NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO (11) **302128** (13) B1

(51) Int Cl[6] C 12 N 11/04, A 61 K 9/50, B 01 J 13/04

Patentstyret

(21) Søknadsnr	913516	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	08.01.91, PCT/US91/00157
(22) Inng. dag	06.09.91	(85) Videreføringsdag	06.09.91
(24) Løpedag	08.01.91	(30) Prioritet	08.01.90, US, 461999
(41) Alm. tilgj.	31.10.91		
(45) Meddelt dato	26.01.98		

(73) Patenthaver Brown University Research Foundation, P.O. Box 1949, Providence, RI 02912, US

(72) Oppfinner Patrick Aebischer, Barrington, RI, US
Lars Wahlberg, Gavle, SE

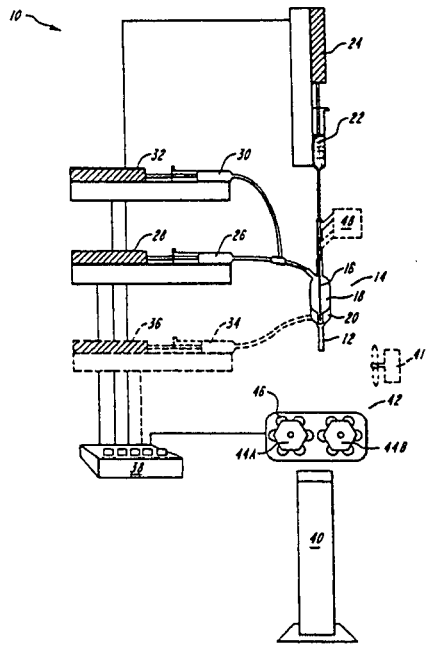
(74) Fullmektig Oslo Patentkontor AS, 0306 Oslo

(54) Benevnelse **Ekstruderingssystemer for celleinnkapslinger**

(56) Anførte publikasjoner EP 188309, GB 2192171, GB 1538510, WO 8704367

(57) Sammendrag

Levende celler (56) som danner biologisk aktive faktorer, kan innkapsles i en halvgjennomtrengelig polymermembran ved ko-ekstrudering av en vandig cellesuspensjon (54) og en polymerløsning (52) gjennom en felles åpning (14) under dannelse av et rørformet ekstrudat (12) med en polymermembran som innkapsler cellesuspensjonen. For eksempel kan cellesuspensjonen og polymerløsningen ekstruderes gjennom en felles ekstrusjonsåpning med minst to konsentriske huller (16 og 18) slik at cellesuspensjonen ekstruderes gjennom det indre hull (16) og polymerløsningen ekstruderes gjennom det ytre hull (18). Polymerløsningen koagulerer under dannelse av et ytre belegg eller membran. Etter hvert som den ytre membran dannes, kan endene av det rørformede ekstrudat forsegles under dannelse av en cellekapsel. Ved én utførelsesform forsegles det rørformede ekstrudat med mellomrom under avgrensing av atskilte cellekamre forbundet ved polymerbindinger (58). Ved en annen utførelsesform kan det dannes en cellekapsel forbundet med et bindende filament (59).


10
24
22
32
30
40
28
26
16
14
18
20
36
34
12
41
42
46
44A
44B
40

Det tekniske område for denne oppfinnelse angår innkapsling av levende celler for produksjon av biologisk aktive faktorer.

Det er for tiden betydelig interesse i de biologisk aktive produkter fra levende celler, innbefattende for eksempel nevrotransmittere, hormoner, cytokiner, nervevekstfaktorer, angiogenesefaktorer, blodkoagulasjonsfaktorer, lymfokiner, enzymer og andre terapeutiske midler. Det er også vesentlig interesse for utvikling av nye metoder og systemer for fremstilling av slike biologiske faktorer så vel som for avgivelse av disse faktorer til individer for terapeutiske formål.

For eksempel er Parkinsons sykdom karakterisert ved degenerering av det dopaminergiske svartstripesystem. Stripeimplantasjon av polymerstaver som frigjør vedvarende mengder av en nevrotransmitter, dopamin, er blitt rapportert å bedre eksperimentell parkinsonisme hos gnagere, hvilket viser at frigjøring av dopamin alene i den riktige målstruktur kan være i stand til å korrigere denne funksjonelle defekt.

I motsetning til den begrensede kapasitet av et polymert matriks-legemiddelfrigjøringssystem, er innkapslede dopaminfrigjørende celler blitt foreslått som et hjelpemiddel for tilveiebringelse av en kontinuerlig tilførsel av nevrotransmittere. Innkapsling av nevrotransmitter-utsondrende celler med en gjennomtrengnings-selektiv membran som muliggjør diffusjon av den biologiske faktor, vil kanskje ikke bare forhindre utstrømming av mitotisk aktive celler, men også forhindre vertsforkastelse når det gjelder transplantasjon mellom artene.

En rekke forskere har foreslått anvendelse av mikrokapsler - ørsmå kuler som innkapsler en mikroskopisk dråpe av en celleløsning - både for terapeutisk implanterings-formål og produksjon av biologiske produkter i stor målestokk. Det er imidlertid en rekke mangler ved mikroinnkapslings-fremgangsmåten: mikrokapslene kan være meget vanskelige å håndtere (og å få tilbake etter implantasjon); deres volum er begrenset; og de typer innkapslingsmaterialer som kan anvendes, er begrenset (ved dannelsesprosessen) til polymerer som kan løses i bioforenlige løsningsmidler.

En alternativ fremgangsmåte har vært makroinnkapsling, som

typisk innebærer innføring av celler i hule fibrer og deretter lukking av ekstremitetene i begge ender med en polymerlim. I motsetning til mikrokapsler, gir makrokapsler den fordel at de lett kan fås tilbake, et viktig moment ved terapeutiske (særlig nøytrale) implantater. Imidlertid har konstruksjon av makrokapsler tidligere ofte vært langsommelig og arbeidskrevende. På grunn av upålitelig lukking har videre vanlige metoder for makroinnkapsling gitt inkonsekvente resultater.

Det er behov for bedre teknikker for makroinnkapsling av celler både for terapeutisk innkapsling og industrielle produksjonsformål. Innkapslingsteknikker som kan praktiseres på en automatisert måte, og som gjør mulig anvendelse av et videre område av materialer og/eller gir mer pålitelig lukking, ville tilfredsstille et lenge følt behov på området.

Metoder og systemer er beskrevet for innkapsling av levedyktige celler som danner biologisk aktive faktorer. Cellene innkapsles i en halvgjennomtrengelig polymer-membran ved ko-ekstrudering av en vandig cellesuspensjon og en polymerløsning gjennom en felles åpning under dannelse av et rørformet ekstrudat med et ytre polymerbelegg som innkapsler cellesuspensjonen.

Ved ett aspekt av oppfinnelsen er det beskrevet metoder hvor cellesuspensjonen og polymerløsningen ko-ekstruderes gjennom en felles ekstrusjonsåpning med minst to konsentriske huller, slik at cellesuspensjonen ekstruderes gjennom det indre hull og polymerløsningen ekstruderes gjennom det ytre hull. Polymerløsningen koaguleres under dannelse av et semipermeabelt ytre belegg. Dette utføres som angitt i krav 1' karakteriserende del. Etter hvert som det ytre belegg dannes, kan endene av det rørformede ekstrudat forsegles under dannelse av en cellekapsel. Ved én illustrert utførelsesform forsegles det rørformede ekstrudat med mellomrom under avgrensing av atskilte cellekamre forbundet ved polymerbindinger.

