FI000120670B



(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 120670 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **29.01.2010**

(51) Kv.lk. - Int.kl.

A61K 35/39 (2006.01)
A61K 35/48 (2006.01)
A61K 38/28 (2006.01)
A61K 38/13 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61P 3/00 (2006.01)
C12N 5/08 (2006.01)

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **964033**

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag **08.10.1996**

(24) Alkupäivä - Löpdag **13.04.1995**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **12.12.1996**

(86) Kv. hakemus - Int. ansökan **PCT/US1995/004565**

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

13.04.1994 US 211695 P

SUOMI – FINLAND
(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

(73) Haltija - Innehavare

1 • Research Corporation Technologies, Inc., Suite 600, 101 N. Wilmot Road, Tucson, AZ 85711-3335, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1 • Selawry, Helena P., Memphis, TN 38119, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud

Kolster Oy Ab, Iso Roobertinkatu 23, 00120 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Farmaseuttinen koostumus käsittäen Sertoli-soluja sekä niiden käyttö

Farmaceutisk komposition innefattande Sertoli-celler och användning därav

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

DE 4227066 A1,
Chemical Abstracts, 1991, vol. 115, nro 3, p. 507, palsta 2, nro 26533u., Danahey, DG. A biochemical and immunohistochemical study of rat Sertoli cells,& Diss. Abstr. Int B 1991, 51(10), p. 4674, Hutson, JC et al. Sertoli Cell Function in Diabetic, Insulin-treated Diabetic, and Semi-Starved Rats. Diabetes, helmikuu 1983, vol. 32, p. 112-116.

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Tämä keksintö kuvaa menetelmän sairauden hoitamiseksi, joka johtuu biologisen tekijän puutteesta, joka menetelmä käsittää Sertoli-solujen ja solujen, jotka tuottavat biologista tekijää, antamisen nisäkkäälle. Erityisesti tämä keksintö kuvaa menetelmän sokeritaudin hoitamiseksi siirtämällä haiman Langerhansin saarekesoluja Sertoli-solujen yhteydessä luomaan immunologisesti etuoikeutettu kohta. Menetelmää immunologisesti etuoikeutetun kohdan luomiseksi nisäkkäässä solusiirrännäisiä varten kuvataan lisää tässä keksinnössä. Tarjotaan myös farmaseuttinen koostumus, joka käsittää Sertoli-soluja ja soluja, jotka tuottavat biologista tekijää.

Föreliggande uppfinning avser ett sätt för behandling av en sjukdom, som uppstått på grund av brist på en biblogisk faktor, varvid man administrerar åt ett däggdjur Sertoli-celler och celler, som producerar den biologiska faktorn. Föreliggande uppfinning avser speciellt ett sätt för behandling av diabetes genom att transplantera Langerhans cellöar tillsammans med Sertoli-celler för bildande av ett immunologiskt privilegierat säte. Föreliggande uppfinning avser dessutom ett sätt för bildande av ett immunologiskt privilegierat säte för celltransplantat i ett däggdjur. Uppfinningen erbjuder även en farmaceutisk komposition, som omfattar Sertoli-celler och celler, som producerar den biologiska faktorn.

Farmaseuttinen koostumus käsittäen Sertoli-soluja sekä niiden käyttö

Tämä keksintö tehtiin Yhdysvaltojen hallituksen tuella apurahalla DK42421, jonka myönsi National Institutes of Health. Yhdysvaltojen hallituksella voi olla tiettyjä oikeuksia tähän keksintöön.

Keksinnön ala

Keho hylkii usein terveiden elinten tai solujen siirrännäisiä sairaudesta kärsiville potilaille immuuni-vasteen vuoksi, joka alkaa vasteena vieraalle kudokselle tai soluille. Tämä keksintö tarjoaa menetelmän solujen siirtämiseksi, jossa luodaan immunologisesti etuoikeutettu paikka, lievittäen täten hylkimistä, joka liittyy tavanomaiseen transplantaatioterapiaan. Erityisesti tämä keksintö kuvaa farmaseuttisen koostumuksen käytettäväksi sairauden hoitoon, joka johtuu biologisen tekijän puutteesta, joka koostumus käsittää Sertoli-soluja ja soluja, jotka tuottavat biologista tekijää. Erityisesti tämä keksintö kuvaa koostumusta, joka on tarkoitettu käytettäväksi sokeritaudin hoitamiseksi siirtämällä haiman Langerhansin saarekesoluja Sertoli-solujen yhteydessä luomaan immunologisesti etuoikeutettu kohta. Menetelmää immunologisesti etuoikeutetun kohdan luomiseksi nisäkkäässä solusiirrännäisiä varten kuvataan enemmän tässä keksinnössä.

Keksinnön tausta

Tietyt krooniset sairaudet tuhoavat funktionaaliset solut sairauden vaivaamissa elimissä. Nisäkkäät, joissa on tällaisia sairauksia, eivät usein pysty tuottamaan proteiineja tai hormoneja, jotka ovat tarpeen homeostaasin säilyttämiseksi, ja vaativat yleensä lukuisia eksogeenisiä aineita selviytyäkseen. Terveiden elinten tai solujen siirtäminen nisäkkääseen, joka kärsii tällaisesta sai-raudesta, voi olla tarpeen nisäkkään hengen pelastamiseksi. Tämän tyyppistä terapiaa pidetään yleisesti viimeisenä vaihtoehtona muuten kuolemaan johtavan sairaustilan parantamiseksi. Keho kuitenkin usein hylkii tällaisia siirrännäisiä johtuen im-

muunivasteesta, joka alkaa vasteena vieraalle kudoksella tai soluille. Nykyään ainoa turvautuminen taistelemaan tätä immuunivastetta vastaan on antaa kroonisia ei-spesifisiä immunosupressioaineita. Valitettavasti tämä vain vaihtaa yhden kroonisen sairauden komplikaatiot toisiin komplikaatioihin, joita immunosupressioaine aiheuttaa.

Yksi sairaus, jota tiedemiehet ovat yrittäneet hoitaa elin- ja/tai solusiirrännäisillä erittäin rajoittuneella onnistumisella, on sokeritauti. Sokeritauti on yleinen degeneratiivinen sairaus nisäkkäissä. Sille on tunnusomaista insuliinierityksen suhteellinen tai täydellinen puute beta-soluilla haiman Langerhansin saarekkeissa tai puutteellisilla insuliinireseptoreilla.

Tämä insuliinin puute estää veren glukoositasojen normaalia säätelyä ja johtaa usein hyperglykemiaan ja ketoasidoosiin. Nisäkkäälle annettuna insuliini edistää glukoosin käyttöä, proteiinisynteesiä, neutraalien lipidien muodostumista ja varastointia ja tiettyjen solutyyppien kasvua.

Yksinomaan Yhdysvalloissa on noin 13 miljoonaa diabeetikkoa. Näistä 2,6 miljoonaa on insuliinista riippuvaisia diabeetikkoja. Drug Market Dev., 4:210 (1994). Terveydenhuoltoanalyytikot arvioivat, että diabeteksen kustannukset ovat 92 miljardia dollaria vuodessa, mikä aiheutuu lääkekuluista ja menetetystä tuottavuudesta.

Diabeteksen erilaisia muotoja on järjestetty kategoriasarjoiksi, jonka kehitti National Insitutes of Healthin National Diabetes Data Group. Tyypin I diabetes tässä luokituskaaviossa käsittää potilaat, jotka ovat riippuvaisia insuliinista ketoosin ehkäisemistä varten. Tätä diabeetikkojen ryhmää kutsuttiin aikaisemmin nuoruusiän diabetekseksi, brittle-diabetekseksi tai ketoosiin taipuvaiseksi diabetekseksi. Tyypin I diabeteksen aiheuttaa autoimuunireaktio, joka aiheuttaa beta-solujen täydellisen tuhoutumisen.

Tyypin II diabetes luokitellaan aikuisiän diabeetikoina. Diabeettipotilas voi olla tai ei ole insuliinista riippuvainen. Tyypin II diabeteksen voi aiheuttaa lukuisat

tekijät. Useimmille nisäkkäille, joilla on tyypin II diabetes, beta-saarekesolut ovat puutteellisia insuliinin erityksessä.

Nykyisin käytetään monia terapioita hoitamaan diabetestä, kullakin on kuitenkin rajoituksensa. Suurin ongelma, joka kohtaa useimpia potilaita, joilla on sokeritauti, on että nykyisin käytettävissä olevat terapiat eivät onnistu ehkäisemään sairausprosessin komplikaatioita. Yleisin tyypin I diabeteksen hoitomenetelmä nisäkkäillä on insuliinin endogeenisen lähteen tarjoaminen, kuten sian, naudan tai ihmisen insuliini. Insuliini-injektioterapia ehkäisee vakavan hyperglykemian ja ketoasidoosin, mutta ei täysin normalisoi veren glukoositasoja. Tämä hoito edelleen epäonnistuu ehkäisemään sairausprosessin komplikaatioita, mukaan lukien ennenaikaisen verisuonien huonontumisen. Ennenaikainen verisuonien huonontuminen on diabetespotilaiden johtava sairastavuuden syy. Lisäksi komplikaatioihin, jotka johtuvat pitkäaikaisesta diabeteksestä, kuuluvat munuaisten vajaatoiminta, verkkokalvon huonontuminen, angina pectoris, valtimonkovetustauti, myokardiaalinen infarkti ja perifeerinen neuropatia.

Toinen menetelmä diabeteksen hoitamiseksi on siirtämällä haima samalla, kun annetaan kroonisia ei-spesifisiä immunosupressioaineita. Tätä hoitoa annetaan yleensä yksilölle, jolla on pitkälle edennyt diabetes, kuten yksilölle, jolla on munuaisten vajaatoiminta. Koko haiman siirtäminen voidaan tehdä onnistuneesti 75 %:n yhden vuoden eloonjäämisprosentilla, mutta haiman kirurginen siirtäminen on erittäin vaikeaa. Lisäksi koska koko elin täytyy luovuttaa, ainoa käyttökelpoinen lähde on kuollut luovuttaja. Lisäksi kun syklosporiinia, yleisin elinsiirränäisiä varten käytetty immunosupressiivinen lääke, annetaan annoksessa, joka on tarpeen tukahduttamaan immuunivaste, lääke inhiboi haimasolun toimintaa. Lisäksi steroidit, joita annetaan usein elinsiirrännäisen kanssa, tekevät usein potilaasta diabeettisen.

Kolmas hoito käsittää Langerhansin saarekesolujen siirtämisen diabetes-potilaaseen. Saarekesiirrännäinen on

yleensä epäonnistunut johtuen saarekesiirrännäisten agressiivisesta immuunihyljinnästä. (Gray, 1991, Immunology Letters 29:153; Jung et al., 1990, Seminars in Surgical Oncology 6:122). Erityisesti, eristettyjen haiman saarekesolujen onnistunut siirtäminen on ollut erittäin vaikea saada aikaan johtuen immunosuppressiivisten lääkkeiden, joita vaaditaan ehkäisemään siirtämistä seuraavaa solujen hylkimistä, kroonisesta antamisesta. Nämä immunosupressiivisten lääkkeiden annokset voivat aiheuttaa lisääntynyttä alttiutta infektiolle, kohonnutta verenpainetta, munuaisten vajaatoimintaa ja kasvainten kasvua. Lisäksi, toisin kuin useimmat elinsiirrännäiset, saarekesolujen täytyy kasvattaa oma verilähteensä implantaation jälkeen isännässä, jotta solut selviytyisivät. Tavanomaiset siirrännäistekniikat eivät tarjoa tarpeellisia tekijöitä stimuloimaan uusien verisuonien tuotantoa.

Tämä keksintö vähentää monia ongelmia, jotka liittyvät nykyisiin terapioihin kroonisia sairauksia varten, jotka tuhoavat elintärkeiden elinten toiminnallisia soluja. Erityisesti tämä keksintö ratkaisee ongelmat, jotka liittyvät tavanomaisiin terapioihin sokeritautia varten, tarjoamalla koostumuksia, joita voidaan käyttää haiman saarekesolujen siirtämiseksi diabeettiseen nisäkkääseen, jonka avulla solusiirrännäiset tuottavat insuliinia diabeettisessä nisäkkäässä. Tämä keksijä on aikaisemmin osoittanut saarekesolujen allotransplantaattien ja vierassiirrännäisten laajaa toiminnallista selviytymistä kiveksessä. (Selawry et al, 1989, Diabetes 38:220). Yllättäen on havaittu tämän keksinnön mukaisesti, että immunologisesti etuoikeutettu kohta voidaan luoda nisäkkäässä siirtämällä Sertoli-soluja ei-kiveskohtaan nisäkkäässä. Juuri luotu immunologisesti etuoikeutettu kohta sallii solujen, jotka tuottavat biologisia tekijöitä, jotka ovat käyttökelpoisia sairauksien hoidossa, erityisesti diabeteksen, siirtämisen ja eloonjäämisen.

Keksinnön yhteenveto

Tämä keksintö koskee farmaseuttista koostumusta käytettäväksi sairauden hoitamiseksi, joka johtuu biologisen

tekijän puutteesta nisäkkäässä, joka koostumus käsittää Sertoli-soluja ja soluja, jotka tuottavat biologista tekijää. Edullisessa toteutusmuodossa biologinen tekijä on hormoni.

Edullisemmassa toteutusmuodossa sairaus on sokeritauti, tekijää tuottavat solut ovat haiman saarekesoluja ja tekijä on insuliini.

Vielä yhdessä toteutusmuodossa solut, jotka tuottavat biologisia tekijöitä, ovat soluja, joita on geneettisesti manipuloitu, esimerkiksi transformaatiolla nukleiinihapon kanssa, joka ilmentää biologista tekijää.

Tämä keksintö koskee edelleen koostumusta käytettäväksi sokeritaudin hoitamiseksi nisäkkäässä, joka koostumus käsittää haiman saarekesoluja ja Sertoli-soluja. Edullisessa toteutusmuodossa koostumus on formuloitu annettavaksi transplantaatiolla.

Tämän keksinnön toinen aspekti suunnataan Sertoli-solujen ja terapeuttisesti tehokkaan määrän haiman Langerhansin saarekesolujen käyttöön lääkkeen valmistamiseksi diabeteksen hoitamiseksi nisäkkäässä, jolloin Sertoli-solujen määrä lääkkeessä on riittävä immunologisesti etuoikeutetun kohdan luomiseksi nisäkkäässä.

Tämä keksintö tarjoaa edelleen lokeroidun kokoonpanon, joka sisältää Sertoli-soluja ja soluja, jotka tuottavat biologista tekijää. Tarjotaan myös valmistusartikkeli, joka käsittää pakkausmateriaalin ja Sertoli-soluja, sisällytettynä pakkaukseen.

Piirrosten lyhyt kuvaus

Kuvio 1 esittää glukoosivasteet oraalisille sustakaalitoleranssikokeille, jotka tehtiin apinalla "Lucky" aikavälein ennen haimanpoistoleikkausta (Lucky-pre); haimanpoistoleikkauksen jälkeen, mutta ennen transplantaatioita (Lucky-post); ja aikavälein transplantaation jälkeen (143, 730 ja 930 vrk, vastaavasti).

Kuvio 2 esittää C-peptidivasteet oraaliselle sustakaalitoleranssikokeelle samoilla aikaväleillä kuin kuviossa 1 on kuvattu.

Kuvio 3 esittää glukoosivasteet oraalisille sustakaalitoleranssikokeille apinassa "Oscar".

Kuvio 4 esittää glukoosivasteet samassa eläimessä ja samoilla aikaväleillä kuin kuviolle 3 esitetään.

Kuvio 5a ja 5b esittää kiveksensisäisten saarekeallotransplantaattien vaikutuksen seerumin glukoositasoihin ja insuliinivasteet oraaliselle glukoosille spontaanisti diabeettisissa BB/Wor dp -rotissa. Kuvio 5a esittää plasman glukoosipitoisuudet (mg/dl) vasteessa oraaliselle glukoosin antamiselle 2 g/kg 50-%:ista glukoosiliuosta kolmessa ryhmässä rottia: hoitamattomat kontrolli Sprague Dawley, transplantoidut diabeettiset BB/Wor dp ja insuliinilla hoidetut diabeettiset BB/Wor dp -rotat. Kuvio 5b esittää seerumin insuliinitasot vasteessa samalle annokselle oraalista glukoosia hoitamattomissa kontrolli Sprague Dawley ja transplantoiduissa BB/Wor dp -rotissa.

Kuviot 6a ja 6b esittävät kiveksensisäisten saarekeallotransplantaattien vaikutuksen plasmaglukagonin eritysvasteilla oraaliseen glukoosiin ja glukoosin ja glipitsidin yhdistelmään spontaanisti diabeettisissa BB/Wor dp -rotissa. Kuvio 6a esittää plasman glukagonivasteet 2 g/kg 50-%:isen glukoosiliuoksen oraaliselle antamiselle kolmessa ryhmässä rottia: hoitamattomat kontrolli Sprague Dawley, transplantoidut diabeettiset BB/Wor dp ja insuliinilla hoidetut diabeettiset BB/Wor dp -rotat. Kuvio 6b esittää plasman glukagonivasteet 7 mg/kg glipitsidiä ja 2 g/kg 50-%:ista glukoosiliuosta oraaliselle antamiselle, annettuna 30 minuuttia myöhemmin, kolmessa ryhmässä rottia: hoitamattomat kontrolli Sprague Dawley, transplantoidut diabeettiset BB/Wor dp ja insuliinilla hoidetut diabeettiset BB/Wor dp -rotat. Tietopisteet ovat kahdeksan eläimen keskiarvo ± SE kussakin ryhmässä.

Kuvio 7 esittää valomikroskooppikuvan haiman Langerhansin saarekkeista ja eristetyistä rotan Sertoli-soluista, jotka on siirretty diabeettisen rotan munuaisen subkapsulaariseen tilaan.

Kuvio 8 esittää siirretyssä saarekkeessa olevan yksittäisen solun elektronimikroskooppikuvan.

Kuvio 9 esittää elektronimikroskooppikuvan saarekkeen ulkoisten solujen, jotka on merkitty "S" kuviossa 7, hienosta rakenteesta.

Kuvio 10 esittää porsaan saarekkeiden ja Sertoli-solujen siirtämisen munuaiskapselin alapuolelle vaikutuksen seitsemän siirrännäisen saaneen naarasrottavastaanottajan keskimääräiseen vuorokauden virtsan ulostuloon. Kukin pylväs esittää keskimääräistä vuorokauden virtsan ulostuloa 10 vuorokauden jakson aikana transplantaation jälkeen.

Kuvio 11 esittää porsaan saarekkeiden ja Sertoli-solujen siirtämisen ihon alle vaikutuksen kolmen rotan keskimääräisiin vuorokauden virtsatilavuuksiin 50 vuorokauden jakson aikana.

Kuvio 12 esittää valomikrovalokuvan porsaan Langerhansin saarekkeista ja rotan Sertoli-soluista, jotka on siirretty diabeettisen rotan munuaisen subkapsulaariseen tilaan. IL esittää beta-solujen saarekkeiden (IL) läsnäolon ympäröitynä pienten lymfosyyttien tunkeutumisella munuaiskapselin (K) alle; B (ylhäällä vasemmalla) esittää suuremmassa suurennoksessa, että saarekkeet (IL) koostuvat beta-soluista, ja B (alhaalla oikealla) osoittaa, että beta-solut sisältävät karakteristisia insuliinijyväsiä.

