



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **326107**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 48/00 (2006.01)

A61L 27/38 (2006.01)

A61F 2/02 (2006.01)

A61M 1/36 (2006.01)

A61K 47/42 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61K 9/50 (2006.01)

C07K 14/61 (2006.01)

A61L 27/24 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19981859	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1996.10.25 PCT/US96/17114
(22)	Inng.dag	1998.04.24	(85)	Videreføringsdag	1998.04.24
(24)	Løpedag	1996.10.25	(30)	Prioritet	1995.10.25, US, 548002
(41)	Alm.tilgj	1998.06.24			
(45)	Meddelt	2008.09.22			
(73)	Innehaver	Shire Human Genetic Therapies, Inc, 195 Albany Street, MA02139 CAMBRIDGE, US			
(72)	Oppfinner	Rochelle Mineau-Hanschke, Waltham, MA, US			
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO			

(54)	Benevnelse	Artikkel omfattende et legeme av matriksmateriale og blanding samt fremstilling derav, og fremgangsmåte for å produsere et polypeptid, fremgangsmåte for preservering av dyrkede virveldyrceller, samt ekstrakorporalt apparat.
(56)	Anførte publikasjoner	WO 9424298
(57)	Sammendrag	

En implanterbar anordning som har et legeme av matriksmateriale laget av uløselige kollagenfibriller, og plassert deri; (a) et større antall virveldyrceller; og (b) et større antall mikrokuler som hver består hovedsakelig av ett eller flere følgende materialer: Kollagen, polystyren, dekstran, polyakrylamid, cellulose, kalsiumalginat, lateks, polysulfon eller glass.

Foreliggende oppfinnelse vedrører artikkel omfattende et legeme av matriksmateriale og blanding samt fremstilling derav, og fremgangsmåte for å produsere et polypeptid, fremgangsmåte for preservering av dyrkede virveldyrceller, samt ekstrakorporalt apparat.

5

Bakgrunn for oppfinnelsen

De midler som anvendes til å avlevere medisinsk anvendelige substanser kan signifikant påvirke deres virksomhet. Den vanlige vei for administrering av mange slike substanser er enten oral, intravenøs eller subkutan. Hver av disse har iboende
10 begrensninger som kan påvirke den terapeutiske anvendelighet av de substanser som blir avgitt. Mange proteinbaserte legemidler har f.eks. kort halveringstid og lav biotilgjengelighet, faktorer som må tas i betraktning ved deres formulering og avgivelse. Selv om det er utviklet forskjellige anordninger for å avgi medisinsk anvendelige substanser, innbefattet bærbar pumper og katetere, er det fremdeles
15 et betydelig behov for forbedrede avgivelsesanordninger.

Mange medisinsk anvendelige substanser, innbefattet proteiner, glykoproteiner og noen peptid og ikke-peptid hormoner, blir mere effektivt fremstilt av dyrkede celler enn via kunstig syntetisk vei. Hensiktsmessige celler blir typisk dyrket i bioreaktorer, og det ønskede produkt renses derfra for administrering til pasienten
20 ved standard anordninger, f.eks.. oralt eller ved intravenøs eller subkutan injeksjon. Alternativt kan cellene implanteres direkte i pasienten, hvor de fremstiller og avleverer det ønskede produkt. Selv om denne fremgangsmåte har flere teoretiske fordeler sammenlignet med injeksjon av selve produktet, innbefattet den mulighet at normale cellulære tilbakekoplingsmekanismer kan utnyttes for å tillate avgivelse av et
25 fysiologisk hensiktsmessig nivå av produktet, vil den medføre ytterligere kompleksiteter. En av disse vedrører det hensiktsmessige miljø for cellene ved tidspunktet for implantering. Det ville være ønskelig å organisere cellene i implantatet i en form som er forlikelig med det naturlige *in vivo* miljø for den celletype som utgjør implantatet (f.eks.. eksisterer fibroblaster naturlig i et rikt nettverk av
30 ekstracellulær matriks sammensatt først og fremst av kollagen). Det er også behov i noen tilfeller for å sikre seg at de implanterte celler holder seg lokalisert på et definert sted i pasientens legeme, slik at de kan overvåkes og kanskje fjernes når de ikke lenger er nødvendige.

En teknikk som er blitt testet for dette formål, anvender en implanterings-anordning bestående av et fast enhetsstykke av kollagengel (en «kollagenmatriks») som cellene er innleiret i (f.eks. Bell, US-patent nr. 4.485.096). Andre substanser så som polytetrafluoretylen (PTFE) fibre (Moullier et al., Nature Genetics, 4:154, 1993; WO 94/24298) kan inkluderes i kollagenimplantatet for å gi styrke eller andre ønskelige egenskaper til kollagengelen.

Sammendrag av oppfinnelsen

Det er blitt funnet at funksjonen til kollagenmatrikser kan bli vesentlig forbedret ved tilsetning av mikrokuler til kollagenmatriksen, slik at det dannes det som her blir kalt en «hybridmatriks». Dette kan oppnås ved å blande mikrokuler med cellene og det løselige kollagen før gelering av kollagenet for å danne matriksen. Om ønsket kan mikrokulene og cellene dyrkes sammen i et tidsrom som tillater cellene å klebe seg til mikrokulene før tilsetning av den ikke-gelerte kollagenløsning; alternativt kan de tre bestanddeler blandes i alt vesentlig samtidig eller i hvilken som helst ønsket rekkefølge, etterfulgt av gelering av det løselige kollagen inne i blandingen, under dannelse av en gelert blanding bestående av uløselige kollagenfibriller, celler og mikrokuler. Denne gelerte blanding blir gradvis mindre gjennom utelukkelse av væske for å danne en fast, relativt elastisk, implanterbar enhet som inneholder både mikrokulene og cellene innleiret i det uløselige nettverk av kollagenfibriller. Når mikrokulene også er sammensatt hovedsakelig av kollagen, blir den heri resulterende matriks betegnet en «hybrid kollagenmatriks».

Foreliggende oppfinnelse vedrører således artikkel omfattende et legeme av matriksmateriale, kjennetegnet ved at det omfatter uløselige kollagenfibriller og plassert i legemet av matriksmateriale;

- (a) et større antall dyrkede virveldyrceller som er genetisk endret til å uttrykke et polypeptid; og
- (b) et større antall mikrokuler, hvor mikrokulene primært består av kollagen.

Virveldyrcellene kan omfatte pattedyrceller så som celler avledet fra et menneske, en sjimpanse, mus, rotte, hamster, marsvin, kanin, ku, hest, svin, geit, sau, hund eller katt.

Mikrokulene (eller perler) består hver hovedsakelig av (dvs. at mer enn 50% av dens tørre vekt er) en eller flere substanser valgt fra en liste innbefattet kollagen (fortrinnsvis type I kollagen), polystyren, dekstran, polyakrylamid, cellulose,

kalsiumalginat, lateks, polysulfon og glass (f.eks. glass belagt med en gel så som kollagen for å forbedre fastklebingen av celler). Generelt minst 70% og fortrinnsvis minst 80% (mest fortrinnsvis mellom ca 90% og ca 100%, f.eks. minst 95%) av hver mikrokules tørrvekt er en eller flere av de oppførte substanser. Kommersielle eksempler på mikrokuler som er beskrevet som bestående i alt vesentlig av rensset kollagen, inkluderer ICN CellagenTM perler og Cellex Biosciences makroporøse mikrokuler. Mikrokulene er fortrinnsvis av porøs konsistens, men kan være glatte, og typisk ha en omtrent sfærisk form med en diameter på ca 0,1 til 2 mm (f.eks. mellom 0,3 og 1 mm). Formen og størrelsen av mikrokulene fra en spesiell sats eller fremstilling vil naturligvis variere innenfor fremstillingstoleransene. Gjenstanden kan gis en form for å bli implantert i et dyr, f.eks. et pattedyr så som en menneskelig pasient, eller kan utformes for fremstilling av cellulære produkter *in vitro*; f.eks. i et ekstrakorporalt bioreaktorapparat som har en anordning for forbikopling av blod fra et dyr til gjenstanden og deretter tilbake i et av dyrets blodkar, eller i en bioreaktor eller annen beholder hvorifra medium inneholdende det ønskede cellulære produkt kan gjenvinnes for rensning og fremstilling av et farmasøytisk middel. Cellene kan være avledet fra en eller flere celler fjernet fra pasienten, og fortrinnsvis være transfekterte celler inneholdende eksogent DNA som koder for et eller flere medisinsk anvendelige polypeptider så som et enzym, hormon, cytokin, kolonistimulerende faktor, angiogenesefaktor, vaksineantigen, antistoff, levringsfaktor, regulatorisk protein, transkripsjonsfaktor, reseptor eller strukturelt protein. Eksempler på slike polypeptider inkluderer humant veksthormon (hGH), faktor VIII, faktor IX, erythropoietin (EPO), albumin, hemoglobin, alfa-1 antitrypsin, kalsitonin, glukocerebrosidase, lav tetthets lipoprotein (LDL) reseptor, IL-2 reseptor, globiner, immunoglobuliner, katalytiske antistoffer, interleukiner, insulin, insulinlignende vekstfaktor I (IGF-1), paratyroidhormon (PTH), leptin, interferonene, nervevekstfaktorer, basisk fibroblast vekstfaktor (bFGF), sur FGF (aFGF), epidermal vekstfaktor (EGF), endotel cellevekstfaktor, blodplateavledet vekstfaktor (PDGF), transformerende vekstfaktorer, endotelcellestimulerende angiogenesefaktor (ESAF), angiogenin, vevsplasminogen aktivator (t-PA), granulocyt kolonistimulerende faktor (G-CSF) og granulocytmakrofag kolonistimulerende faktor (GM-CSF). Alternativt kan det eksogene DNA være en regulatorisk sekvens som vil aktivere ekspresjon av et endogent gen (f.eks. ved anvendelse av homolog rekombinasjon som beskrevet i WO 94/12650-PCT/US93/11704, som er inkorporert ved referanse heri).

Generelt kan hvilken som helst type av celle som er i stand til å feste seg til kollagen og/eller mikrokulene, og som har en ønskelig egenskap så som ekspresjon av et medisinsk anvendelig cellulært produkt eller yteevne av en essensiell strukturell eller metabolsk funksjon, bli anvendt i matriksene ifølge denne oppfinnelse.

- 5 Eksempler inkluderer adipocytter, astrocytter, hjertemuskelceller, kondrocytter, endotelceller, epitelceller, fibroblaster, gangliocytter, kjertelceller, gliale celler, hematopoietiske celler, hepatocytter, keratinocytter, myoblaster, neurale celler, osteoblaster, bukspyttkjertel beta-celler, nyreceller, glatte muskelceller og tverrstripede muskelceller, så vel som forløpere for hvilken som helst av ovennevnte.
- 10 Om ønsket kan mer enn en celletype være inkludert i en gitt matriks. Cellene kan være tilstede som klonale eller heterogene populasjoner.

- Kollagenet i matriksmaterialet er fortrinnsvis type I, men kan være hvilken som helst annen type av kollagen. Matriksmaterialet kan eventuelt inkludere to eller flere typer av kollagen (f.eks. valgt fra typene I, II, III, IV, V, VI VII, VIII, IX, X og XI), så vel
- 15 som hvilke som helst ytterligere komponenter som gir ønskelige egenskaper til den resulterende matriks, f.eks.. agarose, alginat, fibronectin, laminin, hyaluronsyre, heparansulfat, dermatansulfat, kondroitin sulfat, sulfaterte proteoglykaner, fibrin, elastin eller tenasin. Hvilken som helst av de ovenfor nevnte kollagen eller ikke-
- 20 kollagen komponenter kan være avledet fra humane kilder eller fra en annen dyrekilde. Man kunne også inkludere kollagen eller ikke-kollagen fibre plassert inne i anordningen. Slike fibre kan f.eks.. være laget av et materiale som inkluderer nylon, dakron, polytetrafluoretylen, polyglykolsyre, polymelkesyre/polyglykolsyre polymerblandinger, polystyren, polyvinylklorid kopolymer, cat gut, bomull, lin, polyester eller silke.

