NORGE
(19) [NO]

STYRET FOR DET
INDUSTRIELLE RETTSVERN

[B] (12) UTLEGNINGSSKRIFT (11) Nr. 163060

(51) Int. Cl.[4] C 12 N 5/00, 11/04,
C 07 K 15/06, 15/26,
C 12 P 21/00

(21) Patentsøknad nr. 820794
(22) Inngivelsesdag 11.03.82
(24) Løpedag 11.03.82
(62) Avdelt/utskilt fra søknad nr.

(86) Internasjonal søknad nr. -
(86) Internasjonal inngivelsesdag -
(85) Videreføringsdag -
(41) Alment tilgjengelig fra 14.09.82
(44) Utlegningsdag 18.12.89

(71)(73) Søker/Patenthaver DAMON BIOTECH, INC.,
119 Fourth Avenue,
Needham Heights, MA 02194,
US.

(72) Oppfinner FRANKLIN LIM, Richmond, VA,
US.

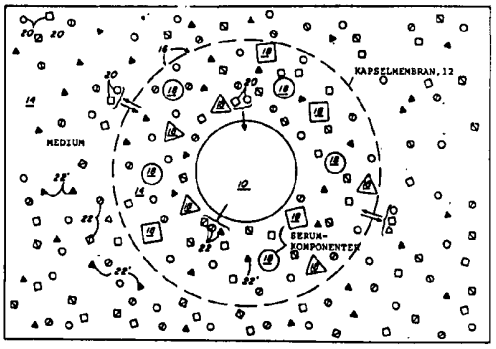
(74) Fullmektig Siv.ing. Sigrun E. Græsbøll,
Bryn & Aarflot A/S, Oslo.

(30) Prioritet begjært 13.03.81, US, nr. 243583.

(54) Oppfinnelsens benevnelse **FREMGANGSMÅTE FOR FREMSTILLING AV SUBSTANSER SOM DANNES AV LEVENDE CELLER SOM PRODUSERER INTERFERONER ELLER ANTISTOFFER.**

(57) Sammendrag

Et system og en fremgangsmåte for produksjon av substanser produsert i celler, f.eks. antistoffer og biologiske respons-modifikatorer. Celler som produserer substansen av interesse, innkapsles i semipermeable membraner som har en øvre permeabilitetsgrense som er tilstrekkelig til å tillate gjennomgang av ioner, aminosyrer og andre cellenæringsstoffer, og suspenderes deretter i et dyrkningsmedium. Serumkomponenter eller andre materialer med høy molekylvekt som trenges for fortsatt levedyktighet og normal in vitro-metabolisme hos visse typer av celler, kan inkluderes innen det intrakapsulære volum og kan utelukkes fra det ekstrakapsulære medium ved begrensning av membranenes permeabilitet. Substansen av interesse oppsamles enten i det intrakapsulære volum eller det ekstrakapsulære medium, avhengig av membranenes permeabilitetsgrad og substansens molekylvekt.



(56) Anførte publikasjoner

Norsk (NO) alment tilgjengelig patentsøknad nr. 800901.

Oppfinnelsen vedrører en fremgangsmåte for fremstilling av substanser som dannes av levende celler som produserer interferoner eller antistoffer.

Fremskritt i cellebiologi har vist at cellene til forskjellige høyere organismer produserer små mengder av substanser som har signifikant potensiell eller demonstrerbar nytte for behandling eller diagnose av sykdommer. Eksempler på slike substanser er det meget av i litteraturen, og de inkluderer forskjellige biologiske responsmodifiserende midler, f.eks. hormoner, interferoner og lymfokiner, så vel som andre substanser som f.eks. antistoffer som benyttes i diagnostisk testing. Cellekulturer av mikrobiell opprinnelse har lenge vært brukt for å produsere store mengder av antibiotika.

Spesielt i cellekulturer som stammer fra høyerestående dyr, er det stadig en fare til stede for bakteriell eller annen kontaminering. Dessuten er i de fleste tilfeller mengdene av den substans av interesse som produseres av cellekulturer, svært små og oppsamles i dyrkningssubstratet som inneholder en kompleks blanding av serumproteiner og andre substrater. Dette gjør isolering og rensning av substansen som er av interesse, vanskelig.

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en fremgangsmåte for produksjon av substanser som produseres av levende celler. Praktiseringen av oppfinnelsen har de iboende dobbelte fordeler ved å tilveiebringe et beskyttende miljø for cellene i kulturen og utgjøre et hjelpemiddel for oppsamling av substanser av interesse i et medium som har færre iblandede fremmedkomponenter. Oppfinnelsen kan anvendes for å separere den substans som er av interesse fra høyeremolekylære serumproteiner og lignende som normalt kreves for å underbygge den fortsatte levelighet og metabolisme hos de produserende celler. Alternativt kan oppfinnelsen anvendes for å oppsamle den substans som er av interesse, i et medium som inneholder relativt små mengder av lavmolekylære næringsstoffer eller cellemetabolske produkter.

Fremgangsmåten omfatter trinnene:

(A) å innkapsle celler i membraner som har en valgt øvre permeabilitetsgrense;

(B) å suspendere de innkapslede celler i vandig dyrkningsmedium;

(C) å tillate cellene å gjennomgå metabolisme in vitro med utskillelse av den ønskede substans, og

(D) å innhøste den ønskede substans fra det vandige medium eller fra det indre av membranene,

hvorved det i trinn (A) anvendes celler som produserer interferoner eller antistoffer. Membranen kan eventuelt være permeabel for den substans som er av interesse, som utskilles av cellene, men i alle fall vil den ha en øvre grense for permeabilitet som er tilstrekkelig til å tillate gjennomgang av molekyler som har en molekylvekt fra et utvalgt nivå som generelt er under ca. $2,0 \times 10^5$ daltons. Substanser med molekylvekt under den øvre permeabilitetsgrense for membranen som utskilles av cellene trenger gjennom membranen og oppsamles i dyrkningsmediet. Det er fordelaktig at slike høymolekylære substanser som serumproteiner, som kreves for sunnheten og levedyktigheten til mange typer av cellekulturer fra høyerestående dyr, men som typisk selv ikke forbrukes, kan inkluderes i mikrokapslene hvor de innesluttes og forhindres fra å diffundere inn i dyrkningsmediet. Substanser som cellekulturen forbruker under metabolismen som har en molekylvekt som er lav nok til å tillate diffusjon gjennom kapselmembranene, passerer derigjennom fra kulturmediet. Metabolske produkter fra cellene som har molekyldimensjon som er tilstrekkelig liten til å tillate passasje gjennom membranene, diffunderer inn i mediet utvendig i forhold til kapslene. Substansene som er av interesse, hvis de har en molekylvekt som er under den øvre grense for permeabilitet, diffunderer inn i det ekstrakapsulære medium hvor de kan høstes relativt lett på grunn av fravær med hensyn til å kontaminere høyeremolekylære materialer som er til stede i u-innkapslede cellekulturer i henhold til teknikkens stand. Hvis den substans som er av interesse har en molekylvekt i overkant av den øvre permeabilitetsgrense for membranene, så oppsamles den i kapslene, som deretter kan bli isolert fra mediet og brytes opp for utvinningsprosesser.

Oppfinnelsen er i det vesentlige ubegrenset med hensyn til den type av celler som kan inkluderes innen kapselmembranene. Særlig omfatter den det at kulturer av celler fra vevet

til alle høyerestående dyr så vel som mikroorganismer kan anvendes. Sammensmeltede celler, f.eks. hybridomaceller, eller genetisk modifiserte celler som f.eks. produseres ved hjelp av den derav utstrømmende rekombinante DNA-teknologi, kan likeledes innkapsles uten vanskelighet. Kort sagt, så sant det eksisterer et dyrkningsmedium som kan opereres for å holde den celletype det er spørsmål om in vitro, kan denne celletype benyttes i overensstemmelse med de teknikker som her er åpenbart. Eksempler på de typer av substanser som kan produseres ved fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen, inkluderer insulin, glykogen, prolaktin, somatostatin, thyroxin, steroidhormoner, pituitære hormoner, interferoner, follikelstimulerende hormoner (FSH), paratyroidhormoner (PTH), samt antistoffer.

Fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen gir innkapslede levedyktige celler som er suspendert i et vandig dyrkningsmedium. De innkapslede celler omfatter membraner som er karakterisert ved en øvre permeabilitetsgrense som er tilstrekkelig til å tillate gjennomgang av næringsstoffene som trenges for cellemetabolisme og fortsatt levedyktighet. Membranene omslutter levedyktige celler som er anbragt i et medium som inkluderer alle komponenter som trenges for å opprettholde metabolisme av cellene, og som er av et størrelsesområde i overkant av den øvre permeabilitetsgrense for membranen. Dyrkningsmediet omfatter komponenter som trenges for å opprettholde levedyktighet av cellene som har høy molekylvekt under den øvre permeabilitetsgrense for membranene.