Keksinnön yksityiskohtainen kuvaus

Tämä keksintö suunnataan farmaseuttiseen koostumukseen sairauden hoitamiseksi, joka johtuu biologisen tekijän puutteesta nisäkkäissä, joka koostumus käsittää Sertoli-soluja ja soluja, jotka tuottavat biologista tekijää. Kuten tällä keksinnöllä on määritelty, biologinen tekijä on proteiini- tai ei-proteiiniyhdiste, joka on välttämätön solumetabolialle ja homeostaasille. Edullisessa toteutusmuodossa

biologinen tekijä on hormoni. Hormonia tuottaviin soluihin, jotka voidaan antaa käyttäen tässä keksinnössä kuvattua menetelmää, kuuluvat esimerkiksi haiman Langerhansin saareke-, aivolisäke-, maksa-, lisäkilpirauhas- ja kilpirauhassolut.

Tämän keksinnön mukaisesti Sertoli-solut ja solut, jotka tuottavat biologista tekijää, voivat olla samasta lajista kuin hoidettava nisäkäs tai eri lajista. Lisäksi Sertoli-soluja ja soluja, jotka tuottavat biologista tekijää, ei tarvitse johtaa samasta lajista. On osoitettu tämän keksinnön mukaisesti, että Sertoli-soluja sioista yhdessä Langerhansin saarekkeen sioista kanssa voidaan käyttää sokeritaudin hoidossa rotissa. Edullisessa toteutusmuodossa Sertoli-solut ovat naudan, sian tai ihmisen.

Sertoli-solut, jotka ovat vallitsevia uroksen kivesten soluja ja joita käytetään tässä keksinnössä kuvatussa menetelmässä, voidaan erottaa muista kivessoluista, kuten Leydig-soluista, siementiehyitä ympäröivistä soluista ja sukusoluista, käyttäen tavanomaisia tekniikoita. Esimerkiksi urosnisäkkään kivekset, kuten karjun tai pässin, otetaan ensin talteen kuohitsemalla. Sitten kivekset pilkotaan useisiin paloihin ja myöhemmin pestään sentrifugoimalla.

Kiveksen Leydig-solut voidaan poistaa kudossuspensiosta käyttäen digestointiaineita, kuten trypsiiniä ha DNaasia. Jäljelle jäävä solususpensio pestään sitten sentrifugoimalla useita kertoja. Pelletti suspendoidaan uudelleen kollagenaasiin, inkuboidaan ja pestään sentrifugoimalla, jolloin eliminoidaan kiveksissä olevat siementiehyitä ympäröivät solut. Kivessukusolut voidaan poistaa inkuboimalla pellettiä hyaluronidaasin ja DNaasin kanssa. Useiden sentrifugointipesujen jälkeen Sertoli-solut voidaan ottaa talteen siirtämistä varten käyttäen tämän keksinnön menetelmää.

Tämän keksinnön mukaisesti biologinen tekijä on proteiini- tai ei-proteiiniyhdiste, joka on poissa, puuttuva tai muuttunut sairaustilassa. Solut, jotka tuottavat biologista tekijää, voidaan eristää esimerkiksi poistamalla nisäkkäästä ensin kirurgisesti kudos, joka tuottaa tekijää. Tämä

kudos pilkotaan myöhemmin ja digestoidaan käyttäen tavanomaisia tekniikoita. Esimerkiksi kudos voidaan digestoida käyttäen kollagenaasidigestointia. Tiettyä tekijää tuottavat solut voidaan myöhemmin ottaa talteen digestointiseoksesta käyttäen erotusgradienttia, kuten Ficoll-gradienttia. Sitten tekijää tuottavia soluja kasvatetaan kudosviljelmässä seerumissa käyttäen tavanomaisia tekniikoita. Tekijää tuottavia soluja voidaan viljellä yhdessä Sertoli-solujen kanssa kudosviljelmässä. Kudosviljelmässä kasvatetut solut voidaan siirtää nisäkkääseen Sertoli-solujen yhteydessä käyttäen tämän keksinnön menetelmää. Tämän keksinnön mukaisesti tekijää tuottavat solut voidaan varastoida käyttäen erilaisia tavanomaisia menetelmiä, kuten solujen kylmäsäilöntää ennen kudosviljelmässä kasvatusta myöhempää transplantaatiota varten. On havaittu tämän keksinnön mukaisesti, että Sertoli-solut, joita viljellään yhdessä tekijää tuottavien solujen kanssa, kuten saarekesolujen, lisäävät solujen jakautumista ja tekijää tuottavien solujen toipumisnopeutta kudosviljelmässä ja erityisesti lisäävät tekijää tuottavien solujen toipumisnopeutta ja jakautumista, jotka solut on aikaisemmin varastoitu käyttäen tekniikoita, kuten kylmäsäilöntää.

Edullisessa toteutusmuodossa tekijä on hormoni, ja hormonia tuottavat solut eristetään kudoslähteestä, kuten edellä on kuvattu. Esimerkiksi insuliinia tuottavat solut eristetään haimasta. Toisessa edullisessa toteutusmuodossa tekijää tuottavat solut tarjotaan muuttamalla sopivat isäntäsolut nukleiinihapolla, joka pystyy ilmentämään kiinnostavaa tekijää. Muutetut solut tarjotaan alan ammattimiehen tuntemilla menetelmillä, ja ne voidaan löytää lukemattomista oppikirjoista ja laboratorionisäkkäistä, mukaan lukien julkaisun Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Mammal, Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring, New York. Jos tarpeen, nukleiinihappo, joka koodaa kiinnostavaa tekijää, voidaan muokata alan ammattimiehen tuntemilla menetelmillä vaikuttamaan tekijän eritykseen muutetusta solusta. Sertoli-solujen käyttö tekijää tuottavien solujen yhteydessä

tämän keksinnön menetelmän mukaisesti sallii immunologisesti etuoikeutetun kohdan tuottamisen hoidettavassa nisäkkäässä.

Tekijää tuottavien solujen ja Sertoli-solujen antaminen nisäkkääseen suoritetaan tavanomaisilla tekniikoilla. Edullisessa toteutusmuodossa antaminen tapahtuu transplantaatiolla ja tekijää tuottavat solut injektoidaan nisäkkääseen samanaikaisesti tai heti Sertoli-solujen injektion jälkeen samaan kohtaan. Tämän keksinnön mukaisesti eksogeenista biologista tekijää voidaan antaa tekijää tuottavien solujen ja Sertoli-solujen siirtämisen jälkeen kunnes siirretyt solut tuottavat terapeuttisesti tehokkaan määrän biologista tekijää. Diabeteksen hoitamiseksi, esimerkiksi insuliinia voidaan antaa haiman saarekesolujen ja Sertoli-solujen siirtämisen jälkeen, kunnes siirretyt saarekesolut tuottavat terapeuttisesti tehokkaan määrän insuliinia.

Tämän keksinnön Sertoli-solut ja tekijää tuottavat solut voidaan siirtää käyttäen mitä tahansa tekniikkaa, joka pystyy viemään solut nisäkkääseen, kuten parenteraalista antamista tai ihonalaista antamista kirurgisen altistuksen jälkeen halutulle kohdalle. Ennen transplantaatiota vastaanottajanisäkäs nukutetaan käyttäen paikallispuudutusta tai yleisnukutusta tavanomaisen tekniikan mukaisesti. Edullisessa toteutusmuodossa hoidettava nisäkäs on ihminen. Toisessa toteutusmuodossa tämä menetelmä sairauden hoitamiseksi käsittää lisäksi immunosupressiivisen aineen antamisen, kuten esimerkiksi syklosporiinin, takrolimuksen, despergualiinin ja monoklonaalisten vasta-aineiden, esim. T-soluihin. Edullisessa toteutusmuodossa immunosupressiivinen aine on syklosporiini. Toisessa edullisessa toteutusmuodossa syklosporiini annetaan annoksessa 0,5 - 200 mg/kg kehon paino. Edullisimmassa toteutusmuodossa syklosporiini annetaan annoksessa 5 - 40 mg/kg kehon paino.

On havaittu tämän keksinnön mukaisesti, että Sertoli-solujen ja tekijää tuottavien solujen antaminen johtaa immunologisesti etuoikeutetun kohdan luomiseen hoidettavassa nisäkkäässä. Immunologisesti etuoikeutettu kohta, kuten on

määritelty tällä keksinnöllä, on kohta nisäkkäässä, jossa immuunivaste, joka tuotetaan vasteena siirretyille soluille, estetään johtuen immunosupressiivisista aineista, joita Sertoli-solut tuottavat. Immunologisesti etuoikeutetuille kohdille on tunnusomaista käytettävissä oleva verilähde, jolloin tarjotaan ravintoa siirretyille soluille ja tiiviille kudokselle, jolloin siirretyt solut pidetään toistensa läheisyydessä. Esimerkkeihin immunologisesti etuoikeutetuista kohdista, kuten tässä keksinnössä on määritelty, kuuluvat munuaisen subkapsulaarinen tila, ihonalainen pinta, aivot ja maksaporttilaskimo.

Tämän keksinnön mukaisesti on osoitettu, että Sertoli-solut lisäävät astetta, jolla siirretyt tekijää tuottavat solut suonittuvat transplantoidussa kohdassa. Siksi on osoitettu, että Sertoli-solut (so. relevantit aineet, joita Sertoli-solut tuottavat) edistävät siirrettyjen solujen, esimerkiksi saarekesolujen, lisääntynyttä suonittumisastetta.

Edullisessa toteutusmuodossa tämä keksintö kuvaa farmaseuttista koostumusta sokeritaudin hoitamiseksi, jossa koostumuksessa käytetään Langerhansin saareketta yhdessä Sertoli-solujen kanssa luomaan immunologisesti etuoikeutetun kohdan. Allotranplantaatit, kuten tässä keksinnössä on käytetty, kuvaavat kudosten tai solujen siirtämistä kahden geneettisesti erilaisen saman lajin nisäkkään välillä. Termi vierassiirrännäiset tässä keksinnössä kuvaa kudosten tai solujen siirtämistä kahden eri lajin nisäkkään välillä.

Siirretyt Langerhansin saarekesolut ja Sertoli-solut, joita käytetään tässä keksinnössä kuvatussa koostumuksessa, voidaan valmistaa käyttäen mitä tahansa määrää tavanomaisia tekniikoita. Esimerkiksi Langerhansin saarekesolut voidaan valmistaa useiden saman lajin nisäkkäiden haimoista. Haimat yhdistetään, pilkotaan ja digestoidaan käyttäen kollagenaasia. Langerhansin saarekesolut voidaan edelleen eristää käyttäen tavanomaisia gradientteja. Kun saarekesolut on eristetty, niitä voidaan kasvattaa viljelmässä ja sitten siirtää

yhdessä Sertoli-solujen kanssa luomaan immunoetuoikeutettu kohta.

Sertoli-solut, joita käytetään tässä keksinnössä kuvatussa koostumuksessa, voidaan eristää urosnisäkkään kiveksistä. Saarekesolujen talteen ottamiseksi kivekset pilkotaan ensin useiksi paloiksi ja pestään sitten sentrifugoimalla. Leydig-solut, jotka ovat läsnä raakaseoksessa, voidaan poistaa kudossuspensiosta käyttäen digestointiaineita, kuten trypsiiniä ja DNaasia. Jäljelle jäävä solususpensio pestään sitten sentrifugoimalla useita kertoja. Seuraavaksi pelletti voidaan suspendoida uudelleen kollagenaasiin, inkuboida ja pestä sentrifugoimalla, jolloin eliminoidaan kiveksissä olevat siementiehyitä ympäröivät solut. Kivessukusolut voidaan poistaa inkuboimalla pellettiä hyaluronidaasin ja DNaasin kanssa. Useiden sentrifugointipesujen jälkeen Sertoli-solut voidaan ottaa talteen transplantaatiota varten.

Sertoli-solut voidaan siirtää luomaan immunoetuoikeutettu kohta nisäkkääseen käyttäen erilaisia tekniikoita. Esimerkiksi kun nisäkäs on nukutettu, Sertoli-solut voidaan injektoida kudosmassaan luoden siten immunoetuoikeutettu kohta.

Sertoli-solut annetaan määrässä, joka on tehokas tarjoamaan immunologisesti etuoikeutetun kohdan. Tällainen tehokas määrä määritellään sellaiseksi, joka estää myöhemmin tai yhdessä annettujen solujen, jotka tuottavat biologista tekijää, immuunihylkimisen. Immuunihylkiminen voidaan määrittää esimerkiksi histologisesti tai solujen tuottaman tekijän funktionaalisella arvioinnilla.

Edullisessa toteutusmuodossa Sertoli-solut annetaan määrissä, jotka vaihtelevat 101 - 1010 soluun. Edullisemmassa totetusmuodossa annetaan 10^5 - 10^{10} solua.

Solut, jotka tuottavat biologista tekijää, annetaan terapeuttisesti tehokkaassa määrässä. Alan ammattimies voi määrittää sopivan määrän soluja, jotka tuottavat biologista tekijää, alalla tunnetuilla menetelmillä. Solujen määrä riippuu solujen tuottaman tekijän määrästä ja tekijän tunnetusta

terapeuttisesti tehokkaasta määrästä, joka on tarpeen hoitamaan sairautta. Esimerkiksi 1 - 1 000 saarekesolua grammaa kehon painoa kohti voidaan antaa hoitamaan diabetestä käyttäen allotransplantaatteja, 20 - 1 000 saarekesolua grammaa kehon painoa kohti voidaan antaa hoitamaan diabetestä käyttäen vierassiirrännäisiä. Toisessa edullisessa toteutusmuodossa 5 - 100 saarekesolua grammaa kehon painoa kohti annetaan hoitamaan diabetestä. Edullisimmassa toteutusmuodossa 5 - 20 saarekesolua grammaa kehon painoa kohti annetaan, käyttäen allotransplantaatteja, ja 100 - 1000 saarekesolua grammaa kehon painoa kohti annetaan vierassiirrännäisille.

Toisessa toteutusmuodossa tämä koostumus diabeteksen hoitamiseksi käsittää edelleen immunosupressiivisen aineen antamisen, kuten esimerkiksi syklosporiinin, takrolimuksen, despergualiinin ja monoklonaalisten vasta-aineiden, esim. T-soluihin. Edullisessa toteutusmuodossa immunusupressiivinen aine on syklosporiini. Toisessa edullisessa toteutusmuodossa syklosporiini annetaan annoksessa 0,5 - 200 mg/kg kehon paino. Edullisimmassa toteutusmuodossa syklosporiini annetaan annoksessa 5 - 40 mg/kg kehon paino.

Yleisemmin, immunosupressiivinen aine voidaan antaa ajan, joka on riittävä sallimaan siirrettyjen saarekkeiden olevan toiminnallisia. Tämä jakso laajenee pisteestä ennen tai heti saarekkeiden siirtämisen jälkeen pisteeseen, jolloin solut pystyvät tuottamaan terapeuttisesti tehokkaat määrät insuliinia. Edullisessa toteutusmuodossa riittävä ajan jakso antamaan immunosupressiivista ainetta on noin 40 - 100 vuorokautta saarekkeiden siirtämisen jälkeen. Edullisemmassa toteutusmuodossa riittävä ajanjakso on noin 50 - 60 vuorokautta.

Tämän keksinnön edullinen toteutusmuoto suunnataan koostumukseen, joka käytetään tyypin I ja tyypin II sokeritaudin hoitamiseksi siirtämällä Langerhansin saareke yhdessä Sertoli-solujen kanssa munuaisen subkapsulaariseen tilaan.

Toisin kuin tunnetussa tekniikassa kuvatut diabetes-terapiat, tässä keksinnössä kuvattu koostumus diabeteksen hoitamiseksi estää sairausprosessin komplikaatioita, eikä johda haitallisiin sivuvaikutuksiin, jotka liittyvät tavanomaiseen diabetes-terapiaan. Lisäksi tässä keksinnössä kuvattu menetelmä saarekesolujen siirtämiseksi tarjoaa välttämättömät tekijät saarekesiirrännäisten verisuonien syntyä varten.

Koostumusta, jota voidaan käyttää immunologisesti etuoikeutetun kohdan luomiseksi nisäkkäässä kuvataan edelleen tällä keksinnöllä. Immunologisesti etuoikeutettu kohta luodaan siirtämällä eristettyjä Sertoli-soluja nisäkkääseen määrässä, joka on tehokas luomaan immunologisesti etuoikeutettu kohta. Edullisessa toteutusmuodossa koostumus on formuloitu antamaan 10^1 - 10^{10} solua. Edullisemmassa toteutusmuodossa koostumus on formuloitu antamaan 10^5 - 10^{10} solua. Edullisessa toteutusmuodossa Sertoli-solut siirretään munuaisen subkapsulaariseen tilaan tai ihonalaiseen pintaan injektiolla. Edullisessa totetusmuodossa nisäkäs on ihminen ja Sertoli-solut ovat ihmisen tai sian.

Kuten tässä on käytetty, farmaseuttisesti hyväksyttävä kantaja käsittää minkä tahansa ja kaikki liuottimet, dispersioväliaineet, päällysteet, bakteerien ja sienten vastaiset aineet, isotoniset aineet ja niiden kaltaiset. Tällaisten väliaineiden ja aineiden käyttö tunnetaan hyvin alalla. Tämä keksintö tutkii edelleen farmaseuttista koostumusta, joka käsittää Sertoli-soluja ja farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan.

Tämä keksintö suunnataan myös kokoonpanoon sairauden hoitamiseksi. Yhdessä toteutusmuodossa kokoonpano on lokeroitu saamaan ensimmäinen säiliö, joka on muokattu sisältämään Sertoli-soluja määrässä, joka on tehokas luomaan immunologisesti etuoikeutettu kohta nisäkkäässä, ja toisen säiliön, joka on muokattu sisältämään terapeuttisesti tehokkaan määrän soluja, jotka tuottavat biologista tekijää, joka on poissa tai puuttuva hoidettavassa sairaudessa. Edullisessa toteu-

tusmuodossa Sertoli-solut ovat naudan, sian tai ihmisen ja ne annetaan määrässä 10^1 - 10^{10} solua. Edullisemmassa toteutusmuodossa Sertoli-solut annetaan määrässä 10^5 - 10^{10} solua. Toisessa edullisessa toteutusmuodossa solut, jotka tuottavat biologista tekijää, ovat soluja, jotka on muutettu DNA:lla, joka koodaa tekijää. Vielä yhdessä edullisessa toteutusmuodossa solut, jotka tuottavat tekijää, ovat haiman saarekesoluja. Saarekesolut annetaan edullisessa määrässä 5 - 200 solua grammaa kehon painoa kohti ja edullisemmassa määrässä 5 - 100 solua grammaa kehon painoa kohti.