Snorer av cellekapsler dannet på denne måte har en rekke fordeler fremfor vanlige celleinnkapslende produkter. Flerkammerformen sikrer at brudd i den rørformede membran kan begrenses til individuelle cellekapsler. Videre er utformningen spesielt fordelaktig ved preparering av implanterbare

cellekulturer for avgivelse av biologisk aktive faktorer til et individ for terapeutiske formål. Snoren av cellekapsler kan være kveilet, tvunnet eller på annen måte fastlagt i forskjellige former under tilveiebringelse av en tett og kompakt struktur for implantasjon. På grunn av at cellekapslene er forbundet med hverandre, kan de også lett fås tilbake, hvis nødvendig, etter implantering. Den snorliknende beskaffenhet av disse produkter er spesielt foretrukket fremfor individuelle sfæriske mikrokapsler som typisk fås tilbake ved utsugning (hvilket ofte resulterer i en høy prosentandel av kapsler som ikke kan fås tilbake, og følgelig inflammasjon hos individet).

Flerkammer-cellekapselsnorer kan dannes av det rørformige ekstrudat ifølge den foreliggende oppfinnelse ved forsegling av ekstrudatet med mellomrom under anvendelse av forskjellige teknikker. For eksempel kan ekstrudatet forsegles ved at det komprimeres med mellomrom under anvendelse av mekanisk eller pneumatisk kraft. Alternativt kan trykket under hvilket celle-suspensjonen eller polymerløsningen ekstruderes, modifiseres under sammenfalling av det rørformede ekstrudat med mellomrom og avgrensing av atskilte cellekamre. Ved enda en annen teknikk kan strømmen av cellesuspensjon avbrytes eller på annen måte hemmes med mellomrom slik at det rørformede ekstrudat på samme måte faller sammen og cellekamre avgrenses.

Produktene ifølge den foreliggende oppfinnelse er spesielt godt egnede for anvendelse som terapeutiske implanteringsanordninger, så som beskrevet i US-patent 4 892 538, "In Vivo Delivery Of Neurotransmitters By Implanted, Encapsulated Cells" av Aebischer et al., utstedt 9. januar 1990, medtatt i det foreliggende som referanse. I US-patent 4 892 538 er det beskrevet teknikker for implantering av innkapslede nevrotransmitter-utsondrende celler i et målområde i hjernen hos et individ, slik at de innkapslede celler utsondrer en nevrotransmitter og derved muliggjør fundamental avgivelse av et terapeutisk middel for behandling av en nevrologisk defekt, så som Parkinsons sykdom. Alternativt kan kunstige organer som kan utsondre andre biologiske faktorer, så som hormoner (f.eks. insulin, thymus-("thymic")-faktorer og liknende) også konstrueres

under anvendelse av de rørformede ekstrudater og flerkammer-cellekapselsnorer ifølge den foreliggende oppfinnelse.

Cellekapslene er også velegnede for anvendelse i bioreaktorer og andre in vitro-dyrkningssystemer, for fremstilling av legemidler og andre nyttige biologiske materialer. Ved slike anvendelser innkapsles celler som danner slike materialer, enten naturlig, ved mutasjon eller ved rekombinant utformning, og får syntetisere materialene som kan oppsamles etter utsondring til et sirkulerende dyrkningsmedium. Alternativt kan de biologiske materialer opphopes inne i cellekapslene (f.eks. ved hensiktsmessig regulering av porøsiteten) og deretter høstes ved fjerning av snorene fra dyrkningsmediet, lysering av polymermembranene og gjenvinning av de syntetiserte materialer i konsentrert form.

Polymerbelegget er en halvgjennomtrengelig membran, d.v.s. en porøs struktur som kan beskytte transplanterte celler mot autoimmunt eller virus-angrep så vel som mot andre skadelige materialer i det ytre miljø, mens essensielle næringsstoffer, celle-avfallsprodukter og celleutsondrings-materialer får diffundere gjennom den. Anvendt i det foreliggende beskriver betegnelsen "selektivt gjennomtrengelig" eller "halvgjennomtrengelig" bioforenlige membraner som gir mulighet for at oppløste stoffer med en molekylvekt på opp til ca. 150 000 (Mr) kan diffundere gjennom dem.

Gjennomtrengeligheten av polymerbelegget kan varieres ved regulering av viskositeten av polymerløsningen, slik at belegget ved koagulering vil danne et nettverk av mikrokanaler under tilveiebringelse av diffusjonsveier. Ved én utførelsesform kan dette oppnås ved anvendelse av et vann-blandbart løsningsmiddel som en komponent i polymerløsningen, og opprettholdelse av en trykkforskjell mellom den vandige cellesuspensjon og polymerløsningen under ekstrusjonen. Etter hvert som det rørformede ekstrudat dannes, infiltreres vann fra den vandige cellesuspensjon i den koagulerende polymer under erstatning av løsningsmidlet etter hvert som løsningsmidlet drives utover ved trykkforskjellen. Ved koagulering tilveiebringer vannet som er blitt infiltrert i polymerbelegget, et nettverk av porer. Det

optimale trykk og viskositet vil selvfølgelig variere med anvendt løsningsmiddel og polymer, men kan lett konstateres for hvilken som helst spesiell polymer/løsningsmiddel-kombinasjon av fagfolk på området uten unødig eksperimentering.

Ved et annet aspekt av fremgangsmåten er det beskrevet systemer for innkapsling av celler under dannelse av det rørformede ekstrudat og flerkammer-cellekapselprodukter beskrevet ovenfor. Dette system kan innbefatte en ekstrusjonshode-montasje (f.eks. en spinnevorte eller liknende) med et første indre hull og et andre konsentrisk ytre hull så vel som en cellesuspensjons-tilførselsanordning for tilførsel av den vandige cellesuspensjon til det indre hull i ekstrusjonshode-montasjen, og en polymerløsnings-tilførselsanordning for tilførsel av polymer-løsningen til det ytre hull i ekstrusjonshode-montasjen. Etter hvert som cellesuspensjonen og polymerløsningen ko-ekstruderes, danner de et rørformet ekstrudat med et polymert ytre belegg som innkapsler cellesuspensjonen.

Det rørformede ekstrudat kan forsegles med mellomrom ved hvilken som helst av en rekke mekanismer. Ved én illustrerende utførelsesform samarbeider to hjul med tilstoppende elementer i sin omkrets, ved rotering under periodisk klemming av det rørformede ekstrudat og derved forsegling av det. Dette mekaniske kompresjonssystem kan erstattes av forskjellige andre mekaniske eller pneumatiske kompresjonssystemer under forsegling av det rørformede ekstrudat med mellomrom.

Alternativt kan systemet innbefatte en strømningsregule-ringsanordning for variering av trykkforskjellen mellom den vandige cellesuspensjon og polymerløsningen under ko-ekstru-sjonen. For eksempel kan hver av komponent-tilførselsanordnin-gene innbefatte en infusjonspumpe som drives ved hjelp av en computer eller annet kontrollelement. Ved normal drift reguleres infusjonspumpene under opprettholdelse av en trykkforskjell mellom den vandige cellesuspensjon og polymerløsningen, slik at polymer-løsningsmidlet drives utover under koagulasjonen. Ved periodisk variering av trykket kan det rørformede ekstrudat bli brakt til å falle sammen med mellomrom under avgrensing av individuelle cellekamre. Dette kan for eksempel utføres ved

reduksjon av trykket i den vandige løsning. I noen tilfeller kan det være foretrukket å avslutte strømningen av den vandige løsning fullstendig og danne et vakuum for å sikre en fullstendig forsegling mellom kamrene.

Forskjellige andre teknikker kan likeledes anvendes for avbrytelse av strømmen av den vandige løsning med mellomrom og derved bevirke at det rørformede ekstrudat faller sammen og danner multiple kamre. For eksempel kan en tilbaketrekningsmekanisme innarbeides i ekstrusjonshode-montasjen for bevegelse av det indre hull i forhold til det ytre hull, slik at strømmen av den vandige løsning avbrytes under avgrensing av atskilte cellekamre med mellomrom.

