(19) SUOMI - FINLAND
(FI)

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

(10) **FI 960611 A7**

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

(21) Patenttihakemus - Patentansökan - Patent application 960611

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation - International patent classification
C12N 5/16
A61K 9/52
A61K 48/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **12.08.1994**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **09.02.1996**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **09.04.1996**

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

(86) Kansainvälinen hakemus - Internationell ansökan - International application **12.08.1994 PCT/US1994/009299**

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

12.08.1993 US 105278

(71) Hakija - Sökande - Applicant

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

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Baetge, E. Edward, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
2 •Hammang, Joseph P., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
3 •Gentile, Frank T., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
4 •Lindner, Mark D., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
5 •Winn, Shelley R., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)
6 •Emerich, Dwaine F., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

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

Bioyhteensopivia, immunologisesti eristettyjä kapseleita, jotka sisält ävät geneettisesti muunneltuja soluja

Biologiskt kompatibla, immunologiskt isolerade kapsyler innehållande g enetiskt ändrade celler

Bioyhteensopivia, immunologisesti eristettyjä kapsuleita, jotka sisältävät geneettisesti muunneltuja soluja

Keksinnön tekninen alue

Esillä oleva keksintö koskee parannettuja biologisesti yhteensopivia kapseleita, joilla luovutetaan biologisesti aktiivisia molekyylejä isäntään. Näissä parannetuissa kapseleissa on erikoisesti sellainen ulkopinnan morfologia, jolle on ominaista spesifinen makrohuokosten jakautuminen ja makrohuokosten koon vaihteluväli. Lisäksi esillä oleva keksintö koskee parannettuja laitteita ja menetelmiä biologisesti aktiivisten molekyylien pitkäaikaiseen stabiiliin ekspressioon ja näiden biologisesti aktiivisten molekyylien luovutukseen, ja erikoisesti biologisesti yhteensopivien immuunisysteemistä eristävien kapselien sisältämiä geneettisesti muunneltuja soluja sellaisen ekspression ja luovutuksen aikaansaamiseksi.

Keksinnön tausta

Monia kliinisiä tiloja, puutoksia ja tautitiloja voidaan parantaa tai lievittää antamalla potilaalle tekijää tai tekijöitä, joita elävät solut tuottavat, tai poistamalla potilaasta tuhoisia tekijöitä, joita elävät solut metaboloivat. Monissa tapauksissa nämä tekijät voivat muodostaa uudelleen tai kompensoida elimen tai kudoksen toimintahäiriön tai -puutoksen. Esimerkkejä sellaisista tauti- tai puutostiloista, joiden etiologiat sisältävät erittävän elimen tai kudoksen toiminnan häviämisen, sisältävät (a) sokeritaudin, jossa haiman Langerhansin saarekkeiden insuliinin tuotto on häiriintynyt tai kadonnut; (b) lisäkilpirauhasen toiminnanvajauksen, jossa lisäkilpirauhashormonin tuoton katoaminen aiheuttaa seerumin kalsiumtasojen putoamisen, joka johtaa vakavaan lihaksen vetokouristukseen; (c) Parkinsonin taudin, jossa dopamiinin tuotto on vähentynyt; ja (d) anemian, jolle on ominaista veren

punasolujen tuoton katoaminen vasteena erytropoietiinin puutokselle. Elimen tai kudoksen toiminnan häiriintyminen tai katoaminen voi johtaa metabolisten lisätoimintojen katoamiseen. Esimerkiksi äkillisessä maksan toimintavajauksessa maksakudos tulee kykenemättömäksi poistamaan myrkkyjä, erittämään solumetabolian tuotteita ja erittämään keskeisiä tuotteita, kuten albumiinia ja faktori VIII -proteiinia. Bontempo, F.A. et al. (1987) Blood, 69, 1721 - 1724.

Toisissa tapauksissa nämä tekijät ovat biologisen vasteen modifioijia, kuten lymfokiinejä tai sytokiinejä, jotka tehostavat potilaan immuunisysteemiä tai toimivat tulehduksen vastaisina aineina. Nämä voivat olla erikoisen käyttökelpoisia sellaisilla yksilöillä, joilla on krooninen parasiitti- tai infektiotauti, ja ne voivat olla myös käyttökelpoisia tiettyjen syöpien hoidossa.

Voi myös olla toivottavaa antaa potilaalle troofisia tekijöitä, kuten hermon kasvutekijää (NGF), aivoista peräisin olevaa neurotrofista tekijää (BDNF), neurotrofiini-3-proteiinia (NT-3), neurotrofiini-4/5-proteiinia (NT-4/5), kiliaarista neurotrofiinitekijää (CNTF), gliasolulinjasta peräisin olevaa neurotrofista tekijää (GDNF), kolinergistä erilaistumistekijää/leukemia-inhibitiotekijää (CDF/LIF), epidermikasvutekijää (EGF), insuliinin kaltaista kasvutekijää (IGF), emäksistä fibroblastikasvutekijää (bFGF), verihiutaleista peräisin olevaa kasvutekijää (PDGF) ja niiden kaltaisia.

Monissa tauti- tai puutostiloissa häiriintynyt elin tai kudos on sellainen, joka normaalisti toimii tavalla, joka respondoi spesifisten metaboliittien tasojen vaihteluille pitäen näin yllä homeostaasia. Esimerkiksi aivotursoon neuronit tuottavat korkeita NGF-tasoja, jotka suoraan tukevat etuaivon pohjan kolinergisiä neuroneita, jotka hermottavat aivotursoa. Aleneminen näiden neuroneiden

tuottamassa NGF-tasossa voi johtaa kolinergisen panoksen häviämiseen tähän elintärkeään rakenteeseen, joka johtaa ikään liittyneeseen muistin huononemiseen, joka löydetään Alzheimerin taudissa.

Hermostosysteemissä krooninen matalatasoinen troofisten tekijöiden luovutus on riittävä pitämään yllä kasvutekijöistä riippuvaisten solupopulaatioiden terveyttä. Kroonisissa häiriöissä, kuten Alzheimerin taudissa ja Huntingtonin taudissa, yhden tai useamman neurotrofisen tekijän, kuten NGF-, BDNF-, NT-3-, NT-4/5-, CTNF-, GDNF- ja CDF/LIF-tekijän, pitkäaikaista luovutusta voidaan tarvita neuronaalisen elinkyvyn säilyttämiseksi. Näitä kasvutekijöitä ei voida antaa systeemisellä annolla, koska ne eivät kykene läpäisemään veri-aivoestettä. Sen vuoksi nämä neurotrofiset tekijät täytyy antaa suoraan keskushermostosysteemiin (CNS).

Monet tutkijat ovat yrittäneet muodostaa uudelleen, lisätä tai korvata elimen tai kudoksen toimintaa siirrostamalla kokonaisia elimiä, elinkudosta tai soluja, jotka erittävät tuotteita tai vaikuttavat metabolisiin toimintoihin. Lisäksi, kudoksen siirrostaminen voi antaa dramaattisia etuja, mutta sen sovellutusta rajoittaa suhteellisen pieni määrä elimiä, jotka ovat sopivia ja saatavissa siirrostusta varten. Yleisesti potilaan täytyy olla immunosuppressoitu, jotta voidaan torjua siirroksen immunologinen hyljintä, joka yleensä johtaa siirroksen toiminnan häviämiseen ja lopulta siirretyn kudoksen tai siirrettyjen solujen kuolemaan. Monissa tapauksissa on kuitenkin toivottavaa, että siirre jää toiminnalliseksi pitkäksi aikaa, jopa potilaan loppuiäksi. On sekä epätoivottavaa että kallista pitää potilasta immunosuppressoidussa tilassa oleellisesti pitkää aikaa.

Toinen lähestymistapa, jota käytetään siirrostusmenetelmissä, on solujen tai kudoksen siirrostaminen puoliläpäisevässä fysikaalisessa esteessä, joka sallii ravin-

teiden, kuona-aineiden ja eritettyjen tuotteiden diffuusion, mutta minimoi immunologisen hyljinnän solu- ja molekyylivaikuttajien tuhoisat vaikutukset. Erilaisia laitteita tai kapseleita, jotka suojaavat valittua tuotetta tuottavia kudoksia tai soluja immuunisysteemiltä, on tutkittu. Nämä sisältävät suonenulkoiset diffuusiokammiot, suonensisäiset diffuusiokammiot, suonensisäiset ultrasuodatuskammiot ja mikrokapseloitujen solujen siirrostamisen [Scharp, World J. Surg. 8, 221 - 229 (1984)]. Näiden laitteiden kuviteltiin esittävän merkittävän edun kudossiirroksen alalla, koska ne vähentävät sitä tarvetta, että potilasta pitäisi ylläpitää immunosuppressoidussa tilassa, ja sallisivat sen vuoksi toimintoja uudelleen muodostavien tai muulla tavalla edullisten kudosssiirrosten antamisen monille muille potilaille sallimalla sellaisten luovuttajasolujen tai -kudoksen käytön, joita ei ole voitu käyttää tavanomaisissa kudossiirrostusmenetelmissä.

Kapseloitujen solujen käyttö estää immuunisysteemin elementtien pääsyn kapseliin suojaten näin kapseloituja soluja immuunituholta. Tämä teknologia kohottaa niiden solutyyppien määrää, joita voidaan käyttää terapiassa. Kapselimembraanin puoliläpäisevä luonne sallii myös halutun molekyylin helpon diffuusion kapselista ympäröivään isäntäkudokseen. Tämä menetelmä estää luontaisen kasvaimen muodostumisen riskin ja sallii epäsopivan ihmis- tai jopa eläinkudoksen käytön ilman että vastaaottaja on immunosuppressoitu. Lisäksi, siirre voidaan ottaa takaisin isännästä, jos on tarpeen tai jos halutaan. Sellainen takaisinottokyky voi olla keskeistä monissa kliinisissä olosuhteissa.

Ulkopinnan morfologia voi vaikuttaa erilaisiin parametreihin sisältäen kapselin vahvuuden, kapselin takaisinottokyvyn kuin myös kapselin kyvyn pidättää eläviä soluja pidennetyn ajan.

On toivottavaa saada aikaan kapselit, jotka sallivat kapseloitujen solujen elinkyvyn pidennetyt ajat ja jotka ovat helpommin otettavissa takaisin ilman hajoamista.

Tunnetaan useita kapselointilaitteita, joilla on erilaisia ulkopinnan morfologioita. Kapselit on jaettu tyypin 1 (T1), tyypin 2 (T2) tai tyypin 4 (T4) kapseleihin riippuen niiden ulkopinnan morfologiasta. Sellaiset membraanit kuvataan esim. julkaisuissa Lacy et al., "Maintenance of Normoglycemia In Diabetic Mice By Subcutaneous Xenografts of Encapsulated Islets", Science, 254, 1782 - 84 (1991) ja Dionne et al., PCT/US92/03327. Tämän keksinnön uudet membraanit on nimetty T1/2-membraaneiksi ja niille on ominaista ulkopinnan hybridimorfologia, jossa makrohuokosten kattama kokonaisalue kuin myös makrohuokosten läpimitta on valitulla välillä.

Jakautuvien solujen ja solulinjojen käyttö tarvittavan biologisen toiminnan saamiseksi tarjoaa useita merkittäviä etuja verrattuna täysin erilaistuneeseen kudokseen ja/tai elimiin. Soluja voidaan kasvattaa suureksi määräksi in vitro ja ne voidaan varastoida ja seuloa patogeenien suhteen. Lisäksi, solut ja solulinjat ovat mukautuvaisempia geneettiselle manipuloinnille kuin primaarielimet tai -kudokset. Kyky sisällyttää heterologista yhdistelmä-DNA:ta sallii monia uusia mahdollisuuksia siirrostettavien solujen toiminnan tai fenotyypin muuttamiseksi. Tämä puolestaan muodostaa suuremman diversiteetin siirrostettavien solujen terapeuttiselle käytölle.

Retrovirusvektoreita on yleensä käytetty sellaisten solujen geneettiseksi muuttamiseksi, joita käytetään sellaisissa menetelmissä (Gage et al., US-patentti 5 082 670). Tiedetään kuitenkin, että retrovirusekspressiovektorit eivät muodosta heterologisten proteiinien korkean tason pitkäaikaista in vitro ekspressiota. Monet erilaiset tekijät ottavat osaa havaittuun siirtogeenin alen-

tuneeseen ekspressioon retroviruspromoottorien säätelyn alaisuudessa. Nämä tekijät sisältävät geneettisesti muunneltujen solujen lepotilan, CpG-emäsduplettien metylaation promoottoreissa ja selektiopaineen häviämisen. Useimmat nisäkäspromoottorien ohjaamat ekspressiovektorit eivät myöskään ole parhaiten sopivia tavanomaisiin kudossiirrostuskaavoihin johtuen niiden luontaisesta matalan tason promoottoriaktiivisuudesta [katso M. Schinstine ja F. Gage, Molecular and Cellular Approaches for the Treatment of Neurological Disease, S.G. Waxman, toim., Raven Press, 311 - 323 (1993)].

Keskushermostossa tapahtuvan retroviruspromoottorien aktiivisuuden vähenemisongelman lisäksi on olemassa muita haittoja käytettäessä retroviruksia geeniterapiaan. On olemassa esimerkiksi vakava huoli siitä mahdollisuudesta, että siirrostetussa nisäkäsisännässä, joka on aiemmin altistettu tai juuri infektoitu geneettisiä elementtejä sisältävällä viruksella, voi tapahtua rekombinaatiotapahtumia, jotka voivat johtaa replikaation suhteen defektiivisen viruksen muuttumiseen eläväksi virukseksi. Lisäksi, työskentely infektiivisten viruspartikkelien kanssa aiheuttaa terveysriskejä laboratoriotyöntekijöille ja lääkäreille, jotka tuottavat ja antavat reagenssia. Lopuksi, nämä huolet ovat johtaneet kohonneeseen riskien tajuamiseen tutkijoiden ja lääkäreiden kuin myös valvontaviranomaisten joukossa.

Vaikka geneettisesti manipuloituja soluja on siirrostettu in vitro sekä kapseloituina että kapseloimattomina muotoina, pitkäaikaista stabiilia heterologisen DNA:n ekspressiota ei ole tyydyttävästi saatu aikaan. Esimerkiksi äskettäin julkaistu tutkimus [Hoffman et al., Experimental Neurology, 122, 100 - 106 (elokuu, 1993)] viittaa sellaisten kapseloitujen allogeenisten solujen käyttöön, joita on geneettisesti manipuloitu niin, että ne erittävät hiiren NGF-proteiinia NGF-proteiinin luovuttamiseksi rot-

tien keskushermostosysteemiin (CNS). Kuvatun systeemin NGF-geenieksprессio oli retroviruksen promoottorin säätelyn alaisuudessa. Kuten yllä on kuvattu, retrovirusvektorit eivät saa aikaan pitkäaikaista stabiilia siirtogeenien ekspressiota in vivo. Sen mukaisesti siinä tutkimuksessa julkaistu menetelmä ei ole sopiva pitkäaikaisiin terapeuttisiin sovelluksiin.

Sen mukaisesti menetelmä, jolla luovutetaan sopivia määriä tarvittavia aineita, kuten kasvutekijöitä, entsyymejä ja hormoneita, geneettisesti muunnelluista soluista pidennetyn ajanjakson ajan, ei ole edelleenkään saatavissa ja olisi erittäin edullinen niille, jotka tarvitsevat pitkäaikaista hoitoa. Lisäksi, menetelmät siirtogeenien pitkäaikaisen stabiilin in vivo ekspression ylläpitämiseksi siirrostetuissa soluissa eivät ole edelleenkään saatavissa ja niitä tarvitaan [esimerkiksi katso Schinstine ja Gage (1993), yllä, sivu 321].

Sen vuoksi on olemassa tarve laitteista ja luovutusmenetelmistä, jotka sisältävät geneettisesti muunneltuja soluja, jotka helpottavat siirtogeenin pitkäaikaista stabiilia ekspressiota in vivo.

Keksinnön yhteenveto

Esillä oleva keksintö esittää uudet T1/2-hybridikapselit, jotka voivat sallia kapseloitujen solujen elinkyvyn pidennetyn ajanjakson ajan siirrostettaessa isäntänisäkkääseen ja jotka ovat helpommin otettavissa takaisin isännästä.

Esillä oleva keksintö esittää laitteet ja menetelmät biologisesti aktiivisen mokelyylin pitkäaikaiseen stabiiliin ekspressioon käyttäen biologisesti yhteensopivaa kapselia, joka sisältää geneettisesti manipuloituja soluja, biologisesti aktiivisten molekyylien tehokkaaseen luovutukseen niin, että saadaan aikaan tai tehostetaan biologista toimintaa nisäkäsisännässä. Tämä keksintö esittää erikoisesti parannetut menetelmät ja koostumukset, joissa

käytetään soluja, jotka on transfekoitu yhdistelmä-DNA-molekyyleillä, jotka sisältävät biologisesti aktiivisia molekyylejä koodittavat DNA-sekvenssit toiminnallisesti liitettyinä promoottoreihin, jotka eivät ole alttiina aktiivisuuden alenemiselle in vivo siirrostettaessa nisäkäsisäntään. Lisäksi, tämän keksinnön mukaiset menetelmät sallivat biologisesti aktiivisten molekyylien pitkäaikaisen stabiilin ja tehokkaan luovutuksen elävistä soluista annetun nisäkkään spesifisiin kohtiin. Tämä keksintö esittää yleiset keinot siirtogeenien pidennettyjen ajanjaksojen in vivo ekspression ylläpitämiseksi. Lisäksi tämä keksintö esittää laitteet ja menetelmät ikään liittyvien havaintohäiriöiden hoitamiseksi.

Määritelmät

Tässä käytettynä termi "biologisesti yhteensopiva kapseli" tarkoittaa, että kapseli siirrostettuna isäntänisäkkääseen ei saa aikaan tuhoisaa isännän vastetta, joka olisi riittävä johtamaan kapselin hylkimiseen tai tekisi sen toimimattomaksi esimerkiksi hajoamisen kautta.

Tässä käytettynä termi "immuunisysteemistä eristävä kapseli" tarkoittaa, että kapseli siirrostettuna nisäkäsisäntään minimoi isännän immuunisysteemin tuhoisat vaikutukset sen sisällä oleviin soluihin.

Biologinen aktiivisuus viittaa spesifisen solun molekyylin biologisesti käyttökelpoisiin vaikutuksiin. Tässä käytettynä termi "biologisesti aktiivinen aine" on sellainen, joka voi käyttää biologista aktiivisuuttaan solussa, jossa se tehdään (esim. bcl-2-proteiini apoptoosin ehkäisemiseksi), tai jota voidaan ekspressoida solun pintaan ja joka voi vaikuttaa solun interaktioihin muiden solujen tai biologisesti aktiivisten molekyylien kanssa (esim. hermovälittäjäaineen reseptorin tai soluadheesiomolekyylin), tai joka voidaan vapauttaa tai erittää solusta, jossa se tehdään, ja joka voi saada aikaan vaikutuksensa erillises-

sä kohdesolussa (esim. hermovälittäjäaine, hormoni, kasvutekijä tai sytokiini).

Promoottorin aktiivisuuden väheneminen tarkoittaa alentumista siirtogeenin tuotteen ekspressiossa sellaiselle tasolle, joka johtaa siirtogeenin tuotteen merkittävän biologisen aktiivisuuden puutokseen in vivo siirrostuksen jälkeen. Tässä käytettynä termi "aktiivisuuden vähenemiselle epäherkkä promoottori" tarkoittaa promoottoria, joka nisäkäsisäntään in vivo siirrostuksen jälkeen ohjaa siirtogeenin ekspressiota tai jatkaa sen ohjaamista tasolla, joka on biologisesti aktiivinen.

Tässä käytettynä termi "biologisesti aktiivisen molekyylin pitkäaikainen stabiili ekspressio" tarkoittaa biologisesti aktiivisen molekyylin jatkuvaa tuottoa tasolla, joka on riittävä pitämään yllä sen käyttökelpoista biologista aktiivisuutta ajanjakso, joka on pidempi kuin yksi kuukausi, suositeltavasti pidempi kuin kolme kuukautta ja suositeltavimmin pidempi kuin kuusi kuukautta.

Tässä käytettynä termi "ikääntynyt" yksilö on yksilö, jossa on tapahtunut tai tapahtuu neuronaalista degeneraatiota johtuen joko luonnollisesta vanhenemisprosessista tai neurodegeneratiivisesta häiriöstä, joka liittyy luonnolliseen vanhenemisprosessiin. Luonnollisesta vanhenemisprosessista johtuva neuronaalinen degeneraatio tarkoittaa neuronaalisen toiminnan häviämistä tai alentumista verrattuna aiempaan tilaan, joka ei johdu määritellystä kliinisestä epänormaaliudesta tai neurologisesta/neurodegeneratiivisesta häiriöstä, kuten Alzheimerin, Parkinsonin tai Huntingtonin taudista.

Kuvioiden lyhyt kuvaus

Kuvio 1 kuvaa pNUT-ß-NGF-ekspressiovektorin restriktiokartan.

Kuvio 2 kuvaa niiden väliseinän kolinergisten neuroneiden prosenttimäärän, jotka jäivät eloon fimbria-fornix-alueen läpileikkausvaurion jälkeen yhdessä NGF-pro-

teiinia erittävien BHK-solusiirrosten kanssa tai ilman niitä.

Kuvio 3 kuvaa kapseloitujen NGF-proteiinia erittävien BHK-solujen vaikutukset apomorfiinilla indusoituihin pyörimisliikkeisiin toispuoleisesti vaurioitetuissa QA-rotissa. Eläimet testattiin pyörimiskäyttäytymisen suhteen kolmessa eri tilanteessa. Tulokset on esitetty täydellisten samansuuntaisten pyörähdysten määrän keskiarvona (±) keskiarvon keskivirheenä 30 minuutin testiaikana kullekin käsittelyryhmälle. Mustat ympyrät/yhtenäiset linjat edustavat tuloksia elämille, jotka saivat ainoastaan QA-yhdistettä, valkoiset ympyrät/yhtenäiset linjat edustavat tuloksia eläimille, jotka saivat QA-yhdistettä ja NGF-proteiinia erittävät BHK-solusiirrokset ja mustat ympyrät/katkolinjat edustavat tuloksia eläimille, jotka saivat QA-yhdistettä ja sellaisia BHK-solusiirroksia, jotka eivät erittäneet NGF-proteiinia.

Kuvio 4 kuvaa kapseloitujen NGF-proteiinia erittävien BHK-solujen vaikutukset spontaaniin liikunta-aktiivisuuteen molemminpuolisesti vaurioitetuissa QA-rotissa. Tulokset on esitetty ennen leikkausta olevien aktiivisuustasojen prosenttien keskiarvona (±) keskiarvon keskivirheenä kullekin aktiivisuusmittaukselle. Kuviossa HA = horisontaalinen aktiivisuus, TD = kokonaisetäisyys, NM = liikkeiden määrä, AD = keskimääräinen etäisyys, MT = liikeaika, AS = keskimääräinen nopeus, VA = vertikaaliaktiivisuus, VM = vertikaaliliikkeiden määrä, VT = vertikaaliaika, SC = toistuvien pakkoliikkeiden aika ja NS = toistuvien pakkoliikkeiden määrä. Paneeli A-QA; paneeli B-2A/ei-NGF, paneeli C-QA/NGF.

Kuvio 5 esittää kapseloitujen NGF-proteiinia erittävien BHK-solujen vaikutukset haloperidolilla (paneeli A) ja SCH23390-yhdisteellä (paneeli B) indusoituun molemminpuolisesti vaurioitettujen QA-rottien katalepsiaan. Tulokset on esitetty katalepsia-ajan keskiarvona (±) keskiarvon

keskivirheenä kullekin käsittelyryhmälle. Mustat ympyrät/ yhtenäiset linjat edustavat tuloksia eläimille, jotka saivat QA-yhdistettä ja sellaisia BHK-solusiirroksia, jotka eivät erittäneet NGF-proteiinia, valkoiset ympyrät/yhtenäiset linjat edustavat tuloksia eläimille, jotka saivat QA-yhdistettä ja NGF-proteiinia erittäviä BHK-solusiirroksia ja mustat ympyrät/katkolinjat edustavat tuloksia eläimille, jotka saivat ainoastaan QA-yhdistettä.

Kuvio 6 kuvaa von Frey somatosensorikynnys -arvoja, jotka mitattiin kosketuksina vasteelle kussakin kolmessa vetolujuudessa. Paneeli A-5.4 kk; paneeli B-20.6 kk; paneeli C-26.7 kk. Vanhat rotat (26.7 kk), joihin siirrostettiin kapseloituja BHK-NGF-soluja, olivat herkempiä kevyelle stimulukselle kuin verrokkiryhmän vanhat rotat, mutta ne eivät olleet herkempiä kuin nuoret rotat. Mustat ympyrät edustavat verrokkeja; neliöt edustavat NGF-BHK-solujen tuloksia.

Kuvio 7 esittää Morrisin vesilabyrinttitestin toimivan muistiversion tulokset, jossa kunkin yrityksen välillä oli kahden tunnin väliaika. Paneeli A - parempi 50 % ennen siirrostusta; paneeli B - huonompi 50 % ennen siirrostusta. Mustat ympyrät edustavat verrokkeja; neliöt edustavat NGF-BHK-solujen tuloksia.

Kuvio 8 esittää, että ikääntyneissä apinoissa, jotka saivat kapseloituja BHK-NGF-soluja, vaurion indusoima väliseinän neuroneiden degeneraatio lievittyi merkittävästi verrattuna verrokkeihin.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Tämä keksintö koskee parannettuja kapseleita, jotka sallivat kapseloitujen solujen elinkyvyn pidennetyn ajanjakson ajan ja jotka ovat helposti otettavissa takaisin isännästä. Tämä keksintö koskee myös parannettuja laitteita ja menetelmiä, joissa käytetään biologisesti yhteensopivien kapseleiden sisältämiä geneettisesti muunneltuja soluja biologisesti aktiivisten molekyylien ekspressoi-

miseksi ja biologisesti aktiivisten molekyylien pitkäaikaiseksi stabiiliksi kuljettamiseksi isäntänisäkkäisiin.

Esillä olevan keksinnön laitteet ja menetelmät ovat käyttökelpoisia useiden erilaisten biologisesti aktiivisten molekyylien pitkäaikaista stabiilia ekspressiota varten, sisältäen korkean molekyylipainon sisältävät tuotteet aina 200 kD asti, sellaisten tarpeessa olevassa yksilössä ja/tai yksilön tarvitsemien metabolisten toimintojen aikaansaamiseksi, kuten haitallisten aineiden poistamisen. Esillä olevan keksinnön laitteissa ja menetelmissä käytettävät biologisesti aktiiviset molekyylit sisältävät useita erilaisia tekijöitä, joita eri elimet tai kudokset normaalisti erittävät. Esimerkiksi insuliinia voidaan kuljettaa sokeritautipotilaalle, dopamiinia potilaalle, joka kärsii Parkinsonin taudista, faktori VIII -proteiinia tyypin A hemofiilikolle tai puudutusainetta kivusta kärsivälle potilaalle.

Muut biologisesti aktiiviset molekyylit, joita voidaan käyttää esillä olevan keksinnön suorittamisessa, sisältävät troofisia tekijöitä, kuten erytropoietiinin, kasvuhormonin, Substance-P-molekyylin, neurotensiinin, NGF-, BDNF-, NT-3-, NT-4/5-, CNTF-, GDNF-, CDF/LIF-, EGF-, IGF-, PDGF-, bFGF- ja aFGF-proteiinit.

Esillä olevan keksinnön mukaiset laitteet ja menetelmät ovat myös käyttökelpoisia biologisesti aktiivisten molekyylien, jotka sisältävät hemoglobiinin, tyrosiinihydroksylaasin, prohormonikonvertaasin, bcl-2-proteiinin, dopadekarboksylaasin ja dopamiini-ß-hydroksylaasin, pitkäaikaista stabiilia ekspressiota varten.

Toinen tuoteryhmä, joka sopii luovutettavaksi esillä olevan keksinnön mukaisesti, sisältää biologisten vasteiden modifioijat sisältäen lymfokiinit ja sytokiinit.

Tässä kuvattuja kapseloituja soluja voidaan myös käyttää elintärkeiden metabolisten toimintojen uudelleen muodostamiseen tai lisäämiseen, kuten toksiinien tai hai-

tallisten metaboliittien (esim. kolesterolin) poistaminen verenkierrosta sellaisten solujen, kuten hepatosyyttien, avulla. Esillä olevan keksinnön mukaiset menetelmät mahdollistavat solujen siirrostamisen ilman, että vastaanottajaa tarvitsee samalla immunosuppressoida hoidon aikana. Tämän keksinnön menetelmiä käyttäen tietyn aineen homeostaasi voidaan muodostaa uudelleen ja pitää yllä pidennetyn ajanjakson ajan.