- 25 Et stort antall celler kan inneholdes i de hybride matrikser. For eksempel kan det fremstilles hybride matrikser som inneholder minst ca to (og fortrinnsvis ca tre) ganger så mange celler som matrikser fremstilt med løselig kollagen alene, idet det antas at antallet inokulerte celler og det opprinnelige produksjonsvolum er likeverdige. Den samlede mengde av polypeptid som uttrykkes av cellene innleiret i
- 30 en gitt hybridmatriks i et gitt tidsintervall vil typisk være signifikant høyere (f.eks.. minst 50% høyere, fortrinnsvis minst 100% høyere, og mere fortrinnsvis 200% høyere) enn oppnådd med en standard kollagenmatriks av tilsvarende volum.

Foreliggende oppfinnelse vedrører følgelig også en blanding kjennetegnet ved at den omfatter

- (a) et større antall dyrkede virveldyrceller som er genetisk endret til å uttrykke et polypeptid, og
- (b) et større antall mikrokuler hvor, mikrokulene primært består av kollagen og
- (c) en kollagenløsning.

5 Det er også beskrevet en blanding kjennetegnet ved at den omfatter, suspendert i en vandig kollagen løsning,

- (a) et større antall dyrkede virveldyrceller som er genetisk endret til å uttrykke et polypeptid, og
- (b) et større antall mikrokuler, hvor mikrokulene primært består av kollagen.

10 Foreliggende oppfinnelse vedrører videre en fremgangsmåte for fremstilling av artikkelen ifølge ethvert av kravene 1-19, kjennetegnet ved

at den danner en blanding omfattende (a) et større antall dyrkede virveldyrceller som er genetisk endret til å uttrykke et polypeptid; (b) et større antall mikrokuler; og (c) en løsning omfattende løselig kollagen;

15 utsette det løselige kollagen i blandingen for betingelser effektive for dannelse av en gel; og

å eksponere gelen for dyrkingsbetingelser som forårsaker at gelen vil trekke seg sammen, og derved danne preparatets legeme.

20 Den hybride matriks ifølge denne oppfinnelse fremstilles følgelig generelt ved en framgangsmåte som inkluderer følgende trinn:

å danne en blanding som inkluderer (a) et større antall virveldyrceller; (b) et større antall mikrokuler som hver består hovedsakelig av en eller flere substanser valgt fra listen bestående av kollagen, polystyren, dekstran, polyakrylamid, cellulose, kalsiumalginat, lateks, polysulfon og glass; og (c) en løsning omfattende løselig

25 kollagen;

å få det løselige kollagen i blandingen til å danne en gel av uløselige kollagenfibriller som cellene og mikrokulene er innleiret i; og

30 å utsette gelen for kulturbetingelser som får gelen til å bli mindre ved å utelukke væske under dannelse av gjenstandens kropp. Gelingen blir typisk utløst ved å heve pH av den relativt sure kollagenløsning til over 5, f.eks. ved tilsetning av konsentrert, bufret dyrkningsmedium, hvorpå kollagenet danner uløselige fibriller. Når dette trinn blir utført i en form, vil gelen ta form av støpeformens indre. Vanligvis blir kontraksjonen av gelen forårsaket av cellene i blandingen som fester seg til fibrillene og gjør at den trekker seg sammen til en mindre utgave av den støpte form

(f.eks. en skive, som i det tilfellet hvor formen er en petrisk skål som er sylindrisk i form). Matriksen kan anvendes umiddelbart etter fremstillingen, kan dyrkes for å øke antallet celler tilstede i matriksen eller for å forbedre deres funksjon, eller kan bevares i frossen tilstand i det uendelige ved en temperatur under 0°C.

- 5 Et medisinsk anvendelig polypeptid, slik som et oppført ovenfor, kan avgis til en pasient ved en behandlingsfremgangsmåte som involverer å tilveiebringe en hybrid matriks inneholdende celler som sekreterer polypeptidet av interesse, og implantere gjenstanden i pasienten på et uvalgt sted, slik som et subkutant, intraperitonealt, subrenalt kapsulært, inguinalt, intramuskulært eller intratekalt sted.
- 10 Hvor polypeptidet er et som befordrer sårheling (f.eks. PDGF eller IGF-I), kan matriksen implanteres på stedet for et på forhånd eksisterende sår. Som diskutert ovenfor kan cellene være avledet fra en eller flere celler fjernet fra pasienten, og blir fortrinnsvis transfektert *in vitro* med eksogent DNA som koder for polypeptidet. Alternativt kan det være celler som naturlig utskiller polypeptidet eller utfører den
- 15 ønskede metaboliske funksjon (f.eks. hepatocytter eller beta-celler i bukspyttkjertelen).

- I en annen utførelse kan det medisinsk anvendelige polypeptid administreres til pasienten ved å forbikople en del av pasientens blod gjennom apparatet beskrevet ovenfor, slik at polypeptidet utskilt av cellene i den hybride matriks vil blande seg
- 20 med blodet. Generelt kan hvilket som helst slikt apparat kjent for fagfolk på dette området bli tilpasset til å ta imot matriksen ifølge denne oppfinnelse. For eksempel vil blod forbikoplet inn i en anordning som inneholder en permselektiv membran som omgir en matriks ifølge den foreliggende oppfinnelse, resultere i avgivelse av et terapeutisk produkt av matriksen til blodet. En anordning i likhet med en kunstig
- 25 bukspyttkjertel (Sullivan et al., Science 252:718-721, 1991) kan anvendes for dette formål.

Foreliggende oppfinnelse vedrører følgelig en fremgangsmåte for å produsere et polypeptid, kjennetegnet ved at den omfatter

- å tilveiebringe artikkelen ifølge ethvert av kravene 1-20, eller kravene 26-34,
- 30 under betingelser hvor de dyrkede virveldyrcellene kan uttrykke og sekretere polypeptidet,

å kontakte artikkelen med en væske slik at de dyrkede virveldyrcellene sekreterer polypeptidet ut i væsken,

å oppnå polypeptidet fra væsken.

Ytterligere en annen anvendelse for de hybride matrikser ifølge denne oppfinnelse er følgelig som en anordning for fremstilling av et polypeptid *in vitro*. Denne fremgangsmåte inkluderer trinn for å plassere den hybride matriks under betingelser hvorved cellene i matriksen uttrykker og utskiller polypeptidet; og bringer matriksen i kontakt med en væske slik at cellene utskiller polypeptidet i væsken; og å fremstille polypeptidet fra væsken, f.eks. ved standard renseteknikk hensiktsmessig for det gitte polypeptid. I en utførelse er matriksen forankret til en overflate og blir badet i væsken; alternativt kan matriksen flyte fritt i væsken. Celler innleiret i den hybride matriks vil fungere ved et høyt nivå i et lite volum. Videre vil det første trinn i rensningen av det uttrykte polypeptid (fjerning av cellene fra mediet) være betydelig mere effektivt med matriksene enn med de fleste standardmetoder for cellekulturer.

Foreliggende oppfinnelse vedrører følgelig videre fremgangsmåte for preservering av dyrkede virveldyrceller, kjennetegnet ved at den omfatter å tilveiebringe artikkelen ifølge ethvert av kravene 1-19 eller 26-34, og lagre gjenstanden ved en temperatur under 0 °C.

Det er også beskrevet et ekstrakorporalt apparat, kjennetegnet ved at det omfatter artikkelen ifølge ethvert av kravene 1-19, eller kravene 26-34, og utstyr for å sjalte blod fra et dyr til artikkelen og så tilbake inn i en blodåre til dyret.

Foreliggende oppfinnelse vedrører videre anvendelse av en artikkel eller blanding ifølge ethvert av kravene 1-19 eller 26-34, for fremstilling av et medikament for administrering av polypeptidet til en pasient i behov derav.

Andre trekk og fordeler ifølge denne oppfinnelse er åpenbare ut i fra kravene, og fra den detaljerte beskrivelse som tilveiebringes nedenfor.

Kort beskrivelse av tegningene

Fig. 1 er et kart av hGH ekspresjonsplasmid pXGH302.

Fig. 2 er et delvis snitt sett ovenfra av en utførelse ifølge oppfinnelsen.

Fig. 3 er et diagram som viser *in vivo* hGH-nivået i nakne mus implantert med enten en kollagenmatriks eller en hybrid kollagenmatriks inneholdende HF165-24 celler, humane hudfibroblaster stabilt transfektert med pXGH302 og som uttrykker hGH.

Detaljert beskrivelse

Eksemplene fremsatt nedenfor illustrerer flere utførelser av oppfinnelsen. Disse eksempler er utelukkende for illustrasjonsformål, og er ikke ment å være begrensende.

5

Eksempel 1

Dette eksempel beskriver fremgangsmåtene som anvendes til å fremstille en klonal cellestamme av humane fibroblaster stabilt transfektert med plasmidet pXGH302 som utskiller rekombinant humant veksthormon (hGH), og til å kombinere dem med porøse kollagenmikrokuler i en hybrid matriks ifølge oppfinnelsen. Slike matrikser blir referert til som hybride kollagenmatrikser (HCM).

10

A. Dannelse av primære humane fibroblaster som uttrykker humant veksthormon

15

Fibroblaster ble isolert fra friskt utskårne forhuder fra menn ved en enzymatisk dissosieringsteknikk. Etter konfluens ble primære kulturer løsnet fra den plastiske overflate ved mild trypsinisering, fortynnet og platet ut igjen for å frembringe den sekundære cellekultur for transfeksjon.

20

Plasmid pXGH302 ble konstruert som beskrevet i eksempel II, og transfeksjon ble utført ved elektroporasjon, en fremgangsmåte hvori cellene blir oppslemmet i en løsning av plasmid-DNA, plassert mellom et par av motsatt ladede elektroder, og underkastet en kort elektrisk puls.

25

Behandlede celler ble utvalgt i G418-holdig medium i 10-14 dager. Celler som integrerte plasmidet i sine genomer, kunne stabilt uttrykke produktet av *neo*-genet og dannet kolonier motstandsdyktige mot dreping av neomycinanalogen G418. Hver koloni bestående av en klonal populasjon av celler, ble enkeltvis fjernet fra sin posisjon på vevskulturskålen ved trypsinisering. De kloner som skåret positivt for hGH-ekspresjonen ble ekspandert for kvantitative analyser, og klon HF165-24 ble valgt for videre anvendelse.

30

Ytterligere detaljerte fremgangsmåter for fremstilling og transfektering av celler egnet for anvendelse i matriksene ifølge denne oppfinnelse tilveiebringes i WO93/09222 (PCT/US92/09627).

B. Fremstilling av hybride kollagenmatraker

1. Fremstilling av mikrokuler

Kollagenmikrokuler (Cellex Biosciences kat.nr. YB00-0015UW) ble overført fra hver originalflaske levert av produsenten (ca 10 ml pr flaske) over i 50 ml koniske rør (1 rør pr flaske). Mikrokulene fikk sedimentere i røret, og lagringsbufferløsningen ble suget av. Mikrokulevaskemedium (DMEM med 1% kalveserum og 1% penicillin/streptomycin) ble tilsatt til 50 ml merket på det graderte rør, mikrokulene fikk sedimentere, og mediet ble suget av. Denne serie med vasketrinn ble gjentatt for tilsammen 4 vaskinger. Mikrokulene ble overført til en 250 ml Erlenmeyer-kolbe ved anvendelse av en 25 ml plastpipette, mens volumet av mikrokuler ble begrenset til 100 ml pr 250 kolbe. Mikrokulevaskemediet ble tilsatt til 250 ml merket, og kolben ble lukket og plassert i en vevskulturinkubator ved 37°C i 2-3 timer. Kolben ble fjernet fra inkubatoren, mikrokulene fikk sedimentere, og vaskemediet ble suget av. Denne serie av inkuberings- og vasketrinn ble gjentatt for tilsammen 3 vaskinger.

2. Fremstilling av hybrid kollagenmatraker

Cellene og mikrokulene ble blandet sammen rett før tilsetning av kollagenløsningen. Vaskede mikrokuler ble tilsatt til 15 ml graderte koniske rør til det ønskede volum (volum = antall matraker multiplisert med 1 ml; se tabell 1). Mikrokulene fikk sedimentere i minst 10 minutter før måling av volumet. Overskudd av vaskemedium ble fjernet ved avsuging.

