiden muodostaman ydinalueen ja ympäröivän pyoliläpäisevän membraanin, jonka molekyypainon enimmäisraja (MWCO) oli 8,25 x 10^{-20} g (50 kD).

Membraanin suhteellista paksuutta muunnettiin säätämällä suulakepuristuksen suhteellista nopeutta putkista, kuten esimerkissä 3 on kuvattu. Sylinterin päät suljettiin tiiviisti käyttäen menetelmiä, jotka olivat samanlaisia kuin vireillä olevassa US-patenttihakemuksessa 07/461 999, jätetty tammikuun 8. päivä, 1990; kuvatut menetelmät ja mainitun patenttihakemuksen opetukset liitetään tähän viittauksena. Näin muodostettua immunoeristettyä välittäjää säilytettiin steriilissä fysiologisessa suolaliuoksessa, tasapainotetussa suolaliuoksessa tai kudosviljelmän elatusaineessa ennen implantointia.

Esimerkki 6. Ydinmatriisin ja läpäisyselektiivisen membraanin omaavan välittäjän muodostaminen "kuormaamalla käsin"

Muissa tapauksissa saarekkeet suspendoitiin 1 - 2-%:iseen alginaattiliuokseen ja "kuormattiin käsin" esimuodostettuihin, termoplastisiin, onttoihin kuituihin käyttäen ruiskua ja kuitujen päät suljettiin tiiviisti käyttäen lämmön polymeeriliiman saostamisen yhdistelmää, kuten on kuvattu vireillä olevassa patenttihakemuksessa U.S.S.N. 07/461 999. Termoplastisen vaipan molekyylipainon enimmäisraja (MWCO) oli likimäärin 8,25 x 10^{-20} g (50 kD). Hydrogeelimatriisi muodostettiin inkuboimalla täytettyjä kuituja 1-%:isessa kalsiumkloridiliuoksessa 6 minuutin ajan.

Esimerkki 7. Immobilisoitujen, immunoeristettyjen saarekkeiden elinkykyisyyden ja toiminnan määrittäminen in vitro

Täysikasvuisten rottien saarekkeet immunoeristettiin kaksoismatriisin omaaviin välittäjiin menetelmien avulla, jotka on kuvattu esimerkeissä 3 ja 6. Matriisin nestemäisen ytimen omaavia välittäjiä, joilla oli termoplastinen vaippa, inkuboitiin in vitro vähintään kaksi viikkoa. Välittäjän ytimen ulkohalkaisija oli 800 µm, jolloin ydintä ympäröi seinä, jonka paksuus oli 65 µm. Alginaatti/alginaatti-kaksoismatriisin omaavien välittäjien ytimen halkaisija oli 880 µm ja seinän paksuus 60 µm. Inkubointiolosuhteet olivat: upottaminen Ham'in F12-elatusaineeseen, joka oli täydennetty 25 %:lla hevosen seerumia, 37°C:n lämpötilassa ilmakehässä, jossa oli 5 % CO_2:a ja 95 % ilmaa. Elatusaine vaihdettiin joka 3. - 4. päivä.

Käyttäen propidiumjodidia havaittiin, että 95 % immunoeristetyistä saarekesoluista oli elossa tämän inkubointijakson jälkeen in vitro. Niiden osoitettiin säilyneen myös toiminnallisina. Kun immunoeristetyt saarekkeet testattiin perifuusion avulla käyttäen glukoosia (Dionne, supra), havaittiin, että niillä oli insuliinia erittävä vaste, joka oli sekä suuruudeltaan että malliltaan samanlainen kuin suojaamattomilla saarekkeilla, joita oli inkuboitu in vitro yhtä pitkän aikaa ja samanlaisissa olosuhteissa. Insuliinin vapautuminen mitattiin käyttäen menetelmää, joka on kuvattu julkaisussa Soeldner, J. S. et al., Diabetes, 14 : 771 (1965). Tyypillisen perifuusiokokeen tulokset esitetään kuvissa 2A ja 2B. Glukoosin herkistämiskonsentraatio (challenge) oli 300 mg-% ja glukoosin peruskonsentraatio oli 100 mg-%. Immunoeristettyjen saarekkeiden osalta ei havaittu merkitsevää viivästystä insuliinin vapautumisen ensimmäisen vaiheen alkamisessa glukoosiärsytyksen jälkeen eikä palautumisessa peruseritykseen. Lisäksi havaittiin nouseva toinen vaihe, joka oli verrattavissa suojaamattomien saarekkeiden vastaavaan vaiheeseen. Ilmaistuna saareketta kohden immunoeristettyjen saarekkeiden vapauttaman insuliinin kokonaismäärät olivat samanlaisia kuin suojaamattomien saarekkeiden vastaavat määrät. Näistä tuloksista esitetään yhteenveto kuvissa 3A ja 3B.

Esimerkki 8. Ksenograftisaarekkeiden käyttäytymistä koskeva vertailu in vivo, kun mainitut saarekkeet on eristetty välittäjiin, joilla on termoplastinen membraani, jossa on sisäinen hydrogeelimatriisi tai hydrogeelimatriisia ei ole

Rotan saarekkeet immunoeristettiin joko matriiriytimen tai nestemäisen ytimen omaaviin termoplastisiin välittäjiin, kuten esimerkissä 6 on kuvattu. Välittäjän ulkohalkaisija oli 800 µm, seinän paksuun 55 µm ja kuidun pituus 2 cm. Käytettiin vain alle 20 %:n kuormitustiheyttä. Nestemäisen ytimen omaavien kapseleiden tapauksessa alginaatti ei sisältynyt solususpensioon. Ensimmäisessä kokeessa saarekkeet immunoeristettiin matriisin sisään. Välittäjät implantoitiin intraperitoneaalisesti streptotsotosiinilla aiheutettua diabetesta sairastaviin hiiriin, kun kysymyksessä oli yhteensopiva ksenografti (so. toisilleen läheistä sukua olevat lajit). Vapaasti kelluvat implantit siirrettiin vatsakalvononteloon. Kahdeksaan eläimeen implantoitiin kuhunkin 500 - 1 000 immunoeristettyä rotan saareketta. Yhdellä eläimellä ei ilmennyt lainkaan hyperglykemian paranemista. Muut eläimet palasivat normoglykeemiseen tilaan (so. näiden eläinten plasman glukoosipitoisuudet palasivat normaalille vaihtelualueelle määritettynä 100 - 125 mg-%:na) viiden päivän kuluessa kudossiirron jälkeen ja pysyivät normoglykeemisinä päivään 60 saakka, jolloin siirrokset poistettiin ja eläimet tulivat jälleen hyperglykeemisiksi. Kuvassa 4 esitetään yhteenveto 7 tällaisen

kokeen keskiarvotuloksista. Pitäisi huomata plasman glukoosipitoisuuksien merkitsevien vaihteluiden puuttuminen näillä eläimillä. Talteenotetuista immunoeristetyistä välittäjistä tutkittiin fibroottisen liikakasvun esiintyminen ja niistä määritettiin kyky vapauttaa insuliinia vasteena glukoosin perifuusiolle. Mikään näistä välittäjistä ei ollut joutunut täysin fibroblastien kapseloimiksi, kuitenkin havaittiin joillakin alueilla 3 - 5 fibroblastikerrosta välittäjän ulkokuoren ympärillä. Talteenotetut immunoeristetyt välittäjät vapauttivat insuliinia in vitro perifuusion jälkeen vasteena glukoosi- ja teofylliiniärsytykselle ja histologinen analyysi paljasti elävät saarekkeet, joista todisteena oli insuliinin värjäytyminen ß-soluissa. Kuvassa 5 esitetään perifuusiokokeen tulokset käyttäen glukoosi- ja teofylliiniärsytystä.

Nämä suotuisat tulokset muodostivat jyrkän vastakohdan tuloksille, jotka oli saatu, kun rotan saarekkeet oli immunoeristetty PAN/PVC-membraanin sisälle ilman immobilisoivaa matriisia. Näiden immunoeristettyjen välittäjien tapauksessa toiminnallinen herkkyys (responsiveness) kesti vain 12 ± 3 päivää implantoinnin jälkeen; viisi viidestä testatusta eläimestä palasi hyperglykeemiseen tilaan sen jälkeen. Näiden immunoeristettyjen välittäjien histologinen tutkimus paljasti saarekkeiden rykelmöitymisen. Saarekkeet olivat tiivistyneet suureksi kudosmassaksi, jossa ilmeni vakava kuolio keskellä, jolloin vain reunalla oli eloonjääneitä, elinkykyisiä ja identifioitavia saarekkeen ß-soluja. Siten matriisin läsnäolo saarekkeiden rykelmöitymisen ja siitä seuraavan kuoleman estämiseksi paransi merkistsevästi elinkykyisyyttä, mistä oli seurauksena implantin pitkäaikainen teho.

Esimerkki 9. Normoglykemian palautumisen määrittäminen streptotsotosiinilla aiheutettua diabetesta sairastavilla hiirillä, joihin oli implantoitu immunoeristettyjä, yhteensopivia ksenograftisaarekkeita immunoglobuliinia läpäisevissä välittäjissä

Kaksoismatriisin omaavan immunoeristetyn välittäjän esiintyminen in vivo määritettiin käyttäen rotalta-hiirelle

- yhteensopivaa ksenograftimallia normoglykemian palauttamiseksi streptotsotosiinilla aiheutettua diabetesta sairastavilla hiirillä. Välittäjät valmistettiin kuten esimerkissä 3 ja ne läpäisivät merkitsevästi 3,3 x 10^{-18} g (2 000 kD:n) dekstraania (Dextran) (kuva 1). Sen vuoksi nämä välittäjät läpäisivät vaivatta myös IgG:n (2,475 x 10^{-19} g, 150 kD). Yhteenveto tämän kokeen tuloksista esitetään taulukossa 2. Eläimet jaettiin kolmeen ryhmään: ryhmä 1 koostui seitsemästä kontrollieläimestä, joihin implantoitiin 300 ei-immunoeristettyä saareketta/eläin munuaisen subkapsulaariseen paikkaan. Vain yksi näistä eläimistä osoitti hyper-

glykemian paranemista kauemmin kuin 12 päivää. Normoglykemian keskimääräinen kesto ryhmässä 1 oli 14,0 ± 3,1 päivää.

Ryhmä 2 koostui 13 eläimestä, joihin kuhunkin implantoitiin 300 rotan saareketta, jotka oli immobilisoitu alginaattimatriisiin, josta puuttui ympäröivä, soluista vapaa alue. Siirrännäisen toiminta hävisi 24 päivän kuluessa 8 eläimellä tämän ryhmän 2 13 eläimestä, osoittaen, että yksinkertainen immobilisaatio ei tuottanut etua ryhmän 1 kontrolleihin nähden. Muut viisi eläintä pysyivät normoglykeemisinä, kunnes siirrännäinen poistettiin. Normoglykemian keskimääräinen kesto ryhmässä 2 oli 29,3 ± 5,5 päivää.

Ryhmä 3 koostui kymmenestä eläimestä, joihin kuhunkin implantoitiin 300 rotan saareketta kaksoismatriisin omaavassa immunoeristetyssä välittäjässä, joka oli esimerkissä 3 kuvattua muotoa, so. sillä oli ympäröivä kerros, joka koostui soluista vapaasta alginaattimatriisista. Vain neljällä näistä eläimistä siirrännäisen toiminta hävisi 14 päivän kuluessa implantoinnin jälkeen. Kuitenkin kuusi eläintä säilyivät normoglykeemisinä yli 100 päivää, jolloin koe päättyi ja siirrännäiset poistettiin, jolloin eläimet palautuivat nopeasti diabeettiseen tilaan (kuva 6). Normoglykemian keskimääräinen kesto ryhmässä 3 oli 65,8 ± 15,1 päivää (n = 10). Sidekudostumisreaktio talteenotettua alginaattivälittäjää kohtaan oli minimaalinen. Talteenotettujen immunoeristettyjen saarekkeiden histologinen analyysi paljasti elossa olevat saarekkeet, joista todisteena oli insuliinin värjäytyminen ß-solujen sisällä. Tässä kokeessa käytetyt immunoeristetyt välittäjät osoittavat myös suurimolekyylipainoisia proteiineja, kuten immunoglobuliini G -proteiinia, läpäisevien välittäjien toiminnallisuuden ja biologisen yhteensopivuuden.

Taulukko 1. Immunoeristettyjen ksenograftien eloonjääminen diabeettisissa hiirissä.

Ryhmä	Välittäjä	Eloonjääminen (päivää)	
		Yksilö	Ryhmä
1	Kontrolli	7,12,12,12, 12,12,29	14,0 ± 3,1
2	Immobilisoitu	8,12,12,14 15,16,18,24 41*-,53*,54*, 54*-,60*-	> 29,3 ± 5,5
3	Immuno-eristetty	8,8,12,13 102*-,102*-, 102*-,102*-, 104*-,104*-	> 65,8 ± 15,1

* Munuaisen poistoleikkaus saarekesiirrännäisen poistamiseksi.

Valmistettiin esimerkissä 3 kuvattua muotoa oleva välittäjä; se sisälsi useita satoja saarekkeita ja sen membraanin molekyylipainon enimmäisraja oli vähemmän kuin 8,25 x 10^{-20} (50 kD).

Välittäjä implantoitiin diabeettiseen BB-rottaan. Tämä rottarodun tiedetään olevan jyrsijämalli ihmisen tyypin 1 autoimmuunin diabeteksen jäljittelemiseksi. Välittäjä otettiin talteen 21 päivän viipymäajan jälkeen in vivo. Immunoeristettyjen saarekkeiden havaittiin olevan eläviä ja toiminnallisia määritettynä histologisen analyysin mukaan.

Esimerkki 10. Immunoeristettyjen saarekkeiden eloonjäämisen määrittäminen ei-yhteensopivassa ksenogeenisessä vastaanottajassa

Valmistettiin kaksoismatriisin omaavat immunoeristetyt välittäjät, jotka sisälsivät immobilisoituja rotan saarekkeita, käyttäen yhteissuulakepuristusmenetelmää kaksi sisäkkäistä putkea käsittävästä suuttimesta, kuten esimerkissä 4 on kuvattu. Olosuhteet matriisin geeliytymiseksi valittiin siten, että saatiin hydogeelimatriisi, joka läpäisi 3,3 x 10^{-18} g:n (2 000 kD:n) sinisen dekstraanin (kuten kuvassa 7), siten näin muodostettu välittäjä oli immunoglobuliini G:n ja C1q:n läpäisevä. Valmistettiin noin 0,5 cm:n pituiset leikkeet jatkuvasta sylinterimäisestä välittäjästä keskeyttämällä jaksottain ydinmateriaalin virta soluista vapaiden alueiden muodostamiseksi, jotka olivat helposti nähtävissä. Kuitu leikattiin soluista vapaalla alueella; siten soluista vapaa alginaattimatriisin alue ympäröi solut täydellisesti. Välittäjät implantoitiin marsujen (n = 2), ei-

yhteensopivien (so. kaukaisten sukulaisten) isäntien, suoliliepeen levyjen väliin. Sitten 21 päivän viipymäajan jälkeen in vivo välittäjät poistettiin ja niistä tutkittiin in vitro insuliinin vapautuminen vasteena glukoosille. Kuvassa 8 esitetään yhteenveto näistä tuloksista. Perusärsykkeen jälkeen mitattiin immunoeristetyistä saarekkeista insuliinin vapautumisen merkitsevä lisääntyminen, kun stimulointi toteutettiin käyttäen 300 mg:aa/dl glukoosia. Ilmeni palautuminen insuliinin peruspitoisuuksiin, kun glukoosin määrä palautettiin arvoon 100 mg/dl. Termoplastiset välittäjät, joissa oli alginaattiytimet, antoivat samanlaisia tuloksia.