Tämän keksinnön piiriin ajatellut biologisesti aktiiviset molekyylit sisältävät sellaiset molekyylit, jotka eritetään kapselista tai muutoin siirrostetusta solusta, ja jotka joko suoraan tai epäsuorasti johtavat biologiseen vaikutukseen nisäkäsisännässä kuin myös ne biologisesti aktiiviset molekyylit, jotka suoraan tai epäsuorasti johtavat biologisiin vaikutuksiin soluille, jotka ovat kapselin sisällä.

Tämän keksinnön suositeltava suoritustapa on parannettu menetelmä neurotrofisten tekijöiden luovuttamiseksi isäntäsnisäkkäiden keskushermostosysteemissä (CNS). Tämän keksinnön spesifisessä suoritustavassa esitetään parannettu menetelmä hermokasvutekijän (NGF) pitkäaikaiseksi stabiiliksi ekspressoimiseksi ja luovuttamiseksi nisäkäsisännän keskushermostosysteemin spesifiselle alueelle.

Geenit, jotka koodittavat useita biologisesti aktiivisia molekyylejä, on kloonattu ja niiden nukleotidisekvenssit on julkaistu. Monet niistä geeneistä on julkisesti saatavissa tallenteista, kuten American Type Culture Collection -kokoelmasta (ATCC) tai erilaisista kaupallisista lähteistä. Tässä keksinnössä käyttökelpoiset biologisesti aktiivisia molekyylejä koodittavat geenit, jotka eivät ole kaupallisesti saatavissa, voidaan muodostaa käyttämällä standardeja yhdistelmä-DNA-menetelmiä, kuten PCR-amplifikaatiota, genomisten ja cDNA-kirjastojen seulontaa oligonukleotidikoettimilla. Mitä tahansa tunnettua geeniä, joka koodittaa biologisesti aktiivista molekyyliä,

voidaan käyttää tämän keksinnön menetelmissä. Katso esim. US-patentti 5 049 493; Gage et al., US-patentti 5 082 670 ja Genentech-yhtiön US-patentti 5 167 762.

Niiden geenien joukossa, jotka ovat erityisen käyttökelpoisia tässä keksinnössä, ovat geenit, jotka koodittavat ihmisen proenkefaliini A -proteiinia, ihmisen prohormonikonvertaasi 2 -proteiinia, ihmisen prohormoni konvertaasi 3 -proteiinia, ihmisen BDNF-proteiinia, POMC-proteiinia (pro-opiomelanokortiini), ß-endorfiinia, prodynorfiinia, kypsää ihmisen BDNF-proteiinia, jossa on ihmisen NGF-signaalisekvenssi, ihmisen CNTF-proteiinia, ihmisen T3-proteiinia, ihmisen NGF-proteiinia, rotan GDNF-proteiinia, kypsää ihmisen NT5-proteiinia, jossa on ihmisen NGF-signaalisekvenssi, naudan dopamiini-ß-hydroksylaasia, naudan dopamiinidekarboksylaasia ja tymidiinikinaasia.

Haluttu geeni (se on geeni, joka koodittaa sopivaa biologisesti aktiivista molekyyliä) voidaan insertoida sopivan ekspressiovektorin kloonauskohtaan käyttäen standardimenetelmiä. On ymmärrettävä, että useampi kuin yksi geeni voidaan insertoida sopivaan ekspressiovektoriin. Nämä menetelmät ovat alan asiantuntijan hyvin tuntemia.

Sitten halutun geenin sisältämää ekspressiovektoria voidaan käyttää transfektoimaan sellainen solulinja, jota käytetään tämän keksinnön menetelmissä. Standardeja transfektiomenetelmiä, kuten kalsiumfosfaattiyhteissaostusta, DEAE-dekstraanitransfektiota tai elektroporaatiota, voidaan käyttää. Kaupallisesti saatavat nisäkkään transfektiokäyttöpakkaukset voidaan hankkia esim. Stratagene-valmistajalta.

Useita erilaisia isäntä/ekspressiovektoriyhdistelmiä voidaan käyttää haluttua biologisesti aktiivista molekyyliä koodittavan geenin ekspressoimiseksi. Pitkäaikainen stabiili <u>in vivo</u> ekspressio saadaan aikaan käyttäen ekspressiovektoreita (se on, yhdistelmä-DNA-molekyylejä), joissa biologisesti aktiivista molekyyliä koodittava geeni

on toiminnallisesti liitetty promoottoriin, joka ei ole herkkä aktiivisuuden vähenemiselle siirrostettaessa in vivo nisäkäsisäntään. Sen mukaisesti sellaiset ekspressiovektorit eivät tyypillisesti sisällä retroviruksen promoottoria.

Sopivat promoottorit sisältävät esimerkiksi SV40-viruksen tai adenoviruksen aikaisen ja myöhäisen promoottorin ja muut tunnetut ei-retroviruspromoottorit, jotka kykenevät säätelemään geeniekspressiota.

Käyttökelpoiset ekspressiovektorit voivat sisältää esimerkiksi kromosomaalisia, ei-kromosomaalisia ja synteettisiä DNA-sekvenssejä, kuten erilaiset tunnetut SV40-johdannaiset ja tunnetut bakteeriplasmidit, esim. E. coli -bakteerin plasmidit pUC, pBlueScript™ sisältäen plasmidit pBR322, pCR1, pMB9, pUC, pBlueScript™ ja niiden johdannaiset.

Ekspressiovektorit, jotka sisältävät genetisiini- (G418) tai hygromysiinilääkeselektiogeenit [Southern, P.J. (1981), In Vitro, 18, 315, Southern, P.J. ja Berg, P. (1982), J. Mol. Appl. Genet., 1, 327] ovat myös käyttökelpoisia tämän keksinnön suorituksessa. Näissä vektoreissa voidaan käyttää useita erilaisia tehostaja/promoottori-alueita halutun biologisen geenin (esim. NGF-geenin) ekspression ohjaamiseksi, ja/tai geeniä, joka saa aikaan resistenssin toksiiniselektiolle, kuten G418- tai hygromysiini B -geenin. G418-resistenssigeeni koodittaa aminoglykosidifosfotransferaasia (APH), joka inaktivoi entsymaattisesti G418-yhdisteen (100 - 500 µg/µl), joka on lisätty viljelyalustaan. Vain ne solut, jotka ekspressoivat APH-geeniä, jäävät eloon lääkeselektiosta johtaen tavallisesti yhtä hyvin toisen biologisen geenin ekspressioon. Hygromysiini B fosfotransferaasigeeni (HPH) koodittaa entsyymiä, joka spesifisesti modifioi hygromysiinitoksiinia ja inaktivoi sen. Geenit, jotka on transfektoitu yhtäaikaa hygromysiini B fosfotransferaasigeenin kanssa tai jotka sisäl-

tyvät plasmidiin, joka sisältää sen geenin, ekspressoituvat valikoivasti sellaisessa hygromysiini B -konsentraatiossa, joka on 50 - 200 µg/ml.

Useita erilaisia nisäkkään promoottoreita voidaan käyttää ohjaamaan G418- ja hygromysiini B -geenien ja/tai halutun biologisen geenin ekspressiota. Nämä promoottorit sisältävät, mutta eivät ole rajoittuneet, hDBH-promoottorin (ihmisen dopamiini-ß-hydroksylaasi)[Mercer et al., Neuron, 7, 703 - 716 (1991)], hTH-promoottorin (ihmisen tyrosiinihydroksylaasi)[Kaneda et al., Neuron, 6, 583 - 594 (1991)], hPNMT-promoottorin (ihmisen fenyylietanoliamiini-N-metyylitransferaasi)[Baetge et al., PNAS, 85, 3648 - 3652 (1988)], mGFAP-promoottorin (hiiren glian säikeinen hapan proteiini)[Besnard et al., J. Biol. Chem., 266, 18877 - 18883 (1991)], myeliinin emäksisen proteiinin promoottorin (MBP), mNF-L-promoottorin (hiiren neurofilamentin kevyt alayksikkö)[Nakahira et al., J. Biol. Chem., 265, 19786 - 19791 (1990)], hPo-promoottorin (ihmisen P^0-promoottori geenille, joka koodittaa pääasiallista myeliiniglykoproteiinia perifeerisessä hermostosysteemissä)[Lemke et al., Neuron, 1, 73 - 83 (1988)], mMT-promoottorin, rNSE-promoottorin (rotan neuronispesifinen enolaasi)[Sakimura et al., Gene, 60, 103 - 113 (1987)] ja niiden kaltaiset.

Esimerkit ekspressiovektoreista, joita voidaan käyttää, ovat kaupallisesti saatavat pRC/CMV-, pRC/RSV- ja pCDNA1NEO-vektorit (InVitrogen). Ne viruspromoottorialueet, jotka ohjaavat haluttujen lääkeselektio- ja biologisten geenien transkriptiota, korvataan yhdellä yllä mainituista promoottorisekvensseistä, jotka eivät ole alttiita viruspromoottorien keskushermostossa kohtaamalle aktiivisuuden alenemiselle. Esimerkiksi GFAP-promoottoria voidaan käyttää astrosyyttien ja astrosyyttisolulinjojen transfektioon, TH-promoottoria voidaan käyttää PC12-so-

luissa tai MBP-promoottoria voidaan käyttää oligodendrosyyteissä.

Eräässä suoritustavassa käytetään pNUT-ekspressiovektoria (katso kuvio 1). Lisäksi pNUT-ekspressiovektori voidaan modifioida niin, että DHFR-proteiinia koodittava sekvenssi korvataan G418- tai hygromysiinilääkeresistenssiä koodittavalla sekvenssillä. pNUT-ekspressiovektorin SV40-promoottori voidaan korvata myös millä tahansa sopivalla konstitutiivisesti ekspressoituvalla nisäkkään promoottorilla, kuten niillä, joista on keskusteltu yllä.

Useita erilaisia soluja voidaan käyttää. Nämä sisältävät hyvin tunnetut julkisesti saatavat kuolemattomiksi tehdyt solulinjat kuin myös jakautuvat primaarisoluviljelmät. Esimerkit sopivista julkisesti saatavista solulinjoista sisältävät poikashamsterin munuaissolut (BHK), kiinanhamsterin munasarjasolut (CHO), hiiren fibroblastisolut (L-M), NIH Swiss -hiiren alkiosolut (NIH/3T3), afrikkalaisen viherapinan solulinjat (sisältäen COS-1-, COS-7-, BSC-1-, BSC-40-, BMT-10- ja Vero-solulinjat), rotan lisämunuaisen feokromosytoomasolut (PC12 ja PC12A), AT3-solut, rotan gliakasvainsolut (C6), astrosyytit ja muut fibroblastisolulinjat. Primaarisolut, joita voidaan käyttää, sisältävät bFGF-responsiiviset neuronin esiastekantasolut, jotka ovat peräisin nisäkkäiden keskushermostosta [Richards et al., PNAS 89, 8591 - 8595 (1992); Ray et al., PNAS 90, 3602 - 3606 (1993)], primaariset fibroblastit, Schwannin solut, astrosyytit, ß-TC-solut, Hep-G2-solut, oligodendrosyytit ja niiden esiasteet, myoblastit ja niiden kaltaiset.

Solutyypit, joita voidaan käyttää tämän keksinnön piiriin kuuluvassa kapseloitujen solujen avulla tapahtuvassa terapiassa sisältävät solut allogeenisista ja ksenogeenisistä lähteistä. Yksi pääasiallisista eduista kapseloitujen solujen lähestymistavassamme lepää tämän keksinnön mukaisten membraanien immuunisysteemiltä eristävissä

ominaisuuksissa ja niiden kyvyssä kantaa soluja, jotka muutoin eivät olisi sopivia siirrostettaviksi (se on, solut muista kuin ihmislähteistä, kuolemattomiksi tehdyt ja/tai kasvainsolulinjat). Erityinen etu ksenogeenisten solujen käyttämiseksi verrattuna allogeenisiin soluihin on se, että epätodennäköisessä membraanivauriotapauksessa immuunisysteemin aiheuttama tuho kohdistuu todennäköisemmin ksenogeenisiin soluihin kuin allogeenisiin soluihin. Lisäksi, ksenogeeniset lähteet on helppo saada ja niiden käyttö poistaa ihmisen sellaisen kudoksen käyttötarpeen, jota on vaikea saada ja jonka käyttöön liittyy paljon sosiaalisia ja eettisiä seikkoja. Lisäksi, ihmisen kudos voi sisältää vieraita aineita, jotka siirtyvät helpommin siirrostettavaan vastaanottajaan. Lopuksi, ksenogeenisen kudoksen tai ksenogeenisten solulinjojen käyttö siirrostuksessa ihmiseen poistaa riskit, jotka liittyvät ihmisen kudoksen käsittelyyn ja prosessointiin.

Eräässä keksinnön suoritustavassa käytetään pNUT-amplifikaatioekspressiosysteemiä BHK-solujen transfektioon. pNUT-vektoria, joka sisältää halutun geenin, voidaan kuitenkin käyttää myös useiden muiden kuolemattomiksi tehtyjen standardi- tai transformoitujen kudosviljelysolulinjojen, kuten COS-, L-, CHO- ja niiden kaltaisten solujen, kuten yllä on keskusteltu, transfektiossa. Lisäksi pNUT-ekspressiovektoria voidaan käyttää transfektoitaessa primaariset astrosyytit, oligodendrosyytit tai neuronaaliset solulinjat (esim. bFGF-responsiiviset neuronin esiastekantasolut, kuten yllä on keskusteltu).

Tämän keksinnön mukaisesti transformoidut solulinjat kykenevät aikaansaamaan biologisesti aktiivisen (aktiivisten) molekyylin (molekyylien) pitkäaikaisen stabiilin ekspression. Sellainen pitkäaikainen stabiili ekspressio voidaan saada aikaan kohottamalla tai amplifioimalla biologisesti aktiivista (aktiivisia) molekyyliä (molekyylejä) koodittavan siirtogeenin määrää käyttäen alalla hy-

vin tunnettuja amplifikaatiomenetelmiä. Sellaiset amplifikaatiomenetelmät sisältävät esim. DHFR-amplifikaation (katso esim. Kaufman et al., US-patentti 4 470 461) tai glutamiinisyntetaasiamplifikaation ("GS") (katso esim. US-patentti 5 122 464 ja julkaistu EP-patenttihakemus 338 841).

Toinen menetelmä geenien pitkäaikaisen stabiilin ekspression aikaansaamiseksi nisäkässoluissa on kaksoistransfektio, jossa käytetään kahta erillistä lääkeselektiomerkkiä, hygromysiini- tai G418-resistenssiekspressiovektoreita voidaan käyttää peräkkäin tai yhtäaikaa transfektoimaan useita yllä mainittuja solulinjoja niin, että saadaan aikaan erilaiset määrät insertoituneita geenikopioita ja sen vuoksi erilaiset halutun geenin ekspressiotasot.

Eräässä suoritustavassa solut transfektoidaan plasmidilla pRC/CMV, joka sisältää ß-NGF-proteiinia koodittavan sekvenssin tai muun halutun geenin toiminnallisesti liitettynä GFAP-promoottori/tehostajaelementtiin, joka korvaa ne CMV-promoottorisekvenssit, jotka normaalisti löytyvät tästä ekspressiovektorista. Kun on selektoitu ne stabiilit kloonit, jotka ekspressoivat transfektoitua siirtogeeniä, kloonit transfektoidaan uudestaan samalla pRC/GFAP-NGF-ekspressiovektorilla, joka sisältää bakteerin hygromysiini B fosfotransferaasigeenin [Gritz ja Davies, Gene, 179 - 188 (1983)] G418-resistenssigeenin tilalla. Kun stabiilit kloonit on selektoitu uudelleen sekä hygromysiinillä että G418-yhdisteellä, solut voidaan testata sellaisten kloonien suhteen, joilla on korkein määrä transfektoidun siirtogeenin integroituneita kopioita ja/tai korkein ekspressio sekä RNA- että proteiinituotteiden suhteen. Tällä tavalla voidaan käyttää muita lääkeselektioekspressiovektoripareja muodostamaan sellaiset useilla vektoreilla transfektoidut solulinjat, joilla on stabiilisti integroituneena geneettisen materiaalin korkeat ko-

piomäärät ja jotka ekspressoivat erilaisia tasoja haluttuja biologisesti aktiivisia molekyylejä.

Soluja voidaan käyttää paljon tämän keksinnön mukaisissa menetelmissä niin, että polymeerikapselin siirrostaminen riittää muodostamaan tehokkaan määrän tarvittavaa ainetta tai toimintoa yksilölle. Lisäksi useampaa kuin yhtä biologisesti aktiivista molekyyliä voidaan stabiilisti ekspressoida ja/tai luovuttaa pitkiä aikoja yksittäisessä kapselissa.

Yksi keino saada aikaan tämä tulos on kapseloida yksittäinen solulinja, joka on geneettisesti muunneltu niin, että se ekspressoi useampaa kuin yhtä heterologista geeniä.

Toinen tapa saada aikaan tämä tulos on kapseloida yksittäinen kapseli soluseoksella, jossa kukin solu on geneettisesti modifioitu niin, että se ekspressoi yhtä biologisesti aktiivista molekyyliä ja toiset solut on geneettisesti modifioitu niin, että ne ekspressoivat toista biologisesti aktiivista molekyyliä. On ymmärrettävä, että muutoin kuin geneettisesti manipuloitua solulinjaa voidaan käyttää toisen biologisesti aktiivisen molekyylin muodostamiseksi.

Solulinja voi esimerkiksi myös olla geneettisesti manipuloitu niin, että se ekspressoi erilaisia biologisesti aktiivisia molekyylejä. Emosolulinjojen jatkokloonit, joista kukin ekspressoi erilaista siirtogeeniä, voidaan sitten yhdistää ja kapseloida niin, että saadaan aikaan haluttu pitkäaikainen vaikutus.

Nämä lähestymistavat poistavat tarpeen useiden siirrosten käyttämiseksi pitkäaikaista stabiilia ekspressiota varten ja useamman kuin yhden biologisesti aktiivisen molekyylin luovuttamiseksi yhteen kohtaan.

Tämä keksintö koskee myös sellaisten kapseleiden käyttöä, jotka sisältävät soluja, jotka on geneettisesti muunneltu heterologisella geenillä, joka mahdollistaa so-

lujen pysymisen elinkykyisinä kapselissa siirrostettaessa isäntänisäkkääseen. Toisin sanoen, tämän keksinnön mukaiset menetelmät koskevat myös sellaisia menetelmiä, joilla luovutetaan molekyylejä siirrostettujen kapseleiden sisällä.

Tämän keksinnön mukaisen spesifisen suoritustavan mukaisesti käytimme pNUT-ekspressiovektoria, joka sisälsi ihmisen ß-NGF-geenin toiminnallisesti liitettynä hiiren metallotioneiinipromoottoriin, transfektoimaan BHK-solut kalsiumfosfaattiyhteissaostusmenetelmällä.

Useat erilaiset biologisesti yhteensopivat immuunisysteemiltä eristävät kapselit ovat sopivia tämän keksinnön mukaisesti molekyylien luovuttamiseksi. Sellaiset kapselit sallivat aineenvaihduntatuotteiden, ravinteiden ja terapeuttisten aineiden läpikulun samalla, kun ne minimoivat isännän immuunisysteemin tuhoisat vaikutukset. Tämän keksinnön mukainen kapseli on suositeltavasti samanlainen kuin ne, jotka ovat kuvanneet Aebischer et al., PCT-julkaisu WO 92/19 195, joka on liitetty tähän viitteksi.

Suositeltavimmin tässä kuvattuja T1/2-membraaneja käytetään sellaisten solujen kapseloimiseksi, jotka on modifioitu tämän keksinnön mukaisilla menetelmillä. On ymmärrettävä, että tässä kuvattuja T1/2-membraaneja voidaan käyttää myös minkä tahansa muun sopivan solun tai solulinjan kapseloimiseen. Näin ollen tämän keksinnön mukaisia T1/2-membraaneja voidaan käyttää kapseloimaan primaarisoluja (ei-jakaantuvia) kuin myös jakautuvia soluja.

Käyttökelpoiset biologisesti yhteensopivat polymeerikapselit sisältävät (a) ytimen, joka sisältää solun tai solut suspensoituna joko nestemäiseen alustaan tai immobilisoituna hydrogeeliin tai solunulkoiseen matriksiin, ja (b) ympäröivän tai perifeerisen selektiivisesti läpäisevän matriksi- tai membraanialueen (vaippa), joka ei sisällä eristettyjä soluja, joka on biologisesti yhteensopiva ja

joka riittää suojaamaan eristettyjä soluja, jos niitä on läsnä ytimessä, tuhoisalta immunologiselta hyökkäykseltä.

Polymeerikapselin ydin on rakennettu niin, että se antaa sopivan paikallisen ympäristön siihen eristettyjen solujen jatkuvaa elinkykyä ja toimintaa varten.

Monet transformoidut solut tai solulinjat eristetään edullisimmin kapseliin, jossa on nestemäinen ydin. Solut voidaan eristää esimerkiksi kapseliin, jonka ydin sisältää ravinnealustan, joka vaihtoehtoisesti sisältää lisätekijöiden, kuten naudan sikiön seerumin tai hevosen seerumin, nestemäisen lähteen niin, että se pitää yllä solun elinkykyä ja toimintaa.

Mikrokapselit voivat joskus olla sopivia käytettäviksi tämän keksinnön mukaisissa menetelmissä ja koostumuksissa. Mikrokapselien valmistuksen ovat kuvanneet Espevik et al., PCT-julkaisu WO 91/07 951, ja Sefton, US-patentti 4 353 888, jotka on sisällytetty tähän viitteeksi.

Ydin voi sopivasti sisältää matriksin, joka on muodostettu hydrogeelistä, joka stabiloi solujen sijainnin solurykelmiksi. Tässä käytetty termi "hydrogeeli" viittaa ristisidottujen hydrofiilisten polymeerien kolmiulotteiseen verkkoon. Verkko on geelin muodossa, joka sisältää oleellisesti vettä, suositeltavasti, mutta ei rajoittuen geeleihin, joissa vettä on enemmän kuin 90 %.

Koostumukset, jotka muodostavat hydrogeelejä, jakautuvat kolmeen luokkaan. Ensimmäisessä luokassa on negatiivinen nettovaraus (esim. alginaatti). Toisessa luokassa on positiivinen nettovaraus (esim. kollageeni ja lamiini). Esimerkit kaupallisesti saatavissa olevista solunulkoisista matriksikomponenteista sisältävät Matrigel™- ja Vitrogen™-matriksit. Fibroblastit säilyvät yleensä hyvin hengissä positiivisesti varatussa matriksissa ja ne on sen vuoksi sopiva kapseloida solunulkoisen matriksityypin hydrogeeleihin. Kolmas luokka sisältää neutraalin varauksen (esim. erittäin ristisidottu polyetyleenioksidi tai poly-

vinyylialkoholi). Mitä tahansa sopivaa matriksia tai väliainetta voidaan käyttää ytimessä sisältäen saostetun kitosaanin, synteettiset polymeerit ja polymeeriseokset, mikrokantajat ja niiden kaltaiset, riippuen kapseloitavien solujen kasvuominaisuuksista.

Kapselit ovat suositeltavasti immuunisysteemiltä eristäviä. Jotta ne olisivat immuunisysteemiltä eristäviä, kapselia ympäröivän tai perifeerisen alueen tulisi antaa soluille suoja sen isännän immuunisysteemiltä, johon kapseli siirrostetaan, estämällä isännän kehon haitallisten aineiden tuleminen vehikkelin ytimeen ja muodostamalla fyysinen este, joka on riittävä estämään tuhoisa immunologinen kontakti eristettyjen solujen ja isännän immuunisysteemin välillä. Tämän fyysisen esteen paksuus voi vaihdella, mutta se on aina riittävän paksu niin, että se estää esteen kummallakin puolella olevien solujen ja/tai aineiden suoran kontaktin. Tämän alueen paksuus vaihtelee yleensä 5 ja 200 µm välillä; paksuus, joka on 10 - 100 µm, on suositeltava ja paksuus, joka on 20 - 75 µm, on erityisen suositeltava. Immunologisen hyökkäyksen tyypit, jotka voidaan estää tai minimoida esillä olevaa vehikkeliä käyttämällä, sisältävät makrofaagien, neutrofiilien, soluvälitteisten immuunivasteiden [esim. luonnolliset tappajasolut ja vasta-aineriippuvainen T-soluvälitteinen sytolyysi (ADCC)] ja humoraalisen vasteen (esim. vasta-aineriippuvaisen komplementtivälitteisen sytolyysin) aiheuttamat hyökkäykset.

Immuunisysteemiltä eristävien kapseleiden käyttö sallii ksenogeenisten solujen tai kudoksen siirrostamisen ilman, että samalla tarvitsee immunosuppressoida vastaanottajaa. Immuunisysteemiltä eristävien kapseleiden käyttö sallii myös yhteensopimattomien solujen (allograftien) käytön. Ksenogeenisiä soluja vastaan olevan immuunivasteen tyypin ja voimakkuuden odotetaan eroavan siitä vasteesta, joka saadaan aikaan, kun vastaanottajaan siirrostetaan

syngeenistä tai allogeenistä kudosta. Tämä vaste voi tapahtua pääasiassa soluvälitteisellä tai komplementtivälitteisellä hyökkäyksellä; määräävät parametrit tietyssä tapauksessa voivat olla huonosti ymmärrettyjä. IgG-proteiinin poissulkeminen vehikkelin ytimestä ei kuitenkaan ole immunosuojauksen koetinkivi, koska useimmissa tapauksissa IgG yksinään ei ole riittävä tuottamaan kohdesolujen tai kohdekudosten sytolyysiä. Käyttäen immuunisysteemiltä eristäviä makrokapseleita on mahdollista luovuttaa tarvittavat korkean molekyylipainon sisältävät tuotteet tai saada aikaan aineenvaihduntatoiminnot, jotka kuuluvat korkean molekyylipainon sisältäviin aineisiin edellyttäen, että kriittiset aineet, jotka ovat tarpeen immunologisen hyökkäyksen välittämiselle, on poistettu immuunisysteemiltä eristävästä kapselista. Nämä aineet voivat sisältää komplementin hyökkäyskompleksin komponentin C1q-proteiinin, tai ne voivat sisältää fagosyyttisiä tai sytotoksisia soluja; esillä oleva immuunisysteemiltä eristävä kapseli esittää suojaavan esteen näiden haitallisten aineiden ja eristettyjen solujen välille. Näin ollen immuunisysteemiltä eristävää kapselia voidaan käyttää jopa ksenogeenisten solujen, sellaisten tuotteiden, joiden molekyylipainot ovat laajalla välillä, kuten insuliinin, paratyroidihormonin, interleukiini 3 -proteiinin, erytropoietiinin, albumiinin, transferriinin, enkefaliinien, endorfiinien, katekoliamiinien, faktori VIII -proteiinin, NGF-, BDNF-, NT-3-, NT-4/5-, CNTF-, GDNF-, CDF/LIF-, EGF-, IGF-, bFGF-, aFGF-, PDGF-, TGF-proteiinien ja niiden kaltaisten, luovuttamiseen.

Erilaisia polymeerejä ja polymeeriseoksia voidaan käyttää kapselivaipan valmistukseen sisältäen polyakrylaatit (sisältäen akryylikopolymeerit), polyvinylideenit, polyvinyylikloridikopolymeerit, polyuretaanit, polystyreenit, polyamidit, selluloosa-asetaatit, selluloosanitraatit, polysulfonit, polyfosfatseenit, polyakrylonitriilit,

poly(akrylonitriili/kovinyylikloridin) kuin myös niiden johdannaiset, kopolymeerit ja seokset.

Kapseli voi olla minkä tahansa muotoinen, joka on sopiva biologisen aktiivisuuden ylläpitämiseksi ja joka antaa mahdollisuuden tuotteen tai toiminnon luovuttamiseksi sisältäen esimerkiksi sylinterin, suorakulmaisen, levyn, ympyrän, munan, tähtimäisen tai pallomaisen muodon. Lisäksi, kapseli voi olla kierretty tai kiedottu verkon tai sisäkkäisen kaltaiseen rakenteeseen. Jos kapseli on tarkoitus ottaa talteen sen jälkeen kun se on siirrostettu, muotoja, joilla on taipumus johtaa kapselien kulkeutumiseen siirrostuskohdasta, kuten pallomaiset kapselit, jotka ovat riittävän pieniä kulkemaan vastaanottajan verisuonissa, ei suositella. Tietyt muodot, kuten suorakulmaiset, ympyrät, levyt, sylinterit ja litteät levyt tarjoavat suuremman rakenteellisen kestävyyden ja ne ovat suositeltavia, kun talteenotto halutaan tehdä.