Tämä keksintö tarjoaa edelleen valmistusartikkelin, joka käsittää pakkausmateriaalin ja Sertoli-solut sisällytettynä mainittuun pakkausmateriaaliin, jossa mainitut Sertoli-solut ovat tehokkaita luomaan immunologisesti etuoikeutettu kohta nisäkkäässä, ja jossa mainittu pakkausmateriaali sisältää etiketin, joka ilmoittaa, että mainittuja Sertoli-soluja voidaan käyttää luomaan immunologisesti etuoikeutettu kohta nisäkkäässä. Pakkausmateriaali, jota käytetään sisältämään Sertoli-solut, voi käsittää lasia, muovia, metallia tai mitä tahansa muuta sopivaa inerttiä materiaalia.

Havainnollistamaan lisää tätä keksintöä suoritettiin kokeet, jotka on kuvattu seuraavissa esimerkeissä.

Tulisi ymmärtää, että keksintö ei rajoitu tässä kuvattuihin spesifisiin esimerkkeihin tai yksityiskohtiin. Esimerkeissä kuvatuista kokeista saadut tulokset esitetään mukana olevissa kuvissa ja taulukoissa.

Esimerkki 1

Kuudelle koiras Rhesus-apinalle siirrettiin saarekeallotransplantaatteja niiden kiveksiin, jolloin tutkittiin näiden siirrännäisten hengissä pysymistä. Vastaanottajista tehtiin diabeettisia lähes totaalisen haimanpoistoleikkauksen keinoilla, mitä seurasi kaksi viikkoa myöhemmin laskimonsisäinen injektio 35 mg streptotsotosiinia/kg kehon painoa. Tämä menettely johti vaikean sokeritaudin aiheuttamiseen. Plasman glukoositasot olivat ylimäärässä 400 mg/dl ja eläimet olivat ketoottisia. Puutteellinen imeytyminen estettiin VIO-

KASE®:n oraalisella antamisella, yksi tabletti annettiin kahdesti vuorokaudessa ennen kutakin ruokaa.

Saarekkeet eristettiin naaras Rhesus-apinoista. Ensin viiden eläimen haimat poistettiin, yhdistettiin ja pilkottiin hienoksi pienemmiksi palasiksi. Kollageenidigestoinnin jälkeen vesihauteessa 37 °C:ssa saarekkeet erotettiin avoerityskudoksista ja muista solujätteistä ainakin kahdella Ficoll-gradientilla, jotka oli valmistettu peräkkäin. Saarekkeet pestiin kolme kertaa sentrifugoimalla jääkylmässä Hanksin puskurissa ja sitten poimittiin käsin ja siirrettiin 150 ryhmissä biologisen asteen Petri-maljoille. Kukin malja sisälsi 6 ml viljelyväliainetta CMRL-1066, jota oli täydennetty 5 % vasikansikiöseerumilla, glukoosilla pitoisuudessa 250 mg/dl, penisilliinillä (100 U/ml) ja streptomysiinillä (100 µg/ml). Saarekkeiden inkubointi suoritettiin 35 °C:ssa 5-%:isessa CO_2:ssa ja ilmassa 4 - 6 vuorokauden ajan. Saarekkeet siirrettiin tuoreeseen väliaineeseen 48 tunnin aikavälein.

Saarekkeiden elinkykyisyyttä ja laskentaa helpotettiin väriaine ditiitsonin pidättymisen keinoilla. Kukin apina sai keskimäärin noin 10^4 saareketta/kg kehon paino injektoituna molempiin kiveksiin. Ensimmäisissä kolmessa eläimessä kivekset kohotettiin vatsaonteloon, kun taas lopuissa kolmessa vastaanottajassa siirretyt elimet ankkuroitiin nivuskanavaan. Syklosporiinia (CsA) annettiin vaihtelevissa annoksissa ensimmäiselle kolmelle siirrännäisen saaneelle eläimelle 30 vuorokauden jakson aikana, kun taas loput kolme isäntää saivat 7 injektiota CsA:ta (20 mg/kg) vuorokausina -4 ja +3. Oraaliset sustakaalitoleranssikokeet tehtiin päivänä 30 ja sitten aikavälein normoglykeemisissä eläimissä seuraavasti.

Apinat majoitettiin yksittäin häkkeihin ja niille annettiin standardi apinaruokaa ja hedelmiä kahdesti vuorokaudessa. Lisäksi haimaentsyymi sekoitettiin ruuan kanssa, koska apinoille oli tehty haimanpoistoleikkaus niiden tekemiseksi diabeettisiksi ennen transplantaatiota.

Koetta edeltävänä yönä eläimiä paastotettiin 12 tunnin ajan. Seuraavana aamuna klo 8 ne sitten nukutettiin ja

valmistettiin koeateriaa varten. Sustakaalia käytettiin koeaineena. Sustakaali koostuu hiilihydraattien, proteiinien ja rasvan fysiologisesta seoksesta, joka jäljittelee läheisesti standardiateriaa ja joka on voimakas ärsyke insuliinin vapautumista varten.

Sustakaali injektoitiin suoraan nukkuvan eläimen vatsaan nenämahalaukkuputken kautta. Verinäytteet saatiin sitten 0, 15, 30, 60, 90, 120 ja 180 minuutin kuluttua. Näytteet sentrifugoitiin ja seerumia varastoitiin -20 °C:ssa, kunnes mittaukset insuliinia ja C-peptidiä varten voitiin suorittaa. C-peptidi on erittäin herkkä leima beta-solutoiminnalle. Tulokset esitetään kuvissa 1 - 4.

Kuvio 1 esittää glukoosivasteen oraalisille sustakaalitoleranssikokeille, jotka tehtiin apinalla "Lucky" aikaväleillä ennen haimanpoistoleikkausta (Lucky-pre); haimanpoistoleikkauksen jälkeen, mutta ennen transplantaatiota (Lucky-post); ja aikavälein transplantaation jälkeen (143, 730 ja 930 vrk, vastaavasti).

Voidaan helposti ymmärtää, että eläimestä tuli vaikeasti diabeettinen sen haiman poiston jälkeen (Lucky-post). Transplantaation jälkeen glukoosivasteet palautuivat normaaleille tasoille kaikissa mitatuissa aikaväleissä (143, 730 ja 930 vuorokautta transplantaation jälkeen). Lucky ei osoittanut todisteita siirrännäisen epäonnistumisesta. Siirrännäisen epäonnistumisessa glukoositasoista tulisi kohonneita ja lähestyisivät niitä, jotka havaittiin sen haimanpoistoleikkauksen jälkeen.

Kuvio 2 esittää C-peptidivasteet oraaliselle sustakaalitoleranssikokeelle samoilla aikaväleillä kuin kuviossa 1 on esitetty. Haimanpoistoleikkauksen jälkeen C-peptidivasteista tuli heikentyneitä, mikä osoittaa vaikeaa diabetestä. Mutta transplantaation jälkeen tasot eivät vain palautuneet normaaleiksi, vaan näyttivät osoittavan "ylireagoivaa" C-peptidin vapautumisen mallia ja tasot, jotka tehtiin 730 vuorokautena, ylittivät normaalit tasot kaikissa mitatuissa pisteissä. Kohonneet tasot voivat johtua siitä tosiasiasta, että

kiveksestä vapautunut insuliini menee systeemiseen verenkiertoon. Vastakohtana haimasta vapautunut insuliini menee porttilaskimoon ja kulkeutuu heti maksaan, jossa noin 60 % hajotetaan ensimmäisen kauttakulun aikana. Systeemiseen verenkiertoon vapautunut insuliini saavuttaa maksan paljon myöhemmin, siitä kohonneet tasot. Kuten glukoosipitoisuuksien tutkimuksessa oli ilmeistä, C-peptidivasteet eivät osoittaneet todisteita epäonnistumisesta 30 kuukautta transplantaation jälkeen.

Kuvio 3 osoittaa glukoosivasteet oraaliselle sustakaalitoleranssikokeille apinassa "Oscar". Haiman poiston jälkeen siitä tuli vaikeasti diabeettinen kohonneilla glukoositasoillaan. Saarekkeiden siirtämisen jälkeen glukoosivasteista tuli samanlaisia kuin niistä, jotka on määritetty ennen haiman poistoa. Glukoositasot säilyvät normaaleilla tasoilla 32 kuukautta transplantaation jälkeen.

Kuvio 4 esittää C-peptidivasteet samassa eläimessä ja samoilla aikaväleillä kuin kuviolle 3 on kuvattu. Eläimestä tuli hyvin diabeettinen sen haiman poiston jälkeen ja tuloksena se osoittaa heikentyneitä C-peptidivasteita. Transplantaation jälkeen ja seuraavat 730 vuorokautta C-peptidivasteet olivat suurempia verrattuna normaaleihin. 930 vuorokautena transplantaation jälkeen C-peptidivasteista on tullut jonkin verran pienempiä verrattuna normaaleihin. Huolimatta jonkin verran alemmista C-peptiditasoista eläin säilyy normoglykeemisenä.

Tämä esimerkki osoittaa, että kädellisille voidaan onnistuneesti siirtää kiveksensisäisiä saarekeallotransplantaatteja ilman, että tarvitaan jatkuvaa immunosupressiota, ja että kiveksensisäisten saarekeallotransplantaattien toiminnallinen kokonaisuus säilyy yli kahden vuoden jaksojen ajan ilman todisteita siirrännäisen epäonnistumisesta.

Esimerkki 2

Tämä tutkimus tutki insuliinin ja glukagonin eritysmalleja spontaanisti diabeettisissa bb/Wor dp -rotissa, joille oli siirretty vatsa-, kiveksensisäisiä, saarekesiirrännäi-

siä. Diabeettiset BB/Wor dp -rotat saivat kiveksensisäiset saarekesiirrännäiset MHC-yhteensopivilta BB/Wor dr -rotilta eivätkä lainkaan immunosupressiota. 74 ± 15 vuorokauden normoglykemian jakson jälkeen kolmelle eri ryhmälle (kontrollit; BB/Wor dp siirrännäisen saaneet; ja BB/Wor dp insuliinilla hoidetut) annettiin seuraavat ärsykkeet; (1) oraalinen glukoositoleranssikoe (OGTT), (2) yksittäinen oraalinen annos glipitsidiä, minkä jälkeen OGTT, ja (3) arginiini laskimonsisäisellä infuusiolla. Tämän tutkimuksen tulokset esitetään taulukoissa 1 ja 2 ja kuvissa 5 ja 6.

Taulukko 1

Metaboliset parametrit ja immunoreaktiiviset seerumin insuliini- ja glukagonitasot kontrollissa ja siirrännäisen saaneissa ja insuliinilla hoidetuissa BB/Wor dp -rotissa

	Kontrollit	**BB/Wor dp siirrännäisen saaneet***	**BB/Wor dp insuliinilla hoidetut**
Plasmaglukoosi (mg/dl): ennen terapiaa	112 ± 5	502 ± 8+	510 ± 13+
2,5 kuukauden jälkeen	97 ± 4	110 ± 3	350 ± 40 #
Kesto p.t. OGTT (vrk)	75 ± 6	70 ± 11	78 ± 19
Painon lisäys (g)	120 ± 6	105 ± 17	48 ± 14 $
Paaston plasmainsuliini (µU/ml)	21,9 ± 3	20,4 ± 2	ND
Paaston plasmaglukagoni (pg/ml)	37,8 ± 5,7	43,4 ± 4,6	47,4 ± 4,9

*Normoglykemian kesto siirränäisen saamisen jälkeen (vrk) = 279 ± 25;
+P < 0,0001 vs. kontrolli;
#P < 0,0001 vs. siirrännäisen saanut;
$P < 0,02 vs. siirrännäisen saanut.

Taulukko 2

Haiman ja kivesten insuliini- ja glukagonipitoisuus kontrollissa ja siirrännäisen saaneissa ja insuliinilla hoidetuissa BB/Wor dp -rotissa

	Kontrollit	**BB/Wor dp siirrännäisen saaneet**	**BB/Wor dp insuliinilla hoidetut**
Haima (mg)	1573 ± 171	757 ± 122	920 ± 32
Insuliini (µg/g)	66 ± 5,03	0,58 ± 0,18	0,76 ± 0,12
Glukagoni (ng/mg)	4,1 ± 0,35*	4,9 ± 0,33**	6,9 ± 0,80
Kivesfraktiot: (mg)	493 ± 49,6	582 ± 59,2	430 ± 28,0
Insuliini (µg/g)	0,0	59,70 ± 0,49	0,0
Glukagoni (ng/mg)	0,0	1,4 ± 3,7	0,0

*P < 0,03 ja
**P < 0,08, vs. diabeettinen vastaavasti.

Kuvio 5 esittää kiveksensisäisten saarekeallotransplantaattien vaikutuksen seerumin glukoosi- ja insuliinivasteisiin oraaliselle glukoosille spontaanisti diabeettisissa BB/Wor dp -rotissa. Kuvio 6 esittää kiveksensisäisten saarekeallotransplantaattien vaikutuksen plasman glukagonieritys-

vasteisiin oraaliselle glukoosille ja glukoosin plus glipitsidin yhdistelmälle spontaanisti diabeettisissa BB/Wor dp -rotissa. Tämä koe osoittaa, että transplantoidut kivekset spontaanisti diabeettisissa BB/Wor dp -rotissa sisältävät sekä alfa- että beta-soluja ja että alfa- ja beta-soluilla on kyky vastata spesifisiin eritystä lisääviin aineisiin itsenäisesti.

Esimerkki 3

Tämä tutkimus tutki Sertoli-soluilla parannetun fraktion (SEF) vaikutusta saarekeallotransplantaatin eloonjäämiseen diabeettisten rottien munuaisen subkapsulaarisessa tilassa.

Tässä tutkimuksessa käytetyt eläimet olivat PVG-rottia, jotka painoivat 150 - 200 g. Diabetes aiheutettiin yksittäisen laskimonsisäisen injektion keinoilla, 65 mg/dl streptotsotosiinia. Vain rotat, joiden plasman glukoositasot olivat ylimäärässä 400 mg/dl, transplantoitiin. Sprague Dawley (S-D) etäissiitettyjä -rottia käytettiin saarekkeen luovuttajina. Sertoli-solun luovuttajina käytettiin 16 - 18 vuorokauden ikäisiä joko PVG- tai S-D-rottia.

Saarekkeen valmistus

Saarekkeet valmistettiin London et al. (1990) Transplantation, 49:1109-1113 menetelmän modifikaation mukaisesti. Saarekkeet puhdistettiin Ficoll-gradienteilla ja eristettyjä soluja inkuboitiin sitten 4 vuorokautta 37 °C:ssa kostutetussa 5-%:isen CO_2:n ja ilman atmosfäärissä ennen käyttöä. Mitään erityisiä yrityksiä tyhjentää saarekkeet kontaminoivista matkustajaleukosyyteistä ei tehty.

Sertoli-soluilla parannetun fraktion valmistus

Hyvin puhdistetut Sertoli-solujen valmisteet eristettiin nuorten urosten kiveksistä Cheng et al., J. Biol. Chem., 26:12768-12779, menetelmän mukaisesti. Kivekset poistettiin, pilkottiin useiksi paloiksi ja asetettiin 50 ml kartiomaiseen putkeen, joka sisälsi 50 ml Hamin F12/DMEM väliainetta. Palo-ja pestiin kerran sentrifugoimalla kierrosnopeudella 800 x g 2 minuutin ajan. Supernatantti aspiroitiin ja kudos suspen-

doitiin uudelleen 40 ml:aan väliainetta, joka sisälsi 40 mg trypsiiniä ja 0,8 mg DNaasia steriilissä 250 ml:n erlenmeyerkolvissa. Kolvi asetettiin 37 °C:n oskilloivaan inkubaattoriin 60 - 90 värähtelyä/min 30 minuutin ajan. Tämä vaihe poisti Leydig-solut. Tiehyet siirrettiin sitten 50 ml:n kartiomaiseen putkeen ja sentrifugoitiin kierrosnopeudella 800 x g 2 minuutin ajan. Supernatanttifraktio aspiroitiin ja pelletti suspendoitiin uudelleen 40 ml:aan 1 M glysiiniä, 2 mM EDTA:ta, joka sisälsi 0,01 % soijapaputrypsiini-inhibiittoria ja 0,8 mg DNaasia, ja inkuboitiin huoneenlämpötilassa 10 minuutin ajan. Tämä vaihe liuotti kaikki jäljelle jääneet Leydig-solut. Soluja pestiin sentrifugoimalla 2 minuutin ajan ja vaihe toistettiin kahdesti, tai kunnes väliaine ei enää ollut samea. Pelletti suspendoitiin uudelleen homogenisoimalla varovasti lasisella pasteur-pipetillä 40 ml:ssa väliainetta, joka sisälsi 20 mg kollagenaasia erlenmeyerkolvissa, ja inkuboitiin 37 °C:ssa 5 minuutin ajan 60 - 90 värähtelyä/min. Solususpensiota sentrifugoitiin kierrosnopeudella 800 x g kahden minuutin ajan ja pelletti suspendoitiin uudelleen homogenisoimalla varovasti lasisella pasteur-pipetillä 40 ml:ssa väliainetta, joka sisälsi 40 mg kollagenaasia ja 0,2 mg DNaasia erlenmeyerkolvissa, ja inkuboitiin 37 °C:ssa 30 minuutin ajan 60 - 90 värähtelyä/min. Sitten solut pestiin sentrifugoimalla 2 minuutin ajan, ja menettelyä toistettiin ainakin kolme kertaa, jolloin eliminoitiin siementiehyitä ympäröivät solut. Solut suspendoitiin uudelleen homogenisoimalla varovasti lasisella pasteur-pipetillä 40 ml:ssa väliainetta, joka sisälsi 40 mg hyaluronidaasia ja 0,2 mg DNaasia, ja inkuboitiin 37 °C:ssa 30 minuutin ajan 60 - 90 värähtelyä/min. Solut pelletoitiin lempeällä sentrifugoinnilla 2 minuutin ajan ja pestiin ainakin viisi kertaa, jolloin eliminoitiin sukusolut. Saatu SEF suspendoitiin uudelleen 0,25 ml:aan väliainetta ja siirrettiin heti vastaanottajarottaan. Kukin siirrännäisen saanut rotta sai ekvivalentin kokonaismäärän Sertoli-soluja sisällytettynä yksittäiseen kivekseen.

Rottien transplantaatio

Diabeettinen rotta nukutettiin metoksifluraanilla USP steriilissä vetokaapissa ja jätettiin kylki avattuna, jolloin paljastettiin munuainen. Sertolilla parannettu fraktio, joka sisälsi noin 5 miljoonaa Sertoli-solua, injektoitiin ensin munuaiskapselin alle. Solut voitiin nähdä maitomaisena kuplana kapselin alla. Heti jälkeenpäin yhteensä 10 saareketta/g kehon paino injektoitiin samaan maitomaiseen kuplaan. Neula vedettiin pois hitaasti siirrettyjen solujen vuodon estämiseksi. Syklosporiini (CsA) annettiin ihonalaisesti vaihtelevissa annoksissa 20 vuorokauden jakson aikana ryhmille kaksi ja neljä. Koska siirrännäisen saaneet rotat reagoivat samalla tavalla kun lääke annettiin 20 vuorokauden tai 3 vuorokauden jakson aikana, kaikkia seuraavista ryhmistä, mukaan lukien naarasrotat, hoidettiin vain kolmella injektiolla, 25 mg/kg CsA, annettuna vuorokausina 0, +1 ja +2 suhteessa siirrännäiseen. Rotat eivät saaneet muuta terapiaa.

