



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2215472 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
G01N 33/50 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.10.27
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.06.18
(86)	Europeisk søknadsnr	08847813.6
(86)	Europeisk innleveringsdag	2008.11.06
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.08.11
(30)	Prioritet	2007.11.09, US, 986751 P
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Genzyme Corporation, 500 Kendall Street, Cambridge, MA 02142, US-USA
(72)	Oppfinner	WANG, Yongzhong, 175 West Wyoming AvenueApt. 39, Melrose, MA 02176, US-USA
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	FREMGANGSMÅTER FOR Å MÅLE CELLELEVEDYKTIGHET UTEN Å ANVENDE KONTROLLCELLER
(56)	Anførte publikasjoner	PROMEGA CORPORATION: "Technical Bulletin TB350: "CytoTox-Fluor? Cytotoxicity Assay" PROMEGA TECHNICAL BULLETINS, no. TB350, June 2006 (2006-06), pages 1-12, XP002511207 Madison WI USA

Beskrivelse

[0001] Denne oppfinnelsen vedrører feltet med cellebiologi samt cellekultur og vevsrekonstruksjon. Mer spesifikt vedrører oppfinnelsen til fremgangsmåter for å måle andelen levedyktige celler i en cellepopulasjon vedlikeholdt i et cellekulturmedium.

5 **[0002]** Feltet med vevsrekonstruksjon (gjennomgått i Langer og Vacanti, Science, 260:920-926 (1993)) sentrerer rundt anvendelsen av matrikser eller stillaser for å støtte veksten og vedlikeholdet av celler. F.eks. er matriksindusert autolog chondrocytt-implantasjon (MACI[®] implantater) en andregenerasjon autolog chondrocytt-implantasjon (ACI)-prosedyre anvendt for å reparere brusk. I et MACI[®] implantat blir 10 kulturekspanderte chondrocytter sådd på en kollagenbasert membranmatriks, som senere forenkler kirurgisk implantasjon. MACI[®] implantater kan bli anvendt for å behandle bruskdefekter artroskopisk eller gjennom minimalt kirurgisk inngrep.

[0003] Anvendelsen av matrikser i vevsrekonstruerte produkter gir signifikante utfordringer til forskere som forsøker å måle levedyktigheten for de rekonstruerte 15 produktenes bestandsceller. Eksisterende fremgangsmåter for å måle cellelevedyktighet avhenger av minst en av to egenskaper for levedyktige celler: nærværet av en intakt plasmamembran og/eller deres metabolske aktivitet. In vitro blir celledød fulgt av tap av plasmamembranintegritet. Dette fenomenet kan enkelt bli observert under et mikroskop ved å anvende vitale fargestoffer. I de vanligste vitale fargestoffanalysene 20 blir fargestoffet trypanblå tilsatt en cellesuspensjon. Fargestoffet blir utelukket fra levedyktige celler med en intakt membran men farger døde eller døende celler med en splittet membran. Alternativt kan cellelevedyktighet bli vurdert ved å måle en eller flere markører for cellens metabolske aktivitet. En slik tilnærming er å kvantifisere nøkkelmetabolitter (f.eks. ATP, NADH), som er nærværende i levedyktige celler men 25 forbrukt eller fraværende fra døde celler. En komplementær tilnærming er å analysere for spesifikke enzymaktiviteter frisatt fra membrankompromitterte celler. F.eks. påviser Cytox-Fluor cytotoksieitetsanalysen (Promega, Madison, WI, kat. nr. G9260) proteaser slik som tripeptidylpeptidase frisatt fra døde celler ved å anvende internt dempet fluorogent peptidsubstrat bis-(Ala-Ala-Phe)-Rhodamine-110.

30 **[0004]** Når anvendt til vevsrekonstruerte produkter, krever de fleste eksisterende cellelevedyktighetsanalyser at cellene skal bli isolert (gjenvunnet) før analyse. Isolasjonsprosessen er imidlertid ofte komplisert, noen ganger krevende og aldri 100 % effektiv. Måling av artifakter kan oppstå som om levedyktige celler blir tapt eller drept, eller siden døde celler blir tapt, under prosedyren. F.eks. når evaluert med trypanblå 35 utelukkelse har alltid gjenvunnede celler en nær 100 % levedyktighet, som mislykkes i å gjenspeile sann levedyktighet for den originale prøven fra hvilken de ble oppnådd. Forsøk på å anvende metabolsk aktivitetsbaserte levedyktighetsanalyser uten først å gjenvinning av cellene er likeledes mislykket på grunn av matriksinterferens, ikke-

spesifikk binding, lav øvre grense for påvisning, utilstrekkelig område eller dårlig presisjon i forskjellige medietyper. Videre deler alle eksisterende metabolsk aktivitetsbaserte cellelevedyktighetsanalyser en fundamental ulempe, dvs. kravet om en positive og/eller negativ kontroll med kjent celleantall og levedyktighet, for å måle levedyktigheten for disse prøvene. For å gjøre en gyldig sammenligning, må cellene anvendt i kontrollen og testprøvene være samme type celler fra den samme donoren eller stammen, og må også ha den samme metabolske profilen. Denne tilnærmingen er ikke anvendelig på vevsrekonstruksjonsprodukter der celler, sådd i 3-dimensjonale matrikser, ofte erverver en svært forskjellig metabolsk profil enn de samme cellene dyrket i suspensjon eller på en 2-dimensjonal overflate. I tillegg er det ofte ugjennomførbart å oppnå ekstra celler og fremstille egnede kontroller innen industriell produksjonsanvendelse der et stort antall lotter blir analysert daglig for levedyktighet og kvalitetskontroll.

[0005] Levedyktigheten for disse cellene som skal transplanteres forblir en hoved determinant i vellykket behandling med vevsrekonstruerte produkter. Promega Corporation: "Technical Bulletin TB350: "CytoTox-Fluoro™ Cytotoxicity Assay" Promega Technical Bulletins, nr. TB350, juni 2006, side 1-12, Madison WI, USA beskriver en analyse som måler det relative antallet av døde celler i cellepopulasjoner. I lys av manglene av eksisterende levedyktighetsanalyser er det behov for enkle, raske og nøyaktige fremgangsmåter for å måle levedyktigheten for celler i vevsrekonstruerte produkter. Slike fremgangsmåter må operere over en rekke celletettheter, og med mange forskjellige celletyper, medier og matrikser. Slike cellelevedyktighetsfremgangsmåter opererer videre fordelaktig uten behovet for en kontrollcellepopulasjon.

[0006] Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter for enkelt, raskt og nøyaktig å måle levedyktigheten for celler under flere tilstander og uten behovet for kontrollceller. Fremgangsmåtene er basert, delvis, på oppdagelsen at levedyktigheten for celler i et dyrket vevsrekonstruert produkt kan bli bestemt ved å påvise andelen av en eller flere enzymaktiviteter for de dyrkede cellene som er nærværende i kulturens supernatant.

[0007] Det er teorisert, men ikke avhengig av formålene med denne oppfinnelsen, at ved tapet av membranintegriteten som følger celledød, blir innholdene av cellen som normalt bindes av plasmamembranen påvisbar i cellekultursupernatanten. Fremgangsmåtene med oppfinnelsen avhenger av påvisningen av et celledødstabilt protein eller enzym, dvs. et protein eller enzym som kan bli påvist om det er nærværende i levende eller døde celler. Cellelevedyktigheten for kulturen kan så bli bestemt ved å påvise den relative mengden av det celledødstabile proteinet eller enzymet i det ikke-celle-inneholdende kondisjonerte mediet (f.eks. supernatant eller støttematriks eller stillas) og det celleinneholdende kondisjonerte mediet (f.eks. de membranintakte cellene og

forbundet kondisjonert medium). Mengden av celledødstabilt protein eller enzym i kun de cellene for det celleinneholdende kondisjonerte mediet kan bli bestemt ved å splitte membranintegriteten for membranintakte celler, f.eks. ved delvis eller fullstendig lysering, å måle den totale enzymaktiviteten i den celleinneholdende delen (dvs. splittede celler og forbundet kondisjonert medium) og så trekke ut enhver enzymaktivitet bidratt av det forbundene kondisjonerte mediet. Verdien som blir trukket ut blir målt ved å analysere cellefritt kondisjonert medium.

[0008] Et aspekt ved oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter for måling av andelen av levedyktige celler i en cellepopulasjon vedlikeholdt i et kulturmedium ved å påvise et celledødstabilt protein eller enzymaktivitet i en del av det kondisjonerte mediet som ikke inneholder celler (f.eks. kondisjonert medium), å påvise et celledødstabilt protein eller enzymaktivitet i en del av mediet som inneholder celler (f.eks. celler og kondisjonert medium), og å sammenligne nivået av celledødstabilt protein eller enzymaktivitet i de to delene. Ved denne fremgangsmåten blir andelen av levedyktige celler i populasjonen proporsjonal med forskjellen mellom nivået av celledødstabilt protein eller enzymaktivitet i delen som inneholder celler og det av delen som ikke inneholder celler.

[0009] I noen utførelsesformer kan de målte cellene bli dyrket på et tradisjonelt todimensjonalt cellekultursubstrat, f.eks. glass eller vevskulturplast. I andre utførelsesformer blir cellene støttet på eller i et tredimensjonalt stillas eller matriks, dvs. cellene er en del av et vevsrekonstruert produkt. I visse utførelsesformer blir cellene dyrket på en svinekollagenutledet matriks.

[0010] I visse utførelsesformer inkluderer fremgangsmåtene med oppfinnelsen videre et steg av å tilveieprøve en prøvedel av cellepopulasjonen og en proporsjonal mengde av det ikke-celleinneholdende kulturkondisjonerte mediet. Prøvedelen blir så delt i en celleinneholdende (dvs. celler pluss kondisjonert medium) og ikke-celleinneholdende (kun kondisjonert medium) andel og behandlet ifølge fremgangsmåten for oppfinnelsen.

[0011] I visse utførelsesformer blir membranintegriteten av cellene av prøvedelen splittet av f.eks. klipping, sonikering, lavt barometertrykk, høy temperatur, lav temperatur, kjemisk eller enzymatisk lysering eller membranutkoblingsmidler. I noen utførelsesformer kan membranintegriteten bli splittet ved å tilsette et amfifilisk molekyl. I visse utførelsesformer er amfifilet saponin.

[0012] Ytterlige aspekter ved oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter for å måle andelen av levedyktige humane chondrocytter tilstede i matrisen av et vevsrekonstruert produkt som har en celletetthet på mellom $1,5 \times 10^4$ og 6×10^6 celler/cm² vedlikeholdt i et kulturmedium. Stegene inkluderer å tilveiebringe en del av det vevsrekonstruerte produktet som inneholder celler og en proporsjonal mengde av det kulturkondisjonerte mediet, å tilveiebringe en del av det kulturkondisjonerte mediet som ikke inneholder

celler fra det vevsrekonstruerte produktet, å tilsette saponin og bis-(Ala-Ala-Phe)-Rhodamine-110 til delene og påvise fluorescerende signaler fra spaltet bis-(Ala-Ala-Phe)-Rhodamine-110 i de to delene. I noen utførelsesformer kan Ala-Ala-Phe-AMC eller et annet substrat med en konjugert avspaltende gruppe erstatte bis-(Ala-Ala-Phe)-Rhodamine-110 i disse fremgangsmåtene. Andelen av levedyktige celler i det vevsrekonstruerte produktet er proporsjonal med forskjellen i fluorescerende signalstyrke mellom de celleinneholdende og ikke-celleinneholdende delene delt på den totale mengden av det fluorescerende signalet i begge deler.