Esillä olevan kapselin täytyy suoda, ainakin yhdessä ulottuvuudessa, kaikille ytimessä oleville eristetyille soluille riittävä läheisyys vastaanottajan ympäröiviin kudoksiin, sisältäen vastaanottajan verenkierron niin, että saadaan aikaan eristettyjen solujen elinkyky ja toiminta. Kapselin muodostamiseen käytettyjen materiaalien diffuusirajoitukset eivät kuitenkaan kaikissa tapauksissa yksinomaan määrää sen muotorajoituksia. Joitain lisäaineita voidaan käyttää, jotka muuttavat tai tehostavat perusvehikkelin diffuusiominaisuuksia tai ravinteiden tai hapen siirto-ominaisuuksia. Esimerkiksi sisällä olevaan alustaan voidaan lisätä hapella kyllästettyjä perfluorihiiliyhdisteitä näin alentaen tarvetta läheiseen kosketukseen verenkierron hapen kanssa. Tämä sallii eristettyjen solujen hengissä pysymisen samalla, kun esimerkiksi angiotensiinin gradientti vapautuu kapselista ympäröivään kudokseen stimuloiden hiussuonten sisäänkasvua. Viitteet ja menetelmät perfluorihiiliyhdisteiden käyttämiseksi on annettu julkai-

suissa Faithful, N.S. (1987), Anaesthesia, 42, 234 - 242, ja NASA Tech Briefs MSC-21480, Yhdysvaltain hallituksen kirjapaino, Washington, D.C. 20402, jotka on liitetty tähän viitteiksi.

Eräässä suositeltavassa suoritustavassa siirrostettava kapseli on sopivan kokoinen ja kestävä niin, että se voidaan ottaa talteen siirrostamisen jälkeen. Sellaisissa makrokapseleissa on ydin, jonka minimitilavuus on suositeltavasti noin 1 - 10 µl, ja riippuen käytöstä, se on helppo valmistaa niin, että sen tilavuus on yli 100 µl.

Suositeltavassa kapselissa on sisällä ultrasuodatusmembraani, jossa on selektiivisesti läpäiseviä huokosia, joiden läpäisykyvyn raja on BSA-hyljintäkerroin 60 - 98 % ja ovalbumiinihyljintäkerroin 50 - 90 %. Kapseli voi olla litteän levyn muotoinen, joka on suljettu periferiastaan tai ontto kuitu, joka on suljettu päistään, kuten on kuvattu PCT-patenttihakemuksessa WO 92/191 95. Litteän levyn muodossa kahta seinämää erottaa aukko, jonka paksuus on vähemmän kuin 1 000 µm, suositeltavasti vähemmän kuin 300 µm. Seinän paksuuden tulisi olla noin 25 - 200 µm, suositeltavasti 30 - 75 µm.

Onttokuidun muodossa kuidun sisähalkaisija on vähemmän kuin 1 500 µm, suositeltavasti vähemmän kuin 300 - 600 µm. Kummassakin geometriassa hydraulinen läpäisevyys on 1 - 100 ml/min/m^2/mmHg, suositeltavasti 25 - 70 ml/min/m^2/mmHg. Kapselin glukoosimassasiirtokerroin, joka määritetään, mitataan ja lasketaan, kuten ovat kuvanneet Dionne et al., ASAIO Abstracts, 99 (1993), ja Colton et al., The Kidney, Brenner, B.M. ja Rector, F.C., toim., 2425 - 89 (1981), on suurempi kuin 10^{-6} cm/sek, suositeltavasti suurempi kuin 10^{-4} cm/sek.

Kapselin ulkoseinän pinnan morfologia vaihtelee. Aiemmin kuvatut T1-, T2-, T4-membraanit ja tämän keksinnön uudet T1/2-membraanit eroavat ulkoseinän pinnan morfolo-

gialtaan. Kaikille näille membraaneille on ominaista sisällä oleva selektiivisesti läpäisevä kalvo.

T1-membraaneille on ominaista "avoin" tai aukollinen ei-selektiivisesti läpäisevä ulkoseinän pinta ja juosteinen seinärakenne ulko- ja sisäseinäpintojen välissä. Katso esim. Lacy et al., Science 254, 1782 - 84 (1991). T1-membraanin ulkoseinän pinnan "makrohuokosten" aukot vievät tyypillisesti noin 20 - 40 % ulkoseinän pinnan kokonaispinta-alasta. Makrohuokoset ovat tyypillisesti halkaisijaltaan 10 - 15 µm tai suurempia.

T2-membraaneilla on samantapainen juosteinen rakenne sisä- ja ulkoseinän välissä, mutta niille on ominaista "suljetumpi" tai pehmeämpi ulkoseinän pinta. T2-membraaneille on tyypillisesti ominaista se, että niissä on vähemmän kuin 10 % makrohuokosia ulkoseinän pinnassa ja todellisuudessa yksikään maksohuokonen ei ole 5 - 15 µm halkaisijakoon alueella.

T4-membraanit ovat edelleen erilaisia niin, että niiden ulkopinta on myös selektiivisesti läpäisevä toisin kuin T1- tai T2-membraanien. T4-membraanit ovat käyttökelpoisia CSF-siirrostuskohtiin, kuten kammiohin tai lukinkalvon alaiseen tilaan, kuin myös muihin sellaisiin siirrostuskohtiin, jotka ovat nesteen sisällä.

Kädellisen aivon peruskudokseen tai muuta "kiinteää" kudossiirrostusaluetta varten suosittelemme käytettäväksi pehmeäseinäkapselia, joka on oleellisesti soluja läpäisemätön. Muut ovat kuvanneet avoimet seinät, jotka tehostavat hiussuonten muodostumista (katso esim. Brauker et al. WO/92/07 525). T1- ja T2-kapselit sopivat erityisen hyvin pitkäaikaisiin siirrostuksiin. Suosittelemme T1/2-kapseleita.

T1/2-kapseleille on ominaista makrohuokosten kokonaisjakautuma, joka on noin 2 - 20 %, suositeltavasti 2 - 15 % ulkoseinän pinnan kokonaisalueesta. Makrohuokosten halkaisijan tulisi olla kooltaan noin 5 µm - 15 µm. Tämän

kokoisten huokosten kokojen suhteellinen jakautuma voi vaihdella.

Erässä spesifisessä suoritustavassa käytettiin T1/2-onttokuitumembraanikapseleita, jotka tehtiin PAN/PVC-yhdisteestä. Tämän suoritustavan mukaisesti makrohuokosten kokonaisalue oli noin 12 % ulkoseinän pinnan kokonaispinta-alasta. Noin 20 % makrohuokosista oli halkaisijaltaan 5 - 15 µm ja noin 80 % makrohuokosista oli noin 10 µm halkaisijaltaan.

Toisessa spesifisessä suoritustavassa valmistettiin T1/2-onttokuitumembraanikapselit, joiden makrohuokosten kokonaispinta-ala oli noin 2,4 % ulkoseinän pinnan kokonaispinta-alasta. Noin 17 % makrohuokosista oli halkaisijaltaan noin 5 µm, noin 33 % oli noin 10 µm halkaisijaltaan ja noin 50 % oli noin 15 µm halkaisijaltaan.

Toisessa spesifisessä suoritustavassa valmistettiin T1/2-onttokuitumembraanikapselit, joiden makrohuokosten kokonaispinta-ala oli noin 10 % ulkoseinän pinnan kokonaispinta-alasta. Enemmän kuin 99 % näistä makrohuokosista oli halkaisijaltaan 10 - 15 µm.

Ulkopinnan makrohuokosten morfologien kvantifikaatio voidaan suorittaa käyttäen mitä tahansa standardimenetelmää. Käytimme kahta menetelmää.

Toisessa menetelmässä onttokuitumembraanin leikkeet kiinnitetään pyyhkäisyelektronimikroskopiaa varten. Sitten kuitujen ulkopinta päällystetään pommittamalla kullalla. Muodostetaan kuvat 1 000 x suurennoksella. Yksi elektronimikroskooppikuva 1 000 x suurennoksella sisältää alueen, joka on noin 9,2 kµm^2 (115 µm x 80 µm). Näissä kuvissa halkaisijaltaan 10 µm huokonen on halkaisijaltaan 1 cm suuruinen. Käyttäen ympyränmuotoista templaattia kaikkien huokosten voidaan luokitella olevan joko 15 µm, 10 µm, 5 µm tai 2,5 µm kokoisia halkaisijaltaan. Avoimen ulkoseinän pinnan kokonaisprosenttimäärä (se on, makrohuokosten) lasketaan arvona (kaikkien huokosten viemä pinta-ala/mik-

roskooppikuvan kokonaispinta-ala) x 100. Samanlaisia laskelmia käytetään määritettäessä yksittäisten huokosten koot.

Automatisoituja systeemejä voidaan käyttää kvantitaation suorittamiseksi. Valmistetaan yllä kuvatulla tavalla pyyhkäisyelektronimikroskooppikuvat 1 000 x suurennoksella. Kuvan tallennukseen analyysiä (SCION Image) varten käytetään kuvatallenninta. Käytimme MacIntosh-kuvaprosessointi- ja -analyysiohjelmaa, jonka nimi on NTH Image (versio 1.55), tallennettujen kuvien prosessoimiseen. Tämä ohjelmisto on kehitetty histologisten näytteiden morfometristä analyysiä varten ja sovelsimme sitä onttokuidun morfometristä analyysiä varten. Kukin huokonen lasketaan ja sen halkaisija määritetään. Makrohuokosten kokonaispinta-alojen ja huokoskoiden laskennat suoritettiin, kuten yllä on kuvattu.

Tämän keksinnön mukaiset T1/2-kuidut voidaan valmistaa millä tahansa alalla tunnetulla menetelmällä. Eräs menetelmä pitää sisällään polymeerisen valuliuoksen ja koagulantin yhtäaikaisen suulakepuristuksen samankeskisen kehruusulakkeen läpi niin, että säädetään sopivasti ontelo-ja valuliuoksen virtausnopeudet käyttäen niitä hyvin tunnettuja menetelmiä, jotka on kuvannut Cabasso, I., Encyclopedia of Chemical Technology, 12, 492 - 517 (1980). Koagulantti, joka voi sisältää biologisia kudosfragmentteja, organelleja tai solususpensioita ja/tai muita terapeuttisia aineita, kuten on kuvattu julkaisuissa Dionne, WO 92/19 195 ja US-patentit 5 158 882, 5 283 187 ja 5 284 761, jotka on liitetty tähän viitteiksi.

Niiden menetelmien mukaisesti T1-membraanit voidaan muodostaa polymeeriliuoksen ja koagulanttiliuoksen yhtäaikaisella suulakepuristuksella ilman läpi ennen niiden saapumista lopetushauteeseen. T2-membraanit voidaan muodostaa puristamalla polymeeri- ja koagulaatioliuokset yhtäaikaa kosteaan ilmaan tai sumuun ja sitten hauteeseen. T4-memb-

raanit voidaan muodostaa puristamalla polymeeri- ja koagulanttiliuokset yhtäaikaa suoraan koagulaatiohauteeseen niin, että selektiivisesti läpäisevän membraanin muodostuminen tapahtuu sekä ulko- että sisäseinissä yhtäaikaa.

T1/2-membraanit voidaan muodostaa käyttäen samanlaisia menetelmiä kuin käytetään T2-membraanien muodostuksessa. Suulakepuristusaukossa olevaa sumua tai kosteutta voidaan kuitenkin säädellä tunnetuilla menetelmillä halutun ulkopinnan morfologian saavuttamiseksi. Vaihtoehtoisesti suuttimen etäisyyttä hauteesta voidaan muutella rutiinimenetelmien mukaisesti. Lisäksi, jos membraanin valamiseksi käytetään yhtäaikaista suulakepuristusta, polymeerin ja koagulantin absoluuttinen ja/tai suhteellinen virtausnopeus voidaan säätää niin, että saadaan aikaan haluttu ulkoseinän pintamorfologia. Lopuksi, polymeeri- ja koagulanttiliuoksen koostumuksia ja lämpötiloja voidaan vaihdella niin, että saadaan aikaan haluttu ulkoseinän pintamorfologia. Esimerkiksi valuliuos voi olla 10 - 15 % PAN/PVC DMSO:ssa (paino/paino) ja koagulantti voi olla vesi tai muu vesipohjainen alusta. Vaihtoehtoisesti valuliuos voi olla esim. 16 % PAN/PVC ja koagulantti voi olla esim. 40 % NMP, 60 % H_2O -liuos 23 °C:ssa.

Mitä tahansa sopivaa menetelmää voidaan käyttää kapselin sulkemiseksi sisältäen polymeeriliimojen ja/tai poimutuksen, solmimisen ja lämpösulkemisen käytön. Nämä sulkemismenetelmät ovat alalla tunnettuja. Lisäksi mitä tahansa sopivaa "kuiva"sulkemismenetelmää voidaan myös käyttää. Sellaisissa menetelmissä muodostetaan oleellisesti ei-huokoinen lisäosa, jonka läpi soluja sisältävä liuos lisätään. Täytön jälkeen kapseli suljetaan. Sellainen menetelmä on kuvattu yhtäaikaa haettavana olevassa US-patenttihakemuksessa, jonka sarjanumero on 08/082 407, joka on liitetty tähän viitteeksi.

Tämän keksinnön mukaisia menetelmiä ja laitteita on tarkoitettu käytettäväksi nisäkäsisännällä, vastaanotta-

jalla, potilaalla tai yksilöllä, suositeltavasti kädellisellä, suositeltavimmin ihmisellä.

Useita erilaisia siirrostuskohtia on ajateltu käytettäväksi tämän keksinnön mukaisilla laitteilla ja menetelmillä. Nämä siirrostuskohdat sisältävät keskushermostosysteemin, sisältäen aivot, selkäytimen ja silmän vesipohjaiset nesteet ja lasiaisnesteen. Suositeltavat kohdat aivoissa sisältävät aivojuovion, aivokuoren, näkökukkulan alaiset tumakkeet ja Maynertin tyvitumakkeen. Muut suositeltavat kohdat ovat aivo-selkäydinneste, suositeltavimmin lukinkalvon alainen tila ja sivukammiot. Tämä keksintö sisältää myös siirrostuksen munuaisen kalvonalaiseen tilaan, ja vatsaontelon ja ihonalaisiin kohtiin tai mihin tahansa muuhun kohtaan, jotka ovat terapeuttisesti edullisia.

Tämän keksinnön eräässä suoritustavassa on esitetty menetelmät, joilla hoidetaan tauteja, jotka aiheutuvat neuronien degeneraatiosta. Esimerkit ihmisen taudeista, joiden ajatellaan liittyvän neuronien degeneraatioon, sisältävät Alzheimerin taudin, Huntingtonin taudin, AIDS:iin liittyvän dementian, liikeratakovettumistaudin (ALS) ja Parkinsonin taudin.

Jotkin neurodegeneratiivisten tautien eläinmallit perustuvat siihen lähtökohtaan, että spesifinen vaurio voi vaurioittaa tai tappaa neuroneita. Joissain tapauksissa se voi johtaa jopa neuronien kuolemiskaskadiin, joka vaikuttaa troofisesti toisistaan riippuvaisiin neuroneihin niillä reiteillä, jotka ovat vastuussa spesifisistä aivotoiminnoista.

Strategia neurodegeneratiivisten tautien hoitamiseksi sisältää kasvu- tai troofisten tekijöiden kohdennetun annon niin, että (1) inhiboidaan synapsin jälkeisten neuronien lisävauriot ja (2) parannetaan vaurion kohteena olevien solujen elinkykyä. Tekijät, joiden tiedetään parantavan neuronien elinkykyä, sisältävät NGF-, BDNF-, NT-

3-, NT-4/4-, CNTF-, GDNF-, CDF/LIF-, bFGF-, aFGF-, IGF-, neurotensiini- ja substance-P-proteiinit.

Eräässä neurodegeneratiivista toksisuutta kiihottavassa eläinmallissa injektoidaan glutamaattianalogia, kinoliinihappoa, stereotaksisesti aivoalueelle, jonka tiedetään aivojuoviossa ja/tai tyvihermosolmussa tuottavan neuropatologian ja oireet, jotka ovat analogisia potilailla, jotka kärsivät Huntingtonin taudista. Sekä mallille että oikealle Huntingtonin taudille on ominaista niiden neuronien vauriot, joita tarvitaan liikesäätelyyn. Lisäksi eräs Huntingtonin taudin varhainen oire on kehonpainon menetys [Sanberg et al., Med. J. Aust., 1, 407 - 409 (1981)]. Samanlaiset vaikutukset havaitaan myös mallisysteemissä [Sanberg et al., Exp. Neurol., 66, 444 - 466 (1979)]. Kinoliinihappoa löydetään myös epänormaalin korkeina tasoina ihmisistä, jotka kärsivät AIDS:iin liittyvästä dementiasta.

Huntingtonin tauti (HD) on autosomaalisesti dominantti tauti, jolle on ominaista progressiivinen dementia, johon liittyy oudot säätelemättömät liikkeet ja epänormaalit asennot. Huntingtonin tautia löydetään melkein kaikista etnisistä ja roturyhmistä niin, että sen esiintymistiheys on Yhdysvalloissa noin 50/1 000 000 [Emerich, D.F. ja Sanberg, Neuromethods, 21, 65 - 134 (1992)]. Tauti puhkeaa tyypillisesti keski-iässä, noin 35 - 45 vuoden iässä, jota seuraa hankala henkinen rappeutuminen ja liikkeiden progressiivinen epänormaalistuminen niin, että kuolema seuraa tavallisesti 15 vuoden sisällä. Huntingtonin taudin neuropatologian tutkimus on paljastanut monimutkaisen mosaiikin, joka sisältää toisilleen läheisiä ja toisistaan riippumattomia neurokemiallisia ja histopatologisia muutoksia.

Useita erilaisia systeemejä on tutkittu eläinmallin kehittämiseksi Huntingtonin taudille. Viime aikaiset tutkimukset ovat keskittyneet aivojuoviovaurion ja liikkeiden epänormaaliuksien väliseen suhteeseen, jotka johtuvat se-

lektiivisten sytotoksisten yhdisteiden käytöstä. Glutamaatti on yksi keskushermostosta löydettävistä pääasiallisista erittyvistä hermovälittäjäaineista. Se voi toimia kuitenkin vahvana neurotoksiinina ja on tehty useita yrityksiä sellaisten Huntingtonin taudin eläinmallien kehittämiseksi, jotka perustuvat glutamaatin ja muiden toksisuutta kiihottavien yhdisteiden suhteellisen spesifisiin sytotoksisiin vaikutuksiin. Nämä yhdisteet sisältävät glutamaatin rakenneanalogit, kuten kainihapon (KA), iboteenihapon (IA) ja endogeenisen tryptofaanimetaboliitin, kinoliinihapon (QA). Kun injektoidaan rottien aivoihin erittäin pieninä määrinä, nämä yhdisteet tuottavat merkittävän ja kohdentuneen toksisen vaikutuksen samalla, kun ne säästävät läpikulkevat aksonit ja tuojahermopäätteet. Toksisuutta kiihottavien aineiden käyttäytymis-, neurokemialliset ja anatomiset seuraukset muistuttavat niitä, jotka havaitaan Huntingtonin taudissa ja se on johtanut siihen spekulaatioon, että endogeenisten toksisuutta kiihottavien yhdisteiden epänormaalin korkea tuotto tai hajoaminen on yksi syy Huntingtonin taudin syntyyn.

Kinoliinihappo, 2,3-pyridiinidikarboksyylihappo, joka on tryptofaanin aineenvaihduntatuote, on saanut paljon huomiota johtuen sen vahvoista toksisuutta kiihottavista ominaisuuksista ja laajasta levinneisyydestä sekä rottien että ihmisen aivoissa [Schwarcz ja Kohler, Neurosci. Lett., 38, 85 - 90 (1983); ja Schwarcz et al., Science, 219, 316 - 318 (1983)]. Sen kataboliittientsyymin, kinoliinihapon fosforibosyylitransferaasin (QPRT), ja sen välittömän anabolisen tuotteen 3-hydroksiantraniilihapon (3HAO) korkeat konsentraatiot on tunnistettu häntätumakkeessa, joka antaa ehdottaa, että sillä on normaalisti rooli aivojuovion toiminnoissa [Foster et al., Brain Res., 336, 207 - 214 (1985)]. Aivojuovio on niiden rakenteiden joukossa, jotka ovat haavoittuvimpia QA-yhdisteen toksisuutta kiihottaville vaikutuksille [Schwacz ja Kohler

(1983), yllä] ja vastasyntyneet, mutta eivät aikuiset, eläimet tuntuvat olevan resistenttejä QA-yhdisteen toksisille vaikutuksille vastaten suurinpiirtein Hunbtingtonin taudin tyypillistä alkamisajankohtaa keski-iässä.

Kinoliinihapolla on julkaistu olevan selektiivisempi degeneratiivinen vaikutus aivojuoviossa kuin KA-yhdisteellä, joka muistuttaa läheisemmin Huntingtonin taudin patologiaa [Beal, Synapse, 3, 38 - 47 (1989); ja Roberts ja DiFiglia, Synapse, 3, 363 - 371 (1989)]. Kuten KA-injektiot, QA-injektiot aiheuttavat GABAergisten neuroneiden määrän vähenemisen samalla, kun ne suhteellisesti säästävät kolinergisiä neuroneita ja ulkopuolista alkuperää olevia aksoneita. Toisin kuin KA tai IA, QA-yhdisteen aivojuovion sisäiset injektiot tuntuvat säästävän somatostatiinia ja neuropeptidi Y -proteiinia sisältäviä neuroneita, joka antaa ehdottaa, että tämä malli tuottaa läheisimmin taudissa havaitun neuropatologian [Beal et al., J. Neuro. Sci., 8, 3901 - 3908 (1988)].

Esillä olevan keksinnön mukaisesti troofiset tekijät luovutetaan oikealle aivoalueelle siirrostamalla kapseli, joka sisältää soluja, sisältäen geneettisesti muunnellut solut, jotka erittävät sopivaa tekijää. Joissain tapauksissa geneettisesti muunnellut solut ovat isännälle autologisia ja eivät ehkä vaadi kapselointia.

Hermosolukasvutekijää erittävät solut, kuten BHK-solut, jotka on manipuloitu tuottamaan ihmisen NGF-proteiinia, edustavat kinoliinilla indusoidun neurodegeneraation hoitoa.

Toinen eläinmalli sisältää fimbria-fornix- (jyrsijät) tai fornix-alueen (kädelliset) vaurion. Erityisesti aivoturson väliseinäsysteemin neuronien viejähaarakkeet katkaistaan, joka johtaa NGF-riippuvaiseen degeneraatioon ja väliseinän kolinergisten neuronien solukuolemaan. Nämä vauriot aiheuttavat degeneratiivisia muutoksia aivoalueil-

la, joissa on samalla tavalla muutoksia ihmisen Alzheimerin taudissa.

Tämän keksinnön menetelmien mukaisesti NGF-proteiinia voidaan luovuttaa vaurioalueelle siirrostamalla kapseli, joka sisältää geneettisesti muunneltuja soluja, jotka erittävät NGF-proteiinia. Muut neurotrofiset tekijät, kuten CNTF, BDNF, bFGF, CDF/LIF, voivat myös suojata samanlaisia tai erilaisia väliseinän kolinergisten neuroneiden populaatioita surkastumiselta ja/tai kuolemalta. Solut ovat suositeltavasti fibroblasteja, joita on geneettisesti manipuloitu niin, että ne tuottavat ihmisen rekombinantti-NGF-proteiinia.

Fornix-alueen vauriot aiheuttavat myös käyttäytymispuutoksia mallieläimillä, jotka on helpoin havaita kokeissa, joissa tarvitaan oppimiskykyä ja muistin käyttöä. On julkaistu, että NGF-proteiinin krooninen anto rotille, joilla on fimbria-fornix-alueen vaurioita, nopeuttaa eläinten käyttäytymisen palautumista [Wills et al., Behav. Brain Res., 17, 17 - 24 (1985)]. Esillä olevassa keksinnössä sellaisen polymeerikapselin, joka sisältää NGF-proteiinia erittäviä soluja, siirrostus muodostaa käyttökelpoisen tavan jatkuvasti luovuttaa NGF-proteiinia vaurioituneen eläimen oikealle aivoalueelle. Esillä olevan keksinnön mukaiset kapselit tarjoavat käyttökelpoisen hoitotavan ja/tai profylaktisen hoidon Alzheimerin potilaille, joiden tila voi lieventyä NGF-proteiinin jatkuvalla annolla spesifisille aivoalueille.

Tämän keksinnön mukaisia menetelmiä ja koostumuksia voidaan käyttää sellaisten ikään liittyvien havaintopuutosten hoitoon, jotka johtuvat neuronien degeneraatiosta. Sellainen hoito voi parantaa havaintosuorituskykyä, joka näin lievittää oireita. Vaihtoehtoisesti hoito voi antaa neuronisuojausvaikutuksen, vaikkakaan ei oireellista etua. Ikään liittyvä havaintohäiriö ja dementia ihmisillä on liitetty neuronien, erityisesti etuaivon pohjan koliner-

gisten neuronien, degeneraatioon ja ChAT-yhdisteen tasojen alenemiseen aivokuoressa ja aivotursossa [Coyle et al., Science, 219, 1184 - 90 (1983); Whitehouse et al., Science, 215, 1237 - 39 (1982); Phelps et al., Neurobiol. Aging, 10, 205 - 07 (1989); Gage et al., Neurobiol. Aging, 9, 645 - 55 (1988)]. Prekliiniset tutkimukset, joilla on yritetty tuottaa dementian jyrsijämalli tuhoamalla selektiivisesti etuaivon pohjan kolinergiset neuronit, eivät ole onnistuneet tuottamaan suuria jatkuvia havaintotoiminnan puutoksia. Ikääntyneillä rotilla on samanlainen neuropatologia kuin se, joka on julkaistu ikääntyneillä ja dementoituneilla potilailla. Morriksen spatilaalinen vesilabyrinttioppimistesti on erittäin herkkä näiden patologisten prosessien tuhoisille vaikutuksille [Morris, J. Neurosci. Meth., 11, 47 - 60 (1984); Morris, Learning and Motivation, 12, 239 - 60 (1981)]. Tämä testi on vahvistettu ikään liittyvän havaintotoiminnan mittariksi - ikääntyneiden rottien suorituskyky tässä testissä ei ole vahvasti liittynyt niiden liikunnallisiin, sensorimotorisiin tai näkökyvyn puutoksiin, jotka ovat tekijöitä, jotka sekoittavat muita oppimis- ja muistitestejä [Gamzu, Ann. NY Acad, Sci., 444, 370 - 93 (1985)].

Havaintotesti, joka vaatii spatiaalikartan kehittämisen [Eichenbaum et al., J. Neurosci., 10, 3531 - 42 (1990)], Morriksen vesilabyrinttitesti, tuntuu olevan analoginen sellaisille ei-verbaalisille havaintotoimintotesteille, jotka ovat erityisen herkkiä vanhenemis- ja dementiahäiriöille kliinisissä puitteissa. Sen vuoksi tämä testi tuntuu olevan käyttökelpoinen mahdollisten uusien dementian hoitomuotojen arvioimiseksi. Esimerkiksi useissa tutkimuksissa on julkaistu, että ulkoa annettu NGF-proteiini parantaa ikääntyneiden ja oppimishäiriöisten rottien suorituskykyä Morriksen vesilabyrinttitestissä. Katso esim. Fischer et al., Nature, 329, 65 - 68 (1987); Fischer et al., J. Neurosci., 11, 1889 - 1906 (1991).

Koska NGF-proteiini ei helposti kulje veri-aivoesteen läpi, sen anto keskushermostoon vaatii sellaisten invasiivisten menetelmien käyttöä, jotka ohittavat veri-aivo-esteen. Esimerkiksi jyrsijän prekliinisissä tutkimuksissa, joissa osoitettiin ulkoa annetun NGF-proteiinin vahva tehokkuus, NGF-proteiini annettiin osmoottisilla minipumpuilla tai pitkään paikallaan olevan suonensisäisen kanyylin läpi. Ne menetelmät vaativat toistuvia infuusioita aivoihin joko injektoiden kanyylin avulla tai pumpuista, jotka täytyy vaihtaa joka kerta, kun säiliö on tyhjä. Joka kerta, jolloin pumpun säiliö täytyy vaihtaa tai joka kerta, kun injektioruisku laitetaan uudelleen kanyylin läpi, edustaa uutta mahdollisuutta, että infektioille erittäin herkkiin aivoihin kulkeutuu kontaminantteja.

Jopa käytettäessä erittäin huolellisesti steriilejä menetelmiä, on olemassa infektioriski. On julkaistu, että jopa teho-osastoilla aivojen sisäistä painetta mittaavat aivokammion sisäiset katetrit infektoituvat bakteereilla noin kolmessa vuorokaudessa [Saffran, Perspectives in Biology and Medicine, 35, 471 - 86 (1992)]. Infektioriskin lisäksi tuntuu olevan olemassa riski, joka liittyy infuusiomenetelmään. Infuusioiden aivokammioihin on julkaistu tuottavan vesipään [Saffran et al., Brain Research, 492, 245 - 254 (1989)] ja liuosten jatkuvaan infuusioon peruskudokseen liittyy nekroosi.