Yhteensä 36 uros ja 21 naaras PVG-rottaa jaettiin kuuteen eri hoitoryhmään: Ryhmä 1, kontrolliryhmä, koostui 6 urosrotasta, joille oli siirretty vain saarekkeita S-D-luovuttajarotilta. Ne eivät saaneet SEF:ä eivätkä CsA:a. Ryhmä 2 koostui 10 rotasta, joille oli siirretty S-D-rotista saatujen saarekkeiden ja CsA yhdistelmä transplantaation jälkeen, mutta SEF:ä. Ryhmä 3 koostui yhteensä 10 rotasta, joille oli siirretty S-D-luovuttajarotista saatujen saarekkeiden ja PVG-luovuttajarotista saadun SEF:n yhdistelmä, mutta ei CsA:a transplantaation jälkeen. Ryhmä 4 koostui 10 rotasta, joille oli siirretty S-D-luovuttajarotista saatujen saarekkeiden ja PVG-luovuttajarotista saadun SEF:n yhdistelmä, ja CsA:a transplantaation jälkeen. Ryhmä 5 koostui 11 naarasrotasta, joille oli siirretty sama yhdistelmä soluja kuin ryhmälle neljä on kuvattu. Ryhmä 6 koostui 10 naarasrotasta, joille oli siirretty saarekkeiden ja SEF:n yhdistelmä, molemmat solutyypit S-D-luovuttajilta, ja CsA:a transplantaation jälkeen.

Rottien transplantaation jälkeinen arviointi

Siirrännäisen saaneet rotat siirrettiin metaboliahäkkeihin, ja plasman glukoositasot saatiin viikon välein. Virtsatilavuudet ja virtsan glukoosipitoisuudet saatiin vuorokauden välein. Rottaa pidettiin parantuneena diabeettisesta prosessista, jos seuraavat kriteerit täytettiin: Satunnainen plasman glukoositaso ≤ 150 mg/dl; glukoosia virtsassa; ja välitön kääntyminen hyperglykemiaan siirretyn munuaisen kirurgisen poiston jälkeen.

Sen määrittämiseksi oliko yksikään rotista tullut passiivisiksi niiden siirrännäisille, normoglykeemisiä rottia ärsytettiin toisella saarekeallotransplantaatilla, joka koostui ainakin 500 juuri valmistetusta Sprague Dawley -saarekkeesta, jotka injektoitiin vastapuolella olevaan munuaisen subkapsulaariseen tilaan. Immunosupressiota ei annettu ärsykkeen jälkeen.

SEF-transplantaation vaikutuksen naarasrottien hedelmällisyyteen tutkimiseksi yli 30 vuorokautta normoglykeemiset eläimet paritettiin PVG-urosten kanssa. Metaboliaparametrejä, kuten edellä on esitetty, tarkkailtiin läheisesti, kuten niiden raskauksien kulkua.

Siirrettyjen kudosten rakenneanalyysi

Yhteensä viideltä onnistuneesti siirrännäisen saaneelta rotalta poistettiin munuaiset transplantaatiota seuraavina aikaväleinä. Munuaiskudoksen kiilaosat, jotka saatiin kohdista, joihin saarekkeet ja SEF oli injektoitu, valmistettiin valo- ja elektronimikroskopialla tutkimista varten, kuten aikaisemmin on kuvattu julkaisussa Cameron et al. (1990) Transplantation, 50:649-653. Lyhyesti, kudoskiiloja uppokiinnitettiin 5-%:isella glutaraldehydillä 0,1 M s-kollidiinipuskurissa 1 tunnin ajan, pestiin puskurissa ja jälkikiinnitettiin 1 tunnin ajan 1-%:isella osmiumtetroksidilla 0,1 M puskurissa. Pienet kudoslohkot leikattiin kiiloista ja dehydratoitiin etyylialkoholien luokiteltujen sarjojen läpi, siirrettiin propyleenioksidiin ja upotettiin Epon 812/Araldite-muovihartsiin. Paksut (0,5 µm) ja ohuet (900 mg) osat värjät-

tiin rutiininomaisesti toluidiinisinisellä ja uraniiliasetaatti/lyijysitraatilla vastaavasti rakenneanalyysiä varten valo- ja elektronimikroskopialla. Tulokset esitetään taulukossa 3 ja kuvissa 7 - 9.

Taulukko 3

Sertoli-solujen vaikutus saarekeallotransplantaatin eloonjäämiseen ei-immunologisesti etuoikeutetussa munuaisen subkapsulaarisessa kohdassa

Ryhmä (n)	Sukupuoli	Sertoli-solu (luovuttaja-alkuperä)	CsA	Normoglykemian kesto (vrk) yksilölliset vasteet
1 (6)	uros	-	-	0,0,0,0,0,0
2 (10)	uros	-	+	0,0,0,0,0,0,0,130 > 441, > 445
3 (10)	uros	+ (PVG)	-	0,0,0,0,9,10,12, 13,13,14
4 (10)	uros	+ (PVG)	+	19,76,58*,84*, 167*,127†,139†, >418†,>422†, >425†
5 (11)	naaras	+ (PVG)	+	7,11,14,28, >287†,>305†, >306†,>308†, >441†,>447†, >457†
6 (10)	naaras	+ (S-D)	+	8,10,96*,128*, >168,>172,>184, >193,>193,>196

*munuainen poistettu,
†ärsytetty toisella saarekeallotransplantaatilla.

Ryhmä 1: Yksikään kuudesta rotasta, joille siirrettiin vain saarekkeita, ilman SEF:ä ja CsA:a, ei tullut normoglykeemiseksi.

Ryhmä 2: Kolme kymmenestä rotasta, joille siirrettiin saarekkeet ja joita hoidettiin CsA:lla, tuli normoglykeemiseksi yli 100 vuorokauden ajaksi. Niitä kolmea normoglykeemistä rottaa ärsytettiin toisella siirrännäisellä vuorokausina 116, 192 ja 197 vastaavasti. Yksi rotta palautui hyperglykeemiseksi 130 vuorokautena, kun taas kaksi säilyi normoglykeemisenä.

Ryhmä 3: Aluksi kuusi kymmenestä rotasta, joille siirrettiin saarekkeet ja SEF, mutta ei CsA:a, tuli normoglykeemiseksi, mutta niistä kaikki palautui hyperglykeemiseksi 14 vuorokauteen mennessä.

Ryhmä 4: Kaikista kymmenestä rotasta, joille siirrettiin SEF:n ja saarekkeiden yhdistelmä ja joille annettiin myös CsA:a, tuli normoglykeemisiä. Kaksi palautui spontaanisti diabetekseen vuorokausina 19 ja 76, vastaavasti. Kolmelta poistettiin munuainen vuorokausina 58, 84 ja 167 transplantaation jälkeen. Kaikista näistä kolmesta tuli hyperglykeemisiä seuraavan 24 tunnin kuluessa. Jäljelle jääneitä viittä rottaa ärsytettiin toisella saarekeallotransplantaatilla vuorokausina 119, 129, 280, 342 ja 400, vastaavasti. Näistä ensimmäiset kaksi palautui diabetekseen vuorokausina 127 ja 139, vastaavasti, kun taas kolme viimeistä säilyi normoglykeemisinä.

Ryhmä 5: Kaikista yhdestätoista naarasrotasta, joille siirrettiin saarekkeiden ja SEF:n yhdistelmä ja annettiin sitten CsA:a, tuli normoglykeemisiä. Näistä neljä palautui spontaanisti hyperglykemiaan vuorokautena 28. Seitsemästä normoglykeemisestä rotasta, jotka paritettiin uros PVG-rottien kanssa, kuusi tuli raskaaksi, ja näistä kahdeksalla oli 1 - 10 pennun poikueet. Ne pystyivät hoitamaan pentuja onnistuneesti. Yhteensä seitsemää pitkään elossa pysyvää naarasta ärsytettiin toisella saarekeallotransplantaatilla aina-

kin 200 vrk transplantaation jälkeen. Yksikään niistä ei palautunut hyperglykemiaan.

Ryhmä 6: Kymmenestä rotasta, joille siirrettiin saarekkeet ja SEF saman lajin rottaluovuttajasta, kaikista kymmenestä tuli normoglykeemisiä. Kaksi palautui hyperglyksemiaan 10 päivään mennessä. Munuaisenpoistoleikkaus siirrännäisen poistamiseksi tehtiin kahdelle pitkään hengissä säilyneelle rotalle päivinä 96 ja vastaavasti 201. Molemmat palautuivat hyperglykeemisiksi heti seuraavan 24 tunnin kuluessa.

Kudosmorfologia

Pitkäaikaisesta siirretystä munuaisesta saatu munuaiskudos näytti rakenteellisesti normaalilta valomikroskoopilla (kuvio 7). Siirretyt saarekkeet tässä elimessä olivat heti munuaiskapselin alapuolella ja näyttivät myös rakenteellisesti normaaleilta. Ne osoittivat kudos- ja soluarkkitehtuurin, joka on identtinen saarekkeiden kanssa in situ (kuvio 7). Yksittäiset saarekesolut jaettiin soluryhmiin ohuilla yhdistävillä väliseinillä, jotka sisälsivät pieniä tiehyitä ja hiussuonia (kuvio 7). Näytti siltä, että useimmat saarekesolut sisälsivät eritysjyväsiä. Erotettuna elektronimikroskopialla saarekesolut identifioitiin ß-solutyypiksi ultrarakenteellisesti erottuvien ja ainutlaatuisten insuliinia sisältävien eritysjyvästen mukaan lukemisella (kuvio 8). Kaikki havaitut ß-soluryhmät olivat lähellä saarekkeensisäisiä hiussuonia (kuvio 8).

Siirrettyjen saarekkeiden ja munuaisperuskudoksen välillä, ja suoraan niiden vieressä, oli suuri solutiheys. Valomikroskoopilla ne eivät näyttäneet olevan saarekesoluja, munuaissoluja eivätkä solu- tai verialkuperää (kuvio 7). Elektronimikroskoopilla havaittuna nämä solut olivat samanlaisia ultrarakenteeltaan Sertoli-solujen kanssa siinä, että niiden nukleiini oli epäsäännöllinen profiililtaan ja ne sisälsivät syviä ydinhalkioita, erottuvat tumajyväset olivat usein läsnä, ja mitokondriarakenne oli tiheä. Vaikka nämä solut eivät säilyttäneet tyypillistä Sertoli-solujen polaarisuutta in vivo, ne olivat kuitenkin identtisiä ulkonäöltään

Sertoli-solujen kanssa in vitro, kun soluista ei tehty maljaviljelmää pohjamembraanisubstraatilla. Solut eivät yhdistyneet pohjamembraaniin ja ne näyttivät satunnaisesti järjestäytyneiltä (kuvio 9). Soluja, jotka osoittivat joko suku- tai Leydig-solujen ultrarakennepiirteitä, ei havaittu.

Tämä esimerkki osoittaa, että immunologisesti etuoikeutettu kohta eristetyn saarekkeen siirtämistä varten voidaan luoda uros ja naaras diabeettisissä vastaanottajissa Sertoli-solujen siirtämisellä ilman jatkuvan immunosupression tarvetta.

Esimerkki 4

Tämä tutkimus määritti erilaisten saarekevierassiirrännäisten eloonjäämisen erilaisissa ei-immunologisesti etuoikeutetuissa elinkohdissa koe-eläimissä.

Saarekkeet valmistettiin nuorista porsaista seuraavasti: Käytettiin yksinomaan urosporsaita, jotka eivät painaneet enempää kuin 2,2 kg. Porsas nukutettiin ja veren päästämisen jälkeen sekä haima että kivekset otettiin talteen steriileissä olosuhteissa. Kollagenaasiliuos, joka koostui 2 mg/ml kollagenaasi tyypistä XI (Sigma), injektoitiin suoraan haimaan. Haimaa inkuboitiin 37 °C:ssa 17 minuutin ajan ja digestoidut kudokset pestiin kolme kertaa sentrifugoimalla ja 1 ml:n erät siirrettiin kukin Petri-maljoille. Saarekkeita inkuboitiin 32 °C:ssa kudosviljelyväliaineessa 199, jota oli täydennetty 10 % hevosen seerumilla, kuuden vuorokauden ajan.

Seitsemäntenä päivänä viljellyt saarekkeet otettiin talteen ±4 000 erissä ja kylmäsäilöttiin käyttäen standardimenettelyä. Soluja varastoitiin nestemäisessä typessä -96 °C:ssa 2 - 4 viikon jaksojen ajan. Saarekkeet poistettiin nestemäisestä typestä ja sulatettiin käyttäen vakiintunutta menetelmää. Sulaneet saarekkeet siirrettiin Petri-maljoille ja viljeltiin yhdessä porsaan Sertoli-solujen kanssa kolmen vuorokauden ajan 32 °C:ssa samassa 199 viljelyväliaineessa kuin edellä on kuvattu. Aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet sulatettujen saarekkeiden, joita on viljelty Sertoli-solujen ollessa läsnä, parantuneen eloonjäämisprosentin.

Kolmantena päivänä sulatuksen jälkeen saarekkeet poimittin käsin ja laskettiin, ja yhteismäärä 12 saareketta/g kehon paino siirrettiin naaras diabeettisiin Sprague Dawley -rottiin. Yhteensä 5 miljoonaa Sertoli-solua, jotka saatiin porsaan kiveksistä, siirrettiin samanaikaisesti samaan sijaintiin. Saarekkeiden siirtämistä varten testattaviin elinkohtiin kuuluvat: a] munuaisen subkapsulaarinen tila, b] ihon alla ja c] maksa. Transplantaation jälkeen rottia hoidettiin syklosporiinilla seuraavasti: 25 mg/kg 7 vuorokauden ajan; 15 mg/kg 5 vuorokauden ajan; 10 mg/kg 5 vuorokauden ajan; 5 mg/kg vielä 13 vuorokauden ajan. Päivänä 30 lääke lopetettiin.

Eristettyjen porsaan saarekkeiden elinkykyisyyden ja toiminnallisen kokonaisuuden osoittamiseksi tehtiin seuraavat tutkimukset: a) solujen värjäys dititsonilla, väri on erittäin spesifinen insuliinille; b) solujen värjäys 0,4-%:isella tryptaanisinisellä, joka osoittaa saarekkeiden elinkykyisyyden; ja c) 5 saarekkeen erien viljely insuliinin eritystä lisäävien aineiden ollessa läsnä, kuten alhaiset ja korkeat glukoosipitoisuudet tietyillä aikaväleillä viljelyn, kylmäsäilönnän ja sulatuksen jälkeen. Tulokset esitetään taulukossa 4.

Taulukko 4

Insuliinin eritys (mikroyksikkö/ml) inkuboiduista ja kylmäsäilytetty-sulatetuista saarekkeista, jotka tehtiin viljelyn päivinä 3, ja 7, ja vastaavasti 14

	Insuliinin vapautumisen mikroyksiköt 5 saareketta kohti eristämistä ja inkubointia seuraavina päivinä		
	3 vrk	**7 vrk**	**14 vrk**
Inkuboidut saarekkeet ennen kylmäsäilöntää: a] Alhainen glukoosi (90 mg/dl)	15,3 ± 3,8	21,8 ± 1,1	17,29 ± 2,4
b] Korkea glukoosi (300 mg/dl)	32,2 ± 5,4	37,14 ± 3,4	23,3 ± 1,8
Kylmäsäilötyt ja sulatetut saarekkeet: a] Alhainen glukoosi (90 mg/dl)	14,52 ± 2,8	7,13 ± 1,3	5,38 ± 2,02
b] Alhainen glukoosi + Sertolisolut	10,31 ± 2,8	9,17 ± 2,6	8,38 ± 0,41

Taulukko 5

Sian saarekkeiden saanto 1, 3 ja 7 vuorokauden viljelyn jälkeen ja 7 vuorokauden viljelyn aikana menetettyjen saarekkeiden prosenttiosuus

Sika nro	BW (kg)	Haiman paino g	DI-saarekkeet/g haima	D3-saarekkeet/g haima	D7-saarekkeet/g haima	Menetetyt saarekkeet % D7/D1
1	1,6	1,79	36 536	31 659	27 212	26
2	2,0	1,89	37 272	32 962	27 883	25
3	2,3	2,46	29 268	26 046	20 884	29
4	1,8	1,66	39 904	37 726	31 664	21
5	1,8	1,76	37 846	34 578	30 046	21
6	1,6	1,74	39 866	37 888	32 424	19
7	1,4	1,61	42 126	39 456	33 872	20
8	2,3	2,48	33 682	29 334	24 892	26
9	2,1	2,28	43 478	41 226	37 394	14
10	2,1	2,09	40 126	36 448	33 282	17
11	2,1	2,12	31 248	27 170	26 415	15
12	2,1	1,98	38 848	36 465	29 293	25
13	2,2	2,06	29 146	37 446	31 709	19
14	2,2	2,24	27 892	25 028	21 342	23
15	2,7	2,69	44 610	38 364	31 524	29
16	1,5	1,44	42 222	40 414	31 244	26
Keskiarvo ± SE	2,0 ± 0,3	2,0 ± 0,4	37692 ± 1233	34513 ± 1307	29442 ± 1119	22,1 ± 1,2 %

Taulukko 6

Saarekkeiden toipuminen pakastuksen ja sulatuksen jälkeen Sertoli-solujen ollessa läsnä ja poissa

	Saarekkeet yksinään			Saarekkeet + Sertoli-solut		
Saarekkeiden nro	Ennen kylmää	Sulatuksen jälkeen	Toipuminen (%)	Ennen kylmää	Sulatuksen jälkeen	Toipuminen (%)
D3F/ D3T	250	152	61	290	212	73
	230	131	57	260	228	88
	440	278	63	430	380	88
	420	366	87	410	324	79
	450	290	64	440	358	81
		Keskiarvo	66,4 %			81,8 %
D7F/ D3T	260	136	52	250	229	92
	300	208	69	300	202	67
	280	177	63	290	238	82
	360	205	57	350	300	86
	320	218	68	390	289	74
	380	217	57	320	270	84
		Keskiarvo	61,0 %			80,8 %

Kuten taulukossa 5 on esitetty, saarekkeiden saanto grammaa haimaa kohti oli 37 692 ± 1 233, 34 513 ± 1 307 ja 29 442 ± 1 119 viljelyn 1, 3 ja vastaavasti 7 vuorokauden ku-

luttua. Kylmäsäilönnän ja sulatuksen ja solujen uudelleenviljelyn jälkeen Sertoli-solujen ollessa läsnä noin 20 % soluista oli vaurioitunut tai menetetty, kuten taulukossa 6 esitetään. Siten ± 24 000 saareketta/gramma sian haima oli käytettävissä siirrännäistarkoituksia varten kylmäsäilönnän ja sulatuksen jälkeen.