Esimerkki 11. Lisääntynyt kudoksen elinkykyisyys kontrolloidun uudelleenrykelmöittämisen tuloksena

Puhdistetut koiran saarekkeet, jotka oli preparoitu menetelmän mukaan, joka on kuvattu julkaisuissa Scharp ja Lacy, U.S.S.N. 07/059 125 ja U.S.S.N. 07/364 976, dispergoitiin solurykelmiin, jotka sisälsivät 1 - 50 solua, seuraavan menetelmän mukaan. Huuhdottiin 1 000 koiran saareketta 3 kertaa 50 ml:lla Ca^{++}- ja Mg^{++}-ioneista vapaata Hank'n elatusainetta, joka oli 1 mM EDTA:n suhteen. Viimeisen huuhtelun jälkeen saarekkeet setrifugoitiin pelletiksi kierrosnopeudella 100 x g, jolloin sentrifugointiaika oli 8 min; 10°C. Tulokseksi saatu pelletti suspendoitiin uudelleen 5 ml:aan samaa elatusainetta/1000 saareketta. Tätä lietettä sekoitettiin 8 minuutin ajan 24°C:n lämpötilassa käyttäen kädessä pidettävää mikropipettiä. Sitten 8 minuutin ajan lopussa lisättiin trypsiiniä ja DNAasia siten, että trypsiinin lopulliseksi konsentraatioksi saatiin 25 ug/ml ja DNAasin 2 ug/ml. Lietettä sekoitettiin edelleen pipetoimalla toistuvasti noin 5 minuutin ajan, jonka päättyessä mikrokooppinen tutkimus osoitti, että suurimmat rykelmät sisälsivät enintään noin 50 solua. Digestio pysäytettiin lisäämällä 10 ml kylmää DMEM-elatusainetta, joka sisälsi 10 % vastasyntyneen vasikan seerumia, 1 000 saareketta kohden. Rykelmät pelletoitiin sentrifugoimalla kierrosnopeudella 250 x g 6 minuutin ajan. Rykelmiä viljeltiin Ham'in F12-elatusaineessa, jossa oli 25 % hevosen seerumia, yön yli, jonka aikana ilmeni rajoittunutta uudelleen rykelmöitymistä, josta oli tuloksena noin 35 um:n tilavuuskeskimääräinen rykelmän koko.

Yön kestäneen viljelyn jälkeen rykelmät pelletoitiin sentrifugoimalla kierrosnopeudella 250 x g 6 minuutin ajan. Pellettiin lisättiin 2-%:inen ei-silloittuneen alginaatin liuos, jolloin saatiin liuos, jossa oli 1 % alginaattia ja 8 % kudosta (paino/tilavuus). Ytimen saarekkeiden lopullinen tilavuus oli 0,56 mm^3 rykelmien muodossa, jotka olivat tasaisesti dispergoituneet kaikkialle sitkeään nesteeseen. Kudosliete imettiin aseptisesti Pe 90 -putken sisään, jonka pää oli aikaisemmin väännetty siten, että se sopi sisähalkaisijaltaan 670 µm:n onttojen kuitumembraanien (ulkohalkaisija = 800 µm) aukkoon. Sitten 10 mikrolitraa ku-

dosta sisältävää lietettä ruiskutettiin 2 cm:n pituisten PAN/PVC-kuitujen sisään, joita oli useita. Kaikkien kuitujen päät suljettiin tiiviisti, kuten edellä on kuvattu, ja kuituja varastoitiin yön yli Ham'in F12 -elatusaineessa, jossa oli 25 % hevosen seerumia. Ennen implantointia kuidut pantiin tuoreeseen Hanks-elatusaineeseen ilman seerumia yhden tunnin ajaksi seerumijäännösten poistamiseksi.

Yön yli kestäneen viljelyn jälkeen puolet (1/2) välittäjistä implantoitiin normoglykeemisten rottien vatsakalvononteloon (2 välittäjää/eläin) ja toista puolta (1/2) välittäjistä ylläpidettiin kudosviljelmässä in vitro. Kahden viikon kuluttua implantoidut välittäjät poistettiin vatsakalvonontelosta ja saatettiin in vitro glukoosiherkistyksen kohteeksi yhdessä kontrollivälittäjien kanssa, joita oli viljelty in vitro. Poistetut välittäjät osoittivat insuliinin vapautumista, joka oli yhtä hyvä tai parempi kuin ennen implantointia oli havaittu, osoittaen toiminnan säilymistä ei vain insuliinin vapautumisen osalta, vaan myös glukoosiherkkyyden osalta. Glukoosiherkistyksen jälkeen välittäjien alginaatti ydin "puhallettiin ulos" ja kudos värjättiin PI:llä elinkykyisyyden määrittämiseksi. Vaikka jokainen rykelmä oli vetäytynyt kasaan muodostaen tiiviin pallon, jonka halkaisija oli noin 35 um, yksittäiset rykelmät säilyivät hyvin jakautuneena kaikkialle alginaattiytimeen eivätkä olleet ryhmittyneet yhteen nekroottisten alueiden muodostamiseksi. Värjäytymättömyys PI:llä osoitti, että elossa olevien solujen määrä oli 100 %.

Esimerkki 12. Liikekäyttäytymisen osittainen palautuminen immunoeristettyjen adrenaalisten kromaffiinisolujen implantoinnin jälkeen parkinsonismin kokeellisessa mallissa

Naudan adrenaaliset kromaffiinisolut otettiin talteen lisämunuaisista menetelmän mukaan, joka on kuvattu julkaisussa Livett, B. G., Physiol. Rev., 64, 1103 - 1161, (1984), kollagenaasidigestion avulla ja niitä ylläpidettiin viljelmässä 10 päivän ajan bakteeri- ja sienisaastunnan puuttumisen varmistamiseksi. Kromaffiinisolujen rykelmät pestiin seerumista vapaassa väliaineessa sentrifugoimalla ja ne suspendoitiin uudelleen 1-%:iseen alginaattiliuokseen. Tätä solususpensiota käytettiin matriisiytimen ja termoplastisen membraanin omaavan immunoeristetyn välittäjän muodostamiseksi, kuten esimerkissä 4 on kuvattu. Vesipitoinen saostuskylpy sisälsi 1-%:isen $CaCl_2$-liuoksen, johon oli sekoitettu suhteessa 1 : 2 kudosviljelmän elatusainetta, jolloin $CaCl_2$:n lopullinen konsentraatio kylvyssä oli 0,5 %. Kuitua inkuboitiin kylvyssä 6 minuutin ajan antaen alginaatin geeliytyä ja sitten se siirrettiin petrimaljaan, joka sisälsi Dulbecco'n muunnettua Eagle'n elatusainetta (DMEM). Kuidusta tutkittiin silmämääräisesti alueet, joilla oli hyvä seinän morfologia, sitten se tarkistettiin (spot-checked) kromaffiinisolujen läsnäolon määrittämiseksi. Sitten se jaettiin 4 mm:n pituisiin

leikkeisiin sulkemalla leikkeiden päät tiiviisti lämmön, liuottimen ja paineen yhdistelmän avulla.

8 Sprague-Dawley-rottaa saivat 6-hydroksidopamiinin (6-OHDA) ruiskeet (10 µg/5ul) mustatumakkeeseen. Niistä tutkittiin apomorfiinin aiheuttama (0,1 mg/kg) pyörimisliikekäyttäytyminen viikon välein. Menetelmän mukaan, joka on kuvattu julkaisuissa Ungerstedt, V. U., Acton Physiol. Scand. Suppl., 367 : 69 - 93, (1971) ja Ungerstedt, V. U. Brain res., 24 : 485 - 493, (1970). Apomorfiini aiheuttaa Parkinsonin taudille ominaisen pyörivän liikkeen vasteen lähtien 6-OHDA:n aiheuttaman vaurion sivusta. Tällaisen pyörimisliikekäyttäytymisen laajuutta apomorfiiniruiskeen jälkeen voidaan käyttää vamman laajuuden ja immunoeristettyjen kromaffiinisolujen tuottaman paranamisen asteen seuraamiseksi. Kuusi viikkoa parkinsonismin aiheuttamisesta eläimet saivat aivojuovion sisäiset implantit, jotka olivat joko kontrollivälittäjiä (tyhjiä) tai adrenaalisia kromaffiinisoluja sisältäviä välittäjiä, ja niistä tutkittiin pyörimisliikekäyttäytyminen viikon välein. Kuvassa 9 esitetään yhteenveto näistä tuloksista.

Ennen implantointia kaikilla eläimillä ilmeni sama määrä pyörimisliikkeitä apomorfiiniherkistyksen jälkeen. Kahden viikon kuluessa implantoinnin jälkeen ne eläimet, jotka olivat saaneet immunoeristettyjä adrenaalisia kromaffiinisoluja, osoittivat merkitsevää 35 - 40 %:n vähenemistä pyörimisliikkeissä, mikä säilyi stabiilina koko testauksen ajan; tämä osoittaa, että implantit korjasivat merkitsevästi 6-OHDA:lla aiheutettujen vaurioiden vaikutuksia. Niissä eläimissä, jotka olivat saaneet kontrollivälittäjät, ei ilmennyt vähenemistä pyörimisliikkeiden määrässä.

Esimerkki 13. Eksitotoksisuudesta johtuvan hermovaurion estäminen

Tässä esimerkissä esitetään menetelmä neuraalisesta eksitotoksisuudesta johtuvan hermovaurion estämiseksi kohteena olevalla eläimellä implantoimalla välittäjä, joka sisältää soluja, jotka erittävät troofista tekijää. Tämän neuroeksitotoksisuuden eläinmallin katsotaan vastaavan hermovauriotyyppejä, joista Huntingtonin tautia sairastavat potilaat kärsivät.

Kohteena olevat eläimet:

Seuraavissa kokeissa käytettiin urospuolisia Sprague-Dawley -rottia (N = 23), jotka olivat 90 - 120 päivän ikäisiä ja painoivat suunnilleen 225 - 250 g. Kaikkia eläimiä pidettiin 2 - 3 eläimen ryhmissä kontrolloidun lämpötilan ja kosteuden omaavassa huoneessa, jossa ylläpidettiin 12 tunnin valoisan ja pimeän ajan sykliä, jolloin valot sytytettiin klo 7.00. Ruoka ja vesi olivat vapaasti saatavilla kokeen ajan.

Adrenaalisia soluja sisältävien makrokapseleiden valmistaminen

Naudan adrenaaliset kromaffiinisolut eristettiin lisämunuaisista ja niitä ylläpidettiin viljelmässä 10 päivän ajan, jotta varmistettiin bakteeri- ja sienisaastunnan puuttuminen. Kromaffiinisolujen rykelmät pestiin seerumista vapaassa elatusaineessa sentrifugoimalla ja ne suspendoitiin uudelleen 1-%:iseen alginaattiliuokseen. Tätä solususpensiota käytettiin ytimen liuoksena yhteissuulakepuristusta varten 15-%:isessa PAN/PVC:DMSO -liuoksessa. Yhteissuulakepuristettu kuitu, joka sisälsi kromaffiinisoluja, kerättiin talteen kylvystä, jossa oli 1-%:inen $CaCl_2$ sekoitettuna suhteessa 1 : 2 kudosviljelmän elatusaineen kanssa. Kuitu jätettiin tähän liuokseen 6 minuutin ajaksi alginaatin geeliytymiseksi ja sitten se siirrettiin petrimaljaan, joka sisälsi elatusainetta. Kuidusta tutkittiin silmämääräisesti alueet, joilla oli hyvä seinän morfologia, sitten siitä tarkistettiin (spot-checked) kromaffiinisolujen läsnäolo. Kapselit valmistettiin sulkemalla tiiviisti 4 mm:n pituisten leikkeiden päät lämmön, liuottimen ja paineen yhdistelmän avulla. Sitten kapselit implantoitiin stereotaksisesti Sprague Dawley -rottien aivoihin.

Kinoliinihapon valmistus:

Kinoliinihappo (Sigma Chemical Co) liuotettiin 2 N natriumhydroksidiin ja laimennettiin fosfaattipuskurilla, jonka pH-arvo oli 7,2, lopulliseen pH-arvoon 7,4 ja lopulliseen konsentraatioon 225 nmol/1 ul.

Kirurginen menettely:

Rotat nukutettiin natriumpentobarbitaalilla (45 mg/kg) ja asetettiin stereotaksiseen Kopf-laitteeseen. Päänahkaan tehtiin sagittaalinen viilto ja kalloon porattiin reikä makrokapseloitujen adrenaalisten kromaffiinisolujen asettamiseksi. Kapselit pantiin kapillaariputkeen, joka oli asennettu stereotaksiseen laitteeseen, ja laskettiin alas seuraavien koordinaattien mukaisesti: 0,3 mm ennen bregmaa, 3,5 mm sivuun nuolisaumasta ja 7,5 mm sisään (ventral) aivojen pinnasta.

Viikkoa myöhemmin eläimet nukutettiin ja asetettiin strereotaksiseen laitteeseen ennen kinoliinihapon tai fosfaattipuskuriapuaineen antamista aivojuovion sisäisesti. Liuokset annettiin hitaasti infuusiona (0,125 ul/min) (käyttäen 10 ul:n Hamilton-ruiskua) reiästä, joka oli porattu 0,8 mm sivuun kapselin asettamispaikasta. Kinoliinihapon ruiskutuspaikka oli: 0,3 mm ennen bregmaa, 2,7 mm sivuun nuolisaumasta ja 5,5 mm sisään (ventral) aivojen pinnasta. Annettu kokonaistilavuus oli 1,0 ul ja injektiokanyyli jätettiin paikalleen vielä 2 minuutin ajaksi läpi valuneen nesteen paikallisen diffuusion edistämiseksi. Tämä menettely tuotti tulokseksi 3 koeryhmän muodostumisen: adrenaalinen kapse-

li/kinoliinihappo (N = 8), tyhjä kapseli/kinoliinihappo (N = 8), pelkkä kinoliinihappo (N = 7).

Eläinten paino rekisteröitiin päivittäin 15 päivän ajan kinoliinihapon antamisen jälkeen.