Gjennom oppfinnelsen tilveiebringes en fremgangsmåte for produksjon av biologiske materialer av den type som produseres av celler. De produserende celler befinner seg i et beskyttende, sunt mikromiljø som er avgrenset av en semipermeabel membran som tjener til å separere produkter fra cellemetabolisme fra høymolekylære materialer som trenges for levedyktighet og vedlikehold av cellene. Fremgangsmåten gjør det mulig å produsere antistoffer og biologiske responsmodifikatorer, f.eks. hormoner, interferoner og lymfokiner, i et serumfritt miljø.

Dette vil fremgå av den følgende beskrivelse og av tegningen, hvor fig. 1 er et skjematisk diagram som illustrerer oppfinnelsens idé, og fig. 2 er en kurve som viser resultatene av det forsøk som er beskrevet i eksempel 5.

Det brede konsept ved oppfinnelsen er å plassere en semipermeabel membran omkring enkeltceller eller grupper av celler for å tilveiebringe et mikromiljø for cellene komplett med celledyrkningsmediet og adskilt ved membranene fra et utvendig vandig medium. Celler av pattedyropprinnelse krever typisk for fortsatt sunnhet og levedyktighet nærvær av serumproteiner, hvorav en del har molekylvekt over ca. 150 000 daltons. Ved teknikken i henhold til teknikkens stand som går ut på dyrking av uinnkapslede celler, dispergeres materialer av interesse som utskilles fra cellene, i dyrkningsmediet og blandes med både høy- og lavmolekylære komponenter. Siden mengdene av celleproduserte produkter typisk er nokså små, blir isolasjon av substansen som er av interesse en møysommelig renseoppgave. Videre er pattedyrcellekulturer notorisk ømfintlige overfor kontaminering av bakterielle eller andre kilder. Dette nødvendiggjør at dyrkningen utføres ved hjelp av forskjellige teknikker for å opprettholde sterilitet, og ofte at antibiotika inkluderes i mediet.

I henhold til foreliggende oppfinnelse mildnes de ovennevnte vanskeligheter ved innkapsling av cellene av kulturen i semipermeable membraner som har en utvalgt grense for permeabilitet som generelt ikke er større enn ca. 200 000 daltons, dvs. at membranen inneholder porer som tillater substanser med en maksimal molekylvekt på eller under den øvre permeabilitetsgrense, å gå gjennom membranen, mens substanser med molekylvekt over den øvre permeabilitetsgrense utelukkes fra å gå gjennom membranen. Dette tillater en å innkapsle celler sammen med et dyrkningssubstrat som inneholder alle komponenter som trenges for fortsatt levedyktighet, metabolisme og til og med mitose, og deretter å suspendere de således innkapslede celler i et dyrkningssubstrat som inneholder substanser med lavere molekylvekt, forbrukt av cellene, men som ikke behøver å inkludere de krevede substanser med høy molekylvekt.

Typisk tar ikke celler fra høyere organismer opp i seg høymolekylære serumproteiner og lignende, men krever dem snarere i nær proksimitet for fortsatte normale biologiske responser. Salter, aminosyrer og andre faktorer med lavere molekylvekt som opptas eller metaboliseres av cellene, passerer fritt gjennom membranen og kan fylles etter behov ved enkel forand-

ring av det dyrkningssubstrat som er utenfor kapslene. Utskilte produkter av cellemetabolisme som har molekylvekt under den øvre grense for membranpermeabiliteten, oppsamles i det ekstrakapsulære medium, hvor, på grunn av fraværet i mediet av høymolekylære materialer, høsting og isolering av de metabolske produkter som er av interesse, forenkles. Høsting av produkter av interesse som har molekylvekt over den øvre permeabilitetsgrense, blir også avhjulpet ved at slike produkter oppsamles innen kapslene og ikke dispergeres i det ekstrakapsulære volum.

Idéen med foreliggende oppfinnelse, slik den anvendes på celleprodukter med lavere molekylvekt, er skjematisk illustrert på tegningen. Som vist, er en celle 10 anbragt i en kapselmembran 12 som har porer 16. Faktorer 18 med høy molekylvekt er innelukket i membranen 12 og har frihet til å sirkulere innen grensene for membranen i mediet 14. Komponenter 20 som trenges av cellen så vel som metabolske produkter 22 inklusive substansen som er av interesse 22' sirkulerer fritt i både det intrakapsulære og ekstrakapsulære medium og gjennomborer membranen gjennom porene 16. Som krevet på periodisk (eller kontinuerlig) basis, kan det ekstrakapsulære medium sammen med alle dets komponenter separeres ved aspirering eller lignende fra selve kapslene og erstattes med friskt medium. Det oppsamlede medium vil være i alt vesentlig fritt for komponenter 18 med høy molekylvekt, hvilket forenkler innhøstingen og isoleringsprosessen. Videre forblir cellen 10 beskyttet inne i det intrakapsulære mikromiljø til alle tider.

I noen tilfeller, f.eks. i den hensikt å stimulere produksjon ved hjelp av innkapslede celler av en spesiell substans av interesse, er det nødvendig å utsette cellene for høymolekylære komponenter som har molekyldimensjoner som er for store til å gjennombore membranen. Et eksempel på dette er produksjon av interferon fra humanfibroblaster, leukocyter eller lymfoblastoidceller som er indusert til å utskille interferon ved behandling med visse viruser eller nukleinsyrer med høy molekylvekt. I et slikt tilfelle, hvis den øvre permeabilitetsgrense for membranene er mindre enn molekylvekten for den induserende faktor, må cellene utsettes for interferoninduksjon før innkapslingen, eller kapselmembranene må, etter dyrkning av cellene, oppbrytes selektivt for å tillate

at slike høymolekylære materialer opptas av cellen. US-patentsøknad nr. 243.584, tilsvarende NO patent nr. 158.284, åpenbarer en fremgangsmåte for selektivt å oppbryte visse typer av kapselmembraner som kan anvendes for disse og andre formål uten skade på cellene.

Fremgangsmåten i henhold til oppfinnelsen forutsetter evne til å danne semipermeable membraner omkring celler uten samtidig i skadelig grad å innvirke på deres fortsatte levedyktighet. En passende innkapslingsprosess er beskrevet i detalj nedenunder.

Celleinnkapsling

Vevet eller cellene som skal innkapsles suspenderes i et vandig medium som er egnet for vedlikehold eller for å understøtte de pågående metabolske prosesser for det spesielle vev eller den spesielle celletype som er involvert. Medier som er egnet for dette formål er kommersielt tilgjengelige. Gjennomsnittsdiameteren til materialet som skal innkapsles, kan variere innen vide grenser mellom noen få mikrometer og opp til flere millimeter. Imidlertid oppnås de beste resultater med kapsler av en størrelse i området 300-1000 mikrometer. Celler fra Langerhans-øyer fra pattedyr er typisk 50-200 mikrometer i diameter. Individuelle celler, f.eks. fibroblaster, leukocyter, lymfoblastoider, pankreatiske β-celler, α-celler, δ-celler, forskjellige forhold mellom disse, eller andre vevenheter kan innkapsles etter ønske. Også mikroorganismer kan innkapsles inklusive slike som er genetisk modifisert ved hjelp av rekombinerende DNA eller andre teknikker.

Den fortsatte levedyktighet til et slikt levende materiale er bl.a. avhengig av tilgjengeligheten av krevede næringsstoffer, oksygenoverføring, fravær av toksiske substanser i mediet, samt mediets pH-verdi. Hittil har det ikke vært mulig å opprettholde et slikt levende materiale i et fysiologisk forlikelig miljø med samtidig innkapsling. Problemet har vært at de betingelser som kreves for membrandannelse har vært letale eller skadelige for vevet og før den oppfinnelse ble gjort som er beskrevet i US-søknad nr. 24 600, var ingen fremgangsmåte for membrandannelse som tillot vev å overleve i sunn tilstand, praktisert.

Imidlertid er det oppdaget at visse vannløselige substanser som er fysiologisk forlikelige med levende vev og kan gjøres vann-uløselige for dannelse av en formbevarende, koherent masse, anvendes for å danne en "temporær kapsel" eller et beskyttende barriere-sjikt omkring enkeltceller eller grupper av celler, og at denne temporære kapsel kan behandles for avsetning av en mer permanent semipermeabel membran omkring cellene uten å skade cellene. En slik substans tilsettes typisk i en konsentrasjon av størrelsesorden noen få prosent, til vevdyrkningsmediet, som også inneholder celler fra kulturen, serumkomponenter (om nødvendig) og eventuelt et cellulært substrat, f.eks. kollagen eller et annet vanndispergert materiale med høy molekylvekt som tjener som forankrende substrat. Hvis man anvender kollagen, må konsentrasjonen være i området fra ca. 10 µg/ml til ca. 1 mg/ml, men fortrinnsvis av størrelsesorden 100-500 µg/ml.