Cellene som skulle innleires i matraksen ble høstet ved trypsinisering, og celleantallet ble bestemt. Det nødvendige antall celler (antall celler pr matraks multiplisert med det totale antall matraker som skal fremstilles) ble sentrifugert ved 1500 opm (500xg) i 7 minutter ved romtemperatur. I et polypropylenrør med konisk bunn og med hensiktsmessig størrelse ble det fremstilt en blanding av like store volumer av modifisert 2x DMEM (2x DMEM med 9 g/l glukose, 4 mmol L-glutamin, og 22,5 mmol HEPES) og kalveserum ifølge tabell 1. (Bemerk: For volumer større enn 250 ml må det totale sammenslåtte volum oppdeles på rør med hensiktsmessig størrelse. Cellepelletten ble slemmet opp igjen i 2x DMEM-kalveserumblandingen. Kollagenmikrokulene ble blandet med cellesuspensjonen ved tilsetning av 1-2 ml av cellesuspensjonen til de pakke mikrokuler og deretter overføring av de konsentrerte mikrokuler med 10 ml pipette til den gjenværende cellesuspensjon,

etterfulgt av forsiktig blanding med pipetten. Blandingen ble plassert på is, og det hensiktsmessige volum av kollagenløsning ble tilsatt (rottehaletype I kollagen; UBI kat.nr. 08-115, fortynnet til en konsentrasjon på 4,0 mg/ml i 0,02 mol eddiksyre), som angitt i tabell 1. Innholdet av røret ble forsiktig blandet (ved å unngå å danne bobler eller skumming) ved anvendelse av en 10 ml glasspipette, inntil matriksløsningen syntes homogen.

For å fremstille matriksen ble et hensiktsmessig volum av kollagen/celle-/mikrokule/mediumblandingen tilsatt til en steril petriskål med en pipette (10 eller 25 ml kapasitet), i overensstemmelse med det totale volum pr skål oppført i tabell 1.

(Blandingen ble omrørt ved leilighetsvis pipettering under fyllingen av skålene for å forhindre sedimentering av celler eller mikrokuler). De fylte skåler ble plassert i en vevskulturinkubator ved 37°C, 5% CO₂, 98% relativ fuktighet og etterlatt uforstyrret i ca 24 timer, hvorunder innholdet gelerte og størrelsen av gelen avtok i alle dimensjoner under dannelse av de hybride matrikser ifølge oppfinnelsen, som var ca 50% av diameteren og 10% av volumet av den ikke-gelerte blanding.

En utførelse av den hybride matriks ifølge oppfinnelsen er illustrert i fig. 2. Matriksen 10 består av et sammentrukket kollagengellegeme 12 hvori det er innleiret virveldyrceller 14 og mikrokuler 16. For klarhet i denne figur er cellene vist som prikker adskilt fra mikrokulene. I virkeligheten ville de fleste av cellene være ventet å være festet til mikrokulene, og ville være betydelig mindre enn representert i figuren.

Tabell 1 Medium-, mikrokuler- og kollagenvolumer nødvendige for HCM-fremstilling

Skål str.	Antall matrikser	Modifisert 2x DMEM	Serum	Mikro-kuler	Kollagen løsning vol.	Totalt
60 mm	1	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	4 ml
60 mm	12	12 ml	12 ml	12 ml	12 ml	48 ml
100 mm	1	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	10 ml
100 mm	12	30 ml	30 ml	30 ml	30 ml	120 ml
150 mm	1	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	30 ml
150 mm	12	90 ml	90 ml	90 ml	90 ml	360 ml

Eksempel II

pXGH302 ble konstruert ved subkloning av det 6,9 kb *Hind*III fragment som strekker seg fra posisjonene 11.960-18.869 i den humane HPRT-sekvens (Edwards et al., *Genomics*, 6:593-608, 1990; Genbank entry HUMHPRTB) og inkluderer
 5 eksonene 2 og 3 av HPRT-genet, inn i *Hind*III-setet av pTZ18R (Pharmacia P-L Biochemicals, Inc.). Det resulterende klon ble spaltet i det unike *Xho*I-setet i ekson 3 av HPRT-genfragmentet, og det 1,1 kb *Sal*I-*Xho*I-fragment inneholdende *neo*genet fra pMC1Neo (Stratagene) ble innsatt under sprengning av kodesekvensen for ekson 3. En orientering, med retningen av *neo*-transkripsjonen motsatt den for HPRT, ble
 10 valgt og betegnet pE3neo.

For å kombinere hGH-genet ble HPRT-sekvensene, og neogenet i det samme plasmid, pXGH5 (Selden et al., *Mol. Cell. Biol.* 6:3173-3179, 1986) spaltet med *Eco*RI, og 4,0 kb fragmentet inneholdende hGH-genet og bundet mus metallotionein-I (mMT-I) promotoren ble isolert. *Exo*RI overhengene ble ifyllt med Klenow-
 15 fragmentet fra *E. coli* DNA polymerase. pE3Neo ble spaltet med *Xho*I, som kutter ved koplingen av neofragmentet og HPRT ekson 3 (3'-koplingen av innskuddet inn i ekson 3). De *Xho*I overhengende ender av det lineæriserte plasmid ble ifyllt med Klenow-fragmentet fra *E. coli* DNA polymerase, og det resulterende fragment ble ligert til det 4,0 kb buttendede mMT/hGH-fragment. Bakteriekolonier avledet fra
 20 ligeringsblandingen ble screenet ved restriksjonsenzymanalyse for en enkelt kopiinnsetting av mMT-I/hGH-fragmentet. En subklon hvori hGH-genet er transkribert i samme retning som neogenet, ble betegnet pXGH302. Et kart av plasmid pXGH302 er vist i fig. 1. I denne figur er posisjonen og orienteringen av den hGH-kodede region og av mus metallotionein-I promoteren (mMT-I) som kontrollerer
 25 hGH-ekspresjonen, bemerket. Posisjonene av de basale promoterelementer (TATA), transkripsjonsinitieringssetene (CAP), og translasjonsinitieringssetene (ATG) er angitt. Som illustrert blir neogentranskripsjonen kontrollert av polyomaenhancer/herpes simplex virus (HSV) tymidinkinase (TK) genpromoter. HPRT betegner posisjonene av sekvenser fra det humane
 30 hypoksantinguaninfosforibosyltransferaselokus. Plasmid pXGH302 anvender pTZ18R (Pharmacia P-L Biochemicals, Inc.) hovedkjeden, et derivat av plasmid pUC18 (Yanisch-Perron et al., *Gene* 33: 103-119, 1985) som har en T7 RNA polymerasepromoter og f1 replikasjonsstartstedet.

Eksempel III

Dette eksempel illustrerer en fremgangsmåte for fremstilling av en hybrid kollagenmatriks hvori transfekterte celler fremstilt som beskrevet ovenfor, blir fordyrket med mikrokulene før dannelse av den hybride kollagenmatriks. Slike «fordyrkede» hybrid kollagenmatrikser blir referert til som PCHCM.

A. Forkultur av celler og mikrokuler

Trypsiniserde transfekterte celler blir utsådd på vaskede kollagenmikrokuler i et forhold på 2×10^6 celler pr ml mikrokuler (f.eks. 10×10^6 celler på 5 ml mikrokuler) etter følgende protokoll:

1. Det tilsettes celleduspensjon i et volum av vekstmedium som er to ganger volumet av mikrokulene til en 125 ml Erlenmeyer-kolbe. Grensen er 10 ml mikrokuler pr kolbe.
2. Det fjernes 1-2 ml av denne suspensjon og tilsettes til 5 ml (pakket volum) mikrokuler på forhånd utmålt i et 15 ml rør.
3. Celleduspensjon/mikrokuler overføres tilbake til 125 ml Erlenmeyer-kolben.
4. Kolben plasseres i vevskulturinkubator og omvirkles forsiktig i ca 5 sekunder hver time i 4-5 timer. Det tilsettes vekstmedium til 50 ml merket på kolben, og celler og mikrokuler tillates å inkubere uforstyrret over natten.

Etter 20-24 timer fra tidspunkt for utsåing, bestemmes antallet celler som har festet seg til kollagenmikrokulene ved følgende fremgangsmåte:

1. Bestem vekten av et 5 ml rundbunnet polystyren prøverør.
2. Fjern en liten prøve av mikrokuler (0,1-0,2 ml) fra Erlenmeyer-kolben og tilsett til det på forhånd veide prøverør.
3. Sug opp medium fra mikrokuleprøven og bestem vekten av røret pluss prøve. Beregn prøvevekt ved å subtrahere vekten av rør fra vekt av rør pluss prøven.
4. Tilsett 1 ml av matriksspalteenzym [kollagenase IA (Sigma kat.nr. C9891) ved 1-2 mg/ml i PBS med Ca^{2+} og Mg^{2+}] til mikrokuleprøven og bland forsiktig ved å banke på siden av røret.

5. Dekk røret med parafilm og plasser det i et 37°C vannbad i en 1 time ved å befordre disintegrering av mikrokulene ved pipettering gjennom en Pasteur-pipette med 15 minutters mellomrom.

6. Etter 1 times inkubering, ytterligere dissosisiering av cellene ved kraftig pipettering med en 5 ml glasspipette. (Bemerk: Dersom det fremdeles finnes klumper, tilsett til røret en løsning av 10x trypsin-EDTA i et volum på 1/10 del av volumet av tilsatt kollagenaseløsning, og inkuber i ytterligere 10 min.)

7. Gjennomfør celletellinger ved anvendelse av et hemacytometer.

8. Bestem tetthet av celler pr ml mikrokuler ved anvendelse av følgende formel som antar at 50% av det fuktig pakkede volum av disse mikrokuler er interstitielt:

$$\text{Totalt antall celler/ml mikrokuler} = 1000 \text{ mg}/(\text{mg vekt av prøve}) \times (\text{celleantall i prøve}) \times 0,5.$$

Celle/mikrokuleblandingen blir overført fra 125 ml Erlenmeyer-kolben til en 250 ml spinnerkolbe (Bellco Microcarrier Spinner Flasks, 250 ml med modell nr. 1965-60001 impellerakslinger), vekstmedium blir tilsatt til 150 ml graderingsmerket, og spinnerkolben plasseres på en magnetisk røreplate (innstilt på 50 opm) i en vevskulturinkubator. Kulturen mates med frisk medium den neste dag og deretter 3 ganger ukentlig ved å la mikrokulene sedimentere på bunnen av kolben og suge opp «brukt» medium til 50 ml merket på kolben og tilsette friskt vekstmedium til 200 ml merket. Tettheten av cellene pr ml mikrokuler kan bestemmes på ønskede tidspunkter som beskrevet ovenfor.

B. Fremstilling av forhåndsdyrkede hybride kollagenmatrikser (PCHCM)

PCHCM fremstilles ved følgende protokoll:

1. Når den ønskede tetthet av celler pr ml mikrokuler er oppnådd (som bestemt ved celletelling), fjernes mikrokulene som inneholder celler, fra spinnerkolben.

2. Det fremstilles matrikser ifølge fremgangsmåten vist ovenfor for fremstilling av HCM, med følgende modifikasjoner:

i. Cellene trypsiniseres ikke.

ii. Det tilsettes dyrkede mikrokuler inneholdende celler til 15 ml graderte koniske rør, til det ønskede pakkede volum (volum = antall matrikser x 0,5 ml).

iii. Det tilsettes tomme mikrokuler til 15 ml graderte koniske rør til det ønskede pakkede volum (volum = antall matrikser x 0,5 ml).

3. Det fremstilles modifisert 2x DMEM og kalveserumblanding som beskrevet i eksempel I ovenfor. Det tilsettes både tomme mikrokuler (50% av totalt mikrokulevolum) og mikrokuler inneholdende celler (50% av totalt mikrokulevolum) til den modifiserte 2x DMEM/kalveserumblanding (se tabell nedenfor).

Mikrokule/DMEM/kalveserumblanding plasseres på is og tilsettes det hensiktsmessige volum av kollagenløsning (rottehaletype I kollagen; UBI kat.nr. 08-115, fortynnet til en konsentrasjon på 4,0 mg/ml i 0,02 mol eddiksyre), som angitt i tabell

2. Innholdet i røret blandes omhyggelig (bobler eller skumdannelse unngås) ved anvendelse av en 10 ml glasspipette, inntil matrikløsningen synes homogen.