Sikiön kudosten käyttöön liittyy eettisiä huolia ja kapseloimattomat ei-sikiön solut voidaan hylkiä tai ne voivat aiheuttaa kasvaimia. Lisäksi kudos, joka on otettu sikiölähteistä, voi olla erittäin vaihtelevaa. Kapseloimalla NGF-proteiinia tuottavat solut, ulkoista NGF-proteiinia voidaan antaa suhteellisen matalalla infektioriskillä ilman, että käytetään sikiön kudosta ja ilman, että on olemassa riski kudoshyljinnälle tai kasvaimen kehittymiselle.

Lopuksi, on myös ilmaistu huoli siitä, voisiko ulkoinen NGF-proteiini aiemmin käytetyillä annoksilla osoittautua itse haitalliseksi tai myrkylliseksi niin, että se voisi jopa nopeuttaa niitä neurodegeneratiivisia prosesseja, jotka liittyvät Alzheimerin tautiin [Saffran, Perspectives in Biology and Medicine, 35, 471 - 86 (1992)]. On ehdotettu, että ulkoa annettu NGF-proteiini voisi nopeuttaa sekaisinmenoa, aloittaa perivaskulaaristen sympaattisten aksonien kasvamisen, joka mahdollisesti johtaisi muutoksiin aivojen veren virtauksessa, tai muuttaa uudelleen etuaivon pohjan neuronien ulokkeita vasteena ulkoisesti annetulle NGF-proteiinille niin, että vielä vaurioitumattomat etuaivon pohjan neuronit eivät enää toimi ja näin dementiaprosessi nopeutuisi [Saffran, Perspectives in Biology and Medicine, 35, 471 - 86 (1992)].

Esillä olevan keksinnön erään näkökohdan mukaisesti ulkoa annettavan NGF-proteiinin edulliset vaikutukset ikään liittyvien havaintopuutosten, jotka sisältävät Huntingtonin taudin, Parkinsonin taudin, Alzheimerin taudin ja ALS-taudin, hoitamiseksi voidaan saada aikaan annoksilla, jotka ovat paljon alempia kuin aiemmin julkaistut ollakseen tehokkaita ulkoisen hNGF-proteiinin luovuttamiseksi.

Aiemmin julkaistujen NGF-annosten annolla voi olla ei-toivottavia sivuvaikutuksia sisältäen vakavan kehon painon vähentymisen, kivun, raukeuden, hypofagian ja herpes-infektion toistumisen.

Tämän keksinnön mukaisesti <u>in vivo</u> muodostetun NGF-proteiinin luovutus kapselista aivokammioihin, aivon peruskudokseen tai muihin sopiviin keskushermostokohtiin annoksina, jotka vaihtelevat 1 - 1 500 ng/vuorokausi, on toivottavaa. NGF-proteiinin, tai muun sopivan tekijän, todellista annosta voidaan vaihdella siirrostamalla pienempi tai suurempi määrä kapseleita. Ajattelemme annosta, joka on 1 - 1 500, suositeltavammin 10 - 600, suositeltavimmin

50 - 500 ng NGF-proteiinia/ihminen/vuorokausi, aivokammioihin luovutusta varten, ja 1 - 1 500, suositeltavasti 10 - 150 ng NGF-proteiinia/ihminen/vuorokausi peruskudokseen luovutusta varten. Nämä annosrajat ovat merkittävästi alempia kuin ne, jotka on aimemmin julkaistu niiksi NGF-proteiinin annoksiksi, jotka tarvitaan CBF-neuronien säästämistä/kasvamista varten jyrsijätutkimuksissa ja kädellistutkimuksissa (17 - 350 µg/vuorokausi) erityisesti, jos annokset normalisoidaan ottaen lukuun aivojen tilavuuserot jyrsijöiden, kädellisten ja ihmisten välillä. Tuzynski et al., J. Neurosci., 10, 3604 - 14 (1990); Koliatsos et al., Ann. Neurol., 30, 831 - 840 (1991); Koliatsos et al., Experimental Neurol., 112, 161 - 73 (1991); Dekker et al., Neuroscience, 60, 299 - 309 (1994). Yhdessä tutkitussa kliinisessä potilaassa annettu NGF-annos oli 75 µg/vuorokausi [Olson et al., J. Neural Trans., 4, 79 - 95 (1992)]. Eräässä suoritustavassa geneettisesti muunnellut solut, jotka erittävät ihmisen NGF-proteiinia (hNGF), kapseloidaan puoliläpäiseviin membraaneihin ja ne siirrostetaan kammion sisäisesti tai peruskudoksen sisäisesti sopivaan nisäkäsisäntään, suositeltavasti kädelliseen, suositeltavimmin ihmiseen.

Jotta tämä keksintö tulisi paremmin ymmärretyksi, on kuvattu seuraavat esimerkit. Nämä esimerkit on annettu ainoastaan kuvaavia tarkoituksia varten eikä niitä pidä pitää millään tavoin tämän keksinnön piiriä rajoittavina.

Esimerkki 1

Kapseloidut NGF-proteiinia erittävät BHK-solut, jotka on siirrostettu aikuisten rottien keskushermostoon

Ihmisen ß-NGF-proteiinin ekspressio ja BHK-solulinjan muodostaminen

Ihmisen geeni ß-NGF-proteiinille, joka kooditti NGF-proteiinin pre-pro-muodon täydellistä aminohapposekvenssiä, jatkokloonattiin hiiren metallotioneiinipromootorin alaisuuteen ekspressiorakenteeseen, joka sisältää

dihydrofolaattireduktaasin mutanttimuodon (katso esim. Kaufman, US-patentti 4 470 461), jota ohjaa SV40-promoottori (kuvio 1).

Kaksi ihmisen genomista kloonia, jotka koodittivat ß-NGF-geenin 5'- ja 3'-päitä, hankittiin ATCC-kokoelmasta (phbeta N8D8, phbeta N8B9). Rakenteen phbeta N8D8 5'-pään 440 emäsparin pituinen ScaI-EcoRI-fragmentti ligoitiin 2,0 kiloemäsparin pituiseen phbeta N8B9 -rakenteesta eristettyyn 3'-pään EcoRI-fragmenttiin. Silmukoitu genominen NGF-sekvenssi sisälsi noin 37 emäsparia ensimmäisen intronin 3'-päästä, kaksois-ATG-sekvenssin, jonka uskotaan olevan proteiinin translaation aloituskohta pre-pro-NGF-proteiinille, ja täydellisen koodittavan sekvenssin ja koko transloimattoman 3'-alueen ihmisen geenistä [Hoyle et al., Neuron, 10, 1019 - 1034 (1993)]. Yhdistetty 2,51 kiloemäsparin pituinen ß-NGF-rakenne jatkokloonattiin DHFR-perusteiseen pNUT-ekspressiovektoriin [Baetge et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 5454 - 5458 (1986)] juuri alavirtaan hiiren metallotioneiini-I-promoottorista (-650 - +7) ja rotan insuliini II -geenin ensimmäisestä intronista [Palmiter, R.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 478 - 482 (1991)]. Rakenne pNUT-ß-NGF (katso kuvio 1) vietiin sisään BHK-soluihin käyttäen standardia kalsiumfosfaattivälitteistä transfektiomenetelmää. Transfektoidut BHK-solut selektoitiin alustassa, joka sisälsi 200 µM metatreksaattia (Sigma), 3 - 4 viikkoa ja resistentit solut ylläpidettiin polyklonaalisena populaationa joko 200 µM metotreksaatin läsnä- tai poissaollessa.

NGF-proteiinin bioaktiivisuuden määritys

Hermokasvutekijä (NGF) aiheuttaa merkittävän neuriittiulokkeiden kasvun PC12-soluissa ja sellaisena muodostaa nopean ja herkän testin NGF-proteiinin bioaktiivisuudelle. NGF-DNA:lla transfektoitujen BHK-solujen tuottaman NGF-proteiinin bioaktiivisuuden testaamiseksi käytetty alusta (CM) emo-BHK-soluista (BHK-verrokki) ja BHK-NGF-so-

luista lisättiin PC12A-soluille [Schweitzer ja Kelly, J. Cell Biol., 101, 667 - 676 (1985)], joita oli kasvatettu standardeilla 6-kuoppaisilla kudosviljelymaljoilla. Verrokkina lisättiin 25 S -hiiren NGF-proteiinia joihinkin kuoppiin neuriittien indusoimiseksi (50 ng/ml). PC12A-solut pisteytettiin sellaisten neuriittien suhteen, jotka olivat ≥ 3 kertaa solun halkaisijan pituisia 1 - 4 vuorokauden sisällä. NGF-biotestit tehtiin myös otettaessa talteen siirrostetut verrokkia ja NGF-proteiinia erittävät BHK-soluilla ladatut kapselit lisäämällä kapselien käytetty alusta luonnollisille PC12A-soluille, jotka oli otettu kapseleista, joita oli inkuboitu tuoreessa alustassa 24 tuntia. Kaikissa kokeissa BHK-NGF-solujen käytetty alusta tuotti vahvan neuriittien kasvun PC12A-soluilla 24 tunnin sisällä, joka osoittaa, että BHK-solujen tuottama NGF-proteiini oli bioaktiivista. BHK-verrokeilla ei ollut sellaista kykyä saada aikaan neuriittien kasvua PC12A-soluilla rinnakkaiskokeissa.

Sen määrittämiseksi, johtuiko neuriittien kasvu muista tekijöistä kuin NGF-proteiinista, kuten bFGF-proteiinista, lisäsimme NGF-proteiinia blokeeraavaa vasta-ainetta (hiiren anti-ß-NGF; Boehringer-Mannheim, luettelonumero 1008-220) yhdessä käytetyn alustan ja hNGF-rekombinanttiproteiinin kanssa. Tämän blokeeraavan vasta-aineen lisäys inhiboi täysin neuriittien kasvun PC12A-soluista annoksesta riippuvaisella tavalla. Lopuksi suoritimme sarjan kokeita, joilla testattiin BHK-verrokkisolujen käytetty alusta ELISA-menetelmällä emäksisen fibroblastikasvutekijän (bFGF) läsnäolon suhteen. Käyttäen bFGF-ELISA-menetelmää (Research and Diagnostics Systems, Quantikine™, human FGF basic ELISA -käyttöpakkaus; Burgess et al., Ann. Rev. Biochem., 58, 575 (1989)], emme kyenneet tunnistamaan mitään bFGF-proteiinia paljon käytetyssä alustassa BHK-soluista. Molemmat nämä kokeet osoittavat selvästi, että PC12A-soluilla nähtävä neuriittien kasvu vasteena BHK-NGF-

solujen käytetylle alustalle johtuu eritetyn NGF-proteiinin läsnäolosta.

NGF-ELISA

NGF-proteiinin ekspression kvantitaatio kapseloiduista ja kapseloimattomista BHK-NGF-soluista suoritettiin seuraavasti. Kaikki reagenssit hankittiin Boehringer Mannheim Biochemicals -valmistajalta, ellei toisin ole ilmoitettu. Nunc-Immuno MaxiSorp ELISA -levyt päällystettiin lisäämällä kuoppaan 150 µl anti-hiiri-ß(2,5 S)-hermokasvutekijäproteiinia konsentraationa 1 ng/ml päällystyspuskurissa (1 x PBS ilman $CaCl_2$:ia ja ilman $MgCl_2$/0,1 % natriumatsidi-liuosta, pH 9,6). Päällystettyjä levyjä inkuboitiin 37 °C:ssa ainakin kaksi tuntia tai vaihtoehtoisesti 4 °C:ssa yli yön. Päällystysliuos poistettiin kuopista ja kuopat pestiin kolme kertaa 300 µl:lla pesupuskuria (50 mM Tris-HCl/200 mM NaCl/10 mM $CaCl_2$/1 % Triton X-100/0,1 % natriumatsidi, pH 7,0). Sitten kuopat blokeerattiin 300 µl:lla päällystysliuosta, jossa oli 10 mg naudan seerumialbumiinia (BSA)/ml, huoneenlämpötilassa ainakin 30 minuuttia. Sitten kuopat pestiin kolme kertaa 300 µl:lla pesupuskuria. Käytettyjen alustojen näytteet laimennettiin 1:1 2 x näytepuskuriin (näytepuskuri on sama kuin pesupuskuri, mutta sisältää 2 % BSA:ta). 100 µl valmistettuja näytteitä lisättiin kuoppiin. Levyt peitettiin ja sitten niitä inkuboitiin ainakin kaksi tuntia 37 °C:ssa tai yli yön 4 °C:ssa. Liuokset poistettiin kuopista imemällä ja ne pestiin kolme kertaa 300 µl:lla pesupuskuria. Kuhunkin kuoppaan lisättiin 100 µl anti-hiiri-ß(2,5S)-hermokasvutekijä-ß-gal-konjugaattia määränä 4 yksikköä/ml. Levyjä inkuboitiin 37 °C:ssa ainakin yksi tunti. Liuokset poistettiin kuopista imemällä ja ne pestiin kolme kertaa 300 µl:lla pesupuskuria. Lopuksi kuoppiin lisättiin 200 µl kloorifenolipuna-ß-D-galaktopyranosidisubstraattiliuosta (40 mg CPRG-yhdistettä 100 mM Hepes/150 mM NaCl/2 mM $MgCl_2$/0,1 % natriumatsidi/1 % BSA -liuoksessa, pH 7,0) ja

niitä inkuboitiin 37 °C:ssa. Noin 30 minuutin - yhden tunnin kuluttua tai sen jälkeen, kun värin kehittyminen oli riittävää fotometristä määritystä varten 570 nm:ssa, näytteet analysoitiin levylukijalla ja mitattiin NGF-rekombinanttiproteiinistandardeja vastaan.

c-fos-induktiotesti

PC12A-soluille lisätyn NGF-proteiinin aikaansaama kvalitatiivinen c-fos-induktio mitattiin immunofluoresenssitestillä. PC12A-solut maljattiin tiheytenä 100 000 solua/ml poly-ornitiini-käsitellyille lasisille peitinlaseille (12 mm) ja niiden annettiin tasapainottua ainakin 24 tuntia 24-kuoppaisella levyllä. Soluja kasvatettiin samassa alustassa kuin on kuvattu aiemmin neuriittien kasvun biotestissä.

c-fos-induktion testaamiseksi PC12A-soluilla, käytetty alusta kapseleista, jotka sisälsivät BHK- ja BHK-NGF-soluja tai ihmisen NGF-rekombinanttiproteiinia (50 ng/ml), lisättiin PC12A-soluille kahdeksi tunniksi ja annettiin inkuboitua 37 °C:ssa ja 5 % CO_2:ssa. Tämän inkubaation jälkeen peitinlasit fiksattiin 4 % paraformaldehydillä (0,1 M PBS:ssä, pH 7,4), pestiin 2 kertaa 10 mM glysiinillä PBS:ssä, tehtiin läpäiseviksi 1 % Triton X100 -detergentillä (PBS:ssä 10 minuuttia) ja 1 % Nonidet P40 -detergentissä (PBS:ssä 10 minuuttia). Peitinlaseilla olevat solut pestiin 3 x 5 minuuttia PBS:llä, blokeerattiin 5 % normaalilla vuohen seerumilla (NGS) PBS:ssä yhden tunnin ajan ja inkuboitiin kolme tuntia kanin polyklonaalisessa antiseerumissa (Oncogene Science), joka oli muodostettu c-fos-proteiinia vastaan, joka oli laimennettu 1:10 PBS:ssä olevaan 1 % NGS-liuokseen. Sitten peitinlasit pestiin 2 x 5 minuuttia PBS:llä ja niitä inkuboitiin fluoreskeiini-konjugoidulla vuohen anti-kani IgG -vasta-aineella. Lopuksi peitinlasit pestiin kaksi kertaa PBS:llä ja ne kiinnitettiin Citifluor^R -antifadentilla ja tarkastettiin fluoresenssimikroskoopilla. Fluoresenssia tarkkailtiin

mikroskoopilla ja c-fos-induktio mitattiin fluoresenssilla leimautuneiden tumien läsnäolon suhteen.

Kapselointimenetelmä

Asymmetriset yksikalvoiset onttokuidut valettiin dimetyylisulfoksidissa olevista 12,5 % (paino/paino) poly-(akrylonitriilivinyylikloridin) (se on PAN-PVC) kopolymeeriliuoksista. Tuottomenetelmä tunnetaan faasi-inversiona käyttäen kuiva-märkä-kehruumenetelmää (jet), jonka on kuvannut Cabasso, Encyclopedia of Chemical Technology, 12, 492 - 517 (1980). Kehruumenetelmän jälkeen onttokuidut siirrettiin steriilisti tislattuun vesihauteeseen, joka sisälsi 25 % glyserolia, joka muodostaa menetelmän, jolla huokoset pidetään vahingoittumattomina kuivumisen aikana (Cabasso, 1980, yllä). Tuotetut kuidut (XP 11) olivat T1/2-membraanityyppiä, joiden sisähalkaisija oli 450 ± 25 µm, hydraulinen läpäisevyys 53 ml/(m^2 min mmHg), BSA-hyljintäkerroin 88,7 ± 2,1 %, ovalbumiinihyljintäkerroin 82,0 ± 1,7 % ja glukoosimassasiirtokerroin noin 8 x 10^{-4} cm/s. Kuivauksen jälkeen tuotettiin laitteet kiinnittämällä 6 - 7 mm pituinen kuiva onttokuitu, jossa oli distaalinen sulku, valolla kovetettuun akrylaattikeskiöön, jossa oli kiinteä väliseinä proksimaalisessa päässä, joissa oli latausaukko laitteen onteloon injektoitavia soluja varten. Laitteista poistettiin glyseroli 70 % suodatinsteriloidulla etanolilla ja ne laitettiin HBSS-liuokseen ennen kapselointivaihetta.

Solut ladattiin esimuodostettuihin kapselointilaitteisiin seuraavasti. Joko BHK-verrokkisolut tai BHK-NGF-solut ladattiin esimuodostettuihin laitteisiin tiheytenä, joka oli noin 10^7 solua/ml. BHK-solususpensiot, joiden tiheydet olivat 2 x 10^7 solua/ml, sekoitettiin 1:1 fysiologisen Vitrogen^R-yhdisteen (Celtrix, Palo Alto, CA) kanssa ja infusoitiin esimuodostettuihin laitteisiin väliseinän aukon kautta. Kun oli infusoitu 2 - 2,5 µl solususpensiota, väliseinä napsautettiin poikki ja aukko suljettiin käyt-

täen valolla kovetettua akrylaattia (Zeneca). BHK-soluilla ladattuja laitteita pidettiin seerumivapaassa tarkoin määrätyssä alustassa PC1 (Hycor) 4 - 5 vuorokautta ennen siirrostusta. Kun oli pidetty 3 tai 4 vuorokautta in vitro, soluilla ladatut kapselit pestiin kahdesti HBSS-liuoksessa ja ne laitettiin 1 ml:aan tuoretta alustaa analysoitavaksi NGF-proteiinin suhteen ELISA-menetelmällä.

ß-NGF-proteiinin pitkäaikainen ekspressio aikuisten rottien keskushermostossa

In vitro kokeemme osoittivat ihmisen ß-NGF-proteiinin pitkäaikaisen stabiilin korkean tason ekspression BHK-soluissa. Sen määrittämiseksi, voitaisiinko tämä pitkäaikainen stabiili ekspressio saavuttaa in vivo, siirrostimme kapselit, jotka sisälsivät BHK-soluja, aikuisten Lewis-rottien keskushermostoon.

Ennen siirrostusta BHK-NGF- ja BHK-verrokkikapseleista otettu käytetty alusta (CM) altistettiin neuriittien NGF-kasvutestille, kuten yllä on kuvattu. 0,5 ml BHK-NGF-solujen käytettyä alustaa vastasi 50 ng:aa ulkoa annettua NGF-proteiinia mitattuna neuriittien kasvun laajuutena, kun taas BHK-verrokkisolujen käytetty alusta ei sisältänyt tunnistettavia NGF-tasoja.

Kapselit siirrostettiin aikuisten Lewis-rottien aivojuovioon yhden, kolmen ja kuuden kuukauden ajanjaksoiksi. Selvityksen aikana kapselit testattiin NGF-proteiinin tuoton suhteen neuriittien kasvutestillä.

Kun olivat olleet yksi, kolme ja kuusi kuukautta in vivo, BHK-NGF-soluilla ladatut kapselit kykenivät tuottamaan sellaisen neuriittien kasvun PC12A-soluilla, joka oli ekvivalentti tai suurempi kuin se, jonka 50 ng NGF-proteiinia/ml antoi. Mitään NGF-aktiivisuutta ei ollut havaittavissa BHK-verrokkikapseleiden käytetyssä alustassa. Kuten taulukossa I on esitetty, kapseloitujen BHK-NGF-solujen näytteet ELISA-menetelmällä määritettynä vapauttivat

noin 20 ng/24 tuntia/kapseli kolmen ja kuuden kuukauden in vivo ajanjakson jälkeen.

Taulukko I

NGF mitattuna ELISA-menetelmällä arvona ng/kapseli/24 tuntia

Tila		Ennen	Jälkeen
3 kk	nv1 (BHK-NGF)	NA	17,1
3 kk	nv2 (BHK-NGF)	NA	13,1
3 kk	nv3 (BHK-verrokki)	NA	0,1
6 kk	nv1 (BHK-NGF)	NA	21,6
6 kk	nv2 (BHK-NGF)	NA	2,8
6 kk	nv3 (BHK-verrokki)	NA	0,1

NA = ei käytössä; NGF-ELISA-testiin ei ole ennen siirrostusta olevia alustanäytteitä

nv1, nv2 ja nv3 edustavat luonnollisia eläimiä.

Esimerkki 2

Fimbria-fornix-alueen vaurion tutkimus rotilla

Sen arvioimiseksi, kykenivätkö kapseloidut NGF-proteiinia erittävät BHK-solut (kuten on kuvattu esimerkissä 1) vapauttamaan tehokkaita määriä NGF-proteiinia in vivo, fimbria-fornix-alueen aspiraatiovauriot muodostettiin stereotaksisesti 14 Lewis-rottaan. Juuri vaurion muodostuksen jälkeen BHK-verrokki- tai BHK-NGF-solut, jotka oli ladattu XP-11-laitteeseen, kuten on kuvattu esimerkissä 1, siirrostettiin stereotaksisesti vauriokohtaan.

Kohteet

Aikuisia urospuolisia Lewis-rottia (Harlan Breeders, Indianapolis, IN), jotka olivat noin kolmen kuukauden ikäisiä ja painoivat noin 300 grammaa, käytettiin seuraavissa tutkimuksissa. Eläimiä pidettiin kolmen eläimen ryhmissä lämpötilan ja kosteuden suhteen säädellyssä kasvatushuoneessa, jossa pidettiin 12 tunnin valo/pimeä-sykliä niin, että valot tulivat päälle kello 7 aamulla.

Stereotaksinen leikkaus

Juuri ennen leikkausta rotat nukutettiin lihaksen sisäisellä injektiolla seosta, jossa oli ketamiinia, ksylatsiinia ja asepromatsiinia, ja ne laitettiin Kopfin stereotaksiseen laitteeseen (katso Emerich et al., 1992). Nuoliviilto tehtiin päänahkaan ja kallon avaus suoritettiin pidentäen 2,0 mm taaksepäin ja 3,0 mm sivuun päälakipisteestä. Aspiratiivilaite, jossa oli 20-väljyinen kärki, kiinnitettiin stereotaksiseen rakenteeseen (Kopf Instruments) ja sisäpuolinen päälakikuori, pihti- ja länkipoimujen kuori, aivokurkiainen, selänpuoleinen aivoturso, selänpuoleinen näkökukkula ja fimbria-fornix-alue aspiroitiin sijoittamalla imukärki 1,40 mm taaksepäin päälakipisteestä ja laskemalla se välittömästi nuolipohjukan sivuun 5,0 mm syvyyteen. Sitten kärkeä siirrettiin sivuttain 0,5 mm välein, kunnes saavutettiin kohta, joka oli 3,0 mm sivuun päälakipisteestä. Heti aspiraation jälkeen rotat siirrostettiin toispuoleisesti joko transfektoituja (N = 8) tai ei-transfektoituja (N = 6) BHK-soluja sisältävillä kapseleilla sijoittamalla kapseli 18-väljyiseen Teflon-katetriin, joka oli kiinnitetty stereotaksiseen rakenteeseen. Kukin laite oli pituudeltaan 0,7 cm ja halkaisijaltaan 600 µm ja sisälsi noin 15 - 25 x 10^3 solua.

Kanyyliin laitettiin ruostumatonta terästä oleva obduraattori ja sitä pidettiin paikoillaan samalla, kun ulompaa kanyyliä nostettiin niin, että kapseli sijoittui passiivisesti aiemmin valmistettuun onteloon. Siirrostuksen stereotaksiset koordinaatit olivat: 0,5 mm päälakipisteestä taaksepäin, 1,0 mm sivuun nuoliompeleesta ja 7,5 mm aivokuoren pinnan alla.

Histologia

Eläimet nukutettiin kolme viikkoa leikkauksen jälkeen ja valmistettiin histologista analyysiä varten. Eläimet perfusoitiin mahansuun kautta käyttäen peristalttista pumppua seuraavilla liuoksilla: 20 ml suolaliuosta (0,9 %,

huoneenlämpötila), 120 ml glutaraldehydiä (0,1 %), 500 ml 0,1 % glutaraldehydiä/4 % paraformaldehydiä, 300 ml paraformaldehydiä (4 %) ja lopuksi 300 ml 10 % sakkaroosia. Kaikki liuokset olivat jääkylmiä (4 °C) ja ne valmistettiin fosfaatilla puskuroituun suolaliuokseen (pH = 7,4), jollei toisin ole ilmoitettu.

Aivot poistettiin fiksauksen jälkeen, sijoitettiin 25 % puskuroituun sakkaroosiin (pH = 7,4) ja jäähdytettiin 24 - 48 tuntia. Kudos leikattiin 20 µm välein kryostaatissa ja kiinnitettiin polylysiinillä päällystetyille objektilaseille. Joka kolmas leike läpi koko väliseinän säästettiin ja se prosessoitiin koliiniasetyylitransferaasin (ChAT) immunoreaktiivisuuden suhteen seuraavan protokollan mukaisesti: (1) yli yön inkubaatio PBS:ssä, joka sisälsi 0,8 % Triton X-100 -detergenttiä + 10 % normaaliseerumia, (2) 48 tunnin inkubaatio primaarisen vasta-aineen kanssa (vuohen antiseerumi ChAT-proteiinia vastaan; Chemicon), jonka laimennos oli 1:1 000, (3) 6 x 5 minuutin huuhtelua PBS + 0,2 % Triton X-100 -liuoksessa, jota seurasi 1,5 tunnin inkubaatio biotinyloidussa sekundaarivasta-aineessa (IgG), (4) 6 x 5 minuutin huuhtelua PBS + 0,2 % Triton X-100 -liuoksessa, (5) inkubaatio Avidin-Biotin Complex -yhdisteen kanssa (ABC, Vector elite) 1,5 tuntia, (6) 3 x 5 minuutin huuhtelua PBS:ssä, (7) 5 minuutin huuhtelu tislatussa vedessä, (8) inkubaatio 3,3-diaminobentsidiini (DAB) (0,05 %) - 2 % nikkeliammoniumsulfaattiliuoksessa, joka oli liuotettu 0,1 % Tris-puskuriin, 5 minuutin ajan, jota seurasi vetyperoksidi-inkubaatio (0,01 %) 5 minuutin ajan, (9) reaktio lopetettiin huuhtelemalla 3 x 1 minuutti PBS:ssä.

Leikkeet kiinnitettiin, niistä poistettiin vesi ja ne peitettiin peitinlasilla. Vierekkäiset leikkeet värjättiin hematoksyliinillä ja eosiinilla (H + E). Muodostetun vaurion laajuuden varmistamiseksi fimbria-fornix-alueen aspiraation jälkeen, joka kymmenes leike otettiin läpi ko-

ko aivotursosta ja värjättiin asetyylikoliiniesteraasin suhteen sen menetelmän mukaisesti, jonka ovat kuvanneet Van Ootegan et al., Brain Res. Bull., 12, 543 - 553 (1984). Kolinergisten solujen hävikin kvantifioimiseksi ChAT-positiiviset neuronit laskettiin sisäpuolisessa väliseinässä ja diagonaalikimpun pystysuorassa reunassa 10-kertaisella suurennoksella. Tähän analyysiin käytettiin kustakin eläimestä edustavia leikkeitä (kolme per aivo), jotka sijaitsivat kohdilla noin 0,7, 0,5 ja 0,2 mm taaksepäin päälakipisteestä.

NGF-vapautustulokset

3 ½ viikkoa siirrostuksen jälkeen eläimet nukutettiin ja laitteet otettiin talteen vetämällä varovasti silikoni kiinnikkeistä. Kutakin kapselia inkuboitiin 24 tuntia 1 ml:ssa alustaa ja käytetty alusta testattiin NGF-proteiinin suhteen ELISA-menetelmällä. NGF-proteiinitasot ennen ja jälkeen siirrostuksen on lueteltu taulukossa II.