Løsningen dannes deretter til dråper som inneholder vev sammen med sitt medium, og gjøres umiddelbart vann-uløselig og geleres, i det minste i et overflatesjikt. Deretter forsynes de formbevarende temporære kapsler med en mer permanent membran som selv deretter kan bli selektivt oppbrutt hvis det er ønskelig å frigjøre vevet uten skade. Der hvor materialet som anvendes for å danne de temporære kapsler tillater det, kan kapselens indre gjøres flytende igjen etter at den permanente membran er dannet. Dette gjøres ved å re-etablere de betingelser i mediet ved hvilke materialet er løselig.

Det materiale som anvendes for å danne de temporære kapsler kan være hvilket som helst ikke-toksisk, vannløselig materiale som, ved en forandring i ionisk miljø eller konsentrasjon, kan omdannes til en formbevarende masse. Materialet bør også inneholde et flertall av lett ioniserte anioniske grupper, f.eks. karboksylgrupper, som kan reagere ved saltdannelse med polymerer som inneholder flere kationiske grupper. Som det skal forklares nedenunder, gjør bruk av denne type materiale det mulig å deponere en permanent membran med en utvalgt øvre permeabilitetsgrense uten vanskelighet i overflatesjikt hos den temporære kapsel.

De materialer som for tiden foretrekkes for å danne den temporære kapsel er sure, vannløselige naturlige eller syntetiske polysakkaridgummier. Slike materialer er kommersielt

tilgjengelige. De er typisk ekstrahert fra vegetabilsk materiale og anvendes ofte som additiver til forskjellige matvarer. Natrium-alginat er det vannløselige polysakkarid som for tiden foretrekkes. Alginat i molekylvektområdet 150 000+ daltons kan anvendes, men på grunn av dets molekyldimensjoner og viskositet vil det vanligvis være uegnet til å gjennomtrenge de kapselmembraner som til slutt dannes. Alginat med lavere molekylvekt, f.eks. 50 000 - 80 000 daltons, fjernes lettere fra det intrakapsulære volum ved diffusjon gjennom en membran med tilstrekkelig porøsitet og foretrekkes derfor. Andre brukbare gummier inkluderer sure fraksjoner av guargummi, karragenan, pektin, tragantgummi eller xantangummi.

Disse materialer omfatter glykosidbundne polysakkaridkjeder. Deres frie syregrupper er ofte til stede i alkalimetallione-formen, f.eks. natriumformen. Hvis et flerverdig ion, f.eks. kalsium eller aluminium byttes ut med alkalimetallionet, "tverr-bindes" de vannløselige polysakkaridmolekyler slik at det dannes en vann-uløselig, formbevarende gel som kan resolubiliseres etter fjerning av ionene ved ionebytting eller via et kompleksdannende middel. Selv om praktisk talt ethvert flerverdig ion som kan danne et salt med den sure gummi kan benyttes, foretrekkes det at fysiologisk forlikelige ioner, f.eks. kalsium, anvendes. Dette er tilbøyelig til å konservere vevet i levende tilstand. Andre flerverdige kationer kan anvendes. Magnesiumioner er ineffektive med hensyn til å gelere natriumalginat.

En typisk løsningssammensetning omfatter like volumdeler av en cellekultur i sitt medium og en 1 eller 2 %ig løsning av polysakkarid i fysiologisk saltvann. Ved anvendelse av natrium-alginat er en 1,2-1,6 % løsning blitt anvendt med hell. Hvis de celler som skal innkapsles er av den type som krever tilknytning til et forankringssubstrat for å gjennomgå mitose, og hvis cellene skal dyrkes inne i kapslene, så kan kollagen eller et annet høymolekylært vanndispergerbart protein eller polypeptid, enten naturlig eller syntetisk, inkluderes i cellekulturen og vil være avgrenset innen det intrakapsulære volum av de til slutt dannede kapsler. Hvis en polymer som har et flertall av kationiske grupper, f.eks. polylysin, anvendes for dette formål, reagerer de kationiske grupper med anioniske seter på den vannløselige gummi slik at det dannes en i alt vesentlig vann-uløselig matriks som er sammenflettet med alginatet. Foretrukne konsentrasjoner for slike materialer er av størrelsesorden 100-500 µg/ml regnet på suspensjonen (inklusive gummiløsningen).

I det neste trinn i innkapslingsprosessen dannes gummiløsningen som inneholder vevet til dråper av ønsket størrelse. Deretter geleres dråpene umiddelbart for å danne formbevarende masser, fortrinnsvis, men ikke nødvendigvis i sfærisk eller sfæroidal form. Dråpedannelsene kan utføres ved kjente metoder. I det følgende skal gis et eksempel på én metode.

Et rør som inneholder en vandig løsning av flerverdige kationer, f.eks. 1,5 % $CaCl_2$-løsning, utstyres med en propp som holder et dråpedannelsesapparat. Apparatet består av et hus som har et øvre luftinntaksmunnstykke og en avlang, hullegeme-fraksjon innpasset i proppen. En 10 cm^3 sprøyte forsynt med en trinnvis pumpe monteres på toppen av huset med f.eks. en 0,254 mm I.D.Teflon-belagt nål som fører gjennom lengden av huset. Det indre av huset er slik konstruert at nålespissen utsettes for en konstant laminær luftstrøm som virker som en luftkniv. I bruk, med sprøyten full av løsning som inneholder det materiale som skal innkapsles, aktueres trinnpumpen for porsjonsvis å tvinge dråper av løsning fra nålespissen. Hver dråpe "kuttes av" ved hjelp av luftstrømmen og faller tilnærmet 2,5 cm ned i $CaCl_2$-løsningen hvor den umiddelbart geleres ved absorpsjon av kalsiumioner. Avstanden mellom nålespissen og overflaten av $CaCl_2$-løsningen er i dette tilfelle stor nok til å tillate natriumalginat/cellesuspensjonen å anta den fysisk sett mest gunstige form: en kule (maksimalt volum for minimalt overflateareal). Luft inne i røret "blør" gjennom en åpning i proppen. Dette resulterer i "tverrbinding" av gelen og i dannelse av en formbevarende beskyttende temporær kapsel med høy viskositet som inneholder det suspenderte vev og dets medium. Kapslene oppsamles i løsningen som separat fase og kan separeres ved aspirering.

I neste trinn i prosessen avsettes en semipermeabel membran omkring overflaten av de temporære kapsler ved "tverrbinding" av overflatesjikt. Dette kan utføres ved å utsette de gelererte temporære kapsler for en vandig løsning av en polymer som inneholder kationiske grupper som er reaktive med anioniske funksjonaliteter i gelmolekylene. Polymerer som inneholder syrereaktive grupper, f.eks. frie imin- eller amingrupper, foretrekkes. I denne situasjon tverrbindes polysakkaridgummien ved vekselvirkning (saltbindingsdannelse) mellom karboksylgruppene og amin- eller imingruppene. Permeabili-

teten kan reguleres innen grenser ved å velge molekylvekten til den tverrbindende polymer som anvendes og ved å regulere konsentrasjonen av polymerløsningen og varigheten av eksponeringen. En løsning av polymer som har lav molekylvekt, i et gitt tidsrom, vil gjennomtrenge ytterligere inn i de temporære kapsler enn hva en polymer med høy molekylvekt vil gjøre. Graden av gjennomtrengning av tverrbindingsmidlet er satt i overensstemmelse med den resulterende permeabilitet. Generelt kan man si at jo høyere molekylvekten og jo mindre gjennomtrengningen er, desto større er porestørrelsen. Bredt sagt, kan polymerer innen molekylvektområdet 3000-100 000 daltons eller mer, anvendes, avhengig av reaksjonens varighet, polymerløsningens konsentrasjon og den ønskede grad av permeabilitet. Ett vellykket sett av reaksjonsbetingelser, ved anvendelse av polylysin med gjennomsnittlig molekylvekt ca. 35 000 daltons, innebar omsetning i 2 minutter, under røring, av en fysiologisk saltløsning som inneholdt 0,0167 % polylysin. Dette resulterer i membraner som har en øvre permeabilitetsgrense på ca. 100 000 daltons. Optimale reaksjonsbetingelser som passer for regulering av permeabiliteten i et gitt system, kan lett bestemmes empirisk på bakgrunn av de ovennevnte retningslinjer. Ved anvendelse av denne metode er det mulig å sette den øvre permeabilitetsgrense for membranene på et valgt nivå under ca. 200 000 daltons.

