

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

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

(10) FI 970217 A7

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application **970217**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 15/12

C12N 5/10

A61K 35/12

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **20.07.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **17.01.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **17.01.1997**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - **20.07.1995 PCT/US1995/009281**
Internationell ansökan - International
application

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

20.07.1994 US 279773 09.05.1995 US 432698

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Cytotherapeutics Inc., 2 Richmond Square, Providence RI 02906-5118, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

- 1 •Schinstine, Malcolm, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)**
- 2 •Shoichet, Molly S., College Street, Toronto, KANADA, (CA)**
- 3 •Gentile, Frank T., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)**
- 4 •Hammang, Joseph P., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)**
- 5 •Holland, Laura M., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)**
- 6 •Cain, Brian M., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)**
- 7 •Doherty, Edward J., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)**
- 8 •Winn, Shelley R., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)**
- 9 •Aebischer, Patrick, Switzerland, SVEITSI, (CH)**
- 10 •Messing, Albee, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)**

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Keinotekoisiiin biologisiin välineisiin kapseloitujen solujen kasvun säätely

Tillväxtkontroll för celler kapslade med konstgjorda biologiska organ

Keinotekoisiiin biologisiin välineisiin kapseloitujen solujen kasvun säätely

Keksinnön kenttä

5 Tämä keksintö koskee menetelmiä ja koostumuksia keinotekoiseen biologiseen välineeseen kapseloitujen solujen kasvun säätelämiseksi.

Keksinnön tausta

10 Keinotekoiset biologiset välineet, "BAO:t" (bio-artificial organ), ovat välineitä, jotka sisältävät eläviä soluja ja jotka on suunniteltu tarvittavan metabolisen toiminnon antamiseen isännälle.

BAO:ihin kapseloidut solut vievät isäntään yhden tai useamman biologisesti aktiivisen molekyylin, joita 15 voidaan käyttää monien kliinisten tilojen, puutosten ja sairaustilojen ehkäisemiseen tai hoitoon.

Esimerkiksi insuliinia erittäviä soluja sisältäviä BAO:ita voidaan käyttää diabeteksen hoitoon. Muita sairauksia, kuten hypoparatyroidismia ja anemiasia, voidaan 20 vastaavasti hoitaa käyttämällä soluja, jotka erittävät paratyroidihormonia ja vastaavasti erytropoietiinia.

Keinotekoisia biologisia välineitä voidaan käyttää myös viemään kohteeseen biologisesti aktiivisia molekyylejä 25 ja hermojen rappeutumistilojen, kuten Huntingtonin taudin, Parkinsonin taudin, Alzheimerin taudin ja AIDSiin liittyvän dementian, hoitamiseksi tai ehkäisemiseksi. Lisäksi myös lymfokiinejä ja sytokiinejä voidaan viedä kohteeseen BAO:illa isännän immuunijärjestelmän moduloimiseksi. Muihin biologisesti aktiivisiin molekyyleihin, joita voidaan 30 viedä kohteeseen keinotekoisilla biologisilla välineillä, kuuluvat katekoliamiinit, endorfiinit, enkefaliinit ja muut opioidiset tai ei-opioidiset peptidit, jotka ovat käyttökelpoisia kivun hoidossa. Myös entsyymipuutostiloja voidaan hoitaa käyttämällä BAO:ita. Biologisesti aktiivinen 35 molekyyli voi vaihtoehtoisesti poistaa tai eliminoida

haitallisia molekyylejä isännästä. BAO voi esimerkiksi sisältää soluja, jotka tuottavat biologisesti aktiivista molekyylejä, jota voidaan käyttää kolesterolin "puhdistamiseen" isännästä.

5 Tunnetaan erilaisia "makrokapseli-BAO:ita". Katso esimerkiksi Aebischer, US-patenttijulkaisu 5 158 881; Dionne et al., WO 92/03 327; Mandel et al., WO 91/00 119 ja Aebischer, WO 92/00 128. BAO:ihin kuuluu myös verisuonten ulkopuolisia diffuusiokammioita, suonensisäisiä diffuusiokammioita, suonensisäisiä ultrasuodatuskammioita ja
10 mikrokapseleita. Katso esimerkiksi Lim et al., Science 210 (1980) 908 - 910; Sun, A. M., Methods in Enzymology 137 (1988) 575 - 579; Dunleavy et al., WO 93/03 901 ja Chick et al., US-patenttijulkaisu 5 002 661.

15 Koska BAO:hon kapseloidut solut tarjoavat käyttöön tarvittavan metabolisen toiminnon, on toivottavaa, että nämä solut tuottavat optimaalisesti biologisesti aktiivista molekyylejä, joka toteuttaa kyseisen toiminnon. Erilais-
tuneet, jakautumattomat solut saattavat tyypillisesti olla
20 edullisempia kuin jakautuvat solut BAO:issa käytettäväksi, koska ne mahdollistavat halutun biologisesti aktiivisen molekyylin optimaalisen tuotannon. Monet erilaistuneet, jakautumattomat solut tuottavat esimerkiksi haluttua terapeuttista proteiinia suuremman määrän kuin jakautuvat solut, koska erilaistumisspesifisten geenien ilmentymisen ja solujen jakautumisen ajatellaan olevan antagonistisia prosesseja. Katso Wollheim, "Establishment and Culture of Insulin Secreting β Cell Lines, Methods in Enzymology 192 (1990) 223 - 235. Solujen replikaatiokapasiteetti pienenee
30 solujen erilaistuessa. Monissa tapauksissa proliferaatio ja erilaistuminen ovat toisensa poissulkevia. Katso Gonos, Oncogenes in Cellular Immortalisation and Differentiation, Anticancer Research 13 (1993) 1117.

Erilaistuneen kudoksen käyttö on edullista, koska
35 erilaistuneen kudoksen ominaisuudet *in vivo* ovat useimmi-

ten määränneet BAO:hon sisällytettäväksi toivotun kudoksen toiminnalliset ominaisuudet. Erilaistuneiden, jakautumattomien solujen käytön yhtenä toisena etuna on, että solujen lukumäärä BAO:ssa pysyy suhteellisen vakiona. Tämä puolestaan johtaa paremmin ennustettavissa oleviin tuloksiin ja stabiiliin annosteluun vastaanottajassa. Lisäksi erilaistuneet solut soveltuvat paremmin käytettäväksi BAO:issa, jotka sulkevat sisäänsä useampia kuin yhden biologisesti aktiivisia molekyylejä erittävän solutyypin. Jos käytetään jakautuvia soluja mainitunlaisissa BAO:issa, erilaiset solutyypit saattavat kasvaa eri nopeudella, mikä johtaa yhden solutyypin ylikasvuun. Käyttämällä erilaistuneita, jakautumattomia soluja voidaan helpommin säädellä kahden tai useamman synergistisen solutyypin suhteellisia osuuksia.

Vaikka erilaistuneiden solujen käyttö on monissa tapauksissa edullista, nisäkkäistä suoraan eristettyjen erilaistuneiden solujen käyttöön on liittynyt erilaisia ongelmia.

Eristetty kudokseksi on ensinnäkin potentiaalisesti kontaminoitunutta, mikä saattaa vaatia, että kustakin eläimestä otetulle kudokselle tehdään kallis ja aikaavievä testaus sen varmistamiseksi, että se on patogeenitonta.

Kudos voi toisekseen vaurioitua eristämisen aikana siitä syystä, että eristysprosessissa käytetään mekaanisia tai entsymaattisia eristysmenettelyjä. Mekaaniset käsittelyt eivät aina ole helppoja standardoida, mikä johtaa vaihteluun eristysten välillä.

Kolmanneksi eristysprosessin aikana saattaa esiintyä iskemioita, mikä aiheuttaa kudoksen vaurioitumista.

Neljänneksi saattaa olla vaikea saavuttaa toistettavissa olevia saantojen kudoksen luovuttajien välisten vaihteluiden vuoksi. Esimerkiksi lähde-eläimen ikä, sukupuoli, terveydentila ja hormonaalinen tila voivat vaikut-

taa kiinnostuksen kohteena olevan kudoksen saantoon ja laatuun.

Viidenneksi lähdekudosta ei joskus ole tarpeeksi täyttämään suunnitelman mukainen tarve kyseisen BAO:n kohdalla. Näin tapahtuu esimerkiksi lähdekudoksen tullessa pienikokoisesta elimestä tai tarvittaessa suuria määriä kudosta. Jos eristetyn kudoksen lähde on ihminen, luovuttajakudoksesta on usein vakava pula.

Kuudenneksi joissakin tapauksissa on toivottavaa muuntaa geneettisesti BAO:ssa käytettäviä soluja. Jakautumaton kudosta on tähän asti ollut vaikea muuntaa geneettisesti *in vitro*, ja muunnettujen solujen saannot ja ominaisuudet saattavat olla epävarmoja. Niinpä edellä mainittujen ongelmien vuoksi ja erilaistuneiden, jakautumattomien solujen käytön ollessa samalla toivottavaa, on olemassa tarve menetelmälle erilaisten, jakautumattomien solujen tuottamiseksi ja ylläpitämiseksi kapseloitaviksi BAO:ihin.

Näiden ongelmien vuoksi on suosittu jakautuvien solujen ja solulinjojen käyttöä BAO:issa tarvittavan biologisen toiminnon aikaansaamiseksi. Jakautuvien solujen käytön yhtenä tärkeänä etuna on, että mainitunlaisia soluja voidaan kasvattaa suuriin lukumääriin *in vitro*, tutkita patogeenien suhteen ja tallettaa. Tämä mahdollistaa lähes rajoittamattoman kudoslähteen alemmin tuotantokustannuksin. Valikointiohjemia, kuten solujen lajittelua tai kloonausta, voidaan soveltaa solupankkiin ominaisuuksiltaan parannettujen alapopulaatioiden kehittämiseksi. Lisäksi jakautuvat solut ja solulinjat soveltuvat paremmin geneettiseen muokkaukseen kuin erilaistuneet, jakautumattomat solut. Kyky tuoda soluihin heterologista yhdistelmä-DNA:tä antaa monia uusia mahdollisuuksia muuttaa BAO:hon kapseloitavien solujen toimintaa tai fenotyyppiä. Tämä puolestaan monipuolistaa BAO:iden terapeuttisia käyttötarkoituksia.

Kuten on käsitelty *supra*, jatkuvasti jakautuvien solujen BAO:hon kapseloinnin haittapuoliin kuuluu kuitenkin välineessä olevien solujen lukumäärän heikko säätely, joka voi johtaa halutun biologisesti aktiivisen molekyylin tuotannon heikompaan ennustettavuuteen.

Vaikka useimmiten voi olla toivottavaa rajoittaa solujen kasvua tai minimoida se BAO:ssa, voi joissakin tapauksissa, esimerkiksi istutettaessa BAO "vihamieliseen" ympäristöön, olla toivottavaa antaa solujen lisääntyä hitaasti solulukumäärien ylläpitämiseksi BAO:ssa.

On olemassa yksi toinen ongelma, joka liittyy yleisesti ottaen solujen kapselointiin. Erilaisilla solutyypeillä on sellaisia solujen tarttumisominaisuuksia, että soluilla on taipumus tarttua toisiinsa ja muodostaa tiiviitä agglomeraatteja tai aggregaatteja, erityisesti ellei saatavissa ole sopivaa substraattia soluille. Mainitunlaisiin soluryppäisiin voi kehittyä keskellä olevia nekrootisia alueita siitä syystä, että ravinteiden ja hapen on suhteellisen vaikea päästä ytimessä oleviin soluihin tai ytimeen kerääntyy toksisia tuotteita. Nekroottinen kudosis voi myös vapauttaa ylimäärin solun proteiineja, jotka tarpeettomasti tuovat isäntään runsaasti ksenoproteiineja tai muita tekijöitä, jotka ovat haitallisia eläville soluille, esimerkiksi tekijöitä, jotka herättävät makrofagi- tai muun immuunivasteen. Tämä ongelma voi pahentua, kun solut kapseloidaan BAO:hon, joka on varustettu puoliläpäisevällä kalvovaipalla kalvon poikki tapahtuvaa diffuusiota koskevien rajoitusten vuoksi. BAO:ssa on usein käytettävissä vähemmän happea ja isännästä tulevia ravintoaineita. Lisäksi BAO:hon voi kerääntyä jätetuotteita.

Näistä tiiviistä solumassoista voi muodostua hitaasti tiiviitä solukasvustopesäkkeitä tai niitä voi muodostua nopeasti juuri dispergoituneiden solujen liittyessä uudelleen toisiinsa tai kudosisvälitteisesti solupintojen adheesioproteiinien vaikutuksesta. Solut tai kudokset,

joilla on suuri metabolinen aktiivisuus, voivat olla erityisen herkkiä hapen tai ravintoaineiden puutteen vaikutuksille ja kuolla pian jouduttuaan suuren soluryppään keskelle. Monet endokriinikudokset, jotka ovat normaalisti tiheiden hiussuonipatjojen ylläpitämiä, käyttäytyvät tällä tavalla; Langerhansin saarekkeet näyttävät olevan erityisen herkkiä kapseloituina.

On olemassa tarve saada aikaan menetelmä ja koostumus kapseloitujen solujen kasvun säätelemiseksi, joissa yhdistyvät sekä lisääntyvien solujen että erilaistuneiden, jakautumattomien solujen erilaiset edut. Tämä keksintö tarjoaa käyttöön menetelmiä ja koostumuksia, joiden yhteydessä soluja voidaan lisätä ja levittää rajattomasti *in vitro* ja säädellä proliferaation ja erilaistumisen välistä tasapainoa solujen ollessa BAO:n sisään kapseloituina, niin että väline toimii toivotulla tavalla. Tämä keksintö mahdollistaa siten BAO:ssa olevien solujen lukumäärän säätelyn, ja sen avulla voidaan siten saada aikaan kapselin tuotantotason parannettu säätely. Tämä keksintö tarjoaa käyttöön myös menetelmiä solujen kasvun kontrolloimiseksi säätelemällä solun sijaintia BAO:ssa ja vähentää siten epätoivottavien nekroottisten soluytimien muodostumista BAO:ssa. Solujen lukumäärän ja sijainnin säätely BAO:ssa tarjoaa myös sen edun, että helpotetaan BAO-kalvon ja muiden välineparametrien optimointia kulloisenkin kapseloidun solutyypin kohdalla. Tämä johtuu siitä, että välineen tarvittavat tunnusmerkilliset ominaisuudet on helpompi määrittää BAO:ssa olevan kiinteän solupopulaation kuin jakautuvan solupopulaation ollessa kyseessä. Lisäksi voidaan saavuttaa biologisesti aktiivisten molekyylien pitkäaikainen luovutus.

Yhteenveto keksinnöstä

Tämä keksintö vastaa edellä esitettyihin ongelmiin tarjoamalla käyttöön menetelmiä ja koostumuksia solujen jakautuman (ts. BAO:ssa olevien solujen lukumäärän tai

sijainnin tai molempien) säätelämiseksi niiden ollessa BAO:hon kapseloituina. Tämän keksinnön mukaisiin menetelmiin ja koostumuksiin kuuluu (1) menetelmiä ja koostumuksia BAO:hon kapseloitavien solujen muuntamiseksi ja (2)

5 menetelmiä ja koostumuksia BAO:n sisällä olevien kasvupintojen muuntamiseksi.

Menetelmiin ja koostumuksiin solujen käsittelyksi kuuluu solujen geneettinen muuttaminen geenillä, joka koodittaa solujen proliferaatioon tai erilaistumeen

10 vaikuttavaa tuotetta. Käsittely voi käsittää sellaisen kemiallisen yhdisteen ja kasvutekijän aikaansaannin, joka inhiboi proliferaatiota tai indusoi erilaistumisen. Käsittely voi vaihtoehtoisesti käsittää proliferaatiota stimuloivan tai erilaistumista inhiboivan kemiallisen yhdisteen

15 tai kasvutekijän poistamisen kasvualustasta. Käsittely voi tapahtua ennen kapselointia BAO:hon tai sen jälkeen, edullisesti ennen kapselointia. Solujen proliferaatiota voidaan lisäksi säädellä säteilytyksellä.

Menetelmiin ja koostumuksiin kasvupinnan muuntamiseksi kuuluu vähintään yhden BAO:n sisällä olevan kasvupinnan päällystäminen yhdellä tai useammalla solun ulkopuolisella matriksimolekyyllillä ("ECM", extracellular

20 matrix molecule). ECM:iä voidaan sijoittaa päällysteeksi suoraan ontelopinnalle tai mille tahansa BAO:n sisällä olevalle alustalle tai mikrohelmikantajille ("mikrokantajille"). Soluja tai mikrokantajia, joille on siirrostettu soluja, voidaan lisäksi suspensoida matriksimateriaaliin, joka inhiboi fysikaalisesti solujen proliferaatiota. Matriksimateriaalista voidaan lisäksi valmistaa kemiallinen

25 tai peptidijohdannainen.

BAO:n kasvupintaa voidaan lisäksi muuntaa kemiallisella käsittelyllä, niin että inhiboidaan solujen kiinnittymistä tai edistetään solujen kiinnittymistä BAO:n ontelopintaan. Kasvupintaa voidaan lisäksi muuntaa lisäämällä

35 inertti "telinerakenne" ennen solujen pakkaamista. Teline-

rakenne estää fysikaalisesti solujen kasvamista ulospäin ja tarjoaa lisäkohtia solujen kiinnittymiselle. On ymmärrettävää, etteivät erilaiset menetelmät ja koostumukset solujen muuntamiseksi ja kasvupinnan muuntamiseksi ole toisiaan poissulkevia ja että niitä voidaan käyttää yhdistelmänä.

Piirustusten lyhyt kuvaus

Kuvio 1 esittää sellaisen konstruktion plasmidi-karttaa, joka sisältää 2,3 ke:n (kiloemäksen) fragmentin hiiren Mx1-promoottorista fuusioituna varhaiseen SV40-alueeseen, jotka seuraa BamHI-XbaI-fragmentti hiiren beeta-globiinigeenin transloitumattomalta 3'-alueelta.

Kuvio 2 NGF:n erittymistä [ng/(ml·24 h)] 4, 11 ja 25 vuorokauden kuluttua BHK-soluista, jotka on kapseloitu derivatisoimattomiin vertailukalvoihin ("0 %" selityksessä) tai kalvoihin, jotka on derivatisoitu käyttämällä 1 % tai 5 % PEO-PDMS:ää ("1 %" ja vastaavasti "5 %" selityksessä). Solut kapseloitiin ilman matriksia ("no mat" selityksessä) tai käyttämällä VitrogenTM-matriksia ("vit" selityksessä) tai agarosimatriksia ("agse" selityksessä).

Kuvio 3 esittää NGF:n vapautumista BHK-soluista, joita kasvatetaan CultiSpheresTM-helmillä agarosimatriksin poissa ollessa (selitys: n-mat-008, 0709-n-m) tai agarosimatriksin läsnä ollessa (selitys: agaro-008, agaro-0709).

Kuvio 4 esittää katekoliamiinien vapautumista PC12A-soluista 1, 14 ja 28 vuorokauden kuluttua kapseloinnista BAO:ihin, joissa on inertti PHEMA-telinerakenne. Kuva A esittää katekoliamiinien perusvapautumista; kuva B K⁺:lla herätettyä katekoliamiinien vapautumista. Selityksessä olevat lyhenteet L-dopa, NEPI, epi, DOPAC, DA ja HVA edustavat L-dopaa, norepinefriiniä, epinefriiniä, dopakia, dopamiinia ja vastaavasti homovanilliinihappoa.

Kuvio 5 esittää katekoliamiinien vapautumista PC12A-soluista 1, 14 ja 28 vuorokauden kuluttua kapseloin-

nista BAO:ihin, joissa on inertti PHEMA/MMA-telinerakenne. Kuva A esittää katekoliamiinien perusvapautumista; kuva B K⁺:lla herätettyä katekoliamiinien vapautumista. Selityksessä olevat lyhenteet L-dopa, NEPI, epi, DOPAC, DA ja HVA edustavat L-dopaa, norepinefriiniä, epinefriiniä, dopakia, dopamiinia ja vastaavasti homovanilliinihappoa.

Kuvio 6 esittää L-dopan vapautumista SV40/DB4-NGF-soluista, joita kasvatetaan CultiSphersTM-helmillä algi-naattimatriksin läsnä ollessa (selitys: CS/AL) tai agarosimatriksin läsnä ollessa (selitys: CS/AG), 2, 20, 40 ja 80 vuorokauden kuluttua kapseloinnista BAO:ihin.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Määritelmät

Tässä käytettynä "keinotekoinen biologinen väline" eli "BAO" (bioartificial organ) on väline, joka voi olla suunniteltu istutettavaksi isäntään tai tehty toimivaksi kehon ulkopuolella ja voidaan kiinnittää joko pysyvästi tai poistettavissa olevalla tavalla isäntään. BAO sisältää sisältää soluja tai eläviä kudoksia, jotka tuottavat biologisesti aktiivista molekyyliä, jolla on terapeuttinen vaikutus isäntään. BAO:n tulisi vastaanottajaan isutettuna olla biologisesti yhteensopiva. Niinpä BAO ei saisi aiheuttaa isännässä haitallista vastetta, joka riittää tekemään sen toimimattomaksi tai terapeuttisesti käyttökelvottomaksi. Tällaista toimimattomuutta voi esiintyä esimerkiksi sellaisen fibroottisen rakenteen muodostuessa kapselin ympärille, joka rajoittaa ravintoaineiden diffuusiota kapselissa oleviin soluihin. Vahingollisiin ilmiöihin voi kuulua myös kapselin hylkiminen tai toksisten tai pyrogeenisten yhdisteiden (esimerkiksi synteettisen polymeerin sivutuotteiden) vapautuminen BAO:sta ympäröivään isäntäkudokseen.

Kapseloituja soluja sisältävistä BAO:ista voidaan konstruoida sellaisia, että niillä on immuunieristysominaisuuksia, jotka estävät isännän immuunijärjestelmän ele-

menttejä pääsemästä välineeseen ja suojaavat siten keino-
tekoisessa biologisessa välineessä olevia soluja vahingol-
liselta immuunituholta. BAO:n suurentaa hoidossa käyttö-
kelpoisten solutyyppeiden valikoimaa. Istutetuissa BAO:issa
5 välineet, jotka voivat olla tai olla olematta immuunieris-
täviä, sisältävät tavallisesti valittua tuotetta tuottavat
solut tai kudoksen puoliläpäisevän fysikaalisen sulun si-
sällä, joka mahdollistaa ravintoaineiden, jättemateriaalien
ja erittyneiden tuotteiden diffuusion ympäröivään isäntä-
10 kudokseen ja pidättää sisällään olevat solut, mutta mini-
moi immunologiseen hylkimiseen liittyvien solu- ja mole-
kyyli efektorien haittavaikutukset. Immuunieristysominais-
suudet eivät ehkä kaikissa tapauksissa ole kuitenkaan
välttämättömiä (esimerkiksi solujen ollessa autologisia
15 tai syngeneeisiä isännälle).

"Biologisesti aktiivinen molekyyli" on molekyyli,
joka (a) voi toimia solussa, jossa se valmistetaan, (b)
ilmentyä solun pinnalla ja vaikuttaa solun vuorovaikutuk-
seen muiden solujen tai biologisesti aktiivisten moleky-
20 lien kanssa (esimerkiksi neurotransmitterireseptori tai
soluadheesiomolekyyli) tai (c) vapautua tai erittyä solus-
ta, jossa se valmistetaan, ja toteuttaa vaikutuksensa
isännässä olevalla erillisellä kohdesolulla tai kohdemole-
kyyllillä (esimerkiksi neurotransmitteri, hormoni, kasvute-
25 kijä tai sytokiini).

Tässä käytettynä, ellei toisin määritellä, termi
"solut" tarkoittaa missä tahansa muodossa olevia soluja,
mukaan luettuina kudokseen pidätettyneet solut, soluryp-
pää ja yksittäin eristetyt solut, mainittuihin kuitenkaan
30 rajoittumatta. Tämän keksinnön yhteydessä käytettävät so-
lut tuottavat vähintään yhtä biologisesti aktiivista mole-
kyyliä.

BAO:n sisällä vallitsevan solujakautuman säätely
tarkoittaa solujen lukumäärän säätelyä BAO:ssa, solujen
35 tilallisen sijainnin säätelyä BAO:ssa tai molempia.