[0013] I et annet aspekt tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for å bestemme cytotoxisitet av en testbehandling (f.eks. behandling med farmakologiske eller biologiske forbindelser; eller eksponering mot forskjellige tilstander, f.eks. ved osmolaritet, pH, temperatur eller barometertrykk; eller foto, elektriske eller mekaniske behandlinger; eller kombinasjoner av disse) til en testpopulasjon av dyrkede celler. Fremgangsmåten medfører å anvende testbehandlingen på testpopulasjonen, å måle andelen av levedyktige celler i testpopulasjonen med fremgangsmåtene med oppfinnelsen og sammenligne den målte levedyktigheten for testpopulasjonen mot levedyktigheten for en ubehandlet populasjon ("kontrollpopulasjon") av de dyrkede cellene.

[0014] Fremgangsmåtene med oppfinnelsen kan bli anvendt med en rekke celler under mange tilstander. I noen utførelsesformer kan cellene være fra pattedyr (f.eks. menneske, primat, sau, kveg, gris, hest, katt, hund eller gnager). I visse utførelsesformer er cellene humane. Celler avledet fra ethvert kildevev kan bli anvendt i fremgangsmåtene med oppfinnelsen. I spesielle utførelsesformer er cellene chondrocytter.

[0015] Fremgangsmåtene med oppfinnelsen kan bli anvendt med celler med et bredt område av tettheter. I noen utførelsesformer er cellene til stede i en tetthet på mellom $1,5 \times 10^4$ og 6×10^6 celler/cm². I andre utførelsesformer kan cellene være tilstede i en tetthet på mellom $2,2 \times 10^4$ og $2,8 \times 10^6$ celler/cm², mellom $3,5 \times 10^4$ og $2,8 \times 10^6$ eller mellom 5×10^4 og 1×10^6 celler/cm². I visse utførelsesformer kan cellene være tilstede ved en høy tetthet på minst $2,0 \times 10^5$, $5,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^6$, $2,0 \times 10^6$, $2,8 \times 10^6$, 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 8×10^6 , 10×10^6 celler/cm² eller enda høyere tettheter.

[0016] I noen utførelsesformer med oppfinnelsen blir celledødstabil enzymaktivitet målt ved å berøre en prøvedel med et substrat av den celledødstabile enzymaktiviteten der substratet blir konjugert til en påvisbar avspaltende gruppe og så påvise den avspaltende gruppen. Med denne fremgangsmåten er mengden påvist avspaltende gruppe proporsjonal med nivået av celledødstabil enzymaktivitet til stede i prøvedelen. I forskjellige utførelsesformer kan avspaltende gruppe være kromogen, luminogen eller fluorogen. I spesielle utførelsesformer er avspaltende gruppe fluorescerende. I visse

utførelsesformer er avspaltende gruppe Rhodamine-110. I andre utførelsesformer er avspaltende gruppe kumarinderivat, f.eks. 7-amin-4-metylkumarin (AMC).

[0017] Et substrat for en enzymaktivitet kan være ethvert molekyl prosesserbart av enzymet. I visse utførelsesformer er substratet et tripeptid. I noen utførelsesformer er substratet bis-(Ala-Ala-Phe)-Rhodamine-110. I andre utførelsesformer er substratet Ala-Ala-Phe-AMC.

[0018] I noen utførelsesformer kan fremgangsmåtene med oppfinnelsen ytterligere inkludere steget med å tilsette et middel som modulerer (f.eks. forbedrer/øker eller reduserer/minsker) signalet for en avspaltende gruppe. I noen utførelsesformer kan midlet modulere signalet med minst 5, 10, 15, 20, 40, 60 eller 80 %; eller mer enn 1, 2, 3, 5, 10, 50 eller 100-ganger. I visse utførelsesformer handler midlet som modulerer signalet for den avspaltende gruppen ved å redusere signalet for den avspaltende gruppen. I spesielle utførelsesformer er midlet som reduserer signalet for den avspaltende gruppe fenolrød. I noen utførelsesformer kan fenolrød være tilstede i en konsentrasjon på opp til 10, 20, 40, 60, 70, 100, 150, 200 mg/L eller mer.

[0019] I forskjellige utførelsesformer med oppfinnelsen kan påvist celledødstabil enzymaktivitet være f.eks. anabolsk eller katabolsk, en oksidoreduktase, transferase, hydrolase, lyase, kinase, fosfatase, isomerase eller ligase. I noen utførelsesformer kan celledødstabil enzymaktivitet være proteolytisk, f.eks. en eller flere tripeptidylpeptidaser, chymotrypsin eller chymotrypsinlignende enzymer, slik som calpain.

[0020] I noen utførelsesformer er det celledødstabile proteinet eller enzymaktiviteten et protein eller en enzymaktivitet som er stabil etter enten nekrotisk eller programmert celledød eller begge (og spesielt stabilt etterfølgende hver form av celledød). I andre utførelsesformer er det celledødstabile proteinet eller enzymaktiviteten et nekrotisk stabilt protein eller enzymaktivitet. I enda andre utførelsesformer er det celledødstabile proteinet eller enzymaktiviteten et programmert celledødstabilt protein eller enzymaktivitet.

[0021] I noen utførelsesformer kan fremgangsmåtene med oppfinnelsen inkludere en kvalitetskontrollanalyse. I slike utførelsesformer kan fremgangsmåtene med oppfinnelsen ytterligere inkludere steget med å påvise en kontaminantspesifikk enzymaktivitet i enten den celleinnholdende eller ikke-celleinnholdende delen eller begge. Å påvise en kontaminantspesifikk enzymaktivitet er indikativ for kulturkontaminasjon.

[0022] De medfølgende tegningene, som er innlemmet i og utgjør en del av denne spesifikasjonen, illustrerer flere utførelsesformer med oppfinnelsen og, sammen med beskrivelsen, tjener til ytterligere å forklare prinsippene med oppfinnelsen.

Kort beskrivelse av tegningene

[0023]

Figur 1 er en skjematisk beskrivelse av en cellelevedyktighetsanalyse.

Figur 2A er en grafisk fremstilling av et eksperiment som viser at enzym-aktiviteten nærværende i cellene og supernatanten for en prøve er lineært forbundet med tettheten av cellepopulasjonen.

Figur 2B er en grafisk fremstilling av et eksperiment som viser at enzym-aktiviteten nærværende i supernatanten for en prøve er lineært forbundet med tettheten av cellepopulasjonen.

Figur 3 er en grafisk fremstilling av et eksperiment som viser at den beskrevne analysen nøyaktig forutsier levedyktigheten.

Figur 4 er en grafisk fremstilling av et eksperiment som viser at tilsetningen av fenolrød ikke påvirker nøyaktigheten av den beskrevne analysen.

Figur 5 er en grafisk fremstilling av et eksperiment som viser at nøyaktigheten av den beskrevne analysen er upåvirket av anvendelse av en alternativ matriks.

Figur 6 er en grafisk fremstilling av et eksperiment som viser at nøyaktigheten av den beskrevne analysen er upåvirket av fraværet av en matriks.

Figur 7 er en grafisk fremstilling av et eksperiment som viser at nøyaktigheten av den beskrevne analysen er upåvirket av anvendelsen av ikke-humane celler.

Figur 8 er en grafisk fremstilling av et eksperiment som viser at den beskrevne analysen kan anvende substrater med en avspaltende gruppe annen enn Rhodamine.

Definisjoner

[0024] Entallsformene "en", "ei", "et", "den" og "det" inkluderer flertallsreferanser med mindre konteksten klart dikterer noe annet.

[0025] Dersom ikke annet er indikert, betyr begrepet "ca." ± 10 %.

[0026] "Overflateområde" som anvendt heri, f.eks. kvadrat område, cm^2 , henviser til det makroskopiske overflateområdet til et substrat, dvs. Z-akseprojeksjonen av overflaten på det to-dimensjonale planet.

[0027] "Tetthet" som anvendt heri betyr et gjennomsnittsantall av en substans, f.eks. en celle eller annet objekt, per enhet område eller volum. Hyppigst i denne søknaden

vil tetthet være i konteksten av en celletetthet: Antall celler per enhet overflateområde. Denne gjennomsnittsmengden er anslått ved å dividere antallet celler sådd på det makroskopiske overflateområdet av overflaten på hvilken de blir dyrket. Denne definisjonen vurderer både todimensjonale overflater samt tredimensjonale strukturer eller gitre.

[0028] Begrepet "medium" som anvendt i denne søknaden viser til alle komponenter som støtter veksten eller vedlikeholdet av celler i kultur. Dette kan inkludere tradisjonelt flytende cellekulturmedium og alle ytterligere faktorer som mediet kan inneholde. Disse faktorene kan inkludere, f.eks. serum, antibiotika, vekstfaktorer, farmakologiske midler, buffere, pH-indikatorer og lignende. Mediet skal ikke generelt vise til noen matriks eller støtte ved eller innen hvilken cellene blir vedlikeholdt eller dyrket med mindre klart indikert på annen måte. I et vevsrekonstruert produkt blir følgelig normalt matriksen del av den celleinnholdende delen.

[0029] "En del av cellekulturmediet som ikke inneholder celler" inkluderer følgelig en flytende del av mediet og ikke noen celleinnholdende matriks. Likeledes inkluderer "en del av cellekulturmediet som inneholder celler" enten isolerte celler eller matriks-assosierte celler, i assosiasjon med medium.

[0030] Med "kondisjonert medium" er det ment medium som har blitt berørt med celler for å tillate sammensetningen av medium å bli modifisert, f.eks. ved opptaket eller frisettingen av en eller flere metabolitter, næringsmidler eller faktorer, f.eks. en eller flere celledødstabile proteiner eller enzymaktiviteter. Med mindre annet er indikert, betyr kondisjonert medium generelt medium som har vært i kontakt med en cellepopulasjon for å samle celledødstabile proteiner eller enzymaktivitet fra celler med kompromittert membranintegritet.

[0031] Som anvendt i denne søknaden viser "påvisbar avspaltende gruppe" til et produkt fra en enzymatisk reaksjon som kan bli anvendt for å overvåke progresjonen av en enzymatisk reaksjon.

[0032] Med "proteom" er det ment settet av alle proteinene uttrykt i en gruppe med celler.

[0033] "Rekombinant" heri viser til ikke-medfødte biologiske molekyler, f.eks. nukleinsyrer, deres transkripsjonelle eller translasjonale produkter eller celler som inneholder noe av ovenstående.