Tabell 2 Medium-, mikrokuler- og kollagenvolumer anvendt for PCHCM-fremstilling

Skål str.	Antall matrikser	Modifisert 2x DMEM	Serum	Mikrokuler		Kollagen løsning vol.	Totalt
				Tomme	Dyrkede		
60 mm	1	1 ml	1 ml	0,5 ml	0,5 ml	1 ml	4 ml
60 mm	12	12 ml	12 ml	6 ml	6 ml	12 ml	48 ml
100 mm	1	2,5 ml	2,5 ml	1,25 ml	1,25 ml	2,5 ml	10 ml
100 mm	12	30 ml	30 ml	15 ml	15 ml	30 ml	120 ml
150 mm	1	7,5 ml	7,5 ml	3,75 ml	3,75 ml	7,5 ml	30 ml
150 mm	12	90 ml	90 ml	45 ml	45 ml	90 ml	360 ml

Eksempel IV

A. Hybride matrikser (HCM eller PCHCM) holdes i kultur ved føring av matriksene på dag 1, og deretter 2 til 3 ganger ukentlig ved anvendelse av følgende protokoll:

1. Omhyggelig avsugning av kulturmedium.
2. Tilsetning av det nødvendige volum av egnet vekstmedium, under hensyntagen til størrelsen av skålen som anvendes for hver matriks (5-7 ml pr 60 mm skål, 10-15 ml pr 100 mm skål, 30-40 ml pr 150 mm skål). Mediet kan suppleres med askorbinsyre 2-fosfat og/eller TGF- β (f.eks. 10-50 μ g/ml askorbinsyre 2-fosfat og/eller 1-10 ng/ml TGF- β).

B. Diameteren av en hybrid kollagenmatriks kan bestemmes ved anvendelse av følgende fremgangsmåte:

1. Petriskålen inneholdende matriksen som skal måles, plasseres på toppen av en metrisk lineal hvilende på mørk bakgrunn.

2. Diameterne (i cm) registreres som ønsket: For eksempel daglig for de første 2 uker, hver annen dag etter de første 2 uker, og på dagene for cellekvantifisering for varigheten av eksperimentet.

C. Celler kan gjenvinnes og kvantifiseres fra en hybrid kollagenmatriks som følger:

1. Enzymatisk spalting av hybride kollagenmatrikser.

a. Det fremstilles en løsning av kollagenase IA (1,0 mg/ml for HCM og PCHCM, 2,0 mg/ml for HCM eller PCHCM supplementert med askorbinsyre 2-fosfat og/eller TGF- β) i PBS.

b. Kollagenaseløsningen dispenseres over i 15 ml koniske sentrifugerør med et volum på 1 ml for matrikser isådd med $1-5 \times 10^6$ celler og 5 ml for matrikser isådd med mer enn 5×10^6 celler pr matriks. Det fremstilles like mange kollagenaserør som det er matrikser som skal telles.

c. Hver matriks fjernes fra sin skål ved anvendelse av en flat pinsett, og omhyggelig oppsuging av overskuddet av væsken fra matriksen ved anvendelse av et absorberende papirhåndkle (dersom cellene vil bli kastet etter telling) eller steril absorberende kompress.

d. Hver matriks plasseres i et individuelt kollagenaseholdig rør, lukkes tett, og festes på en orbital rystemaskin innstilt på 40 opm i en vevskulturinkubator.

e. Matriksene inkuberes i ca 1 time eller inntil spaltingen er fullstendig. For å fremskynde spaltingen brytes matriksene opp ved pipettering med 5 minutters mellomrom.

2. Celletelling

a. Det samlede volum av hver spaltede cellesuspensjon måles ved anvendelse av graderingene på siden av sentrifugerøret.

b. For måling av cellenes levedyktighet fjernes 0,1 ml av celledisuspensjonen og tilsettes til 0,1 ml av 0,08% trypanblått i et 1,5 ml mikrosentrifugerør. Innholdet blandes ved å banke forsiktig på røret.

- c. De levedyktige og døde celler telles ved anvendelse av et hemacytometer. Om nødvendig fortynnes cellesuspensjonen ytterligere i PBS før tilsetning av trypanblått. Det totale antall celler beregnes under hensyntagen til det samlede volum målt i trinn 2a.

5

Eksempel V

Dette eksempel beskriver eksperimenter som varierer inokulumtettheten av kloner av humane fibroblaster stabilt transfektet med plasmidet pXGH302 i en hybridmatriks, for å bestemme den celletetthet som kan understøttes i HCM. hGH-
10 produksjon av hver HCM ble også overvåket.

Hybride kollagenmatrikser ble fremstilt med 3 inokulum tettheter (ID) av den stabilt transfektete hGH-uttrykkende neonatale forhudfibroblastklon betegnet HF165-24. Tetthetene var 5, 10 og 20 x 10⁶ celler pr HCM. For hver ID ble det fremstilt 9 HCM i 60 mm skåler. Hybrid matriksproduksjonsmediet for hver ID bestod
15 av 9 ml av modifisert 2x DMEM, 9 ml kalveserum, 9 ml kollagen mikrokuler, og 9 ml av 4 mg/ml løselig rottehalekollagen, i 50 ml koniske rør.

HF165-24 høstet fra monosjiktkultur ble slått sammen til å gi nok av hver ID for 9 HCM:

5 x 10⁶ celler ganger 9 HCM = 45 x 10⁶ celler totalt;

20 10 x 10⁶ celler ganger 9 HCM = 90 x 10⁶ celler totalt;

20 x 10⁶ celler ganger 9 HCM = 180 x 10⁶ celler totalt.

Sammenslåtte celler for hver ID ble sentrifugert ved 1500 opm i 7 minutter, supernatanten ble suget opp og pelletene ble slemmet opp igjen i 9 ml modifisert 2x DMEM og 9 ml kalveserum og overført til 50 ml rør. Ni ml kollagen mikrokuler utmålt
25 på forhånd i 15 ml graderte rør ble tilsatt til cellene/2x DMEM/kalveserumblandingen og blandet ved forsiktig pipettering med en 10 ml pipette. Denne blanding ble deretter plassert på is, og 9 ml av iskald rottehale type I kollagenløsning (4 mg/ml) ble tilsatt og blandet med en 10 ml pipette for å gi en homogen løsning. Fire ml av denne blanding ble tilsatt til hver av ni 60 mm petriskåler for hver tetthet.

30 Petriskålene ble satt i en vevskulturinkubator og etterlatt uforstyrret i 24 timer.

Medium ble omhyggelig suget opp fra hver skål etter 24 timers inkuberingen, og HCM ble matet på nytt med vekstmedium (DMEM, 10% kalveserum og 1% Pen/Strep), ved anvendelse av 5 ml pr skål. For å gi et større volum av vekstmedium pr matriks ble HCM'ene overført på dag 3 fra 60 mm petriskåler til 100

mm petriskåler ved anvendelse av en flat pinsett, og 10 ml vekstmedium ble tilsatt pr skål. På dag 6 ble medium suget opp fra hver HCM, matriksene ble skylt ved 5 ml av Hanks balanserte saltløsning (HBSS) og suget opp, og 10 ml av vekstmedium ble tilsatt til hver skål. Tiden for vekstmediumtilsetningen til HCM ble notert for å ta en
 5 24 timers mediumprøve den følgende dag (dag 7). Denne skylle- og
 matefremgangsmåte ble gjentatt på dagene 13 og 20 for å gi dag 14 og dag 21
 mediumprøver. Mediumprøvene ble analysert for hGH som angitt nedenfor. HCM
 ble også matet på nytt på dagene 10 og 17 uten skylletrinnet.

Spalting av 3 HCM pr ID for celletellingene foregikk på dagene 7, 14 og 21
 10 etter at mediumprøvene var tatt, som beskrevet i eksempel IV. Fremstilling av hGH
 ved HCM på de angitte tidspunkter ble målt ved radioimmunoanalyse (Nichols
 Institute) av 24 timer mediumprøvene, som beskrevet i eksempel XII nedenfor.
 Tabell 3 sammenfatter celleantallene for triplikat HCM av hver ID og hGH-produksjon
 av HCM ved hver ID på dagene 7 (n = 9), 14 (n = 6) og 21 (n = 3). Verdiene er
 15 presentert som gjennomsnitt +/- standard avvik. Som angitt er likeveksttettheten
 bestemt på dagene 14 og 21 for HCM fremstilt som beskrevet ovenfor, ca $7-10 \times 10^6$
 celler pr matriks. hGH-produksjon pr celle for fullstendig dannede matrikser på dag
 21 er omtrent den samme blant de 3 ID nivåer som var testet.

20
**Tabell 3 Optimalisering av inokulumtettheten av HF165-24 Innleiret I
 hybride matrikser for celletetthet og hGH-produksjon**

HCM ID	Celle # dag 7	$\mu\text{g hGH}/$ 24 t/matriks	$\mu\text{g hGH}/24 \text{ t/}$ 10^6 celler
5 x 10^6	5.331.000 $\pm$ 279.347	683 $\pm$ 138	130 $\pm$ 20
10 x 10^6	9.853.833 $\pm$ 858.634	716 $\pm$ 137	73 $\pm$ 6
20 x 10^6	13.226.000 $\pm$ 1.234.410	689 $\pm$ 130	50 $\pm$ 6

	HCM ID	Celle # dag 7	$\mu\text{g hGH}/$ 24 t/matriks	$\mu\text{g hGH}/24 \text{ t}/$ 10^6 celler
5	5×10^6	$6.534.000 \pm$	853 ± 232	133 ± 23
		344.525		
	10×10^6	$9.631.000 \pm$	1037 ± 277	108 ± 12
		875.820		
10	20×10^6	$10.360.000 \pm$	840 ± 280	81 ± 16
		706.541		
	HCM ID	Celle # dag 21	$\mu\text{g hGH}/$ 24 t/matriks	$\mu\text{g hGH}/24 \text{ t}/$ 10^6 celler
15	5×10^6	$6.916.167 \pm$	730 ± 129	105 ± 10
		608.352		
	10×10^6	$9.884.833 \pm$	1004 ± 279	101 ± 20
		1.475.327		
20	20×10^6	$10.207.750 \pm$	872 ± 333	83 ± 10
		2.833.250		

Eksempel VI

«Standard» kollagenmatrikser (CM) skal ikke inkludere kollagen mikrokuler. For å sammenligne CM med HCM ble CM fremstilt ved å erstatte volumet som opptas av mikrokuler i HCM med ytterligere løselig kollagen, for å gi et forhold på 1 del 2x DMEM, 1 del kalveserum og 2 deler løselig kollagen pr CM. En direkte sammenligning av CM med HCM ble bestemt som følger.

Klonen av humane fibroblaster stabilt transfektert med plasmidet pXGH302, betegnet HF165-24, ble anvendt. Ni matrikser av hver type, ved hver av to ID (1×10^6 og 5×10^6 celler pr matriks) ble fremstilt. For både CM og HCM ble 9×10^6 celler (for 1×10^6 ID) og 45×10^6 celler (for 5×10^6 ID) slemmet opp igjen i 9 ml av 2x DMEM + 9 ml kalveserum i 50 ml rør. For CM ble totalt 18 ml av rottehal type I kollagenløsning (5 mg/ml) tilsatt til hvert ID-sett, og matrikser ble dannet som beskrevet ovenfor i eksempel 1. For HCM ble 9 ml kollagen mikrokuler og 9 ml av

rottehal type I kollagenløsning (4 mg/ml) tilsatt til hvert ID-sett, og HCM ble dannet ifølge eksempel 1. Matrikser ble holdt i den opprinnelige 60 mm skål og matet med et volum på 5 ml vekstmedium. Celletallene pr matriks, samt hGH-produksjon pr matriks, ble bestemt på dagene 7, 14 og 30 som beskrevet for eksempel V.

- 5 Maksimum celletettheter (målt på dag 14) og hGH-fremstilling oppnådd av de 2 typer av matrikser ved de 2 tettheter er sammenfattet i tabell 4. Som angitt i tabellen kunne den hybride typen av matriks tillate en høyere tetthet av celler og en vesentlig større produksjon av hGH pr matriks, sammenlignet med standard kollagenmatriksen uten mikrokuler.