Eksempler på egnede tverrbindingspolymerer inkluderer proteiner og polypeptider, enten naturlige eller syntetiske, som har frie amino- eller iminogrupper, polyetylenaminer, polyetyleniminer, samt polyvinylaminer. Polylysin, både i D- og L-formene, er blitt brukt med hell. Slike proteiner som polyargenin, polycitrullin eller polyornitin er også anvendelige. Polymerer i det høyere område av positiv ladningstetthet, f. eks. polyvinylamin, adhererer kraftig til de anioniske grupper i gelmolekylene for dannelse av stabile membraner, men membranene er nokså vanskelige å bryte opp.

Behandling med fortynnet løsning av polysakkarid vil binde frie aminogrupper på overflatene til kapslene som ellers kan medføre at kapslene får tendens til å danne klumper.

På dette punkt i innkapslingen kan kapsler oppsamles som omfatter en semipermeabel membran som omgir en gelert løsning av gummi, et forlikelig dyrkningsmedium av celletype, celler,

og eventuelt en intern matriks av kollagen eller et annet forankringssubstrat. Siden masseoverføring bør fremkalles i kapslene og tvers over membranene, foretrekkes det å gjenoppløse gelen til dens vannløselige form. Dette kan gjøres ved å re-etablere de betingelser under hvilke gummien er en væske, f.eks. ved å fjerne kalsiumet eller andre multifunksjonelle kationer fra den indre gel. Mediet i kapslen kan resolubiliseres ganske enkelt ved å dyppe kapslene i fosfatpufret saltvann, som inneholder alkalimetallioner og hydrogenioner. Enverdige ioner utbyttes med kalsiumet eller andre multifunksjonelle ioner i gummien når kapslene neddyppes i løsningen under røring. Natriumcitratløsninger kan anvendes for det samme formål og tjener til å danne komplekser med de toverdige ioner.

Cellekulturer som er innkapslet som beskrevet ovenfor, kan suspenderes i kulturmedier som er beregnet på spesifikt å tilfredsstille alle de krav som settes til den spesielle celletype som er involvert, og vil fortsette å gjennomgå normal in vitro-metabolisme. Hvis kulturen krever et miljø med høymolekylære komponenter, f.eks. serumkomponenter, kan disse utelates fra det ekstrakapsulære medium. Typisk er de komponenter som normalt opptas av celler, av relativt lav molekylvekt og diffunderer lett over kapselmembranene inn i mikromiljøet i cellene hvor de gjennomtrenger cellemembranen. Metabolismeprodukter fra cellene som utskilles i det intrakapsulære medium, diffunderer, hvis de har molekylvekt under den øvre permeabilitetsgrense for kapselmembranen, likeledes over disse og oppsamles i det ekstrakapsulære medium.

De innkapslede celler kan dyrkes under betingelser med hensyn til f.eks. temperatur, pH og ionisk miljø, som er identiske med konvensjonelle kulturer. Dessuten kan celleproduserte produkter innhøstes fra det ekstrakapsulære medium eller fra kapslene ved konvensjonelle teknikker. Imidlertid har den dyrkningsteknikk som her er åpenbart følgende fordeler:

1. Cellene fra kulturen beskyttes mot skjærkrefter og mekanisk skade og mot kontaminering ved faktorer som har dimensjoner i overskudd av den øvre permeabilitetsgrense for membranene. Dette betyr at håndtering og sterilitetskrav normalt tilhørende dyrkningsprosesser kan være noe avslappet, siden

mikroorganismer ikke kan nå de innkapslede celler, og virus-infiserte celler trenger ikke å kontaminere andre celler.

2. Kapslene immobiliserer i virkeligheten cellene inne i et miljø i hvilket innelukkede høymolekylære materialer er innestengt, men allikevel fjernes og innføres lett lavere-molekylære cellenæringsstoffer og produkter. Dette gjør det mulig å oppsamle og supplere næringsbuljongen avbrutt eller kontinuerlig etter ønske, uten at cellene forstyrres.

3. Substanser som er av interesse, produsert av cellene, utvinnes svært lett. Utskilte celleprodukter med molekyldimensjoner som er små nok til å gjennomtrenge kapselmembranene, oppsamles i det ekstrakapsulære medium i blanding med næringsstoffer. Imidlertid frigjøres ikke høymolekylære serumkomponenter og lignende inn i det ekstrakapsulære medium, hvilket forenkler utvinning av et celleprodukt av interesse. Utskilte celleprodukter med molekyldimensjoner i overkant av den øvre permeabilitetsgrense for membranene oppsamles i kapslene. Naturligvis kan celleprodukter som ikke utskilles gjennom cellemembranen, også være av interesse. Disse kan utvinnes i relativt konsentrert form ved isolering av kapslene og deretter selektivt oppbryte kapselmembranene under f.eks. anvendelse av den teknikk som skal åpenbares i det følgende, og om nødvendig ved å oppbryte cellemembranene.

4. Det intrakapsulære volum tilveiebringer et miljø som er vel egnet for celledeling. Suspensjonskulturer er observert å gjennomgå mitose i kapselen. Forankringsavhengige celler som i normale kulturer vokser i et todimensjonalt monosjikt formerer seg for dannelse av en rekke i kapslene. Slike celler bruker de innvendige overflater i membranen som substrat og/eller anker for de høymolekylære materialer som er anbrakt i kapslen. Dette fører til signifikante økninger i celledensiteten, sammenlignet med konvensjonelle kulturer. Den fortsatte levedyktighet for slike celleklaser avhjelpes ved det faktum at overflateareal:volumforholdene til kapslene kan være ganske stort, og således har alle celler adgang til krevede næringsstoffer, oksygen osv.

I visse situasjoner ville det være fordelaktig å oppbryte kapselmembranene selektivt for å frigjøre cellene uten

og eventuelt en intern matriks av kollagen eller et annet forankringssubstrat. Siden masseoverføring bør fremkalles i kapslene og tvers over membranene,foretrekkes det å gjenoppløse gelen til dens vannløselige form. Dette kan gjøres ved å re-etablere de betingelser under hvilke gummien er en væske, f.eks. ved å fjerne kalsiumet eller andre multifunksjonelle kationer fra den indre gel. Mediet i kapslen kan resolubiliseres ganske enkelt ved å dyppe kapslene i fosfatpufret saltvann, som inneholder alkalimetallioner og hydrogenioner. Enverdige ioner utbyttes med kalsiumet eller andre multifunksjonelle ioner i gummien når kapslene neddyppes i løsningen under røring. Natriumcitratløsninger kan anvendes for det samme formål og tjener til å danne komplekser med de toverdige ioner.

Cellekulturer som er innkapslet som beskrevet ovenfor, kan suspenderes i kulturmedier som er beregnet på spesifikt å tilfredsstille alle de krav som settes til den spesielle celletype som er involvert, og vil fortsette å gjennomgå normal in vitro-metabolisme. Hvis kulturen krever et miljø med høymolekylære komponenter, f.eks. serumkomponenter, kan disse utelates fra det ekstrakapsulære medium. Typisk er de komponenter som normalt opptas av celler, av relativt lav molekylvekt og diffunderer lett over kapselmembranene inn i mikromiljøet i cellene hvor de gjennomtrenger cellemembranen. Metabolismeprodukter fra cellene som utskilles i det intrakapsulære medium, diffunderer, hvis de har molekylvekt under den øvre permeabilitetsgrense for kapselmembranen, likeledes over disse og oppsamles i det ekstrakapsulære medium.

De innkapslede celler kan dyrkes under betingelser med hensyn til f.eks. temperatur, pH og ionisk miljø, som er identiske med konvensjonelle kulturer. Dessuten kan celleproduserte produkter innhøstes fra det ekstrakapsulære medium eller fra kapslene ved konvensjonelle teknikker. Imidlertid har den dyrkningsteknikk som her er åpenbart følgende fordeler:

1. Cellene fra kulturen beskyttes mot skjærkrefter og mekanisk skade og mot kontaminering ved faktorer som har dimensjoner i overskudd av den øvre permeabilitetsgrense for membranene. Dette betyr at håndtering og sterilitetskrav normalt tilhørende dyrkningsprosesser kan være noe avslappet, siden

mikroorganismer ikke kan nå de innkapslede celler, og virus-infiserte celler trenger ikke å kontaminere andre celler.

2. Kapslene immobiliserer i virkeligheten cellene inne i et miljø i hvilket innelukkede høymolekylære materialer er innestengt, men allikevel fjernes og innføres lett lavere-molekylære cellenæringsstoffer og produkter. Dette gjør det mulig å oppsamle og supplere næringsbuljongen avbrutt eller kontinuerlig etter ønske, uten at cellene forstyrres.