Systemene som er beskrevet i det foreliggende, kan videre innbefatte et bråavslutningsbad for koagulering av polymerløsningen etter ekstrusjon, og forskjellige mekanismer for tørking av det rørformede ekstrudat etter hvert som det kommer fram fra ekstrusjonshodet, innbefattende vifter, eller evakueringskamre. Ekstrusjonshodemontasjen kan innbefatte ytterligere huller under tilveiebringelse av multiple belegg eller avgivelse av et bråavslutningsfluid rundt det rørformede ekstrudat. Systemet kan også innbefatte et bunnfellingskammer for cellesuspensjonen, eller en ekvivalent cellepakkingsmekanisme, for øking av celledensiteten i den vandige cellesuspensjon.

Oppfinnelsen vil nedenfor bli beskrevet i forbindelse med visse illustrerte utførelsesformer; det bør imidlertid være klart at forskjellige addisjoner, subtraksjoner eller modifikasjoner kan gjøres av fagfolk på området uten at man avviker fra oppfinnelsens prinsipp eller ramme.

Kort beskrivelse av tegningene

Fig. 1 er et fullstendig skjematisk diagram over et system for innkapsling av levedyktige celler ifølge oppfinnelsen,

fig. 2 er et mer detaljert skjematisk diagram over en ekstrusjonshodemontasje for anvendelse i systemet ifølge fig. 1,

fig. 3 er et skjematisk diagram over en alternativ ekstrusjonshodemontasje for anvendelse i systemet ifølge fig. 1,

fig. 4 er et skjematisk diagram over en mekanisme for

periodisk forsegling av et rørformet ekstrudat ifølge oppfinnelsen under dannelse av en flerkammer-celledyrkningsbærer,

fig. 5 er et skjematisk diagram over en mekanisme for dannelse av bånd-cellekapsler,

fig. 6 er et diagram som viser dopaminfrigjøring sammenstilt med tiden for kapsler som inneholder dopamin-utsondrende celler, fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse med tre forskjellige løsningsmiddelsystemer,

fig. 7 er et diagram som viser dopamin-frigjøring ved PC12-celler under normale og kaliumstimulerte betingelser på forskjellige tidspunkter etter innkapsling ifølge oppfinnelsen,

fig. 8 er et diagram som viser frigjøring av katekolaminer fra innkapslede PC12-celler, og

fig. 8B er et diagram som viser frigjøring av 5 katekolaminer fra innkapslede kromaffinceller.

Detaljert beskrivelse

På fig. 1 er det vist et system 10 for fremstilling av et rørformet ekstrudat 12 ifølge den foreliggende oppfinnelse, innbefattende et ekstrusjonshode 14 med et første (innerste) hull 16, et andre ytre hull 18 og eventuelt et tredje (ytterste) hull 20. Systemet 10 innbefatter videre et cellesuspensjonstilførselsrør 22 og en tilknyttet pumpe 24, et polymerløsningstilførselsrør 26 og en tilknyttet pumpe 28 og eventuelt et spyleløsningstilførselsrør 30 med en pumpe 32. Dessuten kan systemet også eventuelt innbefatte et ytre tilførselsrør for strømmende bråavslutningsfluid 34 med en tilknyttet pumpe 36. Alle pumpe-elementene kan reguleres manuelt eller fortrinnsvis ved hjelp av en automatisert regulator (f.eks. en mikroprosessor) 38. Systemet 10 kan også innbefatte et bråavslutningsbad 40, som normalt vil være anbrakt direkte under ekstrusjonshodet 14 under drift. Alternativt kan systemet innbefatte en vifte 41, eller systemet kan anvendes med et evakuert eller annet reudsert-trykks-kammer for å hjelpe på løsningsmiddelfjerning.

Når systemet 10 anvendes for å forme det rørformede ekstrudat til en flerkammer-cellekapselsnor, kan det anvendes en forseglingsanordning. Ett slikt forseglingselement 42 er vist

på fig. 1, innbefattende to motoriserte hjul 44A og 44B, som har en serie fremspring 46 som samarbeider under rotering under periodisk klemming og forsegling av det rørformede ekstrudat etter hvert som det passerer mellom hjulene 44A og 44B.

Alternativt kan en inntrekkingsanordning 48 anvendes under periodisk inntrekking av det indre hull for avbrytelse av strømmen av cellesuspensjonen. Effekten av disse inntrekkinger er periodisk å forsegle det rørformede ekstrudat og igjen danne multiple kamre. Ved enda en annen alternativ fremgangsmåte kan regulatoren 38 variere trykket som påføres ved pumpe 24 (og/eller pumpe 28) under dannelse av periodiske avbrytelser i strømmen av cellesuspensjonen.

På fig. 2 er ekstrusjonshodet 14 vist mer detaljert, innbefattende et indre hull 16 for avgivelse av en cellesuspensjon og et ytre hull 18 for avgivelse av en polymerløsning. Etter hvert som cellesuspensjonen og polymerløsningen ekstruderes gjennom den felles ekstrusjonsåpning 19, koaguleres polymerløsningen under dannelse av et ytre belegg rundt cellesuspensjonen.

På fig. 3 er et alternativt ekstrusjonshode 14A vist mer detaljert, omfattende et indre hull 16 for avgivelse av cellesuspensjonen, et andre hull 18 (som omgir det indre hull) for avgivelse av polymerløsningen, og et ytterste hull 20 for avgivelse av et strømmende bråavslutningsfluid, så som saltløsning. Ved denne utførelsesform kan det fås et glatt belegg ved samtidig ekstrudering av cellesuspensjonen og polymerløsningen gjennom felles åpning 19 mens det tilføres et strømmende bråavslutningsfluid under ekstrusjonen (f.eks. fra det ytterste hull 20 i ekstrusjonshodemontasjen 14A).

På fig. 4 er forseglingselementet 42 på fig. 1 vist mer detaljert. Motoriserte hjul 44A og 44B er montert på motsatte sider av det rørformede ekstrudat 12, slik at fremspringene 46 på hjulene ved rotering periodisk kommer i kontakt med ekstrudatet 12 under klemming og forsegling av ekstrudatet 12 etter hvert som det kommer ut fra ekstrusjonshodet 14. Hjulene 44A og 44B kan være mekanisk sammenbundet og drevet av en vanlig motor under regulering av en regulator så som vist på fig. 1.

Resultatet av den periodiske forsegling av ekstrudatet 12 er en flerkammer-makrokapselkjede 50 med en polymer-membran 52 som omgir en innkapslet celleløsning 54 hvor individuelle celler 56 er anbrakt. De individuelle cellekapsler er knyttet til hverandre ved bindefilamenter 58 hvor fremspringene 46 på forseglingsanordningen 42 har klemt ekstrudatet 12.

Forskjellige polymerer kan anvendes for dannelse av membranbeleggene ved fremgangsmåte ifølge den foreliggende oppfinnelse, innbefattende polymerer som stammer fra løsninger som ellers ville være uforenlige med formeringen av levende celler. På grunn av den unike ekstruderingsfremgangsmåte beskrevet ved den foreliggende oppfinnelse, drives løsningsmidler som ellers ville være toksiske, hurtig bort fra den vandige cellesuspensjon under membrandannelsesprosessen, hvorved anvendelse av mange nye og potensielt egnede polymermaterialer blir mulig. For eksempel kan polymer-membraner dannes av polyakrylater (innbefattende akryl-kopolymerer), polyvinylidiener, polyuretaner, polystyrener, polyamider, celluloseacetater, cellulosenitrater, polysulfoner, polyakrylnitriler, så vel som derivater, kopolymerer og blandinger av disse.

Løsningsmidlet for polymerløsningen vil avhenge av den spesielle valgte polymer for membranmaterialet. Egnede løsningsmidler innbefatter mange forskjellige organiske løsningsmidler så som alkoholer og ketoner, generelt, så vel som dimetylsulfoksyd (DMSO), dimetylacetamid (DMA) og dimetylformimid (DMF), spesielt. Vanligvis er vann-blandbare organiske løsningsmidler foretrukket.