10

Tabell 4: Sammenligning av «standard» kollagenmatrikser (CM) og hybride kollagenmatrikser (HCM) for maksimum celletetthet og hGH-produksjon av innleirede HF165-24 celler

15	Matriks-type	ID	Maksimum celle-tetthet	Maksimum hGh produksjon pr matriks
	CM	1×10^6	$2,1 \times 10^6$	290 μg
	CM	5×10^6	$3,3 \times 10^6$	299 μg
20	HCM	1×10^6	$6,2 \times 10^6$	983 μg
	HCM	5×10^6	$10,3 \times 10^6$	1221 μg

Eksempel VII

- Dette eksempel beskriver produksjon og analyse av på forhånd dyrkede
 25 hybride kollagenmatrikser (PCHCM). Celler av klonen av humane fibroblaster stabilt transfektert med plasmidet pXGH302 (HF165-24) ble utsådd på kollagenmikrokuler ved et forhold på 2×10^6 celler pr ml mikrokuler, på følgende måte: En suspensjon av 48×10^6 celler i 40 ml vekstmedium ble oppnådd fra høstede monosjikt kulturer. 5 ml av denne suspensjon ble tilsatt til hver av fire 15 ml graderte rør inneholdende 6
 30 ml av pakke kollagen mikrokuler, og hver celle/mikrokuleblanding ble overført til en 125 ml Erlenmeyer-kolbe. Ytterligere 5 ml celleduspensjon ble tilsatt til cellene/mikrokuleblandingen i 125 ml Erlenmeyer-kolben for å gi en endelig suspensjon på 12×10^6 eller med 6 ml mikrokuler og 10 ml vekstmedium pr kolbe (4

kolber tilsammen). Kolbene ble plassert i en vevskulturinkubator og omvirket forsiktig i ca 5 sekunder hver time i 4 timer. Etter den fjerde time ble vekstmedium tilsatt til hver kolbe til 50 ml merket, kolbene ble etterlatt uforstyrret i 24 timer. Ved 24 timer ble mikrokulene overført fra hver Erlenmeyer-kolbe over i en 250 ml spinnerkolbe, vekstmedium ble tilsatt til 150 ml merket i hver spinnerkolbe, og kolbene ble plassert på en magnetisk røreplate satt på 50 opm i en vevskulturinkubator. Den følgende dag ble vekstmedium tilsatt opp til 200 ml merket i hver spinnerkolbe, og kolbene ble matet på nytt 3 ganger ukentlig ved å suge opp medium til 50 ml merket og tilsette frisk medium opp til 200 ml.

På dag 15 av spinnerkolbekulturen ble tettheten av celler pr ml mikrokuler bestemt. En liten prøve av mikrokuler (ca 0,1 - 0,2 ml) ble fjernet fra hver kolbe og plassert i forhåndsveide 5 ml polystyrenrør. Overskuddsmedium ble fjernet fra hvert rør ved oppsuging, og røret inneholdende mikrokuleprøven ble veiet. En ml av en 2 mg/ml kollagenasetype IA løsning i PBS ble tilsatt til hvert rør, og rørene ble dekket med parafilm og plassert i et vannbad ved 37°C. Med 15 minutters mellomrom ble rørene inneholdende mikrokulene banket forsiktig for å dispergere klumper. Etter 1 time ble cellene ytterligere dissosiert ved kraftig pipettering med en 5 ml glasspipette. For ytterligere å dissosiere klumpene ble det tilsatt en løsning av 10x trypsin:EDTA for å gi en endelig trypsinkonsentrasjon på 1X i kollagenaseløsningen, og rørene ble inkubert i ytterligere 10 minutter. De dissosierte cellesuspensjoner ble fortynnet 1:2 med PBS og fylt i hemacytometerkammere for celletelling. Tettheten av cellene pr ml mikrokuler ble beregnet ved anvendelse av følgende formel:

Totalt antall celler/ml mikrokuler =

$1000 \text{ mg}/(\text{mg vekt av prøve}) \times (\text{celleantall i prøve}) \times 0,5.$

Denne formel antar at 1) fuktig kollagen har en spesifikk vekt på 1,0, og derfor vil gramvekten av kollagen i mikrokuleprøven være lik kollagenvolumet i ml, og 2) halvparten av det fuktig pakke volum av mikrokuler er opptatt av mellomrommet mellom kulene. Det gjennomsnittlige antall celler pr ml mikrokuler ($n = 4$) for dette eksperiment var $19,2 \times 10^6$. Mikrokulene ble fjernet fra hver kolbe og slått sammen i et 15 ml gradert rør. Hele volumet på 6 ml mikrokuler inneholdende $19,2 \times 10^6$ celler pr ml mikrokuler ble anvendt til å produsere hybride kollagenmatriser.

I en 100 ml steril flaske ble 12 ml modifisert 2x DEME, 12 ml kalveserum, 6 ml tomme kollagen mikrokuler, og de 6 ml av forhåndsdyrkede mikrokuler omhyggelig blandet sammen ved anvendelse av en 10 ml glasspipette. Denne blanding ble plassert på is, og 12 ml av iskald rottehare type I kollagen ble tilsatt og
 5 blandet omhyggelig ved anvendelse av en 10 ml glasspipette. 4 ml av denne blanding ble tilsatt til hver av tolv 60 mm petriskåler, og skålene ble plassert ved 37°C og etterlatt uforstyrret i 24 timer.

Det endelige antall celler pr matriks var $9,6 \times 10^6$, siden hver matriks var sammensatt av 0,5 ml mikrokuler inneholdende $19,2 \times 10^6$ celler pr ml. Disse
 10 fordyrkede hybride kollagenmatrikser (PCHCM) ble matet på nytt etter 24 timer ved å suge opp mediet og tilsette 5 ml vekstmedium. PCHCM ble matet på nytt på dagene 4, 7, 11, 14, 18 og 20 med 6 ml vekstmedium. På dagene 7, 14 og 20 ble PCHCM også skylt med 4 ml HBSS før tilsetning av medium, og tiden for mediumtilsetning ble notert. På dagene 8, 15 og 21 ble det tatt en 24 timers mediumprøve for analyse
 15 av hGH-produksjon, og PCHCM ble spaltet for å oppnå celletellinger som følger: En løsning av 2 mg/ml kollagenase type IA i PBS ble tilsatt ved et volum på 6 ml pr 15 ml rør. PCHCM ble løftet fra skåler med flate pinsetter og blottet på et absorberende papirhåndkle før overføring til en kollagenaseløsning. Rørene inneholdende PCHCM og kollagenaseløsning ble festet på en orbital ryster i en vevskulturinkubator,
 20 hastigheten ble satt til 40 opm, og PCHCM ble tillatt å spalte seg i 2 timer. Etter 2 timer inkubering ble PCHCM dissosiert til enkeltceller ved kraftig pipettering med en 5 ml glasspipette. Ytterligere dissosiering ble ansett å være nødvendig pga tilstedeværelsen av klumper, og en løsning av 10x trypsin:EDTA (0,5% trypsin, 5,3 mmol EDTA) ble tilsatt for å gi en endelig trypsinkonsentrasjon på 1X i kollagenasen.
 25 Rørene ble så inkubert i ytterligere 10 minutter. Volumer i hvert rør ble notert, og celledensitetene ble fortynnet 2 ganger i PBS og plassert i et hemacytometerkammer for å oppnå celletellinger. Produksjon av hGH ved PCHCM ved de angitte tidspunkter ble målt ved radioimmunoanalyse av de 24 timer mediumprøver, som beskrevet i eksempel VIII. Tabell 5 sammenfatter celletallene
 30 for triplikatet PCHCM ved hvert tidspunkt, og hGH-produksjonen ved PCHCM på dagene 8 (n = 12), 15 (n = 9), og 21 (n = 6). Verdiene er presentert som gjennomsnitt $\pm$ standard avvik. Som tabell 5 viser vil disse PCHCM understøtte en høyere tetthet av celler enn HCM beskrevet i eksemplene V og VII (tabellene 3 og 4).

Hastigheten av hGH-produksjon pr matriks og pr celle var omtrent den samme gjennom hele studieperioden.

Tabell 5 HF165-24 fordyrket på kollagen mikrokuler og innleiret i kollagen for å danne PCHCM: Celleantall og hGH-produksjon over tid i kultur.

	Dag	Celleantall	$\mu\text{g hGH}/24 \text{ t/matriks}$	$\mu\text{g hGH}/24 \text{ t}/10^6 \text{ celler}$
10	8	13.732.000 $\pm$ 1.786.565	1264 $\pm$ 155	94 $\pm$ 10
	15	12.573.000 $\pm$ 1.547.133	1317 $\pm$ 166	97 $\pm$ 14
15	21	13.706.000 $\pm$ 497.073	1254 $\pm$ 135	85 $\pm$ 10

Eksempel VIII

hGH-ekspresjon ble overvåket ved kvantitativ hGH-måling med en sandwich radioimmunometrisk analyse (Allegro hGH Assay, Nichols Institute, kat.nr. 40-2205), ved anvendelse av betingelser anbefalt av produsenten.

For å bestemme hastigheten av hGH-produksjon ble kulturmediet forandret 24 timer før høsting av cellene for passering. På tidspunktet for passering ble det tatt en alikot av kulturmediet for hGH-analyse, og cellene ble deretter høstet, tallet og sådd ut igjen på nytt. hGH-nivået beregnes etter telling av de høstede celler, og blir uttrykt som $\mu\text{g hGH}/24 \text{ t}/10^6 \text{ celler}$.

Eksempel IX

Dette eksempel beskriver *in vivo* implantering av hybride kollagenmatrikser (HCM) fremstilt beskrevet i eksempel I, samt standard kollagenmatrikser (CM) fremstilt som beskrevet i eksempel VI.

For subkutan implantering av matrikser ble mus [*M. musculus* stammene N:NIH(S)-*nu/nu* (*nakne*: Taconic Farms, Germantown, NY) gitt en intraperitoneal injeksjon av avertin (løsning av 2% w/v 2,2,2-tribrometanol og 2% v/v 2-metyl-2-

butanol) ved en dose på 0,0175 ml/g legemsvekt. Anestetiserte mus ble plassert i sideleie, og skinnet behandlet med alkohol og betadin. Et 0,5 cm til 1 cm tverrsnitt ble gjort i dyrets venstre flanke. Det subkutane rom ble forstørret ved skarp disseksjon til et område noe større enn størrelsen av matriksen som skulle
 5 implanteres. Matriksen ble plassert horisontalt i det subkutane rom og spredt jevnt ved anvendelse av Millipore pinsetter. Innsnittet ble lukket ved anvendelse av kirurgiske stifter av rustfritt stål.

Blod ble oppsamlet ved retroorbital blødning etter at musen var plassert i et større beger inneholdende metoksyfluran (Pittman-Moore) inntil lett anestesi ble
 10 oppnådd. Serum hGH-nivået ble bestemt ved anvendelse av den kommersielt tilgjengelige sandwich radioimmunometriske analyse beskrevet ovenfor. Analysen ble gjennomført som beskrevet som anbefalt, bortsett fra at kontrollserum fra ubehandlede mus ble anvendt for å oppnå korrigert cpm for å generere standardkurven.

CM og HCM ble fremstilt for implantering i nakne mus som beskrevet i
 15 eksemplene I og VI, ved anvendelse av hGH-uttrykkende HF165-24 celler. I det første eksperiment (eksperiment I, tabellene 6 og 7), ble det fremstilt 13 matrikser av hver type. HCM ble fremstilt med en inokulum tetthet (ID) på 5×10^6 HF165-24 celler pr matriks, og standard kollagenmatrikser (CM) ble fremstilt med en ID på 2×10^6
 20 HF165-24 pr matriks. Færre celler ble anvendt til å inokulere CM siden disse matrikser ikke vil understøtte en så høy celletetthet som HCM (se eksemplene V og VI). I påfølgende eksperimenter (eksperimentene 2 og 3, tabellene 6 og 7) ble det testet bare HCM-matrikser (13 i hvert av eksperimentene 2 og 3). Matriksene ble holdt i de originale 60 ml skåler og matet med 5 ml vekstmedium. Etter 13 dager i
 25 kultur ble alle skålene matet med friskt vekstmedium; 24 timer senere ble triplikate matrikser av hvert sett spaltet for celletelling, og mediumprøver fra alle 13 matrikser i hvert sett ble analysert for hGH.

For eksperiment 1 ved tidspunktet for implantering, var det gjennomsnittlige antall celler i CM lik $2,4 \times 10^6$ celler/matriks, mens det gjennomsnittlige antall celler i
 30 HCM var $7,4 \times 10^6$ celler/matriks (tabell 6). Celleantallet pr matriks lignet sistnevnte for HCM fremstilt i eksperimentene 2 og 3 (henholdsvis $8,9 \times 10^6$ og $9,2 \times 10^6$ celler pr HCM-matriks). Tabell 6 sammenfatter celleantallet ($n = 3$), *in vitro* hGH-produksjon pr matriks ($n = 13$), og spesifikk produksjonshastighet ($\mu\text{g}/10^6$ celler/24 t;

n = 3) for hvert sett av *in vitro* eksperimenter. Verdiene er presentert som gjennomsnitt $\pm$ standard avvik. Som vist i tabell 6 ville HCM understøtte en høyere tetthet av celler og ga et høyere nivå av hGH på dagen for implantering enn CM gjorde.