Taulukko II

NGF mitattuna ELISA-menetelmällä arvona ng/kapseli/24 tuntia

Tila	Ennen	Keskiarvon keskihajonta	Jälkeen	Keskiarvon keskihajonta
F/F UNILAT (n=4)	27,2	2,5	5,2	0,9
Verrokit (n=6)	0,1	0,05	0,15	0,1

Histologisia leikkeitä, jotka otettiin kaikkien eläinten aivotursosta ja väliseinästä, tutkittiin asetyylikoliiniesteraasin (AchE) immunosytokemian suhteen aivotursossa ja koliiniasetyylitransferaasin (ChAT) suhteen väliseinässä. Aivoturson AchE-immunoreaktiivisuutta käy-

tettiin vaurion täydellisyyden toisena indikaattorina ja väliseinän ChAT-immunoreaktiivisuus antoi todisteen kolinergisten solujen säästymisestä tai surkastumisesta, joka oli tulosta siirrostuksesta ja vaurioista. Aivoturson vaurioituneen ja verrokkikohdan AchE-immunovärjäytyvyyden edustava vertailu osoitti lähes täydellisen AchE-tuojahaarakkeiden kadon vauriokohtaan.

Se ChAT-positiivisten neuroneiden kokonaismäärä, joka jäi jäljelle väliseinään 3 ½ viikkoa vaurion muodostamisen jälkeen BHK-verrokki- ja BHK-NGF-soluilla siirrostetuissa eläimissä, laskettiin ja yhdistetyt tulokset on esitetty kuviossa 2. ChAT-positiivisten neuroneiden kvantitaatio paljasti, että BHK-verrokkikapseleilla ainoastaan 15 ± 3 % neuroneista jäi positiivisiksi aivon vauriokohdassa verrattuna vaurioitumattomaan kohtaan, kun taas BHK-NGF-kapseleilla 90 ± 5 % kolinergisistä neuroneista oli immunopositiivisia ChAT-proteiinin suhteen. Kapseloitujen solujen eloonjäänti oli samanlainen BHK-verrokki- ja BHK-hNGF-soluilla ladatuissa kapseleissa (tuloksia ei esitetty).

Esimerkki 3

Kädellisen fornix-alueen vaurio

Esimerkki 2 osoitti, että hNGF-proteiinin pitkäaikainen luovutus tämän keksinnön mukaisista BHK-soluista aivokammioon aikuisilla rotilla, joilla oli fimbria-fornix-alueen vauriot, suojaa sisäpuolisen väliseinän kolinergisiä neuroneita, jotka muutoin olisivat kuolleet vaurion johdosta. Samanlaiset kokeet on kuvattu tässä suoritettuna muilla kädellisillä kuin ihmisellä. Fornix-alueen vaurioittaminen apinoilla (Cebus apella) on kuvattu julkaisussa Kordower ja Fiandaca, J. Comp. Neurol., 298, 443 (1990).

Näissä vauriokokeissa käytettiin aikuisia apinoita. Kun toispuoleinen vaurio oli täydellinen, 5 XP-11-kapselilaitetta, jotka on kuvattu esimerkissä 1, (tunnistettiin

numeron perusteella) sijoitettiin käsin aivokammioon väliseinän viereen samalle puolelle kuin vaurio. Verrokeiksi jotkin eläimet siirrostettiin laitteilla, jotka oli ladattu BHK-verrokkisoluilla. Siirrostusmenetelmän jälkeen leikkauskohdat suljettiin ja eläinten sallittiin tointua ja niitä tarkkailtiin tiiviisti 3 ½ viikkoa. 3 ½ viikon eloonjääntiajan jälkeen numeroidut kapselit poistettiin varovasti ja ne sijoitettiin standardiin soluviljelyalustaan ja sitten testattiin uudelleen ELISA-menetelmällä NGF-proteiinin vapautuksen suhteen samoin kuin ne oli testattu ennen siirrostusta (taulukko III). Sitten eläimet lopetettiin perfusoimalla aldehydifiksatiiveilla ja aivot leikattiin leikkeiksi ja prosessoitiin histokemiallisia ja immunohistokemiallisia menetelmiä varten.

Taulukko III

NGF-proteiinin määrien luovutetut ±-tasot fornix-alueen aspiraatiolla vaurioitettuihin kädellisiin mitattuna ELISA-menetelmällä arvona ng/kapseli/24 tuntia

Eläin nro		Ennen	Keski-arvon keski-hajon-ta	Jälkeen	Keski-arvon keski-hajon-ta
B 105 (n=5)	(BHK-NGF)	24,9	9,4	14,1	4,6
B 106 (n=5)	(BHK-NGF)	29,6	8,6	9,2	0,8
B 108 (n=5)	(BHK-verrokki)	0,6	1,2	0,2	0,2

Taulukossa III esitetyt tulokset edustavat kahden BHK-NGF-soluilla siirrostetun apinan ja yhden verrokkiapinan analyysiä. Myöhempi NGF-proteiinin vapautustulosten analyysi kuudella lisäeläimellä samassa tutkimuksessa paljasti, että kapselien tuottaman hNGF-proteiinin keskimääräinen taso ennen siirrostusta oli 21,4 ± 2,0 ng/kapseli/

24 tuntia ja 8,5 ± 1,2 ng/kapseli/24 tuntia talteen otetuissa kapseleissa mitattuna NGF-ELISA-menetelmällä. Koska kukin apina siirrostettiin viidellä kapselilla, kunkin eläimen tuottama NGF-proteiinin kokonaismäärä oli 107 ng/24 tuntia ja 41,5 ng/24 tuntia ennen siirrostusta ja yksi kuukausi siirrostuksen jälkeen, vastaavasti. BHK-verrokkikapselit eivät tuottaneet mitään tunnistettavaa määrää hNGF-proteiinia (testi oli herkkä 25 ng NGF-proteiinia/ml).

Eläimet toipuivat nopeasti leikkauksesta ja ne elivät koko kokeen ajan. Eläimet, jotka saivat BHK-NGF-soluja sisältäviä kapseleita, olivat horteisia ja niillä oli alentunut ruokahalu useita vuorokausia leikkauksen jälkeen. Yhdellä näistä eläimistä oli myös useita taudinkohtauksia, jotka alkoivat noin kaksi vuorokautta leikkauksen jälkeen ja hävisivät viiden vuorokauden sisällä leikkauksesta. Mitään sellaisia komplikaatioita ei havaittu missään sellaisissa eläimissä, jotka saivat BHK-verrokkisolusiirroksia, ja mitään eroja ei havaittu BHK-hNGF- ja BHK-verrokkieläinten kesken ensimmäisen viikon jälkeen leikkauksesta.

Polymeerikapselit jätettiin in situ yhteen eläimeen, joka sai BHK-verrokkisiirrokset. Kaikista muista apinoista BHK-soluilla ladatut laitteet otettiin talteen aivokammioista 23 - 28 vuorokautta siirrostuksen jälkeen niin, että kapseleihin jäi kiinni ainoastaan vähän tai ei ollenkaan isännän kudosta.

Perustuen silmin tehtyyn havaintoon kapselien talteenotto hetkellä, kaikki kapselit sijaitsivat aivokammiossa ja nojautuivat häntätumakkeen päähän ja sivunpuoleiseen väliseinään. Kaikki kapselit poistettiin ehjinä eikä ollut mitään todistetta siitä, että mikään kapseli oli rikkoutunut in situ tai talteenottomenetelmän aikana. Soluilla ladatut laitteet jätettiin in situ yhteen BHK-verrokkieläimeen laitteiden sijainnin osoittamiseksi ja isännän kudoksen vasteen arvioimiseksi. Isännän vaste kap-

seleita vastaan tässä eläimessä ja kaikissa muissa eläimissä oli minimaalinen. Reaktiivisten gliojen suhteellinen harvalukuisuus, jos sitä nähtiin ollenkaan, nähtiin ainoastaan siirroksen ja isännän välisten pintojen ympärillä. Lisäksi muita ei-neuronisoluja, kuten makrofaageja, ei havaittu siirroksen ympärillä olevalla alueella.

Kaikilla apinoilla oli täydellinen fornix-alueen läpileikkausvaurio, jonka paljasti asetyylikoliiniesteraasia sisältävien kuitujen laaja häviäminen aivoturson samalta puolelta kuin vaurio. Verrokkiapinat, joihin ei joko siirrostettu mitään tai joihin siirrostettiin BHK-verrokkisolusiirrokset (NGF-proteiinia erittämättömät), eivät eronneet toisistaan ja niissä oli koliiniasetyylitransferaasin ja p75 NGF-reseptorin (NGFr) suhteen immunoreaktiivisten neuronien voimakas kato sisäpuolisessa väliseinässä (MS; 53 ja 54 %, vastaavasti) ja diagonaalikimpun pystysuorassa reunassa (VLDB; 21 ja 30 %, vastaavasti) samalla puolella kuin vaurio. Tälle päinvastaisesti apinoilla, jotka saivat BHK-hNGF-solujen siirrokset, oli ainoastaan keskinkertainen kolinergisten neuroneiden kato väliseinässä (19 ja 20 %, vastaavasti) ja VLDB-alueella (7 %). Lisäksi, ainoastaan hNGF-proteiinia erittävien solujen siirrokset indusoivat tiheän kolinergisten kuitujen kasvamisen väliseinässä, jotka työnsivät haarojaan siirrostuskohdan vieressä olevan aivokammion ependyymin pintaa vastaan. Talteenotettujen kapseleiden tutkiminen paljasti sellaisten solujen runsauden, jotka tuottivat tunnistettavia tasoja hNGF-proteiinia konsentraatioina, jotka riittivät PC12A-solujen erilaistamiseksi viljelmässä.

Esimerkki 4

BHK-NGF-siirrosten vaikutukset Huntingtonin taudin eläinmalleissa

A. Jyrsijät

Leikkaus ja siirrostus

Juuri ennen leikkausta Lewis-rotat nukutettiin natriumpentobarbitaalilla (45 mg/kg, i.p.) ja ne laitettiin

Kopfin stereotaksiseen laitteeseen. Päänahkaan tehtiin nuoliviilto ja porattiin kaksi reikää sellaisten XP-11-polymeerikapseleiden sijoittamiseksi aivokammioon, jotka sisälsivät NGF-proteiinia erittäviä BHK-soluja (kuten on kuvattu esimerkissä 1). Rotat siirrostettiin joko tois- tai molemminpuolisesti sijoittamalla kapseli 18-väljyiseen Teflon-katetriin, joka kiinnitettiin stereotaksiseen rakenteeseen ja laskettiin se sopivaan kohtaan. Siirrostuksen stereotaksiset koordinaatit olivat: 0,5 mm taaksepäin päälakipisteestä, 1,5 mm sivuun nuoliompeleesta ja 8,0 mm aivokuoren pinnan alla.

Noin viikkoa myöhemmin eläimet nukutettiin, sijoitettiin stereotaksiseen laitteeseen ja ne injektoitiin toispuoleisesti 225 (toispuoleinen) tai 150 nmol (molemminpuoleinen) QA-yhdistettä tai fosfaatilla puskuroitua suolaliuosta niin, että koordinaatit olivat seuraavat: AP = +1,2 mm, ML = ±2,6 mm ja DV = 5,5 mm vatsanpuoleisesti aivojen pinnasta. QA liuotettiin 2 N natriumhydroksidiin ja laimennettiin fosfaattipuskurilla, jonka pH oli 7,2 niin, että lopullinen pH oli 7,4 ja konsentraatio 225 nmol/µl. QA infusoitiin kuhunkin aivojuovioon käyttäen 28-väljyistä Hamilton-ruiskua viiden minuutin aikana 1 µl tilavuudessa. Injektiokanyyli jätettiin paikalleen kahdeksi lisäminuutiksi niin, että sallittiin perfusaatin diffuusio. Tämä menetelmä johti kolmen koeryhmän muodostukseen: (1) ainoastaan kinoliinihappo (QA), (2) kinoliinihappo + NGF-proteiinia erittävät BHK-solut (QA/NGF) ja (3) kinoliinihappo + NGF-proteiinia erittämättömät BHK-solut (QA/NON-NGF). Juuri leikkauksen jälkeen eläimet injektoitiin i.p. 10 ml:lla laktoitua Ringerin liuosta. Eläimiä kasvatettiin toimenpiteen jälkeen ravintoseoksella ja vedellä, joita oli saatavissa mielin määrin.

Käyttäytymistestit

Pyörimiskäyttäytyminen

Alkaen 10 vuorokautta toispuoleisten kinoliinihappoinjektioiden jälkeen eläimet testattiin apomorfiinilla indusoidun pyörimiskäyttäytymisen suhteen automaattirotometreissä (Rotoscan, Omnitech Instruments), jotka liitettiin IBM-tietokoneeseen tulosten automaattista keräystä varten. Eläimet sijoitettiin testikammioon viiden minuutin sopeutumisajaksi, sitten niihin injektoitiin apomorfiinia (1,0 mg/kg normaalissa suolaliuoksessa, joka sisälsi 0,1 % askorbaattia) ja niitä testattiin 30 lisäminuutin ajan. Apomorfiinilla indusoidun pyörimiskäyttäytymisen herkistyminen tapahtuu aivojuovion toksiinilla kiihotettujen vaurioiden jälkeen. Sen vuoksi eläimet testattiin neljä kertaa niin, että kunkin kerran välillä oli 3 - 4 vuorokautta. Pyörimisen määritettiin olevan täydellinen 360 asteen samanpuoleinen kierros ja ne ilmoitettiin kahden eri suunnan välisinä nettoeroina.

Spontaani liikunta-aktiivisuus

Ennen leikkausta ja 30 vuorokautta molemminpuoleisen QA-annon jälkeen kukin eläin laitettiin erikseen yhteen viidestä avoinkenttälaatikosta (40 x 40 x 35 cm), jossa oli automaattinen Digiscan-16 Animal Activity Monitor System -laitteisto (Omnitech Electronics, Columbus, Ohio) ja niitä testattiin liikunta-aktiivisuuden suhteen yhden tunnin testiaikana. Seuraavat liikuntavariaabelit kerättiin: (1) horisontaalinen aktiivisuus (HA): horisontaalisten antureiden häiriöiden kokonaismäärä; (2) kokonaisetäisyys (TD): eläimen kulkema matka tuumissa; (3) liikkeiden määrä (NM): tämä parametri kohosi yhdellä joka kerta, kun valonsäteen katkaisun avulla rekisteröitiin liike, joka erottui viimeisestä häiriöstä ainakin yhdellä sekunnilla; (4) liikeaika (MT): se aika sekunneissa, jonka eläin oli liikkeessä; (5) keskinopeus (AS): eläimen liikkeiden keskinopeus arvona cm/sekunnissa;

(6) keskietäisyys (AD): se keskimääräinen etäisyys, jonka eläin liikkui tuumissa liikekohtauksen aikana; (7) vertikaalinen aktiivisuus (VA): vertikaalisten antureiden valonsäteen häiriöiden kokonaismäärä; (8) vertikaaliaika (VT): tämä parametri kohosi silloin, kun eläin katkaisi vertikaalisen anturin valonsäteen; (9) vertikaalisten liikkeiden määrä (VM): tämä kohosi silloin, kun vertikaalisten antureiden valonsäteiden häiriöitä erotti ainakin yksi (1) sekunti; (10) toistuvien pakkoliikkeiden määrä (NS): tämä parametri kohosi, kun samat valonsäteet katkaistiin toistuvasti niin, että välissä oli yksi sekunti; (11) toistuvien pakkoliikkeiden aika (SC): toistuvissa pakkoliikkeissä vietetty akkumuloitunut aika.

Katalepsia

Vuorokausi liikunta-aktiivisuuden testauksen jälkeen eläimet testattiin lihasten vajaatoiminnan (katalepsian) suhteen sen jälkeen, kun niille annettiin D1- ja D2-dopamiinireseptorien antagonisteja, haloperidolia ja SCH2388-yhdistettä. Katalepsia mitattiin käyttäen tankotestiä, jossa eläinten takajalat sijoitettiin laiturille ja niiden etujalat sijoitettiin horisontaaliselle sauvalle (0,6 cm halkaisijaltaan), joka oli sijoitettu 9,0 cm laiturin yläpuolelle. Eläimissä tuotetun katalepsian taso mitattiin sillä, kuinka kauan kultakin eläimeltä meni poistumiseen tangolta. 300 sekuntia oli sallittu maksimi. Eläimet jaettiin umpimähkään yhteen kolmesta käsittelyryhmästä ja niihin injektoitiin joko haloperidolia (1,0 mg/kg), SCH23388-yhdistettä (1,0 mg/kg) tai verrokkiliuosta (0,9 % suolaliuos). Tankotestit suoritettiin uudelleen 1, 2, 3 ja 4 tuntia lääkkeen ja/tai verrokkiliuoksen annon jälkeen. Kaikki eläimet testattiin kullakin käsittelyllä niin, että testien välillä oli 3 - 4 vuorokautta.

Tulokset

Kaikilla eläimillä oli kohonnut herkkyys apomorfiinille toistuvina testikertoina. Kuten kuviossa 3 on esi-

tetty, QA tuotti merkittävän kohoamisen apomorfiinilla indusoidussa pyörimiskäyttäytymisessä. NON-NGF-ryhmän eläimet eivät eronneet niistä eläimistä, jotka saivat ainoastaan QA-yhdistettä. Kuitenkin niillä eläimillä, jotka saivat QA-yhdistettä yhdessä NGF-proteiinia erittävien BHK-solujen kanssa (katso taulukko IV, QA UNILAT), oli merkittävä pyörimiskäyttäytymisen vaimentuminen kaikissa testitilanteissa.

Yhdenmukaista sen käyttäytymissuojauksen kanssa, joka havaittiin toispuolisen QA-annon jälkeen oli se, että eläimillä oli molemminpuoleisten QA-injektioiden tuottaman liikatoimeliaisuuden vaimentuminen. Eläimillä, jotka saivat ainoastaan QA-yhdistettä tai QA-yhdistettä ja NON-NGF-BHK-solusiirroksia (se on, BHK-verrokkeja), oli verrannolliset kohoamiset aktiivisuudessa, joka vaihteli noin 100 - 350 % ennen siirrostusta oleviin tasoihin nähden (kuvio 4). Tälle päinvastaisesti niillä eläimillä, jotka saivat QA-yhdistettä yhdessä NGF-proteiinia erittävien BHK-solujen kanssa (taulukko V, QA BILAT), oli sellaiset aktiivisuustasot, jotka olivat merkittävästi vaimentuneet verrattuna NON-NGF-käsiteltyihin eläimiin ja vaihtelivat noin 25 - 150 % ennen siirrostusta oleviin tasoihin nähden.

Samanlainen käyttäytymissuojauskuvio, kun molemminpuoleisesti QA-yhdisteellä käsitellyt eläimet tutkittiin katalepsian suhteen. Eläimillä, jotka saivat ainoastaan QA-yhdistettä tai yhdessä NON-NGF-erittävien BHK-solujen kanssa, oli katalepsia-ajat, jotka vaihtelivat noin 30 - 60 sekunnin välillä haloperidolin ja SCH23390-yhdisteen annon jälkeen yli neljän tunnin testijakson aikana (kuvio 5). Tälle päinvastaisesti eläimillä, jotka saivat QA-yhdistettä ja NGF-proteiinia erittäviä BHK-soluja, oli vahva kataleptinen vaste sekä haloperidolille (@ 180 - 220 sekuntia) että SCH23390-yhdisteelle (@ 150 -220 sekuntia). Yhdessä nämä tulokset osoittavat, että polymeerikapseloitujen BHK-solujen aikaisemmin tapahtunut siirrostus kyke-

nee merkittävästi alentamaan niitä käyttäytymisseurauksia, jotka havaitaan sekä tois- että molemminpuoleisten QA-injektioiden jälkeen.

Taulukko IV

NGF-proteiinin luovutetut ±-määrät jyrsijän vaurioituneisiin malleihin mitattuna ELISA-menetelmällä arvona ng/kapseli/24 tuntia

Malli	Ennen	Keskiarvon keskihajonta	Jälkeen	Keskiarvon keskihajonta
QA UNILAT (BHK-NGF) (n=6)	34,1	6,9	16,1	6
QA BILAT (BHK-NGF) (n=8)	23,7	5,5	19,8	16,1
Verrokit (BHK-verrokki) (n=8)	0,1	0,05	0,15	0,1

B. Kädelliset

Yllä oleva tutkimus laajennettiin kädellisiin.

Neljä apinaa sai XP-11-polymeerikapseloitujen BHK-hNGF-solujen siirrokset (kuten on kuvattu esimerkissä 1). Neljä verrokkiapinaa sai samalla tavalla kapseloitujen BHK-solujen siirrokset, joista puuttui hNGF-DNA-rakenne. Kuhunkin eläimeen laitettiin kolme siirrosta häntätumakkeen päähän ja kolme siirrosta laitettiin taka-aivokuorukkaan. Koordinaatit perustuivat MRI-ohjeisiin.

Leikkaus suoritettiin käyttäen standardimenetelmiä. Apinat nukutettiin. Steriileissä olosuhteissa tehtiin U-muotoinen viilto keskilinjaan paljastaen kallo, joka oli oikean aivojuovion päällä. Tehtiin 2 cm x 3 cm kokoinen kallonavaus aivojuovion päälle käyttäen korkeanopeuksista poraa ja kovakalvo käännettiin taaksepäin U-muotoisella

tavalla. Sitten kolme polymeerikapselisiirrosta sijoitettiin stereotaksisesti oikean häntätumakkeen päähän ja kolme kapselia sijoitettiin stereotaksisesti oikeaan aivokuorukkaan. Kiinnike leikattiin aivokuoren pinnalle myöhemmän tunnistuksen ja poisoton helpottamiseksi. Sitten kovakalvo ja pääkoppa laitettiin uudelleen kiinni ja ommeltiin takaisin paikoilleen. Ihonalaiset kudokset ommeltiin käänteisillä 4-0 Coated Vicryl -ompeleilla ja iho suljettiin 4-0 Ethilon -ompeleilla rutiinisti.

Viikko kapselien siirrostuksen jälkeen apinat saivat kinoliinihappoinjektiot häntätumakkeeseen ja aivokuorukkaan juuri kapselisiirrosten välittömään läheisyyteen. Apinoita kuvattiin videolla normaaleissa olosuhteissa ja sen jälkeen, kun niille oli annettu apomorfiinikäsittely kerran viikossa, joka alkoi viikkoa ennen siirrostusta, ja alkaen kolme viikkoa vaurioiden muodostuksen jälkeen kahden viikon ajan. Juuri ennen lopettamista kapselit poistettiin.

Kunkin kapselin hNGF-proteiinin vapautustasot kvantitoidaan ELISA-menetelmällä. Tämän kapselista talteenotettaessa tapahtuvan hNGF-proteiinin vapautumisen biologisen aktiivisuuden relevanssi arvioidaan PC12-solubiotestillä ja siirrostettujen BHK-solujen muuntelu arvioidaan Nissl-värjäyksellä. Apinoiden aivot prosessoidaan immunohistokemiallisesti ChAT-, GAD-,NADPH-, NPY-, somatostatiini- ja Nissl-proteiinien suhteen. Vaurioalue kvantifioidaan Nissl-värjätyistä leikkeistä ja ChAT-, GAD-, NPY-, somatostatiini- ja NADPH-proteiinien suhteen immunoreaktiivisesti värjäytyneiden solujen määrä kvantitoidaan molemminpuoleisesti.

Esimerkki 5

NGF-proteiinin luovutus ihmisen keskushermostoon

Äskettäin Olsen et al., J. Neural. Transmission, 4, 79 - 95 (1993) kuvasivat hiiren NGF-proteiinin annon kammion sisäisellä infuusiolla käyttäen minipumppusysteemiä

(Medtronic). Infuusiosysteemi siirrostettiin ihonalaisesti vatsanseinämään ja liitettiin ihonalaisella katetrilla kammion sisäiseen katetriin, joka sijoitettiin kallossa olevan 2 mm poratun reiän läpi oikeaan aivokammioon. Kaikkiaan 32,4 ml hiiren NGF-proteiinia infusoitiin kolmen kuukauden aikana.

Kliinisessä testissä käytetään kapseloituja BHK-soluja, jotka vapauttavat ihmisen NGF-proteiinia 1 - 10 XP-11-kapselista, jotka sijoitetaan stereotaksisesti kammiotilaan, joka sijaitsee väliseinän ja häntätumakkeen välissä, tai valituille kuoren uuden osan/aivoturson alueille. Kapselit vapauttavat 50 - 500 ng ihmisen NGF-proteiinia/24 tuntia. Kapselit ovat siirrostettuina 3 - 12 kuukautta, jona aikana potilaita voidaan tarkkailla käyttäytymisen ja biokemiallisten parantumisien suhteen. Potilaat voidaan arvioida käyttäen sarjaa havaintotoimintotestejä sisältäen, mutta ei rajoittuen: (1) mielentilan minitutkimuksen, jota käytetään havaintotoimintatason arvioimiseksi [Folstein et al., J. Psychiatr. Res., 12, 189 - 198 (1975)]; (2) kasvotunnistuskokeen [Backman et al., Psychol. Aging, 6, 489 - 492 (1991)]; (3) spatiaalimuistin käyttäen välitöntä ja viivätynyttä (30 min) testausta. Potilaita voidaan myös tarkkailla useilla ei-invasiivisilla menetelmillä kolinergisen toiminnan ja verenvirtauksen varmistamiseksi. Kuoleman jälkeiset <u>in vitro</u> tutkimukset ovat osoittaneet, että kolinergiset nikotiinireseptorit häviävät Alzheimerin taudissa [Nordberg ja Winblad, Neuroscience Lett., 72, 115 - 119 (1986)]. Positroniemissiotomografiaa (PET) voidaan käyttää ^{11}C-nikotiinin sisäänoton visualisoimiseksi mittarina nikotiinireseptorin läsnäolosta ja toiminnasta. Sen lisäksi ^{11}C-butamolia voidaan käyttää aivojen verenkierron arvioimiseksi eri aivoalueilla [Herseovitch et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 7, 527 - 542 (1987)].

Esimerkki 6

Puudutusaineen luovutus

Seuraava esimerkki kuvaa esillä olevan keksinnön käyttöä kroonisen kivun helpottamiseksi terminaalisessa syöpäpotilaassa käyttäen enkefaliinia erittäviä autologisia soluja. Neuronien kantasolut muodostetaan 1 mg aivokudosbiopsiasta, joka saadaan aiotun vastaanottajan aivokammioiden selänpuoleisen sivun kammioinalaiselta vyöhykkeeltä. Sikiön aivoturson esiastesolujen jakaantuva populaatio muodostetaan aivokuoren, aivoturson, väliaivojen, aivojuovion ja/tai väliseinän yhdistelmästä bFGF-proteiinin läsnä ollessa käyttäen menetelmiä, jotka on kuvannut Richards [Richards et al., Proc. Natl. Avad. Sci. USA, 89, 8591 - 8595 (1992)]. Jakaantuvat esiastesolut transfektoidaan pNUT-vektorilla, joka sisältää enkefaliinigeenin, jota ohjaa konstitutiivinen promoottori, kuten metallotioneiinipromoottori, ja ne selektoidaan metotreksaatilla, kuten yllä on kuvattu (katso myös esim. Kaufman et al., US-patentti 4 740 461). Onnistuneet transformantit tunnistetaan niiden resistenssin suhteen selektiiviselle aineelle ja heterologisen geenin ekspressiotasot varmistetaan radioimmuunitestillä (RIA).

Noin 250 000 erilaistumatonta esiastesolua siirrostetaan suoraan vastaanottajan CSF:ään sen menetelmän mukaisesti, jonka on kuvannut Sagen [Sagen et al., US-patentti 4 753 635). Siirrostuksen jälkeen kantasolut lopettavat jakaantumisen muutaman replikaatiosyklin jälkeen ja erilaistuvat enkefaliinia ekspressoiviksi gliasoluiksi. Kohonneen enkefaliinin määrän jatkuva läsnäolo CSF:ssä johtaa vastaanottajan kivuntunnottomuuteen muutaman vuorokauden - kuukauden aikana.

Yllä kuvatut solut, tai vaihtoehtoisesti naudan lisämunuaisen kromaffiinisolut, voidaan kapseloida esimerkiksi tämän keksinnön mukaisiin T1/2-membraanikapseleihin

ja siirrostaa aivokammioihin tai lukinkalvon alaiseen tilaan ihmiselle.