[0034] Med "intrinsisk aktivitet" av et enzym er det ment dets $V_{\max}$; dvs. raten av produktframstillingen når kun enzymets evne til å fremstille substrat er begrensende; reaksjonstilstander er ellers optimert for enzymaktiviteten.

[0035] "Membranintakt" som anvendt i denne søknaden betyr evnen til å ekskludere fargestoffet trypanblå under standard laboratoriebetingelser.

[0036] Med "skaleringsfaktor" er det ment en numerisk konstant bestemt for en spesiell analysetilstand.

[0037] "Relativt mål" i denne søknaden viser til å uttrykke en mengde som en funksjon av en referanseverdi; f.eks. å uttrykke en verdi som en andel av en annen.

[0038] "Absolutt mål" i denne søknaden betyr den aktuelle numeriske verdien av en mengde, dvs. ikke et relativt mål.

5 **Eksempler på utførelsesformer**

[0039] Oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter for å beregne levedyktighet basert på den relative måling av et celledødstabilt protein eller enzymaktivitet i to andeler av en prøve. Til forskjell fra vitale fargestoffanalyser er det ikke behov for å gjenvinne celler fra matriksen. Følgelig kan fremgangsmåtene med oppfinnelsen eliminere målingen av artifakter assosiert med tidligere fremgangsmåter, f.eks. tape celler under fremstillingen, underestimere eller overestimere levedyktighet.

Å bestemme cellelevedyktighet

[0040] Oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter for å måle andelen levedyktige celler i en populasjon vedlikeholdt i et kulturmedium. Dette blir gjort ved å sammenligne mengden av en celledødstabil enzymaktivitet i en del av det kondisjonerte mediet som ikke inneholder celler med mengden av det celledødstabile proteinet eller enzym i en del av det kondisjonerte mediet som inneholder celler. Generelt omfatter fremgangsmåtene med oppfinnelsen tre steg:

1. (1) en prøve blir delt i to deler, en celleinneholdende del ("X") og en ikke-celleinneholdende del ("Y");
2. (2) cellene fra den celleinneholdende delen (eller en prøve tatt fra den celleinneholdende delen) blir lysert; og
3. (3) mengden av det celledødstabile proteinet eller enzymet i hver del ("X" og "Y") blir påvist eller målt. Fagmannen kan omdanne disse målingene til andelen av levedyktige celler i cellepopulasjonen på en rekke måter.

[0041] I et eksempel blir det kondisjonerte mediet først delt likt i to deler (dvs. halvdeler), en celleinneholdende del ("X") og en ikke-celleinneholdende del ("Y"); Som vist i figur 1 og beskrevet i eksempel 1, når den celleinneholdende delen ("Y") har halvparten av det kondisjonerte mediet for prøven og den gjenværende halvdelen er i den ikke-celleinneholdende delen ("X"), da er den levedyktige halvdelen enkelt forskjellen delt av summen av aktivitetene, dvs.

$$\frac{X - Y}{X + Y} = \frac{\text{aktivitet fra levende celler}}{\text{total aktivitet}}$$

Telleren for dette uttrykket er enzymaktiviteten nærværende i de membranintakte cellene (mengden i den celleinnholdende delen, dvs. celler og kondisjonert medium, minus mengden nærværende i det kondisjonerte mediet alene), mens nevneren er den totale mengden av enzymaktivitet nærværende i prøven. Hvis den målte enzymaktiviteten nærværende i de celleinnholdende og ikke-celleinnholdende delene av prøven er 500 og 50, da er andelen levedyktighet

$$\frac{500 - 50}{500 + 50} = \frac{450}{550} \approx 0,82.$$

[0042] I det første steget med fremgangsmåtene med oppfinnelsen, trenger ikke det kondisjonerte mediet i prøven å bli delt likt mellom de celleinnholdende og ikke-celleinnholdende delene. Der andelen av det totale kondisjonerte mediet i prøven ikke blir delt likt mellom de to delene, er andelen levedyktighet gitt ved

$$\frac{X - cY}{X + Y}$$

der

$$c = \frac{1 - f}{f}$$

I det første uttrykket, er c en skaleringsfaktor som justerer for volumet av kondisjonert medium i den cellefrie delen som er analysert, i forhold til volumet av kondisjonert medium i den celleinnholdende delen som er målt. Denne skaleringsfaktoren er en funksjon av den ikke-null, desimalandelen f av det totale prøvekonisjonerte mediet nærværende i del Y, prøvedelen som ikke inneholder celler. I et illustrativt eksempel, ble en prøve av vevsrekonstruert produkt delt i:

1. (1) en del X, som inneholder cellene og 25 % av det prøvekonisjonerte mediet; og
2. (2) en del Y, som ikke inneholder celler, som inneholder 75 % av det prøvekonisjonerte mediet.

Her er c

$$\frac{1 - ,75}{,75} = \frac{,25}{,75} = \frac{1}{3}.$$

Hvis den målte enzymaktiviteten er 400 og 30 for X og Y, da

$$\text{levedyktighet} = \frac{400 - \frac{1}{3} 30}{400 + 30} = \frac{390}{430} \approx 0,91.$$

[0043] Den foregående diskusjonen inkluderte detaljerte midler for å beregne levedyktighet ved å anvende fremgangsmåter tilveiebrakt med oppfinnelsen. Dette kan være i konteksten av en kultur dyrket bare for analyse, eller for formålet av å estimere

levedyktigheten av en større populasjon. F.eks. i en "lotfrislipp"-analyse for et
 vevsrekonstruert produkt, blir levedyktigheten for produktets bestandsceller bestemt
 ved å ta en prøve av produktet (dvs. en biopsi), og noe av det overliggende
 kondisjonerte mediet. I dets enkleste form er prosentandelen av det totale kondisjonerte
 5 mediet som overligger produktet og prosentandelen av produktets totale biopserte
 overflateområde eller volum (og derfor celler), det samme. Hvis f.eks. en biopsi
 inkluderer ca. 2 % av cellene for produktet skulle ca. 2 % av volumet av kondisjonert
 medium som overligger produktet også være nærværende i prøven. Prøvetaking kan bli
 utført ved å ta enten cellene og kondisjonert medium sammen eller i rekker (i hver
 10 rekkefølge), eller en kombinasjon av de to teknikkene
[0044] (f.eks. å ta celler og noe kondisjonert medium, så fjerne ytterligere
 kondisjonert medium) ved å anvende ethvert antall steg vurdert av fagpersoner.
 Ligningene ovenfor antar underforstått dette som 1:1 prosent celle til prosent
 volumforhold i prøven.

15 **[0045]** Den praktiserende fagperson vil verdsette at 1:1 celle til volum prøvetakings-
 forhold kan bli variert, og at spesielle celletyper, produkter eller kulturtilstander kan bli
 tilgjengelig eller også kreve endrede forhold av celler og kondisjonert medium i en
 prøve. Som ville være tydelig for fagmannen, skulle spesielle modifikasjoner til
 beregningene presentert over bli brukt avhengig av anvendt prøvetagingsstrategi. F.eks.
 20 hvis forholdet av prosent kondisjonert mediumvolum til prosent celler i en prøve
 avviker fra 1, kan prøvens levedyktighet bli gitt ved

$$\text{levedyktighet} = \frac{X - Y}{X + Y + 2Y(\alpha - 1)} = \frac{\text{aktivitet_fra_levende_celler}}{\text{korrigert_total_aktivitet}}$$

der α = forholdet av prosent av de totale cellene mot prosent av det totale kondisjonerte
 mediumvolumet i prøven. Hvis en prøve slik inkluderer 2 % av de totale cellene og
 4 % av det totale volumet av kondisjonert medium (dvs. forholdet for prosentandelen
 25 av totale celler og prosent av kondisjonert medium er mindre enn 1), og aktiviteten i
 "X" og "Y" prøvedelene er henholdsvis 1000 og 200, da er

$$\text{levedyktighet} = \frac{1000 - 200}{1000 + 200 + 2 \times 200 \times (\frac{1}{2} - 1)} = 0,8$$

Alternativt kan forholdet av prosent celler mot prosent kondisjonert mediumvolum i en
 prøve være større enn 1. Hvis en prøve slik inkluderer 5 % av de totale cellene og 1 %
 av det totale kondisjonerte mediet, og aktiviteten i henholdsvis "X" og "Y" prøvedeler
 30 er 820 og 20, da er

$$\text{levedyktighet} = \frac{820 - 20}{820 + 20 + 2 \times 20 \times (5 - 1)} = 0,8$$

Særlig i disse eksemplene trenger bare korreksjonene å bli gjort i nevneren til ligningen
 som allerede er presentert ovenfor. Denne reviderte ligningen antar at det totale

volumet av kondisjonert medium nærværende i prøven blir delt likt mellom de analyserte "X" og "Y" delene. Når det kondisjonerte mediet ikke blir delt likt, kan denne samme nevnerkorrigeringen bli anvendt på ligningen, allerede tilveiebrakt, for situasjoner der det kondisjonerte mediet ikke blir delt likt mellom prøvens "X" og "Y" deler.

[0046] Fremgangsmåtene for å fastsette cellelevedyktighet tilveiebrakt med oppfinnelsen eliminerer behovet for kontrollceller. Kontrollceller blir anvendt for å kalibrere en enzymbasert analyse for et spesielt kulturmedium, matriks eller celletype. Dette er, delvis, fordi eksisterende analyser gjør absolutte målinger av protein eller enzymaktivitet. Absolutte målinger av protein eller enzymaktivitet kan bli påvirket av nærværet eller fraværet av f.eks. serum, tilskudd, vitaminer, fenolrød eller matriks/substrat. I tillegg kan absolutte målinger av protein eller enzymaktivitet bli påvirket av intrinsisk giver-til-giver, stamme-til-stamme, og celle passering-til-passering variabiliteter.

[0047] I tillegg mettes ofte eksisterende fremgangsmåter ved selv den lave enden av tettheter anvendt i anvendelser slik som vevsrekonstruering. Fremgangsmåtene tilveiebrakt med oppfinnelsen er nyttig for å måle levedyktighet ved høye celletetthetsanvendelser, slik som vevsrekonstruering.

Celledødstabile protein og enzymaktiviteter, analysetilstander og celledøstabilitet

[0048] Et celledødstabilt protein eller enzymaktivitet er en som fortsetter ved påvisbare nivåer selv om celledød oppstår ved forskjellige mekanismer, f.eks. programmert celledød (en energikrevende behandling) eller nekrose (en ikke-energikrevende behandling). Fordi forskjellige celledødbehandlinger påvirker forskjellige proteiner i forskjellige utstrekninger, kan et celledødstabilt protein være programmert celledødstabilt, nekrotisk stabilt eller begge. For en oversikt av celledød, se f.eks. Guimaraes og Linden, Eur. J. Biochem., 271:1638-1650 (2004) og Hengartner, Nature, 407:770-6 (2000).