Tulokset osoittivat, että insuliinin eritys heikentyi, kun glukoosia käytettiin insuliinin eritystä lisäävänä aineen ennen kylmäsäilöntää. Vaikutus oli ilmeisempi kylmäsäilönnän ja sulatuksen jälkeen. Vaikka Sertoli-solujen läsnä ololla oli merkittäviä vaikutuksia saarekkeiden lukumäärään, joka selviytyi kylmäsäilönnästä ja sulatuksesta niiden läsnä ololla oli vähän vaikutusta saarekkeiden kykyyn vastata alhaiseen glukoosipitoisuuteen insuliinia vapauttavana aineena. Kuten esimerkissä 8 esitetään, Sertoli-solujen läsnäolo kuitenkin lisäsi insuliinin eritystä suurten glukoosipitoisuuksien ja glukoosin plus Forskolinin ollessa läsnä.

Esimerkki 5

Diabeettisten Sprague Dawley -rottien reaktio saarekkeiden siirtämiseen porsasluovuttajilta (erilaiset vierassiirrännäiset)

Rotista tehtiin diabeettisia yksittäisen i.v. injektion, 55 mg/kg streptotsotosiinia, keinoilla. Ne saivat siirrännäisen vain, jos veren sokeri oli yhtä suuri tai yli 400 mg/dl. Transplantaation jälkeen rotat asetettiin yksitellen aineenvaihduntahäkkeihin ja virtsatilavuus, virtsan glukoosipitoisuus ja kehon painot mitattiin päivittäin. Veren glukoositasot tehtiin viikoittain. Rottaa pidettiin parantuneena diabeteksestä, jos veren glukoositaso on 160 mg/dl tai alle ja/tai päivittäinen virtsatilavuus on 15 ml tai alle.

Tulokset esitetään kuvissa 10 ja 11.

Kuvio 10 esittää porsaan saarekkeiden ja Sertoli-solujen transplantaation munuaiskapselin alle vaikutuksen seitsemän siirrännäisen saaneen naarasrottavastaanottajan vuorokauden virtsan ulostulon keskiarvoon. Kukin pylväs mer-

kitsee vuorokauden virtsan ulostulon keskiarvoa 10 vuorokauden jakson aikana transplantaation jälkeen. Tutkimus on suoritettu 80 vuorokauden jakson aikana, kauimpana oikealla oleva pylväs osoittaa siten virtsan ulostulon keskiarvon vuorokautta kohti päivästä 80 päivään 89 jne.

Kuvio osoittaa, että vuorokauden virtsatilavuuden keskiarvo ensimmäiselle 60 vuorokaudelle vaihteli 19,7 ml:sta 27 ml:aan tai diabeettisella alueella. Voidaan helposti ymmärtää, että virtsatilavuudet pienenivät lähes normaalitasoille vain päivästä 70 päivään 89. Vastaavat plasman glukoositasot ensimmäisen ja viimeisen 10 vuorokauden jakson aikana olivat 474 ± 46 ja vastaavasti 155 ± 70 mg/dl.

Nämä tulokset osoittavat, että transplantaation porsaan saarekkeilla ja Sertoli-soluilla jälkeen rotat osoittivat todisteen siirrettyjen saarekkeiden eloonjäämisestä. Palautuminen normoglykemiaan vei noin 80 vuorokautta.

Tulisi huomata, että yksi parantuneista rotista on raskaana ja se on ollut normoglykeeminen koko raskauden ajan.

Kuvio 11 esittää porsaan saarekkeiden ja Sertoli-solujen transplantaation ihon alle vaikutuksen kolmen rotan vuorokauden virtsatilavuuksien keskiarvoon 50 vuorokauden jakson aikana. Tulokset osoittavat, että virtsatilavuuden keskiarvo laski keskiarvosta 41,7 ml ensimmäisen 10 vuorokauden jakson aikana keskimäärin 12,3 ml:aan viidennen viikon aikana. Vastaavat glukoositasot olivat 509 ± 45 ja vastaavasti 200 ± 12 mg/dl.

Edellä kuvatut tiedot osoittavat, että sekä munuaisen subkapsulaarista tilaa että ihonalaista aluetta voidaan käyttää kohtana luomaan immunologisesti etuoikeutettu kohta saarekevierassiirrännäisten transplantaatiota varten.

Esimerkki 6

Tämä tutkimus määritti viljeltyjen Sertoli-solujen vaikutuksen erilaisten saarekevierassiirrännäisten eloonjäämiseen diabeettisissa rotissa minimi aikaisella eksogeenisellä immunosupressiolla.

Saarekkeiden valmistus

Vastasyntyneet porsaat, iältään alle seitsemän vuorokautta, tapettiin anestesialla ja saarekkeet eristettiin Kuo C. Y., Burghen G. A., Myvacle A. ja Herrod H. G. (1994) "Isolation of islets from neonatal pig pancreativ tissue", J. Tissue Culture Methods, 16:1-7, menetelmän mukaisesti. Lyhyesti, haimoja venytettiin kollagenaasiliuoksen injektiolla, 2 mg/ml kollagenaasi tyyppi X1 viljelmäväliaineessa DMEM. 17 minuutin 39 °C:ssa inkuboinnin jälkeen digestoidut fragmentit pestiin sentrifugoimalla ja digestoitua kudosta inkuboitiin sitten 32 °C:ssa yhden viikon ajan väliaineessa 199, jota oli täydennetty 10 % hevosen seerumilla ja 1 % antibiooteilla. Saarekkeita kylmäsäilöttiin sitten Lakey J. R. T., Warnock G. L., Kneteman N. M., Ao Z., Rajotte R.V. (1994) "Effects of Pre-cryopreservation culture on human islet recovery and in vitro function", Transplant Proc., 26:820, menetelmän mukaisesti ja varastoitiin nestemäisessä typessä -196 °C:ssa. Kolme vuorokautta ennen transplantaatiota kylmäsäilötyt saarekkeet sulatettiin nopeasti ja viljeltiin 32 °C:ssa kahden vuorokauden ajan. Yksi vuorokausi ennen transplantaatiota joitakin saarekkeita otettiin talteen ja viljeltiin yhdessä Sertoli-solujen kanssa 24 tunnin ajan.

Sertoli-solun eristys

Nuorten S-D-rottien kivekset poistettiin ja Sertoli-solut eristettiin Cheng C. Y. ja Bardin C. W. (1987) "Identification of two testosterone-responsive proteins in Sertoli cell-enriched culture medium whose secretion is suppressed by cells of the intact seminiferous tubule." J. Biol. Chem., 262:12768-12779, menetelmällä. Lyhyesti, kivekset digestoitiin ensin DMEM:ssä, joka sisälsi 1,0 % trypsiiniä, ja sitten DMEM:ssä, joka sisälsi 1,0 % kollagenaasia, tyyppi 1, 15 minuutin jaksojen ajan 37 °C:ssa. Puhdistettuja Sertoli-soluja viljeltiin 37 °C:ssa DMEM/F12:ssa, jota oli täydennetty transferriinillä, 10 µg/ml, FSH:lla 10 ng/ml, insuliinilla 20 µg/ml ja 1,0 % FCS:llä, kolmen vuorokauden ajan. Transplantaatiota varten Sertoli-solut ja saarekkeet yhdistettiin ja

rotille siirrettiin joko yhdistelmä, joka koostuu 5 x 10^6 Sertoli-solusta ja 3 000 saarekkeesta, tai saarekkeet yksinään (15 saareketta/g kehon paino).

Rottien transplantaatio

Naaras S-D-rotat, jotka painoivat 170 - 200 g tehtiin diabeettisiksi yksittäisen i.v. injektion, 60 mg/kg streptotsotosiinia, keinoilla. Yhteensä 31 diabeettista rottaa jaettiin kolmeen ryhmään ja ne saivat siirrännäisen seuraavasti: Ryhmä 1, kontrolliryhmä (n=8), sai yhteensä 15 saareketta/g kehon paino injektoituna munuaiskapselin alle. Sertoli-soluja ei siirretty. Transplantaation jälkeen rottia hoidettiin syklosporiinilla 55 vuorokauden ajan: 25 mg/kg 3 vuorokauden ajan, 15 mg/kg 10 vuorokauden ajan, 10 mg/kg 10 vuorokauden ajan ja 5 mg/kg seuraavien 32 vuorokauden ajan. Sitten immunosupressio lopetettiin. Kukin rotta sai lisäksi 1 - 3 U Ultralente-insuliinia vuorokauden välein, jos 24 tunnin virtsan glukoosipitoisuus ylitti 1 g. Insuliiniterapia lopetettiin päivänä 55. Ryhmälle 2, kudoskontrolliryhmä (n=8), annettiin munuaisen subkapsulaarinen injektio, joka on yhdistelmä noin 5 x 10^6 Sertoli-solusta ja 3 000 saarekkeesta. CsA:a ei annettu. Insuliinia annettiin kuten edellä on kuvattu. Ryhmälle 3, koeryhmä (n=15), siirrettiin sekä Sertoli-soluja että saarekkeita ja sitten hoidettiin CsA:lla ja insuliinilla edellä kuvatun suunnitelman mukaisesti.

Rottien transplantaation jälkeinen arviointi

Plasman glukoositasot saatiin viikon välein. 24 tunnin virtsatilavuudet ja virtsan glukoosipitoisuudet tallennettiin päivittäin. Rottaa pidettiin parantuneena diabeettisesta prosessista, jos seuraavat kriteerit täytettiin: plasman glukoositaso yhtäsuuri tai alle 10 mmol/l, 24-tunnin virtsatilavuus alle 15 ml ja välitön kääntyminen hyperglykemiaan seuraa siirretyn munuaisen kirurgista poistoa. Yksi normoglykeeminen rotta paritettiin päivänä 69, jolloin testattiin sen kykyä tulla raskaaksi.

Siirretyn kudoksen rakennealanyysi

Kahdelta normoglykeemiseltä rotalta poistettiin munuainen päivinä 117 ja 330 ja siirretty kudos valmistettiin valo- ja elektronimikroskopiaa varten. Selawry H. P., Cameron D. F. (1992) "Sertoli cell-enriched fractions in successful islet cell-transplantation", Cell Trans., 2:123-129. Lyhyesti, kudoskiiloja upotuskiinnitettiin 5-%:isella glutaraldehydillä 0,1 M kollidiinipuskurissa 1 tunnin ajan, pestiin puskurissa ja jälkikiinnitettiin 1 tunnin ajan 1-%:isella osmiumtetroksidilla 0,1 M puskurissa. Pienet kudoslohkot leikattiin kiiloista ja dehydratoitiin etyylialkoholien luokiteltujen sarjojen läpi, siirrettiin propyleenioksidiin ja upotettiin Epon 812/Araldite-muovihartsiin. Paksut (0,5 µm) ja ohuet (900 mg) osat värjättiin rutiininomaisesti toluidiinisinisellä ja uraniiliasetaatti/lyijysitraatilla vastaavasti rakenneanalyysiä varten valo- ja elektronimikroskopialla.

Sertoli-solujen ja syklosporiinin vaikutuksen tulokset sian saarekesolujen ksenografisen transplantaation diabeettisten naarasrottien munuaisen subkapsulaariseen tilaan eloonjäämiseen esitetään taulukossa 7.

Taulukko 7

Ryhmä (n)	**Sertoli-solut**	**CsA**	**Siirrännäisen hengissä pysyminen (päivää)**
1 (8)	-	+	0,0,0,0,0,0,0,0
2 (8)	+	-	0,0,0,0,0,0,0,0
3 (15)	+	+	0,0,0,0,0, 71, 77, 96, 117*, 148#, >154, >165, >327, 330*

*rotat, joilta on poistettu munuainen vierassiirrännäisen poistamiseksi

#rotat, jotka kuolivat sydänpunktion aikana

Kuten taulukossa 7 esitetään, yksikään rotista, joille siirrettiin vain saarekkeet ja sitten annettiin CsA ja alhainen annos insuliinia (Ryhmä 1), ei tullut merkittävästi vähemmän hyperglykeemiseksi. Lisäksi yksikään rotista, joille siirrettiin saarekkeiden ja Sertoli-solujen yhdistelmä, mutta ilman CsA:a, ei osoittanut minkäänlaista hyperglykemian paranemista (Ryhmä 2). Viidestätoista rotasta, joille siirrettiin saarekkeet ja Sertoli-solut ja sitten annettiin CsA:a (Ryhmä 3), 10 osoitti todisteen diabeettisen tilan kääntymisestä. Neljä kymmenestä on silti normoglykeemisiä yli 154, 165, 165 ja vastaavasti 327 vuorokauden jakson ajan. Normoglykeemisistä rotista, joilta poistettiin munuainen päivinä 117 ja 330, tuli heti hyperglykeemisiä. Niiden plasman glukoositasot olivat 4,9 mmol/l ja 8,2 mmol/l, ennen, ja vastaavasti 20,7 mmol/l ja 32,2 mmol/l munuaisenpoistoleikkauksen jälkeen. Naarasrotta, joka paritettiin 69 päivänä, tuli raskaaksi ja synnytti yhteensä 10 pentua 89 päivänä, joista kaikksi se hoiti onnistuneesti samalla, kun se pysyi normoglykeemisenä. Se kuoli 148 päivänä sydänpunktion seurauksena. Kolme kymmenestä rotasta palautui hyperglykemiaan päivinä 71, 77 ja vastaavasti 96, lyhyen euglykemian jakson jälkeen.

Nämä tulokset osoittavat, että pitkittynyt erilaisen saarekevierassiirrännäisen (sialta rotalle) hengissä pysyminen voidaan saada aikaan naaras diabeettisissa rotissa. Saarekevierassiirrännäisten hengissä pysyminen riippui kahdesta tekijästä, jotka oli annettava samanaikaisesti: Transplantaatio yhdessä Sertoli-solujen kanssa ja käsittely syklosporiinilla.

Transplantaatiota sian saarekkeen ja rotan Sertoli-solujen yhdistelmällä seuraavien kokonaisvirtsatilavuuksien vaste, joka mitattiin 10 vuorokauden välein 80 vuorokauden jakson aikana seitsemälle parantuneelle rotalle, osoitti keskimääräisen vuorokauden virtsatilavuuden 27,0 ± 13,0 ml/rotta ensimmäisen 10 vuorokauden jakson aikana, mikä laski hitaasti keskiarvoon 12,0 ± 4,0 ml/rotta 70 vuorokautta transplantaation jälkeen.

Kuviossa 10 esitetyt kudosmorfologiatutkimukset osoittavat, että munuaisperuskudoksen kudos- ja solurakenne näytti normaalilta rotassa, jolle oli tehty munuaisenpoistoleikkaus 117 päivänä transplantaation jälkeen. Normaalilta näyttävät saarekkeet, joissa oli rakenteellisesti selvästi erotettavat B-solut, olivat näkyviä hyvin suonittuneilla munuaiskapselin alapuolella olevilla alueilla. Lisäksi normaalilta näyttäviä Sertoli-soluja havaittiin siirrettyjen saarekkeiden vieressä yhdessä lukuisten lymfosyyttien kanssa. Yhtään plasmasolua ei identifioitu transplantaatiokohdassa. Elinkykyisiä umpierityssoluja havaittiin samalla tavalla rotan, jolle oli tehty munuaisenpoistoleikkaus 330 päivänä transplantaation jälkeen, munuaisen subkapsulaarisessa tilassa.

Nämä tutkimukset osoittavat, että erilaisen saarekevierassiirrännäisen hengissä pysymisen merkittävä pitkittyminen voidaan saada aikaan ilman jatkuvaa immunosupressiota. Nämä tutkimukset osoittavat, että mekanismi, jolla Sertoli-solut edistävät saarekevierassiirrännäisen hengissä pysymistä on kolmiosainen: (1) Sertoli-solut stimuloivat transplantaation aikana vaurioituneiden saarekkeiden toipumista (so. parantavat viljeltyjen saarekkeiden saantoa ja toimintaa), (2) Sertoli-solut suojaavat siirrettyjä saarekkeita immunologiselta hylkimiseltä tuottamalla tekijöitä, jotka voimakkaasti estävät T-solujen lisääntymistä, ja (3) Sertoli-solut suojaavat siirrettyjä saarekkeita syklosporiinin toksisilta vaikutuksilta.

Esimerkki 7

Tämä tutkimus osoittaa menetelmän sian haimasaarekkeiden eristämiseksi ja kylmäsäilömiseksi tulevia ksenografisia transplantaatteja varten nisäkkäissä.

Luovuttajina käytettiin urosporsaita, < 7 vuorkauden ikäisiä ja 2± kg painavia. Haimat, jotka painoivat 1,4 ± 0,3 g, otettiin talteen ja injektoitiin DMEM-liuoksella, joka sisälsi 2 mg/ml kollagenaasia XI. Venytettyä haimaa inkuboitiin ravisteluvesihauteessa 39 °C:ssa 17 minuutin ajan. Digestoitu

kudos suodatettiin 500 µm ruostumatonta terästä olevan suodattimen läpi ja suodokset pestiin 3x kylmällä DMEM:llä. Ilman lisäpuhdistusta soluja viljeltiin M199:ssä ja 10-%:isessa hevosen seerumissa 32 °C:ssa 7 vuorokauden ajan. Saarekesolut kylmäsäilöttiin sitten käyttäen standardimenetelmiä. Täsmällisesti mainituilla aikaväleillä saarekkeet sulatettiin ja viljeltiin M199:ssä, sekä läsnäollessa että urosporsaiden kiveksistä eristettynä standardimenetelmän mukaisesti.

Funktionaalisen kapasiteetin testaamiseksi saarekkeista, joita viljeltiin 3 ja 7 vuorokautta, arvioitiin insuliinin vapautuminen staattisessa inkuboinnissa. Erillisissä kokeissa insuliinin eritystä lisäävien aineiden vaikutus testattiin saarekkeisiin, jotka on viljelty Sertoli-solujen kanssa ja ilman. Tämän tutkimuksen tulokset esitetään taulukoissa 8 ja 9.