Polymerløsningen eller "dop" kan også innbefatte forskjellige additiver, innbefattende overflateaktive midler, for forøkning av dannelsen av porøse kanaler, så vel som antioksydanter for sekvestrering av oksyder som dannes under koagulasjonsprosessen. Når kapslene ifølge den foreliggende oppfinnelse er utformet for implantasjon, kan videre materialer så som anti-inflammatoriske midler og cellevekstfaktorer også innarbeides i polymer-membranen under henholdsvis reduksjon av immunrespons eller stimulering av cellekulturen. Alternativt kan disse

materialer tilsettes til flerkammer-cellekapselkjedene etter dannelse ved en etterbeleggings- eller sprøyteprosess. Kjedene kan for eksempel nedsenkes i en løsning som inneholder et anti-inflammatorisk middel så som et kortikoid, en angiogen faktor eller en vekstfaktor etter ekstrusjon for etterbelegging av cellekapslene.

Etterbelegningsprosesser kan også anvendes for tilveiebringelse av en beskyttende barriere mot immunogener og liknende. Etter dannelse kan for eksempel cellekapselkjedene belegges (f.eks. ved nedsenking, sprøyting eller tilføring av et strømmende fluid under ekstrusjonen) med et overflatebeskyttende materiale så som polyetylenoksyd eller polypropylenoksyd (f.eks. med en molekylvekt på ca. 10 000 Dalton eller større), for inhibering av protein-vekselvirkninger med kapslene.

Forskjellige teknikker kan også anvendes for regulering av glattheten eller ruheten av den ytre overflate av polymerbelegget. I noen tilfeller kan et meget glatt ytre belegg være foretrukket for reduksjon av arrvevstilhefting og andre immunreaksjoner under implantasjonen. Et slikt glatt lag kan fås ved samtidig nedsenking av det rørformede ekstrudat i et bråavslutningsmiddel så som et bad av fysiologisk saltoppløsning, eller ved anvendelse av et strømmende bråavslutningsfluid under ekstrusjonen (f.eks. fra et tredje, konsentrisk ytterste hull i en ekstrusjonshodemontasje). Ved noen anvendelser kan alternativt en ru ytre overflate med større porer være ønskelig, for eksempel i tilfeller hvor kapillær-innvekst under implantasjonen er ønskelig, og en slik mer ru ytre overflate kan fås ved koagulering i luft.

Forskjellige cellelinjer kan innkapsles ifølge den foreliggende oppfinnelse. Som angitt ovenfor, er flerkammer-cellekultursnorene spesielt egnede for den grunnleggende avgivelse av nevrotransmittere, så som dopamin, som utsondres av celler i binyremargen, vev fra ventral midthjerne hos fostere og nevroblastiske cellelinjer. PC12-celler (en udødeliggjort cellelinje som stammer fra et rotte-feokromocytom) er spesielt foretrukket ved noen anvendelser på grunn av sin evne til utsondring av store mengder dopamin i løpet av lange tidsrom.

Andre nevrotransmittere innbefatter gamma-aminosmørsyre (GABA), serotonin, acetylkolin, noradrenalin og andre forbindelser som er nødvendige for normale nervefunksjoner. En rekke cellelinjer er kjent eller kan isoleres som utsondrer disse nevrotransmittere. Det kan også anvendes celler som syntetiserer og utsondrer agonister, analoger, derivater eller fragmenter av nevrotransmittere som er aktive, innbefattende for eksempel celler som utsondrer bromkriptin, en dopamin-agonist, og celler som utsondrer L-dopa, en dopamin-forløper.

Ved andre utførelsesformer av oppfinnelsen kan de innkapslede celler velges på grunnlag av sin utsondring av hormoner, cytonkiner, nervevekstfaktorer, angiogenesefaktorer, antistoffer, blodkoagulasjonsfaktorer, lymfokiner, enzymer og andre terapeutiske midler.

De vandige cellesuspensjoner kan videre innbefatte forskjellige additiver for beskyttelse av cellene under ekstrusjonsprosessen eller for stimulering av veksten av dem etterpå. Slike additiver kan for eksempel innbefatte et næringsmedium eller vekstfaktorer som innarbeides i den vandige suspensjon, så vel som et forankrings-underlagsmateriale for forøkning av celletilheftingen. Forankrings-underlagsmaterialet kan være et proteinholdig materiale så som kollagen, laminin eller polyaminosyrer. Alternativt kan cellesuspensjonen eller polymerløsningen (eller begge) innbefatte et skummingsmiddel eller et sprengmiddel som kan forstyrre den indre overflate av polymerbelegget under øking av forankrings-overflatearealet av rørets indre.

Produktene ifølge den foreliggende oppfinnelse kan ha forskjellige former, innbefattende enkle rørformede ekstrudater så vel som flerkammer-cellekapselsnorer. Formen av flerkammer-snorene kan være rørformet, lik pølser, eller nesten sfæriske, lik snorer av perler. Den maksimale ytre diameter av kjeden vil typisk være i området fra ca. 0,1 til ca. 1,0 millimeter. Membranveggtykkelsen vil typisk være i området fra ca. 10 til ca. 100 mikrometer. Kjedelengden av kjedene vil variere avhengig av den spesielle anvendelse.

Produktene kan også ha form av "bånd"-cellekapsler, d.v.s.

ett eller flere individuelle cellekamre innrettet til et langt polymert rør eller snor. På fig. 5 er det vist en slik bånd-cellekapsel 51 med en polymer-membran 52 som kan omgi en innkapslet celleløsning 54 hvor det er anbrakt individuelle celler 56. Cellekapselen 51 innbefatter videre et langt polymerfilament 59 som kan dannes ved det samme apparat som beskrevet ovenfor i forbindelse med fig. 4 ved avbrytelse av strømmen av celleløsningen og innstramming av polymerløsningen under dannelse av et fast bånd ("tether"). Båndet kan også være etterbelagt med et materiale (f.eks. et polyuretan eller liknende) som gir filamentet ytterligere styrke. Slike bånd-cellekapsler kan finne forskjellige anvendelser, spesielt ved implantering i et individ for en fundamental avgivelse av aktive faktorer. Ved anvendelse kan cellekapselen være anbrakt så nær målområdet (f.eks. i hjernen, bukhulen eller annet sted) som ønskelig, mens den andre ende av båndet kan være festet til et hensiktsmessig forankringspunkt eller anordning med lett tilgjengelig beliggenhet for uttaking.

Oppfinnelsen vil nedenfor bli beskrevet i forbindelse med visse illustrerende, ikke-begrensende eksempler:

EKSEMPLER

Et ekstrusjonssystem likt det som er illustrert på fig. 1, ble anvendt, bestående av tre elektronisk regulerte programmerbare infusjonspumper, en dyse-spinnevorte, to motor-regulerte koaksiale hjulsystemer på hvis omkrets det var montert tilstoppende polytetrafluoretylenrør var montert, og et opptakssystem.

Makrokapslene ble dannet ved injeksjon av en polymerløsning i spinnevortens ytre rør. Et koagulasjonsmiddel, typisk de innkapslede celler i sitt dyrkningsmedium, ble samtidig injisert i spinnevortens indre rør. Den innkapslende membran ble dannet ved en tørrstråle-, våtspinningsprosess, d.v.s. hurtig stabilisering av polymerløsningen som kommer ut fra spinnevorte-munnstykket ved det indre bråavslutningsmedium koplet med ytterligere stabilisering i et bråavslutningsbad. Lukkingen av fiberen ble utført ved mekanisk pressing av den hule fiber under

dannelse, med det koaksiale hjulsystem før nedsenking i bråavslutningsbadet. Nær spinnevortehodet var løsningsmiddelkonsentrasjonen tilstrekkelig høy til at rett sammensmelting av fiberveggen var mulig. Etter hver innkapslingsrunde ble rent løsningsmiddel automatisk spylt gjennom hulrommet i spinnevorten for unngåelse av tilstopping av munnstykket.