Tämän keksinnön yhteydessä voidaan käyttää laajaa valikoimaa soluja. Niihin kuuluu hyvin tunnettuja, yleisesti saatavissa olevia immortalisoituja solulinjoja samoin kuin jakautuvia primaarisoluviljelmiä. Esimerkkejä tämän keksinnön toteuttamiseen soveltuvista, yleisesti saatavissa olevista solulinjoista kuuluvat L-6-solut, MDCK-solut, LLC-PK-solut, β -CH3-solut, C2-solut, BHK-solut (by hamster kidney), kiinanhamsterin munasarjasolut (CHO-solut), hiiren fibroblastit (L-M), NIH Swiss -hiiren alkiosolut (NIH/3T3), vihermarakattisolulinjat (mukaan luetuina COS-a, COS-1, COS-6, COS-7, BSC-1, BSC-40, BMT-10 ja Vero), rotan lisämunuaisen kromaffiinikasvainsolut (PC12), rotan gliakasvainsolut (C6), RAJI-solut (ihmisen lymfooma), MOPC-31C-hiiren plasmasytomasolut, MN9D-solut, MN9H-solut, ripTag-transgeenisestä hiirestä peräisin olevat solut, SCT-1-solut, β -TC-solut, Hep-G2-solut, AT-T20-solut, beeta-solulinjat, kuten NIT-solut tai RIN-solut, Ntera-2-solut [Pleasure et al., Journ. Neuroscience 12 (1992) 1802 - 1815] ja ihmisen astrosyyttisolulinjat, kuten U-373 ja U-937.

Primaarisoluihin, joita voidaan käyttää, kuuluvat bFGF:ään reagoivat kanta- tai emohermosolut, jotka ovat peräisin nisäkkäiden keskushermostosta [Richards et al., PNAS 89 (1992) 8591 - 8595; Ray et al., PNAS 90 (1993) 3602 - 3606], primaariset fibroblastit, Schwann-solut (WO 92/03536), astrosyytit, oligodendrosyytit ja niiden esiasheet, myoblastit ja lisämunuaisen kromaffiinisolut. Yksi mainitunlainen myoblastisolulinja on C₂C₁₂-solulinja.

Solut voidaan valita myös sen mukaan, mitä menetelmää kasvun säätämiseksi ja erilaistumisen aikaansaamiseksi on määrä käyttää. Kantasoluja voidaan esimerkiksi käyttää helposti sellaisten menetelmien yhteydessä, joissa erilaistuminen indusoidaan kemiallisella aineella. Kantasolut ovat yleisesti ottaen erilaistumattomia soluja, jotka *in vivo* ovat normaalisti lepotilassa mutta proliferaa-

tiokykyisiä ja kykeneviä tuottamaan lisää kantasoluja, joilla on kyky tuottaa suuri määrä emosoluja, jotka puolestaan voivat tuottaa erilaistuneita tai erilaistumiskykyisiä tytärsoluja. Kantasolut edustavat ryhmää soluja, joita voidaan helposti lisätä viljelmässä ja joiden jälkeläiset voidaan saattaa erilaistumaan lopullisesti antamalla jotakin määrättyä kasvutekijää. Katso Weiss et al., PCT/CA 92/00 283.

Myoblastit ovat yksi solutyyppeistä, joka voidaan kapseloida tämän keksinnön mukaiseen BAO:hon. Myoblastit ovat esiasteliassoluja, jotka ovat alunperin syntyneet mesodermin kantasolupopulaatioista. Saatavana on joukko myoblastisolulinjoja, joille voi tapahtua erilaistuminen viljelmässä, esimerkiksi L-6- ja β -CH3-solut. Primaarisia myoblasteja voidaan helposti eristää autopsia- tai biopsiakudoksesta ja ne ovat puhdistettavissa ja lisättävissä. Myoblastit proliferoivat ja fuusioituvat yhteen, niin että muodostuu erilaistuneita, monitumaisia "myoputkia". Myoputket eivät enää jakaudu, mutta jatkavat lihasproteiinien tuotantoa. Proliferoituvia myoblasteja voidaan helposti käsitellä geneettisesti tuottamaan terapeuttisia molekyylejä. Tunnetaan menetelmiä yhden tai useamman geenin viemiseksi myoblasteihin haluttujen biologisesti aktiivisten molekyylien tuottamiseksi. Myoblasteilla on kyky liikkua, fuusioitua ennalta olemassa oleviin kuituihin ja toimia niihin tuotujen yhden tai useamman geenin kantajina. Katso Verma et al., WO 94/01129; Blau et al., TIG 9 (1993) 269 - 274; WO 93/03768 ja WO 90/15863. Käsitellyt solut voidaan kapseloida ja niiden voidaan antaa erilaistua BAO:ssa tai voidaan kapseloida itse erilaistuneet solut.

Solujen valinta riippuu myös aiotusta käytöstä. BAO:n sisällä olevat solut voidaan valita neurotransmitterin erityksen perusteella. Mainitunlaisiin neurotransmittereihin kuuluvat dopamiini, gamma-aminovoihappo (GABA),

serotoniini, asetyylikoliini, noradrenaliini, epinefriini, glutamiinihappo ja muut peptidineurotransmitterit. Voidaan käyttää myös soluja, jotka syntetisoivat ja erittävät neurotransmitterien aktiivisia agonisteja, analogeja, johdannaisia tai fragmentteja, mukaan luettuina esimerkiksi solut, jotka erittävät bromokriptiiniä, yhtä dopamiiniagonistia, ja solut, jotka erittävät L-dopaa, yhtä dopamiinin esiastetta.

Solut voidaan valita sen perusteella, että ne erittävät hormoneja, sytokiineja, kasvutekijöitä, ravitsemustekijöitä, angiogeneesitekijöitä, vasta-aineita, veren hyytymistekijöitä, lymfokiineja, entsyymejä ja muita terapeuttisia aineita tai niiden agonisteja, esiasteita, aktiivisia analogeja tai aktiivisia fragmentteja. Niihin kuuluvat enkefaliinit, katekoliamiinit, endorfiinit, dynorfiini, insuliini, tekijä VIII, erytropoietiini, substanssi P, hermokasvutekijä (NGF), gliasolulinjaperäinen neurotrofinen tekijä (GDNF), verihiutaleperäinen kasvutekijä (PDGF), epidermaalinen kasvutekijä (EGF), aivoperäinen neurotrofinen tekijä (BDNF), neurotrofiini-3 (NT-3), neurotrofiini-4/5, GDF/LIF, bFGF, aFGF, joukko muita fibroblastikasvutekijöitä, siliaarinen neurotrofinen tekijä (CDNF) ja interleukiinit.

Edellä esitetyn perusteella tulisi ymmärtää, että tämän keksinnön mukaisissa menetelmissä käyttökelpoiseihin soluihin kuuluu transformoimattomia soluja, jotka erittävät yhtä tai useampaa haluttua biologisesti aktiivista molekyyliä, tai soluja, jotka voidaan transformoida tekemään niin.

Lukuisia biologisesti aktiivisia molekyyliä koodittavat geenit on kloonattuja ja niiden nukleotidisekvenssit julkaistu. Monia näistä geeneistä on saatavana yleisesti tallennuslaitoksista, kuten American Type Culture Collectionista (ATCC), tai erilaisista kaupallisista lähteistä. Tämän keksinnön yhteydessä käyttökelpoi-

sia biologisesti aktiivisia molekyylejä koodittavia geenejä voidaan saada aikaan käyttämällä tavanomaisia yhdistelmä-DNA-menetelmiä, kuten PCR-monistusta ja genomi- ja cDNA-kirjastojen seulomista mistä tahansa julkaistuista sekvensseistä johdetuilla oligonukleotidikoettimilla. Mitä tahansa tunnettua geeniä, joka koodittaa biologisesti aktiivisia molekyylejä, voidaan käyttää tämän keksinnön mukaisissa menetelmissä. Katso esimerkiksi US-patenttijulkaisu 5 049 493; Gage et al., US-patenttijulkaisu 5 082 670 ja US-patenttijulkaisu 5 167 762.

Kiinnostuksen kohteena oleva geeni (esimerkiksi sopivaa biologisesti aktiivista molekyyliä koodittava geeni) voidaan insertoida sopivan ilmentymisvektorin kloonaukseen käyttämällä tavanomaisia menetelmiä. Nämä menetelmät ovat ammattimiesten hyvin tuntemia.

Kiinnostuksen kohteena olevan geenin sisältämää ilmentymisvektoria voidaan sitten käyttää sen solulinjan transfektointiin, jota on määrä käyttää tämän keksinnön mukaisissa menetelmissä. Voidaan käyttää tavanomaisia transfektointimenetelmiä, kuten kalsiumfosfaattikerasaostusta, DEAE-dekstraanitransfektiota, lipidivälitteisiä menetelmiä tai elektroporaatiota.

Tässä tarjotaan käyttöön menetelmiä jakautuvien solujen kasvun säätelemiseksi, joiden avulla voidaan säädellä proliferaation ja erilaistumisen välistä tasapainoa, niin että saadaan aikaan BAO:hon kapseloitujen erilaistuneiden, jakautumattomien solujen varasto. Käyttöön tarjotaan myös menetelmiä sekä jakautuvien että jakautumattomien solujen kasvun säätelemiseksi, joiden avulla säädellään solujen jakautumista ja lukumäärää BAO:ssa, mikä johtaa nekroottisten soluytimien vähentyneeseen muodostumiseen ja vähentyneeseen solujätteeseen.

Proliferaation ja erilaistumisen geenitekkinen säätely

Tässä tarjotaan käyttöön menetelmiä ja koostumuksia solujen kasvun säätelemiseksi muuttamalla geneettisesti soluja geenillä, joka koodittaa solujen proliferaatioon tai erilaistumiseen vaikuttavaa tuotetta.

Tämän keksinnön yhden puolen mukaisesti käytetään immortalisoituja solulinjoja kasvun säätelyn saavuttamiseksi BAO:ssa. Primaarisolut transformoidaan geenillä, joka koodittaa proliferaatiota edistävää tuotetta. Proliferaatiota edistävä geeni kytketään toiminnallisesti säädeltävissä olevaan promoottoriin. Menetelmiä, joita kuvaavat Land et al. [Nature 304 (1983) 596 - 602] tai Cepko [Neuron 1 (1988) 345 - 353] immortalisoitujen solujen tuottamisen suhteen, voidaan rutiininomaisesti muuntaa siten, että tuloksena on ehdollisesti immortalisoituja soluja.

Tämän menetelmän mukaisesti solujen proliferaatiota (ts. mitoosia) voidaan inhiboida tai se voidaan pysäyttää proliferaationedistysgeenin, kuten onkogeenin (esimerkiksi c-myc, v-mos, v-Ha-ras, SV40 T-antigeeni, adenovirusperäinen El-A), vähennetyn ilmentymisen kautta. Onkogeenin vähentynyt ilmentyminen saavutetaan onkogeenin ilmentymistä ohjaavan promoottorin "säätämällä alaspäin", repressiol- la tai inaktivoinnilla, kun BAO istutetaan in vivo isäntään. Säädettävissä olevan promoottorin "säätäminen ylöspäin", aktivointi tai derepressio in vitro johtaa proliferaatiota edistävän geenin ilmentymiseen ja mahdollistaa siten proliferaation in vitro. Sopivia promoottoreja ovat sellaiset, joita voidaan säätää alaspäin in vivo, mukaan luettuina esimerkiksi glykokortikoideihin reagoivat promoottorit, kuten PNMT [Hammang et al., Neuroprotocols 3 (1993) 176 - 183] ja interferoniin ("IFN") reagoivat promoottorit, kuten Mx1 [Hug et al., Mol. Cell. Biol. 8 (1988) 3065 - 3079; Arnheiter et al., Cell 52 (1990) 51 -

61], retrovirusten pitkän terminaalisen toistojakson promoottorit, tetrasykliiniin reagoivat promoottorit, esimerkiksi lac-promoottori ja insuliiniin reagoivat promoottorit. Katso myös McDonnell et al., WO 93/23431. Ymmärrettäneen, että promoottorin valinta riippuu aiotusta istutuskohdasta. Niinpä esimerkiksi glukokortikoideihin tai IFN:iin reagoivat promoottorit ovat käyttökelpoisia tehtäessä istutus aivoihin tämän keksinnön mukaisesti, sillä glukokortikoidi- ja/tai IFN-pitoisuudet ovat hyvin pieniä aivoissa. Siten näiden promoottorien ei odotettaisi ohjaavan onkogeenin merkittävää ilmentymistä, kun BAO on istutettu aivoihin.

Yhdessä suoritusmuodossa muodostetaan ehdollisesti immortalisoituja soluja kytkemällä toiminnallisesti onkogeeni säädeltävissä olevaan promoottoriin. Promoottori aktivoituu tai säätyy ylöspäin sitoutumisproteiinin läsnä ollessa. Sitoutumisproteiinin tuotantoa voidaan säädellä kytkemällä sitoutumisproteiinia koodittava geeni toiminnallisesti tetrasykliiniin reagoivaan promoottoriin.

Yhden suoritusmuodon ajatuksena on esimerkiksi transformoitu solu, joka sisältää konstitutiivisen promoottorin, joka ohjaa tet-repressorin ilmentymistä. Solu sisältää lisäksi heterologisen geenin kytkettynä toiminnallisesti CMV-IE-promoottoriin. Jos CMV-IE-promoottorin vieressä on tet-operaattorisekvenssejä, voidaan tästä promoottorista käsin tapahtuva ilmentyminen pysäyttää tetrepressorilla. Kun tet on läsnä, transkriptio tapahtuu, koska tet sitoutuu tet-repressorin ja antaa muille transkriptiotekijöille mahdollisuuden sitoutua CMV-IE-promoottoriin. Tämän suoritusmuodon mukaisesti onkogeeni ilmentyy ainoastaan tetrasykliinin läsnä ollessa. Niinpä solut voidaan saattaa proliferoitumaan *in vitro* tetrasykliinin läsnä ollessa.

Muutamia päivä ennen istutusta tetrasykliini voidaan poistaa siirtogeenin ilmentymisen vähentämiseksi ja

siten vastaavasti solujen proliferaation vähentämiseksi tai pysäyttämiseksi BAO:ssa.

Yhdessä erityissuoritusmuodossa, jossa käytetään ehdollisesti immortalisoituja soluja, kasvun säätely sää-
 5 vutetaan käyttämällä Mx1-promoottoria. Mx1-geeni koodittaa proteiinia, joka antaa resistenssin influenssa A ja B -vi-
 ruksille. Mx1-geeni on promoottorinsa tiukasti säätelemä. Geeni ei ilmenny interferonin ("IFN") poissa ollessa ja on indusoitavissa IFN α :n ja IFN β :n läsnä ollessa. Arnheiter
 10 et al., Cell 52 (1990) 51 - 61, ovat kuvanneet Mx1-siirto-
 geenisen hiiren aikaansaantia, jolla esiintyi interfero-
 nilla indusoitavissa olevaa siirtogeenin ilmentymistä muu-
 tamissa kudoksissa. SV40:n suuri T-antigeeni pystyy trans-
 formoimaan ja immortalisoimaan soluja, jotka ovat peräisin
 15 joukosta kudoksia.

Yhdessä suoritusmuodossa voidaan fuusioda hiiren Mx1-promoottori SV40:n varhaisen alueen kanssa ja käyttää tätä kimeeristä geeniä siirtogeenisen hiiren aikaansaantiin. Mx1-promoottorielementtien tarjoama tiukka säätely
 20 antaa mahdollisuuden säädellä onkogeenin ilmentymistä kudoksissa tai siirtogeenisistä eläimistä valmistetuissa soluviljelmissä ja muodostaa siten ehdollisesti immortalisoituja solulinjoja.

Tällä tavalla tuotettuja solulinjoja voidaan IFN α :n
 25 tai IFN β :n läsnä ollessa lisätä aritmeettisesti samoin kuin useimpia muita solulinjoja. Solujen jakautuminen voidaan pysäyttää poistamalla IFN α tai IFN β joko ennen kapselointia tai sen jälkeen. Yhdessä edullisessa suoritusmuodossa voidaan valmistaa kantahermosoluja (neurospheres)
 30 siirtogeenisistä hiiristä, jotka sisältävät Mx1-SV40-T-antigeenikonstruktion, käyttämällä Weissin menetelmää (PCT/CA 92/00283). Siten saatu ehdollisesti immortalisoitu kantahermosolulinja voidaan sitten kapseloida ja istuttaa *in vivo* isäntään.

Tätä ehdollisesti immortalisoitua kantahermosolu-
linjaa voidaan haluttaessa lisäksi muuntaa tavanomaisin
menetelmin edelleen geneettisesti vapauttamaan mitä tahan-
sa joukosta kasvutekijöitä tai neurotransmitterimolekyyli-
5 jä. Muutkin IFN:iin reagoivat promoottorit saattavat olla
käyttökelpoisia tässä suoritusmuodossa. Näihin promootto-
reihin kuuluvat metallitioneiini, H-2K^b, H-2D^d, H-2L^d, HLA-
A3, HLA-DR α , HLA-ryhmän I geenin, 202, 56K, 6-16, IP-10,
ISG15, ISG54 ja 2',5'-oligo(A)-syntetaasi. Katso Hug et
10 al., Mol. Cell. Biol. 8 (1988) 3065 - 3079.

Tämä suoritusmuoto soveltuu erityisesti soluille,
jotka on määrää kapseloida BAO:ihin istutettaviksi aivoi-
hin. Aivoverenkierrossa olevat IFN α - ja IFN β -pitoisuudet
ovat riittävän alhaisia, jotta MX1-promoottorin ohjaama
15 transkriptioaktiivisuus on riittämätön johtamaan solujen
proliferaatioon. Lähtökohtana olevissa siirtogeenisissä
eläimissä T-antigeenin ilmentyminen oli indusoitavissa
muutamissa kudoksissa, mutta tämän onkogeenin luonnollista
ilmentymistä havaittiin vain kateenkorvassa. Onkogeenin
20 ilmentyminen kateenkorvassa on kuitenkin suhteellisen
yleinen ilmiö siirtogeenisissä eläimissä, joissa ilmentyy
varhainen SV40-alue. Niinpä solut voidaan onkogeenin mer-
kittävän ilmentymisen poissa ollessa pitää lähes lepoti-
lassa *in vivo*.

Yhdessä toisessa suoritusmuodossa hyödynnetään sitä
havaintoa, että perinteisessä retrovirusinfektiointimen-
telmässä solujen käsittelemiseksi geeniteknisesti *in vivo*
-käyttöä varten käytetään retroviruspromoottoreja, esimer-
kiksi pitkän terminaalisen toistojakson ("LTR", long
30 terminal repeat) promoottoria. Katso esimerkiksi Gage et
al., US-patenttijulkaisu 5 082 670. Näiden promoottorien
ohjaamien geenien ilmentyminen on tyypillisesti heikennet-
tyä *in vivo*. Ajatellaan, että tämän heikentymisen välittä-
jinä ovat verenkierrossa olevat sytokiinit. Tässä keksin-
35 nössä hyödynnetään tätä normaalisti vahingollista retrovi-

rusgeenien säätymistä alaspäin solujen proliferaation pysäyttämiseksi tai vähentämiseksi, kun solut kapseloidaan BAO:hon ja istutetaan *in vivo*. Tässä tapauksessa immortalisoivan geenin (onkogeenin) ohjaus tapahtuu LTR:stä käsin. Tämä geeni "immortalisoi" solut, kun niitä ylläpidetään ja lisätään *in vitro*. Istutuksen jälkeen, sytokiinien läsnä ollessa, "immortalisoivan" onkogeenin toiminta heikkenee, proliferaatio vähenee tai pysähtyy, ja solut voivat mennä lepotilaan väliseessä.

Tämän suoritusmuodon mukaisesti voidaan ehdollisesti immortalisoituja soluja tuottaa retrovirusinfektioinnilla tai DNA-transfektiolla käyttämällä cDNA:ta, joka sisältää onkogeenin (esimerkiksi c-myc, v-mos, v-Ha-ras, SV40:n T-antigeeni, adenovirusperäinen El-A) kytkettynä toiminnallisesti retroviruspromoottoriin, esimerkiksi LTR-promoottoriin. Parhaina pidämme Moloney-hiirileukemiaviruksen (MLV), Rous-sarkoomaviruksen (RSV) ja hiiren rintasyöpäviruksen (MMTV) promoottorisekvenssejä.

Onkogeeni ilmentyy normaalisti näissä transformoiduissa soluissa *in vitro*. Menestyksellisesti transformoituja soluja kasvatetaan viljelmässä käyttämällä vakiintuneita viljelymenetelmiä. LTR-siirtogeenin ilmentymistä voidaan sitmuloida lisäämällä deksametasonia tai epidermaalista kasvutekijää transformoitujen solujen viljelyyn tarvittavan ajan lyhentämiseksi. Saattamalla solut alttiiksi sytokiineille, esimerkiksi gamma-interferonilla (IFN- γ), TNF- α :lle ja transformoivalle kasvutekijä- β :lle (TGF β), edullisesti muutamia päiviä ennen kapselointia ja istutusta, voidaan mitoosia vähentää estämällä LTR:n ohjaamaa siirtogeenin ilmentymistä. Katso Schinstine ja Gage, Molecular and Cellular Approaches to the Treatment of Neurological Disease, toim. S. G. Waxman 1993, s. 71; Selinger et al., J. Immunol. 141 (1988) 2138 - 2144; Selinger et al., J. Virology 61 (1987) 2567 - 2572; Selinger et al., J. Virology 62 (1988) 619 - 621.

Mikä tahansa sopiva solu voidaan immortalisoida ehdollisesti edellä kuvatuin menetelmin. Ammattimies pysyy määrittämään jonkin määrätyn solutyypin soveltuvuuden ehdolliseen immortalisointiin alalla hyvin tunnetuin tutkimusmenetelmin, mukaan luettuina tässä esitettävät menetelmät.

Tässä tarjotaan käyttöön menetelmiä immortalisoitujen solulinjojen tai muiden jatkuvasti proliferoituvien solujen kasvun säätelemiseksi transformoimalla nämä solut sisältämään kasvainsuppressorigeenejä, esimerkiksi p53-geenin tai RB-geenin, niin että proliferaatio pysähtyy tai vähenee. Kasvainsuppressorigeenien eli antionkogeenien otaksutaan olevan kasvua rajoittavia geenejä. Katso esimerkiksi Weinberg, Neuron 11 (1993) 191 - 196. Esimerkiksi villiä tyyppiä oleva P53-aktivoitu fragmentti 1 (WAF1) voi hillitä kasvainsolujen kasvua viljelmässä. Teorian on, että p53-proteiinin indusoimat geenit saattavat välittää sen biologisen tehtävän kasvainsuppressorina. Katso El-Deiry et al., Cell 75 (1993) 817 - 825. WAF1-geeniä kutsutaan myös CIP1-geeniksi. Muihin P53-välitteisiin kasvua vähentäviin geeneihin kuuluvat GADD45 ja GADD153 (eli CHOP). Katso Ron, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 1985 - 1986. Tässä yhteydessä voidaan käyttää edellä käsiteltyjä tavanomaisia menetelmiä solujen transformoimiseksi heterologisella DNA:lla.

Yhden suoritusmuodon mukaisesti immortalisoituja soluja tai jatkuvasti proliferoituvia soluja transformoidaan kasvainsuppressorigeenillä, joka on toiminnallisesti kytketty säädeltävissä olevaan promoottoriin. Sopivan säädeltävissä tai indusoitavissa olevan promoottorin käyttö mahdollistaa siirtogeenin ilmentymisen säätämisen alaspäin tai "kytkemisen pois päältä", kun transformoituja soluja viljellään *in vitro*, ja siten solujen lisäämisen. Kapseloinnin ja istutuksen jälkeen promoottori "indusoidaan" tai sitä säädetään ylöspäin, ja tapahtuu kasvainsuppresso-

rigeenin ilmentyminen, mikä johtaa solujen proliferaation vähentymiseen tai pysähtymiseen.

5 Tyroosiinihydroksylaasi- ja erytropoietiinipromoottorit saattavat olla käyttökelpoisia keksinnön tämän puolen yhteydessä. Nämä promoottorit "säätävät alaspäin" tyyppillisesti runsashappisissa olosuhteissa, kuten olosuhteissa, joita esiintyy *in vitro*, mutta "säätävät ylöspäin" vähähappisissa olosuhteissa, kuten olosuhteissa, joihin solut joutuvat BAO:hon kapseloinnin ja isäntään istuttamisen jälkeen.