Taulukko 8

Insuliinin eritystä lisäävien aineiden, glukoosin ja glukoosin plus Forskolinin, vaikutus insuliinin vapautumiseen inkuboiduista ja pakastettu/sulatetuista (F/T) saarekkeista sian Sertoli-solujen ollessa läsnä ja poissa

	Insuliinin vapautuminen (µU/ml/10 saareketta)		
	3,3 mmol/l glukoosia	**16,7 mmol/l glukoosia**	**16,7 mmol/l glukoosia + 100 µmol Forskolinia**
Vrk 3 inkuboitu Sertoli-solujen kanssa	42,3 ± 1,2	112,8 ± 17,7*#	267,7 ± 43,0**#
Vrk 3 inkuboitu yksin	31,3 ± 2,1	57,3 ± 3,8*	123,4 ± 15,3**
Vrk 7 inkuboitu Sertoli-solujen kanssa	22,9 ± 1,9	64,5 ± 6,4*#	153,9 ± 14,6**
Vrk 7 inkuboitu yksin	21,3 ± 1,2	37,3 ± 6,0*	120,3 ± 11,4**
Vrk 3 F/T Sertoli-solujen kanssa	20,6 ± 4,3	44,9 ± 9,9*	77,1 ± 13,7**
Vrk 3 F/T yksin	11,7 ± 2,3	27,9 ± 6,6*	54,5 ± 10,7**

Anova-koe:

*vs 3,3 mmol/l p 0,05,

**vs sekä 3,3 että 16,7 mmol/l P<0,05,

#Sertoli-solujen kanssa vs saarekkeet yksin P<0,05

Taulukko 9

Sertoli-solujen vaikutus inkuboitujen ja pakastettu-sulatettujen sian saarekkeiden insuliinipitoisuuteen

Insuliinipitoisuus (µU/10 saareketta)		
	Saarekkeet yksin	**Saarekkeet & Sertoli-solut**
Inkuboitu D1	257,0 ± 19,6	391,1 ± 51,4+
Inkuboitu D3	201,1 ± 19,1#	400,1 ± 41,0+#
Inkuboitu D7	179,1 ± 26,2#	271,9 ± 39,9+#
Pakastettu D3/Sulatettu D3	52,4 ± 10,3	132,5 ± 35,1
Pakastettu D7/Sulatettu D3	10,4 ± 0,9	35,1 + 8,2

Anova:
+saarekkeet + Sertoli-solut vs. saareke yksin $P<0,05$
#inkuboidut saarekkeet D3, D7 vs. pakastettu D3, D7 $P<0,05$

Nämä tulokset osoittavat, että (1) suuria määriä vastasyntyneen porsaan saarekkeita voidaan eristää yksinkertaisella menetelmällä; (2) kylmäsäilöntä ja sulatus johtaa noin 40 %:n menetykseen saarekkeiden lukumäärässä Sertoli-solujen ollessa poissa ja noin 20 %:n menetykseen Sertoli-solujen ollessa läsnä; (3) viljellyillä saarekkeilla on kyky vastata sekä glukoosiin ja glukoosi + Forskoliniin insuliinin eritystä lisäävinä aineina; (4) yhdessä viljellyn saarekkeen funktionaalinen kapasiteetti lisääntyi kaksinkertaiseksi Sertoli-solujen ollessa läsnä; (5) kylmäsäilönnän ja sulatuksen jälkeen saarekkeet toipuvat nopeammin Sertoli-solujen ollessa läsnä ja vaste sekä glukoosille että glukoosi + Forskolinille kasvoi kaksinkertaiseksi Sertoli-solujen ollessa läsnä.

Patenttivaatimukset

1. Farmaseuttinen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se käsittää Sertoli-soluja ja farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että se lisäksi käsittää soluja jotka tuottavat biologisen tekijän.

3. Patenttivaatimuksen 2 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että biologinen tekijä on hormoni.

4. Patenttivaatimuksien 2 ja 3 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainitut solut, jotka tuottavat biologista tekijää ovat haiman Langerhansin saarekesoluja.

5. Patenttivaatimuksen 1 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainitut solut, jotka tuottavat biologista tekijää ovat soluja jotka on muutettu nukleiinihapolla, joka koodaa mainittua biologista tekijää.

6. Patenttivaatimuksien 1 ja 2 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainitut Sertoli-solut ovat ihmisen, naudan tai sian soluja.

7. Patenttivaatimuksen 4 mukainen koostumus, t u n n e t t u siitä, että mainitut haiman Langerhansin saarekesolut ovat ihmisen, naudan tai sian soluja.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen farmaseuttinen koostumus käytettäväksi immunologisesti etuoikeutetun kohdan luomiseksi nisäkkäässä.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen farmaseuttinen koostumus, jossa koostumus on käytettäväksi immunologisesti etuoikeutetun kohdan luomiseksi ihmisessä.

10. Patenttivaatimuksen 8 mukainen farmaseuttinen koostumus, jossa koostumus on formuloitu injektoitavaksi munuaisen subkapsulaariseen tilaan.

11. Patenttivaatimuksen 8 mukainen farmaseuttinen koostumus, jossa koostumus on formuloitu injektoitavaksi ihonalaiseen pintaan.

12. Patenttivaatimuksen 8 mukainen farmaseuttinen koostumus, jossa koostumus on formuloitu 10^5 - 10^{10} soluilla.

13. Patenttivaatimuksen 8 mukainen farmaseuttinen koostumus, jossa koostumus on formuloitu Sertoli-soluilla, jotka ovat peräisin ihmisestä, naudasta tai siasta.

14. Lokeroitu kokoonpano muokattu ottamaan vastaan säiliön, joka on muokattu sisältämään patenttivaatimuksen 1 mukaista farmaseuttista koostumusta.

15. Lokeroitu kokoonpano, joka käsittää minkä tahansa patenttivaatimuksen 2 - 7 mukaisen koostumuksen, joka kokoonpano on muokattu ottamaan vastaan ensimmäinen säiliö, joka on muokattu sisältämään Sertoli-soluja, ja toinen säiliö, joka on muokattu sisältämään soluja, jotka tuottavat biologista tekijää, joka on poissa tai puutteellinen sairaudessa.

16. Lokeroitu kokoonpano, joka käsittää minkä tahansa patenttivaatimuksen 2 - 7 mukaisen koostumuksen, joka kokoonpano on muokattu ottamaan vastaan ensimmäisen säiliön, joka on muokattu sisältämään Sertoli-soluja, ja toisen säiliön, joka on muokattu sisältämään haiman Langerhansin saarekesoluja.

17. Valmistusartikkeli, joka käsittää pakkausmateriaalin ja patenttivaatimuksen 1 mukaista farmaseuttista koostumusta, jossa Sertoli-solut ovat sisällytettynä mainittuun pakkausmateriaaliin, jossa mainitut Sertoli-solut ovat tehokkaita luomaan immunologisesti etuoikeutetun kohdan nisäkkäässä, ja jossa mainittu pakkausmateriaali sisältää etiketin, joka ilmaisee, että mainittuja Sertoli-soluja voidaan käyttää luomaan immunologisesti etuoikeutettu kohta nisäkkäässä.

18. Minkä tahansa patenttivaatimuksen 1 - 7 mukaisen koostumuksen käyttö valmistettaessa sairauden hoitoon tarkoitettua lääkettä, joka sairaus johtuu biologisen tekijän puutteesta nisäkkäässä.

19. Patenttivaatimuksen 18 mukainen käyttö, jossa mainittu nisäkäs on ihminen.

20. Patenttivaatimuksien 18 ja 19 mukainen käyttö, jossa mainittu biologinen tekijä on hormoni.

21. Patenttivaatimuksen 18 mukainen käyttö, jossa mainittu biologinen tekijä on insuliini ja mainittu sairaus on sokeritauti.

22. Patenttivaatimuksen 21 mukainen käyttö, jossa solut, jotka tuottavat mainittua biologista tekijää, ovat haiman Langerhansin saarekesoluja.

23. Patenttivaatimuksen 18 mukainen käyttö, jossa solut, jotka tuottavat mainittua biologista tekijää, ovat soluja, jotka on muutettu nukleiinihapolla, joka koodaa mainittua biologista tekijää.

24. Patenttivaatimuksen 18 mukainen käyttö, jossa lääke on formuloitu annettavaksi transplantaatiolla.

25. Patenttivaatimuksen 18 mukainen käyttö, jossa lääke on formuloitu 10^5 - 10^{10} Sertoli-solulla.

26. Patenttivaatimuksen 18 mukainen käyttö, jossa lääke on formuloitu 10^5 - 10^{10} solulla, jotka tuottavat biologista tekijää.

27. Patenttivaatimuksen 24 mukainen käyttö, jossa mainittu transplantaatio on vierassiirrännäisellä.

28. Patenttivaatimuksen 24 mukainen käyttö, jossa mainittu transplantaatio on allotransplantaatilla.

29. Patenttivaatimuksen 18 mukainen käyttö, joka lääke käsittää lisäksi immunosupressiivisen aineen.

30. Patenttivaatimuksen 29 mukainen käyttö, jolloin immunosupressiivista ainetta sisältävä lääke sopii annettavaksi ajan, joka on riittävä sallimaan mainittujen siirrettyjen solujen olevan toiminnallisia.

31. Patenttivaatimuksen 29 mukainen käyttö, jossa mainittu immunosupressiivinen aine on syklosporiini.

32. Patenttivaatimuksen 31 mukainen käyttö, jossa mainittu lääke on formuloitu sisältämään syklosporiinia annoksessa 5 - 40 mg/kg kehon paino.

33. Patenttivaatimuksen 18 mukainen käyttö, jossa lääke on formuloitu käsittämään lisäksi terapeuttisesti tehokkaan määrän eksogeenistä biologista tekijää.

34. Patenttivaatimuksen 18 mukainen käyttö, jossa mainittu lääke on formuloitu soluilla, jotka tuottavat mainittua biologista tekijää ja jotka on viljelty yhdessä Sertoli-solujen kanssa kudosviljelmässä.

35. Patenttivaatimuksen 34 mukainen käyttö, jossa mainittu lääke on formuloitu soluilla, jotka tuottavat mainittua biologista tekijää ja jotka kylmäsäilötään ennen yhteisviljelyä Sertoli-solujen kanssa kudosviljelmässä.

36. Sertoli-solujen ja terapeuttisesti tehokkaan määrän haiman Langerhansin saarekesoluja käyttö lääkkeen valmistamiseksi diabeteksen hoitamiseksi nisäkkäässä, jolloin Sertoli-solujen määrä lääkkeessä on tehokas luomaan immunologisesti etuoikeutetun kohdan.

37. Patenttivaatimuksen 36 mukainen käyttö, jossa mainittu lääke on formuloitu hoitamaan diabetestä joka on tyyppiä I tai tyyppiä II.

38. Patenttivaatimuksen 36 mukainen käyttö, jossa lääke on formuloitu annettavaksi ihmiselle.

39. Patenttivaatimuksen 36 mukainen käyttö, jossa lääke on formuloitu Sertoli-soluilla, jotka ovat peräisin ihmisestä, naudasta tai siasta.

40. Patenttivaatimuksen 36 mukainen käyttö, jossa lääke on formuloitu haiman Langerhansin saarekesoluilla, jotka ovat peräisin ihmisestä, naudasta tai siasta.

41. Patenttivaatimuksen 36 mukainen käyttö, joka lääke on formuloitu annettavaksi transplantaatiolla.

42. Patenttivaatimuksen 41 mukainen käyttö, jossa mainittu transplantaatio on injektiolla munuaisen subkapsulaariseen tilaan.

43. Patenttivaatimuksen 41 mukainen käyttö, jossa mainittu transplantaatio on injektiolla ihonalaiseen pintaan.

44. Patenttivaatimuksen 36 mukainen käyttö, jossa lääke on formuloitu 10^5 - 10^{10} Sertoli-soluilla.

45. Patenttivaatimuksen 36 mukainen käyttö, jossa lääke on formuloitu sisältämään Langerhansin saarekesoluja annoksessa, joka vaihtelee välillä 5 - 1 000 saarekesolua/g kehon paino.

46. Patenttivaatimuksen 36 mukainen käyttö, joka lääke on formuloitu käsittämään lisäksi immunosupressiivisen aineen.

47. Patenttivaatimuksen 46 mukainen käyttö, jolloin immunosupressiivista ainetta sisältävä lääke on formuloitu annettavaksi ajan, joka on riittävä sallimaan siirrettyjen solujen olevan toiminnallisia.

48. Patenttivaatimuksen 46 mukainen käyttö, jossa mainittu immunosupressiivinen aine on syklosporiini.

49. Patenttivaatimuksen 48 mukainen käyttö, jossa lääke on formuloitu sisältämään syklosporiinia annoksessa 5 - 40 mg/kg kehon paino.

50. Patenttivaatimuksen 36 mukainen käyttö, jossa lääke on formuloitu käsittämään lisäksi terapeuttisesti tehokkaan määrän insuliinia.

51. Farmaseuttinen koostumus, joka käsittää Sertoli-soluja, haiman Langerhansin saarekesoluja ja farmaseuttisesti hyväksyttävän kantajan.

Patentkrav

1. Farmaceutisk komposition, kännetecknad av att den omfattar Sertoli-celler och en farmaceutisk godtagbar bärare.

2. Komposition enligt patentkrav 1, kännetecknad av att den ytterligare omfattar celler som producerar en biologisk faktor.

3. Komposition enligt patentkrav 2, kännetecknad av att den biologiska faktorna är ett hormon.

4. Komposition enligt patentkrav 2 och 3, kännetecknad av att nämnda celler som producerar den biologiska faktorerna är celler av bukspottskörtelns Langerhans öar.

5. Komposition enligt patentkrav 1, kännetecknad av att nämnda celler som producerar biologiska faktorer är celler som är förändrade med nukleinsyra, som kodar nämnda biologiska faktor.

6. Komposition enligt patentkrav 1 och 2, kännetecknad av att nämnda Sertoli-celler är människo-, nötkreatur- eller svinceller.

7. Komposition enligt patentkrav 4, kännetecknad av att nämnda celler av bukspottskörtelns öar är människo-, nötkreatur- eller svinceller.

8. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 1 för användning för att skapa ett immunologiskt privilegierat ställe i ett däggdjur.

9. Farmaceutisk kompostition enligt patentkrav 8, kännetecknad av att kompositionen är för användning för att skapa ett immunologiskt privilegierat ställe i en människa.

10. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 8, kännetecknad av att kompositionen är formulerad för att injiceras i njurens subcapsular område.

11. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 8, kännetecknad av att kompositionen är formulerad för att injiceras på en yta under huden.

12. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 8, kännetecknad av att kompositionen är formulerad med 10^5 - 10^{10} celler.

13. Farmaceutisk komposition enligt patentkrav 8, kännetecknad av att kompositionen är formulerad med Sertoli-celler som har sin ursprung i människa, nötkreatur eller svin.

14. En montering med fack som är utformad att ta emot en behållare, som är utformad att innehålla en farmaceutisk komposition enligt patentkrav 1.

15. En montering med fack, som omfattar en komposition enligt vilket som helst av patentkraven 2 - 7, vilken montering är utformad att ta emot en första behållare, som är utformad att innehålla Sertoli-celler, och en andra behållare, som är utformad att innehålla celler, som producerar en biologisk faktor, som saknas eller är otillräcklig i en sjukdom.

16. En montering med fack, som omfattar en komposition enligt vilket som helst av patentkraven 2 - 7, vilken montering är utformad att ta emot en första behållare, som är utformad att innehålla Sertoli-celler, och en andra behållare, som är utformad att innehålla celler från bukspottskörtelns Langerhans öar.

17. En tillverkningsartikel, som omfattar packningsmaterial och en farmaceutisk komposition enligt patentkrav 1, i vilken Sertoli-cellerna är inkluderade i nämnda packningsmaterial, i vilket nämnda Sertoli-celler är effektiva att skapa ett immunologiskt privilegierat ställe i ett däggdjur, och i vilken nämnda packningsmaterial innehåller en etikett, som uttrycker att nämnda Sertoli-celler kan användas för att skapa ett immunologiskt privilegierat ställe i ett däggdjur.

18. Användning av en komposition enligt vilket som helst av patentkraven 1 - 7 för att framställa en medicin för behandling av en sjukdom, där sjukdomen förorsakas av en brist på en biologisk faktor hos ett däggdjur.

19. Användning enligt patentkrav 18, där det nämnda däggdjuret är en människa.

20. Användning enligt patentkrav 18 och 19, där den nämnda biologiska faktorn är ett hormon.

21. Användning enligt patentkrav 18, där den nämnda biologiska faktorn är insulin och nämnda sjukdomen är sockersjuka.

22. Användning enligt patentkrav 21, där cellerna, som producerar nämnda biologiska faktor är celler av bukspottskörtelns Langerhans öar.

23. Användning enligt patentkrav 18, där cellerna, som producerar nämnda biologiska faktor är celler som är förändrade med nukleinsyra, som kodar nämnda biologiska faktor.

24. Användning enligt patentkrav 18, där medicinen är formulerad för att ges genom transplantation.

25. Användning enligt patentkrav 18, där medicinen är formulerad med 10^5 - 10^{10} Sertoli-celler.

26. Användning enligt patentkrav 18, där medicinen är formulerad med 10^5 - 10^{10} celler, som producerar en biologisk faktor.

27. Användning enligt patentkrav 24, där nämnda transplantationen är med en xenotransplantation.

28. Användning enligt patentkrav 24, där nämnda transplantationen är med en allotransplantation.

29. Användning enligt patentkrav 18, där medicinen ytterligare omfattar ett immunosuppressivt medel.

30. Användning enligt patentkrav 29, varvid medicinen, som innehåller immunosuppressivt medel, lämpar sig för administrering under en tid, som är tillräcklig för att tillåta nämnda flyttade celler att vara funktionella.

31. Användning enligt patentkrav 29, där nämnda immunosuppressiva medel är cyklosporin.

32. Användning enligt patentkrav 31, där nämnda medicinen är formulerad att innehålla 5 - 40 mg/kg kroppsvikt cyklosporin i en dos.

33. Användning enligt patentkrav 18, där medicinen är formulerad att omfatta en terapeutiskt effektiv mängd av en exogen biologisk faktor.

34. Användning enligt patentkrav 18, där nämnda medicinen är formulerad med celler, som producerar nämnda biologiska faktor och som är odlade tillsammans med Sertoli-celler i en vävnadsodling.

35. Användning enligt patentkrav 34, där nämnda medicinen är formulerad med celler som producerar nämnda biologiska faktor och som är köldförvarade före samodlingen med Sertoli-cellerna i vävnadsodlingen.

36. Användning av Sertoli-celler och en terapeutisk effektiv mängd celler av Langerhans öar för att framställa en medicin för behandling av diabetes hos däggdjur, varvid mängden av Sertoli-celler i medicinen är effektiv för att skapa ett immunologiskt privilegierat ställe.

37. Användning enligt patentkrav 36, där nämnda medicinen är formulerad för behandling av diabets som är av typ I eller typ II.

38. Användning enligt patentkrav 36, där medicinen är formulerad att ges till en människa.

39. Användning enligt patentkrav 36, där medicinen är formulerad med Sertoli-celler, som har sin ursprung i människa, nötkreatur eller svin.

40. Användning enligt patentkrav 36, där medicinen är formulerad med celler av bukspottskörtelns Langerhans öar, som har sin ursprung i människa, nötkreatur eller svin.

41. Användning enligt patentkrav 36, där medicinen är formulerad för att ges via transplantation.

42. Användning enligt patentkrav 41, där nämnda transplantationen är genom injektion i njurens subcapsular område.

43. Användning enligt patentkrav 41, där nämnda transplantationen är genom injektion till en yta under huden.

44. Användning enligt patentkrav 36, där medicinen är formulerad med 10^5 - 10^{10} Sertoli-celler.

45. Användning enligt patentkrav 36, där medicinen är formulerad att innehålla celler av Langerhans öar i en dos, som varierar mellan 5 - 1 000 celler /g kroppsvikt.