PC12-celler, en udødeliggjort cellelinje som stammer fra et rotte-feokromocytom som utsondrer store mengder dopamin, ble dyrket på kollagenbelagte vevskulturskåler i RPMI 1640-medium supplert med 10% varme-inaktivert hesteserum og 5% føtalt kalveserum. Dissosierte bovine binyremargceller, en ikke-delende celletype som utsondrer dopamin, ble holdt i DMEM-medium supplert med 5% føtalt kalveserum. Før innkapsling ble cellene høstet og innført i en 3 ml sprøyte ved en konsentrasjon på 1×10^5 celler pr. ml. En 15% vinylklorid-akrylnitril-kopolymerløsning i enten dimetylsulfoksyd (DMSO), dimetylformimid (DMF) eller dimetylacetamid (DMAC) ble innført i en 5 ml glassprøyte. Begge løsningene ble så ko-ekstrudert gjennom spinnevorten, og kapslene ble oppsamlet i en fysiologisk saltløsning. Kapslene ble skyllet og anbrakt i individuelle brønner som inneholdt de hensiktsmessige dyrkningsmedier.

Basal og kaliumfremkalt frigjøring av katekolaminer ble kvantifisert under statiske inkuberingsbetingelser ved ionepar-reversert-fase-høytrykks-væskekromatografi (HPLC) utstyrt med elektrokjemisk påvisning etter 2 og 4 uker. Morfologisk analyse, innbefattende lys-, scanning- og transmisjonselektron-mikroskopering, ble utført på representative prøver for hvert tidsrom.

Alle celle-ifylte kapsler frigjorde dopamin i mediet under basalbetingelser ved alle tidsrom. Høykalium-behandling økte dopaminfrigjøring både fra PC12- og binyremargceller. Dopamin-utbytte med PC12-celler, men ikke binyremargceller, øket med tiden. Økningen i dopaminfrigjøring ved de PC12-celle-ifylte kapsler over tid antas å ha forbindelse med celleformeringen inne i polymerkapselen. Ingen betydelig forskjell i dopaminfrigjøring kunne observeres fra PC12-ifylte kapsler ekstrudert med de tre forskjellige løsningsmiddelsystemer (DMSO, DMF, DMAC), hvilket

tyder på at innkapslingsteknikken ifølge den foreliggende oppfinnelse kan forhindre celleødeleggelse voldt av løsningsmidler (fig. 6). På grunn av det høyere trykk i det indre hullsystem, ble løsningsmidlet hurtig drevet mot utsiden av polymerkapselen, hvilket forhindret utvidet celle-løsnings-middel-kontakt.

Morfologisk analyse åpenbarte tilstedeværelse av små klaser av PC12-celler tilfeldig dispergert gjennom hele kapselens hulrom. På elektronmikroskopnivået kunne godt bevarte PC12-celler, med sine typiske elektrontette sekresjonsgranuler, observeres. Tilstedeværelse av tallrike mitoseformer tydet på celledeling inne i kapselrommet. Skjønt binyre-kromaffinceller i begynnelsen ble ko-ekstrudert som en cellesuspensjon, dannet de pakkede aggregater én uke etter innkapsling.

Fig. 7 viser resultatene av en in vitro-analyse hvor PC12-celler ble innkapslet ved fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelse og overvåket med hensyn til frigjøring av dopamin to og fire uker etter innkapsling. Dopamin-nivåene ble målt under både normale (regulerte) betingelser og under høy kaliumstimulering, hvilket er kjent for å bevirke depolarisering av cellene og følgelig å øke utsondringen av dopamin i levedyktige celler. Som det vil kunne sees av diagrammet, var det liten aktivitet etter to uker; etter fire uker oppviste imidlertid de innkapslede celler dopaminutsondringer ikke bare under normale betingelser, men de oppviste også en sterk respons overfor kaliumstimuleringen, hvilket viste at cellene faktisk var levedyktige i sin innkapslede tilstand.

Fig. 8A og 8B viser resultatene av ytterligere in vitro-forsøk hvor utsondringene hos henholdsvis PC12-celler og kromaffinceller ble overvåket fire uker etter innkapsling ved fremgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelse. Igjen ble cellene stimulert ved høye kaliumkonsentrasjoner i mediet. Mens PC12-cellene bare frigjorde dopamin, frigjorde kromaffincellene forskjellige katekolaminer. Diagrammet viser nivåene av noradrenalin (NE), epinefrin (EPI) og dopamin (DA).

På grunn av sin fluid-dynamikk vil makrokapslene ekstrudert ifølge den foreliggende oppfinnelse gi mulighet for anvendelse

av et videre område av polymer/løsningsmiddel-systemer og kan utgjøre en mer effektiv innkapslingsteknikk. Resultatene viser at udødeliggjorte og differensierte dopamin-utsondrende celler vil overleve i makroinnkapsling. Evnen hos disse kapsler til spontan frigjøring av dopamin over tid tyder på at polymer-innkapsling kan tilveiebringe et alternativ til transplantering av ikke-innkapslede eller mikroinnkapslede dopamin-utsondrende celler ved behandling av Parkinsons sykdom.

Patentkrav

1. Fremgangsmåte ved innkapsling av levedyktige celler, karakterisert ved at fremgangsmåten omfatter å koekstrudere en vandig cellesuspensjon og en polymer oppløsning gjennom en felles ekstrusjonsåpning med en indre og en ytre boring hvorfra henholdsvis suspensjonen og den polymere løsning kommer ut, idet nevnte polymeroppløsning ved koekstrudering gjennom åpningen drives utover og bort fra cellesuspensjonen under koagulering for å danne et tubulært ekstrudat som har et semipermeabelt ytre belegg som innkapsler nevnte cellesuspensjon.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, karakterisert ved at den ytterligere omfatter å forsegle det tubulære ekstrudat ved intervaller for å danne separate cellerom bundet sammen med polymere kjeder.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 2, karakterisert ved at forseglingstrinnet for ekstrudatet omfatter å presse sammen ekstrudatet ved intervaller for å danne adskilte cellerom.

4. Fremgangsmåte ifølge krav 2, karakterisert ved at forseglingstrinnet av ekstrudatet omfatter å modifisere trykket hvorunder cellesuspensjonen eller den polymere oppløsning ekstruderes, for derved å bringe sammen det tubulære ekstrudat ved intervaller for å danne separate cellerom.

5. Fremgangsmåte ifølge krav 2, karakterisert ved at forseglingstrinnet for ekstrudatet omfatter å bremse strømmen av cellesuspensjon ved intervaller for å bringe sammen det tubulære ekstrudat og derved danne separate cellerom.

6. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det polymere belegg koaguleres i luft.

7. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det polymere belegg koaguleres i et kammer under redusert trykk.

8. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at det polymere belegg koaguleres i et stansebad.

9. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter å ekstrudere en vandig cellesuspensjon inneholdende celler som skiller ut en biologisk aktiv faktor såsom en neurotransmitter.

10. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ekstruderte vandige cellesuspensjon inneholder et næringsmedium.

11. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ekstruderte cellesuspensjon inneholder et forankringssubstrat.

12. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den polymere oppløsning omfatter en oppløsningsmiddel-komponent som er blandbar med vann.

13. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den polymere oppløsning ytterligere omfatter et overflateaktivt middel og/eller et anti-inflammatorisk middel og/eller et anti-oksydasjonsmiddel.

14. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter å kontrollere viskositeten av nevnte polymere oppløsning.

15. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter å opprettholde en trykkforskjell mellom den vandige cellesuspensjon og den polymere oppløsning under koekstrudering for å hemme diffusjon av oppløsningsmiddel fra nevnte polymere oppløsning inn i nevnte cellesuspensjon.