Esimerkki 7

T1/2-membraanin valmistus

T1-, T2- ja T1/2-onttokuitumembraanit valmistettiin käyttäen yhtäaikaista suulakepuristuskehruumenetelmää, joka oli samanlainen kuin se, joka on kuvattu US-patenteissa 5 158 881, 5 284 761 ja 5 283 187. Taulukossa V esitetään näiden T1-, T2- ja T1/2-membraanien ominaisuudet. Valuliuos näille membraaneille oli DMSO:ssa oleva 12,5 % (paino/paino) PAN/PVC (Dynel). Liuos suodatettiin 0,22 µm suodattimen läpi ennen käyttöä. Kuidut kehrättiin deionisoituun (MilliQ) vesihauteeseen 23 °C:ssa niin, että deionisoitu (MilliQ) vesi toimi koagulanttiliuoksena. Suuttimen mitat olivat: rengasmainen osa (etulevy) 0,650 mm, kapillaari 0,475 mm. Polymeerin virtausnopeudet (yksikötön) mitattiin Gilmont #0 -virtausmittarilla (GFO). Koagulantin virtausnopeudet (yksikötön) mitattiin Gilmont #4 -virtausmittarilla (GF4) (yksikötön). T2- ja T1/2-membraaneille ilmakehä suuttimen ja lopetushauteen välillä olevassa ilmavälissä kosteutettiin sumukammiossa käyttäen huonekostutinta. Taulukon V mukaisten T1/2-kuitujen katkeamisvahvuus oli 19,3 ± 0,5 grammaa.

Näillä kapseleilla oli alentunut kudoksen sisäänkasvu siirrostuksen aikana ja 100 % talteenottokyky ilman hajoamista (10 kapselia 10 kapselista).

Taulukko V

Kuitutyyppi

	T1	T2	T 1/2
Kuidun tunnistusnro	HF042293-2	HF042293-1	XP11-93-001
Sisähalkaisija (/um)	504 ± 8,5	480,5 ± 10	450 ± 25
Ulkohalkaisija (/um)	621 ± 11	600 ± 13	570 ± 30
Hydraulinen läpäisevyys /ml/(m^2 min mmHg)/	49,5 ± 7	38 ± 7	53
BSA-hyljintä (%)	97 ± 1	98,0 ± 0,7	88,7 ± 2,1
Ovalbumiinihyljintä (%)	68,8 ± 1,5	76,3 ± 1,5	82,0 ± 1,7
Katkaisulujuus (gms)	28,0 ± 0,5	28,0 ± 0,5	19,3 ± 0,5
Suuttimen korkeus (tuumaa)	3,5	3,5	6
Ilmakehä	ei sumua	sumukammio	sumukammio
Polymeerin virtausnopeus	30 @ 21 psi GF0	28 @ 21 psi GF0	27 @ 22 psi GF0
Virtausnopeus putkessa	45 @ 15 psi GF4	44 @ 15 psi GF4	44 @ 15 psi GF4

Taulukossa V kuvattujen T1/2- XP-11 -kuitujen makrohuokosten kokonaispinta-ala oli noin 12 % ulkoseinän kokonaispinta-alasta. Noin 20 % makrohuokosista oli halkaisijaltaan 5 - 10 µm ja noin 80 % makrohuokosista oli halkaisijaltaan noin 10 µm.

Toisen myös yhtäaikaisella suulakepuristuksella tuotetun T1/2-membraanin sisähalkaisija oli 522,5 ± 10 µm ja ulkohalkaisija 670 ± 11 µm.

Polymeerinen valuliuos oli NMP-liuoksessa oleva 12,5 % (paino/paino) PAN/PVC. Putkessa oleva koagulanttiliuos ja haude olivat H_2O:ta (deionisoitu MilliQ) 23 °C:ssa. Polymeerin virtausnopeus oli 63 @ 25 psi:tä mitattuna Gilmont #0 -virtausmittarilla. Koagulantin virtausnopeus oli 69 @ 58 psi:tä mitattuna Gilmont #4 -virtausmittarilla. Suuttimen rengasmaisen osan (etulevy) halkaisija oli 650 µm. Kapillaarin O.D. oli 400 µm; kapillaarin I.D. oli 310 µm. Suuttimen ja lopetushauteen välinen ilmaväli oli 8,0 tuumaa. Ilmakehä ilmavälissä oli ympäröivä ilma (ei sumua).

Hydraulinen läpäisevyys oli noin 35,0 ml/(m^2 min mmHg). Katkeamisvahvuus oli 31,0 ± 0,3 grammaa. Näiden

kuitujen makrohuokosten kokonaispinta-ala oli noin 10 % ulkoseinän kokonaispinta-alasta. Enemmän kuin 99 % näistä makrohuokosista oli halkaisijaltaan 10 - 15 µm.

Kolmas T1/2-membraani valmistettiin yhtäaikaisella suulakepuristuksella. Polymeerinen valuliuos oli NMP-liuoksessa, jossa oli 10 % H_2O:ta, oleva 16,0 % (paino/paino) PAN/PVC (molekyylipaino noin 40 K). Putkessa oleva koagulanttiliuos ja haudeliuos oli 40 % NMP, 60 % H_2O 23 °C:ssa. Polymeerin virtausnopeus oli 40 @ 28 psi:tä mitattuna Gilmont #0 -virtausmittarilla. Koagulantin virtausnopeus oli 97 @ 15 psi:tä mitattuna Gilmont #4 -virtausmittarilla. Suuttimen mitat olivat: kapillaarin O.D. oli 400 µm ja rengasmaisen osan I.D. oli 650 µm. Suuttimen ja lopetushauteen välinen ilmaväli oli 10,3 tuumaa. Ilmakehä ilmavälissä kosteutettiin sumukammiossa käyttäen huonekostutinta.

T1/2-kuitujen sisähalkaisija oli noin 545 µm ja ulkohalkaisija noin 639 µm. Näiden kuitujen hydraulinen läpäisevyys oli noin 29 ml/(m^2 min mmHg). Katkeamisvahvuus oli 29,3 ± 0,5 grammaa. Näiden kuitujen makrohuokosten kokonaispinta-ala oli noin 2,4 % ulkoseinän kokonaispinta-alasta. Noin 17 % makrohuokosista oli halkaisijaltaan noin 5 µm, noin 33 % oli halkaisijaltaan noin 10 µm ja noin 50 % oli halkaisijaltaan noin 15 µm.

Nämä T1/2-onttokuidut ovat asymmetrisiä; niissä on tiheä sisäinen selektiivisesti läpäisevä este ja laaja suuriaukkoinen juosteinen seinärakenne. Ulkopinta on ainoastaan vähän avoin isännän kudoksen sisääntunkeutumiselle niin, että jäljelle jäävä on huokoinen (se on, ei-selektiivinen), mutta suljettu isännän kudoksen sisäänkasvulle.

Esimerkki 8

Parantunut havaintotoiminta ikääntyneillä rotilla

Tässä tutkimuksessa arvioitiin kapseloitujen NGF-proteiinia tuottavien poikashamsterin (BHK) solujen mah-

dollista terapeuttista tehokkuutta jyrsijän dementiamallissa. Lisäksi rotat testattiin hoidon ei-havaintovaikutusten, kuten myrkyllisyyden, suhteen. Tätä tarkoitusta varten niiden kivun sietokynnykset arvioitiin kuumalevylaitteessa ja rotat tutkittiin haitallisten vaikutusten suhteen mitä tulee niiden kuolleisuuteen, kehon painoon ja aktiivisuustasoihin päivä/yösyklissä.

Solujen transfektio ja viljely

Solut tuotettiin, kuten on kuvattu esimerkissä 1.

Solujen kapselointi

Yksittäiset T1/2-kapselit (XP1193-001), joiden pituus oli 7,0 ± 0,5 mm, valmistettiin esimerkin 7 mukaisesti. Kapselien sisähalkaisijat vaihtelivat välillä 425 - 500 µm ja seinät olivat 50 - 65 µm paksuisia. Näiden membraanien nimellinen molekyylipainon cut-off-arvo oli noin 100 kD mitattuna dekstraanin virtaus-pidätys-kokeilla. Kuitulaitteissa oli väliseinärakenne proksimaalisessa päässä solujen latausta varten ja ne suljettiin distaalisesta päästä. BHK-solut valmistettiin yksisolususpensiona ja ne infusoitiin väliseinän aukosta tiheytenä, joka oli 10^4 solua/µl sen jälkeen, kun ne oli sekoitettu 1:1 fysiologisen kollageenin kanssa. Kun solususpensiota oli infusoitu 202,5 µl, väliseinä poistettiin ja täyttöaukko suljettiin. BHK-soluilla ladatut laitteet pidettiin PC-1-alustassa 4 - 5 vuorokautta ennen siirrostusta. 3 - 4 vuorokauden kuluttua kapselit huuhdeltiin Hanksin tasapainotetussa suolaliuoksessa ja sijoitettiin 1 ml:aan tuoretta PC-1-alustaa yli yöksi analysoitavaksi hNGF-proteiinin suhteen ELISA-menetelmällä.

Kapselin NGF-proteiinin tuoton arviointi

BHK-NGF-ladatuista kapseleista vapautuneen hNGF-proteiinin kvantitointi suoritettiin kaksipaikkaisella entsyymi-immuunitestillä. Menetelmä oli modifikaatio siitä, jonka on kuvannut Boehringer Mannheim, käyttäen Nunc-Immuno Maxisorp ELISA -levyjä. Värin kehittymisen jälkeen

(30 minuuttia) näytteet analysoitiin levylukijalla ja mitattiin hiiren rekombinantti-NGF-proteiinistandardeja vastaan. Kapseleiden hNGF-proteiinin tuotto vaihteli. Sen varmistamiseksi, että kaikki rotat saivat samanlaiset määrät ulkopuolista hNGF-proteiinia, kukin rotta siirrostettiin yhdellä melko korkeasti ja yhdellä melko matalasti hNGF-proteiinia tuottavalla kapselilla.

Rotat

Urospuoliset Wistar 344 -rotat hankittiin ikääntyneestä Harlan Sprague Dawley -rottakoloniasta National Institutes of Aging -laitoksesta. Vanhemmat rotat olivat aiempia siitoseläimiä. Näitä rottia sopeutettiin kasvatushuoneeseen 1,5 kuukautta ennen kuin käyttäytymistestit alkoivat ja niitä pidettiin koko niiden elinikä NIH-31-ruokavaliolla. Kaseiinia sisältävillä ruokavalioilla F-344-rottien munuaisvaurioiden määrä on niin korkea, että se tekee niiden käytön ikääntymisen eläinmallina kyseenalaiseksi. NIH-31-ruokavalio on soijaproteiinia sisältävä ruokavalio, joka kohottaa pitkäikäisyyttä ja alentaa voimakkaasti vakavan kroonisen munuaistaudin yleisyyttä sellaisilla F-344-rotilla, jotka saavat ruokaa mielin määrin niin, että munuaistauti ei sekoita niiden käyttöä ikääntymistutkimuksissa. Katso Winn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 2324 - 28 (1994). Kun käyttäytymistestit alkoivat, rotat olivat iältään 3,3 kuukautisia (n = 30), 18,5 kuukautisia (n = 45) ja 24,6 kuukautisia (n = 60). Rottien iät on tuloksissa ilmoitettu niiden todellisina ikinä siinä testivaiheessa.

Kapselien siirrostus

Rotat nukutettiin injektoimalla ketamiinin (33 mg/ml), ksylatsiinin (1,7 mg/ml) ja asepromatsiinin (10 mg/ml) seosta määränä 1,0 ml/kg. Ne sijoitettiin Kopfin stereotaksiseen laitteeseen, päänahkaan tehtiin nuoliviilto ja porareikä porattiin sopivilla koordinaateilla polymeerikapselien sijoittamiseksi aivokammioihin. Rotat siirros-

tettiin sijoittamalla kapseli 18-väljyiseen Teflon-kateteriin, joka kiinnitettiin stereotaksiseen rakenteeseen. Ruostumatonta terästä oleva obduraattori sijoitettiin kanyyliin, laite laskettiin aivoihin ja obduraattoria pidettiin paikoillaan samalla, kun ulompaa kanyyliä nostettiin niin, että passiivisesti sijoitettiin kapseli aivokammioihin. Siirrostuksen stereotaksiset koordinaatit olivat: 0,5 mm taaksepäin päälakipisteestä, 1,5 mm sivuun nuoliompeleesta ja 7,5 mm aivokuoren pinnan alla. Rotille, jotka eivät saaneet siirroksia, suoritettiin näennäisleikkaukset (nukutettiin, päänahka avattiin, kallo porattiin ja kovakalvo puhkaistiin).

Kuolleisuusluvut

Kunkin rotan ikä ja yleinen ulkonäkö arvioitiin sinä vuorokautena, kun se kuoli. Niiden rottien, jotka olivat tutkimuksessa loppuun asti, kuolinikää pidettiin perfuusioikänä.

Kehon painot

Rotat punnittiin kerran viikossa siitä lähtien, kun ne saapuivat eläintallista.

Morriksen vesilabyrintti

Laite: Musta lasikuitutankki, jonka halkaisija oli 1,5 m ja syvyys 76 cm, täytettiin vedellä (21 °C) 32 cm syvyyteen. Neliönmuotoinen laituri, jonka koko oli 10 x 10 cm, upotettiin 0,5 cm veden pinnan alle viitemuistin ja toimintamuistin testejä varten. Oppimiskokeiden aikana laituri merkittiin valkoisella sylinterillä (39 cm korkuinen ja 1,2 cm halkasijaltaan), joka oli valmistettu puutapeista ja joka ulottui vertikaalisesti laiturista. Kaatuvaa laituria käytettiin anturikoetesteissä. SA-3 Tracker -laitetta käytettiin yhdessä Poly-Track Software -ohjelmien (San Diego Instruments, San Diego, CA) kanssa jäljittämään ja tallentamaan valkoisen rotan koordinaatit, kun se liikkui mustalla taustalla. Kamera kiinnitettiin 178 cm veden pinnan yläpuolelle ja suunnattiin tankin keskustaan.

Tankki sijoitettiin seinää vasten huoneessa, jota valaisi kaksi 18 watin fluoresenssilamppua ja neljä 50 watin hehkulamppua, jotka oli sijoitettu ympäri huonetta tankin reunan alapuolelle. Suuret kooltaan 122 x 183 cm mustavalkoiset näkyvät merkit (tammipelilauta ja maalitaulun keskus) sijoitettiin vastapäisille seinille lähelle tankkia.

Viitemuistitestaus ja käsittelytehtävä

Paikoillaan pysyvä laituri sijoitettiin tankin keskustan ja ulkoseinän puoleenväliin kaikissa kokeissa. Umpimähkäisiä aloituskohtia käytettiin kaikissa neljässä kvadrantissa. Kokeet lopetettiin, kun rotta löysi laiturin tai kahdessa minuutissa. Kunkin kokeen lopussa rotta sijoitettiin laiturille 10 sekunniksi. Ennen leikkausta rotat kävivät läpi yhden koetilaisuuden vuorokaudessa seitsemässä ensimmäisessä koetilaisuudessa ja kaksi koetilaisuutta vuorokaudessa seuraavien kahdeksan koetilaisuuden ajan. Leikkauksen jälkeen rotat kävivät läpi yhden koetilaisuuden vuorokaudessa viiden vuorokauden ajan siirrostuksen jälkeisinä vuorokausina 15 - 19.

Siirrostuksen jälkeiset anturikokeet

Kaatuva laituri sijoitettiin sen saman kvadrantin keskustaan, jota käytettiin viitemuistikokeissa. Laituri oli ala-asennossa kokeen alussa ja se nostettiin yläasentoon 30 sekunnin kuluttua. Käytettiin umpimähkäisiä aloituskohtia. Kokeet lopetettiin, kun rotta löysi laiturin tai kahdessa minuutissa. Kunkin kokeen lopussa rotat sijoitettiin laiturille 10 sekunniksi. Tulokset kerättiin ainoastaan ensimmäisten 30 sekunnin ajalta. Se määrä, jonka rotat uivat laiturin paikan yli (kun laituri putosi tankin pohjalle) ensimmäisten 30 sekunnin aikana, talletettiin. Rotat kävivät läpi yhden kokeen vuorokaudessa viiden vuorokauden ajan samoina vuorokausina kuin siirrostuksen jälkeiset viitemuistikokeet suoritettiin. Anturikokeiden ja viitemuistikokeiden järjestys vaihteli vuorokaudesta toiseen.

Siirrostuksen jälkeiset oppimiskokeet

Paikoillaan pysyvä laituri, jossa oli musta kansi yläosaan kuminauhoilla kiinnitettynä, sijoitettiin sen saman kvandrantin keskustaan, jota käytettiin viitemuistikokeissa. Kolme puutappia teipattiin toistensa päälle ja ne kiinnitettiin mustaan kanteen. Käytettiin umpimähkäisiä aloituskohtia. Rotat kävivät läpi kolme koetta niin, että niiden välissä ei ollut väliaikaa, anturikoetestien jälkeen.

Siirrostuksen jälkeiset toimintamuistikokeet

Paikoillaan pysyvä laituri sijoitettiin uuteen kohtaan, joka valittiin umpimähkäisesti kaikista neljästä kvadrantista kussakin koetilaisuudessa. Käytettiin umpimähkäisiä aloituskohtia. Yksi koetilaisuus sisälsi kolme yritystä, joiden välissä ei ollut väliaikaa, neljänä siirrostuksen jälkeisenä vuorokautena vuorokaudesta 26 vuorokauteen 29. Suoritettiin toinen sarja Morriksen vesilabyrintin toimintamuistitestejä käyttäen kahden tunnin väliaikaa yritysten välissä kuutena siirrostuksen jälkeisenä vuorokautena vuorokaudesta 30 vuorokauteen 35. Yritykset lopetettiin, kun rotta löysi laiturin tai kahdessa minuutissa. Kahden ensimmäisen yrityksen lopussa rotat sijoitettiin laiturille 10 sekunniksi.

Nosiseptiiviset kynnykset kuumalevyllä

Kuumalevy kuumennettiin 50 °C:seksi ja se peitettiin Plexiglas-laatikolla. Rotat sijoitettiin levylle ja ne poistettiin välittömästi, kun havaittiin merkkejä levottomuudesta (esim. tassujen nuoleminen, nopeat tassun heilutukset). Yritys lopetettiin 60 sekunnin kuluttua silloinkin, kun mitään merkkejä levottomuudesta ei havaittu. Latenttisuuden vasteelle tulkittiin olevan riippuvuussuhteessa oleva mitta. 45 vuorokautta ennen siirrostusta rotilla suoritettiin yksi koe vuorokaudessa viiden vuorokauden ajan ja näiden viiden kokeen keskiarvot laskettiin mittana perustason suorituskyvystä. 15 vuorokautta leik-

kauksen jälkeen suoritettiin toiset viisi koetilaisuutta kerran vuorokaudessa. Lopuksi 35 vuorokautta toimenpiteen jälkeen kuumalevyllä suoritettiin yksi koetilaisuus.

Siirrostuksen jälkeinen Von Freyn somatosensorinen toiminta

Käytettiin kalibroituja Von Frey -karvoja, joiden koot olivat 7,37, 12,5 ja 20,9 g. Rotat sijoitettiin verkkolattialle (120 x 45 cm), joka nostettiin 45 cm pöydästä ja peitettiin kirkkaalla muovihäkillä (24 x 14 x 13 cm) ja niiden annettiin sopeutua 10 minuuttia. Von Frey -karvat painettiin takatassun jalkapohjan keskiosan ihoa vasten, kunnes ne alkoivat taipua, enimmillään 20 kertaa frekvenssillä, joka oli noin kaksi kosketusta sekunnissa. Jos rotalla ei ollut vastetta 20 kosketuksen jälkeen, merkittiin arvoksi 21. Kynnysarvossa rottien vasteena oli nopea tassun heilutus, tassun poisvetäminen tai tassun nuoleminen. Karvoilla kosketeltiin umpimähkäisessä järjestyksessä vasempaan ja oikeaan takatassuun. Rotat kävivät läpi yhden koetilaisuuden toimenpiteen jälkeen ja vasemman ja oikean puolen keskiarvoja käytettiin.

Aktiivisuustasot

Rotat sijoitettiin pleksilasiseen häkkiin (42 cm x 42 cm x 30 cm), jonka ulkoreunan ympärillä oli rivi infrapunasäteitä (Integrated Animal Monitoring System, Omnitech Electronics, Inc.) ja ohut kerros beeta-puolijohdelastuja pohjalla, kello viidestä illalla kello yhdeksään aamulla väliseksi ajaksi (valot sammutettuina kahdeksasta illalla kahdeksaan aamulla) ennen siirrostusta ja sen jälkeen. Säteen katkeamiset muutettiin kokonaismatkaksi, joka oli kuljettu tunnissa 16 tunnin koetilaisuuden aikana.

Tulosten analyysi

Tulokset analysoitiin käyttäen SAS-PC™. Varianssianalyysit laskettiin käyttäen yleisten lineaaristen mallien menetelmiä, joissa oli vapaa valinta toistetuille mittauksille, kun oli tarpeen, ja Cronbachin alfa-vakio

laskettiin mittana sisäisestä luotettavuudesta (SAS Institute, Inc., 1989). Omegan neliö laskettiin mittana vaikutuksen koosta [Dodd ja Schultz, Jr., Psychol. Bull., 79, 391 - 95 (1973)]. SAS-PC PROC LIFETEST -menetelmää, käyttäen tuoterajoitusmenetelmää, käytettiin arvioitaessa eloonjääntijakautumia stratumien mukaisesti. Log-arvo-testiä käytettiin eloonjäännin samankaltaisuuden testaamiseksi stratumien välillä. Lukuunottamatta kuolleisuuslukuja, kaikki julkaistut tulokset ja analyysit rajoitettiin niihin kohteisiin, jotka elivät kokeen loppuun asti.

Kapselin hNGF-proteiinin tuotto

Kaikkien 14 kapseloidun BHK-verrokkisolun (ei-transfektoiduista verrokeista) NGF-tuotto oli 0 ng/20 tuntia elimistön ulkopuolisen viljelyn aikaan. 43 rottaa, jotka siirrostettiin molemminpuoleisesti BHK-NGF-kapseleilla, elivät kokeen loppuun asti. hNGF-proteiinin tuotto kapseloiduista BHK-NGF-soluista vaihteli välillä 0,80 ng/20 tuntia - 17,4 ng/20 tuntia ennen siirrostusta ja välillä 0,00 ng/20 tuntia - 12,1 ng/20 tuntia viljeltäessä siirrostuksen jälkeen elimistön ulkopuolella. Kunkin eläimen kahden kapselin hNGF-proteiinin tuoton summa ennen siirrostusta oli 11,5 ± 0,56 ng/20 tuntia ja aleni arvoon 7,3 ± 0,75 ng/20 tuntia, kun mitattiin siirrostuksen jälkeen elimistön ulkopuolella. Kahden kapselin hNGF-proteiinin tuoton summa ennen siirrostusta tai selvityksen jälkeen ei korreloinut suorituskykyyn missään vesilabyrinttitestissä.

Kuolleisuusluvut

Kun rotat saapuivat eläintallista, ne olivat iältään 1,8 kuukautta (n = 30), 17 kuukautta (n = 45) ja 23,1 kuukautta (n = 60). Yksikään nuoremmista rotista ei kuollut, seitsemän 45:stä keski-ikäisestä rotasta (15 %) ja 18 rottaa 60:sta vanhimmasta rotasta (30 %) kuoli sillä välillä, kun ne saapuivat eläintallista ja kun ne suunniteltiin leikkausta varten noin 65 vuorokautta myöhemmin.

Yksikään minkään ikäinen rotta ei kuollut leikkauksen tai nukutuksesta selviämisen aikana. Yksikään nuori rotta ei kuollut, yksi rotta 18:sta keski-ikäisestä rotasta, jotka oli siirrostettu kapseloiduilla BHK-NGF-soluilla (5,5 %), neljä rottaa 20:sta vanhimmasta verrokkirotasta (20 %) ja kuusi rottaa 22:sta vanhimmasta rotasta, jotka oli siirrostettu kapseloiduilla BHK-NGF-soluilla (27 %), kuoli sillä välillä, kun ne siirrostettiin ja kun ne suunniteltiin lopetettaviksi noin 40 vuorokautta myöhemmin.

Eloonjääneiden lukumäärä ja niiden iät lopetuksen ajankohtana olivat: 5,4 kuukautta (n = 30), 20,6 kuukautta (n = 37) ja 26,7 kuukautta (n = 32), vastaavasti niin, että yhteensä N = 99 rottaa, jotka säilyivät hengissä kokeen loppuun asti. Ainoastaan tulokset näistä 99 eloonjääneestä sisällytettiin tulosten analyysiin, jotka on esitetty alla.

Kehon painot

Nuorimmilla rotilla oli alimmat kehon painot, keski-ikäiset rotat olivat painavimpia ja vanhimmat rotat olivat painoltaan näiden keskivälillä. Ikä vaikutti tulosten suureen varianssisuhteeseen, omega^2 = 0,89, F(2,81) = 722,6, p = 0,0001. Kehon painot muuttuivat merkittävästi kahdeksan viikon aikana ennen leikkausta. Nuorimmat rotat jatkoivat painon lisäystä, kun taas keski-ikäiset ja vanhimmat rotat menettivät jatkuvasti painoaan. Rotat jaettiin ryhmiin perustuen niiden suorituskykyyn Morriksen vesilabyrinttitestin viitemuistiversiossa ennen siirrostusta, ei perustuen ennen siirrostusta olevaan kehon painoon. Sen mukaisesti keski-ikäiset rotat, jotka suunniteltiin siirrostukseen kapseloiduilla BHK-NGF-soluilla, eivät olleet aivan niin painavia (ennen niiden siirrostamista) kuin rotat, jotka osoitettiin verrokkiryhmiin.

Kehon painot muuttuivat neljän viikon aikana leikkauksen jälkeen. Nuorimmat rotat jatkoivat painonlisäystä, kun taas keski-ikäiset ja vanhimmat rotat jatkoivat pai-

nonmenetystä siirrostuksen/näennäisleikkauksen jälkeen. Tämän jälkeiset vertailut osoittivat, että rotat, jotka oli siirrostettu kapseloiduilla BHK-soluilla, olivat merkittävästi kevyempiä kuin verrokkirotat, joille oli tehty näennäisleikkaukset, $F(1,81) = 8,34$, $p = 0,005$, kun taas rotat, joihin oli siirrostettu kapseloidut BHK-NGF-solut, eivät olleet kevyempiä kuin rotat, jotka oli siirrostettu kapseloiduilla BHK-soluilla, $F(1,81) = 0,07$, $p = 0,79$. Siirrostuksen jälkeisten kehon painojen keskiarvot osoittavat, että näennäissiirrostetut rotat olivat painoltaan 386,8 ± 9,3 g, kun taas sellaisten rottien kehon painot, jotka oli siirrostettu kapseloiduilla BHK-soluilla, olivat 3 % pienemmät (375,5 ± 11,0 g), ja sellaisten rottien kehon painot, jotka oli siirrostettu kapseloiduilla BHK-NGF-soluilla, olivat 2 % pienemmät kuin näennäissiirrostetun ryhmän (379,8 ± 6,5 g). Jopa ilmaistuna selvitetyillä varianssisuhteilla, käsittelyn vaikutukset kehon painoon olivat pieniä. Lisäksi ei ollut mitään todisteita siitä, että käsittely vaikutti kehon painojen muutosnopeuteen tai -kuvioon neljän viikon aikana siirrostuksen jälkeen.

Aktiivisuustasot

Kokonaismatka, joka kuljettiin kunakin tuntina 16 tunnin ajanjaksona viidestä illalla yhdeksään aamulla (valot sammutettuna kahdeksasta illalla kahdeksaan aamulla) osoittaa, että ennen siirrostusta aktiivisuustasot olivat korkeita aluksi ja alenivat, mutta kohosivat dramaattisesti, kun valot sammuivat neljäntenä tuntina laatikossa. Nuorimmat rotat olivat aktiivisempia kuin vanhemmat rotat. Aktiivisuustasoihin vaikutti merkitsevästi myös vuorokauden aika.

Käsittelyn päävaikutus oli tilastollisesti merkittävä siirrostuksen jälkeisiin aktiivisuustasoihin, $F(2,81) = 4,32$, $p = 0,017$. Siirrostuksen jälkeisten aktiivisuustasojen jälkeiset analyysit kullekin ikäryhmälle osoittavat, että käsittelyllä (BHK-NGF-siirrokset) oli

merkittävä vaikutus 3,3 kuukauden ikäisissä rotissa, $F(2,24) = 4,18$, $p = 0,027$. Käsittelyn päävaikutus ei ollut merkittävä keski-ikäisissä rotissa, $F(2,31) = 1,92$, $p = 0,16$, tai vanhimpien rottien joukossa, $F(2,26) = 2,12$, $p = 0,14$.

Kuumalevy

Kapseloitujen aivokammioon siirrostettujen BHK-NGF-solujen luovuttama NGF-proteiini ei tuntunut vaikuttavan latenttisuuteen vasteille kuumalevyllä. Käsittelyn päävaikutus ei ollut tilastollisesti merkitsevä, $F(1,87) = 0,03$, $p = 0,865$.

Von Frey -karvojen somatosensorikynnykset

Rotat respondoivat nopeammin jäykempiin Von Frey -karvoihin. Nuoremmilla rotilla oli myös taipumus respondoida nopeammin kuin vanhemmilla rotilla. Ulkoinen NGF vaikutti suorituskykyyn vanhemmilla rotilla kevyemmällä stimuluksella, mutta ei nuorempien joukossa. Kuitenkin, vanhimmat rotat, jotka saivat ulkoista NGF-proteiinia, eivät olleet enemmän respondoivia kuin nuoret rotat (kuvio 6).