46. Användning enligt patentkrav 36, där medicinen är formulerad att ytterligare omfatta ett immunosuppresivt medel.

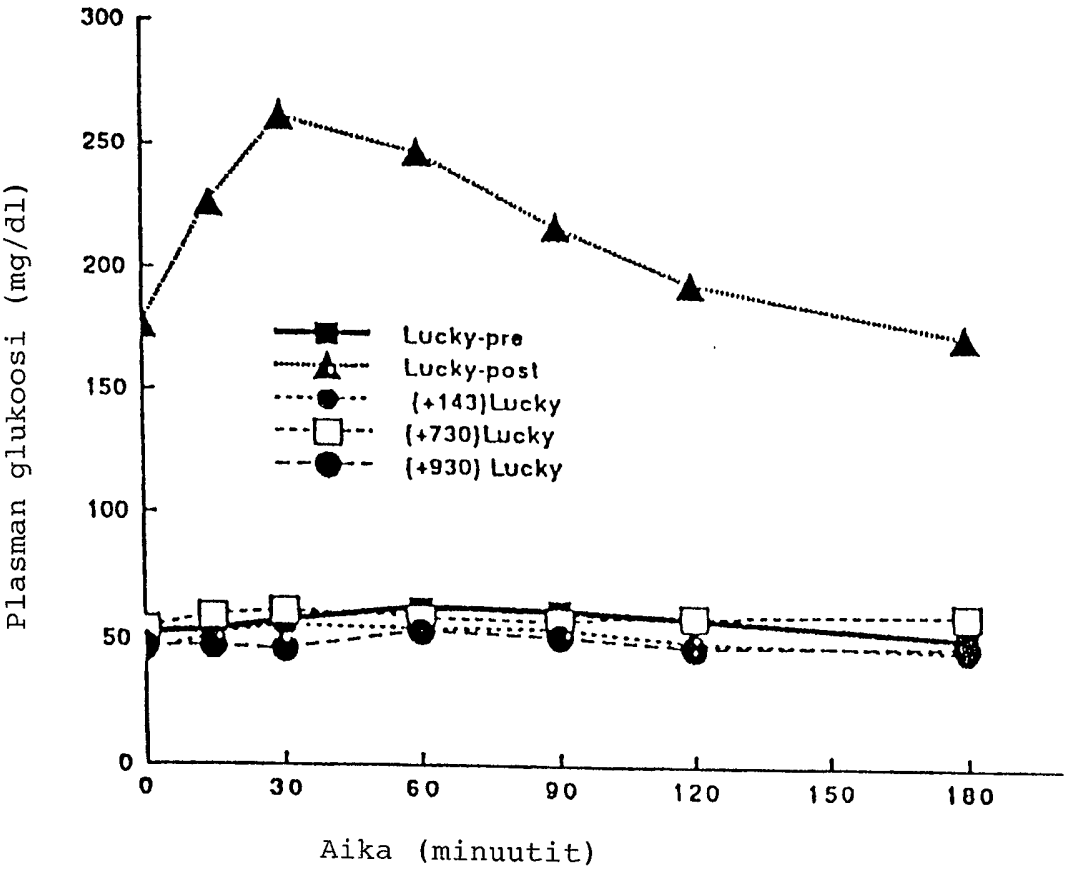
47. Användning enligt patentkrav 46, varvid det immunosuppressiva medlet är formulerat för att ges under en tid som är tillräcklig för att tillåta de flyttade cellerna att vara funktionella.

48. Användning enligt patentkrav 46, där nämnda immunosuppressiva medlet är cyklosporin.

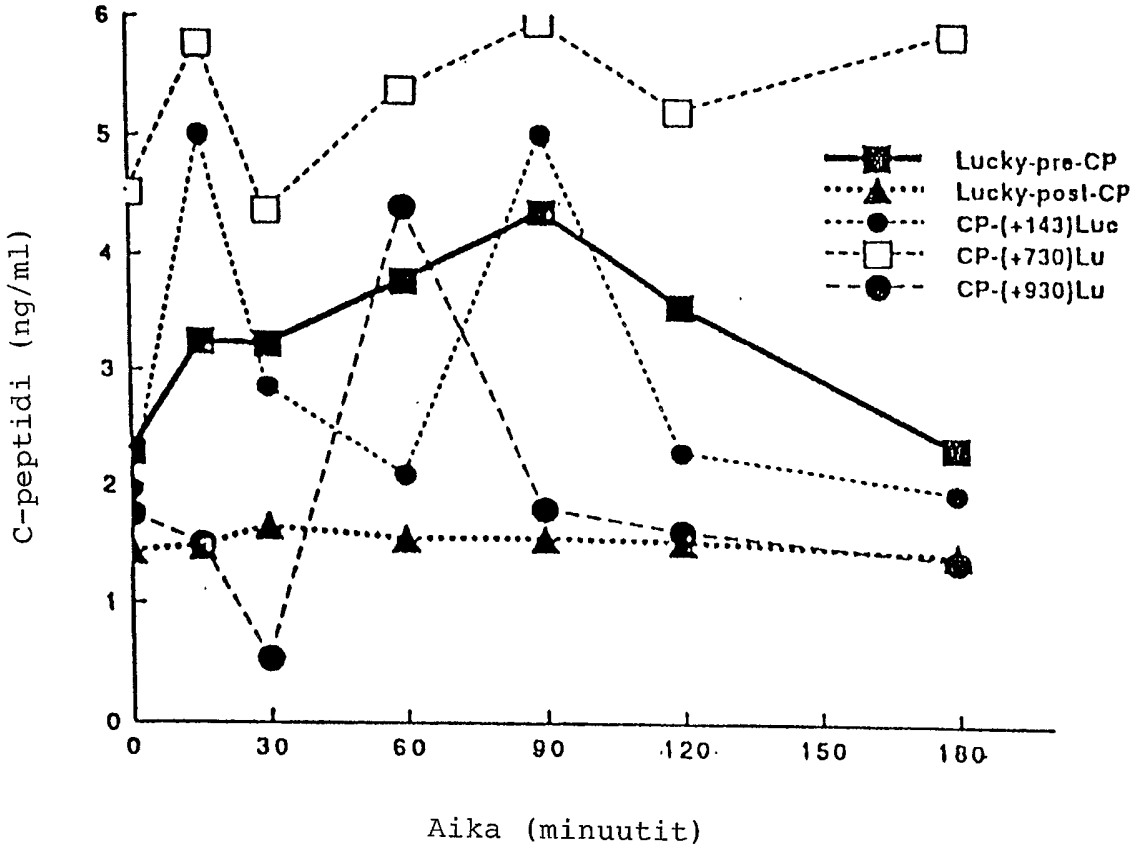
49. Användning enligt patentkrav 48, där medicinen är formulerad att innehålla cyklosporin i en dos 5 - 40 mg/kg kroppsvikt.

50. Användning enligt patentkrav 36, där medicinen är formulrad att omfatta ytterligare en terapeutisk effektiv mängd insulin.

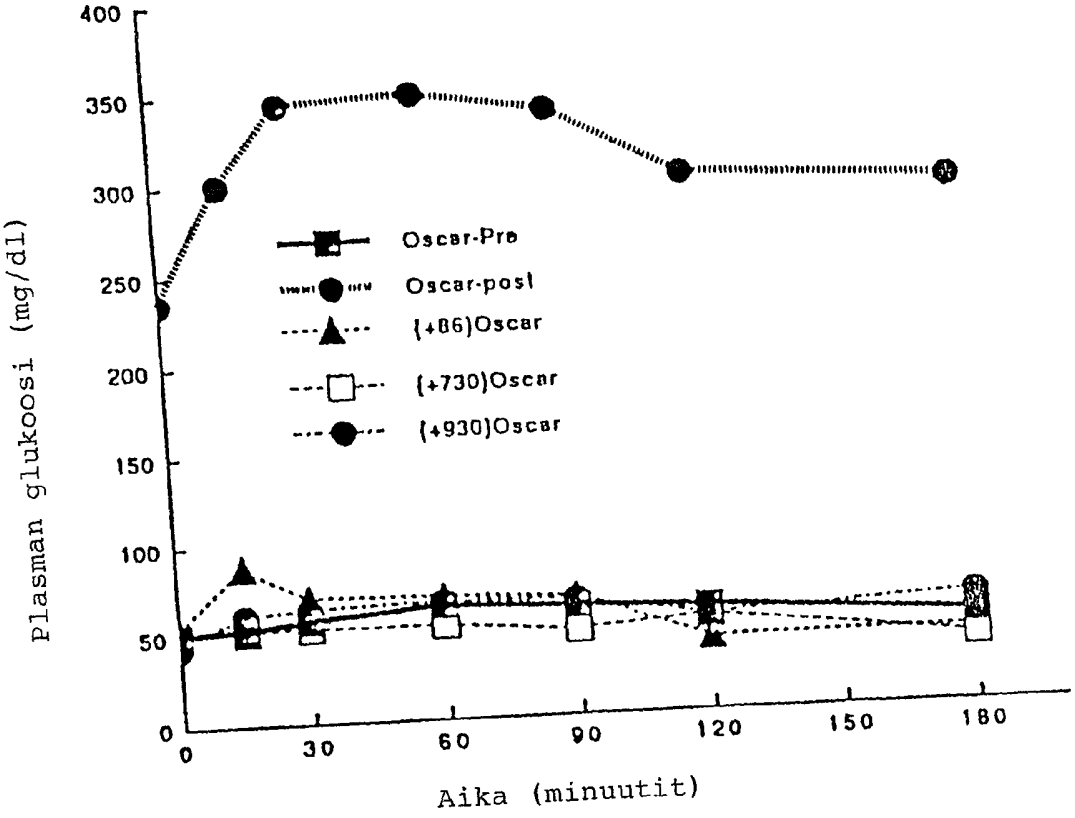
51. Farmaceutisk komposition som omfattar Sertoliceller, celler av bukspottskörtelns Langerhans öar och en farmaceutisk godtagbar bärare.


300
250
200
150
100
50
0
Plasman glukoosi (mg/dl)
0
30
60
90
120
150
180
Aika (minuutit)
Lucky-pre
Lucky-post
(+143)Lucky
(+730)Lucky
(+930) Lucky

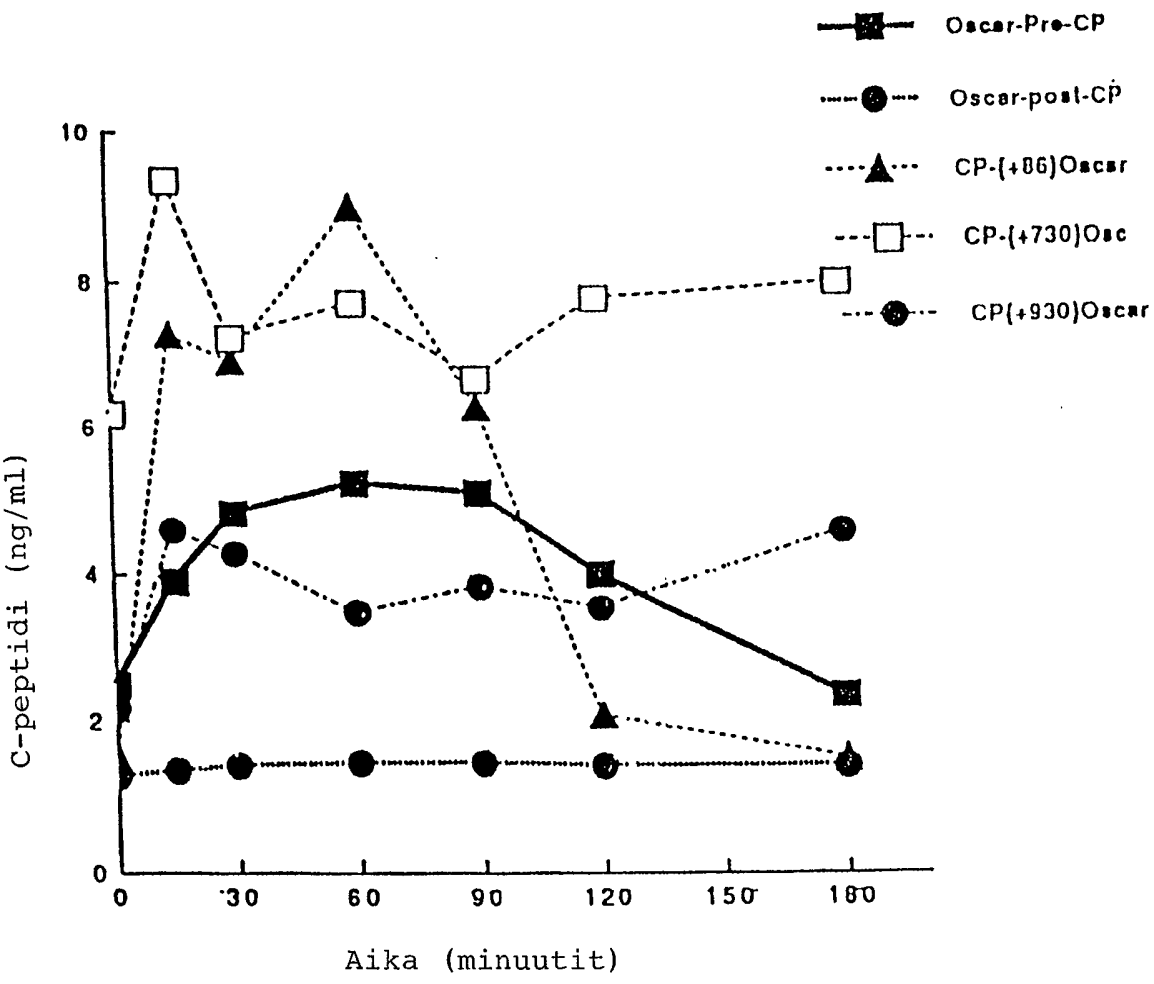
Kuvio 1


C-peptidi (ng/ml)
0
1
2
3
4
5
6
0
30
60
90
120
150
180
Aika (minuutit)
Lucky-pre-CP
Lucky-posl-CP
CP-(+143)Luc
CP-(+730)Lu
CP-(+930)Lu

Kuvio 2

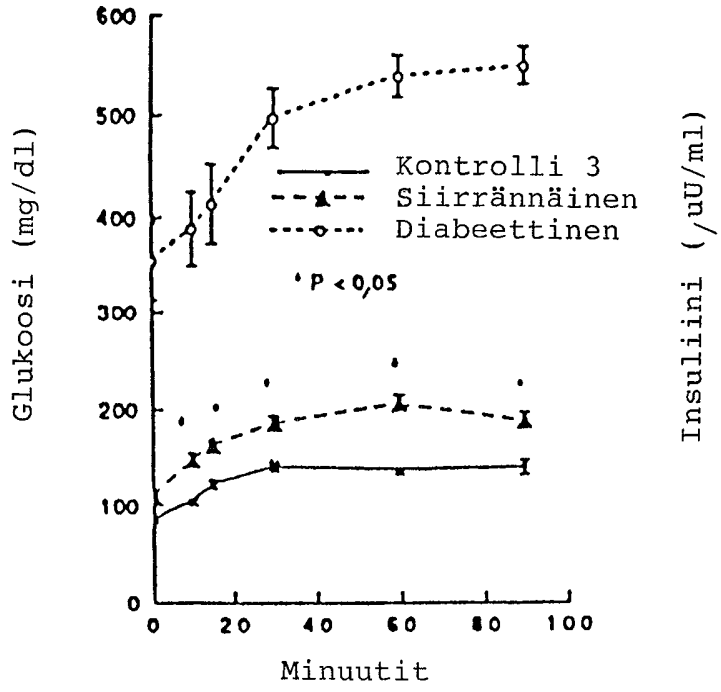

400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
30
60
90
120
150
180
Plasman glukoosi (mg/dl)
Aika (minuutit)
Oscar-Pre
Oscar-posl
(+86)Oscar
(+730)Oscar
(+930)Oscar

Kuvio 3

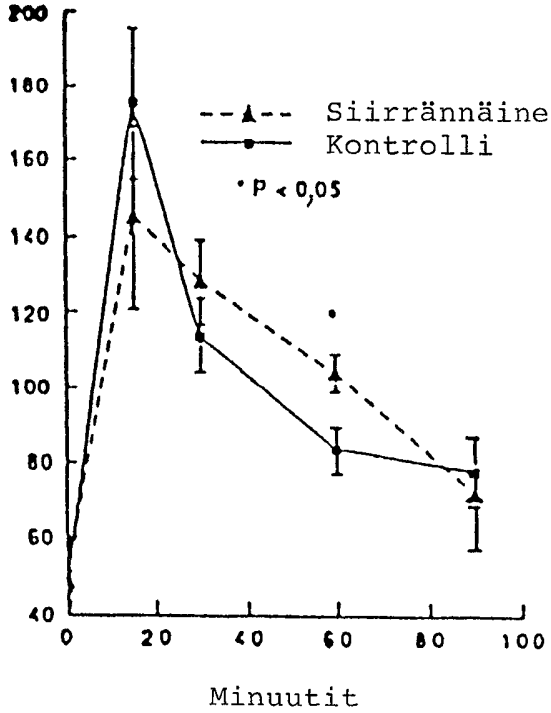

Oscar-Pre-CP
Oscar-post-CP
CP-(+86)Oscar
CP-(+730)Osc
CP(+930)Oscar
C-peptidi (ng/ml)
0
2
4
6
8
10
0
30
60
90
120
150
180
Aika (minuutit)