16. Fremgangsmåte ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter å tilføre et beskyttende barrierematerialе til det utvendige av det polymere belegg.

17. Celledyrknings-bærer (50,51), k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en tubulær, semipermeabel, polymer membran (52) som inneslutter en cellekultur (54), hvor nevnte bærer har blitt dannet ved å koekstrudere cellekulturen med en polymer oppløsning gjenomm en felles ko-ekstruderingsåpning med en indre og en ytre boring hvortil cellekulturen og den polymere oppløsning henholdsvis blir tilført idet nevnte kultur og polymere oppløsning har blitt valgt, slik at oppløsningen koagulerer og danner nevnte membran ved koekstrudering med kulturen gjennom den felles åpning.

18. Bærer ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at membranen (52) er permeabel for molekyler med en molekylvekt på omkring 150.000 eller mindre.

19. Bærer ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at den maksimale ytterdiameter av cellekulturbæreren ligger i området fra 0,1 til

1,0 mm.

20. Bærer ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at membranen (52) har en veggtykkelse i området fra 10 til 100 μm.

21. Bærer ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at den polymere membran (52) omfatter et polyakrylat-materiale.

22. Bærer ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at den polymere membran (52) omfatter et overflateaktivt materiale og/eller et anti-inflammatorisk materiale og/eller et anti-oksydasjons-middel.

23. Bærer ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ekstruderte tubulære membran (52) er forseglet ved intervaller (ved 58) for å danne separate cellerom (56) eventuelt forbundet med polymere forbindelser (58).

24. Bærer ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at den tubulære membran er forseglet for å utgjøre minst ett cellerom (56) forbundet til et forankringsfilament (59).

25. Bærer ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at cellekulturen ytterligere omfatter en vandig cellesuspensjon inneholdende celler som skiller ut en biologisk aktiv faktor såsom en terapeutisk faktor.

26. Bærer ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d at den vandige cellesuspensjon ytterligere omfatter et næringsmedium.

27. Bærer ifølge krav 17, karakterisert ved at cellekulturen ytterligere omfatter et forankrings-substrat-materiale.

28. Bærer ifølge krav 27, karakterisert ved at substratmaterialet er valgt fra et kollagen-materiale, et laminin-materiale og en polyaminosyre.

29. Bærer ifølge krav 17, karakterisert ved at den ytterligere omfatter et beskyttende barriere-materiale som dekker minst en del av den ytre overflate av den polymere membran (52).

30. Bærer ifølge krav 29, karakterisert ved at det beskyttende barriere-materiale er en inhibitor for protein-interaksjoner.

31. Bærer ifølge krav 29, karakterisert ved at det beskyttende barriere-materiale er valgt fra polyetylenoksyder, polypropylenoksyder, derivater samt blandinger derav.

32. Anordning for innkapsling av levedyktige celler, karakterisert ved at den omfatter:

en ekstrusjonshode-sammensetning (14) med en første indre boring (16) og en andre, konsentrisk, ytre boring (18);

anordninger (22) for tilførsel av en cellesuspensjon for å tilføre en vandig cellesuspensjon til den indre boring (16) av ekstrusjonshode-sammensetningen (14);

anordninger (26) for tilførsel av en polymer oppløsning til den ytre boring (18) av ekstrusjonshode-sammensetningen samt anordninger for trykk-differensiering for å danne en

positiv trykkforskjell mellom cellesuspensjonen og den polymere oppløsning under ekstrusjonsforløpet slik at nevnte cellesuspensjon og nevnte polymere oppløsning ved koekstrudering fra nevnte hodesammensetning (14) danner et tubulært ekstrudat med et koagulert polymert ytterbelegg som innkapsler nevnte cellesuspensjon, hvor nevnte positive trykkforskjell ved bruk driver polymer-oppløsningsmiddel utad og bort fra cellesuspensjonen under koagulering.

33. Anordning ifølge krav 32, k a r a k t e r i s e r t v e d at trykkforskjellsanordningen omfatter strømningskontrollinnretninger for å opprettholde trykkforskjellen mellom den vandige cellesuspensjon og den polymere oppløsning under koekstrudering.

34. Anordning ifølge krav 33, k a r a k t e r i s e r t v e d at strømningskontrollinnretningene omfatter en computer (38) tilpasset til å kontrollere en første infusjonspumpe (24) i nevnte tilføringsinnretninger (22) for cellesuspensjon samt en andre infusjonspumpe (28) i nevnte anordninger (26) for tilførsel av polymer oppløsning.

35. Anordning ifølge krav 32, k a r a k t e r i s e r t v e d at den ytterligere omfatter et stansebad (40) for å koagulere nevnte polymere oppløsning etter ekstrudering.

36. Anordning ifølge krav 32, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter innretninger til forsegling av det tubulære ekstrudat ved intervaller for å danne adskilte cellerom (54) forbundet med polymere forbindelser (58).

37. Anordning ifølge krav 36, k a r a k t e r i s e r t v e d at forseglingsinnretningene (42) omfatter innretninger (44a,44b,46) for å

presse sammen ekstrudatet ved intervaller under ekstrudering for å danne de separate cellerom.

38. Anordning ifølge krav 36,
k a r a k t e r i s e r t v e d at forseglingsinnretningene kan betjenes for å regulere trykket under hvilket cellesuspensjonen eller den polymere oppløsning ekstruderes for derved å presse sammen det tubulære ekstrudat ved intervaller for å danne separate cellerom.

39. Anordning ifølge krav 36,
k a r a k t e r i s e r t v e d at forseglingsinnretningene omfatter anordninger (48) for å hindre strømmen av cellesuspensjon ved intervaller for å presse sammen det tubulære ekstrudat og danne adskilte cellerom.

40. Anording ifølge krav 36,
k a r a k t e r i s e r t v e d at forseglingsinnretningene omfatter en retraksjonsinnretning (48) for å bevege den indre boring (16) av nevnte ekstrusjonshode-sammensetning (14) i forhold til den ytre boring (18) for å avbryte strømmen av tubulært ekstrudat ved intervaller for å danne separate cellerom.

41. Anordning ifølge krav 32,
k a r a k t e r i s e r t v e d at ekstrusjonshode-sammensetningen (14) innbefatter en tredje, konsentrisk, ytre boring (20) for tilførsel av avslutningsvæske for å koagulere nevnte polymere oppløsning.