5

Tabell 6: HF165-24 celletetthet og *in vitro* hGH-produksjon pr matriks for kollagenmatrikser og hybride kollagenmatrikser på implanteringsdagen

10	Eksperiment #	Celle # på dagen for implantering	$\mu\text{g hGH}/24 \text{ t} / \text{matriks}$	$\mu\text{g hGH}/24 \text{ t} / 10^6 \text{ celler}$
	1/CM	$2,4 \pm 0,1 \times 10^6$	241 ± 33	98 ± 8
	1/HCM	$7,4 \pm 1,6 \times 10^6$	983 ± 239	109 ± 16
15	2/HCM	$8,9 \pm 1,5 \times 10^6$	1399 ± 177	170 ± 27
	3/HCM	$9,2 \pm 0,9 \times 10^6$	1279 ± 115	137 ± 19

Åtte matrikser av hver type ble implantert i nakne mus i eksperiment 1, mens fem HCM ble implantert i nakne mus i hvert av eksperimentene 2 og 3. Serum hGH-nivået ble målt med regelmessige mellomrom etter implanteringen. Resultatene er vist i tabell 7 og fig. 3. I eksperiment 1 kunne HCM-implanterte dyr opprettholde vesentlig høyere serum hGH-nivå enn CM-implanterte dyr i 186 dager post-implantering. Dyr implantert med HCM i eksperimentene 2 og 3 viste lignende høyt serum hGH-nivå.

20

Tabell 7: *In vivo* avgivelse av hGH ved implanterte kollagen hybridmatrikser inneholdende tranfiserne human hudfibroblaster

serum hGH-verdier (ng/ml $\pm$ standard avvik)

	Eksperiment 1		Eksperiment 2	
	CM n=8	HCM n=8	HCM n=5	HCM n=5
Eksperiment 3				
Dager etter implantering				
5				
10				
7	2,4 $\pm$ 0,4	6,8 $\pm$ 0,6	13,2 $\pm$ 2,0	16,5 $\pm$ 2,1
14			8,5 $\pm$ 1,3	8,3 $\pm$ 2,0
15	1,0 $\pm$ 0,1	4,2 $\pm$ 0,4		
21	0,8 $\pm$ 0,1	3,7 $\pm$ 0,4	5,0 $\pm$ 0,4	5,8 $\pm$ 1,6
15				
28			7,1 $\pm$ 2,3	3,6 $\pm$ 1,0
29	0,7 $\pm$ 0,1	4,8 $\pm$ 1,0		
35	0,4 $\pm$ 0,1	3,0 $\pm$ 0,7	3,2 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,6
42	0,6 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,3	2,9 $\pm$ 0,7	2,3 $\pm$ 0,6
55			2,0 $\pm$ 0,3	
20				
56	0,4 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,5		1,6 $\pm$ 0,3
70	0,3 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,4
85	0,4 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,2		
123	0,5 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,3		
154	0,5 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,3		
25				
186	0,6 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,5		

Eksempel X

De hybride matrikser ifølge denne oppfinnelse kunne fremstilles for implantering i mennesker som følger:

De ønskede celler, typisk stabilt transfekterte autologe celler avledet fra pasienten, blir høstet fra vevskulturskåler og bearbeidet for fremstilling av HCM eller PCHCM ved hvilken som helst av fremgangsmåtene beskrevet i eksemplene I-IV. Doseringen for en gitt pasient (dvs den fysiologisk effektive mengde av terapeutisk

produkt fremstilt av matriksen) kan varieres ved anvendelse av en større eller mindre matriks, implantering av et forskjellig antall matrikser i pasienten, og/eller anvendelse av celler som uttrykker et forskjellig nivå av produktet pr celle når matriksen konstrueres. Mengden av det terapeutiske produkt fremstilt i pasienten kan også
 5 varieres ved å eksponere cellen i matriksen for et farmakologisk eller fysiologisk signal som forandrer ekspresjonen av det terapeutiske gen. Dersom det terapeutiske gen f.eks. er under kontroll av en glukokortikoidresponderende promoter, da vil *in vivo* eksponering av cellene for et medikament så som deksametason (ved administrering av medikamentet til pasienten på en måte som
 10 sikrer at medikamentet når frem til implantatet) forandre ekspresjonen av det terapeutiske gen.

Typisk ville det implanteres et større antall små matrikser (ca 1-2 cm i diameter), fremstilt i 60 mm petriskåler og inneholdende størrelsesorden 10×10^6 celler pr matriks. Ca 100 mill celler kunne således implanteres ved anvendelse av
 15 10 små matrikser. Anvendelse av matrikser med signifikant høye celletettheter (som fremstilt ved inkorporering av f.eks. askorbinsyre 2-fosfat) ville resultere i et mindre antall matrikser nødvendig for en gitt pasient. Alternativt kan det anvendes en større petriskål (>150 mm diameter) som en form for å fremstille større matrikser som enten kunne implanteres direkte eller skjæres i mindre biter som blir implantert.

20 Før implantering kan matriksene lagres eller transporteres i vekstmedium eller hvilken som helst annen løsning som tillater cellene å holde seg levedyktige. Alternativt kan matriksene kryokonserveres ved frysing i et egnet frysemedium, som kan vaskes bort før implantering.

Matriksene kan implanteres i flere forskjellige steder, innbefattet, men ikke
 25 begrenset til subkutane, intraperitoneale, intraspleniske, intraomentale, inguinale, intratekale, intraventrikulære og intramuskulære steder, samt i lymfeknuter eller inne i fettvev. Det gjøres et kirurgisk innsnitt på det egnede sted, matriksen innsettes og innsnittet lukkes.

30 Eksempel XI

Det er flere statiske og *in vitro* perfusjonsdyrkningssystemer i stor skala som kan tilpasses for anvendelse ved proteinfremstilling ved anvendelse av celler som vedlikeholdes i hybride matrikser ifølge denne oppfinnelse. Disse valg tilbyr

varierende nivå av letthet i de nødvendige trinn for føring og mediumhøsting før rensning av målproteinene. Flere er beskrevet nedenfor.

1. Etter dannelse og metning av hybride kollagenmatrikser (HCM) i konvensjonelle petriskåler (f.eks. etter 10-25 dagers inkubering) kan flere av disse HCM overføres aseptisk til en steril Microcarrier Spinner Flask (250-100 ml kapasitet). Disse HCM fremstilles og vedlikeholdes under betingelser som maksimerer tettheten av levelige celler inne i hver matriks. Typisk vil dette kreve mellom 5 og 20 ml medium for hver en ml matriksvolum. Proteinframstillingsmediet formuleres til å omfatte et minimum av udefinerte komponenter (f.eks. serum), og kan inkludere tilsatte faktorer ment for å maksimere utbyttet av proteinframstilling pr celle. Spinnerkolbene plasseres i en $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $5\% \pm 1\%$ CO_2 humidifisert inkubator på en magnetisk røreplattform satt for 30-70 opm. Etter 1-3 dager overføres kolben til et klasse 100 biologisk sikkerhetskabinett, og framstillingsmediet inneholdende det uttrykte protein blir aseptisk trukket av uten å forstyrre de sedimenterte matrikser. Et ekvivalent volum av friskt proteinframstillingsmedium blir tilsatt til kolben, og kolben returneres til røreplattformen inne i inkubatoren.

2. Matriksene beskrevet i (1) ovenfor kan overføres aseptisk til en 1-5 l bioreaktor (f.eks. Brunswick) med en kontrollerbar røreimpelleraksling. Nivået av produksjonsmedium settes av kontrollsystemet for bioreaktoren. Høsting og etterfylling av medium kontrolleres inne i et sterilt system med lukket sløyfe for å minimalisere forurensning.

3. For høyt volum av HCM-fremstilling, blir matriksene dannet fra bestanddelskomponentene og blir tillatt å gelere inne i en vevskultur rulleflaske. Flaskene blir inkubert i en statisk opprettstående stilling inntil kontraksjon av matriksen resulterer i en frittflytende struktur (3-5 dager). Vekstmedium blir deretter etterfylt, og flaskene blir gasset med $5\% \text{CO}_2$ og plassert i et valseapparat inne i en 37°C inkubator. Vekstmedium etterfylles hver 2-3 dager inntil HCM er moden (10-25 dagers total inkubering), på hvilket tidspunkt HCM blir eksponert for proteinframstillingsmedium. Etter 1-3 dager blir flaskene overført til et klasse 100 biologisk sikkerhetskabinett, og framstillingsmediet inneholdende det uttrykte protein blir aseptisk trukket av uten å forstyrre matriksene. Et ekvivalent volum av friskt proteinframstillingsmedium blir tilsatt til flasken som returneres til valseapparatet.

4. Bestanddelene av HCM kan innføres aseptisk i sterile gassgjennomtrengelige Teflon™ poser gjennom en åpning som kan forsegles. Komponentene blir tillatt å gelere inne i posen og påta seg formen og konformasjonen deri. Posene blir inkubert i $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$, $5\% \pm 1\%$ CO_2 humidifiserte inkubatorer. Ettersom HCM

5 kontrakterer og reduseres i volum blir vekstmediumvolumet justert for å kompensere. Høsting og etterfylling av medium blir oppnådd gjennom sterilt forbundede rørsystemer bygget inn i posene. Anvendelse av inkubatorer med åpninger og utstrakt røranlegg kunne tillate utforming av et syklisk høste/føre-pumpesystem som kunne eliminere behovet for å fjerne posene fra inkubatorene under en

10 produksjonskjøring.

5. Bestanddelene av HCM kan innføres aseptisk i spesialkonstruerte termoformede trau med høy volum kapasitet. Den enkleste konformasjon ville være et åpent rektangulært trau med lokk og med gassutvekslingsmuligheter utformet for anvendelse i en CO_2 vevskulturinkubator. En annen utforming ville inkludere et

15 system med lukket sløyfe og med adgangsåpninger til mediumreservoiret for kontrollert føring og mediumhøsting, som vanlig for et bioreaktorkammer.

Andre utførelser

De hybride matrikser ifølge denne oppfinnelse er hensiktsmessige for

20 avgivelse av et bredt område av cellulære produkter, omfattende ikke bare hGH, men også faktor VIII, faktor IX, erythropoietin (EPO), albumin, hemoglobin, alfa-1 antitrypsin, kalsitonin, glukocerebrosidase, lav tetthets lipoprotein (LDL) reseptor, IL-2 reseptor, globiner, immunoglobuliner, katalytiske antistoffer, interleukiner, insulin, insulinlignende vekstfaktor I (IGF-1), paratyroidhormon (PTH), leptin, interferonene,

25 nervevekstfaktorer, basisk fibroblast vekstfaktor (bFGF), sur FGF (aFGF), epidermal vekstfaktor (EGF), endotel cellevekstfaktor, blodplateavledet vekstfaktor (PDGF), transformerende vekstfaktorer, endotelcellestimulerende angiogenesefaktor (ESAF), angiogenin, vevsplasminogen aktivator (t-PA), granulocyt kolonistimulerende faktor (G-CSF) og granulocytmakrofag kolonistimulerende faktor (GM-CSF). Cellene

30 innleiret i matriksen kan f.eks. være bukspyttkjertel beta-celler som naturlig sekreterer insulin i respons på en stigning i blodglukosen, og som derfor kan supplementere en utilstrekkelig insulinrespons hos en diabetisk eller pre-diabetisk pasient. Alternativt kan de være en hvilken som helst celletype genetisk manipulert

til å uttrykke og sekretere et høyt nivå av et nødvendig polypeptid, slik som en koagulasjonsfaktor, inne i pasienten. En slik konstruksjon kan være under kontroll av en konstitutivt aktivert promoter, eller av en hensiktsmessig fysiologisk eller farmakologisk regulert promoter.