3. Substanser som er av interesse, produsert av cellene, utvinnes svært lett. Utskilte celleprodukter med molekyldimensjoner som er små nok til å gjennomtrenge kapselmembranene, oppsamles i det ekstrakapsulære medium i blanding med næringsstoffer. Imidlertid frigjøres ikke høymolekylære serumkomponenter og lignende inn i det ekstrakapsulære medium, hvilket forenkler utvinning av et celleprodukt av interesse. Utskilte celleprodukter med molekyldimensjoner i overkant av den øvre permeabilitetsgrense for membranene oppsamles i kapslene. Naturligvis kan celleprodukter som ikke utskilles gjennom cellemembranen, også være av interesse. Disse kan utvinnes i relativt konsentrert form ved isolering av kapslene og deretter selektivt oppbryte kapselmembranene under f.eks. anvendelse av den teknikk som skal åpenbares i det følgende, og om nødvendig ved å oppbryte cellemembranene.

4. Det intrakapsulære volum tilveiebringer et miljø som er vel egnet for celledeling. Suspensjonskulturer er observert å gjennomgå mitose i kapselen. Forankringsavhengige celler som i normale kulturer vokser i et todimensjonalt monosjikt formerer seg for dannelse av en rekke i kapslene. Slike celler bruker de innvendige overflater i membranen som substrat og/eller anker for de høymolekylære materialer som er anbrakt i kapslen. Dette fører til signifikante økninger i celledensiteten, sammenlignet med konvensjonelle kulturer. Den fortsatte levedyktighet for slike celleklaser avhjelpes ved det faktum at overflateareal:volumforholdene til kapslene kan være ganske stort, og således har alle celler adgang til krevede næringsstoffer, oksygen osv.

I visse situasjoner ville det være fordelaktig å oppbryte kapselmembranene selektivt for å frigjøre cellene uten

skade. Ett eksempel som det er verdt å merke seg er ved produksjon av interferon (INF). Celler som har evne til å produsere INF må utsettes for visse viruser eller nukleinsyrer ved fremstilling for INF-produksjonstrinnet. Dessuten tilsettes i flere INF-induksjonsprosesser reaksjoner til kulturen for å inhibere proteinsyntese. Følgelig må veksttrinnet i dyrkningsprosessen utføres under betingelser som er helt annerledes enn INF-induksjonstrinnet. Hvis de substanser som anvendes for INF-induksjon har en molekylvekt som er i overkant av den øvre permeabilitetsgrense for kapselmembranene (hvilket vil være tilfelle i virus-induksjoner), så kan induksjonsprosessen ikke fullføres i den innkapslede cellekultur. Følgelig ville INF-produserende celler,hvis de dyrkes i kapselen, måtte frigjøres ved oppbrytning av membranen i den hensikt å bli underkastet induksjonsprosessen.

Oppbrytning av membraner

Celler som er innesluttet i membraner av den type som er angitt ovenfor, kan frigis ved en fremgangsmåte som involverer kommersielt tilgjengelige reagenser som har egenskaper som ikke signifikant innvirker ugunstig på de innkapslede celler. For det første separeres kapslene fra sitt suspenderingsmedium, vaskes grundig for fjerning av eventuelle forurensninger som er til stede på det ytre av mikrokapslene, og dispergeres deretter, under agitering, i en blandet løsning av monoatomiske, flerverdige kationer, f.eks. kalsiumioner, og en strippe-polymer som har et flertall av anioniske grupper, f.eks. et salt av en polysulfon- eller polyfosforsyre. Heparin, et naturlig sulfonert polysakkarid, foretrekkes for dette trinn. Den anioniske ladningsdensitet for strippe-polymeren som anvendes, må være lik eller fortrinnsvis større enn ladningsdensiteten for det polyanioniske materiale som opprinnelig ble anvendt for dannelse av membranene. Molekylvekten til polymeren må være minst sammenlignbar med og fortrinnsvis større enn molekylvekten til polymeren som har et flertall kationiske grupper, anvendt ved dannelse av membranen. I suspensjonen av kapsler i den blandede løsning konkurrerer kalsiumionene med de polykationiske polymerkjeder som anvendes for dannelse av membranen, om anioniske seter på den vannløselige gummi. Samtidig

konkurrerer heparinet eller en annen polymer som har et flertall anioniske grupper, oppløst i løsningen, med gummien i membranen om kationiske seter på polymerkjedene. Dette resulterer i et vanndispergerbart eller fortrinnsvis vannløselig kompleks av f.eks. polylysin og heparin, og i assosiasjon av de monoatomiske kationer med molekyler i gelen.

Dette trinn gjør membranen mottagelig for oppløsning ved påfølgende eksponering for et sekvestreringsmiddel som fullfører oppbrytningsprosessen ved å ta opp monoatomiske ioner fra gelen. Kapselmembran-debris som forblir i mediet, om sådant er til stede, kan lett separeres fra cellene.

Den løsning som for tiden foretrekkes for det første trinn i den selektive oppbrytningsprosess omfatter 1,1 vekt/vol.% kalsiumklorid og mellom 500 og 1500 enheter heparin pr. ml løsning. Et volum av mikrokapsler tilsettes til denne løsning som er tilstrekkelig til å utgjøre mellom ca. 20 og 30 % av det totale suspensjonsvolum. Kalsiumklorid og heparin foretrekkes for oppbrytning av membraner i celleholdige kapsler, siden begge reagenser er fysiologisk forlikelige med de fleste celler og derfor reduserer muligheten for celleskader til et minimum. Blandinger av aluminiumsalter eller andre flerverdige kationer (men ikke Mg^{++}-ioner) kan også anvendes sammen med polysulfon- eller polyfosforsyresaltene av den type som er angitt ovenfor.

Generelt kan konsentrasjonene av monoatomiske ioner og anionisk polymer som anvendes i dette trinn, variere innen vide grenser. Optimale konsentrasjoner kan lett bestemmes empirisk, og er avhengig av eksponeringstiden så vel som den spesielle polymer som anvendes for å danne membranene.

Det sekvestreringsmiddel som for tiden foretrekkes for å utføre den selektive oppbrytning er natriumcitrat, selv om andre alkalimetallcitratsalter og alkalimetall-EDTA-salter også kan anvendes. Hvis natriumcitrat anvendes, er den optimale konsentrasjon av størrelsesorden 55 mM. Det foretrekkes å oppløse citratet eller et annet sekvestreringsmiddel i isotonisk saltvann for å redusere celleskadene til et minimum.

Oppfinnelsen skal i det følgende belyses ved hjelp av følgende eksempler.

Eksempel 1: Insulinproduksjon

Langerhans-øyer oppnås fra menneskelik eller dyrepankreas og tilsettes til en komplett vevkultur (CMRL-1969) i en konsentrasjon av tilnærmet 10^3 øyer pr. ml. Vevkulturen inneholder alle næringsstoffer som trenges for fortsatt levedyktighet hos øyene så vel som de aminosyrer som benyttes av β-cellene for å produsere insulin. 4/10 av en suspensjon som inneholder 10^3 øyer pr. ml tilsettes deretter til 1/2 ml volum av 1,2 % natriumalginat i fysiologisk saltvann.

Deretter anvendes en 1,5 % kalsiumkloridløsning for å gelere dråper av den løsning som ble dannet som angitt ovenfor. Dråper av størrelsesorden 300-400 μm i diameter som kommer ut fra nålespissen gelerer umiddelbart etter at de er kommet inn i kalsiumløsningen. De gelerte kapsler overføres deretter til et begerglass som inneholder 15 ml av en løsning som omfatter 1 del av en 2 % 2(cykloheksylamino)etansulfonsyrepufferløsning i 0,6 % NaCl (isotonisk, pH= 8,2) fortynnet med 20 deler 1 % $CaCl_2$. Etter 3 minutters neddypping vaskes kapslene 2 ganger i 1 % $CaCl_2$.

Kapslene overføres deretter til en 32 ml løsning som omfatter 1/80 av 1 % polylysin (gjennomsnittlig MV 35 000 daltons) i fysiologisk saltvann. Etter 3 minutter dekanteres polylysinløsningen. Kapslene vaskes med 1 % $CaCl_2$, og resuspenderes eventuelt i 3 minutter i en løsning av polyetylenimin (MV 40 000-60 000), produsert ved å fortynne en 3,3 % polyetylenimin-forrådsløsning i morfolinpropansulfonsyrepuffer (0,2M, pH=6) med tilstrekkelig 1 % $CaCl_2$ til å resultere i en endelig polymerkonsentrasjon på 0,12 %. De resulterende kapsler, som har "permanente" semipermeable membraner, vaskes deretter to ganger med 1 % $CaCl_2$, to ganger med fysiologisk saltvann og blandes med 10 ml av 0,12 % alginsyre i vann.