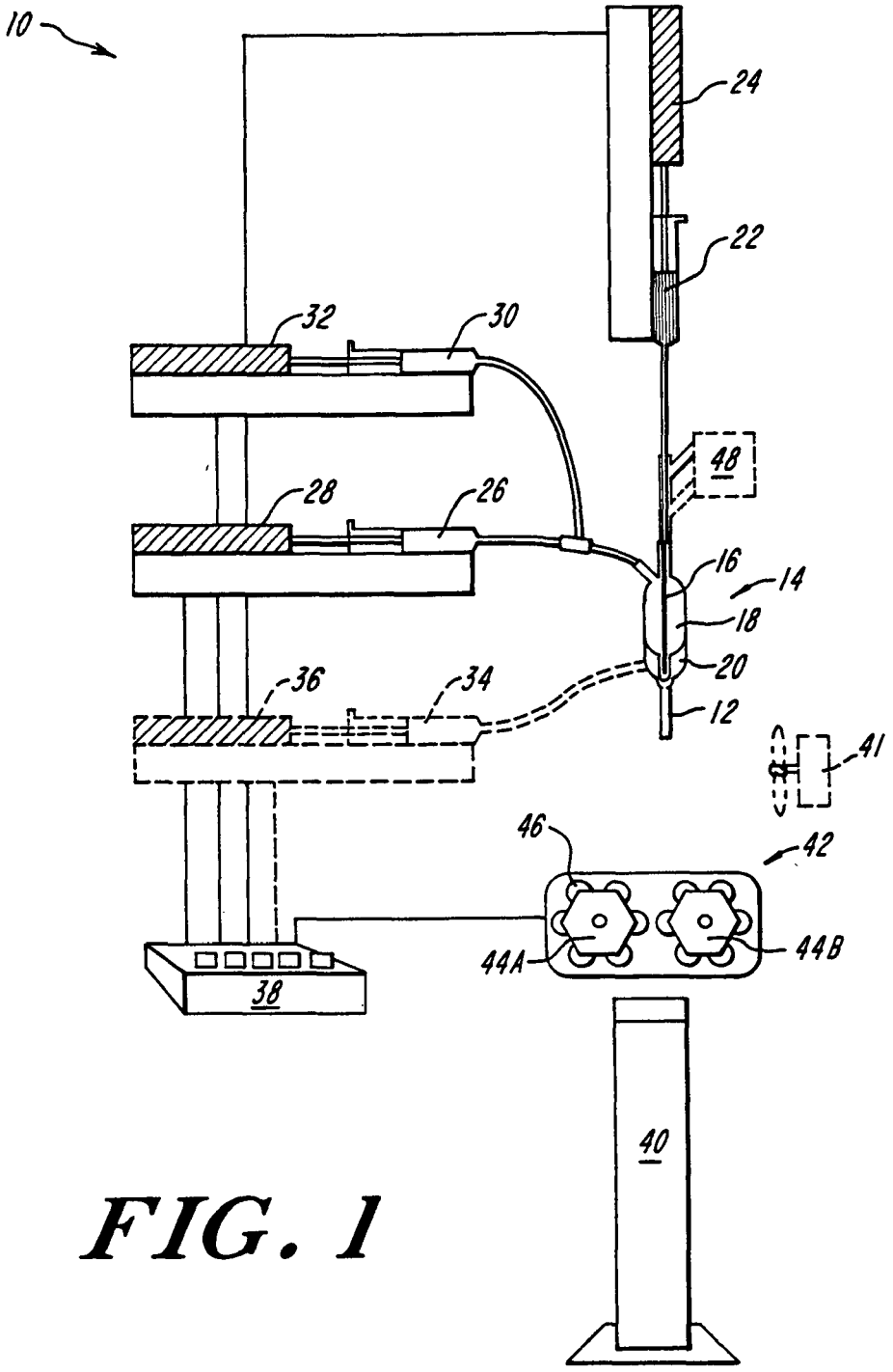


FIG. 1

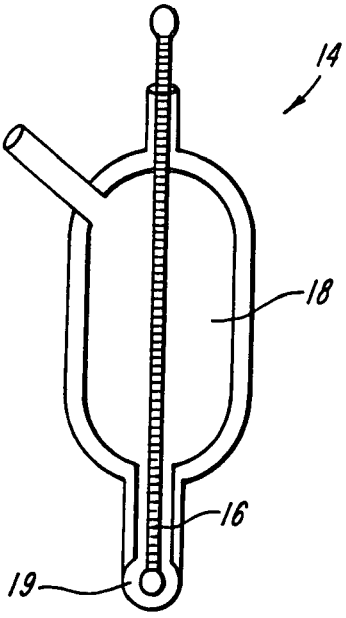


FIG. 2

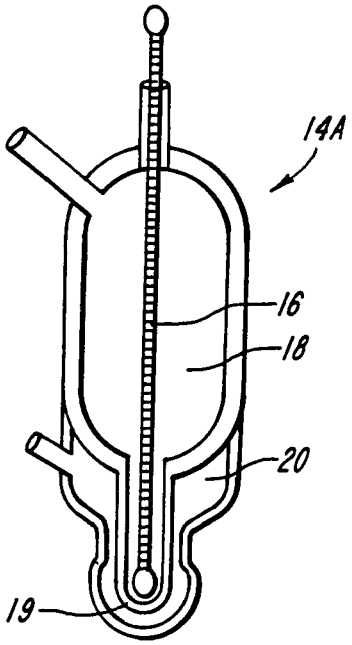


FIG. 3

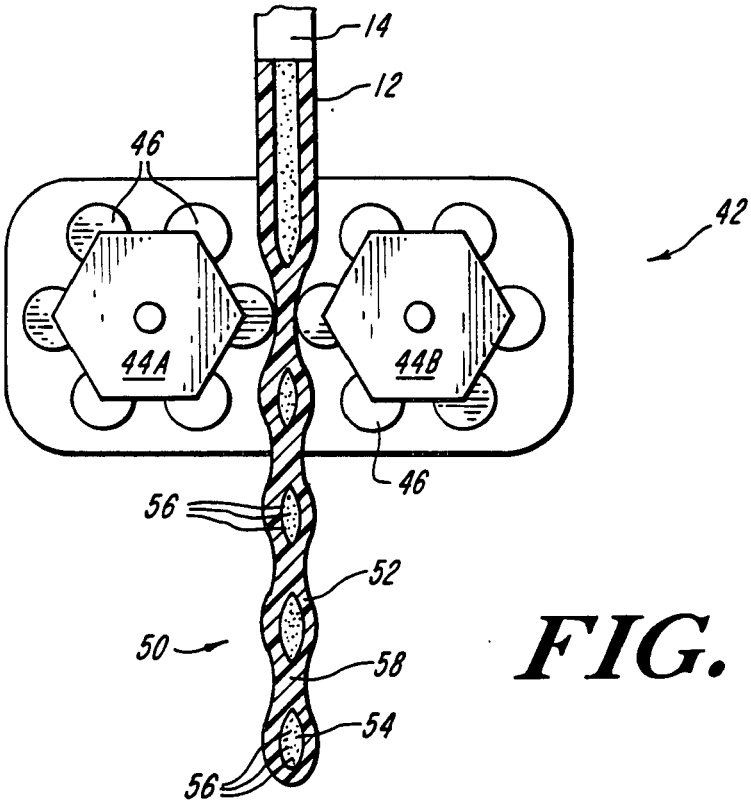


FIG. 4

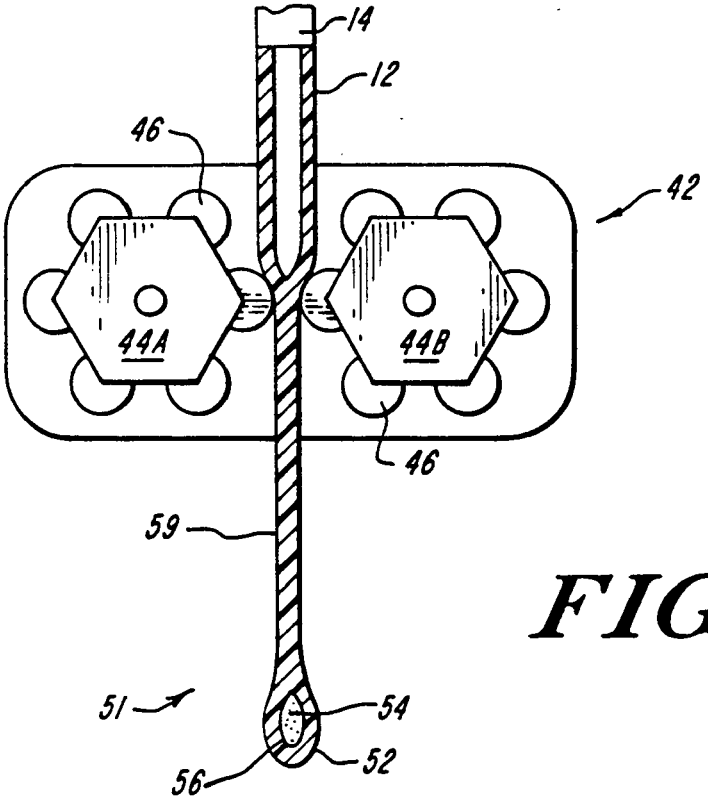

14
12
46
42
44A
44B
46
59
51
54
52
56

FIG. 5