10 Lisäksi voidaan käyttää sopivia kytkettyjä tai de-repressiokykyisiä promoottorijärjestelmiä proliferaatio-suppressorigeenin toivotun säätelyn aikaansaamiseksi. Yhdessä sopivassa järjestelmässä käytetään esimerkiksi AP1-promoottoria ja lac-operaattori-PGK1-promoottorijärjestelmää, jota kuvaavat Hannan et al. [Gene 130 (1993) 233 - 239]. AP1-promoottori kytketään toiminnallisesti lac-repressorigeeniin. lacO (lac-operaattori) ja 3-fosfoglyseeraattikinaasi (PGK1) -promoottori kytketään toiminnallisesti proliferaatiosuppressorigeeniin. Eksogeenisen forbolierin lisääminen *in vitro* indusoi AP1-promoottorin, mikä johtaa lac-repressoriproteiinien ilmentymiseen. Repressoriproteiinin läsnä ollessa lacO-PGK1-promoottorikon-

15 struktio repressoituu eikä proliferaatiosuppressorigeenin ilmentymistä tapahdu. Forbolierin poissa ollessa *in vivo* repressoriproteiinia ei ilmennyt, lacO-PGK1-promoottori derepressoituu ja proliferaatiosuppressorigeeni ilmentyy.

20 Yhden menetelmän mukaisesti transformoidaan sopiva solu erilaistumisen indusoivaa tuotetta koodittavalla geenillä. Tämä erilaistumisen indusoiva geeni kytketään toiminnallisesti säädeltävissä olevaan promoottoriin. Tämän menetelmän mukaisesti erilaistumisen indusoiva geeni ilmentyisi kapseloinnin ja elävään isäntään istuttamisen jälkeen. Ilmentyminen voidaan pysäyttää tai inhiboida kui-

30

35

tenkin *in vitro* säädeltävissä olevan promoottorin asianmu-
 kaisella säätämisellä alaspäin, repressiolla tai inakti-
 voinnilla ja mahdollistaa siten halutun solun tai solulin-
 jan lisääminen *in vitro*. Tätä menetelmää voidaan käyttää
 5 jakautuvien solujen tai immortalisoitujen primaarisolujen
 yhteydessä. HMG-geeni (high mobility group chromosomal
 protein 14 -geeni) on yksi esimerkki solujen erilaistumi-
 sen säätelyyn osallistuvista geeneistä. Mitä tahansa sopi-
 vaa promoottoria, joka säätyy ylöspäin *in vivo* mutta on
 10 "kytkettävissä pois päältä" tai säädettävissä alaspäin *in*
vitro, voidaan käyttää tässä suoritusmuodossa, kuten on
 käsitelty edellä proliferaationpysäytysgeenien käytön yh-
 teydessä. Lisäksi voidaan käyttää mitä tahana sopivaa de-
 repressiokykyistä promoottorijärjestelmää, kuten on käsi-
 15 telty *supra*, kasvainsuppressorigeenin ilmentymisen sääte-
 lyyn.

Yhdessä toisessa menetelmässä kasvun säatelemiseksi
 käytetään antisense-RNA:ta tai -DNA:ta tai niiden johdan-
 naisia. Antisense-RNA tai -DNA on yksisäikeinen nukleiini-
 20 happo, joka on komplementaarinen geenin koodittavalle säi-
 keelle tai kyseisen geenin transkriptiossa syntyneelle
 "koodittavalle" mRNA:lle. Jos solussa on läsnä antisense-
 RNA:ta samanaikaisesti mRNA:n kanssa, antisense-RNA hybri-
 disoituu mRNA:han, jolloin muodostuu kaksoissäie, jota
 25 ribosomit eivät pysty lukemaan proteiinin valmistamiseksi.
 Antisense-RNA:ta voidaan viedä soluhin joko mikroinjekti-
 olla tai lisäämällä suuri määrä kasvualustaa. Tämän kek-
 sinnön mukainen edullinen menetelmä on kohdesolujen
 transfektointi eukaryoottisilla ilmentymisvektoreilla.
 30 Katso Neckers et al., Antisense Technology: Biological
 Utility And Practical Considerations, Am. J. Physiol. 265
 (Lung Cell. Mol. Physiol. 9) (1993) L1 - L2.

Tämän suoritusmuodon mukaisesti antisense-geeni,
 joka koodittaa joko proliferaation indusoivaa geeniä tai
 35 kasvainsuppressorigeeniä vastaavaa antisense-RNA:ta, voi-

daan toiminnallisesti kytkeä indusoitavissa olevaan promoottoriin. Kun promoottori indusoidaan, syntyy antisense-RNA:ta. Jos transformoidut solut sisältävät proliferaation indusoivan geenin, antisense-RNA:n tulisi tuotanto tämän suoritusmuodon mukaisesti pysäytetyksi tai säädettyksi alaspäin *in vitro*, jolloin solujen lisääntyminen mahdollistuu, ja säädettyksi ylöspäin *in vivo*, jolloin saavutetaan proliferaation pysähtyminen tai heikkeneminen.

Vaihtoehtoisesti, jos transformoidut solut sisältävät kasvainsuppressorigeenin, antisense-RNA:n tuotanto tulisi säädettyksi ylöspäin *in vitro* ja alaspäin *in vivo*, niin että saavutetaan toivottu kasvun säätely.

Antisense-tekniikkaa voitaisiin lisäksi käyttää minkä tahansa antisense-geenin konstruoimiseksi geenille, joka koodittaa proliferaatiolle tai erilaistumiselle välttämätöntä tuotetta. Antisense-geenin ilmentymisen sopiva indusointi antaisi ammattimiehelle mahdollisuuden saavuttaa tämän keksinnön mukaisten kapseloitujen solujen toivottu kasvun säätely.

On edullista käyttää säädeltävissä olevaa promoottori-geenikonstruktiota, jota voidaan manipuloida *in vivo* siinä tapauksessa, että käy välttämättömäksi tai toivottavaksi indusoida solujen lisäproliferaatio *in vivo*. Esimerkiksi Mx1/SV40-konstruktiossa, jota on käsitelty edellä, voidaan lisätä IFN:a paikallisesti tai systeemisesti onkogeenin ilmentymisen indusoimiseksi. Solujen jakautumisen lisääntyminen *in vivo* BAO:ssa voi olla toivottavaa solujen lukumäärän lisäämiseksi, niin että korvataan BAO:ssa kuolleita soluja tai saavutetaan halutun biologisesti aktiivisen molekyylin suurempi tuotanto BAO:ssa.

Kasvun ja erilaistumisen säätely käyttämällä kemiallisia yhdisteitä

Noudatettaessa yhtä toista tämän keksinnön mukaista menetelmää soluille voidaan tehdä käsittely, joka inhiboi proliferaatiota tai indusoi erilaistumisen. Joissakin me-

netelmissä tämä käsittely käsittää kemiallisen yhdisteen tai kasvutekijän käytön. Joissakin muissa menetelmissä käsittely käsittää kemiallisen yhdisteen tai kasvutekijän poistamisen kasvualustasta. Käsittely voi tapahtua ennen

5 BAO:hon kapselointia tai sen jälkeen, edullisesti ennen kapselointia.

Käytettävä proteiini tai kemiallinen yhdiste riippuu solutyypistä ja toivotusta vaikutuksesta. Ammattimies pystyisi tutkimaan jonkin määrätyn solutyypin reagoivuuden

10 valittuun yhdisteeseen tai proteiiniin käyttämällä rutii-nimenetelmiä.

Yhdessä menetelmässä solujakautumaa säädellään käsittelyllä, joka käsittää proliferaation indusoivan kemiallisen yhdisteen tai kasvutekijän poistamisen solun kasvualustasta. Yhdessä suoritusmuodossa voidaan käyttää kasvutekijöitä, kuten epidermaalista kasvutekijää ("EGF"), transformoivaa kasvutekijää α ("TGF- α "), amfireguliinia tai mitä tahansa muuta sopivaa ainetta kanta- tai emosolujen proliferaation indusointiin, mukaan luettuina alkion

15 sympateettisista ganglioista ja immortalisoiduista emosoluista, edullisesti kantahermosoluista (Weiss, PCT/CA 92/00 283), peräisin olevat solut. Tämä mahdollistaa esiastehermosolubaraston ylläpitämisen ja lisäämisen in vitro. Ollessaan kapseloituina näiden proliferaation indusoivien kasvutekijöiden poissa ollessa esiastehermosolut lakkaavat jakautumasta ja erilaistuvat.

20

Esiastehermosolut voidaan lisäksi indusoida erilaistumaan käsittelemällä esimerkiksi forboliesterillä tai kasvattamalla kiinteällä substraatilla, mukaan luettuina

25 ionisesti varautuneet pinnat, kuten poly-L-lysiini ja poly-L-ornitiini yms. Erilaistuminen voidaan indusoida myös käsittelemällä FGF-ryhmän jollakin jäsenellä yhdistettynä vähintään yhteen tekijään, joka kuuluu joko siliaaristen neurotrofisten tekijöiden (CNTF) tai hermokasvutekijöiden (NGF) ryhmään, kuten kuvaavat Ip et al. (WO 94/03199).

30

35

Yhdessä toisessa suoritussuorituksessa voidaan käyttää stroomassa syntyvää monilinjakasvutekijää, josta käytetään myös nimityksiä "syöttösolukasvutekijä", "kantasolukasvutekijä", "c-kit-ligandi" tai "Steel-tekijä", hematopoieettisten kantasolujen proliferaation indusointiin. Jakautuvien solujen varaston ylläpitämiseksi *in vitro* hematopoieettisia soluja viljellään syöttösolukasvutekijän läsnä ollessa. Proliferaation pysäyttämiseksi tai vähentämiseksi syöttösolukasvutekijä poistetaan kasvualustasta. Tämä voidaan tehdä ennen kapselointia tai sen jälkeen, edullisesti ennen kapselointia.

Esimerkkeihin muista monilinjakasvutekijöistä, jotka edistävät proliferaatiota, kuuluvat interleukiini-3 ja granulositytti-makrofagipesäkkeitä stimuloiva tekijä. Syöttösolukasvutekijä voi vaikuttaa solujen kasvuun myös yhdessä muiden monilinjakasvutekijöiden tai linjaspesifisten kasvutekijöiden, esimerkiksi erytropoietiinin, kanssa. Syöttösolukasvutekijän ajatellaan toimivan synergistisesti esimerkiksi IL-3:n kanssa voimakkaasti rikastuneiden hiiren hematopoieettisten kantasolujen proliferaation ja erilaistumisen indusoinnissa. Katso Galli et al., The Biology of Stem Cell Factor, a New Hematopoietic Growth Factor Involved in Stem Cell Regulation, Int. J. Clin. Lab. Res. 23 (1993) 70 - 77.

Yhdessä toisessa tämän keksinnön mukaisessa menetelmässä voidaan saavuttaa solujakautuman säätely BAO:ssa käyttämällä kemiallista yhdistettä tai kasvutekijää, joka inhiboi solujen proliferaatiota tai indusoi erilaistumisen. Mitä tahansa sopivaa proliferaatiota inhiboivaa tai erilaistumisen indusoivaa yhdistettä voidaan käyttää tämän menetelmän mukaisesti.

Ymmärrettäneen, että erilaiset solutyypit voivat reagoida eri tavalla erilaisiin kemiallisiin yhdisteisiin. Ammattimies pystyy rutiininomaisesti tutkimaan jonkin määrätyn yhdisteen, niin että saadaan määritetyksi sen vaiku-

tusteho jonkin määrätyn solutyypin proliferaatioon tai erilaistumiseen.

Yhdessä suoritusmuodossa voidaan käyttää sytokiine-
 jä, esimerkiksi transformoiva kasvutekijä $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) mu-
 5 kaan luettuna, solujen proliferaation pysäyttämiseen tai
 inhibointiin tai solujen erilaistumisen indusointiin. Esi-
 merkiksi BHK-solujen alentunut proliferaatio ja tehostunut
 erilaistuminen voidaan saavuttaa saattamalla solut TGF $\beta 1$:n
 ja askorbaatin vaikutuksen alaisiksi. TGF $\beta 1$:ä voidaan vas-
 10 taavasti käyttää fibroblastisolujen erilaistumisen indu-
 sointiin ja myös keratinosyyttien ja endoteelisolujen kas-
 vun inhiboijana. Katso Phillips et al., Ascorbic Acid and
 Transforming Growth Factor- $\beta 1$ Increase Collagen Biosynt-
 hesis via Different Mechanisms: Coordinate Regulation of
 15 Pro $\alpha 1$ (I) and Pro $\alpha 1$ (III) Collagens, Archives of Biochemis-
 try and Biophysics 295 (1992) 397 - 403.

Yhdessä toisessa suoritusmuodossa voidaan käyttää
 TGF $\beta 1$:ä, serotoniinia tai FGF:ää neuroendokriinisolujen
 kasvun säätelyyn. Neuroendokriinisolujen kasvua voivat
 20 säädellä niiden omat tuotteet autokriinisesti. TGF $\beta 1$ on
 autokriininen kasvua inhiboiva tekijä ihmisen haimakarsi-
 noidisolujen (BON) ollessa kyseessä, kun taas FGF ja sero-
 tiniini ovat autokriinisiä kasvua stimuloivia tekijöitä.
 TGF $\beta 1$:n BON-solujen kasvia inhiboiva vaikutus voidaan ku-
 25 mota lisäämällä serotoniinia. Katso Townsend Jr. et al.,
 Studies of Growth Regulation in a Neuroendocrine Cell
 Line, Acta Oncologica 32 (1993) 125 - 130.

Erilaisia muitakin kemikaaleja voidaan käyttää tä-
 män keksinnön mukaisissa menetelmissä solujen proliferaa-
 30 tion pysäyttämiseen tai inhibointiin tai erilaistumisen
 indusointiin. Näihin kemikaaleihin kuuluvat mitomysiini C,
 5-bromideoksiuridiini (NrdU), prostaglandiini E₁ (PGE₁),
 dibutyryyli-cAMP, 1- β -D-arabinoofuranosyyllisytyosiini (Ara-
 C), nikotiiniamidi ja hepariini. Mitomysiini voi olla eri-
 35 tyisen sopiva kapseloitujen BHC-solulinjojen proliferaa-

tion säätelyyn. Katso esimerkiksi Radvanyi et al., Mol. Cell. Biol. 13 (1993) 4223 - 4227.

Joskus voidaan käyttää kemikaaliyhdistelmää. Ihmisen neuroblastoomasolut IMR-32 voidaan indusoida erilais-
 5 tumaan *in vitro* käsittelemällä mitomysiini C:llä ja BrdU:lla tai PGE₁:llä ja dinbutyryyli-cAMP:llä (dbcAMP). Katso Gash et al., Amitotic Neuroblastoma Cells Used for Neural Implants in Monkeys, Science 233 (1986) 1420 - 1422. Ihmisen alkion rhabdomyosarkoomasolulinjan sarjaesi-
 10 käsittely Ara-C:llä johtaa merkittävään kasvun inhibitioon *in vitro*, tumorigeenisyyden menetykseen *in vivo* ja erilaistuneempaan fenotyyppiin jopa yhdisteen poiston jälke-
 15 en. Katso Crouch et al., Ara-C Treatment Leads to Differentiation and Reverses the Transformed Phenotype in a Human Rhabdomyosarcoma Cell Line, Experimental Cell Research 204 (1993) 210 - 216. Nikotiiniamidin (NIC) aja-
 tellaan indusoivan ihmisen sikiön haiman saarekesolujen erilaistumisen ja kypsymisen. Katso Otonkoski et al., Ni-
 20 cotinamide Is a Potent Inducer of Endocrine Differentiation in Cultured Human Fetal Pancreatic Cells, J. Clin. Invest. 92 (1993) 1459 - 1466.

On myös raportoitu, että dbcAMP:n lisääminen vai-
 25 kuttaa kehittyvien kudosten erilaistumiseen. Ajatellaan esimerkiksi, että dbcAMP moduloi astrosyyttien esiasteiden erilaistumista, indusoi neuriittien muodostumisen PC12-
 soluissa ja stimuloi Schwann-solujen proliferaatiota. Katso Baron-Van Evercooren et al., Schwann Cell Differentiation *in vitro*: Extracellular Matrix Deposition and Inter-
 30 action, Dev. Neurosci. 8 (1986) 182 - 196. Schwann-solujen erilaistuminen voidaan vastaavasti indusoida saattamalla ne askorbaatin vaikutuksen alaisiksi (*ibid.*).

Lisäksi voidaan käyttää sialoglykopeptidiä ("SGP")
 35 solujen proliferaation inhibointiin tai pysäyttämiseen. Esimerkiksi naudan intakteista aivokuorisoluista eristetty 18 kDa:n solupintasialoglykopeptidi pysäytti eksponentiaa-

lisesti kasvavien Swiss 2T3 -solujen proliferaation. Katso esimerkiksi Toole-Simms et al., Jour. Cell. Physiol. 147 (1991) 292 - 297; Fattaey et al., Exp. Cell. Res. 194 (1991) 62 - 68. Lukuisten transformoitujen ja transformoimattomien solutyyppeiden on osoitettu oleva herkkiä joillekin SGP:ille. Näihin soluihin kuuluu monista erilaisista selkärangkaisiin ja selkärangattomiin kuuluvista lajeista peräisin olevia epiteelimäisiä ja fibroblastisoluja. Katso esimerkiksi Fattaey et al., Jour. Cell. Physiol. 139 (1989) 269 - 274, joka mainitaan tässä viitteenä.

Ymmärrettäneen, että joillakin edellä mainituista käsittelyistä saattaa olla vain tilapäinen vaikutus proliferaatioon ja erilaistumiseen. Mainitunlaisissa tapauksissa saattaa olla toivottavaa saada aikaan jatkuvasti täydennettävä yhdisteen tai kasvutekijän syöttö kapseloituun soluun tämän ollessa osutettuna isäntään *in vivo*.

Tämä voidaan toteuttaa käyttämällä biologisesti kulu-
luvasta polymeeristä valmistettua kasvutekijä- tai yhdis-
telähdettä, joka on muu kuin solu, kapseloimalla mukaan
kasvutekijän tai yhdisteen solulähde tai millä tahansa
muulla sopivalla keinolla. Katso esimerkiksi US-patentti-
julkaisut 5 106 627 ja 5 156 844.

Kasvun säätely säteilytyksellä

Solujen proliferaatiota voidaan säädellä myös saat-
tamalla solut alttiiksi sopivalle säteilyannokselle, esi-
merkiksi röntgensäteille, ultravioletti (UV) -säteilylle
yms. Kun soluja säteilytetään, niin eteneminen solusyklin
läpi saattaa pysähtyä. Kriittinen annosteho tai minimian-
nosteho voidaan määrittää valitulle solutyypille käyttä-
mällä alalla tunnettuja menetelmiä. Katso esimerkiksi
Stanley ja Lee, Radiat. Res. 133 (1993) 163 - 169;
Mitchell et al., Radiat. Res. 79 (1979) 537 - 551. Esimer-
kiksi ihmisen normaaleissa epidermaalisissa keratinosyy-
teissä, joita säteilytettiin käyttämällä 5 ja 10 mJ/cm²
ultravioletti B (UVB) -säteilyä, tapahtui merkittävä (jopa

78 %) proliferaation väheneminen 3 - 5 vuorokauden kuluttua säteilytyksestä. Katso Prystowsky et al., J. Invest. Dermatol. 101 (1993) 54 - 58. Yi et al. [Radiation Research 133 (1993) 163 - 169] tarjoavat käyttöön menetelmän
 5 pienimmän annostuksen laskemiseksi, joka tarvitaan solujen proliferaation pysäyttämiseksi röntgensäteilyllä.

Kasvun ja erilaistumisen säätely käyttämällä solun ulkopuolisia matriksimolekyylejä

Tässä tarjotaan käyttöön menetelmiä BAO:ssa vallitsevan solujakautuman säatelemiseksi muuntamalla kasvupintaa kasvua säatelevällä solun ulkopuolisella matriksilla ("ECM") (tai sen komponenteilla) joko yksinään tai yhdistettynä kasvua säatelevään fysikaaliseen matriksiin tai muihin kasvua säateleviin aineisiin.

15 Elävissä kudoksissa ECM muodostuu erilaisista proteiineista ja polysakkarideista, joita solut erittävät ja joista muodostuu verkosto niitä erittäneiden solujen läheisyyteen. ECM-molekyyleihin kuuluu glykosaminoglykaaneja ja proteoglykaaneja, kuten kondroitiinisulfaatti, fibronektiini, hepariinisulfaatti, hylauroni, dermataanisulfaatti, keratiinisulfaatti, laminiini, kollageeni, heparaanisulfaattiproteoglykaani (HSPG) ja elastiini. Erityisesti kollageeni on *in vivo* yksi ECM:n pääkomponenteista. ECM-molekyylien tiedetään aiheuttavan solujen proliferaa-
 20 tion vähenemistä ja solujen erilaistumisen lisääntymistä. Lisäksi solun ulkopuolinen ECM voi tämän keksinnön mukaisissa menetelmissä käytettynä vaikuttaa BAO:hon kapseloitujen solujen tilalliseen sijaintiin.

ECM voidaan saada aikaan viljelemällä soluja, joiden tiedetään tuottavan ECM:ää, Schwann-solut voidaan induoida syntetisoimaan ECM:ää, kun ne käsitellään askorbaatilla ja cAMP:lla. Nämä ECM-komponentit muistuttavat Schwann-solujen proliferaatiota tukevan peruskalvon esias-
 30 temuotoa. Lisäksi luonnossa tuotettu endoteelisoluperäinen ECM ja Engelbreth Holm-Swarm -kasvainsoluista (RHS) peräi-

sin oleva rekonstituoitu peruskalvogeeli tukevat erilais-
 ten epiteeli- ja endoteelisolujen kasvua ja erilaistumis-
 ta. Katso Baron-Van Evercooren et al., Schwann Cell
 Differentiation in vitro: Extracellular Matrix Deposition
 and Interaction, Dev. Neurosci. 8 (1986) 182 - 196.

Yhdessä suoritusmuodossa kasvun säätely saavutetaan
 päällystämällä BAO:ssa oleva kasvupinta ECM:llä (tai sen
 kasvua säätelevillä komponenteilla). Pidämme edullisimpana
 ECM:ää tuottavien solujen siirrosta BAO:ssa olevalle
 kasvupinnalle ja solujen viljelemistä yhtenäiseksi kasvus-
 toksi. Solut käsitellään sitten detergentillä ja NH_4OH :lla.
 Tuloksena olevaa BAO:ta, jonka kasvupinta on päällystetty
 solun ulkopuolisella ECM:llä, käytetään sitten haluttua
 biologisesti aktiivista molekyylä tuottavien solujen kap-
 selointiin.

Yhdessä toisessa suoritusmuodossa ECM valmistetaan
 suunnilleen samalla tavalla *in vitro*, kylmäkuivataan,
 fragmentoidaan ja sekoitetaan solujen kanssa suspensioksi.
 Solut ja ECM-fragmentit pakataan sitten yhdessä BAO:hon.

Joidenkin ECM-molekyylien läsnä ollessa kasvate-
 tuissa soluissa esiintyy vähemmän proliferaatiota ja enem-
 män erilaistumista kuin tavanomaisena yksisolukerrosvil-
 jelmän kasvatetuissa soluissa. Esimerkiksi lisämunuaiskuo-
 risoluissa, joiden tiedetään syntetisoivan tiettyjä stero-
 idihormoneja, kuten aldosteronia, tapahtuu vähemmän pro-
 liferaatiota, kun niitä kasvatetaan *in vitro* kollageeni-
 geelin läsnä ollessa. Katso Fujiyama et al., Influence of
 Extracellular Matrix in the Proliferation and Differentia-
 tion of Adrenocortical Cells in Culture, Path. Res. Pract.
 189 (1993) 12051 - 14.

Myös Schwann-solujen proliferaatio voi vähentyä ja
 erilaistuminen lisääntyä kollageenin läsnä ollessa kasva-
 tettuina.

Endokriinisolujen tiedetään myös erilaistuvan *in*
vitro, kun niitä kasvatetaan pinnoilla, jotka on päällys-

tetty tyypin IV kollageenin ja HSPG:n yhdistelmällä. Tyypin IV kollageeni on välttämätön solujen adheesiolle ja HSPG indusoi erilaistumisen. Katso de Bruine et al., Extracellular Matrix Components Induce Endocrine Differentiation *In Vitro* in NCI-H716 Cells, American Journal of Pathology 142 (1993) 773 - 782.