Kapslene motstår klumpdannelse, og mange kan sees å inneholde Langerhans-øyer. Gel i det indre av kulene gjøres flytende igjen ved at kulene neddyppes i en blanding av saltvann og citratpuffer (pH=7,4) i 5 min. Til slutt suspenderes kapslene i CMLR-69 medium.

Under mikroskopet sees disse kapsler å bestå av en svært tynn membran som omsirkler en øy i hvilken individuelle celler

kan sees. Molekyler som har en molekylvekt på opp til ca. 100 000 kan gjennomtrenge membranene. Dette tillater oksygen, aminosyrer, næringsstoffer og plasmakomponenter som anvendes i dyrkningsmedier (dvs. laveremolekylære fetal-kalveplasmakomponenter) å nå en slik øy og tillater utskillelse av insulin.

Etter gjentatte vaskinger i fysiologisk saltvann suspenderes mikrokapsler som er fremstilt i overensstemmelse med den ovenfor omtalte fremgangsmåte, som inneholder tilnærmet 15 øyer, i 3 ml av CMRL-1969. Da de var 8 dager gamle, utskilte kapslene, i nærvær av 600 mg/dl glukose, i ett forsøk, 67 enheter/ml insulin i løpet av 1,5 timer, inn i det ekstrakapsulære medium. I et annet forsøk ble det produsert 68 enheter/ml insulin i det samme tidsrom. 1 uke gamle kapsler i det samme medium, men i nærvær av 100 mg/dl glukose, utskilte i et første forsøk 25 enheter/ml insulin i løpet av 1,2 timer og i et annet forsøk 10 enheter/ml.

Eksempel 2: INF-β-produksjon

Human-fibroblaster oppnådd ved å behandle menneske-pannevev med trypsin og EDTA i 5 minutter ved 37°C på kjent måte suspenderes i et komplett vekstmedium (CMLR 1969) supplert med 40 vol.% renset føtalt kalveserum, 0,8 % natriumalginat og 200 µg/ml renset kalvehudkollagen. Densiteten til cellesuspensjonen er ca. $1,5 \times 10^7$ celler/ml. Temporære alginatkapsler dannes som angitt i eksempel 1. Semipermeable membraner avsettes i overflatesjikt av kapslene ved at de suspenderes i en 0,005 vekt/vol.% vandig løsning av polylysin, (MV 43 000 daltons) i 3 minutter.

De resulterende kapsler suspenderes i CMLR-1969 supplert med 10 % føtalt kalveserum. De forutgående trinn utføres alle ved 37°C. Etter inkubering ved samme temperatur vil kapslene, hvis de undersøkes under mikroskopet, bli funnet å inneholde fibroblaster som har gjennomgått mitose og viser tredimensjonal fibroblastisk morfologi i kapslene.

Etter 4-5 dagers inkubering utsettes de innkapslede fibroblaster for en INF-β-superinduksjonsteknikk i henhold til Vilcek-prosessen. Under 5 % CO_2 atmosfærer (95 % luft) inkuberes kapselsuspensjonen ved 37°C i 1 time i nærvær av 100 µg/ml Poly I-Poly C, en dobbelttrådet RNA (kjent

INF-β-induktor) og 50 µg/ml cykloheksimid (proteinsyntese-inhibitor). Etter 1 time vaskes de suspenderte kapsler i medium (CMLR-1969) som inneholder 50 µg/ml cykloheksimid og resuspenderes deretter i samme løsning i 3 timer ved 37°C under en 5 % CO_2-atmosfære. Ved fullførelsen av denne inkubering gjentas vaske-trinnet, og kapslene resuspenderes i medium som inneholder 50 µg/ml cykloheksimid og 5 µg/ml actinomycin D) (en kjent RNA-syntese-inhibitor) og inkuberes i 2 timer ved 37°C under en 5 % CO_2-atmosfære. Kapslene vaskes deretter 2 ganger i medium og suspenderes i serum-fritt medium ved 37°C i 18-24 timer, og i dette tidsrom utskiller fibroblastene INF-β, som har molekylvekt av 21 000 dalton og kan innhøstes fra det ekstrakapsulære medium.

Eksempel 3: INF-β-produksjon

Fremgangsmåten fra eksempel 2 gjentas, med unntagelse av at før induksjonen oppbrytes kapselmembranene selektivt slik at Poly I·Poly C lettere kan få adgang til fibroblastene. Oppbrytningsprosessen utføres på følgende måte.

10 ml andeler av mikrokapselsuspensjoner som inneholder ca. 500-1000 kapsler pr. ml, tillates å sette seg, og suspensjonsmediet aspireres fra. Kapslene vaskes to ganger med fosfatpufret saltvann (PBS, pH=7,4). De vaskede kapsler blandes så med en 3,0 ml alikvot av PBS som inneholder 1000 enheter/ml heparin og 1,1 vekt/vol% $CaCl_2$. Suspensjonen agiteres ved 37°C i 3 minutter, hvoretter kapslene tillates å sette seg, det overstående aspireres fra, og kapslene vaskes to ganger med 3,0 ml av 0,15 M NaCl. Etter aspirering av den annen vaskeløsning blandes kapslene med 2,0 ml av en blandet løsning som omfatter like volumdeler av 110 mM natriumcitrat og 0,15 M NaCl (pH=7,4). Blandingen håndsentrifugeres i 1 minutt for å indusere oppløsning av membranene, hvoretter cellene vaskes to ganger i medium.

Cellene suspenderes deretter i medium, utsettes for den induksjonsprosess som er beskrevet i eksempel 2, og reinnkapsles deretter som angitt i eksempel 2. Kapselsuspensjonen inkuberes så i serumfritt medium i 18-24 timer, og i dette tidsrom utskilles INF-β fra cellene, gjennomtrenger kapsel-

membranene og oppsamles i det ekstrakapsulære medium.

Eksemplene 2 og 3, hvis de er utført med Poly I-Poly C (5S) (sedimenteringsverdi, Poly I og Poly C varmebehandlet for dannelse av dobbelttrådet RNA) resulterer i følgende INF-β-produksjonsnivåer, i enheter av INF-β/10^5 celler:

	1.	2.
Eksempel 2	25	25
Eksempel 3	2500	2500

Eksemplene 2 og 3, hvis de utføres med Poly I-Poly C (12S) (sedimenteringsverdi, dobbelttrådet i innkjøpt tilstand) resulterer i følgende INF-β-produksjonsnivåer, i enheter av INF-β/10^5 celler:

	1.	2.
Eksempel 2	25	25
Eksempel 3	2500	2500

Den 100-folds økning i produksjon under anvendelse av fremgangsmåten fra eksempel 3 i forhold til den som er beskrevet i eksempel 2, menes å skyldes, i det minste delvis, det faktum at Poly I·Poly C har bedre adgang til cellene i fremgangsmåten i henhold til eksempel 3.

Eksempel 4

Fremgangsmåten fra eksempel 2 gjentas med unntagelse av at kapsler som ikke inneholder noe kollagen anvendes. De innkapslede celler ble dyrket i konvensjonell ett-sjiktskultur, behandlet med trypsin, og indusert med Poly I·Poly C (5S) og mikroinnkapslet samtidig. Det ekstrakapsulære medium viser seg å inneholde 2500 enheter INF-β/10^5-celler.

Eksempel 5: Monoklonale antistoffer

Hybridoma-celler oppnådd fra Herman Eisen ved MIT ble dyrket til en tetthet på 3,0 x 10^6 celler/ml. Disse celler var sammensmeltet fra mus-milt-celler, og mus-myeloma-celler på en måte som er velkjent fra teknikkens stand, og utgjorde en udødelig cellelinje som i kultur produserte antistoffer mot dinitrofenyl-bovin-serum-albumin. 3 ml-alikvoter av cellesuspensjonen ble laget ved å tilsette 2,1 ml suspensjon som inneholdt 1,4 % natriumalginat til 0,6 ml føtalt kalveserum

og 0,3 ml fysiologisk (150 mM) saltvann. Dråper av suspensjonen ble umiddelbart gelert i $CaCl_2$-løsning og deretter behandlet med en 0,016 vekt% løsning av poly-L-lysin. Det indre av de resulterende kapsler ble deretter flytendegjort pånyved neddypping i en løsning av 1 del 110 mM natriumcitrat og 3 deler 150 mM saltvann i 6 minutter. De kapsler som inneholdt hybridoma-celler ble deretter suspendert i en blanding av RPMI-1640 medium som inneholdt 20 % varme-inaktivert føtalt kalveserum.