Histologia

30 päivän kuluttua kinoliinihapon antamisesta eläimille annettiin perfuusiona sydämen kautta käyttäen peristalttista pumppua 0,9-%:ista suolaliuosta (50 ml/min) ja sen jälkeen 1-%:ista paraformaldehydiä/1,25-%:ista glutaraldehydiä 0,1 M fosfaattipuskurissa (4°C) (800 ml/30 min). Sitten aivoja jälkikiinnitettiin 2 tunnin ajan paraformaldehydiliuoksessa ennen niiden asettamista 20-%:iseen sakkaroosiliuokseen 24 tunnin ajaksi. Sitten aivot pakastettiin ja leikattiin sarjana liukuvalla mikotomilla (sliding micotome) 30 um:n koronaalisiksi leikkeiksi. Sitten leikkeet käsiteltiin sytokromioksidaasihistokemiaa varten ja vierekkäiset leikkeet värjättiin Nissl-värjäyksen avulla.

Tulokset:

Sytokromioksidaasin läsnäolon katsottiin osoittavan aineenvaihdunnallista aktiivisuutta ja siten hermojen elinkykyisyyttä. Nissl-värjäystä käytettiin solun prosessien saamiseksi näkyviin ja hermosolun arkkitehtuurin yleisen rakenteen määrittämiseksi.

Koeryhmässä, joka oli saanut tyhjän kapselin, aivojuovio oli kutistunut 20 - 40 % verrattuna vaurioitettuihin elämiin, jotka olivat saaneet kromaffiinisoluja sisältävän välittäjän. Tyhjän kapselin saaneen ryhmän aivojuovion hermosolut osoittivat aineenvaihdunnalisen aktiivisuuden puuttumista osoitettuna sytokromioksidaasin värjäyksen puuttumisena. Lisäksi kaikissa eläimissä ilmeni merkitsevää painon vähenemistä (kuva 10).

Sitä vastoin kromaffiinisoluja sisältävän välittäjän saaneen ryhmän hermosolut osoittivat normaalia värjäytymistä sekä sytokromioksidaasilla että Nissl-värjäyksellä eikä niillä ilmennyt painon vähenemistä.

Johtopäätös:

Kromaffiinisoluja sisältävän implantin saaneiden koe-eläinten hermosolut suojattiin kinoliinihapon aiheuttamalta eksitotoksiselta vauriolta.

Esimerkki 14. Hermojen rappeutumiskäsittely

Tässä esimerkissä esitetään menetelmä fimbria-fornix-vaurion aiheuttamiseksi eläimille. Tämän tyyppinen vaurio tuottaa hermosolun kuoleman ja postsynaptisten hermosolujen rappeutumisen ja käytösoireet, jotka osoittavat puutteita muistissa ja oppimisessa. Tässä eläinmallissa tuotetun kolinergisten hermosolujen rappeutumisen katsotaan vastaavan samanlaisia vaikutuksia, jotka on havaittu Alzheimerin taudissa ihmisellä.

Kirurginen menettely fimbria-fornix-vamman tuottamiseksi: Täysikasvuiset, urospuoliset Sprague-Dawley-rotat (250 - 350 g) nukutettiin antamalla intraperitoneaalisesti natriumpentobarbitoliruiske (55 mg/kg). Unilateraaliset fimbria-fornix-vammat toteutettiin imemällä fimbria, dorsaalinen fornix, parietaalisen aivokuoren keskiosa, ventraalinen hippokampuksen kiinnike (commissure), corpus collosum ja limittäinen aivokuorivyö (cingulate cortex). Jäljempänä kuvattu implanttivälittäjä asetettiin sitten jokaisen eläimen ipsilateraaliseen lateraaliventrikkeliin, suunnattuna kohtisuoraan interauraalista tasoa kohti.

PAN/PVC-kuitujen valmistus:

Läpäisyselektiiviset ontot kuidut valmistettiin käyttäen kuivasuihkumärkäkehruutekniikkaa (Cabasso, 1980). Suulakepuristettiin 15-%:inen PAN/PVC-sekapolymeerin liuos dimetyylisulfoksidissa (DMSO) rengasmaisen kehruusuulakkeen läpi, käyttäen DMSO-liuotinta (huokoista sisäpintaa varten) tai ei-liuotin-vettä (tasaista sisäpintaa varten), joka virtasi putken läpi. Tuloksesi saatu kuitu kerättiin ei-liuotin-vesikylpyyn, käsiteltiin glyserolilla ja kuivattiin.

Geeniteknologian avulla käsitellyt fibroblastit:

Rottien fibroblastit R208N.8 ja R208F saatiin lahjoituksena tri Xandra Breakefield'iltä, Harvard Yliopisto. R208N.8-fibroblastit käsiteltiin geeniteknologian avulla erittämään hermosolujen kasvutekijää (NGF) seuraavasti (Short et al., Dev. Neurosci., 12 : 34 - 45, 1990). Retrovirusvektori muodostettiin hiiren Moloney-leukemiaviruksesta. Se sisälsi viimeiset 777 emäsparia koodaavaa aluetta hiiren hermosolujen kasvutekijän cDNA:ta varten viruksen 5'-pitkän terminaaliryhmän toiston kontrolloimana. Vektori sisälsi myös dominoivan valikoivan merkitsijän, joka koodaa transposoni Tn5:n neomysiini-resistenssitoiminnan sisäisen Rous sarcoma viruksen promoottorin kontrolloimana. Siirrettävä retrovirus tuotettiin transfektoimalla vektori-DNA amfotrooppisen PA317 –tuottajahiiren fibroblastisoluihin ja käyttämällä näistä soluista saatua elatusainetta ekotrooppisten Y2-solujen infektoimiseksi. Y2-kloonista saatua suurimman titrausarvon tuottavaa virusta käytettiin vakiinnutetun rotan fibroblasti-solulinjan R208F infektoimiseksi transformoimalla se R208N.8-fibroblasteiksi. Yksittäisiä neomysiiniresistenttejä pesäkkeitä, jotka oli valittu elatusaineeseen, joka sisälsi neomysiinianalogia G418, lisättiin ja niistä tutkittiin hermosolujen kasvutekijän tuotanto ja erittyminen kaksipaikkaisen entsyymi-immunomäärityksen avulla.

Fibroblastien kapselointi:

R208F- ja R208.8-fibroblastit dissosioitiin trypsiini-EDTA:n avulla ja suspendoitiin tiheyden ollessa 1 x 10^6 solua/µl laminiiniin, joka sisälsi matrigeelin suspendoituna uudelleen Matrigel™- tai Vitrogen™-matriisikomponentteihin, ja imettiin 1 cm^3:n ruiskulla esisteriloituun onttoon PAN/PVC-kuituun. Kuidut

leikattiin 4 mm:n pituisiksi ja kuitujen päät suljettiin tiiviisti steriilin kirurgisen poltinlaitteen avulla.

ChAT-immunosytokemia:

Kahden viikon kuluttua eläimet lopetettiin ja preparoitiin perfuusiona sydämen kautta annetulla, kylmällä, hepariinilla käsitellyllä, fysiologisella suolaliuoksella ja 4-%:isella paraformaldehydillä fosfaattipuskurissa. Aivot leikeltiin välittömästi ja niitä jälkikiinnitettiin yön yli ja sen jälkeen upottamalla ne 15-%:seen ja 25-%:seen sakkaroosiliuokseen. Pakastetut leikkeet leikattiin 25 µm:n paksuudelta edestä taaksepäin (from anterior to posterior) kryostaatilla ja kaikki koronaaliset leikkeet kerättiin talteen objektilevyille tai fosfaattipuskuriin. Edustavat koronaaliset näytteet käsiteltiin immunosytokemiaa varten käyttäen rotan ChAT:n monoklonaalista vasta-ainetta (2,5 µg/ml) biotiini-avidiini-DAB-menetelmän avulla. Leikkeet valmistettiin ja hermosolujen solurakenteet vastaväriättiin kresyylivioletilla. Kaikki ChAT-positiiviset solurakenteet laskettiin mediaalisen septumin ja pystysuoran diagonaalisen kaistan alueelta, joka oli vammaan nähden samalla puolella ja vastapuolella, aivokurkiaisen polvekkeen ja etummaisen kiinnikkeen (commissure) risteyksen välissä. ChAT(+)-solujen vähenemisen merkitsevä estäminen havaittiin rotilla, jotka olivat saaneet R208N.8-kapselin.

Esimerkki 15. Immunoeristetyn välittäjän käyttö suurimolekyylipainoisen tuotteen vapauttamiseksi vastaanottajaan

Immunoeristetyt välittäjät valmistettiin laittamalla käsin 350 000 hybridoomasolua, jotka tuottavat vasta-ainetta (iostyyppistä immunoglobuliini G:tä), spesifinen tuumorinekroositekijälle (TNF), 7 mm:n pituiseen, lääketieteellistä laatua olevaan, olefiiniseen, mikrohuokoiseen onttoon kuituun, jollaista on käytetty plasmafereesiin (Plasmaphan; Enka). Kuidun sisähalkaisija oli 300 mikronia; sen molekyylipainon enimmäisraja (MWCO) oli noin $1{,}65 \times 10^{-18}$ g (1 000 kD). Välittäjän päät suljettiin tiiviisti, kuten vireillä olevassa patenttihakemuksessa U.S.S.N. 07/461 999 on kuvattu. Välittäjä implantoitiin hiiren munuaiskotelon alle, jossa sen annettiin olla 14 päivän ajan. Sen jälkeen välittäjä otettiin talteen ja sen havaittiin sisältävän monia soluja, joista yli 50 % oli elossa määritettynä indikaattorivärin (pI) puuttumisena. TNF-spesifisen vasta-aineen vapautumista vastaanottajahiiren seerumiin seurattiin ELISA-menetelmän avulla. Tulokset olivat seuraavat:

Taulukko 2.

Implantoinnin jälkeen päivää	TNF-spesifisen vasta-aineen titteri in vivo
0	ei havaittu lainkaan
1	10
2	30
6	70
8	100
11	60
15	23

Kontrollina ollut immunoeristetty välittäjä, jota ylläpidettiin in vitro, osoitti samanlaista vasta-aineen vapauttamista.

Esimerkki 16. Kapseloitujen saarekkeiden ihonalainen implantointi

Saarekkeita sisältävien kapseleiden valmistus: Käytettiin kahta tyyppiä akryylisekapolymeerista koostuvia onttoja kuituja, joita nimitetään tyypin 1 kuiduiksi ja tyypin 2 kuiduiksi. Kuidut muodostettiin käyttämällä kuiva-märkä-kehruuteknikkaa kehruusuulakkeen avulla, kuten on kuvattu julkaisussa I. Cabasso, Hollow Fiber Membranes, osa 12, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Wiley, New York, 3. painos, sivut 492 - 517, 1980. Käytetty akryylisekapolymeeri oli poly(akrylonitriili-ko-vinyylikloridi) (M_n = 100 000, M_w = 300 000, määritettynä koon mukaan poissulkevan kromatografian avulla, CytoTherapeutics, Inc.), joka oli liuotettu dimetyylisulfoksidiin (12,5 %, paino/paino). Akryylisekapolymeeriliuos pumpattiin kehruusuulakkeen ulomman putken kautta ja vesi pumpattiin sisemmän putken kautta. Tyypin 1 ontot kuidut suulakepuristettiin veteen ilmavälin läpi, jolloin tuloksena oli ikkunallinen ulkoseinä, joka on tyypillinen kuiduille, jotka on tehty kuiva-märkä-kehruutekniikan avulla. Tyypin 2 kuidut valmistettiin vastaavalla tavalla, paitsi että ilmaväli korvattiin kosteutetulla ilmakehällä, jolloin tuloksena oli tasainen ulkopinta.

Rotan saarekkeet eristettiin urospuolisista Wistar-Furth-rotista, kuten edellä esimerkissä 1 on kuvattu. Saarekkeet immobilisoitiin alginaattigeeliin ja kapseloitiin 2 cm:n pituisiin tyypin 1 tai tyypin 2 kuituihin, 550 - 1 000 saareketta/kuitu, kuten on kuvattu julkaisussa Lacy, P. E. et al., Science, 254 : 1782, (1991).

Implantointi: Kapseloidut rotan saarekkeet implantoitiin vatsakalvonontelon sisäisesti tai ihon alaisesti hiiriin, jotka oli tehty diabeettisiksi streptotsotosiiniruiskeen avulla. Ei-paastolla olevien eläinten plasman glukoosikonsentraatiot määritettiin kolme kertaa viikossa; diabeettisilla vastaanottajilla oli

suuremmat konsentraatiot kuin 400 mg/dl ennen kudossiirrosta. Kuormitustiheys oli 70 saareketta/cm 1 000 saarekkeen tapauksessa ja 35 saareketta/cm 500 saarekkeen tapauksessa. 26 hiirtä sai kuidut vatsakalvonontelon sisäisesti ja 26 ihonalaisesti. Jokaisessa ryhmässä 14 hiirtä sai kuidut, jotka sisälsivät yhteensä 1 000 saareketta, ja 12 sai kuidut, jotka sisälsivät yhteensä 500 saareketta.

Tulokset: Vatsakalvonontelon sisäisesti annetut tyypin 1 kuidut aiheuttivat normoglykemian ja ylläpitivät sitä kauemmin kuin 60 päivää seitsemällä yhdeksästä vastaanottajasta, jotka olivat saaneet 1 000 saareketta, ja kaikilla vastaanottajilla, jotka olivat saaneet 500 saareketta. Mitkään vastaanottajista, jotka saivat ihon alaisesti tyypin 1 implantit, jotka sisälsivät 500 saareketta, eivät säilyneet normoglykeemisinä 60 päivää, kolme kahdeksasta vastaanottajasta, jotka olivat saaneet 1 000 saareketta, olivat normoglykeemisiä kauemmin kuin 60 päivää. Kuitujen poistaminen näistä kolmesta vastaanottajasta palautti hiiret diabeettiseen tilaan. Rotan saarekkeiden siirrokset tyypin 2 kuituihin tuottivat normoglykemian ja ylläpitivät sitä vastaanottajahiirissä yli 80 %:lla joko vatsakalvononteloon tai ihon alle annettuna sisältäen joko 1 000 saareketta tai 500 saareketta. Vastaanottajat tulivat jälleen hyperglykeemisiksi, kun kuidut poistettiin 60. päivänä. Poistettujen tyypin 1 ja tyypin 2 kuitujen histologinen tutkimus paljasti, että ne olivat biologisesti yhteensopivia.

Esimerkki 17. Rotan saarekkeiden säädelty rykelmöityminen uudelleen

Rotan saarekkeet eristettiin, dissosioitiin, rykelmöitettiin uudelleen ja kapseloitiin, kuten esimerkissä 11 on kuvattu paitsi, että tiiviisti suljettuja kuituja ei saatettu alttiiksi seerumille in vitro ja niitä pidettiin vain 1 tunnin ajan ennen implantointia. Jokaiseen rottaan implantoitiin joko kaksi 2 cm:n pituista kapselia tai kaksi 2 cm:n ja yksi 1 cm:n pituista kapselia.

Saarekkeet dissosioitiin ja rykelmöitettiin uudelleen likimäärin 35 um:n kokoon. Kaikki uudelleen rykelmöitetyt solut suunnilleen 500 saarekkeesta pantiin 4 - 6 cm:n pituiseen kapseliin. Implantoidut kapselit kykenevät säilyttämään normoglykemian rotilla kauemmin kuin 60 päivää.