[0049] I noen utførelsesformer er den relative konsentrasjonen av det celledødstabile proteinet eller enzymaktiviteten upåvirket eller endres ikke mer enn 5, 10, 15, 20, 40, 60 eller 80 % eller ikke mer enn 1, 2 eller 3 ganger i celler som har gjennomgått en celledødbehandling, i forhold til celler som ikke har gjennomgått celledødbehandlingen. I visse utførelsesformer kan halveringstiden for et celledødstabilt protein eller enzymaktivitet være ca. 30, 60, 90 eller 120 minutter; ca. 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 eller 12 timer; eller opp til ca. 1, 2, 3, 4 dager, eller mer.

[0050] Fagpersonen vil verdsette at proteiner eller enzymaktiviteter som kan være egnet for den foreliggende oppfinnelsen kan bli identifisert av forskjellige midler. F.eks. kan analyser av genuttrykksprofilen for celler som gjennomgår en

celledødbehandling, i forhold til den for celler som ikke gjennomgår en celledød-behandling, bli anvendt for å identifisere gener viss proteinprodukter er celledødstabile proteiner eller enzymaktiviteter. Slike gener kan være differensiert uttrykt ikke mer enn 5, 10, 15, 20, 40, 60 eller 80 % eller ikke mer enn 1, 2 eller 3 ganger i celler som

5 gjennomgår en celledødbehandling, i forhold til celler som ikke gjennomgår en celledødbehandling. Fagfolk vil gjenkjenne at gener identifisert på denne måten blir ytterligere evaluert for stabiliteten av proteinproduktet eller enzymaktiviteten under forskjellige celledødbehandlinger.

[0051] Celledødstabile proteiner eller enzymaktiviteter må bli begrenset av omkretsen av cellen, f.eks. på eller inne i plasmamembranen, i cytosolet eller inne i en membran-bundet organell. Målmolekyler må ikke være utskilte proteiner fordi opprinnelsen av et slikt protein eller enzymaktivitet, dvs. fra enten levedyktige eller ikke-levedyktige celler, ikke kan bli enkelt bestemt. Celledødstabilt protein eller enzymaktivitet, om begrenset inne i plasmamembranen, må bli målbar for tap av membranintegritet.

15 **[0052]** Membranintegriteten for cellene i cellepopulasjonen kan bli splittet av en rekke midler kjent for fagfolk. Slike midler skal konservere hele eller det meste av det celledødstabile proteinet eller enzymaktiviteten. F.eks. kan cellemembranintegriteten bli splittet ved klipping, sonisering, vakuum, høy temperatur, lav temperatur (f.eks. frysing), kjemisk eller enzymatisk lysering eller membranutkoblingsmidler. Kjemisk

20 lysering kan bli oppnådd ved inkubasjon med amfifiliske molekyler slik som såper, detergenter eller visse glykosider (f.eks. saponin). Mengden av kjemisk lyserings-middel kan bli justert for å oppnå den ønskede effekten. F.eks. kan saponin bli anvendt i en sluttkonsentrasjon på mellom 0,01 % og 2 % (vekt/volum), f.eks. mellom 0,05 % og 0,5 %.

25 **[0053]** Det celledødstabile proteinet eller enzymaktiviteten kan enten være en naturlig oppstående komponent fra cellepopulasjonens proteom eller en ikke-naturlig oppstående komponent, f.eks. uttrykt rekombinant(e) protein(er) eller enzymaktivitet. Slike rekombinante molekyler kan bli innført med rutinemetoder kjent i faget, og kan være stabilt eller kortvarig uttrykt, dvs. integrert i genomet eller plasmidbasert. Se

30 f.eks. Joseph Sambrook og David Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press; 3. utgave (2001).

[0054] Det vil bli forstått at mer enn et enzym kan være ansvarlig for en celledødstabil enzymaktivitet. F.eks. kan en gruppe av beslektede enzymer dele et substrat. I noen utførelsesformer blir en enzymaktivitet katalysert av minst 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20

35 eller flere forskjellige enzymer.

Påvisningsfremgangsmåter

[0055] Et celledødstabilt protein kan bli påvist ved konvensjonelle teknikker kjent i faget, f.eks. Western blot, ELISA, massespektrometri, kromatografi, eller immunkjemi. Alternativt kan et celledødstabilt protein bli påvist ved en karakteristisk celledødstabil enzymaktivitet. Det betyr at et protein kan bli påvist indirekte ved dets funksjon, f.eks. en reaksjon som den katalyserer. Å splitte membranintegritet tillater påvisning av enzymaktivitet tidligere utilgjengelig for molekyler i det ekstracellulære miljøet ved, f.eks. diffusjon av enzymet ut av cellen, inntreden av et substrat inn i cellen eller begge.

[0056] Fagfolk vil gjenkjenne at kombinasjoner av substrater og avspaltende grupper kan bli screenet for å anvende i fremgangsmåtene med oppfinnelsen, uten nødvendigvis å kjenne enzymet(ene) ansvarlig for å katalysere frisettingen av den avspaltende gruppen. F.eks. kan testprøver bli utført fra kjente mengder av levedyktige og ikke-levedyktige celler (se, f.eks. eksempel 1) og inkubert med et kandidatsubstrat ifølge fremgangsmåtene med oppfinnelsen. Den avspaltende gruppen blir så påvist og dens intensitet plottet mot det kjente forholdet for levedyktige og ikke-levedyktige celler. Nyttige substrater vil være de som har en lineær korrelasjon med den kjente proporsjonen av levedyktige og ikke-levedyktige celler. Ved å teste substrater på denne måten, er det ikke nødvendig å kjenne kilden(e) til den celledødstabile enzymaktiviteten.

[0057] Enzymsubstrat/avspaltende gruppe konjugater er velkjent innen faget. En nyttig egenskap for slike forbindelser er den interne stansingen av den påvisbare avspaltende gruppen. Det betyr at den avspaltende gruppen ikke i det hele tatt, eller kun svakt, er påvisbar når konjugert til et enzymsubstrat, men raskt blir påvisbart ved atskillelse fra substratet, f.eks. etter enzymatisk behandling av enzymsubstratet. Klasser av avspaltende grupper som kan bli anvendt i fremgangsmåtene med oppfinnelsen inkluderer, men er ikke begrenset til, kromogene, fluorescerende og luminescerende molekyler.

[0058] Kromogene molekyler for påvisningen av enzymaktivitet er velkjent innen faget. Tetrazoliumsalter og formazaner var noen av de første substratene anvendt til å påvise enzymatisk aktivitet (Altman, Prog. Histochem. Cytochem., 9:1-56 (1976)). Ytterligere kolorimetrisk komponenter kan f.eks. bli funnet i U.S. patent nr. 7 026 111, i kolonne 11.

[0059] Luminescerende molekyler, slik som luminol og isoluminol kan bli konjugert til enzymsubstrater og anvendt direkte i fremgangsmåtene med oppfinnelsen (se f.eks. U.S. patent nr. 4 748 116). Alternativt kan substrater konjugert til luciferin bli anvendt i et system der luciferase er uttrykt (se f.eks. U.S. patent nr. 7 148 030).

[0060] Fremgangsmåtene med oppfinnelsen kan anvende fluorescerende avspaltende grupper, f.eks. xantenfarger, fluoresceiner, rhodaminer, kumarinbaserte molekyler og deres derivater. Tilgjengelige fluorescerende molekyler er velkjent innen faget. (Se

f.eks. U.S. patent nr. 4 557 862; 4 640 893; 4 694 070; 4 801 534; 5 352 803; 6 130 101; 6 248 904; 6 342 611; 6 458 966; 6 750 357; 6 759 207; RE38 723, spesielt tabell II, deri og U.S. patentsøknad nr. 10/138 375, sendt inn 6. mai 2002 (publisert som U.S. patentpublikasjon nr. 2003/0208037) og 10/621 311, sendt inn 18. juli 2003 (publisert som U.S. patentpublikasjon nr. 2005/0014160) f.eks. for fluorescerende avspaltende grupper).

[0061] Signalet fremstilt a den avspaltende gruppen kan bli påvist ved alle egnede midler, f.eks. visuell inspeksjon, et spektrofotometer, luminometer eller fluormeter. I anvendelser der to eller flere tydelige avspaltende grupper er til stede i en prøve, kan de bli påvist samtidig eller fortløpende.

[0062] Nyttige substratavspaltende gruppe-konjugater i fremgangsmåtene med oppfinnelsen vil ha en avspaltende gruppe konjugert til et substrat av et celledødstabilt enzym som f.eks. er, et karbohydrat-, lipid-, protein-, peptid-, nukleinsyre-, hormon- eller vitaminhalvdel; eller en kombinasjon av en eller flere slike substrater. Disse halvdelene kan være naturlig forekommende (f.eks. biokjemisk rensert) eller syntetisk (f.eks. kjemisk syntetisert eller rekombinant fremstilt). I tillegg kan disse substratene inneholde ingen, noen eller alle ikke-medfødte komponenter (f.eks. ikke-naturlige aminosyrer, blokkerende eller beskyttende grupper osv.). Omfattende kataoger for enzym/substratpar er kjent innen faget. (se f.eks. U.S. patent nr. 4 167 449 (spesielt tabell II), 5 871 946 (spesielt tabell I) og 7 026 111 (spesielt kolonnene 13-18) f.eks. for slike enzym/substratpar). I tillegg kan substratbiblioteker være generert, som beskrevet i U.S. patent nr. 6 680 178 og screenet for å identifisere nyttige peptid-substrater for anvendelse i fremgangsmåtene med oppfinnelsen. I noen utførelsesformer kan en enzymaktivitetssubstratpreferanse bli profilert ved å anvende fagvisningsteknologi, som f.eks. beskrevet i Felber et al., Biol. Chem. 386:291-98 (2005).

[0063] Andre nyttige molekyler i fremgangsmåtene med oppfinnelsen inkluderer konjugater av det fluorescerende fargestoffet Rhodamine til peptidhalvdeler (Leytus et al., Biochem. J., 209:299-307 (1983)) som er nyttige i analyser for proteaseaktivitet, f.eks. Grant et al., J. of Biomol. Screen, 7:531-540 (2002) og Hug et al., Biochemistry, 38:13906-11 (1999). Disse reagensene kan bli integrert i multipleksanalyser som f.eks. beskrevet i U.S. patentsøknad nr. 10/762 836, sendt inn 22 januar 2004 (publisert som U.S. patentpublikasjon 2005/0164321 28 juli 2005).

[0064] Den sentrale rollen for proteaser i å vedlikeholde cellulær og organismal homeostase over fyla er en årsak til prevalensen for merkede peptidsubstrater som markører av proteaseaktivitet (se f.eks. U.S. patent nr. 6 037 137 og 6 984 718 som tilveiebringer reagenser og fremgangsmåter for å påvise proteaseaktivitet *in situ* og i hele celler).