Morriksen spatiaalisen oppimisen vesilabyrinttitesti

Ennen siirrostusta oleva viitemuistin suorituskyky Morriksen vesilabyrintissä

Ennen siirrostusta havaittu uintimatka laiturille aleni kaikissa ryhmissä 11 vuorokaudessa testin aloituksesta. Vanhempiin rottiin vaikutus oli suurempi kuin nuorempiin rottiin. Kaikissa ikäryhmissä oli melko suuri vaihteluväli suorituskyvyssä. Eläimet jaettiin käsittelyryhmiin sovittaen ne yhteen niiden suorituskyvyn mukaan ennen siirrostusta tehdyssä viitemuistin Morriksen vesilabyrinttitestissä ja käsittelyjen välillä ei ollut mitään merkittäviä eroja ennen siirrostusta.

Siirrostuksen jälkeen oleva viitemuisti Morriksen vesilabyrintissä

Kahden verrokkiryhmän välillä ei ollut mitään eroja mitä tulee niiden suorituskykyyn siirrostuksen jälkeen suoritetussa Morriksen vesilabyrintin viitemuistiversiossa, näin ollen ne kaksi ryhmää, kapseloiduilla ei-transfektoiduilla BHK-soluilla siirrostettu ryhmä ja ryhmä, jolle tehtiin näennäisleikkaus, yhdistettiin yhdeksi verrokkiryhmäksi. Uintimatka ei lyhentynyt niiden matkojen alle, jotka hankittiin ennen siirrostusta.

Kahden eri ikäryhmän välillä oli eroja suorituskyvyssä. Kapseloiduilla BHK-NGF-soluilla ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta suorituskykyyn. Rotat, joiden suorituskyky kuului parempaan 50 % ja huonompaan 50 % ennen siirrostusta tehdyssä viitemuistin Morriksen vesilabyrinttitestissä, olivat merkittävästi erilaisia näissä siirrostuksen jälkeisissä kokeissa.

Siirrostuksen jälkeiset anturikokeet

Kahden verrokkiryhmän välillä ei ollut mitään eroja mitä tulee niiden suorituskykyyn siirrostuksen jälkeen suoritetuissa anturikokeissa Morriksen vesilabyrintissä, näin ollen ryhmä, joka siirrostettiin kapseloiduilla ei-transfektoiduilla BHK-soluilla ja ryhmä, jolle tehtiin näennäisleikkaus, yhdistettiin yhdeksi verrokkiryhmäksi. Nuoremmat rotat ylittivät laiturin kohdan useammin ensimmäisten 30 sekunnin uintiajan sisällä kuin vanhemmat rotat. BHK-NGF-solut eivät tuottaneet tilastollisesti merkitsevää vaikutusta.

Toimintamuisti Morriksen vesilabyrintissä ITI-arvon ollessa 0

Rottia testattiin vuorokausina 26 - 29 leikkauksen jälkeen kolmella yrityksellä vuorokaudessa Morriksen vesilabyrinttitestin toimintamuistiversiossa. Laituri siirrettiin joka päivä umpimähkään valittuun kohtaan tankissa, sisältäen erilaiset etäisyydet tankin seinämästä. Yritys-

ten välillä ei ollut yhtään viivettä (0 ITI). Suorituskyky neljän vuorokauden sisällä laskettiin yritysten yksi, kaksi ja kolme keskiarvona. Mitään eroja ei ollut BHK-ryhmien ja näennäisleikkauksen saaneiden verrokkiryhmien välillä, näin ollen nämä ryhmät yhdistettiin yhdeksi verrokkiryhmäksi. Suorituskyky parani yhdenmukaisesti kaikissa kolmessa kokeessa. Parantumiskuvio yrityksissä oli erilainen vanhemmille rotille kuin nuoremmille rotille. Kapseloitujen BHK-NGF-solujen antamalla NGF-proteiinilla ei ollut tilastollisesti merkitsevää vaikutusta tässä tehtävässä.

Toimintamuisti Morriksen vesilabyrinttitestissä ITI-arvon ollessa kaksi tuntia

Rottia testattiin vuorokausina 30 - 35 leikkauksen jälkeen kolmella yrityksellä vuorokaudessa Morriksen vesilabyrinttitestin toimintamuistiversiossa. Laituri siirrettiin joka päivä umpimähkään valittuun kohtaan tankissa, sisältäen erilaiset etäisyydet tankin seinämästä. Yritysten välillä oli kahden tunnin viive, jona aikana rotat kuivattiin ja lämmitettiin 15 minuuttia infrapunalampun alla, ennen kuin ne palautettiin niiden kotihäkkeihin. Suorituskyky kuuden vuorokauden sisällä laskettiin yritysten yksi, kaksi ja kolme keskiarvona (kuvio 7). Mitään eroja ei ollut BHK-ryhmien ja näennäisleikkauksen saaneiden verrokkiryhmien välillä, näin ollen nämä ryhmät yhdistettiin yhdeksi verrokkiryhmäksi.

Suorituskyky parani yhdenmukaisesti kaikissa kolmessa kokeessa. Nuoremmilla rotilla oli yleensä parempi suorituskyky kuin vanhemmilla.

Kapseloiduilla BHK-NGF-soluilla siirrostettujen rottien, joiden suorituskyky oli ollut huonompi ennen leikkausta, suorituskyky oli parempi kuin verrokkiryhmän huonojen suorittajien (kuvio 7).

Nämä tulokset antavat ehdottaa, että keskushermostoon siirrostetut puoliläpäisevät membraanit, jotka sisältävät geneettisesti modifioituja ksenogeenisiä soluja,

tuottavat jatkuvasti hNGF-proteiinia, joka lievittää ikään liittyviä havaintopuutoksia ei-immunosuppressoiduissa rotissa, ja että sekä leikkauksella tapahtuva siirrostusmenetelmä että pitkäaikainen altistus hNGF-proteiinin matalille annoksille tuntuvat olevan turvallisia.

Esimerkki 9

Kapseloitujen BHK-NGF-solujen siirrostus ikääntyneisiin apinoihin, joiden fornix-alue on vaurioitunut

Esillä oleva tutkimus osoittaa, että sellaisten polymeerikapseloitujen solujen siirrokset, jotka on geneettisesti modifioitu erittämään ihmisen NGF-proteiinia (hNGF), voivat estää sellaisten CBF-neuronien, joiden viejähaarakkeet on katkaistu, degeneraation ikääntyneillä apinoilla, ja että nämä siirrokset indusoivat kolinergisten kuitujen kasvamisen proksimaalisesti siirroksista.

Tässä tutkimuksessa käytettiin kuutta naaraspuolista reesusapinaa (Macaca mullata), joiden iät olivat 24 - 29 vuotta (vastaa noin 75 - 87 vuoden ikää ihmisellä). Kaikille apinoille tehtiin toispuoleiset vauriot vasempaan fornix-alueeseen. Apinat nukutettiin isofluraanilla (1,5 - 2,0 %). Kun oli esikäsitelty mannitolilla (0,25 g/kg, i.v.), suoritettiin vasemman fornix-alueen toispuoleiset läpileikkaukset [J.H. Kordower, M.S. Fiandaca, J. Comp. Neurol., 298, 443 (1990)]. Leikkausporaa käytettiin muodostamaan keskitason suuntainen luusiirros (koko = 1,5 cm x 4,0 cm), joka paljasti otsan ylemmän nuolipoukaman. Kovakalvo vedettiin sisään ja itsestään lukittuvaa haavanlevitintä käytettiin aivopuoliskojen välisen uurteen paljastamiseksi. Aivokurkiaiseen tehtiin pitkittäinen viilto. Hännänpuoleisen Monron aukon tasolla fornix-alue on helppo nähdä erillisenä 2 - 3 mm levyisenä valkoisena kuitukimppuna. Aluksi fornix-alue läpileikattiin käyttäen palloleikkuria. Sitten fornix-alueen katkaistut päät imettiin vaurion täydellisyyden varmistamiseksi.

Heti sen jälkeen kullekin apinalle annettiin vasempaan aivokammioon XP-11-polymeerikapselien siirrokset, jotka sisälsivät poikashamsterin munuaisfibroblasteja (BHK), jotka oli (n = 3) tai ei oltu (n = 3) geneettisesti modifioitu erittämään hNGF-proteiinia (kuten on kuvattu esimerkissä 1). Yksittäiset BHK-soluja sisältävät XP-11-kapselit sijoitettiin käsin hienoilla pinseteillä häntätumakkeen ja väliseinätumakkeen päiden väliin. Yhteensä viisi laitetta siirrostettiin kuhunkin eläimeen niin, että ne asetettiin riviin pää-häntäsuuntaisesti. Kapselit nojautuivat häntätumakkeeseen ja väliseinään, jäivät pystysuoraan asentoon eivätkä vaatineet lisäkiinnitystä. Kovakalvo asetettiin takaisin, luusiirros ommeltiin takaisin paikoilleen ja galea ja iho ommeltiin käyttäen rutiinimenetelmiä.

Kaikki apinat lopetettiin 3 - 4 viikkoa siirrostuksen jälkeen ja ne prosessoitiin asetyylikoliiniesteraasin histokemiallista tarkastelua varten [AChE; Hedreen et al., Cytochem., 33, 134 (1985)] ja koliiniasetyylitransferaasin (ChAT), matala-affiinisen NGF-reseptorin (p75 NGFr), dopamiini-ß-hydroksylaasin (DßH) ja ß-amyloidin immunohistokemiallista tarkastelua varten. Eläimet sijoitettiin stereotaksiseen rakenteeseen, aiemmin tehty luusiirros poistettiin, isoaivopuolisko vedettiin sisään ja BHK-soluilla ladatut kapselit poistettiin. Välittömästi kapselien poiston jälkeen eläimet perfusoitiin mahansuun kautta fosfaatilla puskuroidulla suolaliuoksella (pH = 7,4), jota seurasi fiksaatio 3,5 litralla 4 % Zambonin fiksatiivia. Jäädytetyt leikkeet (40 µm) leikattiin liukuveitsimikrotomilla. Joka kolmas leike väliseinä/diagonaalireunakompleksista prosessoitiin immunosytokemiallisesti ChAT-proteiinin suhteen (1:7 500; Chemicon), p75 NGF-reseptorin suhteen (1:80 000; tohtori Mark Bothwell) tai A4-molekyylin suhteen (1:10 000; tohtori Dennis Selkoe) käyttäen aiemmin kuvattuja menetelmiä [esim. J.H. Kordower ja Fiandaca, yllä;

Kordower et al., J. Comp. Neurol., 277, 465 (1988)]. Sisäpuolisen väliseinän kolinergisten neuronien laskennat suoritettiin käsin. Sisäpuolisessa väliseinässä olevien ChAT- ja p75 NGFr-ir-neuronien määrä kvantitoitiin molemminpuoleisesti vähintään viidestä leikkeestä yhteensopivasta tasosta kustakin eläimestä. Kolinergisten neuronien määrää verrattiin ryhmien välillä käyttäen kaksijakoista T-testiä.

Alkaen toimenpiteen jälkeen ja jatkaen koko kokeen ajan apinat, joille annettiin NGF-proteiinia erittäviä siirroksia, tuntuivat olevan horroksisia verrattuna verrokilla siirrostettuihin apinoihin. Kullakin apinalla oli useita ß-amyloidin kanssa immunoreaktiivisia plakkien kaltaisia rakenteita amygdalan ja aivoturson ohimo- ja päälakikuoren uusimmassa osassa. NGF-annolla ei ollut mitään vaikutusta amyloidiplakkien määrään tai jakaantumiseen verrattuna verrokkieläimiin (tuloksia ei esitetty). Nissl- ja AChE-värjätyt leikkeet vauriokohdasta paljastivat, että vasen fornix-alue oli läpileikkautunut kaikissa eläimissä hännänpuoleisen Monron aukon tasolla johtaen AChE-proteiinia sisältävien kuitujen laajaan vähenemiseen samanpuoleisessa aivotursossa verrattuna koskemattomaan vastakkaiseen puoleen.

Apinoilla, jotka saivat BHK-verrokkisiirrokset, oli merkittävä aleneminen ChAT- (57 - 75 %) ja p75 NGFr-ir-neuroneiden (52 - 53 %) tasossa samalla puolella sisäpuolista väliseinää kuin siirros (kuvio 8). Monet jäljelle jääneet väliseinän neuronit tuntuivat atrooppisilta verrattuna väliseinän ChAT- ja p75 NGFr-ir-neuroneihin vastakkaisella puolella. Vaurion indusoima väliseinän neuroneiden degeneraatio lieventyi merkittävästi apinoissa, jotka saivat polymeerikapseloitujen BHK-hNGF-solujen siirrokset, koska näissä apinoissa oli ainoastaan 0 - 36 % aleneminen ChAT- ($p < 0,001$) ja 7 - 23 % aleneminen p75 NGFr-ir-neuroneissa ($p < 0,001$) sisäpuolisessa väliseinäs-

sä samalla puolella kuin vaurio verrattuna vastakkaiseen puoleen (kuvio 8).

Sen lisäksi, että pitivät yllä väliseinän neuroneiden kolinergisen fenotyypin elinkykyä ja jatkuvaa ekspressiota, BHK-hNGF-siirrokset indusoivat samanpuoleisen väliseinän kolinergisten kuitujen vahvan kasvun. Kaikilla apinoilla, jotka saivat BHK-hNGF-siirrokset, oli havaittavissa p75-NGFr-ir-kuitujen punoksia väliseinän sivulla proksimaalisesti siirroksista. Nämä kuidut haaroittuivat aivokammion ependyymin pintaan vastaan. Tälle päinvastaisesti yhdelläkään BHK-verrokilla siirrostetulla apinalla ei ollut kolinergisiä neuroneita kasvattavaa vastetta. Nämä kuidut olivat myös ChAT-ir- ja AChE-positiivisia, joka varmisti tämän kasvuvasteen kolinergisen fenotyypin. Yhdessä tapauksessa BHK-hNGF-kapseli tunkeutui aivokammioon vatsanpuoleisesti sijaiten etuaivon pohjan suunpuoleisessa peruskudoksessa. p75 NGFr-ir-kuitujen rajoittunut punos havaittiin proksimaalisesti tästä siirrostuskohdasta. Samalla, kun muutamat kuidut, jotka olivat peräisin väliseinän takaosasta ja diagonaalikimpun pystysuoran reunan taka-sivunpuoleisesta osasta, tuntuivat ottavan osaa tähän kuitupunokseen, niiden solujen tarkka alkuperä, jotka saivat aikaan tämän kuitupunoksen, jää selvitettäväksi. Se, mikä on selvää on, että nämä kuidut eivät olleet peräisin sympaattisesta hermosysteemistä, koska ne olivat ohuita suonikohjuisia eivätkä reagoineet immunologisesti DBH-proteiinin kanssa. Mielenkiintoista on, että satunnaisia p75 NGFr-ir-neuroneita havaittiin kuitupunoksessa, mutta näitä soluja oli liian vähän, jotta ne olisivat merkittävästi ottaneet osaa tähän kuitusysteemiin.

Ennen siirrostusta ELISA-analyysi osoitti, että BHK-hNGF-siirrostetut apinat saivat kapselit, jotka tuottivat yhteensä 44,65 ± 0,95 ng NGF-proteiinia/24 tuntia/eläin. Juuri ennen lopetusta olevana talteenottoajankohtana kapseleissa havaittiin useita Nissl-värjäytyneitä BHK-

soluja, jotka nyt tuottivat hNGF-proteiinia nopeudella 9,6 ng/24 tuntia/eläin. Näistä kapseleista saatu alusta, sen jälkeen, kun niitä oli pidetty yksi kuukausi ikääntyneissä apinoissa, indusoi vahvan PC12A-solujen erilaistumisen in vitro, joka osoitti, että tämä NGF-tuottotaso oli biologisesti relevantti.

Tämä tutkimus on ensimmäinen osoitus, että NGF voi aiheuttaa troofisia ja trooppisia vaikutuksia degeneroituviin kolinergisiin etuaivon pohjan (CBF) neuroneihin ikääntyneen kädellisen aivoissa. Tässä havaitut troofiset ja trooppiset vaikutukset voivat johtua siirroksesta peräisin olevasta hNGF-proteiinista melkoisella varmuudella, koska kahden apinaryhmän, jotka saivat BHK-hNGF- ja BHK-verrokkisiirrokset, vastaavasti, käsittelystrategiat erosivat ainoastaan yhden geenin suhteen, joka koodittaa hNGF-proteiinin synteesiä. Kun hermosyyn viejähaarake katkaistiin, jatkuva CBF-neuroneiden degeneraatio havaittiin verrokilla siirrostetuilla apinoilla. Tälle päinvastaisesti, sellaisten polymeerikapselien, jotka sisälsivät BHK-soluja, jotka oli geneettisesti modifioitu erittämään hNGF-proteiinia, siirrostaminen esti vahingoittuneiden kolinergisten sisäpuoleisen väliseinän neuroneiden degeneraation.

CBF-neuronit ovat ainoita soluja aivoissa, joiden on osoitettu ekspressoivan sekä matala-affiinista p75 NGF-reseptoria että korkea-affiinista trk A -reseptoria [Steininger et al., Brain res., 612, 330 (1993)]. Mielenkiintoista on, että esillä oleva tutkimus paljasti myös osittaisen erilaisuuden näiden kahden kolinergisen merkkigeenin ekspressiossa vasteena hermosyyn viejähaarakkeiden katkaisulle ikääntyneissä eläimissä niin, että ChAT-proteiinin ekspressio oli herkempi kuin p75 NGFr-proteiinin ekspressio vaurion vaikutuksille. Koska ChAT- ja p75 NGFr-proteiinien ekspressio on tavallisesti erittäin yhdenmukainen, tämä antaa ehdottaa, että apinoiden välisei-

nän neuronit ovat vielä elinkykyisiä hermosyyn viejähaarakkeiden katkaisun jälkeen, mutta ne eivät ekspressoi kolinergisiä merkkigeenejä tunnistettavalla tasolla.

Lisäksi, hNGF-proteiinia erittävät kapselisiirrokset indusoivat vahvan kolinergisten kuitujen kasvun proksimaalisesti siirroksesta. Tärkeätä on, että hNGF-proteiinia erittävien siirrosten sekä troofiset että trooppiset vaikutukset havaittiin 29-vuotiaalla apinalla. Nämä tulokset antavat ehdottaa, että CBF-neuronit ikääntyneellä kädellisellä respondoivat hNGF-proteiiniin koko elinikänsä.

Nämä tulokset antavat myös ehdottaa, että suhteellisen alhaiset tasot (ng/vuorokausi) hNGF-proteiinia voivat olla riittäviä pitämään yllä degeneroituvia etuaivon pohjan neuroneita.

Esillä oleva tutkimus osoittaa sellaisten kapseloitujen solujen, jotka on geneettisesti modifioitu erittämään hNGF-proteiinia, siirrostamisen soveltuvuuden ikääntyneiden kädellisten aivoihin. Tämä kapselointimenetelmä sallii ksenograftien käytön ilman, että tarvitsee käyttää mahdollisesti myrkyllisiä käsittelyitä, joissa käytetään lääkkeitä, jotka suppressoivat immuunisysteemiä. Kapseloituja soluja siedettiin hyvin esillä olevassa tutkimuksessa ja ainoastaan minimaalista astrosytoosia havaittiin proksimaalisesti siirroksista. BHK-solut säilyivät elinkykyisinä kapseleissa ja tuottivat tunnistettavat ja biologiset tasot hNGF-proteiinia koko kokeen ajan.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä biologisesti aktiivisen molekyylin luovuttamiseksi nisäkäsisäntään, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vaiheen, jossa isäntään siirrostetaan biologisesti yhteensopiva kapseli, joka sisältää yhden tai useamman solun, joka tai jotka on transfektoitu yhdistelmä-DNA-molekyylillä, joka sisältää DNA-sekvenssin, joka koodittaa biologisesti aktiivista molekyyliä, toiminnallisesti liitettynä promoottoriin, joka ei ole altis aktiivisuuden vähenemiselle siirrostettaessa isäntään niin, että saadaan aikaan biologisesti aktiivisen molekyylin pitkäaikainen stabiili ekspressio.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että solu tai solut ovat ksenogeenisiä isännälle.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kapseli siirrostetaan nisäkäsisännän keskushermostosysteemiin.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että biologisesti aktiivinen molekyyli on neurotrofinen tekijä.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että neurotrofinen tekijä on hermokasvutekijä (NGF).

6. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että promoottori valitaan ryhmästä, joka sisältää PNMT-promoottorin, DBH-promoottorin, GFAP-promoottorin, TH-promoottorin, NF-L-promoottorin, NSE-promoottorin, P_o-promoottorin, MBP-promoottorin ja hiiren metallotioneiini-1-promoottorin.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että yhdistelmä-DNA-molekyyli on pNUT-ekspressiovektori.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että solut ovat BHK-soluja.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että nisäkäsisäntä on kädellinen.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että solu tai solut transfektoidaan lisäksi toisella yhdistelmä-DNA-molekyylillä, joka sisältää toisen DNA-sekvenssin, joka koodittaa toista biologisesti aktiivista molekyyliä, toiminnallisesti liitettynä promoottoriin, joka ei ole altis aktiivisuuden vähenemiselle siirrostettaessa isäntään niin, että saadaan aikaan toisen biologisesti aktiivisen molekyylin pitkäaikainen stabiili ekspressio.

11. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kapseli sisältää lisäksi toisen solun tai toiset solut, jotka on transfektoitu toisella yhdistelmä-DNA-molekyylillä, joka sisältää toisen DNA-sekvenssin, joka koodittaa toista biologisesti aktiivista molekyyliä, toiminnallisesti liitettynä promoottoriin, joka ei ole altis aktiivisuuden vähenemiselle siirrostettaessa isäntään niin, että toinen biologisesti aktiivinen molekyyli ekspressoituu myös stabiilisti.

12. Menetelmä biologisesti aktiivisen molekyylin pitkäaikaiseksi stabiiliksi ekspressoimiseksi kapseloidussa solussa, joka on siirrostettu in vivo nisäkäsisäntään, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vaiheen, jossa isäntään siirrostetaan biologisesti yhteensopiva immuunisysteemiltä eristävä kapseli, joka sisältää yhden tai useamman solun, joka tai jotka on transfektoitu yhdistelmä-DNA-molekyylillä, joka sisältää DNA-sekvenssin, joka koodittaa biologisesti aktiivista molekyyliä, toiminnallisesti liitettynä promoottoriin, joka ei ole altis aktiivisuuden vähenemiselle siirrostettaessa isäntään.

13. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että solu on ksenogeeninen solu.

14. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kapseli siirrostetaan nisäkäsisännän keskushermostosysteemiin.

15. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että biologisesti aktiivinen molekyyli valitaan ryhmästä, joka sisältää NGF-, BDNF-, NT-3-, NT-4/5-, CNTF-, GDNF-, CDF/LIF-, EGF-, IGF-, PDGF-, bFGF-, aFGF-, neurotensiini-, substance P, hemoglobiini-, tyrosiinihydroksylaasi-, prohormonikonvertaasi-, bcl-2-, dopadekarboksylaasi- ja dopamiini-beeta-hydroksylaasiproteiinit.

16. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että promoottori valitaan ryhmästä, joka sisältää PNMT-promoottorin, DBH-promoottorin, GFAP-promoottorin, TH-promoottorin, NF-L-promoottorin, NSE-promoottorin, P_o-promoottorin, MBP-promoottorin ja hiiren metallotioneiini-1-promoottorin.

17. Patenttivaatimuksen 12 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että nisäkäsisäntä on kädellinen.

18. Siirrostettavissa oleva biologisesti yhteensopiva immuunisysteemiltä eristävä kapseli, joka antaa biologisesti aktiivisen molekyylin pitkäaikaisen stabiilin ekspression siirrostettaessa kapseli in vivo nisäkäsisäntään, t u n n e t t u siitä, että kapseli sisältää:

(a) ytimen, joka sisältää yhden tai useamman solun hajaannutettuna biologisesti yhteensopivaan matriksiin, solun tai solujen ollessa transfektoitu yhdistelmä-DNA-molekyylillä, joka sisältää DNA-sekvenssin, joka koodittaa biologisesti aktiivista molekyyliä, toiminnallisesti liitettynä promoottoriin, joka ei ole altis aktiivisuuden vähenemiselle siirrostettaessa isäntään; ja

(b) ydintä ympäröivän ulkoisen diffuusiopintavaipan, jossa vaipan molekyylipainon cut-off-arvo on niiden aineiden molekyylipainoa pienempi, jotka ovat keskeisiä

solujen immunologisessa hyljinnässä, mutta joka sallii aineiden läpikulun nisäkäsisännän ja ytimen välillä.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen kapseli, t u n n e t t u siitä, että solu tai solut ovat ksenogeenisiä isännälle.

20. Patenttivaatimuksen 18 mukainen kapseli, t u n n e t t u siitä, että kapseli siirrostetaan nisäkäsisännän keskushermostosysteemiin.

21. Patenttivaatimuksen 18 mukainen kapseli, t u n n e t t u siitä, että biologisesti aktiivinen molekyyli on NGF-, BDNF-, NT-3-, NT-4/5-, CNTF-, GDNF-, CDF/LIF-, EGF-, IGF-, PDGF-, bFGF-, aFGF-, neurotensiini-, substance P, hemoglobiini-, tyrosiinihydroksylaasi-, prohormonikonvertaasi-, bcl-2-, dopadekarboksylaasi- ja dopamiini-beeta-hydroksylaasiproteiini.

22. Patenttivaatimuksen 18 mukainen kapseli, t u n n e t t u siitä, että promoottori valitaan ryhmästä, joka sisältää PNMT-promoottorin, DBH-promoottorin, GFAP-promoottorin, TH-promoottorin, NF-L-promoottorin, NSE-promoottorin, P_o-promoottorin, MBP-promoottorin ja hiiren metallotioneiini-1-promoottorin.

23. Patenttivaatimuksen 18 mukainen kapseli, t u n n e t t u siitä, että nisäkäsisäntä on kädellinen.

24. Puoliläpäisevästä membraanista muodostettu kapseli, t u n n e t t u siitä, että se sisältää sisäseinäpinnan, joka on selektiivisesti läpäisevä, ei-selektiivisesti läpäisevän ulkoseinäpinnan ja juosteisen seinän niiden välissä niin, että ulkoseinäpinta sisältää makrohuokosia niiden muodostaessa noin 2,0 - 20 % ulkoseinäpinnan kokonaispinta-alasta ja niiden ollessa halkaisijaltaan noin 5 - 15 µm.

25. Patenttivaatimuksen 24 mukainen kapseli, t u n n e t t u siitä, että kapseli muotoillaan sylinterimäisen onttokuidun muotoon.

26. Patenttivaatimuksen 24 mukainen kapseli, t u n n e t t u siitä, että kapseli muotoillaan litteän levyn muotoon.

27. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 24 - 26 mukainen membraani, t u n n e t t u siitä, että makrohuokoset muodostavat noin 2,5 % ulkoseinäpinnan kokonaispinta-alasta.

28. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 24 - 26 mukainen membraani, t u n n e t t u siitä, että makrohuokoset muodostavat noin 10 % ulkoseinäpinnan kokonaispinta-alasta.

29. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 24 - 26 mukainen membraani, t u n n e t t u siitä, että makrohuokoset muodostavat noin 12 % ulkoseinäpinnasta.

30. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kapseli on minkä tahansa patenttivaatimuksen 24 - 29 mukainen kapseli.

31. Menetelmä nisäkkään neuronien degeneraation hoitamiseksi, t u n n e t t u siitä, että se sisältää vaiheen, jossa nisäkkääseen siirrostetaan biologisesti yhteensopiva kapseli, joka sisältää yhden tai useamman solun, mainittujen solujen tuottaessa kasvutekijää tai troofista tekijää niin, että kapseli kykenee luovuttamaan nisäkkäälle 1 - 1 500 ng kasvu- tai troofista tekijää/vuorokausi.

32. Patenttivaatimuksen 31 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kasvutekijä on ihmisen hermokasvutekijä.

33. Patenttivaatimuksen 32 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että nisäkäs on ihminen.

34. Patenttivaatimuksen 33 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että biologisesti yhteensopiva kapseli kykenee luovuttamaan ihmiselle 10 - 600 ng NGF-proteiinia/vuorokausi aivokammion sisäisesti.

35. Patenttivaatimuksen 33 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että biologisesti yhteensopiva kapseli kykenee luovuttamaan ihmiselle 10 - 150 ng NGF-proteiinia/vuorokausi peruskudoksen sisäisesti.