Esimerkki 18. Litteän levyn muotoisten saarekkeiden kapselointivälittäjien valmistus

Kaikissa seuraavissa menettelyvaiheissa käytettiin aseptisia aineita ja menetelmiä. Niihin sisältyivät autoklaavisterilointi, puhdistus EtOH:lla, UV-sterilointi ja/tai 0,2 um:n steriili suodatus.

Valmistettiin valuliuos käyttäen monoakryylisekapolymeeria, jonka keskimääräinen molekyylipaino oli 1,65 x 10^{-19} g (10^5 daltonia) ja joka liuotettiin vesiliuokoiseen orgaaniseen liuottimeen. Valuliuos oli 10,0-%:inen polymeeri

(paino/paino) orgaanisessa liuottimessa. Polymeeri saostettiin kerran steriileissä olosuhteissa ennen sen käyttöä minkä tahansa jäljellä olevien monomeerien, oligomeerien poistamiseksi tai minkä tahansa lisäaineiden poistamiseksi, jotka valmistaja oli laittanut irtopolymeeriin. Tämä polymeeriliuos kuivattiin sitten ja liuotettiin uudelleen 100-%:iseen DMSO:iin 10-%:isen (paino/paino) polymeeriliuoksen muodostamiseksi. Tämä liuos kuljetettiin 0,2 um:n steriilin nylonsuodattimen läpi ja kerättiin talteen aseptisissa olosuhteissa.

Seuraavaksi valuliuos levitettiin tasaisesti käyttäen valutankoa 0,635 cm:n (1/4") lasisubstraatille valupaksuuden ollessa 125 um. Kalvon valamiseksi substraatti, jota pidettiin 30 asteen kulmassa, siirrettiin kiinteän valutangon alle saostuskylpyyn. Saostuskylvyn tasopinta oli 0,318 - 0,635 cm:n (1/8 - 1/4") etäisyydellä valutangosta (Substraatti voi olla mitä tahansa ainetta, joka estää membraanin ennenaikaisen nousemisen substraatista ennen täydellistä saostamista. Samanaikaisesti levittämisen kanssa valuliuos syöstiin 24°C:iseen veteen, mistä oli seurauksena polymeerin saostuminen, jolloin muodostui anisotrooppinen, puoliläpäisevä membraani läpäisyselektiivisen kerroksen ilmetessä ohuena kalvona membraanin jäähdytyspuolella (poispäin substraatista). Kalvo jätettiin kylpyyn neljän minuutin ajaksi, jotta varmistettiin, että membraanin ominaisuudet vakiintuivat riittävästi ennen sen poistamista.

Sitten kalvo kuljetettiin huuhtelusarjan läpi minkä tahansa jäljellä olevan liuottimen tai myrkyllisen jäännöksen poistamiseksi, joka olisi saattanut vaarantaa lopputuotteen yhteensopivuuden. Nämä huuhtelukylvyt koostuivat liuoksista, jotka eivät aiheuttaneet lopullisen membraanin merkittävää fysikaalista tai kemiallista muuntumista. Ensimmäinen jälkikylpy koostui vedestä, joka oli käsitelty Milli-Q-puhdistusjärjestelmän avulla, ja materiaali jätettiin likoamaan vähintään 15 minuutin ajaksi. Materiaali poistettiin sitten ja pantiin 70-%:seen (tilavuus/tilavuus) muodolliseen etyylialkoholin ja veden liuokseen, joka oli suodatettu 0,2 um:n suodattimen läpi, vähintään 60 minuutin ajaksi ja poistettiin sitten. Loppuvaihe oli kalvon liottaminen kahdessa peräkkäisessä, steriilissä, normaalissa suolaliuoskylvyssä, tilavuuden ollessa 2 ml/cm^2 kuitua, vähintään 60 minuutin ajan.

Tulokset: Lopullisen märkävalumembraanin (wet-as-cast) paksuus oli 30 - 75 um ja hydraulinen läpäisykyky 0,475 cm^3/min/cm^2 paineen ollessa 35 kPa (5,0 psig). Hylkimiskerrointa koskevat tiedot osoittivat, että membraani sulki pois aineet, jotka olivat suurempia kuin noin 1,65 x 10^{-19} g (100 000 daltonia).

Kapselointi ja implantointi: Steriili, valettu, 10-%:inen litteän levyn membraani, jota liotettiin suolaliuoksessa, valmistettiin, kuten edellä on kuvattu, ja kapseloitavat saarekkeet valmistettiin seuraavasti: 15,24 x 20,32 cm:n (6" -

8") suuruinen märkä membraanilevy laskostettiin itsensä päälle pintapuolet siten, että luotiin kaksinkertaisen membraanin suikale, joka oli noin 2,54 cm:n (1") levyinen. Laskos puristettiin huolellisesti rypyn muodostamiseksi. Käyttäen #10 kuorimisterää, 2,54 cm:n (1") levyinen kaksinkertaisen membraanin suikale leikattiin levystä. Kaksinkertaisesta suikaleesta otettiin kiinni toisesta päästä ja se leikattiin 2,54 cm:n (1") neliöiksi käyttäen saksia. Neliöt otettiin kiinni suolaliuokseen, kun ne leikattiin irti. Jokaisen neliön yläpuoli ja pohjapuoli yhdistettiin taitteella, jolla oli yksi sivu.

Välittömästi ennen täyttämistä neliö nostettiin ylös ja pantiin halkaisijaltaan 7,64 cm:n (3") suuruisen polystyreeni-petrimaljan kannelle, joka oli aikaisemmin kostutettu 1 - 2 ml:lla 1-%:ista $CaCl_2$-liuosta. Membraanin taitokset avattiin ja jokaista puolta kellutettiin $CaCl_2$-liuoksen päällä pitäen huolta siitä, että liuos ei virrannut membraanin sisään.

Ennen tätä saarekkeiden oli annettu kerrostua pelletiksi ja se suspendoitiin uudelleen 1-%:iseen ei-geeliytyneeseen alginaattiliuokseen (liuos oli valmistettu tekemällä 2-%:inen alginaattiliuos veteen ja sekoittamalla se suhteessa 50/50 elatusaineen kanssa, jossa saarekkeita oli viljelty). Saarekkeiden/alginaatin liete sekoitettiin varovaisesti hämmentämällä ja imemällä pipetillä. Liete oli valmistettu siten, että siinä oli 500 saareketta 25 ul:ssa alginaattia neliösenttimetriä kohden käytettävää pintaa yhdellä membraanin puolella. Tämä vastaa suunnilleen 125 ul:aa ja 2500 rotan saareketta membraanilevyn 6,45 cm^2:ä (neliötuumaa) kohden.

Saareke/alginaatti-liete imettiin 200 ul:n pipetin kärkeen ja sitten se levitettiin tasaisesti yhden membraanin sisäpuolelle jättäen noin 0,32 cm:n (1/8") tyhjä alue neliömäisen levyn kaikkiin reunoihin. Levittäminen tehtiin nopeasti alginaatin silloittuessa hitaasti johtuen Ca^{++}-ionien diffuusiosta membraanin läpi alla olevasta $CaCl_2$-liuoksesta.

Kun alginaatti oli riittävästi silloittunut sen leviämisen estämiseksi (noin 1 - 2 min) litteän levylaitteen toinen puoli laskostettiin päälle muodostaen yläpuolen litteälle voileivälle. Pidettiin huolta siitä, että ilmakuplia ei esiintynyt.

Membraanin kaksi puolta suljettiin tiiviisti käyttäen impulssilämpötiivistintä, jossa oli 0,318 cm:n (1/8") lämmityselementti, joka oli asetettu keskilämmölle (lämpötila, joka on 80 - 160°C). Jokainen reuna, mukaan luettuna taitettu reuna, tiivistettiin yksilölllisesti aktivoimalla lämpötiivistin, samalla puristaen alaspäin ei-alginaatilla päällystetytn membraanin 0,318 cm:n (1/8") suikaleen kaikkia reunoja.

Tiivistämisen jälkeen laitetta liotettiin 1-%:isessa $CaCl_2$-liuoksessa 4 minuutin ajan alginaatin silloittamiseksi edelleen. Laitetta pidettiin Hank'in liuoksessa implantointiin saakka (noin 2 tuntia).

Litteä levy implantoitiin kemiallisesti diabeettisen Wistar-Furth-vastaanottajarotan vatsakalvononteloon tekemällä nukutetulle rotalle keskiviivaviilto ihon läpi ja vatsakalvononteloon. Litteä levyimplantti asetettiin onteloon pitämällä kiinni tiivistetystä reunasta sileillä pihdeillä ja asettamalla laite varovaisesti vapaasti kellumaan suolen pinnalle lähelle vatsakalvonontelon seinää. Vatsakalvonontelo ja iho suljettiin ompelemalla.

Eläimiä tutkittiin 21 päivän ajan ja laitteet poistettiin. Veren glukoosipitoisuudet laskivat 375 mg:sta/dl 150 mg:aan/dl 4 päivässä implantoinnin jälkeen ja pysyivät tällä tasolla, kunnes implantti poistettiin, jolloin veren glukoosiarvot nousivat 275 mg:aan/dl (n = 2).

Histologinen tutkimus paljasti elossa olevat saarekkeet, jotka oli immobilisoitu alginaattikerrokseen, jolloin membraanin ulkopuolelle oli kiinnittynyt vähemmän kuin yksi solujen kerros.

Vastaavat menetelmät

Alan ammattimiehet ymmärtävät tai kykenevät saamaan selville käyttäen vain rutiinitutkimusta monia vastaavia menetelmiä tässä kuvatun keksinnön spesifisille suoritusmuodoille. Nämä ja muut tällaiset vastaavat menetelmät on tarkoitus sulkea seuraavien patenttivaatimusten piiriin.

15

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä implantoitavan välittäjän valmistamiseksi, jossa on elävistä soluista koostuva ydin ja jolla siirretään biologisesti aktiivia tuotetta tai toimintaa potilaaseen, **tunnettu** siitä, että menetelmässä

a) muodostetaan ydin, jossa on ainakin 10^4 isoloitua elävää solua dispergoituna bioyhteensopivaan ydinmatriisiin, mainittujen solujen ollessa kykeneviä erittämään biologisesti aktiivia tuotetta tai tuottamaan biologisen toiminnon, ja

b) muodostetaan ulkoinen immunoisoloiva vaippa mainitun ydinmatriisin ympärille hydrogeelistä tai kestomuovista, joka vaippa on riittävän paksu estämään solujen pääsyn sen ulkopuolelle ja jonka vaipan materiaalin molekyylipainojakautuman yläraja on sovitettu niin, että se estää solujen immunologisen hylkimisreaktion ytimen sisällä mutta kuitenkin sallii yhdisteiden kulkeutumisen potilaan elimistön ja ytimen välillä vaipan lävitse, jotta sanottu biologinen tuote tai toiminto voi olla toimiva.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että välittäjä muodostetaan koekstruusiotekniikalla, jossa tekniikassa

a) suoritetaan koekstruusio koaksiaalisesta kaksoiskanava-suulakepuristinsuuttimesta, jossa on sisempi suulakeaukko ja sitä ympäröivä ulompi suulakeaukko, jolloin sisemmästä suutinaukosta puristetaan ulos soluja suspendoituina bioyhteensopivaan ydinmatriisin esiasteeseen, jota on riittävä määrä niin, että solut säilyvät dispergoituna siihen,

b) mainitusta ulommasta suutinaukosta puristetaan ulos bioyhteensopivaa vaipan muodostavan materiaalin esiastetta liuoksena, jolloin kohdan a) solususpensio koskettaa kohdan b) liuosta siten, että kohdan b) liuoksesta muodostuu bioyhteensopiva, immunoisoloiva vaippa, ja

c) täten muodostetaan bioyhteensopivan matriisimateriaalin esiasteesta mainitun ytimen bioyhteensopiva matriisi.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että ytimen matriisi muodostuu matriisimateriaalin esiasteesta, kun kohdan a) solususpensio ja kohdan b) liuos yhdistyvät koekstruusiossa.

4. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kohdan a) matriisimateriaalin esiaste sisältää alkalimetallin alginaattia, jonka koekstruusio kohdan b) liuoksen kanssa suoritetaan vesipitoiseen moniarvoisen kationin liuokseen.

5. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kohdan b) liuos sisältää hydrogeeliä tai kestomuovisen vaippamateriaalin esiastetta.

6. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kohdan b) liuos sisältää alkalimetallin alginaattia ja kohdan a) solususpension koekstruusio kohdan b) liuoksen kanssa suoritetaan vesipitoiseen kalsiumkloridiliuokseen.

7. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että kohdan b) liuos sisältää veteenliukenematonta kestomuovipolymeeria tai -kopolymeeria liuotettuna veteensekoittuvaan liuottimeen ja että kohdan a) solususpension ja kohdan b) liuoksen koekstruusio suoritetaan vesipitoiseen nesteeseen.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu immunoisoloiva vaippa on läpäisyselektiivinen ja muodostettu mainitun ytimen ympärille siten, että mainittu vaippa on välittömässä kontaktissa mainittuun ydinmatriisiin, jolloin mainittu ydin ja mainittu vaippa muodostavat rajapinnan, joka on oleellisesti vailla suoria ionisidoksia ja ydintä vaippaan yhdistävää välikerrosta.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainittu vaippa ja mainittu ydin on ovat hydrogeeliä ja mainittu vaippa muodostuu mainitun vaipan hydrogeelin ristisilloittumisesta mainitun ytimen hydrogeelin kanssa.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että mainitussa menetelmässä välittäjälle on

a) ensin muodostettu ulkoinen immunoisoloiva vaippa, minkä jälkeen

b) mainittuun vaippaan on muodostettu ydin, jossa on ainakin 10^4 solua dispergoituna biologisesti yhteensopivaan ydinmatriisiin.

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että välittäjän mainitun vaipan hydrogeeli ja bioyhteensopiva ydin sisältävät alginaattia.

12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että välittäjän biologisesti aktiivinen komponentti sisältää kasvutekijöitä, solujen kasvua edistäviä tekijöitä, biologista vastetta muuntavia tekijöitä, vasta-aineita, entsyymejä, hormoneja, lymfokiineja, sytokiinejä ja hermosolujen välittäjäaineita.

13. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että välittäjän mainitut solut käsittävät soluja, jotka on geeniteknologian avulla käsitelty erittämään rekombinanttia hermosolujen kasvutekijää.

14. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että välittäjän mainittu biologisesti aktiivinen tekijä on valittu ryhmästä, joka koostuu hermosolujen kasvutekijästä, sidekudossolun peruskasvutekijästä, siliaarisesta neurotroofisesta tekijästä, aivoperäisestä neurotrofisesta tekijästä, neurotrofiini-3:sta ja alfa-neurotrofiinista.

15. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että välittäjän mainittu bioyhteensopiva matriisi on valittu solunulkoisten matriisikomponenttien ryhmästä, joka koostuu kollageenista, laminiinista, glykosaminoglykaaneista, proteoglykaaneista, fibronektiinista, elastiinista ja edellä mainittujen seoksista.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että välittäjän mainitut glykosaminoglykaanit on valittu ryhmästä, joka koostuu hyaluronihaposta, kondroitiinisulfaatista, hepariinista ja hepariinisulfaatista.

17. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että välittäjän mainitut solut on valittu ryhmästä, joka liittyy elimistön metabolisiin toimintoihin, haitallisten aineiden poistamiseen ja homeostaasin säilyttämiseen.

L17

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av en implanterbar vehikel som har en av levande celler bestående kärna och med vilken överförs en biologiskt aktiv produkt eller funktion till en patient, **kännetecknat** av att vid förfarandet

a) skapas en kärna med åtminstone 10^4 isolerade levande celler dispergerade i en biokompatibel kärnmatris, varvid nämnda celler kan avsöndra en biologiskt aktiv produkt eller producera en biologisk funktion, och

b) skapas en yttre immunoisolerande mantel kring nämnda kärnmatris ur hydrogel eller termoplast, vilken mantel är tillräckligt tjock för att hindra cellerna från att komma utanför den och varvid den övre gränsen för molekylviktsfördelningen hos mantelns material är anordnad sådan, att den förhindrar cellernas immunologiska frånstötningsreaktion inom kärnan men tillåter ändå föreningars rörelse mellan patientens organism och kärnan genom manteln så, att nämnda biologiska produkt eller funktion kan vara aktiv.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att vehikeln skapas genom en koextrusionsteknik vid vilken teknik
a) utförs koextrusion genom ett koaxiellt tvåkanalsextrusionsmunstycke som har en inre munstycksöppning och en yttre munstycksöppning kring denna, varvid ur den inre munstycksöppningen pressas ut celler suspenderade i ett biokompatibelt kärnmatrisförstadium som finns i tillräcklig mängd för att hålla cellerna dispergerade i det,

b) ur nämnda yttre munstycksöppning pressas ut ett biokompatibelt mantelmaterialsförstadium i form av en lösning, varvid punktens a) cellsuspension kommer i kontakt med punktens b) lösning så, att ur punktens b) lösning bildas en biokompatibel, immunoisolerande mantel, och

c) på så sätt skapas nämnda kärnas biokompatibla matris ur det biokompatibla matrismaterialförstadiet.

3. Förfarande enligt patentkrav 2, **kännetecknat** av att kärnans matris bildas ur matrismaterialförstadiet när punktens a) cellsuspension och punktens b) lösning förenas vid koextrusionen.

4. Förfarande enligt patentkrav 2, **kännetecknat** av att punktens a) matrismaterialförstadium innehåller ett alkalimetallalginat vars koextrusion med punktens b) lösning utförs till en lösning av en flervärd katjon.

5. Förfarande enligt patentkrav 2, **kännetecknat** av att punktens b) lösning innehåller hydrogel eller ett termoplastiskt mantelmaterialförstadium.

6. Förfarande enligt patentkrav 2, **kännetecknat** av att punktens b) lösning innehåller ett alkalimetallalginat och att koextrusionen av punktens a) cellsuspension med punktens b) lösning utförs till en vattenhaltig kalciumkloridlösning.

7. Förfarande enligt patentkrav 2, **kännetecknat** av att punktens b) lösning innehåller en vattenolöslig termoplastpolymer eller -kopolymer upplöst i ett med vatten blandbart lösningsmedel och att koextrusionen av punktens a) cellsuspension och punktens b) lösning utförs till en vattenhaltig vätska.

8. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att nämnda immunoisolerande mantel är genomsläppningsselektiv och bildad kring nämnda kärna på så sätt att manteln står i direkt kontakt med nämnda kärnmatris, varvid nämnda kärna och nämnda mantel bildar ett gränssnitt som väsentligen saknar direkta jonbindningar och ett mellanskikt som sammanbinder kärnan med manteln.

9. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att nämnda mantel och nämnda kärna är av hydrogel och att nämnda mantel bildas genom tvärbindning av nämnda mantels hydrogel med nämnda kärnas hydrogel.

10. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att vid nämnda förfarande för vehikeln

a) först har skapats en yttre immunoisolerande mantel, varefter

b) för nämnda manteln har skapats en kärna med åtminstone 10^4 celler dispergerade i en biologiskt kompatibel kärnmatris.

11. Förfarande enligt patentkrav 10, **kännetecknat** av att nämnda mantels hydrogel och den biokompatibla kärnan hos vehikeln innehåller ett alginat.

12. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att vehikelns biologiskt aktiva komponent innehåller tillväxtfaktorer, celltillväxtfrämjande faktorer, faktorer som ändrar biologisk respons, antikroppar, enzymer, hormoner, lymfokiner, cytokiner och nervcellstransmittorer.

13. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att vehikelns nämnda celler omfattar celler som genom genteknologi har behandlats att avsöndra en rekombinant nervcellstillväxtfaktor.

14. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att vehikelns nämnda biologiskt aktiva faktor är vald från en grupp som består av en nervcellstillväxtfaktor, bindvävsgrundtillväxtfaktor, cililär neurotrofisk faktor, hjärnderiverad neurotrofisk faktor, neurotrofin-3 och alfa-neurotrofin.

15. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att vehikelns nämnda biokompatibla matris är vald från en grupp av extracellulära matriskomponenter som består av kollagen, laminin, glykosaminoglykaner, proteoglykaner, fibronektin, elastin och blandningar av ovan nämnda.

16. Förfarande enligt patentkrav 15, **kännetecknat** av att vehikelns nämnda glykosaminoglykaner är valda från en grupp som består av hyaluronsyra, kondroitinsulfat, heparin och heparinsulfat.

17. Förfarande enligt patentkrav 1, **kännetecknat** av att vehikelns nämnda celler är valda från en grupp som har att göra med organismens metaboliska funktioner, avlägsnande av skadliga ämnen och upprätthållande av homeostas.

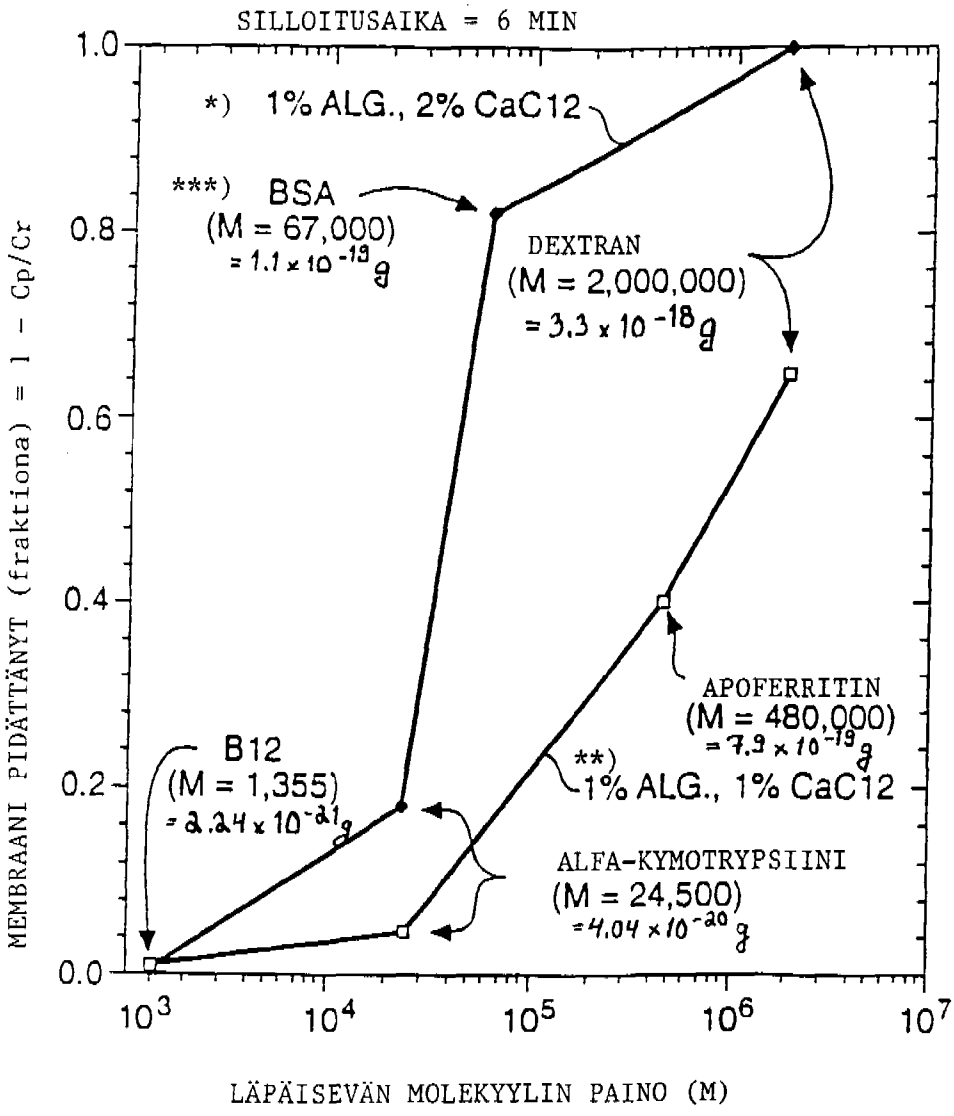

FIG._1

Molekyylipainot daltoneina

*) 1-%:inen algiini, 2-%:inen $CaCl_2$

**) 1-%:inen algiini, 1-%:inen $CaCl_2$

***) BSA = naudan seerumin alkumiini

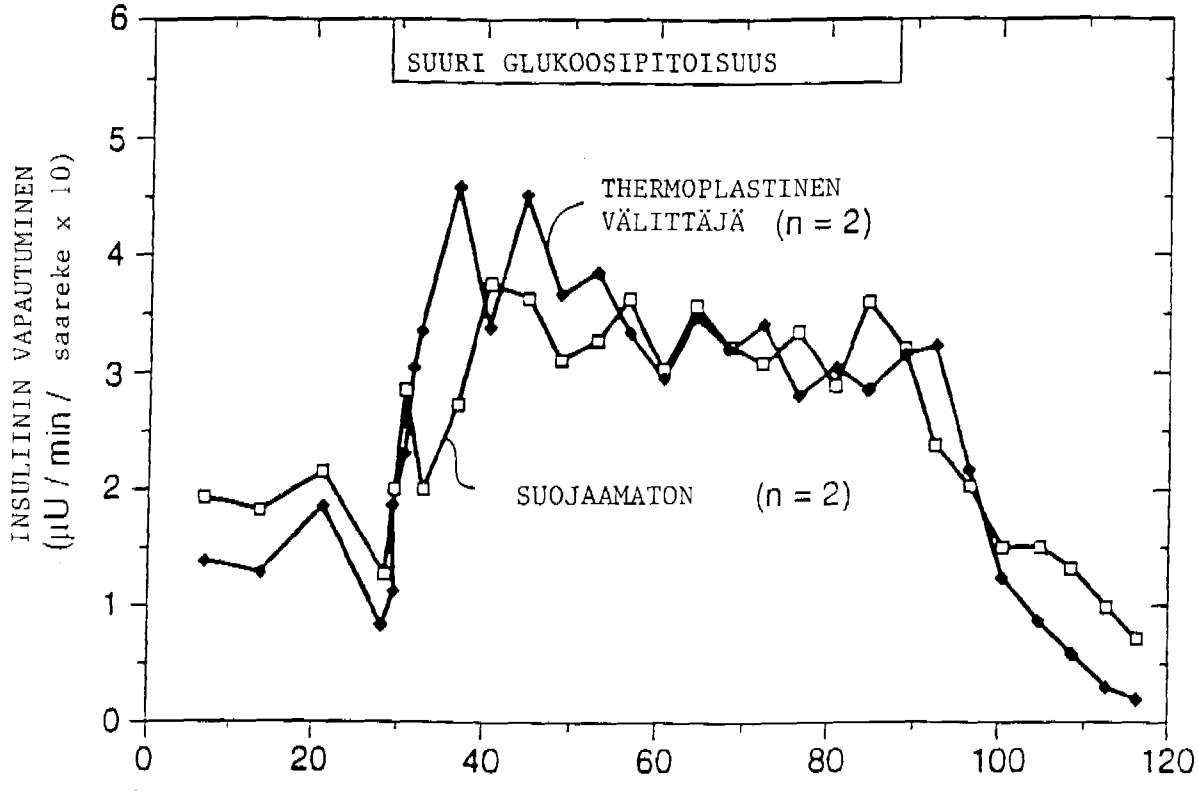
SUURI GLUKOOSIPITOISUUS
THERMOPLASTINEN
VÄLITTÄJÄ (n = 2)
SUOJAAMATON (n = 2)
INSULIININ VAPAUTUMINEN
(µU / min / saareke x 10)
0
1
2
3
4
5
6
0
20
40
60
80
100
120

FIG._2A

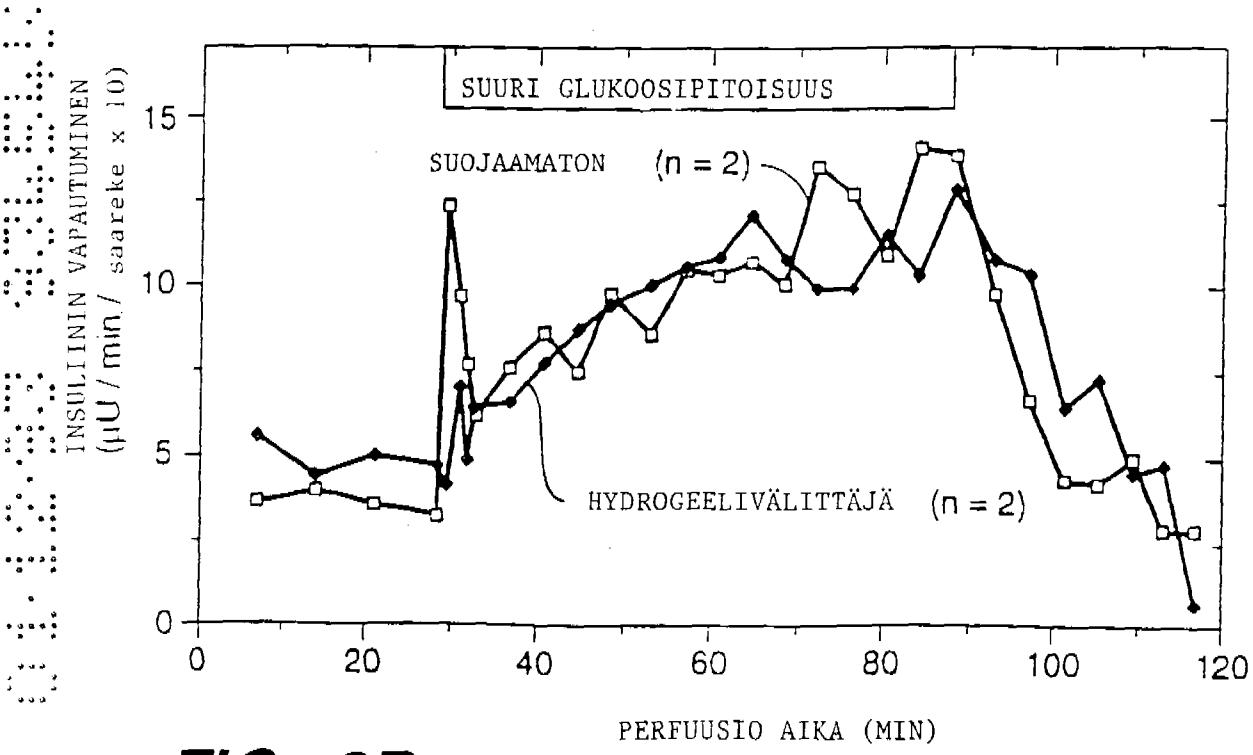
SUURI GLUKOOSIPITOISUUS
SUOJAAMATON (n = 2)
HYDROGEELIVÄLITTÄJÄ (n = 2)
INSULIININ VAPAUTUMINEN
(µU / min / saareke x 10)
0
5
10
15
0
20
40
60
80
100
120
PERFUUSIO AIKA (MIN)