Celletellinger av innkapslede og uinnkapslede hybridomakulturer, og mengden av monoklonalt antistoff produsert av både de innkapslede og uinnkapslede kulturer ble bestemt periodisk. Resultatene er gjengitt i grafisk form i fig. 2.

Eksempel 6: INF-α fra leukocyter

30 ml "buffy coats" oppnådd fra det amerikanske Røde Kors ble behandlet med 3,0 ml av 5 % EDTA og gjentatt 10 minutters eksponeringer overfor 0,83 NH_4Cl ved 4°C for lyse av de røde blodlegemer. En 5 minutters sentrifugering (1200 opm ved 4°C) mellom NH_4Cl-behandlingene separerer debris fra de gjenværende intakte leukocyter. Cellene ble så suspendert i MEM (minimalt essensielt medium, serumfritt), fortynnet med en faktor på 100, og ble farvet med tryptanblått i 15 minutter. En celletelling som ble utført på en prøve viste at ca. $1,3 \times 10^9$ leukocyter pr. 30 ml "buffy Coat" overlevde. Cellene ble deretter suspendert ved en tetthet på 1×10^7 celler/ml i medium som var supplert med 2 % varme-inaktivert fetal-kalveserum.

Induksjon ble bevirket ved å eksponere cellesuspensjonen for Sendai-virus (varierende konsentrasjoner i hemagglutinerende enheter/ml i 1 time ved 37°C
under røring. Viruset ble deretter separert fra cellen ved sentrifugering ved romtemperatur, og cellene ble resuspendert i like volumdeler av MEM - 4 % varme-inaktivert føtalt kalveserum og 1,4 % natriumalginat. Det ble dannet kapsler som beskrevet ovenfor, og disse ble så resuspendert i serumfrie og serumholdige medier. Det var ingen signifikante forskjeller i mengdene av INF påvist i det ekstrakapsulære medium av disse testprøver. INF-produksjonsnivåer var også identiske i

uinnkapslede kontrollkulturer. Resultatene fra disse forsøk er gjengitt nedenunder:

Enheter Sendai-virus (HA-enheter/ml)	INF-produserte enheter 10^7 celler
600	10
300	20
150	33
75	50

Eksempel 7: INF-α fra lymfoblastoider

Namalwa-celler fra American Type Culture Collection ble dyrket både i konvensjonell kultur og i mikrokapsler i RPMI-1640 medium supplert med 10 % varme-inaktivert føtalt kalveserum. Volumer av cellesuspensjonene ble så utsatt for INF-induksjon og produksjonsprosesser, med et volum innkapslet og det annet uinnkapslet. Kulturene inneholdt i alt vesentlig like antall celler. Til både de innkapslede og de uinnkapslede kulturer ble det tilsatt 25 mg/ml bromdeoksyuridin i dobbelt destillert vann for å inhibere mitose. Etter inkubering i 36 timer ved 37°C ble cellene fra begge kulturer vasket og deretter suspendert i RPMI-1640 medium supplert med 2 % varme-inaktivert føtalt kalveserum.

Den innkapslede kultur ble deretter behandlet for selektivt å oppbryte kapselmembranene. Kapslene ble vasket tre ganger i fysiologisk saltvann, inkubert i 1000 enheter/ml heparin-løsning som inneholdt 1,1 % $CaCl_2$ i 10 minutter ved 37°C, og deretter vasket pånytt i saltvann. De vaskede kapsler ble å inkubert i 5 minutter ved 37°C med fortynnet natriumcitratløsning i fysiologisk saltvann. Agitering av kapselsuspensjonen på dette punkt resulterer i oppløsning av membranene og frigivelse av Namalwa-cellene. Cellesuspensjonen ble så sentrifugert for fjerning av debris og vasket flere ganger i citrat/saltvannløsning.

Begge kulturer ble deretter suspendert i friskt RPMI-1640 kulturmedium supplert med 2 % varme-inaktivert føtalt kalveserum og puffer (pH = 7,4) ved en densitet på 1,0 x 10^6 celler/ml.

Til både den konvensjonelle kultur og den tidligere inn-

kapslede kultur ble så Bankowski-stammen av Newcastle Disease Virus i amnion - væske tilsatt. Viruset var i en konsentrasjon av 1,0 x 10^8 pfu/ml og var innkjøpt fra Poultry Health Laboratories, Davis, California. 1 ml av viruset ble tilsatt for hver 10 ml av cellesuspensjon. Kulturene ble inkubert i 24 timer ved 37°C.

Den konvensjonelle kultur ble så delt i fem deler (1-5 nedenunder); den tidligere innkapslede kultur ble delt i fire deler (6-9 nedenunder). Hver av de 9 alikvoter av kultur ble deretter analysert med hensyn på INF-produksjon ved å følge de metoder som er beskrevet nedenunder.

1. ubehandlet
2. resuspendert i RPMI-1640 medium med 2 % varme-inaktivert føtalt kalveserum
3. resuspendert i RPMI-1640 medium serumfritt
4. innkapslet sammen med RPMI-1640 medium og 5 % varme-inaktivert føtalt kalveserum-kapsler suspendert i serumfritt medium
5. innkapslet sammen med RPMI-1640 medium og 5 % varme-inaktivert føtalt kalveserum-kapsler suspendert i medium med 2 % føtalt kalveserum
6. resuspendert i serumfritt medium
7. resuspendert i medium som inneholdt 2 % varme-inaktivert føtalt kalveserum
8. reinnkapslet sammen med medium pluss 5 % varme-inaktiverte føtalt kalveserum-kapsler suspendert i serumfritt medium
9. reinnkapslet sammen med medium pluss 5 % varme-inaktivert føtalt kalveserum-kapsler suspendert i medium pluss 2 % serum

Følgende tabell angir den mengde av celler som kreves i hver av cellekulturene 1-9 for å produsere 1 enhet av INF-α :

1	30	6	40
2	45	7	40
3	-	8	1000, 360
4	680	9	200, 100
5	2000		

Andre utførelsesformer faller inn under de følgende krav.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av substanser som dannes av levende celler som produserer interferoner eller antistoffer, k a r a k t e r i s e r t v e d

(A) å innkapsle celler i membraner som har en valgt øvre permeabilitetsgrense;

(B) å suspendere de innkapslede celler i vandig dyrkningsmedium;

(C) å tillate cellene å gjennomgå metabolisme in vitro med utskillelse av den ønskede substans, og

(D) å innhøste den ønskede substans fra det vandige medium eller fra det indre av membranene,

hvorved det i trinn (A) anvendes celler som produserer interferoner eller antistoffer.

2. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at innkapslingstrinnet (A) utføres ved å danne membranen ved omsetning mellom kationiske grupper, f.eks. amin- eller imin-grupper på polymerkjeder og anioniske grupper, f.eks. karboksylgrupper, på et vannløselig polysakkarid slik at det dannes en vann-uløselig ionisk bundet matriks.

3. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at innkapslingstrinnet (A) utføres i følgende trinn:

1) å suspendere cellene i et vandig medium som er fysiologisk forlikelig med dem og som inneholder en vannløselig polysakkaridgummi som har et flertall anioniske grupper;

2) å danne suspensjonen til dråper som inneholder cellene;

3) å utsette dråpene for en løsning av flerverdige, fysiologisk forlikelige kationer for å gelere dråpene som adskilte, formbevarende, vann-uløselige temporære kapsler;

4) å tverrbinde overflatesjikt av de temporære kapsler for å produsere semipermeable membraner omkring dråpene ved å utsette dem for en lavmolekylær polymer som omfatter et flertall av kationiske grupper som er reaktive med de anioniske grupper; eventuelt

5) det ytterligere trinn å resolubilisere gelen i membranen som er produsert i trinn 4).

4. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at cellene innkapsles sammen med et fullstendig celledyrkningsmedium som er tilstrekkelig til å opprettholde cellene og å tillate biosyntese av substansen in vitro.