5 Kollagengelporsjonen av matriksen kan bestå fullstendig av uløselige kollagenfibriller, eller kan inneholde andre komponenter i tillegg til kollagen; f.eks. agarose; alginat; et glykosaminoglykan slik som hyaluronsyre, heparinsulfat, dermatansulfat eller kondroitinsulfat; et sulfatert proteoglykan; fibronectin; laminin; elastin; fibrin; eller tenasin. Slike komponenter (spesielt de som finnes i den

10 ekstracellulære matriks i dyrevev) bidrar til den konstruktuelle stabilitet av de hybride matrikser ifølge oppfinnelsen, og/eller gir ytterligere festeevne for cellene i matriksene og vertsvevet på implantasjonsstedet. De ville bli inkorporert i matriksene ved blanding med kollagenløsningen før geleringen.

Andre potensielle additiver inkluderer cytokiner og/eller vekstfaktorer som er

15 anvendelige for å optimalisere vedlikeholdet av cellene eller befordre gunstig interaksjon med vertsvev (f.eks. vaskularisering, innbefattet bFGF, aFGF, endotelcellevekstfaktorer, PDGF, endotelcellestimulerende angiogenesefaktor (ESAF), leukotrien C₄, prostaglandiner, (f.eks. PGE₁, PGE₂), IGF-1, GCSF, angiogenin, TGF- α , TGF- β , askorbinsyre, EGF og onkostatin M. Disse additiver kan

20 inkorporeres i matriksen ved å blande dem med kollagenløsningen før gelering, ved innføring av dem i mellomrommene mellom mikrokulene, eller ved å inkludere dem i det medium som omgir matriksene. Alternativt kan cellene modifiseres genetisk til å uttrykke det ønskede produkt. Cellene i matriksen kan f.eks. kotransfiseres med et

25 terapeutisk protein, eller med en enkeltvektor som koder for begge typer proteiner bundet til egnede ekspresjonskontrollsekvenser.

Kollagenet som anvendes i gelen kan være en hvilken som helst egnet type (f.eks. type I-XI) eller en blanding av hvilke som helst to eller flere. Fibere kan plasseres i formen før gelering av kollagenet, slik at de blir en integrerende del av

30 matriksen og bidrar til å gjøre den robust og håndteringsvennlig. Typisk ville fibre bli laget hovedsakelig av kollagen (f.eks. cat gut) eller et ikke-kollagen materiale slik som nylon, dakron, polytetrafluoretylen (Gore-Textm eller TeflonTM), polyglykolsyre, polymelkesyre/polyglykolsyreblanding (VicrylTM), polystyren, polyvinylklorid ko-

polymer, cellulose (f.eks. bomull eller lin), polyester, rayon eller silke. Fiberene kan være vevet til en netting eller klede, eller anvendes som enkelttråder.

Istedenfor type I kollagenmikrokulene beskrevet i eksemplene ovenfor, kunne det anvendes mikrokuler bestående hovedsakelig av en annen type kollagen,

- 5 polystyren, dekstran, (f.eks. CytodexTM, Pharmacia), polyakrylamid, cellulose, kalsiumalginat, lateks, polysulfon, glass (belagt med en substans som f.eks. kollagen som beforder cellevevhefting), eller kombinasjoner av kollagen med hvilken som helst av de ovennevnte. Slike mikrokuler er tilgjengelige kommersielt eller kan lages ved standard fremgangsmåter, og deretter steriliseres for anvendelse i de hybride
- 10 matrikser ifølge denne oppfinnelse.

Andre utførelser er innenfor de følgende krav.

PATENTKRAV

1. Artikkel omfattende et legeme av matriksmateriale, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter uløselige kollagenfibriller og plassert i legemet av matriksmateriale;

- 5 (a) et større antall dyrkede virveldyrceller som er genetisk endret til å uttrykke et polypeptid; og
(b) et større antall mikrokuler, hvor mikrokulene primært består av kollagen.

2. Blanding, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter

- 10 (a) et større antall dyrkede virveldyrceller som er genetisk endret til å uttrykke et polypeptid, og
(b) et større antall mikrokuler hvor, mikrokulene primært består av kollagen og
(c) en kollagenløsning.

15 3. Blanding, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter, suspendert i en vandig kollagen løsning,

- (a) et større antall dyrkede virveldyrceller som er genetisk endret til å uttrykke et polypeptid, og
(b) et større antall mikrokuler, hvor mikrokulene primært består av kollagen.

20 4. Blanding som krevet i krav 2 eller krav 3, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er tilstrekkelig kollagen i blandingen til å tillate blandingen å gele ved omtrent pH 5.

5. Artikkel ifølge krav 1 eller blanding ifølge kravene 2, 3 eller 4,

25 k a r a k t e r i s e r t v e d at de dyrkede virveldyrcellene er valgt fra gruppen bestående av adipocytter, astrocytter, hjertemuskelceller, kondrocytter, endotelceller, epitelceller, fibroblaster, gangliocytter, kjertelceller, gliale celler, hematopoietiske celler, hepatocytter, keratinocytter, myoblaster, neurale celler, osteoblaster, bukspyttkjertel beta-celler, nyreceller, glatte muskelceller tverrstripede muskelceller
30 og forløpere for disse.

6. Artikkel eller blanding ifølge krav 1 til krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at de dyrkede virveldyrcellene er humane celler.

7. Artikkel eller blanding ifølge ethvert av kravene 1-6, karakterisert ved at de dyrkede virveldyrcellene er transfekterte celler inneholdende eksogent DNA som koder for et polypeptid.

5

8. Artikkel eller blanding ifølge ethvert av kravene 1-7, karakterisert ved at de dyrkede virveldyrcellene er transfekterte celler inneholdende eksogent DNA som inkluderer en regulatorisk sekvens som aktiverer ekspresjon av et gen som koder for et polypeptid, nevnte gen er eksogent for nevnte virveldyrceller både før og etter at de er transfekterte.

10

9. Artikkel eller blanding ifølge krav 7 eller krav 8, karakterisert ved at polypeptidet er valgt fra gruppen bestående av enzymer, hormoner, cytokiner, kolonistimulerende faktorer, vaksineantigener, antistoffer, koagulasjonsfaktorer, regulatoriske proteiner, transkripsjonsfaktorer, reseptorer og strukturproteiner.

15

10. Artikkel eller blanding ifølge ethvert av kravene 7 til 9, karakterisert ved at polypeptidet er valgt fra gruppen bestående av humant veksthormon, faktor VIII, faktor IX, erythropoietin og insulin, alfa-1 antitrypsin, kalsitonin, glukocerebrosidase, lav tetthets lipoprotein (LDL) reseptor, IL-2 reseptor, globiner, immunoglobuliner, katalytiske antistoffer, interleukiner, insulinlignende vekstfaktor I (IGF-1), paratyroid-hormon (PTH), leptin, interferonene, nervevekstfaktorer, basisk fibroblast vekstfaktor (bFGF), sur FGF (aFGF), epidermal vekstfaktor (EGF), endotel cellevekstfaktor, blodplateavledet vekstfaktor (PDGF), transformerende vekstfaktorer, endotelcelle-stimulerende angiogenesefaktor (ESAF), angiogenin, vevsplasminogen aktivator (t-PA), granulocyt kolonistimulerende faktor (G-CSF) og granulocytmakrofag kolonistimulerende faktor (GM-CSF).

20

25

11. Artikkel eller blanding ifølge kravene 7-10, karakterisert ved at polypeptidet er en angiogenesefaktor.

30

12. Artikkel eller blanding ifølge kravene 1-11, karakterisert ved at mikrokulene er kollagen type I perler.

13. Artikkel eller blanding ifølge ethvert av kravene 1-12, karakterisert ved at de fleste mikrokulene har en diameter mellom ca 0,1 og ca 2 mm.

14. Artikkel eller blanding ifølge ethvert av kravene 1-13, karakterisert ved at det ytterligere omfatter ikke-kollagenfibre dispergert i legemet av matriksmateriale.

15. Artikkel eller blanding ifølge krav 14, karakterisert ved at ikke-kollagenfibre omfatter et materiale valgt fra gruppen bestående av nylon, dakron, polytetrafluoretylen, polyglykolsyre, polymelkesyre/polyglykolsyreblending, polystyren, polyvinylklorid-kopolymer, "cat gut", bomull, lin, polyester og silke.

16. Artikkel eller blanding ifølge ethvert av kravene 1-15, karakterisert ved at artikkelen er plassert inne i et pattedyr.

17. Artikkel ifølge ethvert av kravene 1-16, karakterisert ved at den er utformet slik at det kan implanteres i en pasient.

18. Artikkel eller blanding ifølge krav 17, karakterisert ved at de dyrkede virveldyrcellene er avledet fra en eller flere celler fjernet fra pasienten.

19. Artikkel eller blanding ifølge ethvert av kravene 1-18, karakterisert ved at de dyrkede virveldyrcellene består av en klonal populasjon.

20. Fremgangsmåte for fremstilling av artikkelen ifølge ethvert av kravene 1-19, karakterisert ved

at den danner en blanding omfattende (a) et større antall dyrkede virveldyrceller som er genetisk endret til å uttrykke et polypeptid; (b) et større antall mikrokuler; og (c) en løsning omfattende løselig kollagen;

utsette det løselige kollagen i blandingen for betingelser effektive for dannelse av en gel; og

å eksponere gelen for dyrkingsbetingelser som forårsaker at gelen vil trekke seg sammen, og derved danne preparatets legeme.

21. Fremgangsmåte for å fremstille en blanding ifølge kravene 2 eller 3, karakterisert ved at den omfatter å kombinere

(a) et større antall dyrkede virveldyrceller som er genetisk endret til å uttrykke et polypeptid,

5 (b) et større antall mikrokuler, og

(c) en løsning omfattende løselig kollagen.

22. Fremgangsmåte ifølge krav 20 eller 21, karakterisert ved at mikrokulene er porøse kollagenperler.

10

23. Fremgangsmåte ifølge krav 20 eller 22, karakterisert ved at løsningen er en sur vandig løsning av løselig kollagen, og at geleringen blir gjennomført ved å heve løsningens pH.

15 24. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 20-23, karakterisert ved at geleringsstrinnet finner sted i en form, slik at gelen før kontraksjonstrinnet har samme form som støpeformen.

25 25. Fremgangsmåte ifølge ethvert av kravene 20-24, karakterisert ved at de dyrkede virveldyrcellene er dyrket i nærvær av mikrokulene før de blir blandet med løsningen.

26. Artikkel eller blanding ifølge ethvert av kravene 1-19, eller fremgangsmåten ifølge ethvert av kravene 20-25, karakterisert ved at artikkelen eller
25 blandingen i tillegg omfatter en substans valgt fra gruppen bestående av en andre type av kollagen, agarose, alginat, fibronektin, laminin, hyaluronsyre, heparansulfat, dermatansulfat, sulfaterte proteoglykaner, fibrin, elastin og tenasin.

27. Artikkel eller blanding ifølge ethvert av kravene 1-19, eller krav 26, hvor de
30 dyrkede virveldyrcellene er fibroblaster.

28. Artikkel eller blanding ifølge ethvert av kravene 1 til 19 eller krav 26 eller krav 27, karakterisert ved at mikrokulene har en omtrentlig rund form.

29. Artikkel eller blanding ifølge ethvert av kravene 1-19, eller kravene 26-28, karakterisert ved at den ytterligere omfatter i det minste ett additiv som er valgt fra gruppen som består av faktorer som bevirker vaskularisering, et cytokin, en vekstfaktor og askorbinsyre.

5

30. Artikkel eller blanding ifølge krav 29, karakterisert ved at i det minste det ene additivet er valgt fra gruppen som består av basisk fibroblastvekstfaktor (bFGF), sur fibroblastvekstfaktor (aFGF), endotelial cellevekstfaktor, blodplate-avledet vekstfaktor (PDGF), endotelial
10 celledifferensieringsangiogenesefaktor (ESAF), leukotrien C₄, et prostaglandin, insulinlignende vekstfaktor 1 (IGF-1), granulocyt kolonistimulerende faktor (GCSF), angiogenin, transformerende vekstfaktor- α (TGF- α), transformerende vekstfaktor- β (TGF- β), epidermal vekstfaktor (EGF) og onkostatin M.

15 31. Artikkel eller blanding ifølge krav 29, karakterisert ved at additivet som bevirker vaskularisering er bFGF eller PDGF.

32. Artikkel eller blanding ifølge krav 30, karakterisert ved at de dyrkede virveldyrcellene er genetisk endret til å uttrykke i tillegg til polypeptidet, i det
20 minste ett additiv.

25

33. Artikkel eller blanding ifølge krav 32, karakterisert ved at de dyrkede virveldyrcellene er kotransfektet med DNA som koder for polypeptidet og et DNA som koder for i det minste ett additiv.