Erilaisia kasvutekijöitä tai kemiallisia yhdisteitä, mukaan luettuina tässä käsiteltyt, voidaan lisätä ECM-komponentteihin solujen kasvun ja erilaistumisen säätelämiseksi edelleen. Kasvutekijöitä voidaan annostella soluihin *in vitro* ennen istutusta tai soluihin *in vivo* tai kummallakin tavalla. Katso esimerkiksi US-patenttijulkaisut 5 156 844 ja 5 106 627, jotka koskevat menetelmiä kasvutekijöiden luovuttamiseksi käyttämällä mukaan kapseloitua kasvutekijälähdettä, joka on joko solu tai muu kuin solu. Lisäksi ECM-molekyyleistä voidaan tunnetuin menetelmin valmistaa johdannaisia käyttämällä kasvua säätelviä peptidejä.

Esimerkiksi transformoiva kasvutekijä- β aa, joka itsessään moduloi solujen kasvua ja sitoutuu reversiibelisti tiettyihin ECM-molekyyleihin (esimerkiksi dekoriniin), voidaan lisätä ECM:ään ECM-molekyylien kasvua inhiboivien vaikutusten tehostamiseksi.

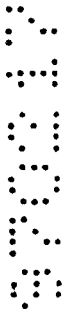
Samoin myös hepariinin on osoitettu estävän sekä transformoimattomien solujen että transformoitujen solulinjojen kasvua. Katso Matuoka et al., Cell Structure and Function 9 (1984) 357.

Perusfinroblastikasvutekijän (bFGF) on myös raportoitu edistävän indokriinisolujen erilaistumista lisättynä yhdessä ECM-komponenttien kanssa, Katso Brine et al., Extracellular Matrix Components Induce Endocrine Differentiation *In Vitro* in NCI.H716 Cells, American Journal of Pathology 142 (1993) 773 - 782.

Kasvutekijöillä voi olla erilaisia vaikutuksia soluihin, kun ne yhdistetään erilaisiin ECM-komponentteihin.

Esimerkiksi fibroblastikasvutekijän (FGF) on osoitettu olevan tehokas erilaistumistekijä ja heikko mitogeeni lamiiniinilla kasvatettujen kromaffiinisolujen suhteen. Kun FGF:ää lisätään kollageenilla kasvatettuihin kromaffiinisoluihin, FGF on kuitenkin heikko erilaistumistekijä ja vahva mitogeeni. Tämä käyttäytyminen on osoitettu myös syklisen AMP-analogin, syklisen 8-(4-kloorifenyyli)-AMP:n, suhteen. Katso Chu et al., Neuroscience 95 (1994) 43 - 54.

10 Taulukko 1 on osittainen luettelo ECM-molekyyleistä, kasvutekijöistä ja kemiallisista yhdisteistä, joiden tiedetään vaikuttavan proliferaatioon ja erilaistumiseen määrättyissä solutyypeissä.



Taulukko 1

Proliferaatioon tai erilaistumiseen vaikuttavat ECM-molekyylit, kasvutekijät ja kemialliset yhdisteet

5	Solutyyppi	Erilaistumisen indusoija/ kasvun inhiboija	Proliferaation edistäjä
	Schwann	askorbaatti; kollageeni (Vitrogen TM); Cultisphers/ agaroosi	TGF- β : dbcAMP
10	PC12	NGF; dbcAMP; SGP	
	Fibroblastit	TGF- β 1; Cultisphers/agaroosi; askorbaatti; SGP	Vitrogen TM
15	Myoblastit	kollageeni; askorbaatti	
	Kantahermosolut	laminiini; Peptide 2000; Cultisphers/Peptide 2000; forboliesteri; hepariini; FGF ja (CNTF tai NGF)	EGF; bFGF; TGF- α ; amfireguliini
20			
	Ihmisen alkion rabdomyosarkoomasolulinja	Ara-C	
25			
	Ihmisen sikiön haiman saarekesolut	nikotiiniamidi (NIC)	
30	Astroblastit	dbcAMP	
	Swiss 3T3	SGP	
35	Lisämunuaisen kuorikerrossolut	kollageeni	
	Endokriinisolut	tyypin IV kollageeni + HSPG; bFGF + ECM-komponentit	
40	Kromaffiinisolut	FGF + laminiini; syklinen 8-(4-kloorifenyyli)AMP + laminiini	FGF + kollageeni; syklinen 8-(4-kloorifenyyli)AMP + kollageeni
45	Hematopoieettiset kantasolut		syöttösolukasvutekijä
	BHK	TGF β -1 + askorbaatti; E15-rotan aivo-selkäydinkalvosolujen ECM	
50			

	Keratinosyytit	TGFβ-1	
	Endoteelisolut	TGFβ-1	
5	Neuroendokriini- solut [ihmisen haiman karanoidi- solut (BON)]	TGFβ-1	TGFβ-1 + askorbaat- ti; serotoniini; FGF
10	Ihmisen neuro- blastoomasolu- linja IMR-32	mitomysiini C + BrdU; PGE ₁ + dbcAMP; SGP	
15	SCT-1	kollageeni; askorbaatti	

BAO:n sisällä oleviin kasvupintoihin kuuluvat BAO:n ontelopinnat ja lisäksi muut kasvupinnat, kuten sisällä oleva tuki, joka voidaan kapseloida BAO:hon.

- Mikrokantajat voivat tarjota pinnan solujen kasvulle. Mikrokantajien käyttö voi antaa mahdollisuuden kapseloida ja jakaa tasaisesti BAO:n sisään suuremman määrän soluja, erityisesti sellaisten solujen ollessa kyseessä, joista tulee kasvukontakti-inhiboituja. Kaupallisesti on saatavissa muutamia mikrokantajatyyppejä, mukaan luettuina
- 25 Cytodex-dekstraanimikrokantajat (Sigma, St. Louis, MO), makrohuokoiset gelatiinimikrokantajat CultispherTM (HyClone Labs, Logan, UT) ja lasiset mikrokantajat. Näitä mikrokantajia käytetään usein ankkuroitumisalustasta riippuvaisten solujen viljelyyn. Solulinjoihin, joiden on osoitettu kasvavan makrohuokoisilla gelatiinimikrokantajilla, kuuluvat
- 30 OBHK, BHK-21, L-929, CHO-K1, rCHO, MDCK, V79, F9, HeLa ja MDBK. Mikrokantajia voidaan valmistaa myös muista ECM-molekyyleistä [kuten kollageenilla päällystetyt mikrokantajat FACTTM (Solo Hill Labs, Ann Arbor, MI)] tai solun ulkopuolisesta ECM:stä tai päällystää niillä, suurin piirtein edellä kuvatulla tavalla.
- 35

- Yhdessä edullisessa suoritussuodossa soluja, jotka tuottavat toivottuja biologisesti aktiivisia molekyylejä, voidaan siirrostaa ECM:llä päällystetyille mikrokantajapinnoille ja viljellä mikrokantajilla *in vitro* ennen kap-
- 40

selointia ja istuttamista. Cherksey (WO 93/14 790) viittaa solujen viljelyyn lasi- tai muovimikrohelmillä ja mikrohelmien istuttamiseen sitten vastaanottajan aivoihin.

Yhdessä toisessa keksinnön mukaisessa suoritustavassa mikrokantajille siirrostetut solut voidaan suspensoida sopivan kasvua inhihoivan matriksin läsnä ollessa ja kapseloida sitten BAO:hon. Mainitunlainen matriksimateriaali (esimerkiksi agarooosi tai agar fibroblastien ollessa kyseessä; kollageeni lisämunuaiskuorisolujen ollessa kyseessä) estää fysikaalisesti solujen jatkokasvun. Mainitunlaisia hydrogeelimatrisseja kuvaa esimerkiksi Dionne julkaisussa WO 92/19195, joka mainitaan tässä viitteenä.

Tämän keksinnön yhden toisen puolen mukaisesti agarosia voidaan käyttää myös ECM:n korvaajana tekemällä derivatisointi peptidisekvensseillä, niin että vaikutetaan solujen kiinnittymiseen matriksiin. Agarosihydrogeelejä voidaan derivatisoida esimerkiksi laminiinin tai fibronektiinin peptidisekvensseillä.

Tässä menetelmässä solut suspensoidaan kolmiulotteisiin matrikseihin, jotka koostuvat agarosista, joka on derivatisoitu peptidisekvenssillä, joka tunnistaa solujen adheesioon osallistuvan solupintareseptorin. Muutamien peptidisekvenssien on osoitettu (kaksiulotteisesti) edistävän solujen adheesiota. Katso esimerkiksi Pierschbacher et al., Science 309 (1984) 30 - 33; Graf et al., Biochemistry 26 (1987) 6896 - 6900; Smallheiser et al., Dev. Brain Res. 12 (1984) 136 - 140; Jucker et al., J. Neurosci. Res. 28 (1991) 507 - 517. Tämän keksinnön mukaiset derivatisoidut agarosimatriksit antavat mahdollisuuden tuoda tarjolle solujen adheesion kannalta sopivat molekyylin osat kolmiulotteisesti. Agarosipitoisuus on edullisesti korkeintaan 1,25 % (m/V), edullisimmin noin 1,0 %. Pidämme parhaina RGD-pitoisia sekvenssejä (ts. ArgGlyAsp; SEQ ID NO:2:n AA₂-AA₄), YIGSR-pitoisia sekvenssejä (TyrIleGlySerArg; SEQ ID NO:1:n AA₅-AA₉), IKVAV-pitoisia sekvens-

sejä (IleLysValAlaVal; SEQ ID NO:3:n AA₁₁-AA₁₅) yms. Derivatisointi voidaan saada aikaan käyttämällä bifunktionaalista kytkentäaineita, kuten 1,1-karbonyylidi-imidatsolia, tai millä tahansa muulla sopivalla menetelmällä.

5 Yhtenä erityisenä etuna agaroosin käytöstä ECM-komponenttien sijasta on, että luonnossa esiintyvät ECM-komponentit voivat hajota entsymaattisesti ajan mittaan *in vivo*, kun taas agaroosi ei hajoa yhtä helposti. Agaroosin käyttö on edullista myös siitä syystä, että sen on määriteltä

10 telty tuote toisin kuin sellaiset materiaalit kuin Matrigel^R, joka on johdettu kasvainsolulinjasta ja on siksi määrittelemätön seos. Tarkemmin esitettynä on osoitettu, että Matrigel^R sisältää bFGF:ää, monien solutyypin suhteen voimakasta mitogeenia. Agaroosi on polysakkarideista ko-

15 tuva kirkas, lämpöreversiibeli hydrogeeli. Solujen kasvu fysikaalisen rajoittamisen lisäksi saattaa itse agaroosi inhiboida proliferaatiota ja indusoida erilaistumisen. Katso esimerkiksi Aulthouse, Expression of the Human Chondrocyte Phenotype In Vitro, In Vitro Cellular & Developmental Biology 25 (1989) 659 - 668.

Agaroosia voidaan muuntaa kemiallisesti johdannaisilla, esimerkiksi PEO-PDMS:llä, solujen kasvun inhiboimiseksi tehokkaammin, edullisesti ilman soluihin kohdistuvia toksisia vaikutuksia.

25 Ymmärrettäneen, että erilaisilla solutyypeillä saattaa olla erilainen reagoivuus johonkin määrättyyn ECM-molekyylisiin tai jostakin määrätystä lähteestä saatavaan solun ulkopuoliseen ECM:ään. Katso esimerkiksi End ja Engel, Mutidomain Proteins Of The Extracellular Matrix And Cellular Growth teoksessa Receptors For Extracellular Matrix, toim. McDonald ja Mecham, Academic Press, New York 1991, s. 79 - 129, joka mainitaan tässä viitteenä. Ammat-

30 timies pystyy helposti määrittämään solutyypin reagoivuuden ECM-molekyylisiin tai jostakin määrätystä lähteestä pe-

räisin olevaan solun ulkopuoliseen ECM:ään, jotta saa määritetyksi tämän tehokkuuden solujakautuman säätelyssä.

Kasvun säätely muuntamalla BAO:ssa olevaa kasvupintaa

5 Tässä tarjotaan käyttöön menetelmiä solujen kasvun säätelemiseksi BAO:ssa muuntamalla kemiallisesti kasvupintoja, niin että säädellään solujen lukumäärää ja sijaintia BAO:ssa. Keinotekoisien biologisen välineen sisällä olevia kasvupintoja voidaan muuntaa siten, että säädellään solujen kiinnittymistä kasvupintaan. BAO:n sisällä oleva kasvupinta voi olla BAO:n ontelopinta tai BAO:n sisään sijoitettu kalvo, mikrokantaja tai sisätuki. Mikrokantaja- ja sisätukisuoritusmuotojen ollessa kyseessä soluja voidaan viljellä näillä rakenteilla *in vitro* ja kapseloida ne siten BAO:hon istutusta varten.

BAO-kalvoa voidaan muuntaa joukolla erilaisia tunnettuja menetelmiä, mukaan luettuna kemiallinen muuntaminen karboksyylihapporyhmien, amiiniryhmien, hydroksyyli-ryhmien tai muiden reaktiivisten funktionaalisten ryhmien tuottamiseksi, tai sitä voidaan muuntaa absorption kautta. Näitä reaktiivisia funktionaalisia ryhmiä, joita muuten ei ole läsnä polymeerin rungolla, voidaan sitten käyttää jatkoderivatisointikohtina.

Yhdessä suoritusmuodossa muunnetaan BAO:n ontelopintaa, niin että edistetään solujen kiinnittymistä siihen. Solujen kontrolloitu kiinnittyminen ontelopintaan saattaa olla hyödyllistä solujen hengissäpitämisen edistämisen kannalta. Kiinnittämällä solut ensisijaisesti kalvoon voidaan saavuttaa solujen yhtenäinen jakautuminen kapselin sisälle pienemmällä määrällä soluja, kuin käytetään immobilisointimenetelmissä, joissa hyödynnetään hydrogeelisuspensiota. Pienemmän solumäärän käyttö johtaa solujätteen pienempään määrään. Toinen etu on ravintoaineiden tehostettu diffuusio soluihin, koska solut ovat läheisessä kosketuksessa kalvon kanssa. Jos käytetään kalvon

muuntamista ilman kapselin sisällä olevaa matriksimateriaalia, vältetään myös komplikaatiot, joita liittyy kuljetukseen geelin läpi ja proteiinien tai solutuotteiden adsorboitumiseen matriksimateriaaliin. Solujen kiinnittymistä voidaan edistää käsittelemällä BAO:n ontelopinta poly-d-lysiinillä, jonka moolimassa vaihtelee. Poly-d-lysiini voidaan adsorboida BAO:n ontelopinnalle liuoksesta, joka on puskuroitu pH-arvoon 11. Pidämme parhaana poly-d-lysiiniä, jonka moolimassa on noin 67 000 g/mol.

10 Lisäksi peptidijohdannaiset, esimerkiksi RGD-pitoiset sekvenssit (ArgGlyAsp; SEQ ID NO:2:n AA₂-AA₄), YIGSR-pitoiset sekvenssit (TyrIleGlySerArg; SEQ ID NO:1:n AA₅-AA₉), mukaan luettuna CDPGYIGSR (CysAspProGlyTyrIleGlySerArg; SEQ ID NO:1), samoin kuin IKVAV-pitoiset sekvenssit
15 (IleLysValAlaVal; SEQ ID NO:3:n AA₁₁-AA₁₅) [edullisesti CysSerArgAlaARGLysGlnAlaAlaSerIleLysValAlaValSerAlaAspArg (SEQ ID NO:3)], on havaittu erityisen käyttökelpoisiksi solujen kiinnittymisen edistämisessä. Esimerkiksi RGD (ArgGlyAsp; SEQ ID NO:2:n AA₂-AA₄), yleisin näistä pepti-
20 deistä, voidaan kiinnittää kemiallisesti BAO:n kalvoon käyttämällä tunnettuja menetelmiä. Joitakin RGD:n (ArgGlyAsp; SEQ ID NO:2:n AA₂-AA₄) sisältäviä molekyylejä on saatavana kaupallisesti, esimerkiksi PepTite-2000TM (Telios).

25 Yhdessä toisessa suoritussuorituksessa BAO:n kalvoa voidaan muuntaa, jotta esitetään solujen kiinnittyminen esimerkiksi PEO-PDMS:n tai poly-d-lysiinialginaatin adsorption kautta. Pidämme edullisimpana PEO-PDMS-muuntamista, erityisesti kasvupinnan ollessa huokoinen. Tämä johtuu
30 siitä, että PEO-PDMS:llä on taipumus diffusoitua huokosten läpi ja kulkiessaan huokosten läpi adsorboitua pintaan kahden hydrofobisen elementin välisen sitoutumisen kautta. Pienimoolimassainen (600 - 3000 g/mol) PEO-PDMS on erityisesti edullinen.

Tämä suoritusmuoto on erityisen käyttökelpoinen, kun soluja kasvatetaan mikrokantajilla ja ne kapseloidaan BAO:hon. Tällä tavalla voidaan saavuttaa yhtenäinen jakautuminen, kontrolloida solujen lukumäärää ja rajoittaa solujen adheesio mikrokantajaan.

Lisäksi solujen kiinnittymistä edistäviä ja inhiboivia yhdisteitä voidaan käyttää yhdessä. Voidaan esimerkiksi käsitellä BAO:n ontelopinta solujen kiinnittymistä inhiboivilla yhdisteillä ja solujen kantajina olevat mikrohelmet tai soluja ympäröivä matriksi (jos sitä käytetään) solujen kiinnittymistä edistävillä yhdisteillä.

Yhdessä toisessa suoritusmuodossa BAO:n sisäpuolta voidaan muuttaa sijoittamalla inertti telinerakenne BAO:hon ennen solujen pakkaamista. Tämä telinerakenne tarjoaa rakenteen solujen kiinnittämiseksi ja jakamiseksi yhtenäisesti kapselin sisään. Inertin telinerakenteen valmistukseen käyttökelpoisiin yhdisteisiin kuuluvat polyhydroksietyylimetakrylaatti ("PHEMA") ja hydroksietyylimetakrylaatti-metyylimetakrylaattikopolymeeri ("PHEMA/MMA"). Telinerakenne voidaan lisäksi derivatisoida erilaisilla kemikaaleilla tai proteiineilla, mukaan luettuina edellä käsitellyt, kasvun ja erilaistumisen säätelemiseksi edelleen. Tämän menetelmän mukaisesti sopivan telinerakennemateriaalin liuoksia saostetaan BAO:hon halutun telinerakenteen aikaansaamiseksi.

Yhden toisen suoritusmuodon ajatuksena on solujen viljely kappaleella, joka toimii sisätukena. Sisätuki voidaan valmistaa mistä tahansa biologisesti olennaisen yhteensopivasta materiaalista, kuten titaanista tai sopivasta polymeeristä. Tuki voi olla kannattimen muodossa tai suunniteltu toimimaan myös telinerakenteena tarjoamalla suuren pinta-alan solukasvustolle. Yksi esimerkki mainitunlaisesta telinerakennemateriaalista on polyesterikuitukangas (NWPF; non-woven polyester fabric) (Reemay, Tennessee). On olemassa lukuisia NWPF-tyyppejä, joiden kudokset

tiukkuus ja paksuus vaihtelee. Mainitunlainen menetelmä mahdollistaa BAO:ssa olevien solujen lukumäärän täsmällisen säätelyn samoin kuin solujen/telinerakenteen kelpoisuuden toteamisen ennen sijoittamista BAO:hon. Lisäksi mainitunlaisella materiaalilla (välineen ulkopuolella) kasvavien solujen erilaistuminen voitaisiin saattaa tapahtumaan ennen materiaalin sijoittamista välineeseen. Mainitunlaista telinerakennetta voitaisiin muuntaa esimerkiksi soluadheesiopeptideillä solujen erilaistumisen indusoimiseksi. Tämä materiaali parantaa lisäksi BAO:n lujuutta. Sisätuen sisältävien BAO:iden valmistusta kuvataan samanaikaisesti käsittelyn alaisena olevassa hakemuksessa sarjanumero 08/105 728.

Tämän keksinnön yhteydessä käyttökelpoisissa BAO:issa on tyypillisesti vähintään yksi puoliläpäisevä ulkopintakalvo eli vaippa, joka ympäröi solut sisältävää ydintä. Tämä vaippa mahdollistaa ravintoaineiden, biologisesti aktiivisten molekyylien ja muiden valittujen tuotteiden diffuusion BAO:n läpi. BAO on biologisesti yhteensopiva ja edullisesti immuunieristävä. Ydin sisältää eristettyjä soluja joko nestemäiseen väliaineeseen suspensoituna tai immobilisoituna hydrogeelimatriksiin.

On ymmärrettävä, että edellä esitetyt menetelmät ja koostumukset BAO:ssa olevien solujen jakautumisen säatelemiseksi eivät ole toisiaan pois sulkevia. Voi olla toivottavaa käyttää muutamia menetelmiä ja koostumuksia yhdistelmänä kasvun toivotun säätelyn saavuttamiseksi.

Voi esimerkiksi olla toivottavaa tuottaa soluja, joita on muunnettu geneettisesti tämän keksinnön mukaisilla menetelmillä sisältämään kasvunsäätelygeeni, kasvattaa mainittuja soluja ECM-mikrokantajilla ja kapseloida solumikrokantajaryppäät BAO:hon, jossa on muunnettu yhtä tai useampaa kasvupintaa solujen jakautumisen säatelemiseksi.

BAO:n kapselointikalvo voidaan valmistaa materiaalista, joka on sama kuin ydinmateriaali, tai eri materiaa-

lista. Kummassakin tapauksessa muodostetaan BAO:n ympäröivä kalvoalue, joka on selektiivisesti läpäisevä ja biologisesti yhteensopiva. Kalvosta voidaan haluttaessa tehdä myös immuunieristävä.

5 BAO:n muodostamiseen käytettävien materiaalien valinta määräytyy monien tekijöiden mukaan, ja sitä kuvaa yksityiskohtaisesti Dionne julkaisussa WO 92/19 195. Lyhyesti esitettynä kapselin vaipan valmistukseen voidaan käyttää erilaisia polymeerejä ja polymeeriseoksia. BAO:n
10 ja siinä olevat kasvupinnat muodostavat polymeerikalvot voivat sisältää polyakrylaatteja (akryylikopolymeerit mukaan luettuina), polyvinylideenejä, polyvinyylikloridikopolymeerejä, polyuretaaneja, polystyreenejä, polyamideja, selluloosa-asetaatteja, selluloosanitraatteja, polysulfoneja, polyfosfatseeneja, polyakrylinitriilejä ja akrylinitriili-vinyylikloridikopolymeerejä samoin kuin mainittujen johdannaisia, kopolymeerejä ja seoksia.

BAO:ita voidaan muodostaa millä tahansa sopivalla tunnetulla menetelmällä. Yhdessä mainitunlaisessa menetelmässä tehdään polymeerivaluliuoksen ja koagulointiaineen monikomponenttisuulakepuristus, jossa voi olla mukana biologisten kudosten fragmentteja, organelleja tai solujen ja/tai muiden terapeuttisten aineiden suspensioita, kuten kuvataan Dionnen julkaisussa WO 92/19 195 ja US-patenttijulkaisuisissa 5 158 881, 5 283 187 ja 5 284 761, jotka mainitaan tässä viitteinä.

Vaipassa voi olla yksi pintakalvo (tyypit 1 ja 2) tai kaksi pintakalvoa (tyyppi 4). Yhdellä pintakalvolla varustettu onttokuitu voidaan valmistaa jäähdyttämällä nopeasti vain toinen polymeeriliuoksen pinnoista monikomponenttiekstruusion yhteydessä. Kahdella pintakalvolla varustettu onttokuitu voidaan valmistaa jäähdyttämällä nopeasti polymeeriliuoksen molemmat pinnat monikomponenttiekstruusion yhteydessä. Makrohuokosten prosentuaalinen osuus ulkopinnasta on tyyppin 1 onttokuiduissa tyyppillises-

ti suurempi kuin tyypin 4 onttokuiduissa. Tyypin 2 onttokuidut ovat välialueella.

Lukuisat kapselin rakenteet, kuten sylinterimäiset, kiekon muotoiset tai pallomaiset, ovat mahdollisia.

5 BAO:n vaipalla on huokoskoko, joka määrää selektiivisesti läpäisevän kalvon nimellisen moolimassarajan (nMWCO; nominal molecular weight cut off). nMWCO:a suurempien molekyylien kulku kalvon poikki estyy fysikaalisesti. Nimellinen moolimassaraja määritellään 90-prosenttiseksi
10 estoksi konvektio-olosuhteissa. Tilanteissa, joissa on toivottavaa, että BAO on immuunieristävä, kalvon huokoskoko valitaan siten, että solujen tuottamat määrätyt tekijät pääsevät diffusoitumaan ulos välineestä, mutta estetään isännän immuunivastetekijöiden pääsy BAO:hon. nMWCO on
15 tyypillisesti alueella 50 - 200 kD, edullisesti 90 - 150 kD. Sopivin kalvokoostumus minimoi myös reaktiivisuuden valitussa istutuskohdassa tunnetusti läsnä olevien isännän immuuniefektorimolekyylien ja BAO:n ulkokalvon komponenttien välillä.