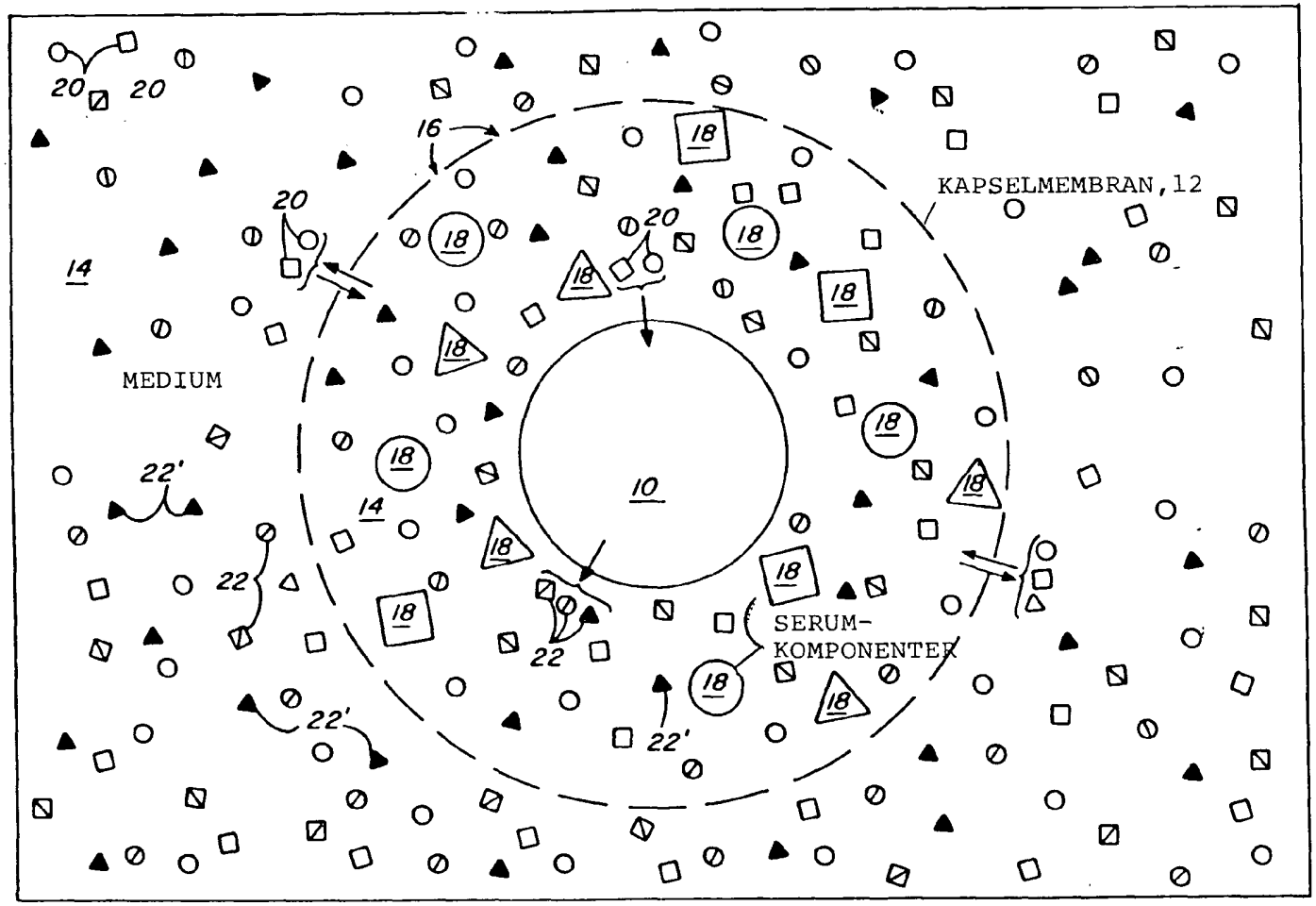
5. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det som vandig medium i trinn (B) anvendes et komplett celledyrkningsmedium som er tilstrekkelig til å opprettholde de nevnte celler og å tillate biosyntese av den nevnte substans in vitro.

6. Fremgangsmåte som angitt i krav 4, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inkluderes en høymolekylær serum-komponent som har en molekylvekt over den øvre permeabilitetsgrense for membranen og som cellene trenger for å tillate in vitro-biosyntese av substansen, idet fremgangsmåten omfatter det ytterligere trinn å innkapsle komponenten sammen med cellene.

7. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at under innkapslingstrinnet (A) produseres sfæroidale mikrokapsler som har diameter under ca. 0,5 mm.

8. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at cellene som innkapsles i trinn (A) bringes i kontakt med en komponent som har en molekylvekt i overkant av den øvre permeabilitetsgrense for membranene, for å opprettholde produksjon av substansen, idet komponenten blir innkapslet sammen med cellene i trinn (A) og det vandige dyrknings-medium som anvendes i trinn (B) er i alt vesentlig fritt for komponenten.

9. Fremgangsmåte som angitt i krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det anvendes en øvre permeabilitetsgrense som er under ca. 1,5 x 10^5 daltons.



▲— SUBSTANS AV INTERESSE PRODUSERT AV CELLE
○□- SUBSTANSER MED LAV MOLEKYLVEKT TATT OPP AV CELLE
⊘⊠- FREMMEDE METABOLISKE PRODUKTER

FIG. 1

163060

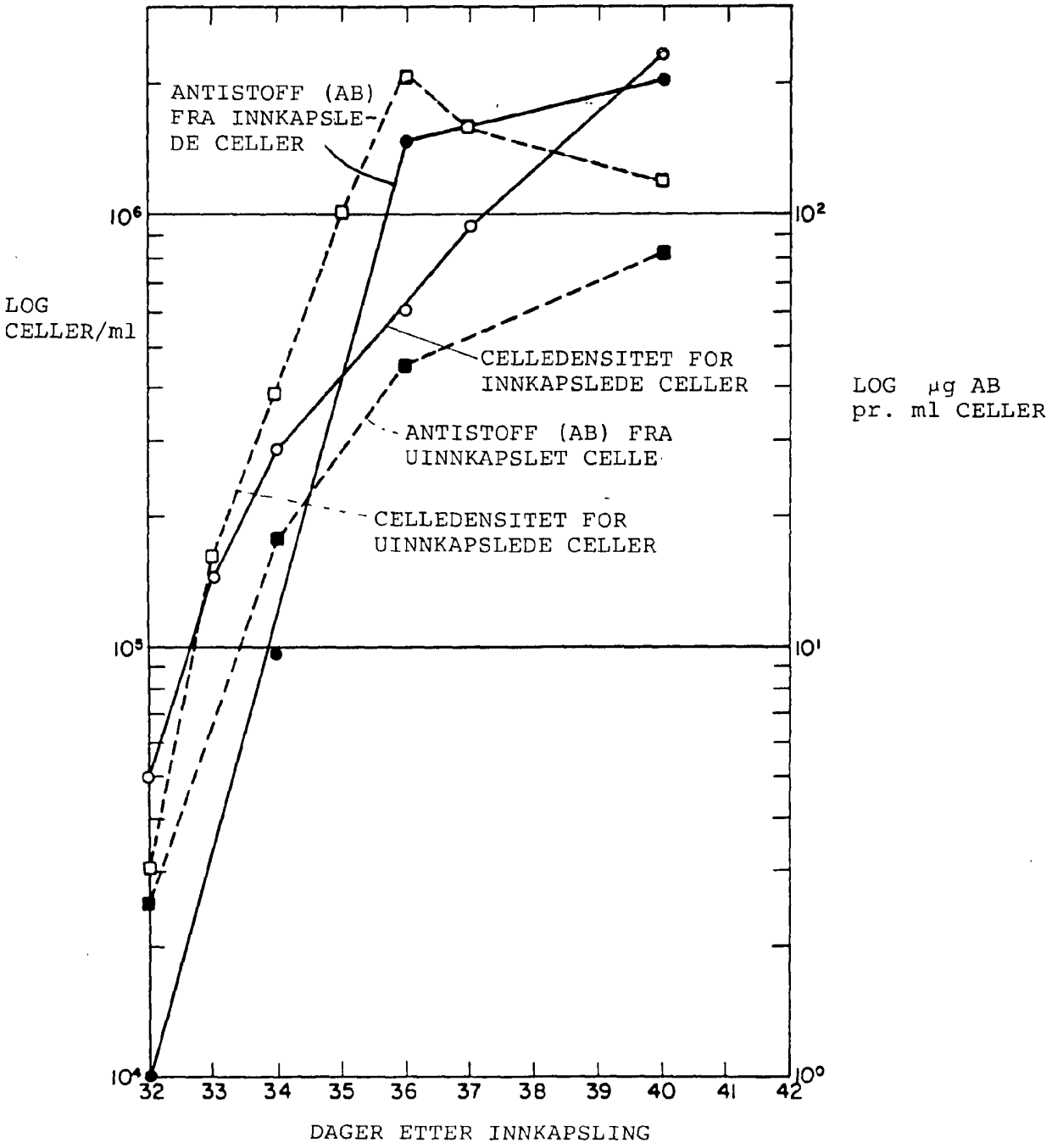

ANTISTOFF (AB) FRA INNKAPSLE-DE CELLER
LOG CELLER/ml
LOG µg AB pr. ml CELLER
CELLEDENSITET FOR INNKAPSLEDE CELLER
ANTISTOFF (AB) FRA UINNKAPSLET CELLE
CELLEDENSITET FOR UINNKAPSLEDE CELLER
10⁶
10⁵
10⁴
10²
10¹
10⁰
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
DAGER ETTER INNKAPSLING

FIG. 2