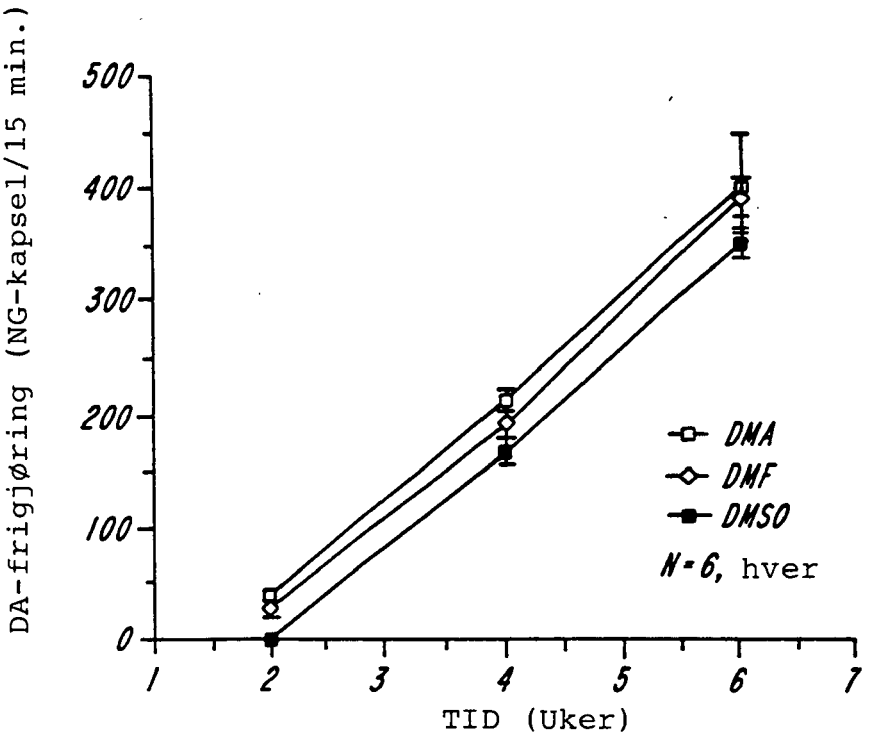

DA-frigjøring (NG-kapsel/15 min.)
500
400
300
200
100
0
1
2
3
4
5
6
7
TID (Uker)
DMA
DMF
DMSO
N=6, hver

FIG. 6

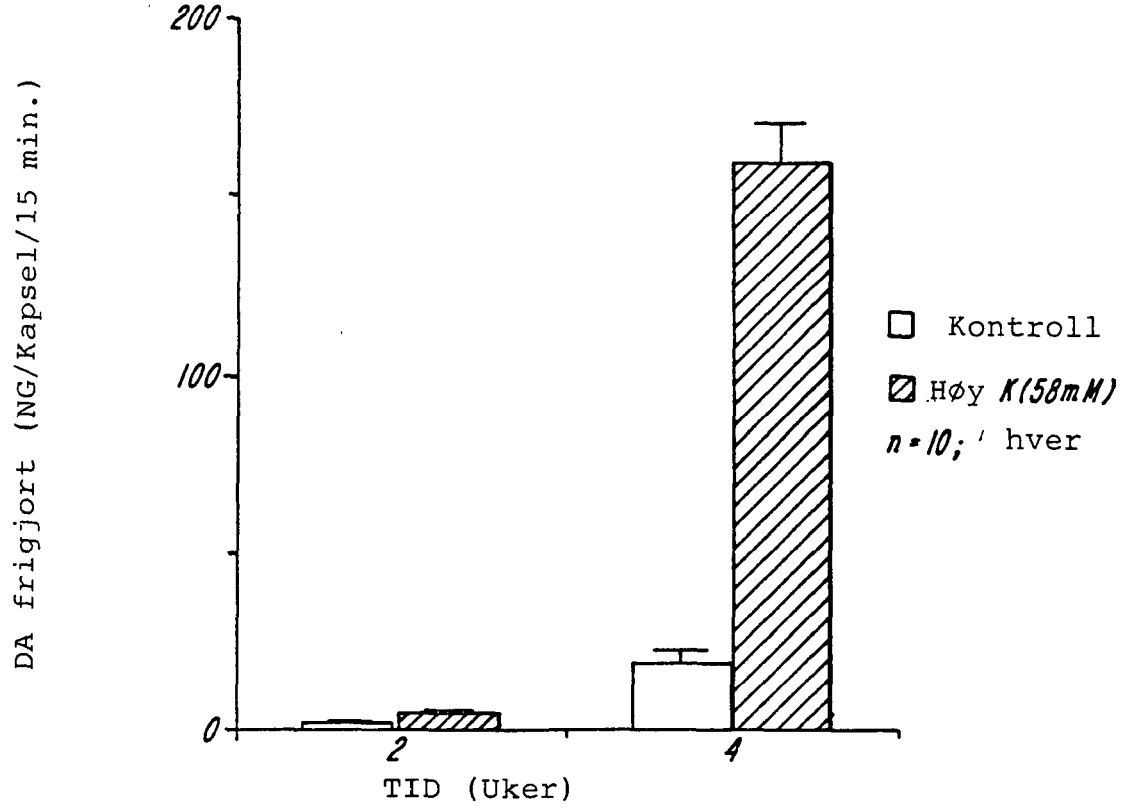


FIG. 7

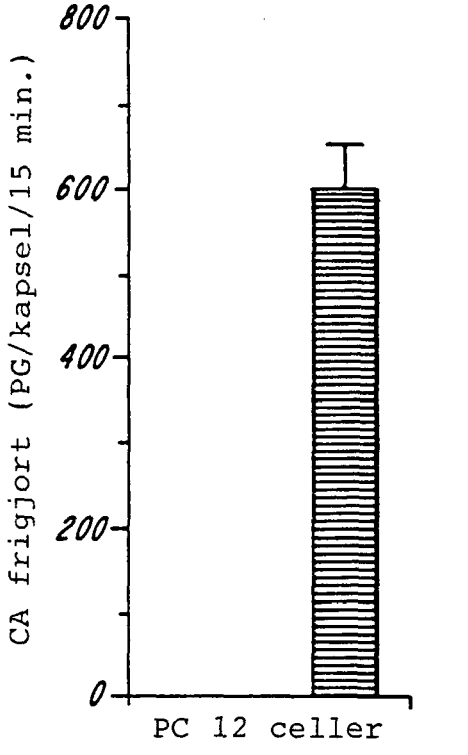


FIG. 8A

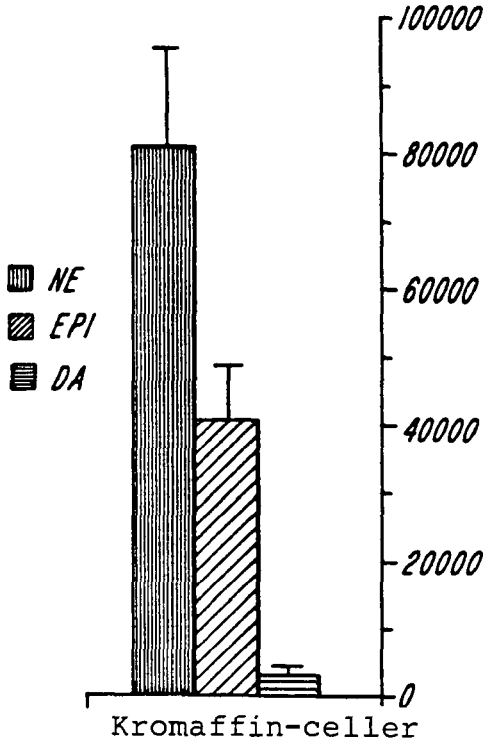


FIG. 8B