Kuvio 4

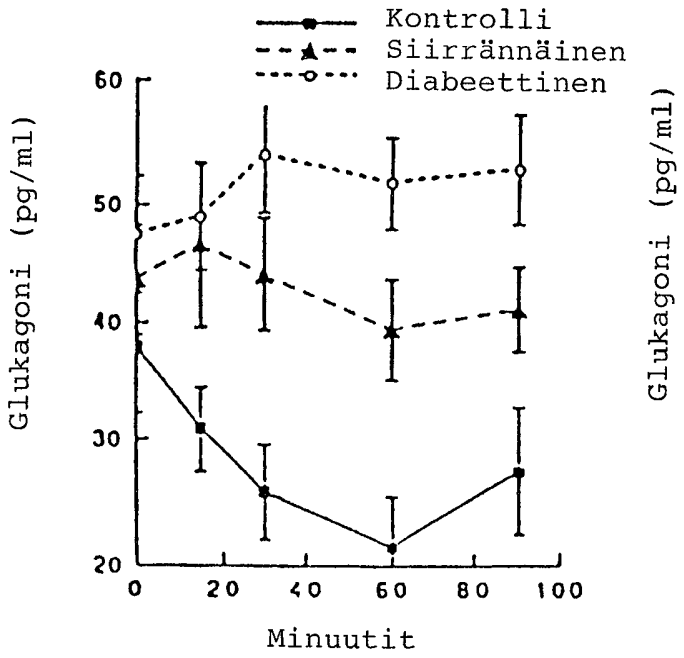
Kuvio 5a



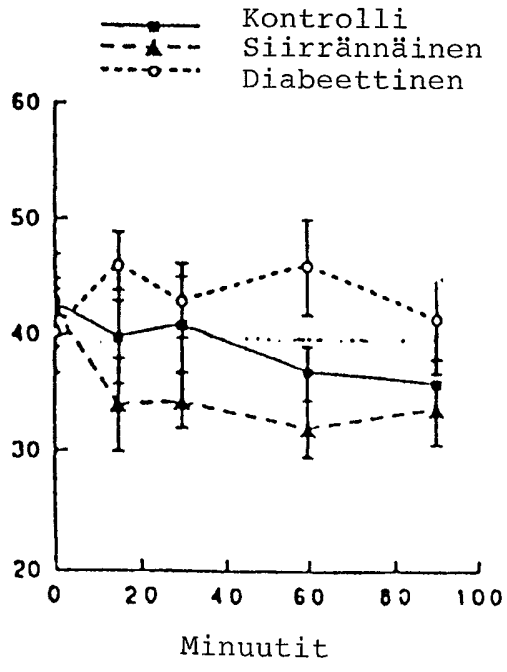
Kuvio 5b

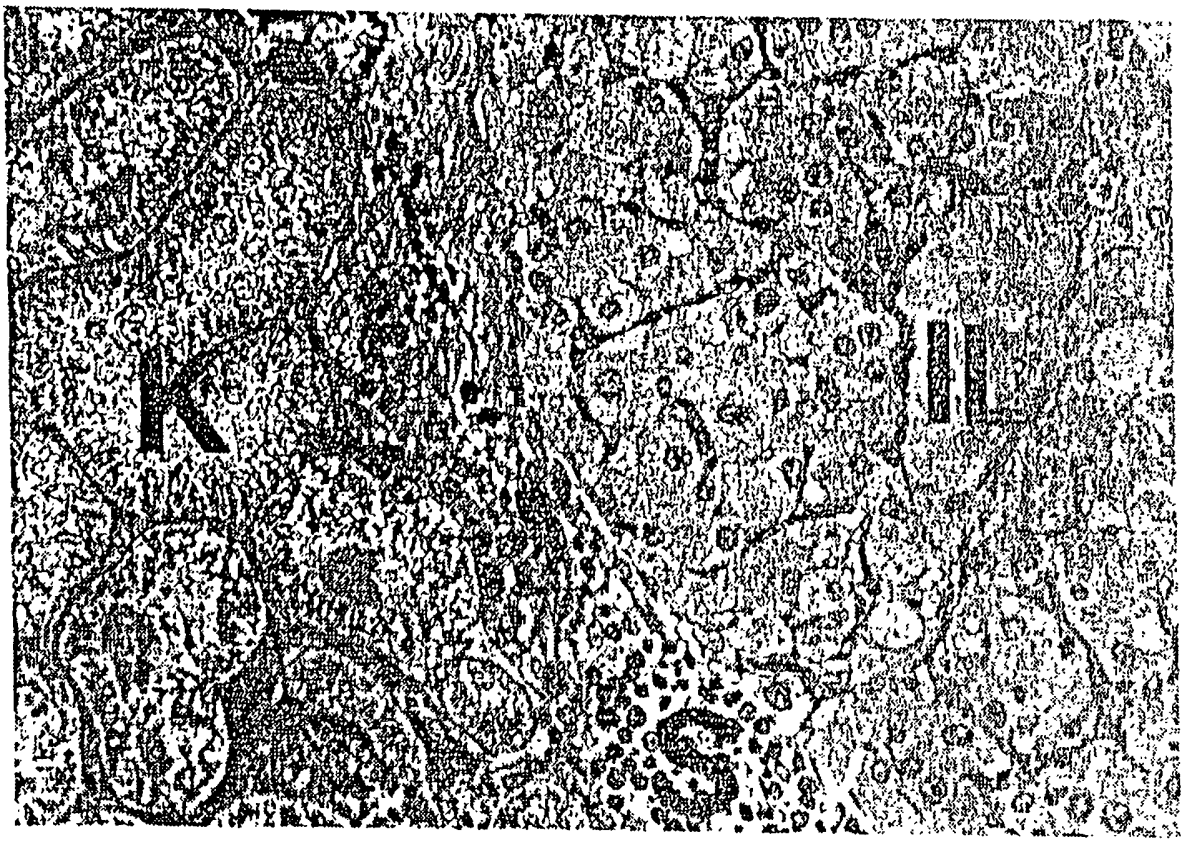


Kuvio 6a

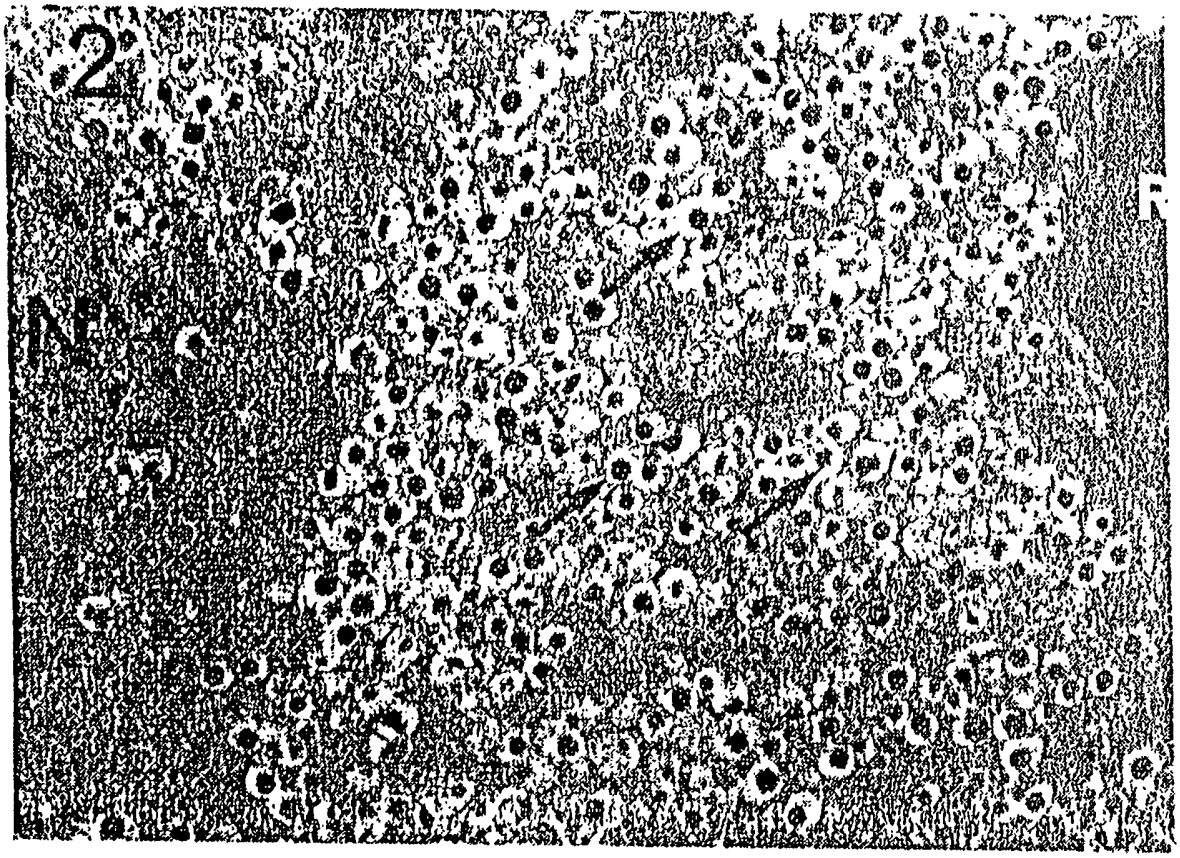


Kuvio 6b

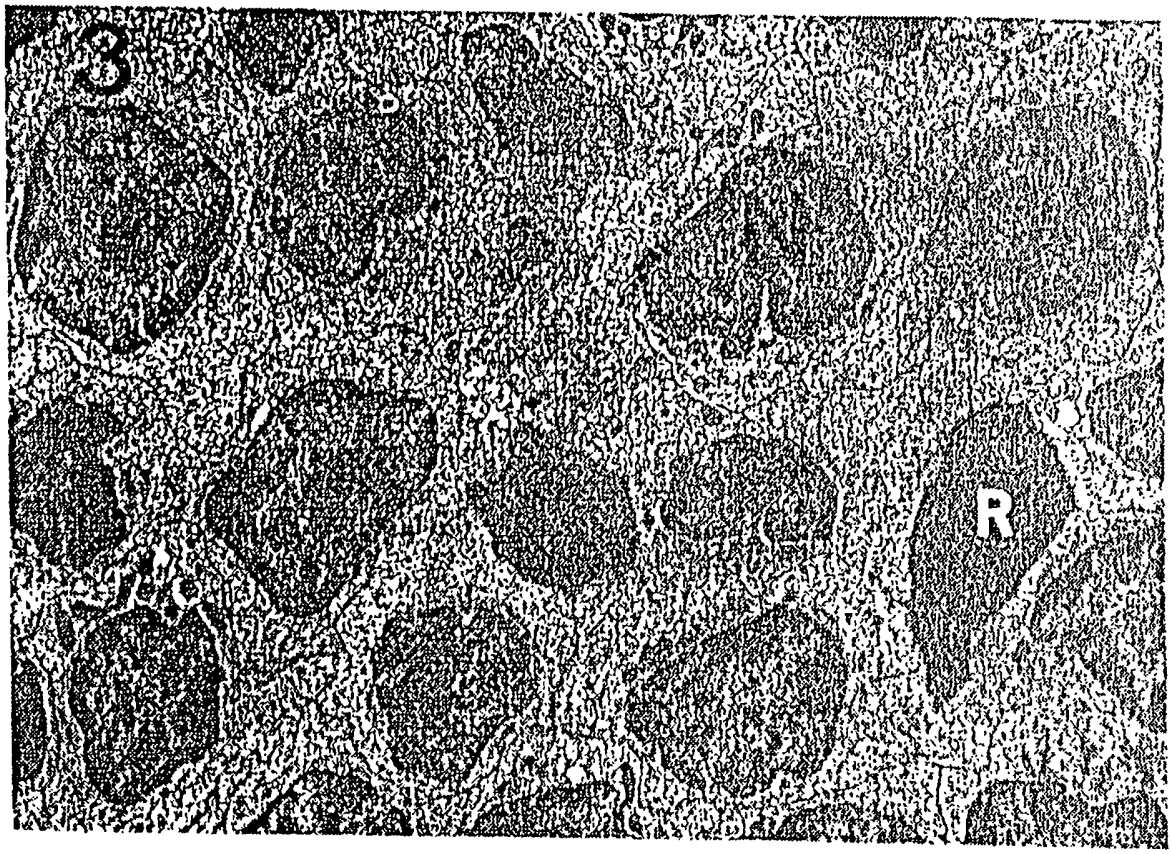




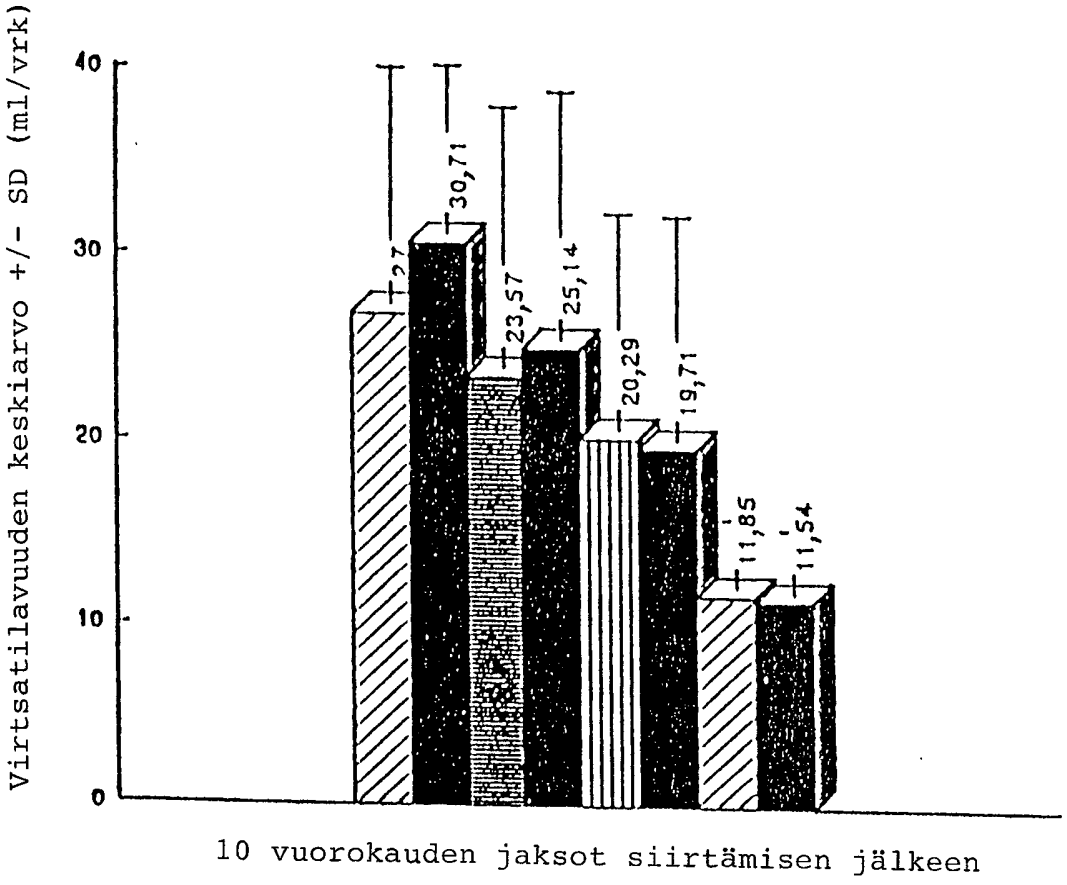
Kuvio 7



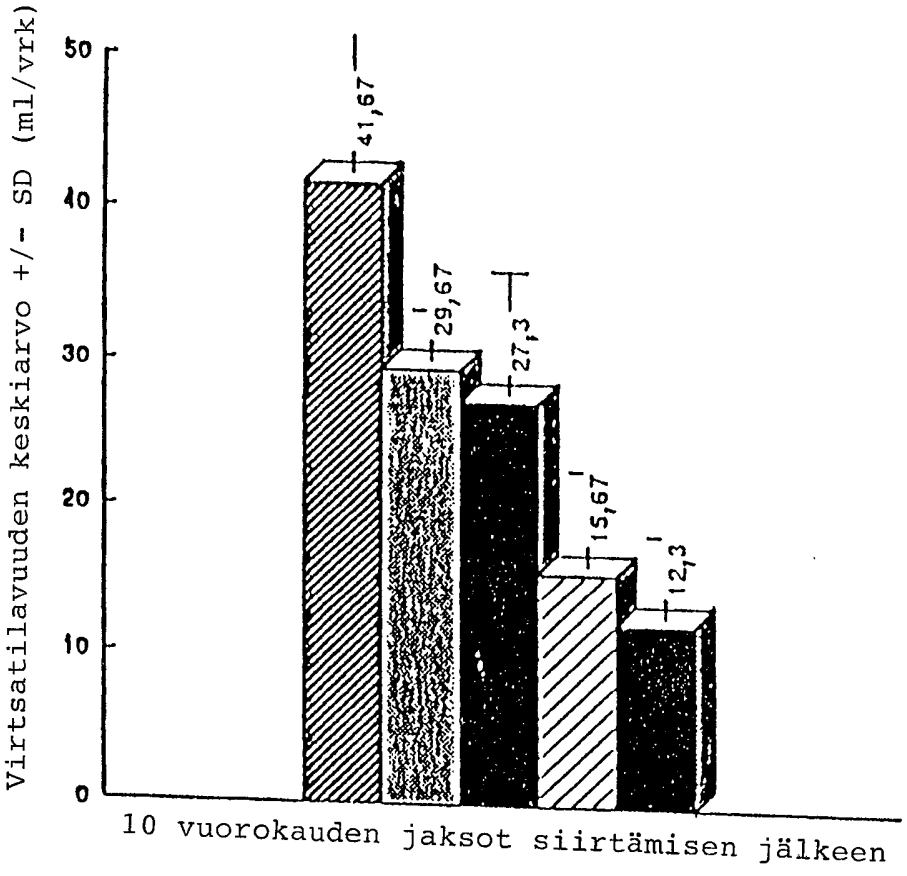
Kuvio 8



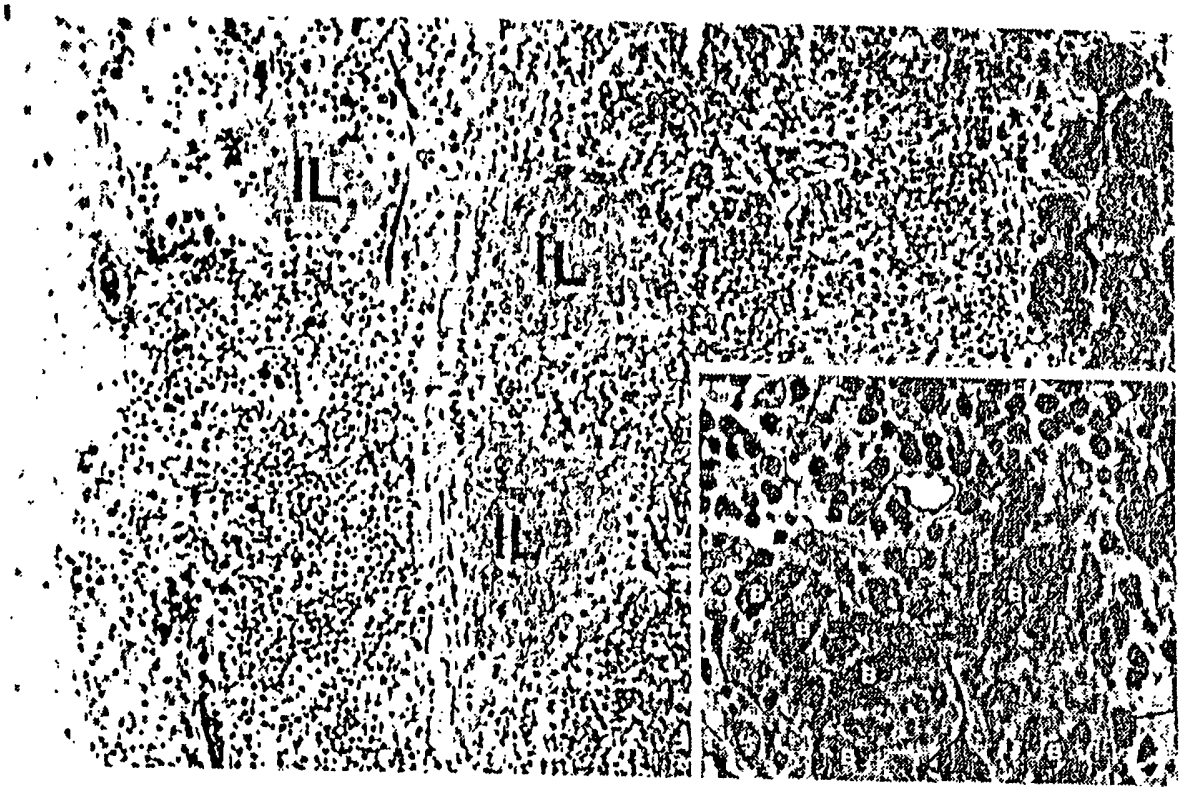
Kuvio 9


Virtsatilavuuden keskiarvo +/- SD (ml/vrk)
40
30
20
10
0
27
30,71
23,57
25,14
20,29
19,71
11,85
11,54
10 vuorokauden jaksot siirtämisen jälkeen

Kuvio 10


Virtsatilavuuden keskiarvo +/- SD (ml/vrk)
50
40
30
20
10
0
41,67
29,67
27,3
15,67
12,3
10 vuorokauden jaksot siirtämisen jälkeen

Kuvio 11



Kuvio 12