FIG._2B

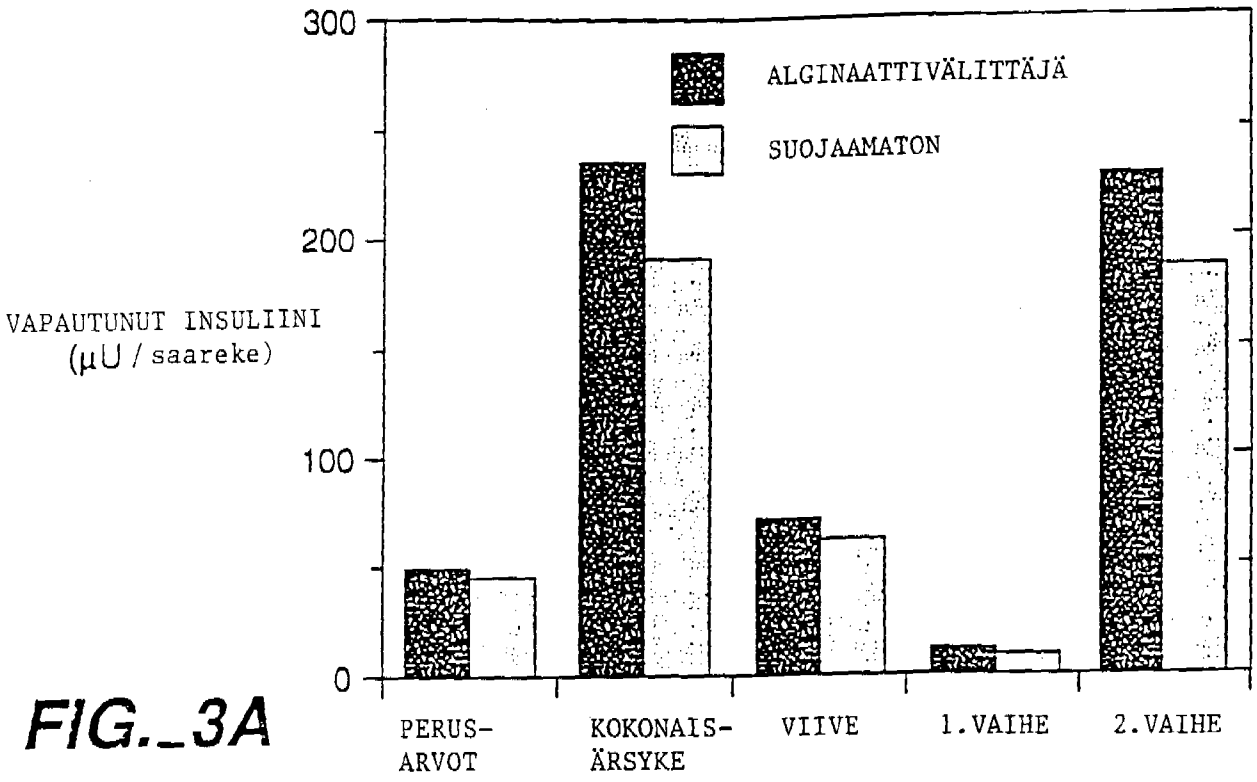
300
200
100
0
VAPAUTUNUT INSULIINI
(µU / saareke)
ALGINAATTIVÄLITTÄJÄ
SUOJAAMATON
PERUS-
ARVOT
KOKONAIS-
ÄRSYKE
VIIVE
1.VAIHE
2.VAIHE

FIG._3A

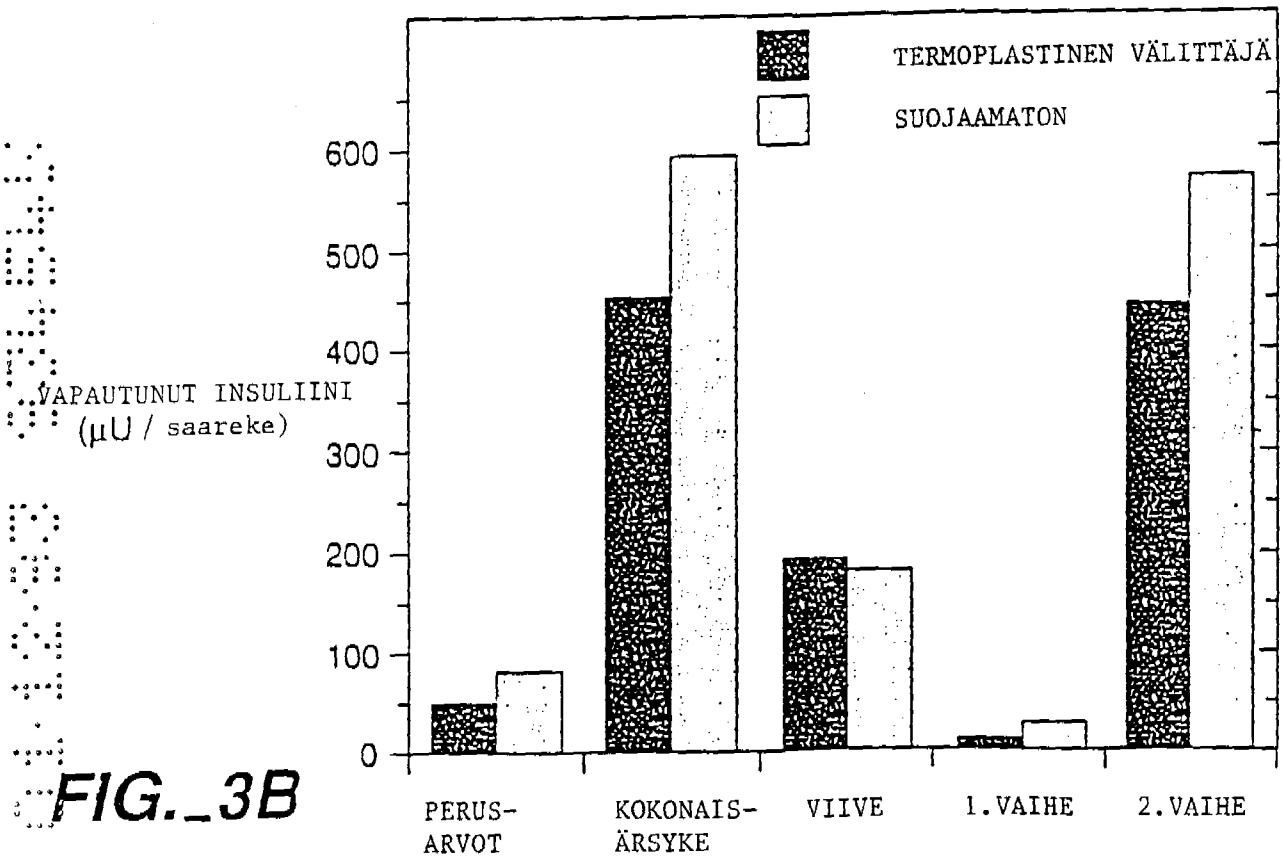
600
500
400
300
200
100
0
VAPAUTUNUT INSULIINI
(µU / saareke)
TERMOPLASTINEN VÄLITTÄJÄ
SUOJAAMATON
PERUS-
ARVOT
KOKONAIS-
ÄRSYKE
VIIVE
1.VAIHE
2.VAIHE

FIG._3B

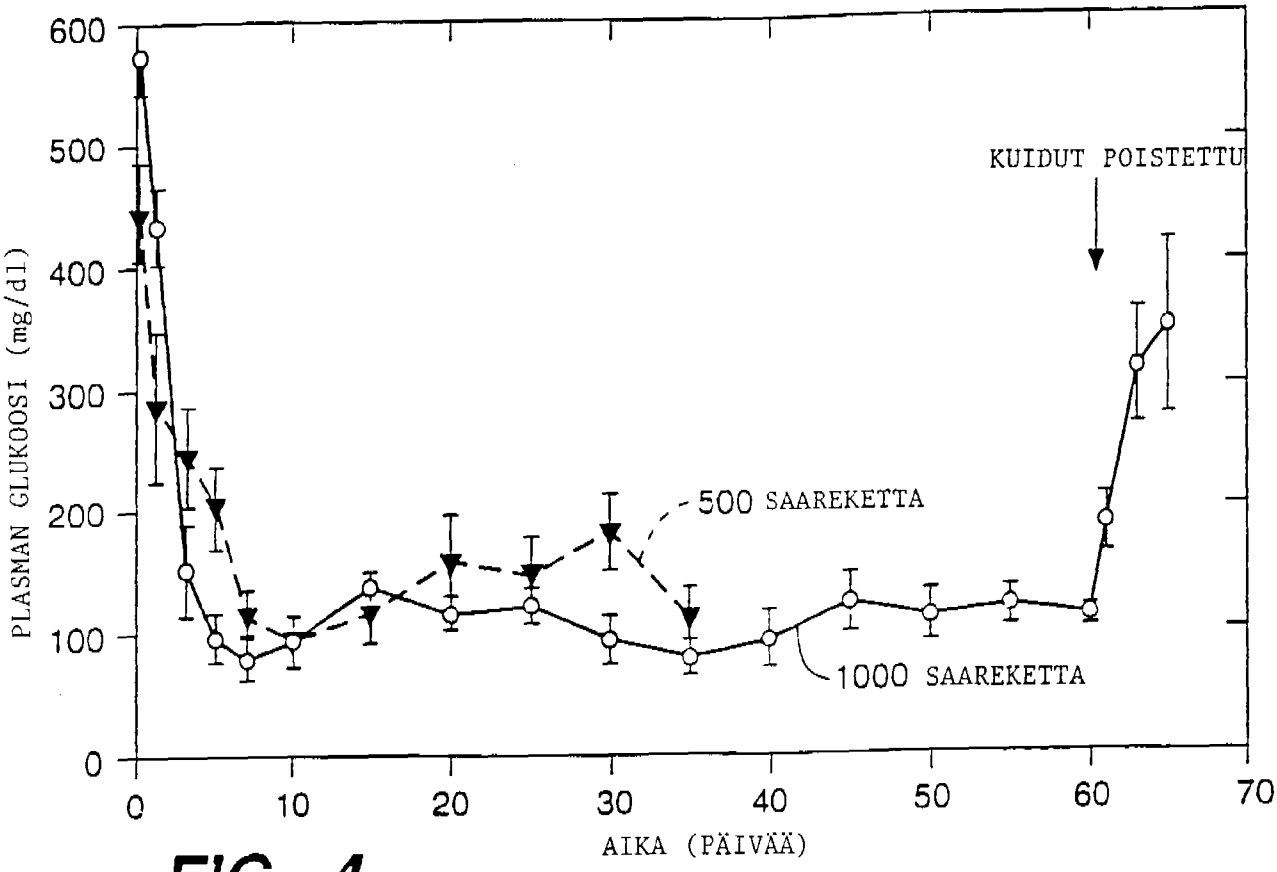
PLASMAN GLUKOOSI (mg/dl)
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
60
70
AIKA (PÄIVÄÄ)
KUIDUT POISTETTU
500 SAAREKETTA
1000 SAAREKETTA

FIG._4

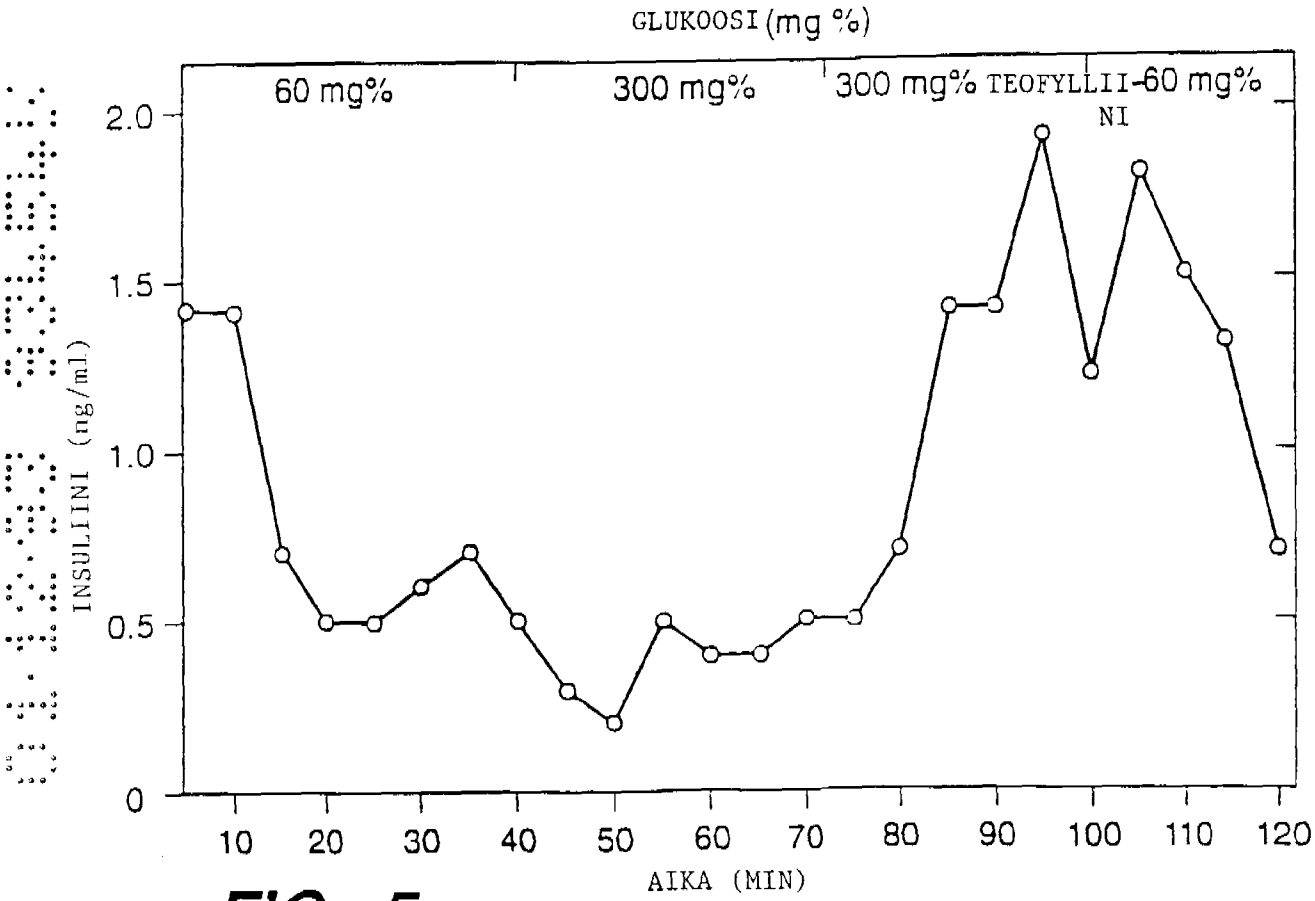
GLUKOOSI (mg %)
60 mg%
300 mg%
300 mg% TEOFYLLII-
NI
60 mg%
INSULIINI (ng/ml)
2.0
1.5
1.0
0.5
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
AIKA (MIN)