20 BAO:n ydin konstruoidaan siten, että saadaan aikaan sopiva paikallisympäristö siihen kulloinkin eristettävälle soluille. Ydin voi käsittää riittävästi nestemäistä kasvu-
alustaa solukasvuston ylläpitämiseksi. Nestemäiset ytimet ovat erityisen sopivia transformoitujen solulinjojen, kuten PC12-solujen, ylläpitämiseen. Ydin voi vaihtoehtoisesti käsittää geelimatriksia. Geelimatriksi voi koostua hydrogeelistä (alginaatti, VitrogenTM jne.) tai solun ulkopuolisista matriksikomponenteista. Katso esimerkiksi Dionne,
25 WO 92/19 195.

30 Hydrogeelejä muodostavat koostumukset kuuluvat kolmeen yleiseen ryhmään. Ensimmäisellä ryhmällä on negatiivinen nettovaraus (esimerkiksi alginaatti). Toisella ryhmällä on positiivinen nettovaraus (esimerkiksi kollageeni ja laminiini). Esimerkkeihin kaupallisesti saatavissa olevista solun ulkopuolisista matriksikomponenteista kuuluvat
35

MatrigelTM ja VitroGelTM. Kolmannen ryhmän nettovaraus on neutraali (esimerkiksi voimakkaasti silloitettu polyeteenioksidi tai polyvinyylialkoholi).

5 Mitä tahansa sopivaa menetelmää BAO:n sulkemiseksi voidaan käyttää, mukaan luettuina polymeeriliimojen käyttö ja/tai puristaminen, solmiminen tai kuumasaumaus. Nämä sulkemismenetelmät ovat alalla tunnettuja. Lisäksi voidaan käyttää myös mitä tahansa sopivaa "kuivaa" sulkemismenetelmää. Mainitunlaisissa menetelmissä hankitaan olennaisesti huokoseton väline, jonka läpi soluja sisältävä liuos syötetään. BAO suljetaan täytön jälkeen. Mainitunlaista menetelmää kuvataan käsittelyn alaisena samanaikaisesti olevassa US-patenttihakemuksessa sarjanumero 08/082 407, joka mainitaan tässä viitteenä.

15 On edullista käyttää yhtä tai useampaa *in vitro* -määrittystä BAO:n toimivuuden toteamiseksi ennen istuttamista *in vivo*. Näihin tarkoituksiin voidaan käyttää alalla hyvin tunnettuja määrittäyksiä tai diagnostisia testejä. Katso esimerkiksi Methods In Enzymology, toim. Abelson, 20 Academic Press 1993. Voidaan käyttää esimerkiksi ELISA-menetelmää (enzyme-linked immunosorbent assay), kromatografista tai entsyymaattista määrittystä tai erittyneelle tuotteelle spesifistä biologista määrittystä. Istutteen eritystoimintaa voidaan haluttaessa seurata ajan kuluessa ottamalla vastaanottajasta sopivia näytteitä (esimerkiksi seeruminäytteitä) ja analysoimalla ne. Jos vastaanottaja on kädellinen, voidaan käyttää mikrodialyysiä.

25 BAO:iden lukumäärän ja koon tulisi olla riittävät saamaan aikaan terapeutin vaikutus istutuksen jälkeen, ja ne määrää kulloisessakin sovelluksessa tarvittava biologisen aktiivisuuden määrä. Terapeuttisia aineita vapauttavien erittävien solujen ollessa kyseessä käytetään alalla tunnettuja tavanomaisia annostusnäkökohtia ja -kriteerejä määritettäessä tarvittava erittävän aineen määrä.

Huomioon otettavia tekijöitä käsitellään Dionnen julkaisussa WO 92/19 195.

BAO:n istutus tehdään steriileissä olosuhteissa. BAO istutetaan yleisesti ottaen sellaiseen kohtaan isännässä, joka mahdollistaa erittyneen tuotteen tai toiminnon asianmukaisen luovutuksen isäntään ja ravintoaineiden asianmukaisen viennin kapseloituihin soluihin tai kapseloituun kudokseen sekä myös pääsyn käsiksi BAO:hon poistoa ja/tai vaihtamista varten. Edullinen isäntä on kädellinen, edullisimmin ihminen.

Joukko erilaisia istutuskohtia on mahdollisia. Näihin istutuskohtiin kuuluvat keskushermosto, aivot mukaan luettuina, selkäydin ja silmän kammiovesi ja lasiainen. Edullisiin kohtiin aivoissa kuuluvat aivojuovio, aivokuori, näkökukkulan alaiset tumakkeet ja Meynertin tyvitumakkeet. Muita edullisia kohtia ovat aivo-selkäydinneste, edullisimmin lukinkalvon alainen tila ja sivukammiot. Keksinnön ajatuksen mukaista on myös istuttaminen munuaiskalvon alle ja vatsaontelonsisäisiin ja ihonalaisiin kohtiin tai mihin tahansa muuhun terapeuttisesti suotuisaan kohtaan.

Seuraavat esimerkit esitetään keksinnön ymmärtämisen helpottamiseksi. Nämä keksinnöt esitetään vain asian valaisemiseksi eikä niitä pidä ymmärtää keksinnön suoja-alaa millään tavoin rajoittaviksi.

Esimerkit

Esimerkki 1

Kasvun säätely käyttämällä Mx1-promoottoria

Hiiren Mx1-promoottori fuusioitiin SV40:n varhaisen alueen kanssa ja käytettiin tätä kimeeristä geeniä siirtogeenisten hiirten aikaansaantiin. Koska Mx1-promoottori-elementit indusoituvat IFN α :n tai IFN β :n läsnä ollessa, voidaan onkogeenien ilmentymistä säädellä siirtogeenisistä eläimistä preparoiduissa kudoksissa tai soluviljelmissä.

Niinpä voidaan synnyttää ehdollisesti immortalisoituja solulinjoja.

Siirtogeenisten hiirten tuottaminen

Käyttämämme Mx1-Tag-konstruktio koostui noin 2 ke:n
 5 pituisesta alueesta Mx1-promoottoria (ts. Xba1-EcoR1-fragmentista) fuusioituna intaktin SV40:n varhaisen alueen cDNA:han, joka koodittaa sekä suuria että pieniä T-antigeeneja ja on fuusioitu hiiren beeta-globiinigeenin 3'-pään transloitumattoman alueen ja poly-A-signaalin edelle
 10 (BamH1-Xba1-fragmentti). Beeta-globiinisekvenssit otettiin mukaan silmukointikohtien aikaansaamiseksi cDNA:n ilmentymisen edistämiseksi siirtogeenisissä eläimissä. Kuvio 1 esittää Mx-1-konstruktion plasmidikarttaa.

Mx1-Tag-konstruktion sisältäviä siirtogeenisiä hiiriä tuotettiin tavanomaisella menetelmällä, pronukleaarisella mikroinjektiolla hedelmöitettyyn yksisoluiseen hiiren munasoluun [Brinster et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 4438 - 4442]. Kanta-eläimistä peräisin olevien kudosten Southern blot -analyysi vahvisti, että genomiin oli integroitunut intakteja siirtogeenikopioita.
 20

Näiden hiirten jälkeläiset vahvistettiin "DNA-positiivisiksi" käyttämällä PCR-monistettuja jaksoja, jotka tunnistavat SV40:n varhaisen alueen sekvenssejä.

Ehdollisesti immortalisoidut kantasolut

Poistettiin siirtogeenisten E15-hiirten ja DNA-negatiivisten saman pentueen jäsenten alkioista aivojuovioita ja siirrostettiin ne (yksittäis)primaarisoluvielmiksi EGF-pitoiseen kantahermosolualustaan [100 ml:aa kohden: 50 ml DDH₂O:a, 10 ml 10X DMEM/F12:a, 3,0 ml 30-prosenttista glukoosiliuosta, 1,5 ml NaHCO₃:a, 0,5 ml HEPES-puskuria (1 mol/l), 1,0 L-glutamiinia, 10 ml 10X hormoniseosta ja 25 ml DDH₂O:a (suodattimen pesuun)]. Kantahermosolut prepoitettiin Weissin menetelmällä [PCT CA92/00 283; Reynolds ja Weiss, J. Neuroscience 12 (1992) 4565 - 4574]. Soluille
 35 tehtiin uusintasiirrostus seitsemästi kerran viikossa ja

ne jaettiin sitten 2 ryhmään: ulkopuolista interferonia (IFN) sisältävään ja sisältämättömään ryhmään. Solut laitettiin T25-pulloihin siirrostustiheyden ollessa 500 000 solua/5 ml EGF-pitoiseen kantahermosolualustaan. Puoleen soluista lisättiin 1 000 yksikköä/ml IFN:a. Vertailukantahermosoluille ei annettu IFN:a. Soluja inkuboitiin lämpötilassa 37 °C 5 % CO₂:a sisältävässä atmosfäärissä ja tehtiin uusintasiirrostus viikottain.

30 uusintasiirrostuksen (23 IFN:n kera) jälkeen solut sijoitettiin seerumipitoiseen alustaan (DMEM, 5 % naudan sikiöseerumia ja 1X L-glutamiinia), joka sisälsi 1 000 yksikköä IFN:a, käyttämällä solutiheyttä 1,25 miljoonaa solua 15 ml:aa kohden. Tuoretta IFN:a lisättiin joka toinen päivä.

Alusta poistettiin 7 päivän kuluttua, solut pestiin Hanksin tsapainotetulla suolaliuoksella (HBSS; Hanks' Balanced Salt Solution) ja pullolle tehtiin kevyt trypsiinikäsittely. Solut suspensoitiin uudelleen 10 ml:aan seerumipitoista alustaa, sentrifugoitiin 2 min kierrostaajuudella 1 000 min⁻¹ ja imettiin alusta pois. Sitten solut suspensoitiin uudelleen 2 ml:aan seerumipitoista alustaa hiertäen liekissä käsitellyllä pipetillä.

Noin 25 000 solua siirrostettiin polyornitiinilla käsitellyille peiteliusköille DMEM-alustaan, joka sisälsi 5 % FBS:a (naudan sikiöseerumia). Puolelle peiteliusköistä lisättiin IFN:a (1 000 yksikköä/ml) joka toinen päivä. Solut värjättiin SV40:n T-antigeenin (Tag) ja hermotukikudoksen säikeisen happaman proteiinin (GFAP), astrosyyteissä spesifisesti ilmentyvän välivaihefilamenttiproteiinin, suhteen erilaisin aikaväleihin seuraavan ohjelman mukaisesti.

Peiteliuskat upotettiin 20 min:ksi huoneenlämpötilassa olevaan liuokseen, joka sisälsi 4 % paraformaldehydiä fosfaattipuskuroidussa fysiologisessa suolaliuoksessa (PBS; 0,1 mol/l), ja niitä pestiin sitten kahdesti 5 min

PBS:ssä. Solut tehtiin läpäiseviksi pitämällä niitä 100-%:isessa EtOH:ssa 2 min ja niitä pestiin siten jälleen kahdesti 5 min PBS:ssä (0,1 mol/l). Solut suojattiin pitämällä niitä vähintään 30 min huoneenlämpötilassa liuoksessa, joka sisälsi 5 % NGS:ää (normaalia vuohen seerumia) PBS:ssä (0,1 mol/l). Primaariset vasta-aineet yhdistettiin, laimennettiin pitämällä 1-%:isessa NGS-liuoksessa 2 tuntia ja levitettiin huoneenlämpötilassa peiteliuskoidle seuraavasti: anti-Tag (hiiren monoklonaalinen vasta-aine) laimennettiin suhteessa 1:10 ja anti-GFAP (kaniinin polyklonaalinen vasta-aine) laimennettiin suhteessa 1:500. Primaariset vasta-aineet poistettiin ja peiteliuskotja pestiin sitten kahdesti 5 min PBS:llä.

Sekundaariset vasta-aineet yhdistettiin, laimennettiin 1-%:isella NGS-liuoksella ja levitettiin peiteliuskoidle 30 min:n ajaksi huoneenlämpötilassa pimeässä seuraavasti: GAM-FITC (1:128); GAR-Texas Red (laimennettiin suhteessa 1:100). Sekundaariset vasta-aineet poistettiin ja peiteliuskotja pestiin sitten kahdesti 5 min PBS:llä pimeässä.

Peiteliuskat kiinnitettiin CitiflourillaTM (tai muulla haalistumista estävällä kiinnitysväliaineella) mikroskoopplaseille ja varastoitiin lämpötilassa 4 °C, kunnes ne tutkittiin käyttämällä fluoresenssimikroskoppia, joka oli varustettu rodamiini- ja fluoreseiinioptiikalla.

Tässä koesarjassa oli päämääränämme määrittää, kuinka nopeasti T-antigeenitaso laskevat interferonin poistamisen jälkeen. Lisäksi meitä kiinnosti määrittää T-antigeenitason vaikutus solujen proliferaatioon ja erilaistumiseen. Erilaistuminen määritettiin seuraamalla GFAP-tasoa. GFAP on kypsissä astrosyyteissä spesifisesti ilmentyvä välivaihefilamenttiproteiini. Saatiin seuraavat immuunifluoresenssitulokset.

	Päivä	IFN (100 yksikköä/ml)		Vertailu (ei IFN:a)	
		Tag	GFAP	Tag	GAFP
	1	+++	-	+++	-
5	4	+++	-	+	+/-
	7	+++	-	+/-	+/-
	10	+++	-	-	+

10 Kuten Tag- ja GFAP-immuunivärjäykset osoittavat, jonkin aikaa seerumialustassa oltuaan IFN-käsiteltyt solut jatkoivat siis T-antigeenin ilmentämistä ja proliferaatiota, eikä niissä havaittu merkkejä GFAP-ilmentymisestä, kun taas vertailusolut (ei IFN:a) alkoivat erilaistua (voimistunut GFAP-ilmentyminen) ja lakkasivat jakautumasta.

15 Tämä vahvistettiin peiteliusköjen visuaalisella tarkastuksella - solulukumäärissä ole selvä ero päivään 4 mennessä. Päivään 10 mennessä IFN-käsiteltyjä soluja oli paljon enemmän kuin vertailusoluja.

20 SV40:n T-antigeenin ilmentyminen on tässä konstruktiossa säädeltyä annoksesta riippuvalla tavalla. Tuottamissamme solulinjoissa T-antigeenin maksimi-ilmentyminen (immuunifluoresenssilla mitattuna) havaittiin IFN-annoksella 500 - 1 000 yksikköä/ml. Annoksen ollessa 100 yksikköä/ml havaitsimme hyvin vähäistä ilmentymistä tai sitä ei esiintynyt ollenkaan.

25 Kuten on odotettavissa, proliferaationopeus korreloi IFN-annoksen kanssa; solujen jakautumista tapahtui vähän tai ei ollenkaan IFN-annoksella 100 yksikköä/ml.

30 Edellä kuvatuilla EGF:ään reagoivilla Mx1 Tag -hermokantasoluilla tehdyissä jatkotutkimuksissa olemme osoittaneet, että proliferaatiota ja erilaistumista voidaan säädellä. Näiden kantasolujen muodostama populaatio pakotettiin erilaistumaan poistamalla EGF ja lisäämällä FBS:ää. Kun lisättiin 1 000 yksikköä/ml alfa-/beeta-IFN:a, litteiden, astrosyyttimäisten solujen muodostamat ryppäät

35

alkoivat proliferoitua ja täyttivät lopulta viljelymaljat. Olemme pitäneet jatkuvasti yllä näitä soluja IFN:ssa yli 70 uudelleensiirroituksen ajan, ja kahdentumisaika on pysynyt alueella 24 - 36 tuntia tämän jakson ajan. Testatta-

5 essa joukolla hermo- ja hermotukisoluspesifisiä vasta-aineita nämä IFN-käsiteltyt solut olivat käytännöllisesti katsoen kaikki nestiini- ja T-antigeenipositiivia mutta heikosti immuunireaktiivisia glutamiinisyntetaasin suhteen ja GFAP-negatiivisia.

10 IFN:n poistamisen jälkeen näiden litteiden solujen jakautumisnopeus laski nopeasti, solut menettivät T-antigeeni-immuunireaktiivisuutensa, ja niiden glutamiinisyntetaasi- ja GFAP-iimmuunireaktiivisuus kasvoi. Nämä solut pysyvät hengissä muutamia kuukausia *in vitro*, eikä proliferaatiota ilmene IFN:n ollessa jatkuvasti poissa. Kiinnostavaa on, että T-antigeeni-immuunireaktiivisuus ja solujen proliferaatio voidaan indusoida uudelleen lisäämällä IFN:a. Tämä tarjoaa käyttöön solulinjan, jolla on kyky proliferoitua tai erilaistua kontrolloidusti.

20 **Esimerkki 2**

Esimerkin 1 mukaisesti preparoidut solut kapseloidaan ja istutetaan ihmisisäntään.

PAN/PVC-kuitujen valmistus

25 Selektiivisesti läpäiseviä onttokuituja valmistetaan kuivasuihkutus-märkäkehräysmenetelmällä (Cabasso, Hollow Fiber Membranes, Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, vol. 12, 3. p., Wiley, New York 1980, s. 492 - 517; Dionne, WO 92/19 195; US-patenttijulkaisu 5 158 881). Valetaan epäsymmetrisiä onttokuituja liuoksista, jotka sisältävät 12,5 paino-% akryylinitriili-vinyyliekloridi (PAN/PVC) -kopolyymeeriä dimetyylisulfoksidissa. Tuotetaan yhdellä tai kahdella pintakalvolla varustettuja kuituja. Kuidut kerätään liuotteena toimimattomaan vesihauteeseen, käsitellään glyserolilla ja kuivataan. Soluja

30 pakataan tiheydeksi 25 000 solua/ μ l yhdellä pintakalvolla

35

varustettuun PAN/PVC-onttokuituun ja suljetaan kuumapuristamalla.

Istuttaminen isäntään

5 Kapseloidut solut istutetaan ihmisisäntään. Istutuskohdista ovat sivukammiot ja aivojuovio. Menettelyjä BAO:iden istuttamiseksi aivoihin kuvaavat Aebischer et al. julkaisussa WO 93/00 127, joka mainitaan tässä viitteenä.

Esimerkki 3

10 **Vastasyntyneen astrosyyttien ehdollinen immortali-sointi**

Fragmentti, joka sisältää hiiren rintakasvainviruksen (MMTV) promoottorielementit, fuusioidaan DV40:n varhaisen alueen cDNA:han. Vastasyntyneen E15-rotan aivoista peräisin olevat astrosyytit transfektoidaan elektroporaatiolla ja transformantit valikoidaan proliferaatiomäärityksen avulla. Jakautuvat solut poistetaan, niitä lisätään ja määritetään niistä suuren T-antigeenin ilmentyminen käyttämällä anti(suuri T)vasta-aineita. Transformoituja soluja koteloidaan BAO:ihin ja istutetaan isäntään suurin piirtein esimerkissä 2 kuvatulla tavalla. BAO:ita pidetään in vivo 1 kuukausi. Sitten BAO:t poistetaan isännästä ja verrataan BAO:issa vallitsevaa solujakautumaa vastaaviin BAO:ihin, joita on pidetty sama aika in vitro.

Esimerkki 4

25 **SCT-1-solujen kollageenilla heikennetty proliferaatio ja askorbaatilla indusoitu erilaistuminen**

Kloonattiin Po-SV40-siirtogeenisen hiiren lonkka-hermokasvaimesta saatuja SCT-1-soluja [Messing et al., J. Neuroscience 14 (1994) 3533 - 3539]. Nämä SCT-1-solut olivat immuunireaktiivisia Schwann-solumarkkerien S100 ja Po samoin kuin SV40:n T-antigeenin suhteen.

SCT-1-soluja kasvatettiin kolmenlaisissa olosuhteissa: (1) kudosisviljelymuovilla ilman askorbaattia, (2) kudosisviljelymuovilla askorbaatin ollessa läsnä pitoisuute-

na 50 $\mu\text{g/ml}$ erilaistumisen indusoimiseksi ja (3) suspensoituina tyypin I kollageeniin.

Muovisubstraatilla askorbaatin poissa ollessa useimmilla soluilla oli fibroblastimainen muoto. Läsä oli kuitenkin joitakin kaksinapaisia soluja. Solut kahdentuivat 18 - 20 tunnissa, eikä niissä esiintynyt kontakti-inhibitiota.

SCT-1-solut, joita kasvatettiin askorbaatin läsnä ollessa, kasvoivat hitaammin ja värjäytyivät voimakkaammin fibronektiinin ja tyypin IV kollageenin suhteen. Laminini-immuunireaktiivisuus oli sen sijaan samanlainen vertailuviljelmissä ja askorbaatilla indusoiduissa erilaistuneissa viljelmissä.

Tyypin I kollageeniin suspensoiduilla SCT-1-soluilla oli kaksinapainen muoto, ja niiden mitoosiaktiivisuus oli alentunut dramaattisesti (ts. kahdentumisaika oli ≥ 30 päivää).

Esimerkki 5

BHK-solujen proliferaation inhibointi askorbaatilla ja TGF- β :lla

CNTF:ää erittäviä BHK-soluja kasvatettiin (runsasglukoosisessa) DMEM-alustassa. Vielä yhteenkasvamattomien BHK-viljelmien käsittely TGF- β 1:llä (2,5 ng/ml) ja askorbaatilla (100 $\mu\text{mol/l}$) vähensi mitoosia. Lisäksi solut näyttivät pitkänomaisilta, ja jotkut solut asettuivat yhdensuuntaisesti. Nämä tulokset osoittavat, että TGF- β 1 ja askorbaatti inhiboivat proliferaatiota ja indusoivat BHK-solujen erilaistumisen.

Jatkokokeissa käsiteltiin hNGF:ää erittäviä BHK-soluja TGF- β :lla (2,5 ng/ml) ja askorbiinihapolla (100 $\mu\text{mol/l}$) ennen kapselointia BAO:ihin ja istuttamista. Käsittelemättömät solut toimivat vertailunäytteinä. Käytetyt muuttajat olivat seuraavat: a) TGF β /askorbaatti, ei VitrogeniaTM, b) TGF β /askorbaatti, VitrogenTM, c) ei TGF β :aa/askorbaattia, VitrogenTM ja d) ei TGF β :aa/askor-

baattia, ei VitrogeniaTM. Lisäksi käytettiin muutamia erilaisia polymeerejä. Kapseleita istutettiin aikuisten rottien aivojuovioon. Rotat lopetettiin 3 kuukauden kuluttua.

Esimerkki 6

5 **Hermokantasolut proliferoivat EGF:n läsnä ollessa ja erilaistuvat sen poissa ollessa**

Hermokantasoluja preparoitiin käyttämällä Weissin et al. menetelmiä (PCT/CA 92/00 283). Kerättiin siirrostuksesta hermokantasoluja ja jaettiin ne. Puolet hermokantasoluista hierrettiin yksittäissolususpensioksi ja puolet jätettiin ryppäiksi. Yksittäissolususpensiosta laskettiin yksittäiset solut ja otaksuttiin, että ryppäinä olevien solujen tiheys oli sama. Yksittäissolut ja ryppäät suspensioitiin yhtä suuriin määriin VitrogeniaTM ja joko 20 ng/ml EGF:aa sisältävää hermokantasolualustaan (vertailunäytteet) tai PC-1-alustaan.

10 Soluja pakattiin tiheydeksi 25 000 solua/ μ l yhdellä pintakalvolla varustettuihin PAN-/PVC-onttokuitu-BAO:ihin, jotka oli valmistettu suurin piirtein esimerkissä 2 kuvatulla tavalla, ja suljettiin sitten holkillla. BAO:ita pidettiin joko hermokantasolu + EGF -alustassa tai PC-1-alustassa (ilman EGF:ää).