34. Artikkel eller blanding ifølge krav 32, karakterisert ved at de dyrkede virveldyrcellene er transfektet med et enkelt DNA som koder for både polypeptidet og i det minste ett additiv.

30

35. Anvendelse av artikkelen ifølge ethvert av kravene 1-19, eller kravene 26 til 34, for fremstilling av et medikament for administrering av nevnte polypeptid til en pasient som har behov for det.

36. Anvendelse ifølge krav 35, hvor implanteringen utføres subkutant, intraperitonealt, sub-nyrekapsulært, inguianalt, intramuskulært, intraventrikulært, eller intratekalt i pasienten.

37. Anvendelse ifølge krav 35 eller krav 36, hvor polypeptidet er ett som bevirker sårheling og at implanteringen utføres på et sted hvor pasienten har et sår.

38. Fremgangsmåte for å produsere et polypeptid, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter

å tilveiebringe artikkelen ifølge ethvert av kravene 1-20, eller kravene 26-34, under betingelser hvor de dyrkede virveldyrcellene kan uttrykke og sekretere polypeptidet,

å kontakte artikkelen med en væske slik at de dyrkede virveldyrcellene sekreterer polypeptidet ut i væsken,

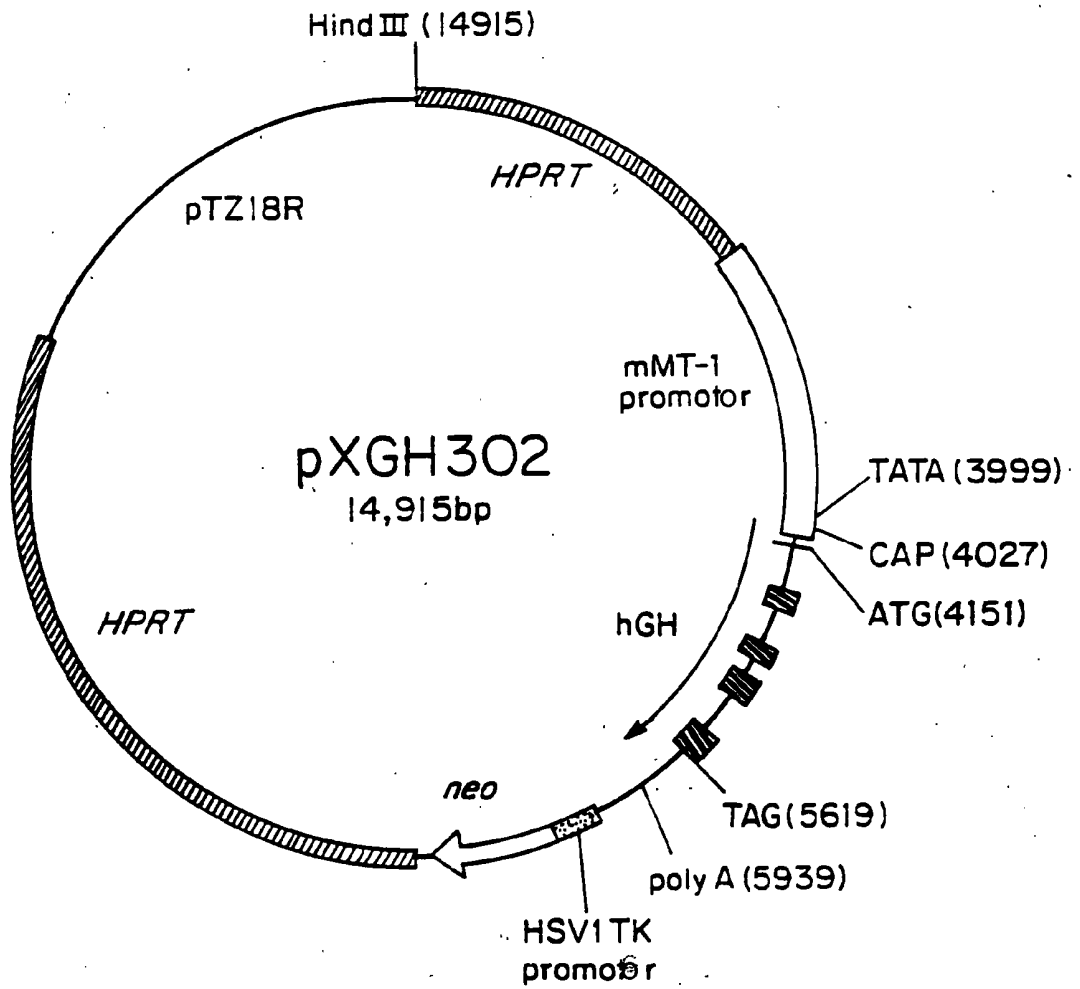
å oppnå polypeptidet fra væsken.

39. Fremgangsmåte for preservering av dyrkede virveldyrceller, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter å tilveiebringe artikkelen ifølge ethvert av kravene 1-19 eller 26-34, og lagre gjenstanden ved en temperatur under 0 °C.

40. Ekstrakorporalt apparat, k a r a k t e r i s e r t v e d a t det omfatter artikkelen ifølge ethvert av kravene 1-19, eller kravene 26-34, og utstyr for å sjalte blod fra et dyr til artikkelen og så tilbake inn i en blodåre til dyret.

41. Anvendelse av en artikkel eller blanding ifølge ethvert av kravene 1-19 eller 26-34, for fremstilling av et medikament for administrering av polypeptidet til en pasient i behov derav.

42. Artikkel eller blanding ifølge et hvilket som helst av kravene 1-19 eller 26-34, for anvendelse i terapi.

**FIG. 1**

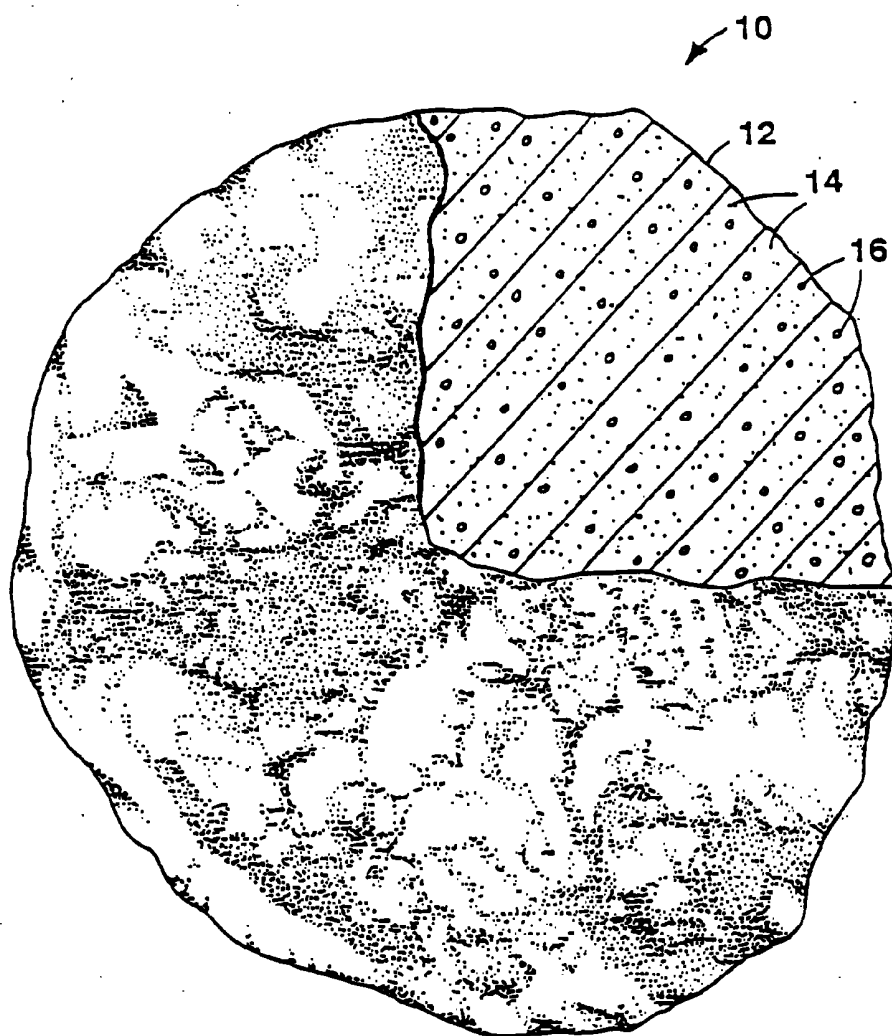


FIG. 2

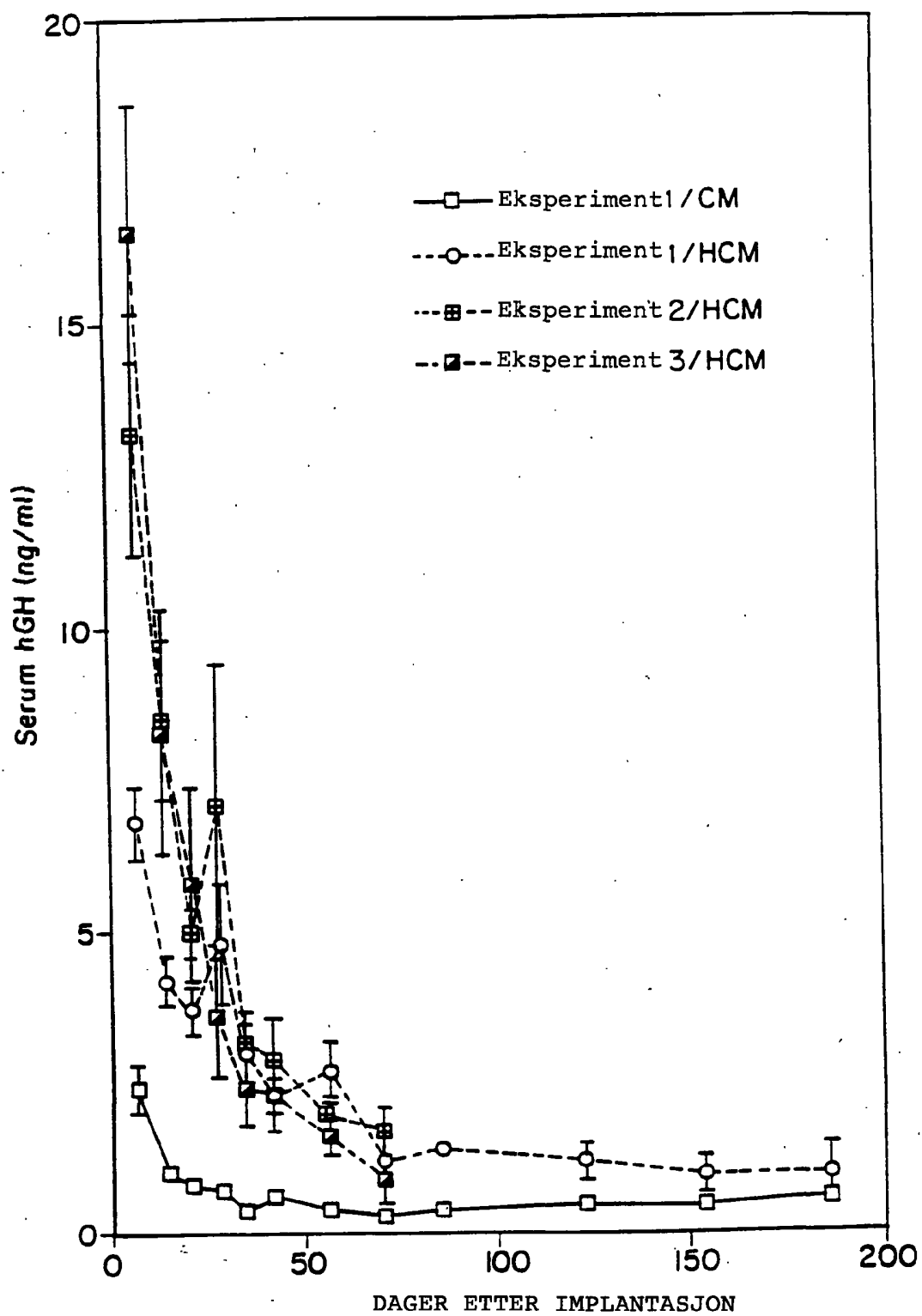


FIG. 3