[0065] Intrinsisk enzymaktivitet varierer bredt blant forskjellige enzymer og for forskjellige substrater av et spesielt enzym. Ekstrinsiske faktorer som påvirker enzymaktiviteten inkluderer tilstandene for mediet (f.eks. pH, temperatur, osmolaritet osv.), uttrykksnivå eller post-translasjonal regulering av enzymet, og substrat-

5 konsentrasjon. Substratkonsentrasjon vil behøve å bli justert omtrentlig av den utøvende. For gitte enzym- og mediumtilstander kan egnede substratkonsentrasjoner f.eks. være i området 0,01 ng/ml til 100 mg/ml, eller 10 µg/ml til 10 mg/ml. I noen situasjoner kan en substratkonsentrasjon på mellom 0,001 mM og 10 mM være egnet. Alternativt kan substratkonsentrasjonen være mellom 0,01 mM og 0,5 mM. Likeledes

10 vil inkubasjonstider som tillater utviklingen av påvisbare signaler variere bredt avhengig av disse samme parameterne. Følgelig kan inkubasjonstider strekke seg fra 30 sekunder eller mindre, opp til 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 45, 60, 75 eller 90 minutter; eller også 2, 4, 6, 10 eller 12 timer eller mer.

[0066] Et nyttig substrate for påvisningen av proteolytisk aktivitet i fremgangsmåtene med oppfinnelsen er bis-(Ala-Ala-Phe)-Rhodamine-110 (Promega, kat. nr. G9260). Et ytterligere substrat nyttig i fremgangsmåtene med oppfinnelsen er Ala-Ala-Phe-AMC (Bachem kat. nr. 1-1415.0050). Det er teorisert, men ikke avhengig av, at Ala-Ala-Phe tripeptid er et substrat for ekstralysosomal tripeptidylpeptidase-II-enzym (TPP II; Balow et al., J. Biol. Chem., 261:2409-2417 (1986)) og det lysosomale tripeptidyl-

15 peptidase-I-enzymet (TPP I; Vines og Warburton, Biochim. Biophys. Acta., 1384:233-242 (1998) og Steinfeld et al., J. Histochem. Cytochem., 54:991-996 (2006)). Særlig er Ala-Ala-Phe et vanlig og spesifikt substrat for de bakterielle subtilisinene (Stambolieva et al., Arch. Biochem. Biophys., 294:703-6 (1992)), som er funksjonelt like tripeptidyl-

20 peptidasene. Ytterligere substrater av TPP I kan bli funnet i f.eks. Tian et al., J. Biol. Chem., 281:6559-72 (2006), som screenet store biblioteker med substrater og U.S. patent nr. 6 824 998, som beskrev substrater (med presipiterende avspaltende grupper) nyttige for histologiske anvendelser.

[0067] Ala-Ala-Phe er kjent for også være et substrat for chymotrypsin-enzymet. Andre substrater for chymotrypsin og beslektede enzymer, slik som calpain, er kjent

30 innen faget, som er struktur/funksjonskorrelasjoner av slike enzymer. Disse er beskrevet ytterligere i f.eks. Sharma et al., Biol. Chem. (2008; 8 august, elektronisk publikasjon; PubMed Id (PMID) nr. 18690777), Croall og Ersfeld Genome Biol. 8:218 (2007); Czapinska og Otlewski Euro. J. Biochem 260:571-95 (1999); Perona og Craik J. Biol. Chem. 272:29987-90 (1997).

Cellekulturmedium, og matriks

[0068] Oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter som kan bli anvendt for å måle levedyktigheten av dyrkede celler avledet fra en lang rekke vertsorganismer, f.eks. pattedyr, inkludert mennesker, og fra en lang rekke av kildevev. De målte cellene kan bli avledet fra vev i forskjellige faser i utvikling. Celler kan bli avledet fra en voksen, foster eller embryon kilde. Cellene kan bli totipotente eller pluripotente stamceller, avledet fra et organ som stammer fra et av de tre primordiale vekstlagene (dvs. 5 ekto-derm, meso-derm eller endo-derm). Celler kan f.eks. bli avledet fra hud, hjerte, skjelettmuskel, myk muskel, nyre, lever, lunger, bein, pankreas, sentralt nervevev, perifert nervevev, sirkulatorisk vev, lymfoid vev, innvoller, milt, tyroidea, bindevev (f.eks. chondrocytter), eller gonader. Cellene kan være ikke-ekspanderte primærceller, kultur-ekspanderte primærceller eller etablerte cellelinjer. I tillegg kan cellene bli dyrket i mange medier, f.eks. med eller uten serum (f.eks. kjemisk definerte medier), og med eller uten fenolrød.

[0069] Oppfinnelsen tilveiebringer framgangsmåter for å måle levedyktigheten av celler over et bredt område av celletettheter. Cellene kan f.eks. være tilstede i en tetthet 15 på mellom $2,2 \times 10^4$ og $2,8 \times 10^6$ celler/cm², mellom $3,5 \times 10^4$ og $2,8 \times 10^6$ eller mellom 5×10^4 og 1×10^6 celler/cm². Cellene kan også være tilstede ved en høy tetthet på minst $2,0 \times 10^5$, $5,0 \times 10^5$, $1,0 \times 10^6$, $2,0 \times 10^6$, $2,8 \times 10^6$, 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 8×10^6 , 10×10^6 celler/cm² eller mer. Fremgangsmåtene tilveiebrakt i oppfinnelsen har blitt anvendt med celletettheter på opp til ca. 3×10^6 celler/cm². Det er vurdert at fremgangsmåtene ville fungere med celletettheter på opp til 10^6 celler/cm² eller mer. Det må være forstått at alle celletettheter angitt gjennom denne beskrivelsen er kvalifisert av begrepet "gjennomsnitt." Fagfolk vil utvilsomt vedsette at lokale vekslinger i celletetthet vil oppstå og blir vurdert i fremgangsmåtene tilveiebrakt med oppfinnelsen.

[0070] Celler blir inkubert i mediet for å sørge for akkumuleringen av celledødstabilt protein eller enzymaktivitet i mediet, dvs å fremstille kondisjonert medium. Fremgangsmåtene tilveiebrakt med oppfinnelsen måler levedyktighet over tidsperioden som cellene er i kontakt med mediet, dvs. kondisjonert medium generelt kan ikke bli byttet ut med ferskt medium rett før analyse. Celler kan bli inkubert i varierende tidsperioder, avhengig av den spesielle utførelsen, f.eks. celletype, celletetthet, mediumtype eller halveringstid for celledødstabilt protein eller enzymaktivitet. Celler kan bli inkubert før analysering i ca. 1, 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 eller 240 minutter; eller ca. 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 18 eller 24 timer; eller opp til ca. 1, 2, 3, 4, 5 dager eller mer.

[0071] Fremgangsmåtene med oppfinnelsen er nyttige for å måle andelen ev levedyktige celler dyrket på en rekke substrater eller matrikser. Celler kan bli dyrket på tradisjonelle, todimensjonale cellekultursubstrater, f.eks. glass eller overflatebehandlet plast. Alternativt kan celler bli støttet av et stillas eller matriks, f.eks. der cellene er del av et vevsrekonstruert produkt. Egnede stillaser kan inkludere strukturer sammensatt av metaller, plast, glass, silikon, keramikk og/eller kalsiumfosfater. Andre egnede

stillasmaterialer inkluderer absorberbare polyestere (f.eks. polymerer av glykolid eller laktid og derivater eller kopolymerer derav); karbohydrat (f.eks. hyaluronin, kitin, stivelse eller alginat); og protein (f.eks. kollagen (f.eks. en kollagenavledet matriks av svin) eller gelatin), eller kombinasjoner av alle disse matriksene. Ytterligere diskusjon av matrikser anvendt i vevsrekonstruksjon finnes i, f.eks. Langer og Vacanti (1993); Ikada, J. R. Soc. Interface, 3:589-601 (2006); og U.S. patent nr. 6 689 608 og 6 800 296.

Analysevariasjoner

[0072] Søkere har oppdaget at fenolrød videre kan utvide området av celletettheter målbare med framgangsmåtene med oppfinnelsen. Dette blir oppnådd ved å redusere signalet for avspaltende gruppe. Det betyr at fenolrød reduserer signalet av, f.eks. rhodamin-110 (R110), og analysen mettes ved en høyere celletetthet. Det er teorisert, men ikke avhengig av, at deprotonert fenolrød utøver denne effekten fordi dens absorpsjonsspektrum har signifikant overlapp med både eksitasjons- og emisjons-spektre av rhodamin 110.

[0073] I tillegg til fenolrød for R110, er anvendelsen av andre reduserende midler tilpasset for anvendelse med andre avspaltende grupper også vurdert. Egnede reduserende midler for spesielle avspaltende gruppers eksitasjons og eller emisjons-spektre vil ha den ønskede graden av overlapp i dets absorpsjonsspekter. Absorpsjons, eksitasjons og emisjonsspektre er kjent i faget eller kan enkelt bli bestemt empirisk, for eksempel ved fluorometri.

[0074] Fremgangsmåtene tilveiebrakt av oppfinnelsen er videre modulær og tilgjengelig for multipleksing. Det betyr at ytterligere fremgangsmåter, steg og/eller midler kan ytterligere utvide en analyses nytte. Fremgangsmåtene tilveiebrakt med oppfinnelsen kan videre f.eks. inkludere påvisningen av mer enn et celledødstabilt protein eller enzymaktivitet. Dette blir oppnådd ved å anvende multiple enzym-spesifikke substrater for to eller flere celledødstabile enzymaktiviteter i en prøvedel ved å anvende f.eks. ortogonale substrater og/eller avspaltende grupper. En slik "påvisningsblanding" inneholder en eller flere slag av substrat for celldødstabile enzymaktiviteter koblet til en eller flere påvisbare avspaltende grupper. Disse multipleksende fremgangsmåtene kan bli delt i to generelle klasser: et enkelt slag av avspaltende gruppe og multiple arter av avspaltende grupper.

[0075] En påvisningsblanding der et enkelt slag av avspaltende gruppe er koblet med multiple slag av enzymsubstrater vil fremstille et integrert signal. Det betyr at det resulterende signalet er en sum av de påviste enzymaktivitetene. Hvert substrat kunne f.eks. bli fremstilt av en tydelig enzymaktivitet. Ved analysering og summering over

multiple enzymaktiviteter, blir det integrerte signalet en mer nøyaktig visning av prøvens totale metabolske tilstand. Integrerte signaler kan også være nyttige der kortere inkubasjonstider er ønsket.

[0076] Anvendelsen av multiple slag av avspaltende grupper i fremgangsmåtene med oppfinnelsen tilveiebringer uavhengige målinger av levedyktighet. En påvisningsblanding som inneholder et enkelt slag av substrat for en enzymaktivitet koblet til multiple slag av avspaltende grupper tilveiebringer parallellmålinger av levedyktighet. De forskjellige signalene gir ytterligere fleksibilitet til forskere som anvender påvisningsutstyr som kan ha maskin- eller detektoravhengige sensitiviteter, f.eks. ved forskjellige bølgelengder og intensiteter.