20 BAO:t tapettiin 3 ja 7 päivän kuluttua ja niille tehtiin värjäys hermotukikudoksen säikeisen happaman proteiinin (GFAP) suhteen immuunisytokemiallisesti. GFAP on astrozyyteissä spesifisesti ilmentyvä välivaihefilamentti-proteiini. GFAP-reaktiivisuus osoittaa, että hermokantasolut ovat erilaistuneet astrozyyteiksi. Saatiin seuraavat tulokset:

	Aika (d)	GFAP-reaktiivisuus
	3	Pieni osa GFAP-posi- tiivisia
	3	Negatiivinen
5	3	Pieni osa GFAP-posi- tiivisia
	3	Negatiivinen
	7	Voimakas GFAP-posi- tiivisuus
10	7	Negatiivinen
	7	Voimakas GFAP-posi- tiivisuus
	7	Negatiivinen

15 Kapseloidut hermokantasolut olivat päivään 7 men-
nessä erilaistuneet astrosyyeiksi EGF:n poissa ollessa.

Esimerkki 7

ECM:n vaikutus BHK-soluihin

20 E15-rotan aivo-selkäydinkalvosoluja, jotka otettiin
15 päivän ikäisistä rotan alkioista, siirrostettiin moni-
syvennyksiin maljoihin ja niiden annettiin kasvaa yhteen.
Solut vedettiin yksisolukerrokseksi 2 viikon kuluttua, ja
niiden annettiin kasvaa uudelleen.

25 Solun ulkopuolinen ECM eristettiin käsittelemällä
30 min 0,1 % Triton X-100-detergenttiä sisältävällä liu-
oksella ja käsittelemällä sitten 3 min NHOH-liuoksella
(5 mmol/l).

BHK-hNGF-solut

30 NGF:ää erittävä BHK-solulinja tuotettiin seuraavas-
ti. 2,51 ke:n fragmentti, joka sisälsi noin 37 ep ensim-
mäisen intronin 3'-päättä, kaksinkertaisen ATG-sekvenssin,
jonka otaksutaan olevan pre-pro-NGF-proteiinin translaa-
tion aloituskohta, ja ihmisen NGF-geenin täydellisen koo-
ditussekvenssin ja koko 3-pään transloitumattoman alueen
35 [Hoyle et al., Neuron 10 (1993) 1019 - 1034], alikloonat-
tiin DHFR-pohjaiseen pNUT-ilmentymisvektoriin välittömästi

hiiren metallotioneini-1-promoottorin (-650 - +7) ja rotan insuliini II -geenin ensimmäisen intronin perään [Baetge, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 83 (1986) 5454 - 5458].

5 Hamsterinpoikasen munuaissoluja (BHK-soluja) transfektoitiin pNUT- β -NGF-konstruktiolla käyttämällä kalsiumfosfaattimenetelmää. BHK-soluja kasvatettiin DMEM:ssä, joka sisälsi 10 % naudan sikiöseerumia, 1X penisilliini/streptomysiini/ampisilliini B:tä (0,8 g/l) ja L-glutamiinia (GIBCO), 5 % CO₂:a sisältävässä atmosfäärissä lämpötilassa 37 °C. Transfektoidut BHK-solut valikoitiin pitämällä 200 μ mol/l metotreksaattia (Sigma) sisältävässä alustassa 3 - 4 viikkoa ja resistenttejä soluja pidettiin yllä polyklonaalisena populaationa joko metotreksaatin 15 (200 μ mol/l) läsnä ollessa tai ilman sitä.

Transformoidut BHK-hNGF-solut siirrostettiin tiheydeksi $1,0 \cdot 10^4$ solua/syvennys maljoihin, jotka sisälsivät aivo-selkäydinkalvosoluista eristettyä ECM:ää. BHK-hNGF-soluja siirrostettiin myös samaksi tiheydeksi vertailumaljoihin, jotka eivät sisältäneet ECM:ää. Solut laskettiin 20 käyttämällä hemosytometriä 6 DIV:n jälkeen.

Solumäärät olivat vertailusyvennyksissä keskimäärin $4,5 \cdot 10^6 \pm 4,5 \cdot 10^5$ solua. Eristettyä ECM:ää sisältävissä maljoissa solumäärät olivat keskimäärin $9,9 \cdot 10^5 \pm 4,9 \cdot 10^5$ 25 solua. Nämä tulokset osoittavat, että solujen kasvu oli 4,5 kertaa heikompaa käsitellyissä maljoissa.

Esimerkki 8

Solujen tarttuminen solun ulkopuoliseen ECM:ään sisätuella

30 Jatkokokeissa siirrostettiin primaarisia aivo-selkäydinkalvosoluja TECOTM-polyuretaanikuidulle. Mainitunlaiset kuidut ovat käyttökelpoisia sisätukina BAO:issa. Kasvualustana käytettiin DMEM:ää, jota oli täydennetty 10 %:lla FBS:ää. Kuituja uutettiin 2 viikon kuluttua 35 30 min 0,1 % Triton X-100:aa sisältävällä liuoksella ja

sen jälkeen NH_4OH -liuoksella (25 mmol/l) 3 min. Jotkut kuidut immuunivärjättiin antifibronektiinivasta-aineella, jotta varmistettiin solun ulkopuolisen ECM:n läsnäolo kuidulla. Muita kuituja käytettiin BHK-soluilla tehtäviin soluadheesiotesteihin.

Esimerkki 9

BHK-solujen kasvu PEO-PDMS:llä muunnettuihin BAO:ihin kapseloiduilla mikrokantajilla

PEO-PDMS-derivatisoitujen BAO:iden valmistus

Valmistettiin yhdellä pintakalvolla varustettuja PAN/PVC-onttokuitu-BAO:ita esimerkissä 2 kuvatulla tavalla. Näiden BAO:iden sisäläpimitta oli $642,6 \pm 36,7 \mu\text{m}$ ja ulkoläpimitta $787,8 \pm 32,2 \mu\text{m}$, seinämän paksuus $67,8 \pm 16,2 \mu\text{m}$, BSA:n hylkimiskerroin 100 % ja vedenläpäisevyys noin $21,8 \text{ ml}/(\text{min} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{mmHg})$.

PAN/PVC-BAO:t derivatisoitiin PEO-PDMS:llä steriileissä olosuhteissa. Valmistettiin liuos, joka sisälsi 1 tai 5 til-% PEO-PDMS:ää (Huls, PS073, $M = 3126 \text{ g/mol}$; 82 paino-% PEO:ta), laimentamalla 1 ml tai 5 ml PEO-PDMS:ää 100 ml:ksi deionisoidulla vedellä. Liuos steriloidtiin suodattamalla ($0,2 \mu\text{m}$) ennen injektointia "märkään" PAN/PVC-kalvoon. Kalvo suljettiin kuumapuristamalla ja upotettiin vesipitoiseen liuokseen. Kuidut huuhdottiin Hanksin puskuroidulla suolaliuoksella 72 tunnin kuluttua ja ennen käyttöä soluille.

Pakattiin esimerkissä 7 kuvattujen kaltaisia NGF:ää erittäviä BHK-soluja PEO-PDMS-derivatisoituihin kuituihin seuraavasti:

Pakkaus- ja sulkemismenettely

Yhteenkasvamisasteeseen 90 % kasvatetuista NGF:ää tuottavista BHK-soluista valmistetut yksittäissolususpensiot huuhdottiin PBS:llä (ilman kalsiumia ja magnesiumia), käsiteltiin trypsiinillä noin 1 min ja pellettoitiin sentrifugoimalla 3 min kierrostaajuudella $1\,000 \text{ min}^{-1}$. Solut

suspensioitiin uudelleen alustaan, niin että lopullinen solutiheys oli $2 \cdot 10^7$ solu/ml.

5 Soluja joko pakattiin suoraan PEO-PDMS-derivatisoituihin kuituihin tai sekoitettiin 0,15-prosenttisen VitrogenTM-matriksiliuoksen tai 0,5-prosenttisen agarosiliuoksen kanssa ja pakattiin sitten. Kuhunkin kuituun pakattiin noin 2,5 μ l soluja tai solu-matriksilietettä (10 000 solua/ μ l) käyttämällä kartiomaista katetrin kärkeä nro 24 ja Hamilton-ruiskua.

10 Kapselit suljettiin asettamalla 1 - 1,1 cm:n pala kuivaa onttokuitua holkille, jonka lähemmässä päässä oli septumi ja täyttöaukko välineen onteloon injektoitavia soluja varten. Kun oli infusoitu 2,5 μ m solususpensiota, septumi poistettiin ja syöttöaukko suljettiin käyttämällä
15 valokovetteista akrylaattia (LuctrakTM LCM 24, ICI Resins US, Wilmington, MA) ("holkkisulku"). Sen jälkeen kapselit "varustettiin liealla" sijoittamalla 1,5 cm 0,020":n (0,5 mm) Silastic-letkua akryyliholkin päälle.

Tällä tavalla valmistettiin seuraavat BAO:t:

- 20 1. derivatisoimaton vertailuvaippa, ei matriksia;
2. derivatisoimaton vertailuvaippa, VitrogenTM-matriksi;
3. derivatisoimaton vertailuvaippa, agarosimatriksi;
25 4. PEO-PDMS:llä (1 %) derivatisoitu vaippa, ei matriksia;
5. PEO-PDMS:llä (1 %) derivatisoitu vaippa, VitrogenTM-matriksi;
30 6. PEO-PDMS:llä (1 %) derivatisoitu vaippa, agarosimatriksi;
7. PEO-PDMS:llä (5 %) derivatisoitu vaippa, ei matriksia;
8. PEO-PDMS:llä (5 %) derivatisoitu vaippa, VitrogenTM-matriksi;

9. PEO-PDMS:llä (5 %) derivatisoitu vaippa, agarosimatriksi.

BAO:ita pidettiin yllä ympäristön O₂-olosuhteissa 4 päivää kapseloinnin jälkeen ja sitten vähän O₂:a sisältävässä [6,65 kPa (50 mmHg)] atmosfäärissä tutkimuksen ajan. Kuvio 2 esittää NGF-eritystä (mitattu ELISalla) 4, 11 ja 25 päivän kuluttua.

NGF-vapautustulokset osoittavat, että pelkällä matriksilla on vähän vaikutusta solujen tuotantoon. NGF:n vapautuminen on kuitenkin olennaisesti vähäisempää PEO-PDMS:n läsnä ollessa, kun tätä käytetään agarosin kera ja ilman matriksia, mutta muuttumaton käytettäessä tätä VitrogeninTM kera. Lisäksi muuntamiseen käytetyn PEO-PDMS:n prosentuaalisella osuudella oli ilmeisesti vähäinen vaikutus NGF:n vapautumiseen. Histologisten tulosten perusteella agarosin kera kapseloiduilla BHK-soluilla oli pitkänomainen muoto, ja ne olivat välineen seinämällä; itse agarosin sisällä oli kuitenkin hyvin vähän eläviä soluja. BHK-solut, jotka pakattiin agarosin kera PEO-PDMS-muunnettuihin kuituihin, olivat samoin kapselin ontelopinnalla mutta muodoltaan pyöreitä. PEO-PDMS-muunnettuissa PAN/PVC-kuiduissa oli vähemmän soluja kuin muuntamattomissa agarosia sisältävissä kuiduissa, mikä osoittaa että solujen kasvu oli säädeltyä. Kuidun muuntaminen ei vaikuttanut VitrogenillaTM täytetyissä välineissä oleviin soluihin eikä myöskään ilman matriksia kapseloituihin soluihin.

VitrogenTM-matriksia sisältävissä muuntamattomissa kuiduissa olevat BHK-solut olivat hyvin jakautuneita ja elossa noin 75-prosenttisesti. Välineen keskellä esiintyi jonkin verran solunekroosia. PEO-PDMS-muuntaminen ei vaikuttanut solujen jakautumiseen, elinkykyyn eikä muotoon. Kun matriksina oli agarosi, solujen jakautuminen oli erinomaista ja niistä oli elossa noin 90 %. Kalvon PEO-PDMS-muuntaminen (1 % ja 5 %) vaikutti solujen muotoon, kun käytettiin agarosimatriksia. Solut olivat pitkänomai-

sia muuntamattomassa PAN/PVC:ssä ja pyöreämpiä muunnetussa PAN/PVC:ssä. Solut eivät sijoittuneet agarosimatriksiin vaan kuidun ja "agarosisauvan" väliseen tilaan. Ilman matriksia solujen jakautuminen on vähemmän tyydyttävää, 5 koska solut ovat muodostaneet suuria ryppäitä ja niiden elossaolosaste on alhaisempi, (noin) 60 %.

Esimerkki 10

BHK-solujen kasvu CultiSphersTM-kantajilla

Esimerkissä 7 kuvattujen kaltaisia NGF:ää erittäviä 10 BHK-soluja kasvatettiin kollageenilla päällystetyillä CultiSphersTM-kantajilla. CultiSphersTM-kantajat (1 g) hydratoitiin uudelleen 50 ml:ssa PBS:ää (CMF). Suspensoitiin $15 \cdot 10^6$ solua 1 ml:aan uudelleen hydratoituja CultiSphersTM-kantajia. Solu-CultiSphersTM-suspensio pakattiin suoraan 15 yhdellä pintakalvolla varustettuihin PAN/PVC-onttokuituihin tai sekoitettiin suhteessa 1:1 1-prosenttisen agarosin kanssa ja pakattiin sitten yhdellä pintakalvolla varustettuihin PAN/PVC-onttokuituihin. Kuidut valmistettiin suurin piirtein esimerkissä 2 kuvatulla tavalla, täytettiin ja suljettiin suurin piirtein esimerkissä 9 kuvatulla 20 tavalla.

Kapseloiduista soluista testattiin NGF-eritys ELISalla 2, 15 ja 56 päivän kuluttua. Alustaa täydennettiin kolmesti viikossa. Tulokset esitetään kuviossa 3. 25 NGF-vapautustulokset osoittavat, että BHK-solut pystyvät kasvamaan CultiSphersTM-mikrokantajilla BAO:ihin kapseloituina (kuvio 3, selitys: n-mat-008, 0709-n-m). NGF-vapautustulokset osoittavat lisäksi, että BHK-solu-CultiSphersTM-yhdistelmä voidaan suspensoida edelleen agarosimatriksiin vaikuttaen vähän tai ei ollenkaan NGF:n vapautukseen (kuvio 3, selitys: agaro-008, agaro-0709). 30

Esimerkki 11**Peptidijohdannaisen käyttö solujen lukumäärän ja jakautumisen säätelyyn**

Tässä esimerkissä BAO:n ontelopinta muunnettuun
 5 PEO-PDMS:llä, poly-d-lysiinillä tai PepTite 2000:llaTM,
 kaupallisesti saatavissa olevalla soluadheesioproteiinil-
 la.

Tässä tutkimuksessa käytettiin hamsterinpoikasen
 munuaissoluja (BHK-soluja), koska ne ovat ankkuroitumis-
 10 paikasta riippuvaisia soluja ja niiden on aiemmin osoitet-
 tu tarttuvan onttokuitukalvoon.

Kuidut

Valmistettiin yhdellä pintakalvolla varustettuja
 PAN/PVC-onttokuituja suurin piirtein esimerkissä 2 kuva-
 15 tulla tavalla. Kuitujen sisäläpimitta oli 625 μm ja seinä-
 mäpaksuus 50 μm . Nämä kuidut steriloitiin pitämällä niitä
 yön yli 70-prosenttisessa etanolissa ja huuhdottiin sitten
 useaan kertaan HBSS:llä.

Derivatisointi**20 1. PDMS-PEO:**

BAO:t derivatisoitiin PDMS-PEO:lla seuraavasti.
 Valmistettiin liuos, joka sisälsi 1 til-% PEO-PDMS:ää
 (Huls, PS073, M = 3126 g/mol; 82 paino-% PEO:ta), laimen-
 tamalla 1 ml PEO-PDMS:ää 100 ml:ksi deionisoidulla vedel-
 25 lä. Liuos steriloitiin suodattamalla (0,2 μm) ennen injek-
 tointia steriiliin kalvoon. Kalvoa pidettiin 1 % PEO-
 PDMS:ää sisältävässä vesipitoisessa liuoksessa 24 tuntia
 huoneenlämpötilassa. Kuidut huuhdottiin vedellä (kolmesti)
 ja sitten HBSS:llä ennen solujen injektointia.

30 2. PdL:

BAO:t derivatisoitiin poly-d-lysiinillä seuraavas-
 ti. Kuituja pidettiin 24 tuntia huoneenlämpötilassa vesi-
 pitoisessa liuoksessa, joka sisälsi 2 mg/ml poly-d-lysiiniä
 (moolimassa 67 000). Kuidut huuhdottiin kolmesti ve-

dellä ja sitten kolmesti HBSS:llä ennen solujen injektointia.

3. PepTite 2000TM:

5 BAO:t derivatisoitiin PepTite 2000TM:lla seuraavasti. Kuidut upotettiin PBS-liuokseen, joka sisälsi 100 mg/ml etanoliin ensin liuotettua PepTite 2000TM:a. Kuituja pidettiin tässä liuoksessa 24 tuntia huoneenlämpötilassa ja ne huuhdottiin sitten kolmesti PBS:llä ennen solujen injektointia.

10 4. PAN/PVC:

Vertailukuituja pidettiin 24 tuntia huoneenlämpötilassa HBSS:ssä ennen solujen injektointia.

Solut

15 BHK-soluja pakattiin derivatisoituihin kuituihin tiheydeksi 5 000 solua/ml. Kuidut suljettiin ja laitettiin kierrekorkilla varustettuihin putkiin, jotka sisälsivät seerumitonta alustaa (PC1-alusta), ja laitettiin putket sitten korkeintaan 2 viikoksi pyöritysrummulle inkubaattoriin, jonka lämpötila oli säädetty 37 °C:ksi. Rummun pyörimisnopeus oli 2 min⁻¹. Kuidut kiinnitettiin sopivalla hetkellä 4-prosenttisessä paraformaldehydissä, kuivattiin asteittain väkevämmässä etanolissa ja värjättiin hemato-

20 ksyliinillä ja eosiinilla (H&E) solujakautuman analysoimiseksi histologisesti osmiumtetroksidilla.

25 Solujen jakautuminen oli hyvä derivatisoiduilla PAN/PVC-kalvoilla, kun derivatisointi tehtiin poly-d-lysiinillä, ja yhtenäisempää, kun derivatisointi tehtiin PepTite 2000TM:lla, osmiumtetroksidivärjäyksellä määritettynä.

30 PAN/PVC-kalvoja yritettiin muuntaa PepTite 2000TM:lla kahdella tavalla. Ensin muunnettiin vain kalvojen sisäpuolinen ontelopinta ja toiseksi käsiteltiin sekä sisäpuolinen ontelopinta että ulkopinta. Tyhjistä (ts. soluja sisältämättömistä) BAO:ista analysoitiin kokonais-

35 aminohapot poly-d-lysiinin tai PepTite 2000TM:n sitoutumi-

sen määrittämiseksi. Muuntamattomiin vertailukalvoihin sitoutunut kokonaisaminohappomäärä oli noin 0,2 g/BAO. Poly-d-lysiinillä muunnettuihin kalvoihin sitoutunut kokonaisaminohappomäärä oli noin 0,8 g/BAO sisäpuoliselta ontelopinnaltaan muunnettujen kalvojen ollessa kyseessä ja noin 2,6 g/BAO sellaisten kalvojen ollessa kyseessä, joissa oli muunnettu sekä sisäpuolinen ontelopinta että ulkopinta. Samanlaisia BAO:ita, joihin oli pakattu BHK-soluja, säilytettiin 14 päivää ja tutkittiin ne sitten histologisesti. Muuntamattomissa vertailu-BAO:issa solut sijaitsivat epäyhtenäisesti suurina ryppäinä koko kuidun alueella pituussuunnassa. Kummassakin tyypissä muunnettuja kuituja solut olivat sen sijaan jakautuneina yhtenäisesti kalvon ontelopinnalle.

Nämä tulokset viittaavat siihen, että poly-d-lysiini ja PepTite 2000TM edistävät tehokkaasti solujen kiinnittymistä BAO:n ontelopintaan ja säätelevät siten tehokkaasti solujen jakautumista BAO:hon.

Esimerkki 12

ECM-molekyylien käyttö kantahermosolujen kasvun säätelyyn

Siirrostuserästä 71 saadut hiiren kantahermosolut preparoitiin suurin piirtein esimerkissä 1 kuvatulla tavalla. Monisyvennyksiset maljat esipäällystettiin 0,5-prosenttisella agarosilla (Sea-PrepTM), jotta estettiin kantahermosolujen tarttuminen muovimaljoihin. Soluja siirrostettiin suunnilleen tiheydeksi 50 000 solua/syvennys kohteessa käytettäviin matrikseihin. Kutakin matriksia kohden käytettiin kolme syvennystä; kaksi syvennyksistä sisälsi PC-1-alustaa (vertailu) ja yksi kantahermosoluja ynnä EGF-alustaa (EGF).

Tutkittiin ihoperäisen tyypin 1 kollageenin (ZydastTM; Collagen Biomedical, Palo Alto), jänneperäisen tyypin 1 kollageenin (OrganogenesisTM), tyypin 1 kollageenin (VitrogenTM, Celtrix, Santa Clara) ja agarosin tehok-

kuus solujen kasvun säätelyssä yksinään tai yhdistelmänä laminiinin tai PepTite 2000TM:n tai kummankin kanssa.

Solut analysoitiin 4 ja 14 päivän kuluttua värjäämällä fluoreseiinidiasetaatilla/propidiumjodidilla (FDA/PI) ja määrittämällä solujen elinkyky, kasvu ja erilaistuminen. Soluissa, jotka oli käsitelty OrganogenesisTM-kollageenin, PepTite 2000TM:n ja laminiinin yhdistelmällä, oli tapahtunut eniten erilaistumista, noin 90 % soluista oli erilaistunut. Noin 80 % soluista, jotka olivat olleet alttiina agarosin, PepTite 2000TM:n ja laminiinin yhdistelmälle, oli erilaistunut.

Esimerkki 13

Inertin telinerakenteen käyttö BHK-solujen lukumäärän ja jakautumisen säätelyyn BAO:ssa

Käytettiin kahta PAN-PVC-kuitutyyppiä (suunnilleen esimerkissä 2 kuvattujen kaltaisia): yhdellä pintakalvolla varustettua kuitua, jonka ulkopinnalla on selektiivisesti läpäisevä kalvo, ja yhdellä pintakalvolla varustettua kuitua, jonka sisäpinnalla on selektiivisesti läpäisevä kalvo.

Ensin poistettiin glyseroli PAN/PVC-kuiduista ja ne steriloitiin pitämällä niitä suodattamalla steriloidussa 70-prosenttisessa etanolissa yön yli. Sitten kuituja huuhdottiin steriilillä vedellä kolmesti noin 1 - 2 tuntia.

Seuraavaksi valmistettiin telinerakennematriksi, joka sisälsi 15 % polyhydroksietyylimetakrylaattia ("PHEMA"), liuottamalla 1,5 g PHEMA:a 10 ml:aan 95-prosenttista etanolia (190 proof, Quantum). Lisäksi valmistettiin telinerakennematriksi, joka sisälsi 10 % hydroksietyylimetakrylaatti-metyylimetakrylaattikopolymeeriä ("PHEMA/MMA"), liuottamalla 1,0 g PHEMA/MMA:a 10 ml:aan 95-prosenttista etanolia. Liuosta sekoitettiin ja kuumentettiin polymeerien liuotuksen helpottamiseksi.

PHEMA- tai PHEMA/MMA-liuokset syötettiin ruiskulla PAN/PVC-kuituihin, jotka upotettiin sitten steriiliin ve-

teen. Täytetyt kuidut jätettiin veteen 1 tunnin ajaksi, jotta varmistetaan telinerakenteiden saostuminen ja etanolin diffusoituminen pois ytimeistä. Kuitujen päät katkaistiin, koska ne olivat usein PHEMA:n tai PHEMA/MMA:n tukkimia. Kuidut siirrettiin steriiliä HBSS:ää sisältäviin petrimaljoihin. Tällä tavalla valmistettiin PHEMA:lla ja PHEMA/MMA:lla täytettyjä BAO:ita ja vertailu-BAO:ita.

Kasvatettiin NGF:ää erittäviä BHK-soluja (kuvattu esimerkissä 7) 10-prosenttisessa DMEM:ssä, johon oli lisätty glutamiinia ja antibiootteja. Solut poistettiin varovasti pulloista 0,25-prosenttisella trypsiiniliuoksella, pestiin ja suspendoitiin uudelleen PC1-alustaan tiheydeksi $1 \cdot 10^7$ solua/ml.

BHK-NGF soluja pakattiin kuituihin tiheydeksi 10 000 solua/ μ l käyttämällä Teflon-katetria nro 22. BAO:t suljettiin kuumapuristamalla.