FIG._5

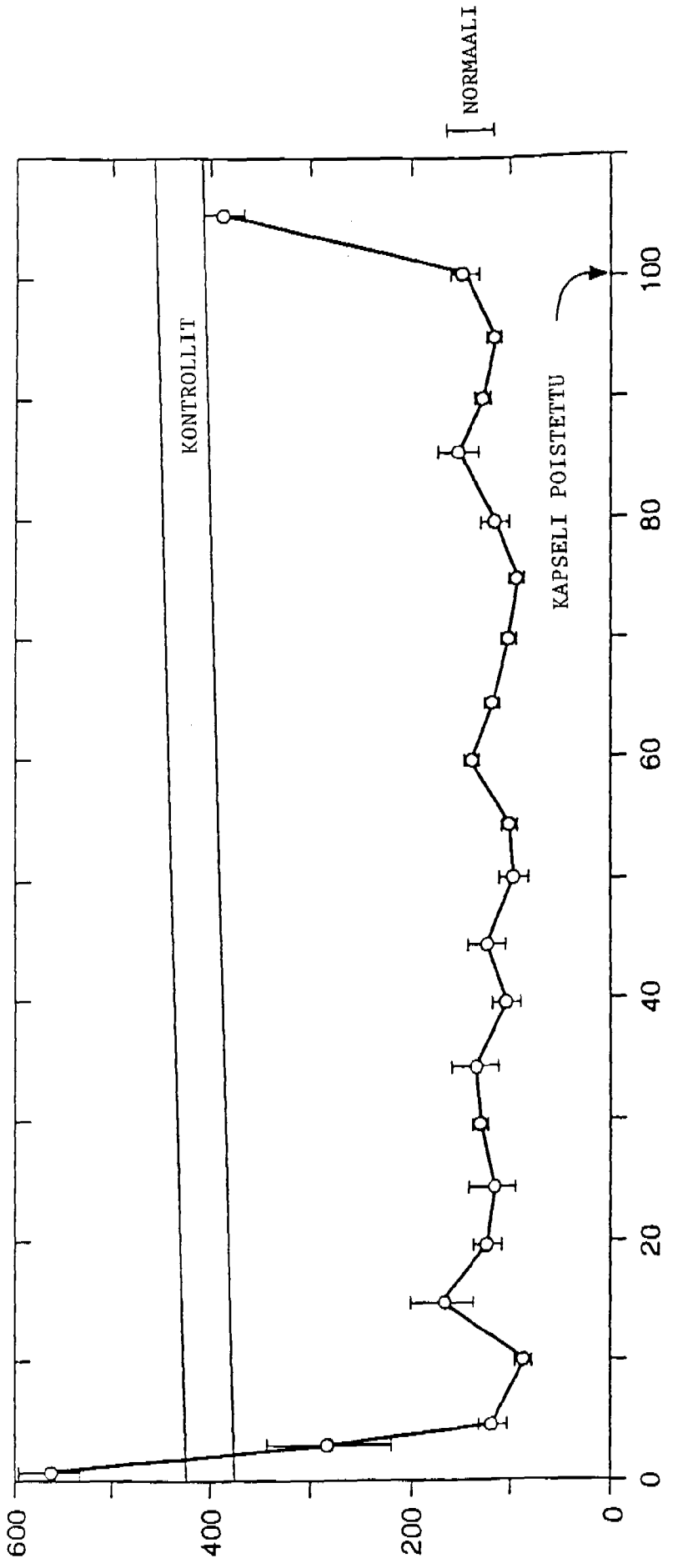
NORMAALI
KONTROLLIT
KAPSELI POISTETTU
600
400
200
0
0
20
40
60
80
100
PLASMAN GLUKOOSI (mg/dl)
AIKA VÄLITTÄJÄN IMPLANNOINNISTA (PÄIVÄÄ)

FIG._6

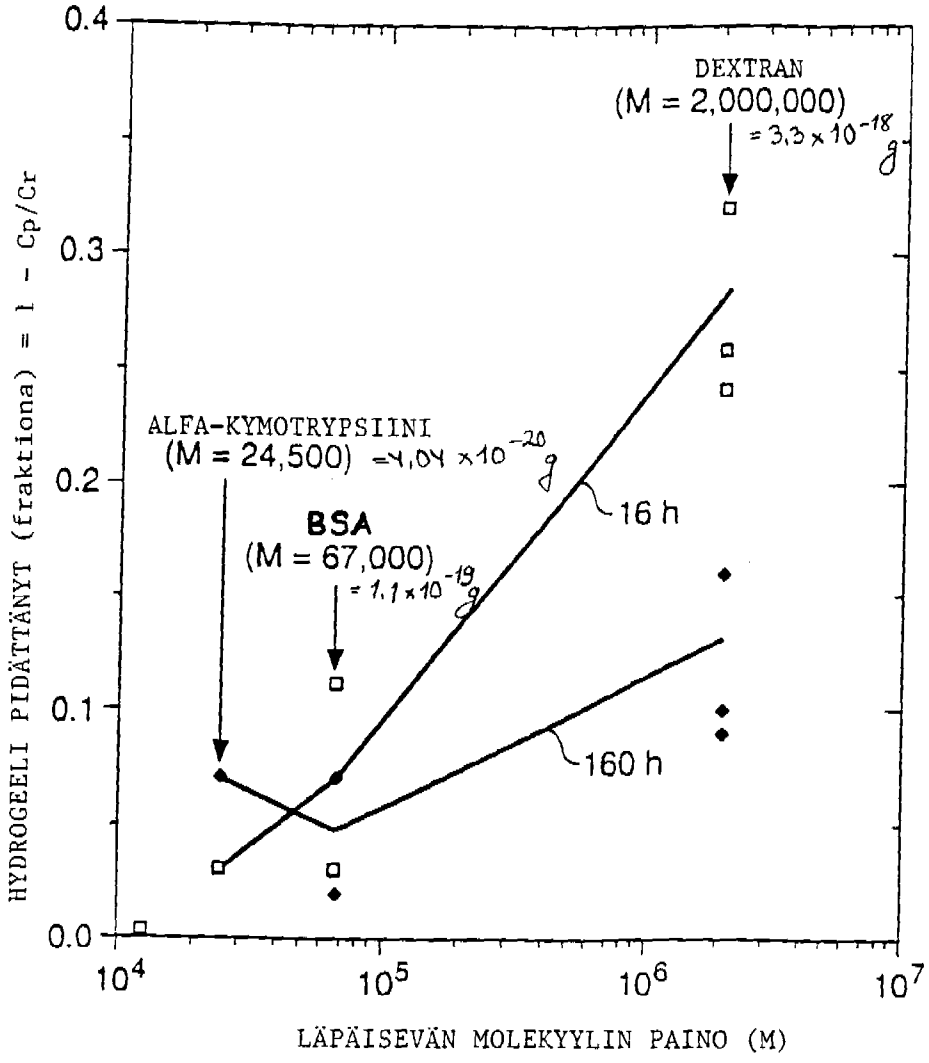
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
HYDROGEELI PIDÄTTÄNYT (fraktiona) = 1 - Cp/Cr
DEXTRAN
(M = 2,000,000)
= 3,3 x 10^-18 g
ALFA-KYMOTRYPSIINI
(M = 24,500) = 4,04 x 10^-20 g
BSA
(M = 67,000)
= 1,1 x 10^-19 g
16 h
160 h
10^4
10^5
10^6
10^7
LÄPÄISEVÄN MOLEKYYLIN PAINO (M)

FIG._7

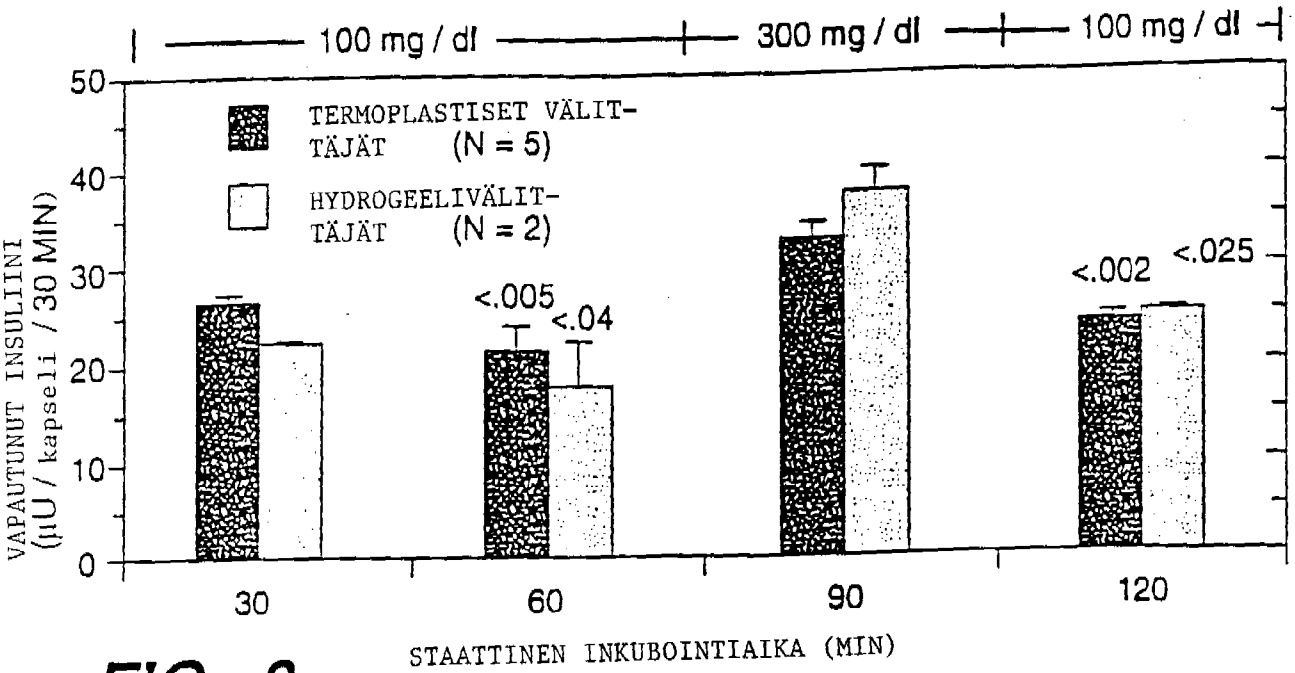
100 mg / dl
300 mg / dl
100 mg / dl
TERMOPLASTISET VÄLIT-
TÄJÄT (N = 5)
HYDROGEELIVÄLIT-
TÄJÄT (N = 2)
VAPAUTUNUT INSULIINI
(µU / kapseli / 30 MIN)
<.005
<.04
<.002
<.025
0
10
20
30
40
50
30
60
90
120
STAATTINEN INKUBOINTIAIKA (MIN)

FIG._8

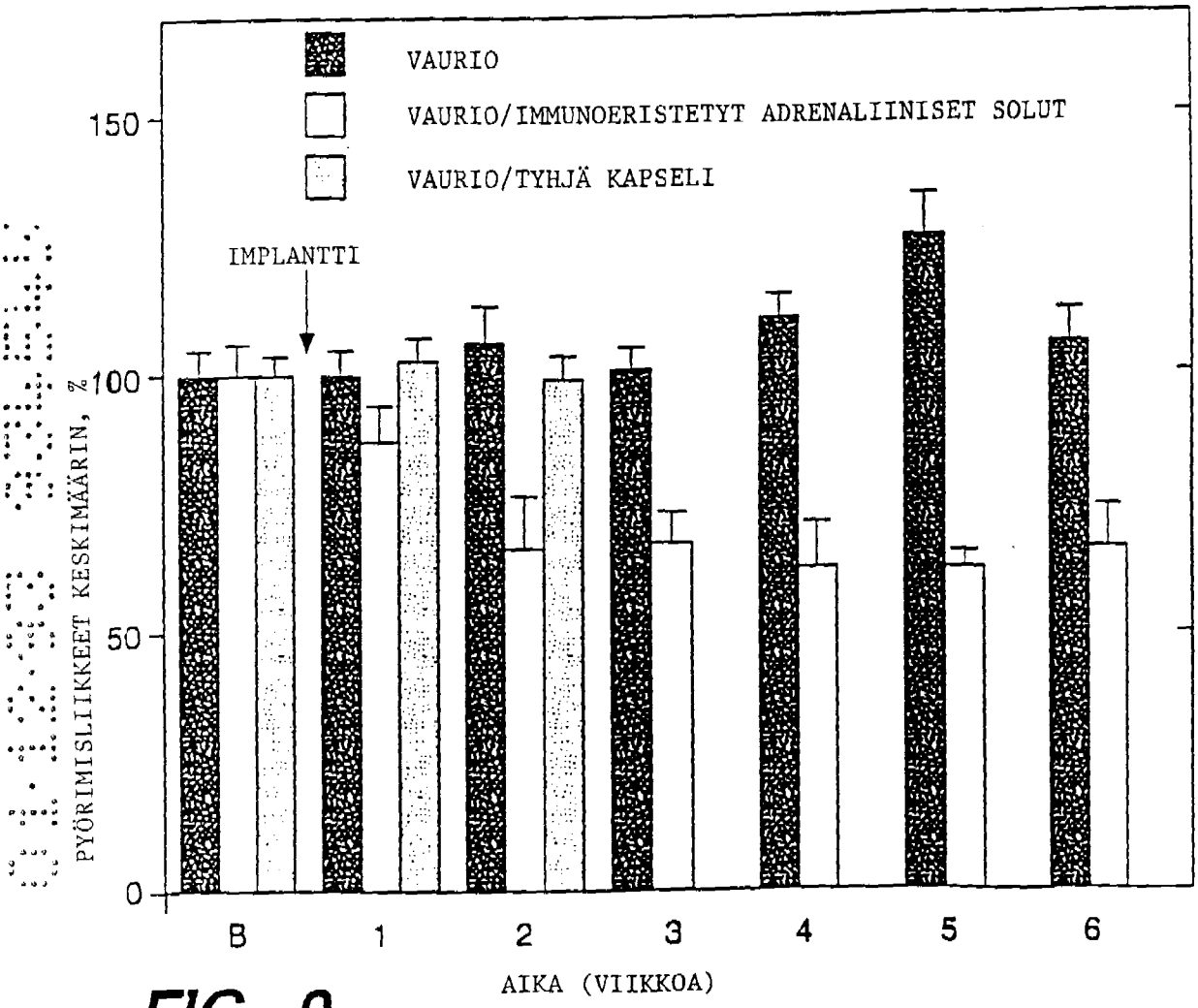
VAURIO
VAURIO/IMMUNOERISTETYT ADRENALIINISET SOLUT
VAURIO/TYHJÄ KAPSELI
IMPLANTTI
PYÖRIMISLIIKKEET KESKIMÄÄRIN, %
0
50
100
150
B
1
2
3
4
5
6
AIKA (VIIKKOA)