[0077] Anvendelsen av multiple substratslag, hvert koblet til et ulikt slag av avspaltende gruppe, gir helt avhengige målinger av levedyktighet. Substratene kan f.eks. tilhøre enzymer med lave, medium eller høye beslektede aktiviteter. De beslektede aktivitetene kunne variere fra lav til høy ved minst 10, 20, 40 eller 80 %, eller ved minst 1, 2, 5, 10, 50, 100, 500 eller 1000 ganger eller mer. Ved å utføre multiple avhengige målinger av levedyktighet, kan en forsker enklere forbli i det lineære påvisningsområdet med minst ett substratslag.

[0078] En ytterligere anvendelse ved å anvende multiple avspaltende grupper er en kvalitetskontrollanalyse. Særlig kan fremgangsmåtene med oppfinnelsen ytterligere inkludere stegene med å tilsette en eller flere kontaminantspesifikke substrater, hvert koblet til det samme slaget av avspaltende gruppe og å påvise en eller flere kontaminantspesifikke enzymaktiviteter. De kontaminantspesifikke substratslaget er substrater for enzymer spesifikke mot vanlige cellekulturkontaminanter slik som: sopp, bakterier, arkeer og protister – og fravær av de dyrkede cellenes proteomer. Følgelig indikerer påvisning av den kontaminantspesifikke avspaltende gruppe kontaminasjon av den dyrkede cellepopulasjonen. Naturligvis vil den avspaltende gruppen for de kontaminantspesifikke enzymaktivitetene være tydelig fra de(n) avspaltende gruppen(e) anvendt til å måle levedyktigheten av dyrkede cellene.

[0079] Fremgangsmåtene med oppfinnelsen kan også bli tilpasset å måle cytotoksisiteten av en behandling. En behandling kan være en omgivende eller fysiologisk behandling, f.eks. termisk, barometrisk, mekanisk eller fotisk stimulus. Behandling kan også være en kjemisk behandling, f.eks. osmolaritet, pH, et farmakologisk eller biologisk middel eller enhver kombinasjon av de over. Fremgangsmåtene med oppfinnelsen kan videre inkludere stegene med å anvende en behandling til en testcellepopulasjon, å måle levedyktigheten av testcellepopulasjonen med fremgangsmåtene med oppfinnelsen og å sammenligne levedyktigheten til en kontrollkultur av de samme cellene som ikke er eksponert i behandlingen. I visse utførelsesformer kan cytotoksisiteten bli beregnet som 1 minus andelen levedyktighet for en populasjon. I disse utførelsesformene er ikke en kontrollpopulasjon nødvendig.

Eksempler

Eksempel 1: Måle cellelevedyktighet for et vevsrekonstruert produkt

[0080] En kort skjematisk for en cellelevedyktighetsanalyse er vist i figur 1. Der "Read #1" er mengden av celledødstabil eller enzymaktivitet tilstede i delen av populasjonen som inneholder cellene og kondisjonert medium, mens "Read #2" er mengden av celledødstabil protein av enzymaktivitet nærværende i delen av det kondisjonerte mediet som ikke inneholder celler fra kulturpopulasjonen.

[0081] Humane leddchondrocytter ble utvidet til andre eller tredje passering i monolagkulturer. For å gjenta kulturtilstander anvendt i MACI[®] implantater, ble chondrocytter sådd i triplikat på hvite, gjennomsiktige 96 brønns plater på den grove siden av ACI-MAIX[®] membranens matriksgroper (6 mm i diameter) med tettheter på ca. 25 000 til 600 000 celler per grop. Matricel ACI-MAIX[®] membranmatriks er en svinekollagenbasert membranmatriks med en glatt side og en grov side. Denne såingstettheten er lik $8,75 \times 10^4$ til $2,1 \times 10^6$ celler/cm² som tilsvarer $1,75 \times 10^6$ til 42×10^6 celler per ACI-MAIX[®] membranmatriks (20 cm²). Når analysen blir anvendt i fullskala MACI[®] implantatprøver, blir to små groper (normalt 6 mm i diameter) og en proporsjonal mengde av kondisjonert medium tatt fra hver prøve. For to groper 6 mm i diameter, som sammen representerer ca. 2,8 % av en 20 cm² membran, er en proporsjonal mengde av det kondisjonerte mediet ca. 2,8 % av det totale volumet av det kondisjonerte mediet som overligger den 20 cm² membranen. I både fullskala og nedskalerte tilfeller, ble blanke membranmatriksgroper og medium fremstilt som kontroller.

[0082] Tre timer etter cellesåing, ble halvparten av det kondisjonerte mediet, som ville inneholde halvparten av den totale mengden av alle proteaser frisatt av død (ikkelevedyktige) celler, overført til tomme brønner.

[0083] Deretter ble en masterblanding som inneholder bis-(Ala-Ala-Phe)-Rhodamine-110 substrat (bis-alanyl-alanyl-fenylalanyl-rhodamin 110; Promega kat. nr. G9260) med saponin (10 % vekt/volum vandig løsning, Sigma, St. Louis, MO, kat. nr. S4521) og fenolrød (eventuelt; 0,1 % løsning fremstilt ved å fortynne 0,5 % fenolrød, Sigma kat. nr. P0290, i fosfatbufret saltvann (PBS)) tilsatt prøvene. Saponin ble anvendt for å trenge gjennom de levende cellene i delen som inneholder celler og kondisjonert medium for å gjøre de intracellulære proteasene tilgjengelig for substratet. Sluttkonsentrasjonen av ulike komponenter i masterblandingen er normalt:

- bis-(Ala-Ala-Phe)-Rhodamine-110 substrat, 0,83 mM
- Saponin 1,67 %
- Fenolrød 0,167 mg/mL (eventuelt)

[0084] Etter inkubasjon (45-90 min.), ble platen lest ved å anvende en molekylær SpectraMax M5 mikropplateleser med SoftMax Pro-programvaren ved eksitasjon 485 nm - emisjon 520 nm. Dataene ble så behandlet i Microsoft EXCEL.

[0085] Resultater av representative eksperimenter er vist i figur 2. Spredningsdiagram av fluorescerende reportersignalstyrke, (Read #1, levende celler med supernatant, figur 2A; og Read #2, kun supernatant, figur 2B); som en funksjon av celledensitet er vist. Datapunkter er gjennomsnittet av tre gjentakelser. Inkuberingstid med bis-(Ala-Ala-Phe)-Rhodamine-110 substratet var enten 45, 60 eller 90 minutter. Forholdet mellom signal og celledensitet var lineær og varierte lite for alle testede inkubasjonstider. Et 60 minutters inkubasjonssteg ble anvendt i etterfølgende målinger.

Eksempel 2: Analysenøyaktighet og presisjon

[0086] Nøyaktigheten av analysen ble evaluert ved å sammenligne den målte levedyktigheten for en kultur med en kjent prosentandel av levedyktige celler. Kulturen ble sammensatt av en blanding av kjente mengder av levende og døde celler, forblandet og sådd ved de angitte tetthetene, så behandlet som i eksempel 1. Den målte levedyktigheten ble plottet som en funksjon av prosenten av levedyktige celler i testblandingen (figur 3). De plottede datapunkter er gjennomsnittet av to gjentakelser. Normalt er forskjellen mellom den målte levedyktigheten og den aktuelle levedyktigheten mindre enn 15 %. For celledensiteter lavere enn $0,175 \times 10^6$ celler/cm², hjelper en lengre inkubasjonstid (på minst 90 min.) til å sikre analysenøyaktighet.

[0087] For å måle nøyaktigheten innen stamme for analysen, ble 1:1 forhold av levende og døde celler fra 3 forskjellige stammer sådd med en tetthet på $7,0 \times 10^5$ celler/cm². Selv om betydelig intrinsisk variabilitet kan finnes i de absolutte signalnivåene fra forskjellige cellestammer (tabell 1, første datakolonne; % CV=41,49) er variabiliteten i målt levedyktighet vesentlig mindre (tabell 1, andre datakolonne; % CV=7,62).

Tabell 1

	Lest #1 signal	Målt levedyktighet
Stamme #1	20724,01	58,27
Stamme #2	10029,55	51,04
Stamme #3	24999,32	51,37
Gjennomsnitt	18584,29	53,56
Standardavvik(SD)	7710,85	4,08
% CV=(100xSD/gjennomsnitt)	41,49	7,62

Eksempel 3: Bidrag fra matriks, reagens og analyttvariabilitet til analysepresisjon

[0088] For å få tilgang til effekten av forskjellige analytter og forskjellige matrikser eller reagensloter på presisjonen av målt levedyktighet, ble celler fra en enkelt foreldrekultur sådd med en tetthet på $7,0 \times 10^5$ celler/cm² på membrangroper og utført som beskrevet i eksempel 1. Tre variabler ble analysert: matrikslot, analyselot og analytt. Hver variabel ble testet i to grupper – hver behandlingsgruppe med tre statistiske gjentakelser. Resultatene er vist i tabell 2. Disse resultatene foreslår at analysen er relativt ufølsom for endringer i disse tekniske variablene.

Tabell 2

	Membranmatriks		Analysereagens		Analytt	
	Lot #1	Lot #2	Lot #1	Lot #2	Analytt #1	Analytt #2
Analysering #1	78,6	80,7	75,8	79,3	75,9	77,0
Analysering #2	78,3	82,5	80,5	78,6	82,8	78,6
Analysering #3	77,6	81,6	76,1	80,7	78,4	73,7
Gjennomsnitt	78,2	81,6	77,5	79,5	79,0	76,4
Standardavvik	0,5	0,9	2,6	1,1	3,5	2,5
% CV	0,7	1,1	3,4	1,3	4,4	3,3

Eksempel 4: Effekt på fenolrød

[0089] Under utviklingen av denne analysen ble det funnet at tilsetningen av fenolrød til analyseblandingen kunne redusere signalintensiteten på en doseavhengig måte og utvide det lineære området for analysen til høyere celletettheter. Celler ble sådd ved varierende tettheter og behandlet som i eksempel 1, med eller uten fenolrød og den gjennomsnittelige levedyktigheten for tre gjentakelser er vist i figur 4. Tilsetningen av fenolrød påvirker ikke analysens nøyaktighet, den tjener heller til å hindre signalnivåene fra å tilnærme seg metting ved å undertrykke signaltelsene på en doseavhengig måte. Mengden fenolrød kan bli justert etter behov. Fenolrød er ikke normalt nødvendig for å så tettheter lavere enn $0,5 \times 10^6$ celler/cm² membranmatriks.

Eksempel 5: Tidspunkt for tilsetning av fenolrød

[0090] Tidspunktet for tilsetning av fenolrød til analyseblandingen ble funnet å være fleksibelt. For å vise dette ble celler fra en enkelt stamme behandlet for å frisetse alle intracellulære proteaser og å så ved en tetthet på $1,0 \times 10^4$ celler/brønn i en 96 brønns

plate, i et volum på 100 µl/brønn. Substrater og fenolrød ble tilsatt i mengden og på tidspunktet ifølge tabell 3. Resultatene er vist som gjennomsnittssignalintensiteten av tre gjentakelser per behandling i tabell 4. Disse resultatene viser at fenolrød av varierende konsentrasjoner tilsatt ved varierende tidspunkter under analysen, er likeledes effektivt i å redusere signalene.