36. Biologisesti yhteensopiva kapseli, joka antaa kasvutekijän tai troofisen tekijän pitkäaikaisen stabiilin ekspression siirrostettaessa nisäkkään keskushermostoon, t u n n e t t u siitä, että kapseli sisältää yhden tai useamman solun niiden ollessa transfektoitu yhdistelmä-DNA-molekyylillä, joka sisältää DNA-sekvenssin, joka koodittaa kasvutekijää tai troofista tekijää, toiminnallisesti liitettynä promoottoriin, joka ei ole altis aktiivisuuden vähenemiselle siirrostettaessa ihmiseen niin, että kapseli kykenee luovuttamaan nisäkkäälle 1 - 1 500 ng kasvutekijää tai troofista tekijää/vuorokausi.

37. Patenttivaatimuksen 36 mukainen kapseli, t u n n e t t u siitä, että kasvutekijä on hermokasvutekijä.

38. Patenttivaatimuksen 37 mukainen kapseli, t u n n e t t u siitä, että nisäkäs on ihminen.

39. Patenttivaatimuksen 38 mukainen kapseli, t u n n e t t u siitä, että kapseli kykenee luovuttamaan ihmiselle 10 - 600 ng NGF-proteiinia/vuorokausi, kun on siirrostettu aivokammion sisälle.

40. Patenttivaatimuksen 38 mukainen kapseli, t u n n e t t u siitä, että kapseli kykenee luovuttamaan ihmiselle 10 - 150 ng NGF-proteiinia/vuorokausi, kun on siirrostettu peruskudokseen.

41. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 33 - 35 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ihminen kärsii ikään liittyvistä havaintopuutoksista.

42. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 38 - 40 mukainen kapseli, t u n n e t t u siitä, että ihminen kärsii ikään liittyvistä havaintopuutoksista.

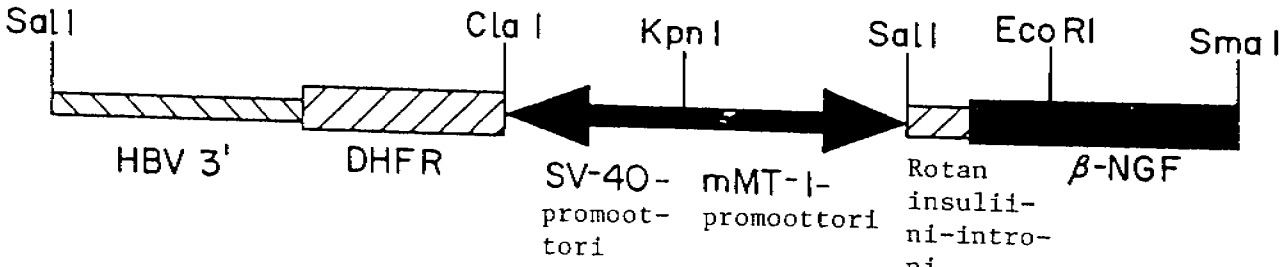
Sal I
Cla I
Kpn I
Sal I
EcoRI
Sma I
HBV 3'
DHFR
SV-40-promoottori
mMT-I-promoottori
Rotan insulii-ni-intro-ni
β-NGF

FIG. 1

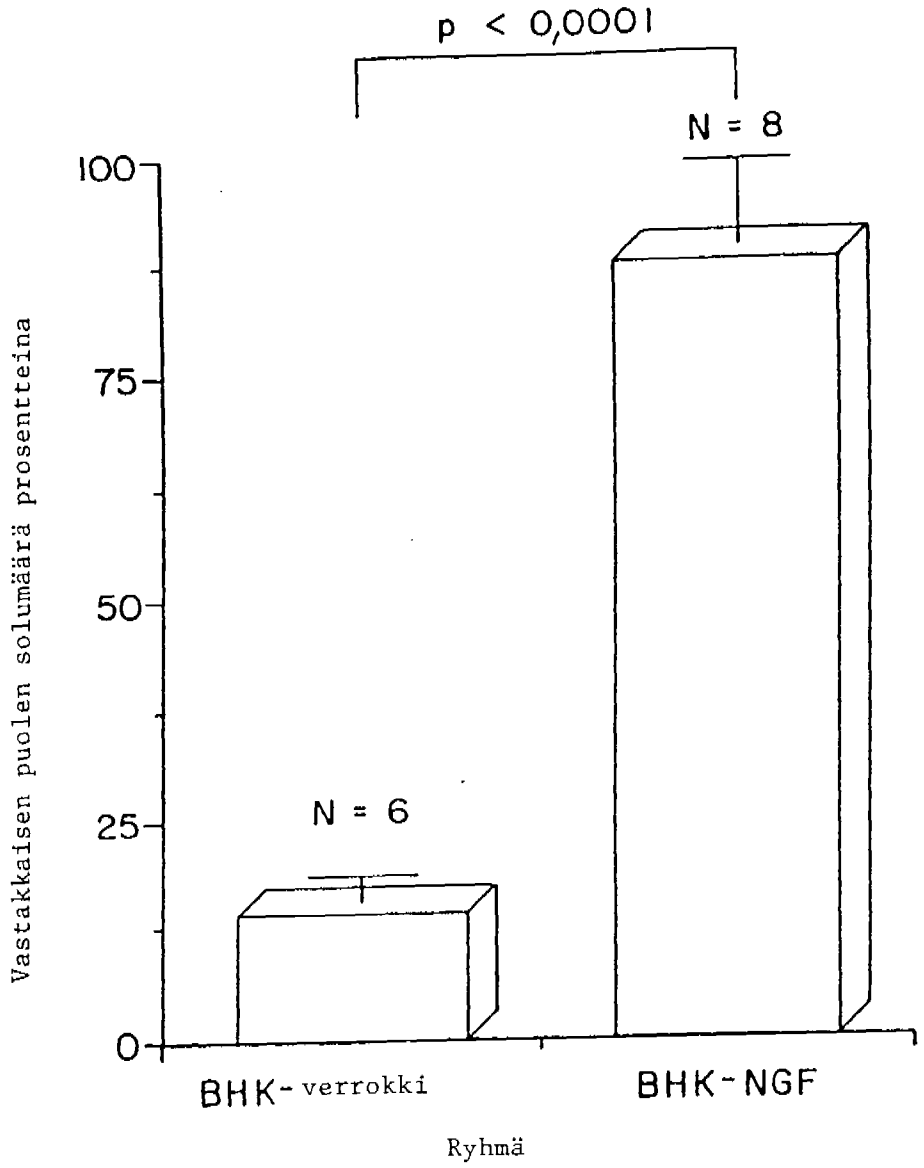
p < 0,0001
N = 8
N = 6
100
75
50
25
0
Vastakkaisen puolen solumäärä prosentteina
BHK-verrokki
BHK-NGF
Ryhmä

FIG. 2

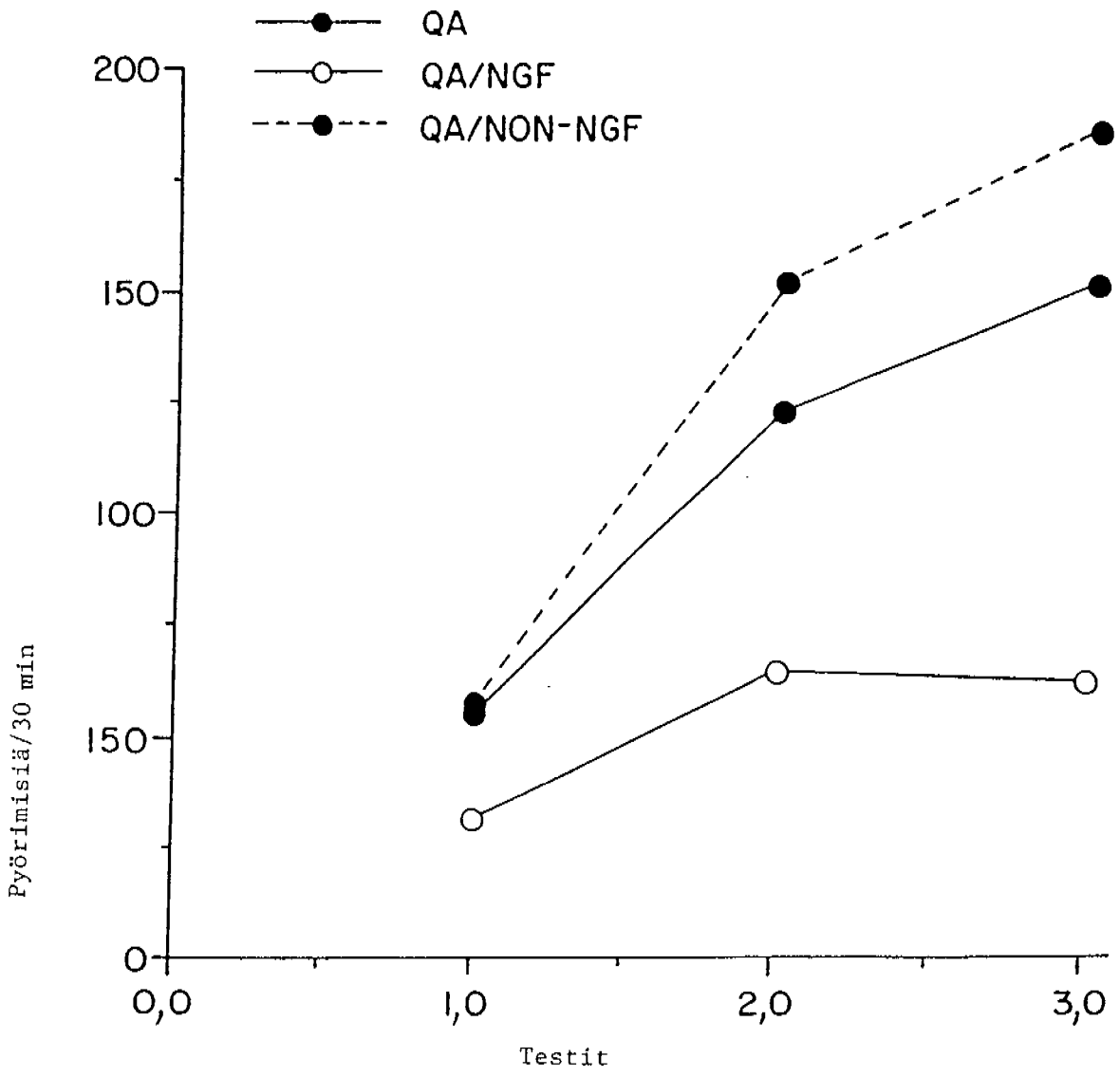
QA
QA/NGF
QA/NON-NGF
200
150
100
150
0
0,0
1,0
2,0
3,0
Pyörimisiä/30 min
Testit

FIG. 3

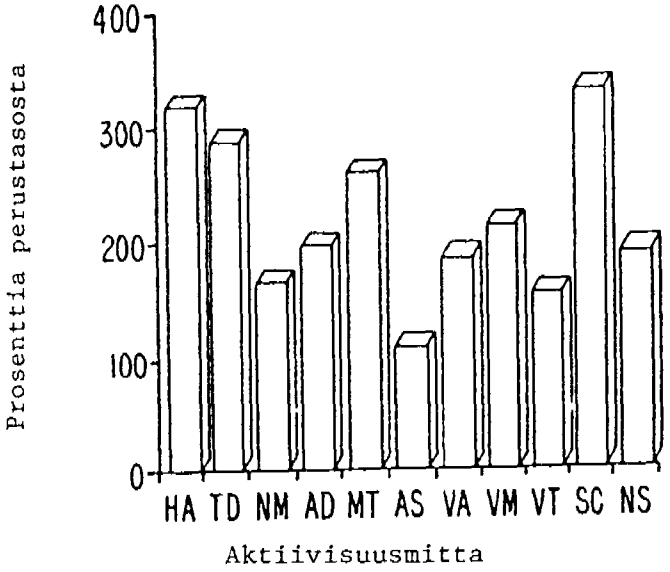

FIG. 4A

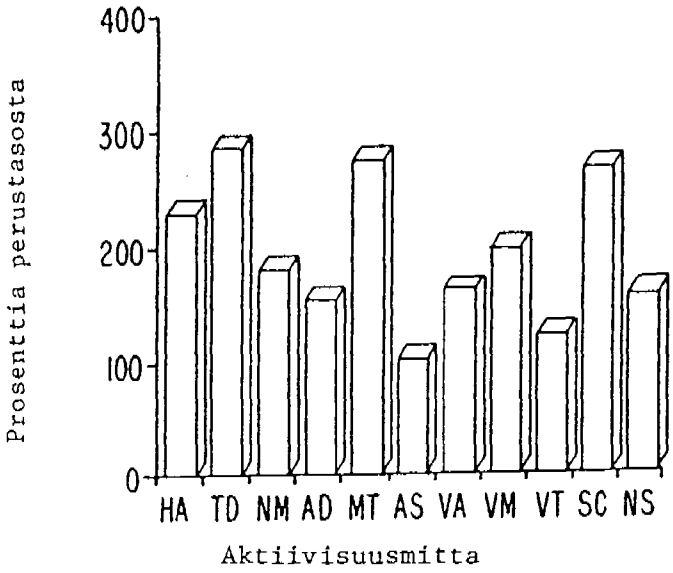

FIG. 4B

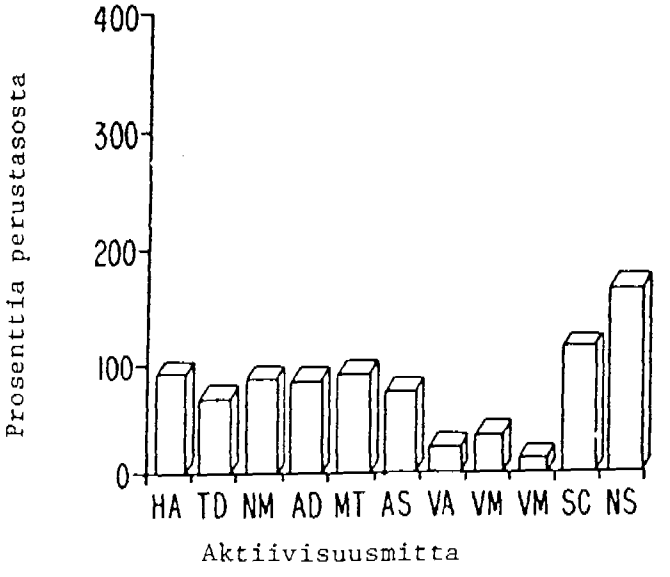

FIG. 4C

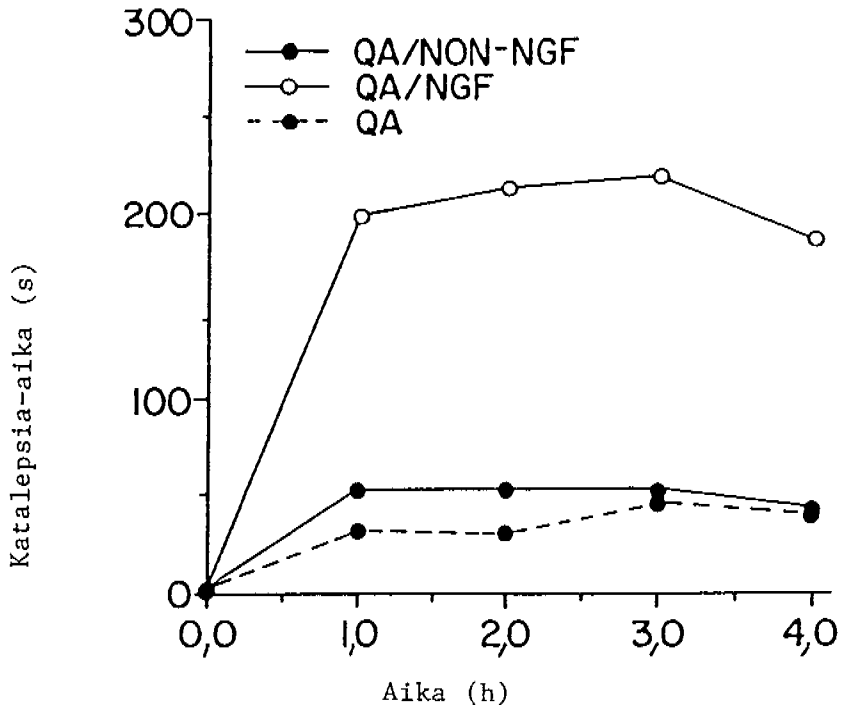
300
200
100
0
QA/NON-NGF
QA/NGF
QA
Katalepsia-aika (s)
0,0
1,0
2,0
3,0
4,0
Aika (h)

FIG. 5A

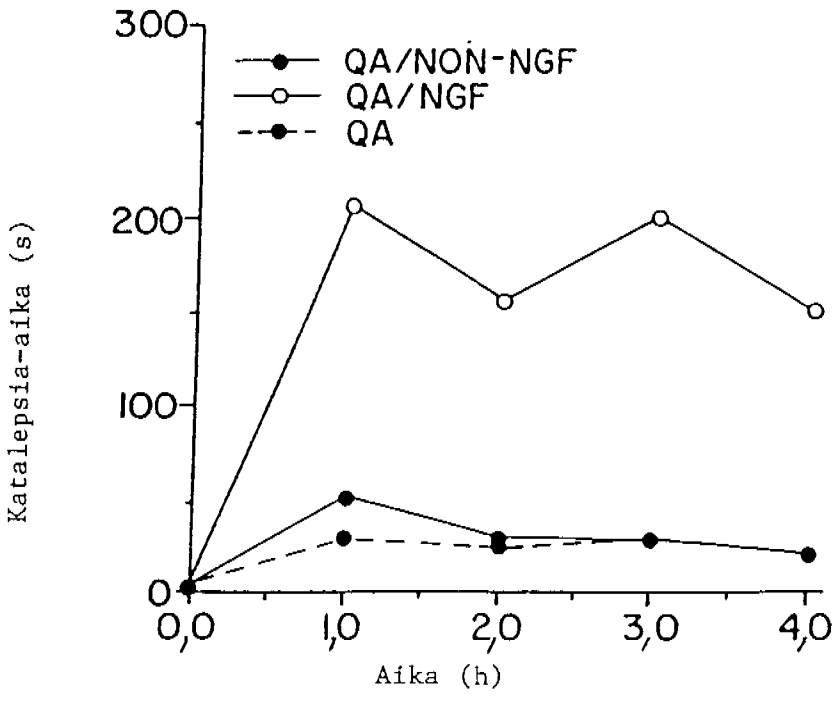
300
200
100
0
QA/NON-NGF
QA/NGF
QA
Katalepsia-aika (s)
0,0
1,0
2,0
3,0
4,0
Aika (h)

FIG. 5B

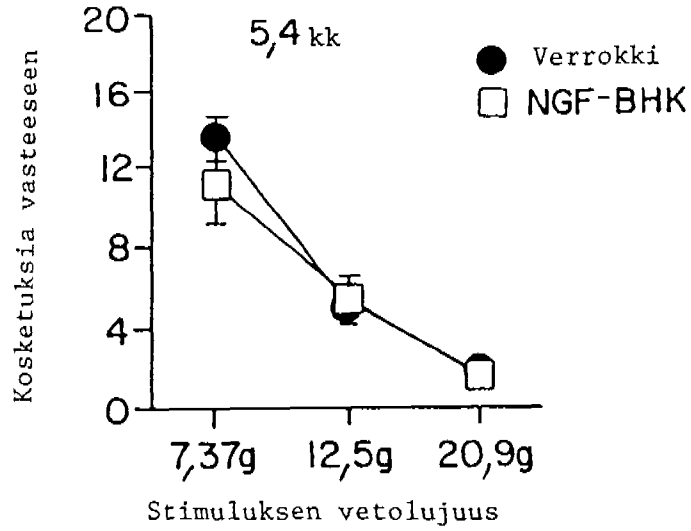

FIG. 6A

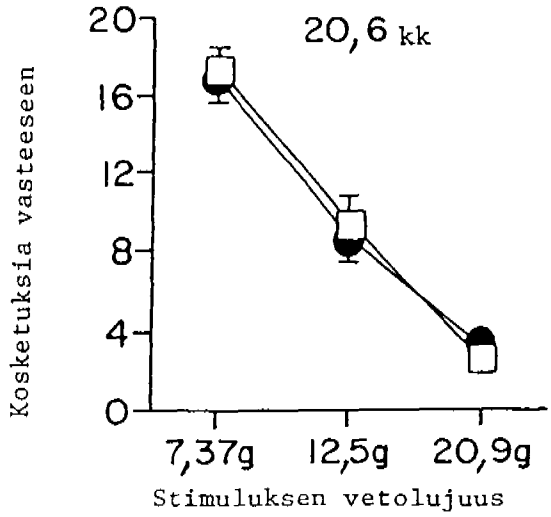

FIG. 6B

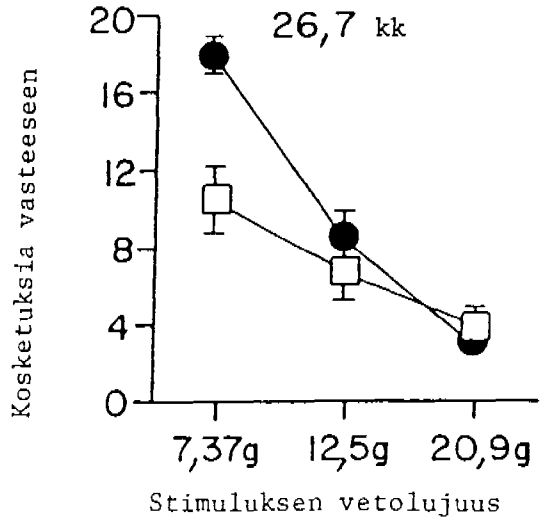

FIG. 6C

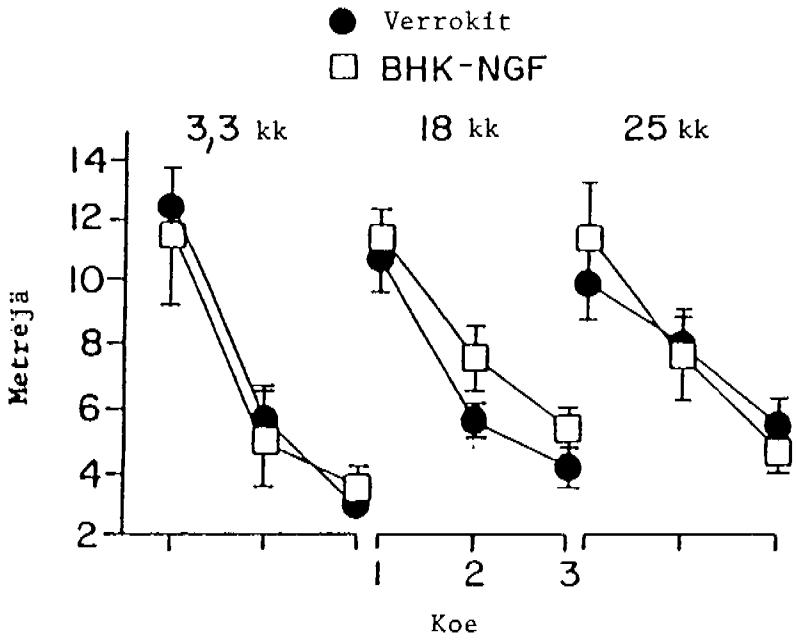
Verrokit
BHK-NGF
3,3 kk
18 kk
25 kk
Metrejä
14
12
10
8
6
4
2
1
2
3
Koe

FIG. 7A

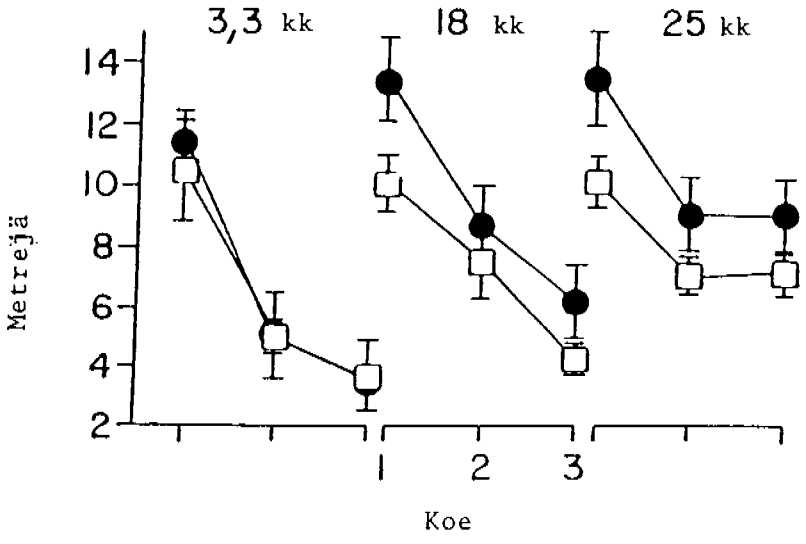
3,3 kk
18 kk
25 kk
Metrejä
14
12
10
8
6
4
2
1
2
3
Koe

FIG. 7B

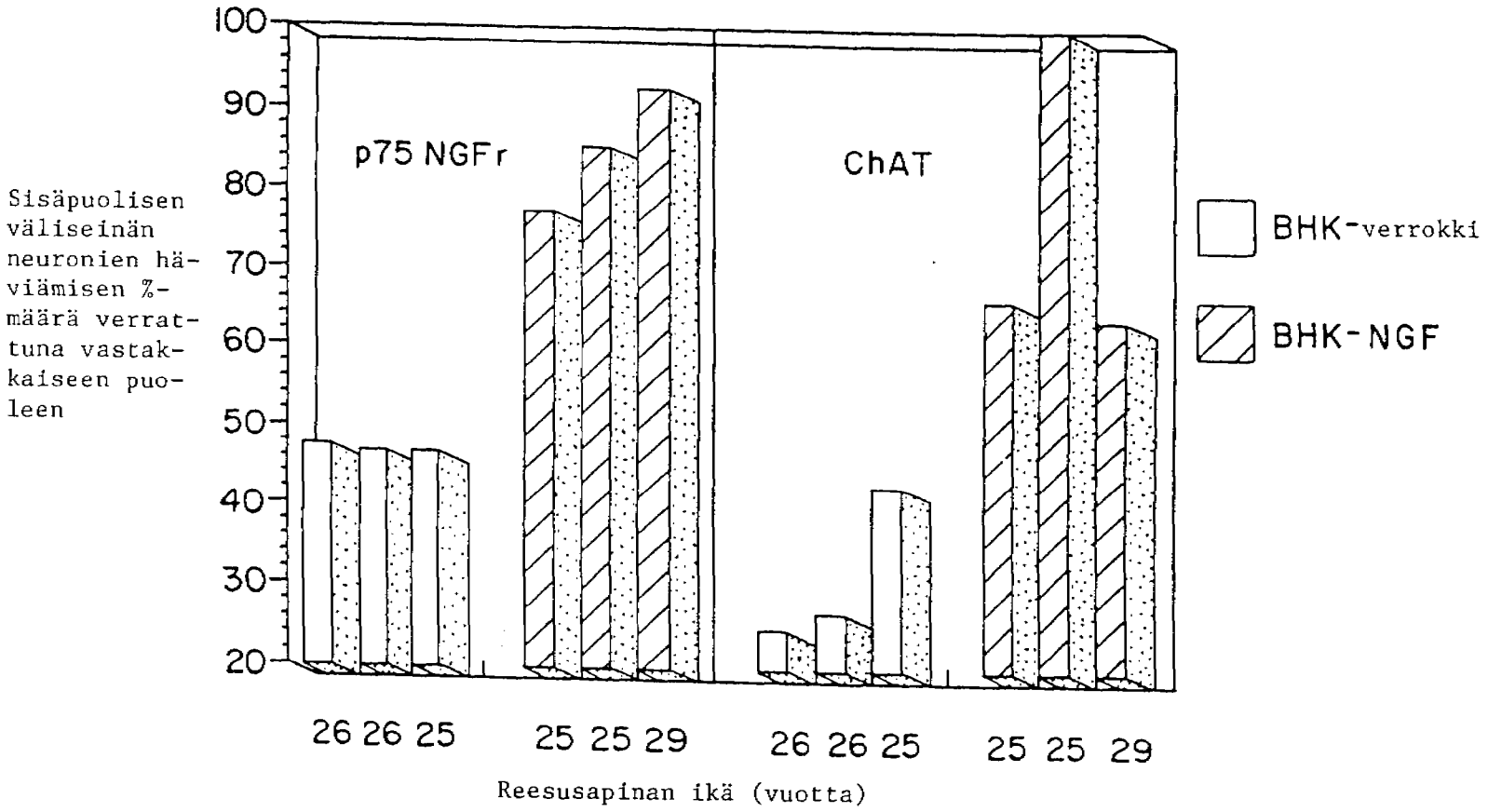
Sisäpuolisen väliseinän neuronien häviämisen %-määrä verrattuna vastakkaiseen puoleen
100
90
80
70
60
50
40
30
20
p75 NGFr
ChAT
BHK-verrokki
BHK-NGF
26 26 25
25 25 29
26 26 25
25 25 29
Reesusapinan ikä (vuotta)

FIG. 8