Valmistettiin 5 kutakin tyyppiä olevaa BAO:ta. Neljä niistä laitettiin 24-syvennykseen maljaan, jossa oli 1 ml PC1-alustaa. Viides laitettiin noin 3 - 4 ml:aan PC1-alustaa pystysuoraan putkeen. Pystysuoraan putkeen laitetut BAO:t leikattiin 24 tunnin kuluttua auki pitkin ontelopintaa (pitkittäinen halkileikkaus) ja analysoitiin 24 tunnin kuluttua solujen jakautuminen kuituihin värjäämällä fluoreseiinidiasetaatilla/propidiumjodidilla (FDA/PI). Tarkasteltaessa fluoresenssimikroskoopilla FDA värjää elävät solut vihreiksi ja PI kuolleet solut punaisiksi.

Lopuuja BAO:ita kasvatettiin 2 viikkoa. BAO:ita pidettiin ympäristön O_2 -olosuhteissa 4 päivää kapseloinnin jälkeen ja sitten vähän O_2 :a sisältävässä [6,65 kPa (50 mmHg)] atmosfäärissä tutkimuksen ajan.

BHK-NGF-solujen toimivuus testattiin mittaamalla NGF-eritys (ELISalla) 4, 7 ja 14 päivän kuluttua. PHEMA- tai PHEMA/MMA-telinerakenteen sisältävissä BAO:issa olevat solut jatkoivat NGF:n erittämistä tutkimuksen ajan. Sekä histologiset että NGF-vapautustulokset osoittavat, että

PHEMA- ja PHEMA-MMA-telinerakenteet mahdollistavat pitkin BAO:ta jakautuneiden, funktionaalisesti aktiivisten elävien solujen ylläpitämisen. 10 % PHEMA-MMA:a sisältävillä telinerakenteilla saadut tulokset olivat parhaat.

5 **Esimerkki 14**

Inertin telinerakenteen käyttö PC12A-solujen lukumäärän ja jakautumisen säätelyyn BAO:ssa

Määritettiin inerttien PHEMA- ja PHEMA/MMA-telinerakenteiden tehokkuus BAO:issa olevien PC12-solujen jakautumisen säätelyssä.

Valmistettiin yhdellä pintakalvolla varustettuja kuituja suurin piirtein esimerkissä 2 kuvatulla tavalla. Näillä kuiduilla oli tyypillisesti seuraavat ominaisuudet: sisäläpimitta 642 μm , ulkoläpimitta 787 μm , seinämän paksuus 68 μm , hylkimiskerroin 100 % (BSA) ja vedenläpäisevyys 22 $\text{ml}/(\text{min} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{mmHg})$.

Näihin kuituihin valmistettiin inerttejä PHEMA- ja PHEMA/MMA-telinerakenteita suurin piirtein esimerkissä 13 kuvatulla tavalla.

20 HL-1-alustassa olevia PC12A-soluja ($1 \cdot 10^7$ solua/ml) injektoitiin kuitujen ontelotiloihin ja kuidut kuumasau-
mattiin, niin että syntyi noin 1 cm:n pituisia BAO:ita. Välineitä pidettiin lämpötilassa 37 °C ympäristössä val-
litsevissa paineolosuhteissa HL-1-alustassa. Kapseloitujen
25 solujen toimivuuden määrittämiseksi BAO:ista testattiin katekoliamiinin perusvapautuminen ja K^+ :lla herätetty va-
pautuminen 1, 14 ja 28 päivän kuluttua. Tulokset esitetään kuvioissa 4A ja 5A (perusvapautuminen) ja kuvioissa 4B ja
30 5B (K^+ :lla herätetty vapautuminen). Nämä tulokset osoitta-
vat, että inerttejä PHEMA- ja PHEMA/MMA-telinerakenteita sisältäviin BAO:ihin kapseloidut solut säilyttävät toimi-
vuutensa katekoliamiinivapautuksen kautta mitattuna.

Solujen jakautuminen BAO:ihin määritettiin 5 tunnin ja 4 päivän kuluttua leikkaamalla kuidut pystysuunnassa kahtia ja värjäämällä solut FDA:lla/PI:llä. Nämä tulokset

osoittivat, että PHEMA- ja PHEMA/MMA-telinerakenteet ovat myrkyttömiä ja tukevat PC12-solujen elinkykyä ja toimivuutta.

Esimerkki 15

5 **NWPF:n käyttö edistämään solujen adheesiota ja erilaistumista BAO:ssa**

 Kokeiltiin kuutta NWPF-tyyppiä (Reemay, Tennessee):
nro 2 470, nro 2 295, nro 2 024, nro 2 055, nro 2 033, nro
2 250 (Reemayn numeroita). Saatu kangas oli levyn muodos-
10 sa: siitä stanssattiin kiekkoja, jotka sopivat 24-syven-
nyksiin maljoihin. NWPF-kiekkoja pidettiin liuoksessa,
joka sisälsi 1 % (m/V) natriumdodekyylisulfaattia (SDS), 6
tuntia ja ne huuhdottiin sitten vedellä (3 kertaa). Sitten
kiekkoja pidettiin liuoksessa, joka sisälsi 1 til-% rik-
15 kihappoa vedessä, 13 tuntia (yön yli) ja ne huuhdottiin
sitten kolmesti vedellä. Kiekkojen annettiin kuivua pape-
ripyyhkeellä ja ne steriloiitiin sitten autoklaavissa.

 Kiekkoja viljeltiin 3 solutyypin kanssa solujen
adheesion testaamiseksi: BHK-, AT-3- ja TSA-solut. Lisät-
20 tiin noin 100 000 solua 24-syvennyksiseen maljaan, joka
sisälsi yhden edellä mainituista 6 NWPF-kiekosta PC1-alus-
tassa. Käytettiin seerumitonta alustaa solujen adheesion
testaamiseksi ilman seerumin aiheuttamia häiriöitä (TSA-
soluja lukuun ottamatta). BHK- ja AT-3-solujen adheesio
25 tutkittiin 4 päivän kuluttua PDA/PI-menetelmällä. Solujen
muoto oli pitkänomainen, ja ne näyttivät tarttuvan Reemay
nro 2 250:een ja nro 2 055:een. 10 päivän kuluttua BHK-
solut kasvoivat parhaiten nro 2 250:llä. AT-3-solut tart-
tuivat parhaiten nro 2 024:ään ja nro 2 295:een. AT-3-so-
30 lut kasvoivat parhaiten nro 2 024:llä 10 päivän kuluttua.
TSA-solut (10 % FCS:ää sisältävässä alustassa) olivat 1
päivän kuluttua muodoltaan pitkänomaisia, kun niitä kas-
vatettiin nro 2 250:llä ja nro 2 055:llä, ja ne kasvoivat
parhaiten nro 2 024:llä. 7 päivän kuluttua TSA-solut kas-
35 voivat parhaiten nro 2 055:llä.

Esimerkki 16**SV40/D β H-NGF-solut matriksimateriaaliin suspensoiduilla mikrokantajilla**

Hyödynnettiin dopamiini- β -hydroksylaasi (D β H) -geenin säätelyelementtejä [Hoyle et al., J. Neurosci. 14 (1994) 2455 - 2463] SV40:n T-antigeenin (tsa58) (D β H-SV) ja ihmisen kasvutekijän (D β H-hNGF) saattamiseksi ilmentymään rinnakkain transgeenisissä hiirissä. Näiden kimeeristen geenien rinnakkaisilmentyminen johti kasvaimiin lisämunuaisen ytimessä ja noradrenergisissä sympateettisissa ganglioissa. Yhden tällaisen hiiren vatsa-alueen kasvain leikattiin irti ja kasvainkudos hajotettiin mekaanisesti ja laitettiin kudosisäilytysliuokseen (DMEM, 10 % FBS:ää, 37 °C, 5 % CO₂:a). Viljelyjakson alkuvaiheesta lähtien läsnä oli kahta toisistaan erottuvaa solutyyppiä, suuria litteitä fibroblastimaisia soluja ja pieniä kirkasfaasisia soluja, joissa oli pitkiä neuriittihaarakkeita. Pienillä soluilla oli katekoliaminergisen hermosolun piirteitä, mukaan luetuna immuunireaktiivisuus neurofilamentti-L:n ja -M:n ja tyrosiinihydroksylaasin suhteen. Näissä soluissa esiintyi myös immuunireaktiivisuutta SV40:n T-antigeenin suhteen, toisin kuin fibroblastimaisissa soluissa, jotka olivat negatiivisia näiden markkereiden suhteen. Solut uusintasiirrostettiin viikottain.

Soluja kasvatettiin CultiSphersTM-kantajilla esimerkiksi 10 kuvatulla tavalla ja ne suspensoitiin joko alginaattia (1,5 %) tai agarosia (1 %) sisältävään matriksiin. Alginaattimatriksin ollessa kyseessä alginaatti silloitettiin pitämällä välineitä 5 min 1 % kalsiumkloridia sisältävässä vesipitoisessa liuoksessa kapseloinnin jälkeen. Solu-CultiSphersTM-matriksiyhdistelmä pakattiin PAN/PVC-onttokuituihin esimerkissä 10 kuvatulla tavalla.

Soluja sisältäviä BAO:ita pidettiin seerumittomassa alustassa. Valituin aikavälein välineet pestiin ennen 30 min kestävästä inkuboinnista HBSS:ssä. Perusalusta otettiin

talteen ja siitä määritettiin L-dopa HPLC-ED:llä. Välineet erittivät edelleen L-dopaa 80 päivän kuluttua *in vitro*.

Esimerkki 17

Geneettisesti muunnetut myoblastit erittävät NGF:ää erilaistumisen jälkeen

Hiiren C_2C_{12} -myoblastisolujen etuna on, että ne ovat nopeasti jakautuvia soluja, niitä voidaan viljellä suuria määriä *in vitro*, ne voidaan saattaa ilmentämään proteiineja ja voidaan eristää valittuja klooneja. Hiiren C_2C_{12} -solut voivat erilaistua jälkimitoottiseen tilaan oltuaan vähän seerumia sisältävän alustan vaikutuksen alaisina. Nämä solut ovat siten edullisia kapseloitaviksi verrattuina jakautuviin soluihin, joiden proliferaatiota ei pystytä säätelemään - viimeksi mainitut solut jatkavat jakautumista, kunnes ne täyttävät kapselin, ja muutaman kuukauden kuluttua havaitaan jätteen kerääntymistä.

Testasimme transfektoidun C_2C_{12} -myoblastisolulinjan kyvyn jatkaa hNGF:n eritystä, kun on tapahtunut fuusioituminen myoputkiksi.

C_2C_{12} -myoblastit (ATCC) transfektoitiin hNGF-geenillä käyttämällä Lipofectamine-reagenssia valmistajan (Gibco) ohjeiden mukaisesti. Soluja valikoitiin 2 viikon ajan G418:n (1 mg) läsnä ollessa ja testattiin sitten NGF-tuotanto. Solut siirrostettiin suunnilleen tiheyteen 260 solua/cm² T75-pulloihin ja peiteliuskoidilla varustettuihin tai varustamattomiin 24-syvennyksisiin maljoihin. Soluille annettiin kahdesti viikossa lisää DMEM:ää ja FBS:ää (10 %). Soluja otettiin talteen 1, 5, 8 ja 13 päivän kuluttua, jolloin mitattiin NGF-eritys. Tulokset esitetään taulukossa 2.

Taulukko 2

C₂C₁₂:n NGF-eritys ajan funktiona

	Solulinja	Viljely- aika	Yhteenkasva- minen (%)	Fuusioitu- minen (%)	NGF- eritys
5	Kanta	päivä 1 23.3.-95	25	0	nt
	+ NGF	päivä 1 23.3.-95	25	0	nt
	Kanta	päivä 5	40	0	nt
10	+ NGF	päivä 5	30	0	nt
	Kanta	päivä 8	98	5	***
	+ NGF	päivä 8	90	1	0,0018
	Kanta	päivä 10	1 000	80	ND
	+ NGF	päivä 13	100	50	0,014

15

Fuusioituminen (%) = myoputkiksi muotoutumassa olevien myoblastien prosentuaalinen osuus

"+ NGF" tarkoittaa hNGF-geenillä transfektoituja C₂C₁₂-soluja.

20

"Kanta" tarkoittaa transfektoimattomia C₂C₁₂-soluja.

NGF-erityksen mittayksikkönä on pg/(ml·solu·24 h).

nt = ei testattu

ND = ei havaittu

25

*Päivänä 8 solut ovat kasvaneet kooltaan ja valmistautu-
massa fuusioon.

*Päivänä 8 esiintyy enemmän fuusioitumista viljelymaljois-
sa kuin T-pulloissa (pulloille tehty virtausytometria).

30

Nämä tulokset viittaavaat siihen, että transfektoi-
dut myoblastit jatkavat halutun heterologisen tuotteen,
ts. NGF:n, tuottamista erilaistuttuaan lopullisesti myo-
putkiksi.

Esimerkki 18

Geneettisesti muunnetut myoblastit erittävät CNTF:ää erilaistumisen jälkeen

Transfektoimme hiiren C_2C_{12} -myoblasteja pNUT-ilmentymisvektorilla [Baetge, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 83 (1986) 5454 - 5458], joka sisälsi ihmisen CNTF-geenin. Määritimme hCNTF-geenin ilmentymistason ja tekijän biologisen aktiivisuuden Northern blot -menetelmällä, ELISA-määrityksellä ja mittaamalla ChAT-aktiivisuus alkion selkäytimen motoneuroniviljelmissä. Yhden C_2C_{12} -kloonin havaittiin erittävän noin 0,2 g CNTF:ää 10 solua kohden vuorokaudessa. nCNTF:n erittymisnopeus ei muuttunut C_2C_{12} -myoblastien erilaistuessa. C_2C_{12} -nCNTF pystyi myös pelastamaan motoneuroneja aksotomian aiheuttamalta solukuolemalta. Vastasyntyneiden rottien kasvotumakkeiden morfologinen tutkimus osoitti, että viikon kuluttua aksotomiasta vain 13,4 % kasvojen liikehermosoluista oli jäljellä vertailueläimissä, kun taas nCNTF:n jatkuva vapautuminen johti siihen, että 22,7 % motoneuroneista oli elossa.

Sekvenssilistaus**(1) YLEISET TIEDOT:**

- (i) HAKIJA: CytoTherapeutics, Inc.
- (ii) KEKSINNÖN NIMITYS: Keinotekoisii biologisiin-
välineisiinkapseloitujen solujen kasvun
säätely
- (iii) SEKVENSSIEN LUKUMÄÄRÄ: 4
- (iv) KIRJEENVAIHTO-OSOITE:
 - (A) VASTAANOTTAJA: James F. Haley, Jr.,
FISH & Meave
 - (B) KATU: 1251 Ave. of the Americas
 - (C) KAUPUNKI: New York
 - (D) OSAVALTIO TAI LÄÄNI: New York
 - (E) MAA: USA
 - (F) POSTINUMERO: 10020-1104
- (v) KONEKOODIMUOTO:
 - (A) VÄLINETYYPPI: Floppy-levyke
 - (B) TIETOKONE: IBM PC yhteensopiva
 - (C) KÄYTTÖJÄRJESTELMÄ: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) OHJELMISTO: PatentIn Release # 1.0,
version #1.25
- (vi) NYKYISEN HAKEMUKSEN TIEDOT:
 - (A) HAKEMUSNUMERO:
 - (B) JÄTTÖPÄIVÄMÄÄRÄ:
- (vii) ETUOIKEUSHAKEMUKSEN TIEDOT:
 - (A) HAKEMUSNUMERO: US 08/279 773
 - (B) JÄTTÖPÄIVÄ: 20.07.1994
- (viii) ASIAMIESTÄ KOSKEVAT TIEDOT:
 - (A) NIMI: Haley Jr., James F.
 - (B) REKISTERINUMERO: 27 794
 - (C) VIITE/LUETTELONUMERO: CTI-22 CIT PCT
- (ix) TIETOLIIKENNEYHTEYSTIEDOT:
 - (A) PUHELIN: (212) 596-9000
 - (B) TELEFAX: (212) 596-9090

(2) SEKVENSSIN NRO 1 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 - (A) PITUUS: 9 aminohappo
 - (B) TYYPPI: aminohappo
 - (C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
 - (D) TOPOLOGIA: lineaarinen

- (ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi
- (iii) HYPOTEETTINEN: ei
- (iv) ANTI-SENSE. ei
- (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 1:

Cys Asp Pro Gly Tyr Ile Gly Ser Arg
 1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 2 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 - (A) PITUUS: 6 aminohappoa
 - (B) TYYPPI: aminohappo
 - (C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
 - (D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi
- (iii) HYPOTEETTINEN: ei
- (iv) ANTI-SENSE: ei
- (xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 2:

Gly Arg Gly Asp Ser Pro
 1 5

(2) SEKVENSSIN NRO 3 TIEDOT:

- (i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:
 - (A) PITUUS: 19 aminohappoa
 - (B) TYYPPI: aminohappo
 - (C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen
 - (D) TOPOLOGIA: lineaarinen
- (ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi
- (iii) HYPOTEETTINEN: ei
- (iv) ANTI-SENSE: ei

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 3:

Cys Ser Arg Ala Arg Lys Gln Ala Ala Ser Ile Lys Val
 1 5 10

Ala Val Ser Ala Asp Arg
 15

(2) SEKVENSSIN NRO 4 TIEDOT:

(i) SEKVENSSIN OMINAISPIIRTEET:

(A) PITUUS: 5 aminohappoa

(B) TYYPPI: aminohappo

(C) JUOSTEISUUS: yksisäikeinen

(D) TOPOLOGIA: lineaarinen

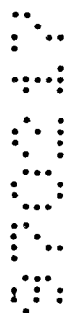
(ii) MOLEKYYLITYYPPI: Peptidi

(iii) HYPOTEETTINEN: ei

(iv) ANTI-SENSE: ei

(xi) SEKVENSSIN KUVAUS: SEKVENSSI NRO 4:

Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5



Patenttivaatimukset

1. Menetelmä keinotekoisessa biologisessa välineessä vallitsevan solujakautuman säätelemiseksi, t u n -
5 n e t t u siitä, että tehdään soluille käsittely, joka inhiboi solujen proliferaatiota tai edistää solujen erilaistumista ja joka käsittely vaikuttaa elävään isäntään istuttamisen jälkeen.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n -
10 n e t t u siitä, että käsittely käsittää solujen transformoinnin proliferaatiota edistävällä geenillä, joka on toiminnallisesti kytketty säädeltävissä olevaan promoottoriin, niin että pystytään inhiboimaan proliferaatiota edistävän geenin ilmentymistä elävään isäntään istuttamisen jälkeen.
15

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että proliferaatiota edistävä geeni on onkogeeni.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n -
20 n e t t u siitä, että käsittely käsittää solujen transformoinnin proliferaatiota heikentävällä geenillä, joka on toiminnallisesti kytketty säädeltävissä olevaan promoottoriin, niin että proliferaatiota heikentävän geenin ilmentyminen voi tapahtua elävään isäntään istuttamisen jälkeen, mutta sitä pystytään inhiboimaan *in vitro*.
25

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n -
n e t t u siitä, että proliferaatiota heikentävä geeni on kasvainsuppressorigeeni, jonka tulevat kyseeseen P53-geeni ja RB-geeni.

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n -
30 n e t t u siitä, että käsittely käsittää solujen transformoinnin erilaistumisen indusoivalla geenillä, joka on toiminnallisesti kytketty säädeltävissä olevaan promoottoriin, niin että erilaistumisen indusoivan geenin ilmenty-

minen voi tapahtua elävään isäntään istuttamisen jälkeen, mutta sitä pystytään inhiboimaan *in vitro*.

5 7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että erilaistumisen indusoiva geeni on liikkuvuudeltaan suureen ryhmään kuuluva kromosomaalinen proteiini 14.

10 8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käsittely käsittää solujen käsittelyn proliferaatiota inhiboivalla yhdisteellä tai erilaistumisen indusoivalla yhdisteellä.

15 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proliferaatiota inhiboivana yhdisteenä tai erilaistumisen indusoivana yhdisteenä tulevat kyseeseen forboliesteri, hepariini, TGF- β , askorbaatti, mitomysiini, BrdU, PGE₁, dbcAMP, Ara-C, nikotiiniamidi ja SGP.

20 10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käsittely käsittää solujen poistamisen proliferaatiota stimuloivan yhdisteen tai erilaistumista inhiboivan yhdisteen vaikutuksen alaisuudesta.

25 11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että proliferaatiota stimuloivana yhdisteenä tai erilaistumista inhiboivana yhdisteenä tulevat kyseeseen EGF, TGF- α ja amfireguliini ja solut ovat kantahermosoluja.

30 12. Menetelmä keinotekoisessa biologisessa väli-
neessä vallitsevan solujakautuman säätelemiseksi, t u n n e t t u siitä, että tehdään vähintään yhdelle keinotekoisien biologisen välineen sisällä olevalle kasvupinnalle käsittely, joka inhiboi solujen proliferaatiota tai edistää solujen erilaistumista ja joka käsittely vaikuttaa elävään isäntään istuttamisen jälkeen.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käsittely käsittää kasvupin-

nan päällystämisen vaikuttavalla määrällä vähintään yhtä solun ulkopuolista matriksimolekyyliä.

14. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käsittely käsittää solujen
5 suspendoinnin keinotekoisen biologisen välineen sisällä olevaan hydrogeelimatriksiin, joka matriksi on derivatisoitu proliferaatiota inhiboivalla tai erilaistumisen indusoivalla peptidillä tai peptidisekvenssillä.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen menetelmä,
10 t u n n e t t u siitä, että hydrogeelimatriksi koostuu agarosista, joka on derivatisoitu peptidisekvenssillä, jona tulevat kyseeseen RGD-pitoinen sekvenssi (ArgGlyAsp; sekvenssin nro 2 AA₂ - AA₄), YIGSR-pitoinen sekvenssi (TyrIleGlySerArg; sekvenssin nro 1 AA₅ - AA₉) ja IKVAV-pitoinen sekvenssi (IleLysValAlaVal; sekvenssin nro 3
15 AA₁₁ - AA₁₅).

16. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että käsittelyssä mikrokantajat
suspendoidaan keinotekoisen biologisen välineen sisään.

17. Menetelmä keinotekoisessa biologisessa väli-
20 neessä vallitsevan solujakautuman säätelemiseksi, t u n n e t t u siitä, että tehdään vähintään yhdelle keinotekoisen biologisen välineen sisällä olevalle kasvupinnalle käsittely, joka edistää solujen kiinnittymistä siihen.

18. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä,
25 t u n n e t t u siitä, että käsittely käsittää derivatisoinnin tai yhdisteen adsorboinnin kasvupinnalle, jona yhdisteenä tulevat kyseeseen poly-d-lysiini, RGD-pitoinen sekvenssi (ArgGlyAsp; sekvenssin nro AA₂ - AA₄), YIGSR-pitoinen sekvenssi (TyrIleGlySerArg; sekvenssin nro AA₅ -
30 AA₉) ja IKVAV-pitoinen sekvenssi (IleLysValAlaVal; sekvenssin nro AA₁₁ - AA₁₅).

19. Patenttivaatimuksen 17 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että käsittely käsittää inertin

telinerakenteen muodostamisen keinotekoisen biologisen välineen sisään.

20. Patenttivaatimuksen 19 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että inertti telinerakenne muodostetaan yhdisteestä, jona tulevat kyseeseen polyhydroksietyyylimetakrylaatti ja hydroksietyyylimetakrylaatti-metyyylimetakrylaattikopolymeeri.

21. Menetelmä keinotekoisessa biologisessa välineessä vallitsevan solujakautuman säätelymiseksi, t u n n e t t u siitä, että tehdään vähintään yhdelle keinotekoisen biologisen välineen sisällä olevalle kasvupinnalle käsittely, joka inhiboi solujen kiinnittymistä siihen.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käsittely käsittää derivatisoinnin tai PEO-PDMS:n adsorboinnin kasvupinnalle.

23. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että käsittely käsittää solujen saattamisen alttiiksi proliferaatiota inhiboivalle annokselle UV-säteilyä.

24. Keinotekoinen biologinen väline, t u n n e t t u siitä, että se käsittää

(a) biologisesti yhteensopivan, selektiivisesti läpäisevän vaipan;

(b) eläviä soluja käsittävän ytimen, joille soluille on tehty minkä tahana patenttivaatimuksista 1 - 23 mukainen käsittely, niin että pystytään säätelymään keinotekoisessa biologisessa välineessä vallitsevaa solujakautumaa elävään isäntään istuttamisen jälkeen.