[0091] Anvendelsen av fenolrød ekspanderer betydelig det dynamiske området for at den nye analysen kan måle levedyktighet ved å anvende den: en høy celledensitet (normalt over $1,4 \times 10^6$ celler/cm²), eller i en variasjon av medier inkludert serum-inneholdende eller serumfritt og fenolrødinneholdende eller fenolrødfritt.

Tabell 3

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7
Tid = 0 min (Ved start), tilsett ytterligere fenolrød for 1. runde:		2 ul med 0,05 % fenolrød per brønn	2 ul med 0,1 % fenolrød per brønn				
Tid = 30 min: tilsett substrat							
Tid = 90 min: tilsett ytterligere fenolrød for den 2. runden: (60 min etter tilsetting av substrat)				2 ul med 0,05 % fenolrød per brønn	2 ul med 0,1 % fenolrød per brønn		
Tid = 210 min: tilsett ytterligere fenolrød for den 3. runden: (180 min etter tilsetting av substrat)						2 ul med 0,05 % fenolrød per brønn	2 ul med 0,1 % fenolrød per brønn

Tabell 4

Gruppe Signal (RFU) ved	1 (ikke ytterligere fenolrød)	2	3	4	5	6	7
Tid = 60 min (60 min etter runde 1 ytterligere fenolrød og 30 min etter tilsetting av substrat)	336,51	155,07	104,64	264,06	288,91	310,23	326,48
Tid = 90 min (Rett før runde 2 ytterligere fenolrød)	868,22	408,44	258,21	721,74	774,08	829,01	866,34
Tid = 90 min (Rett etter runde 2 ytterligere fenolrød)	871,22	403,59	251,84	426,17	275,25	841,60	886,71
Tid = 210 min (Rett før runde 3 ytterligere fenolrød)	3921,60	1861,36	1170,77	1917,11	1131,79	4039,14	4282,18
Tid = 210 min (Rett etter runde 2 ytterligere fenolrød)	3550,22	1736,73	1084,51	1777,20	1038,75	1981,21	1313,56
Tid = 270 min	5513,00	2522,19	1611,28	2583,72	1561,83	2642,22	1715,75
Tid = 12 timer	17777,36	9809,42	6125,19	10058,85	5868,30	9722,61	5782,98

Eksempel 6: Celler dyrket på en alternativ matriks

[0092] For å vise effekten av et forskjellig matriksmateriale på fremgangsmåten, ble celler sådd på Gelfoam (Upjohn Pharmacia, Kalamazoo, MI), en svært porøs gelatin-svamp, med tetthet som strekker seg fra $7,1 \times 10^4$ to $2,3 \times 10^6$ celler/cm². Celler ble behandlet som i eksempel 1. Resultater er vist i figur 5 som den gjennomsnittlige levedyktigheten for tre gjentakelser. Levedyktigheten for cellene, som bestemt med trypanblå eksklusjon rett før såing, var 91 %. Disse data indikerer at analysen er tilgjengelig for å analysere celler sådd på en rekke forskjellige matriser.

Eksempel 7: Celler dyrket på 2D-kulturer (vevskulturplast).

[0093] For å vise effektiviteten for analysen i et mer tradisjonelt vevskulturmiljø (dvs. vekst på et uorganisk, flatt substrat), ble celler sådd direkte i en seksbrønns vevskulturplate av plast, uten matriks, ved tettheter i området fra $2,2 \times 10^4$ til $2,8 \times 10^6$ celler/cm². Cellene ble behandlet som i eksempel 1. Resultatene er vist i figur 6 som den

5 gjennomsnittelige levedyktigheten for to gjentakelser. Levedyktigheten for cellene, som bestemt med trypanblå eksklusjon rett før såing, var 96 %. Disse resultatene viser at analysen yter godt med celler dyrket på et tradisjonelt cellekultursubstrat, i tillegg til celler dyrket på forskjellige matriser.

Eksempel 8: Ikkehumane celler

10 **[0094]** For å vise effektiviteten av analysen på ikke-humane celler ble kaninchondrocytter fra to donorer sådd på ACI-MAIX[®]-membranmatriksgrøper (6 mm i diameter) ved tettheter i området fra 0,175 til $1,4 \times 10^6$ celler/cm². Cellene ble behandlet som i eksempel 1. Resultatene er vist i figur 7 som den gjennomsnittelige levedyktigheten for to gjentakelser. Levedyktigheten for stammer 1 og 2, som bestemt med trypanblå

15 eksklusjon rett før såing, var henholdsvis 88,0 % og 84,9 %. Disse resultatene viser at analysen yter godt med celler fra en ikke-human kilde.

Eksempel 9: Alternativt substrat

[0095] For å vise effektiviteten for fremgangsmåten som anvender andre substrater enn bis-(Ala-Ala-Phe)-Rhodamine-110, ble et alternativt substrat, (Ala-Ala-Phe)-AMC

20 (Bachem kat. nr. 1-1415.0050, Torrance, CA), testet ved å anvende tre stammer av humane chondrocytter sådd med tettheter i området fra $8,75 \times 10^4$ til $1,4 \times 10^6$ celler/cm². Cellene ble behandlet som i eksempel 1, untatt bis-(Ala-AlaPhe)-Rhodamine-110 ble erstattet av (Ala-Ala-Phe)-AMC og prøveplaten ble lest ved eksitasjon 360 nm - emisjon 440 nm. Levedyktighetene for stamme A, B og C, bestemt

25 med trypanblå eksklusjon rett før såing, var henholdsvis 98,6 %, 98,6 % og 99,2 %. Resultatene er vist i figur 8 som den gjennomsnittelige levedyktigheten av to gjentakelser. Resultatene viste at det alternative (Ala-Ala-Phe)-AMC-substratet var effektivt (figur 8).

[0096] Andre utførelsesformer med oppfinnelsen vil være tydelig for fagpersoner fra vurderinger av spesifikasjonen og anvendelse av oppfinnelsen omtalt heri. Det er

30 tiltenkt at spesifikasjonen og eksemplene skal betraktes kun som eksempler.

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåte for å måle andelen levedyktige celler i en cellepopulasjon vedlikeholdt i et cellekulturmedium der fremgangsmåten omfatter:

(a) å påvise en celledødstabil enzymaktivitet (Y) i en del av et
cellekulturkondisjonert medium som ikke inneholder celler av
cellepopulasjonen;

(b) å splitte membranintegriteten for cellene i en del av cellekulturmediet som inneholder celler fra populasjonen;

(c) å påvise en celledødstabil enzymaktivitet (X) i cellene og kondisjonert medium av delen av cellekulturmediet som inneholder celler fra
cellepopulasjonen; og

(d) å sammenligne nivået av celledødstabil enzymaktivitet (X) i cellene og kondisjonert medium for delen av cellekulturmediet som inneholder celler med nivået for celledødstabil enzymaktivitet (Y) i delen av cellekulturkondisjonert medium som ikke inneholder celler;

hvor andelen av levedyktige celler i cellepopulasjonen kan bli beregnet ifølge formelen:

$$\frac{X - cY}{X + Y}$$

hvor

$$c = \frac{1 - f}{f}$$

og f er andelen av det totale kondisjonerte mediet nærværende i delen av det
cellekulturkondisjonerte mediet som ikke inneholder celler fra cellepopulasjonen.

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor fremgangsmåten er en fremgangsmåte for å måle andelen av levedyktige celler i et vevsrekonstruert produkt vedlikeholdt i et cellekulturmedium, og hvor fremgangsmåten omfatter:

(a) å påvise en celledødstabil enzymaktivitet (Y) i en del av et cellekulturkondisjonert medium som ikke inneholder celler av det vevsrekonstruerte produktet;

(b) å splitte membranintegriteten for cellene i en del av cellekulturmediet som inneholder celler fra det vevsrekonstruerte produktet;

(c) å påvise en celledødstabil enzymaktivitet (X) i cellene og kondisjonert medium av delen av cellekulturmediet som inneholder celler fra det vevsrekonstruerte produktet; og

(d) å sammenligne nivået av celledødstabil enzymaktivitet (X) i delen av cellekulturmediet som inneholder celler og kondisjonert medium for det vevsrekonstruerte produktet til nivået for celledødstabil enzymaktivitet (Y) i delen av det cellekulturkondisjonerte mediet som ikke inneholder celler fra det vevsrekonstruerte produktet,

hvor andelen av levedyktige celler i det vevsrekonstruerte produktet kan bli beregnet ifølge formelen:

$$\frac{X - cY}{X + Y}$$

hvor

$$c = \frac{1 - f}{f}$$

og f er andelen av det totale kondisjonerte mediet nærværende i delen av det cellekulturkondisjonerte mediet som ikke inneholder celler fra cellepopulasjonen.

3. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvor fremgangsmåten er en fremgangsmåte for å måle andelen av levedyktige celler i et vevsrekonstruert produkt vedlikeholdt i et cellekulturmedium, og hvor fremgangsmåten omfatter:

(a) å tilveiebringe en prøvedel av det vevsrekonstruerte produktet som inneholder celler og en proporsjonal mengde av et cellekulturkondisjonert medium;

(b) å påvise en celledødstabil enzymaktivitet (Y) i en del av et cellekulturkondisjonert medium som ikke inneholder celler av det vevsrekonstruerte produktet fra prøvedelen tilveiebrakt i steg (a);

(c) å splitte membranintegriteten for cellene i prøvedelen for det vevsrekonstruerte produktet tilveiebrakt i steg (a);

(d) å påvise en celledødstabil enzymaktivitet (X) i cellene og kondisjonert medium av prøvedelen av det vevsrekonstruerte produktet tilveiebrakt i steg (a); og

5 (e) å sammenligne nivået av celledødstabil enzymaktivitet påvist i steg (b) og (d), hvori når forholdet for prosentandelen av totale celler mot prosentandelen av totalt cellekulturkondisjonert medium i prøvedelen er 1:1, kan andelen av levedyktige celler i det vevsrekonstruerte produktet bli beregnet ifølge formelen:

$$\frac{X - cY}{X + Y}$$

hvor

$$c = \frac{1 - f}{f}$$

10 og f er andelen av det totale prøvekonisjonerte medium nærværende i delen for det cellekulturkondisjonerte mediet som ikke inneholder celler fra cellepopulasjonen; og hvori når forholdet av prosentandelen av celler mot prosentandelen av cellekulturkondisjonert medium i prøvedelen avviker fra 1:1, kan andelen av levedyktige celler i det vevsrekonstruerte produktet bli beregnet ifølge formelen:

$$\frac{X - cY}{X + Y + 2Y(\alpha - 1)}$$

hvor

$$c = \frac{1 - f}{f}$$

15 og f er andelen av det totale prøvekonisjonerte medium nærværende i delen av det cellekulturkondisjonerte mediet som ikke inneholder celler fra cellepopulasjonen; og hvori α er forholdet av prosentandelen av de totale cellene mot prosentandelen av det totale kondisjonerte mediet nærværende i prøven.