FIG._9

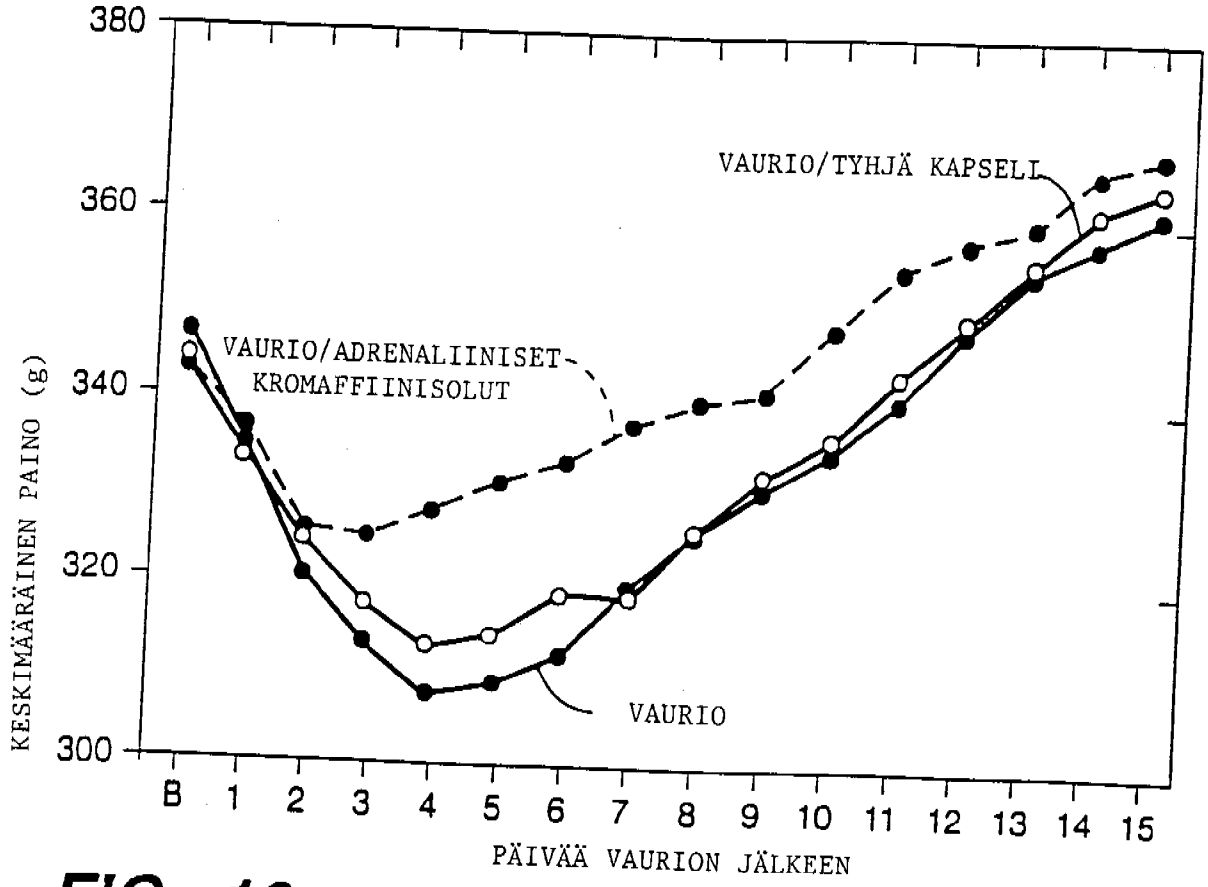
380
360
340
320
300
KESKIMÄÄRÄINEN PAINO (g)
VAURIO/TYHJÄ KAPSELI
VAURIO/ADRENALIINISET-
KROMAFFIINISOLUT
VAURIO
B 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15
PÄIVÄÄ VAURION JÄLKEEN

FIG._10

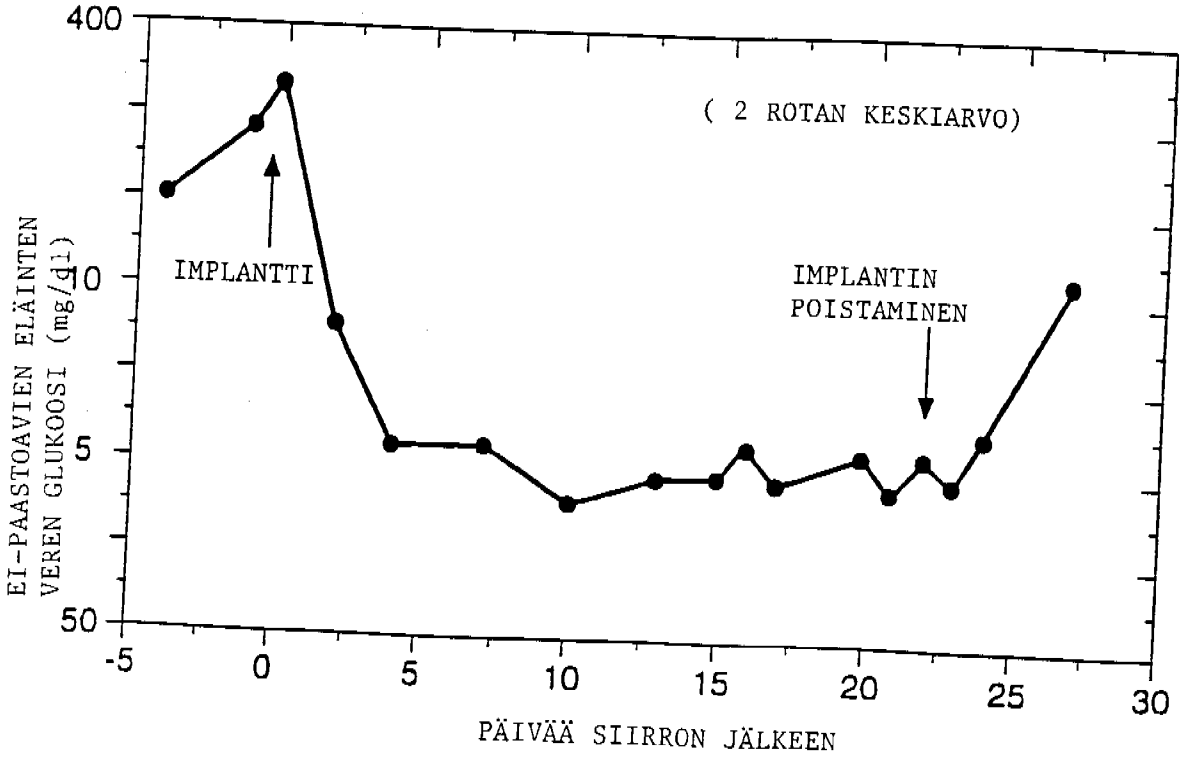
400
10
5
50
EI-PAASTOAVIEN ELÄINTEN
VEREN GLUKOOSI (mg/dl)
(2 ROTAN KESKIARVO)
IMPLANTTI
IMPLANTIN
POISTAMINEN
-5 0 5 10 15 20 25 30
PÄIVÄÄ SIIRRON JÄLKEEN

FIG._12

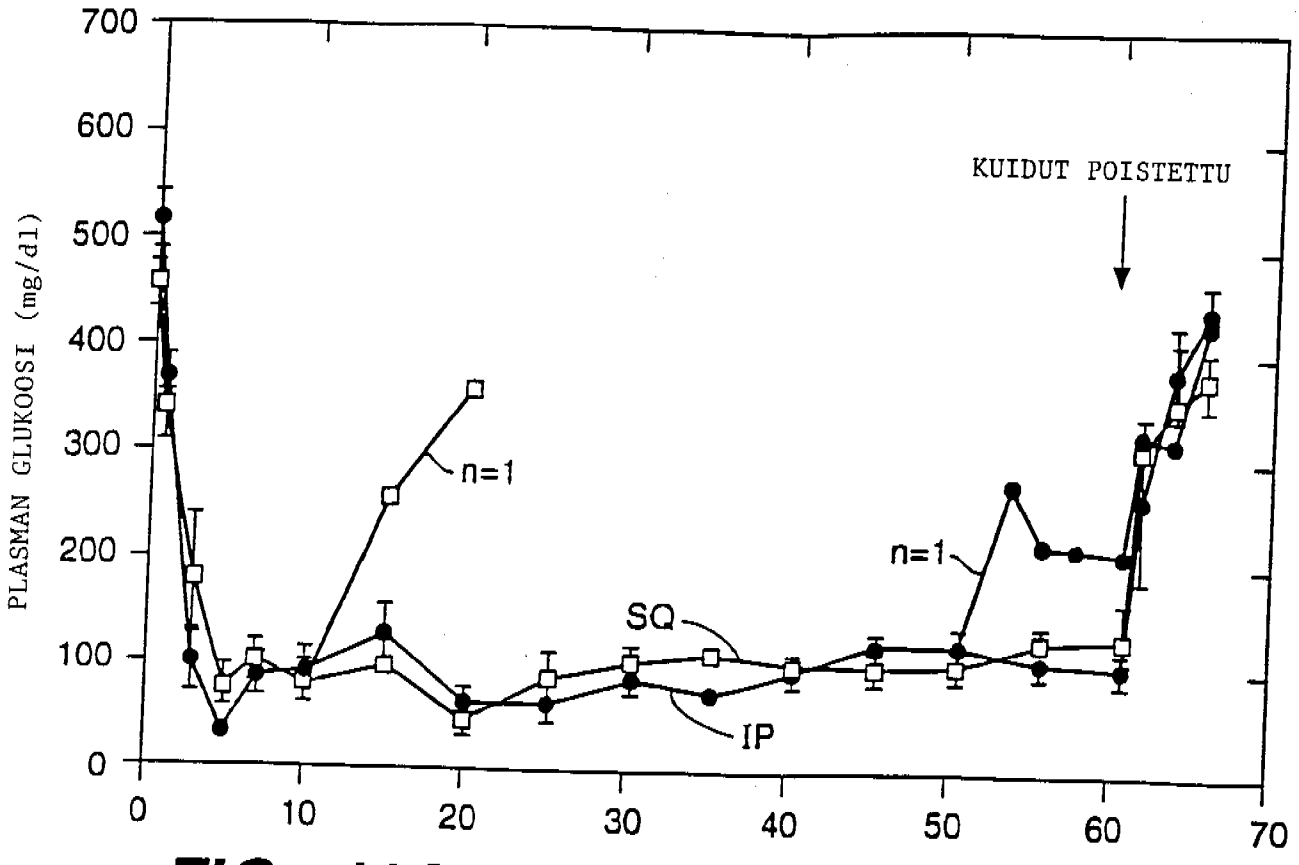

FIG._11A

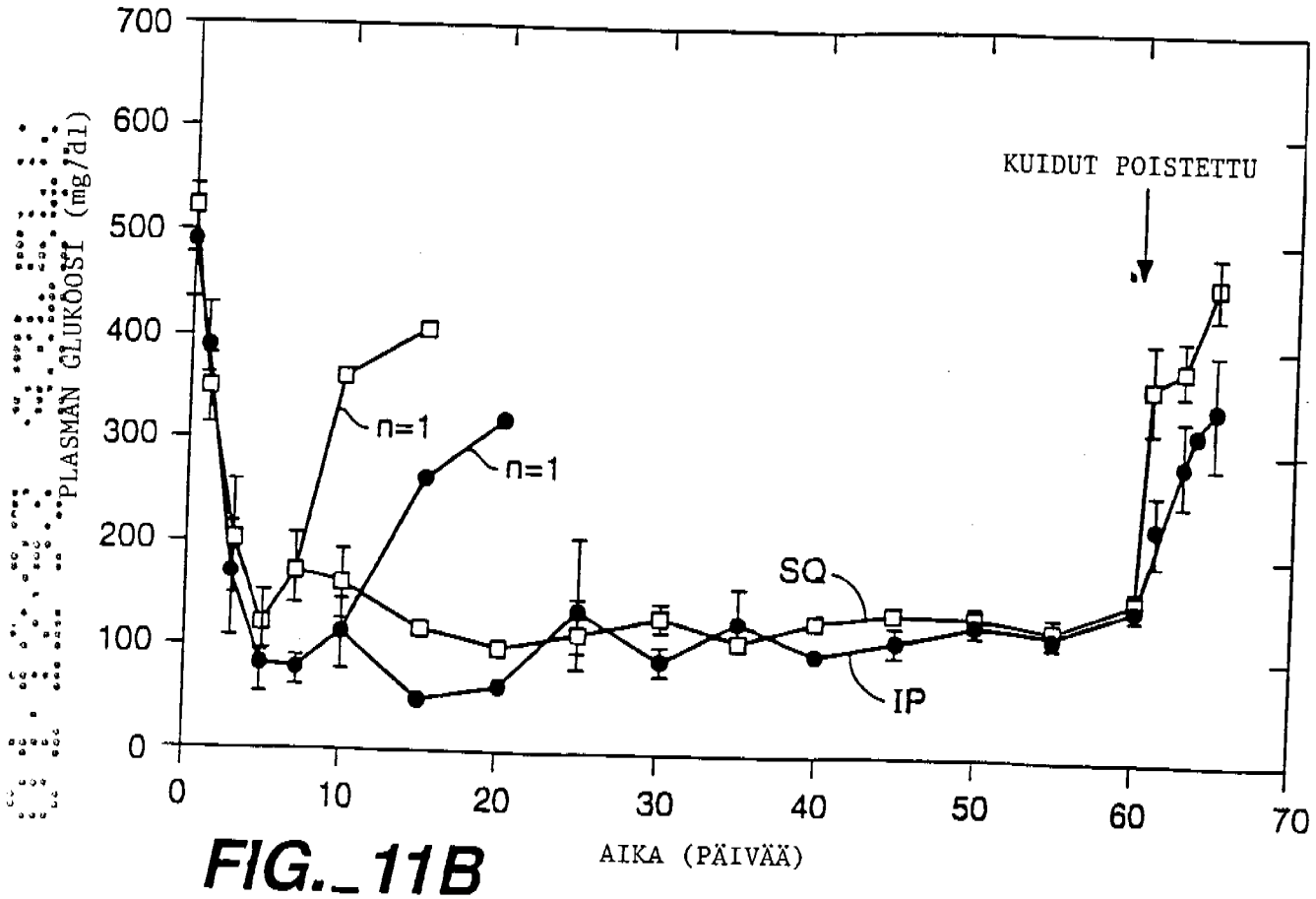

FIG._11B