25. Yhdistelmä-DNA-molekyyllillä transformoitu solu, t u n n e t t u siitä, että se käsittää

(a) proliferaatiota edistävän geenin, joka pystyy ilmentyessään indusoimaan solujakautumisen;

(b) proliferaatiota edistävään geeniin toiminnallisesti kytketyn Mx-1-promoottorin, jolloin mainittu solu voidaan indusoida proliferoitumaan saattamalla se sellai-

sen interferonimäärän vaikutuksen alaiseksi, joka on riittävä johtamaan proliferaatiota edistävän geenin ilmentymiseen.

5 26. Patenttivaatimuksen 25 mukainen solu, t u n n e t t u siitä, että proliferaatiota edistävä geeni on SV40:n suuri T-antigeeni.

 27. Siirtogeeninen nisäkäs, t u n n e t t u siitä, että se on transformoitu yhdistelmä-DNA-molekyyllillä, joka käsittää

10 (a) proliferaatiota edistävän geenin, joka pystyy ilmentyessään indusoimaan solujakautumisen;

 (b) proliferaatiota edistävään geeniin toiminnallisesti kytketyn Mx-1-promoottorin.

15 28. Patenttivaatimuksen 27 mukainen siirtogeeninen nisäkäs, t u n n e t t u siitä, että proliferaatiota edistävä geeni on SV40:n suuri T-antigeeni.

 29. Patenttivaatimuksen 27 mukaisen siirtogeenisen nisäkkään jälkeläiset.

20 30. Solu, t u n n e t t u siitä, että se on eristetty patenttivaatimuksen 27 tai 28 mukaisesta siirtogeenisestä nisäkkäästä.

 31. Menetelmä ehdollisesti immortalisoidun solun aikaansaamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se käsittää seuraavat vaiheet:

25 (a) transformoidaan solu yhdistelmä-DNA-molekyyllillä, joka käsittää proliferaatiota edistävän geenin, joka pystyy ilmentyessään indusoimaan solujakautumisen, ja proliferaatiota edistävään geeniin toiminnallisesti kytketyn Mx-1-promoottorin, niin että mainittu solu voidaan indu-

30 soida proliferoitumaan saattamalla se sellaisen interferonimäärän vaikutuksen alaiseksi, joka on riittävä johtamaan proliferaatiota edistävän geenin ilmentymiseen;

 (b) viljellään mainittua transformoitua solua.

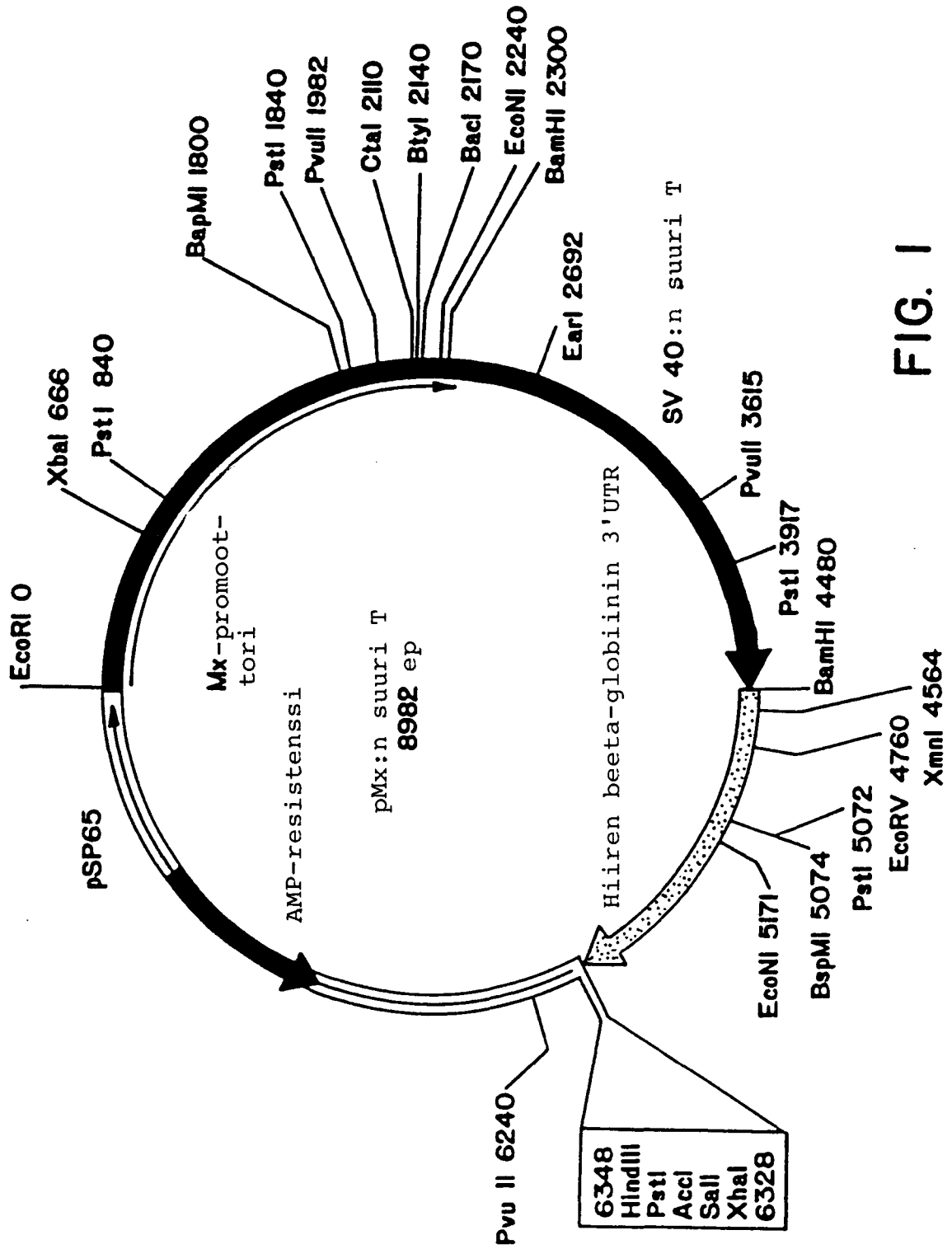


FIG. 1

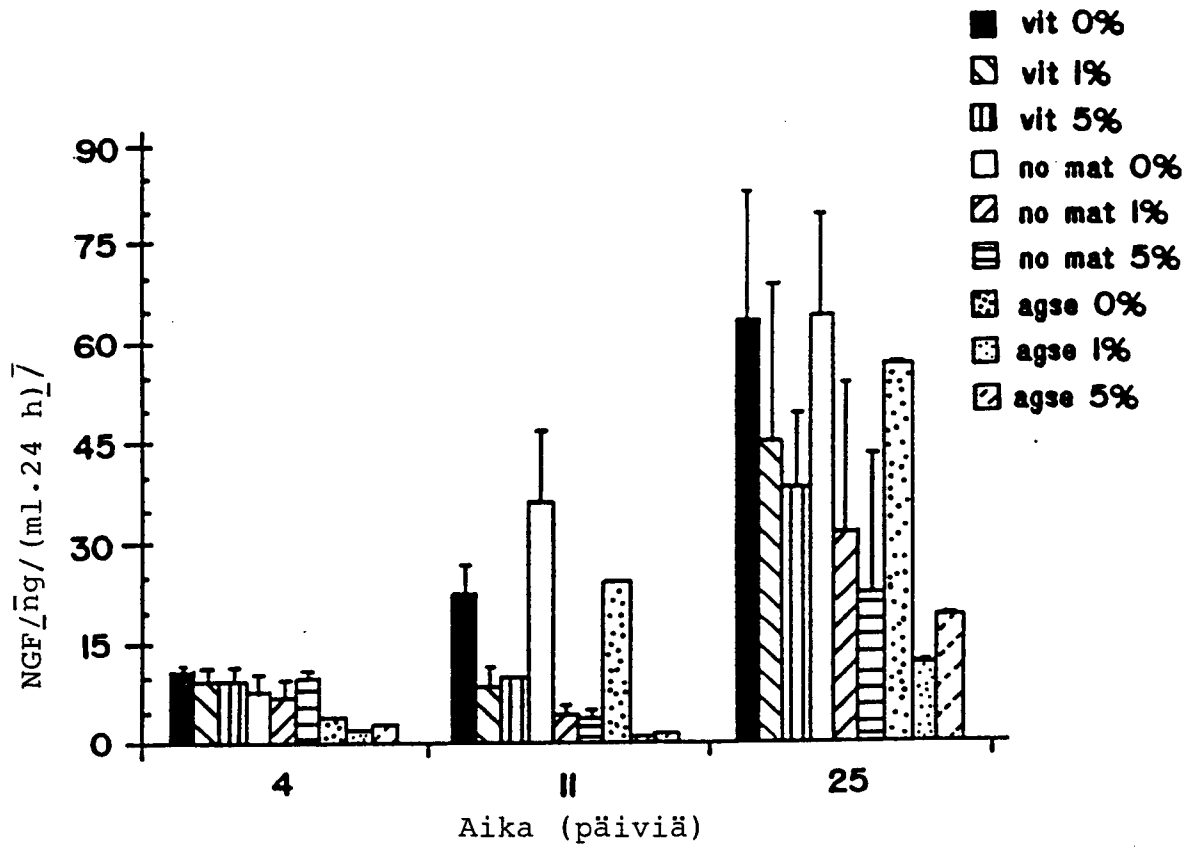


FIG. 2

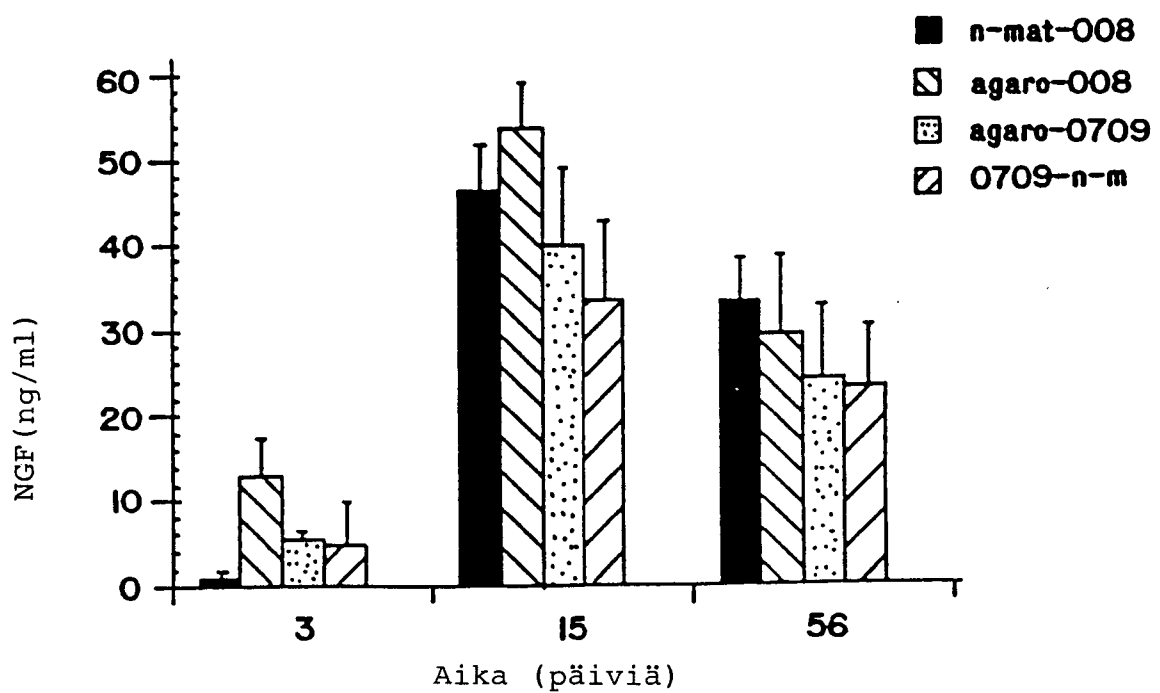


FIG. 3

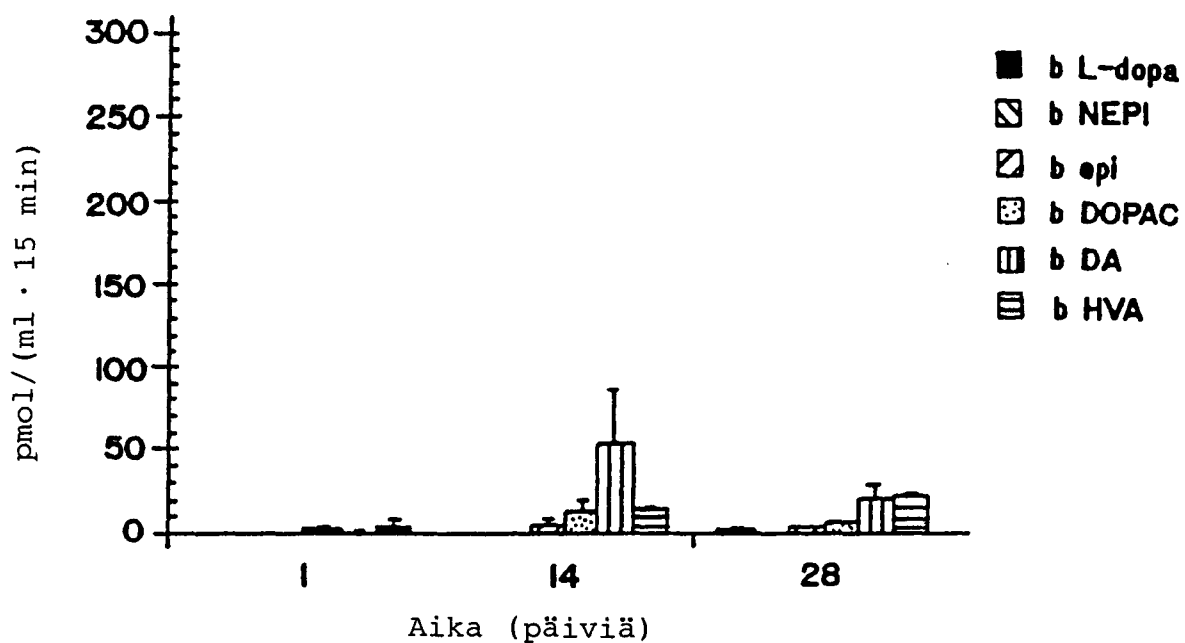


FIG. 4A

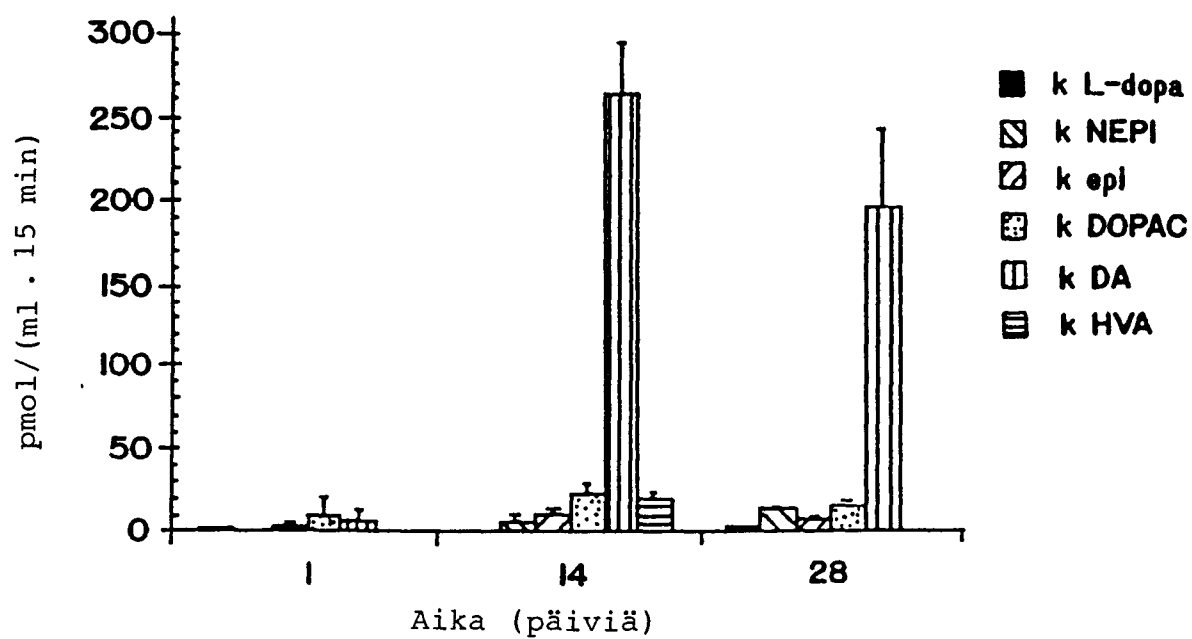


FIG. 4B

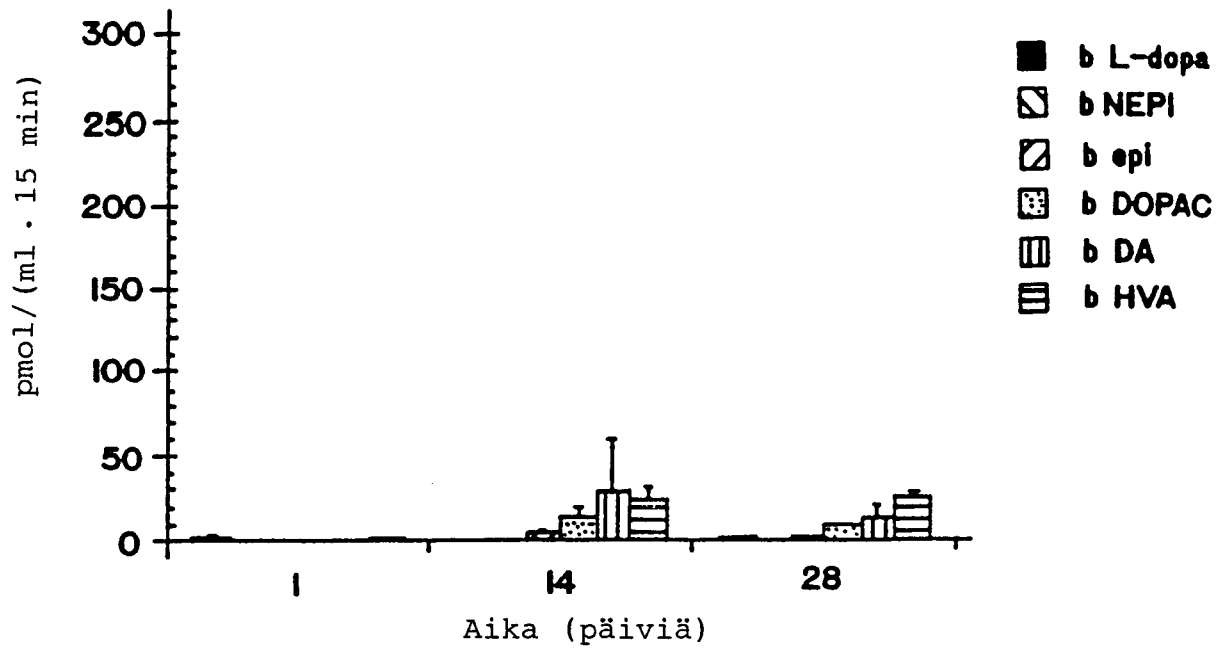


FIG. 5A

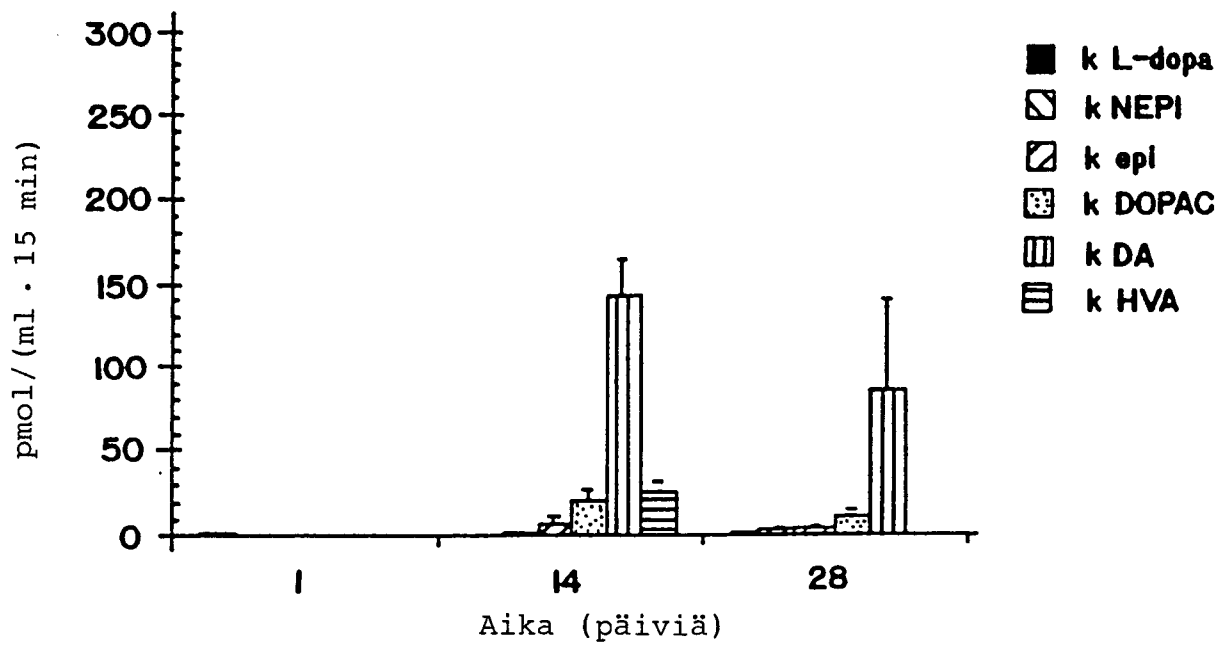


FIG. 5B

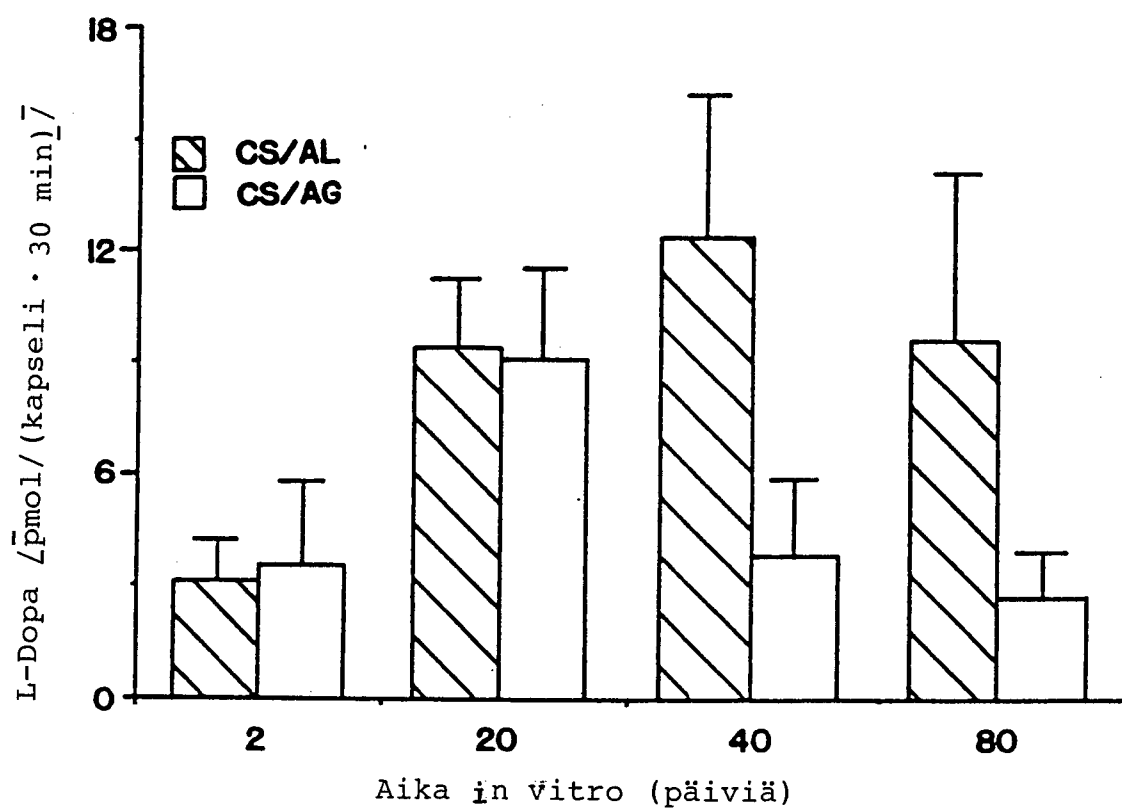


FIG. 6