20 **4.** Fremgangsmåten ifølge krav 3, hvori membranintegriteten av cellene i prøvedelen splittet av det vevsrekonstruerte produktet blir splittet ved klipping, sonikering, lavt barometertrykk, høy temperatur, lav temperatur, kjemisk eller enzymatisk lysering eller membranutkoblingsmidler.

25 **5.** Fremgangsmåten ifølge krav 4, hvori membranintegriteten av cellene i prøvedelen splittet av det vevsrekonstruerte produktet blir splittet ved tilsetningen av et amfifil.

6. Fremgangsmåte ifølge krav 5, hvor amfifilet er saponin.

7. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori fremgangsmåten er en fremgangsmåte for å måle andelen av levedyktige celler i et vevsrekonstruert produkt vedlikeholdt i et cellekulturmedium, og hvori fremgangsmåten omfatter:

(a) å tilveiebringe en del av det vevsrekonstruerte produktet som inneholder celler og en proporsjonal mengde av det cellekulturkondisjonerte mediet;

(b) å tilveiebringe en del av det cellekulturkondisjonerte mediet, tilveiebrakt i steg a), som ikke inneholder celler av det vevsrekonstruerte produktet;

(c) tilsette saponin og bis-(Ala-Ala-Phe)-Rhodamine-110 til prøven tilveiebrakt i steg a) og b); og

(d) å påvise fluorescenser tilsvarende spaltet bis-(Ala-Ala-Phe) Rhodamine-110 i prøvene tilveiebrakt i steg a) og b), hvori cellene er humane chondrocytter, vedlikeholdt i en matriks ved en tetthet på mellom $1,5 \times 10^4$ og 6×10^6 celler/cm².

8. Fremgangsmåte for å måle cytotoksisiteten av en behandling til celler i et vevsrekonstruert produkt vedlikeholdt i et cellekulturmedium omfattende:

(a) å anvende behandlingen til det vevsrekonstruerte produktet;

(b) å påvise en celledødstabil enzymaktivitet (Y) i en del av et cellekulturkondisjonert medium som ikke inneholder celler av det vevsrekonstruerte produktet;

(c) å splitte membranintegriteten for cellene i en del av cellekulturmediet som inneholder celler fra det vevsrekonstruerte produktet;

(d) å påvise en celledødstabil enzymaktivitet (X) i cellene og kondisjonert medium av delen av cellekulturmediet som inneholder celler fra det vevsrekonstruerte produktet; og

(e) å sammenligne nivået av celledødstabil enzymaktivitet (X) i delen av cellekulturmediet som inneholder celler fra det vevsrekonstruerte produktet til nivået for celledødstabil enzymaktivitet (Y) i delen av det cellekulturkondisjonerte mediet som ikke inneholder celler fra det vevsrekonstruerte produktet,

hvor cytotoksisiteten av behandlingen er proporsjonal med forskjellen i andelen av levedyktige celler i det behandlede vevsrekonstruerte produktet mot et ubehandlet vevsrekonstruert produkt, og hvor andelen av levedyktige celler i det vevsrekonstruerte produktet kan bli beregnet ifølge formelen:

$$\frac{X - cY}{X + Y}$$

5 hvor

$$c = \frac{1 - f}{f}$$

og f er andelen av det totale kondisjonerte mediet nærværende i delen av det cellekulturkondisjonerte mediet som ikke inneholder celler fra cellepopulasjonen.

9. Fremgangsmåten for ethvert av kravene 1, 2, 3 eller 8, hvor cellene er fra
10 pattedyr.

10. Fremgangsmåten ifølge krav 9, hvor cellene er humane.

11. Fremgangsmåten ifølge krav 10, hvor cellene er chondrocytter.
15

12. Fremgangsmåten ifølge krav 9, hvor cellene er dyrket på en matriks.

13. Fremgangsmåten ifølge krav 9, hvor cellene er til stede i en tetthet på mellom
1,5x10⁴ og 6x10⁶ celler/cm².
20

14. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 3, 7 eller 8, hvor
cellene er tilstede i en høy tetthet på minst 2,0x10⁵ celler/cm².

15. Fremgangsmåten ifølge krav 14, hvor cellene er til stede ved mellom 2x10⁴
25 og 6x10⁶ celler/cm².

16. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 3, 7 eller 8, hvor
den celledødstabile enzymaktiviteten blir målt ved stegene omfattende:

(a) å berøre en prøve med et substrat av den celledødstabile enzymaktiviteten
30 hvor substratet blir konjugert til en påvisbar avspaltende gruppe; og

(b) påvisning av den avspaltende gruppen,

hvor i mengden avspaltende gruppe påvist er proporsjonal med nivået av celledødstabil enzymaktivitet.

17. Fremgangsmåten ifølge krav 16, hvor i den avspaltende gruppen er kromogen,
lumogen eller fluorescerende.

18. Fremgangsmåten ifølge krav 17, hvor i den avspaltende gruppen er fluorescerende.

19. Fremgangsmåten ifølge krav 18, hvor i den avspaltende gruppen er Rhodamine-110.

20. Fremgangsmåten ifølge krav 16, hvor i substratet er bis-(Ala-Ala-Phe)-Rhodamine-110.

21. Fremgangsmåten ifølge krav 18, hvor i den avspaltende gruppen er et kumarinderivat.

22. Fremgangsmåten ifølge krav 21, hvor i den avspaltende gruppen er AMC.

23. Fremgangsmåten ifølge krav 22, hvor i substratet er Ala-Ala-Phe-AMC.

24. Fremgangsmåten ifølge krav 16, ytterligere omfattende steget av å tilsette et middel som modulerer signalet av den påvisbare avspaltende gruppen.

25. Fremgangsmåten ifølge krav 24, hvor i midlet som modulerer signalet fra avspaltende gruppe, reduserer signalet fra den avspaltende gruppen.

26. Fremgangsmåten ifølge krav 25, hvor i midlet som reduserer signalet for den avspaltende gruppen er fenolrød.

27. Fremgangsmåten ifølge krav 26, hvor i fenolrød er nærværende i en konsentrasjon på opp til 500 mg/L.

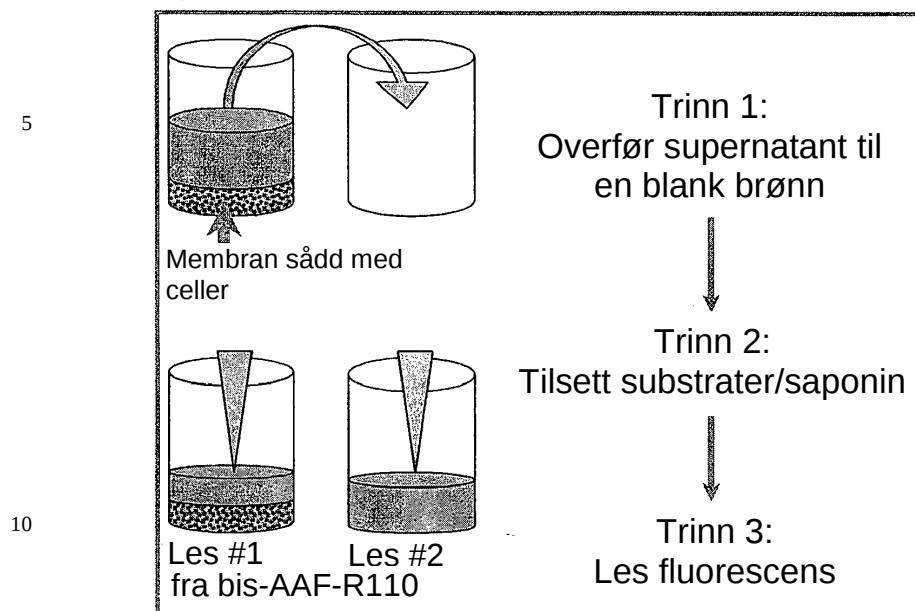
28. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 3, 7 eller 8, hvor i den celledødstabile enzymaktiviteten er proteolytisk.

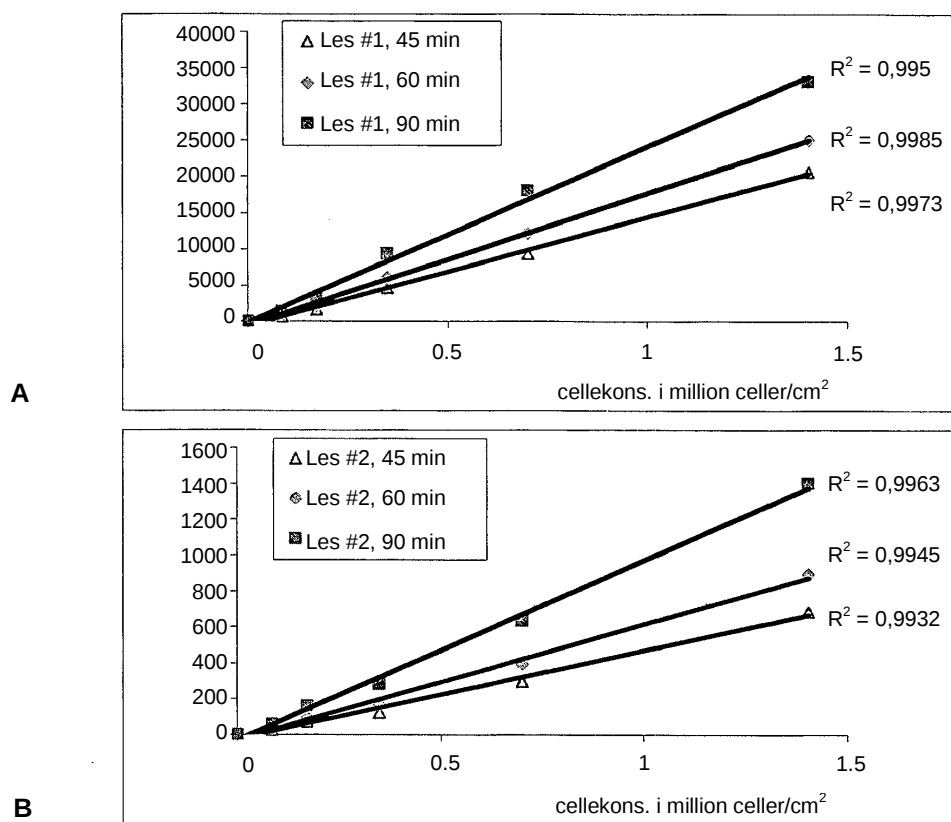
29. Fremgangsmåten ifølge krav 28, hvor i den celledødstabile enzymaktiviteten omfatter en eller flere tripeptidylpeptidaser.

30. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2, 3, 7 eller 8, hvori den celledødstabile enzymaktiviteten er både en nekrotisk og programmert celledødstabil enzymaktivitet.

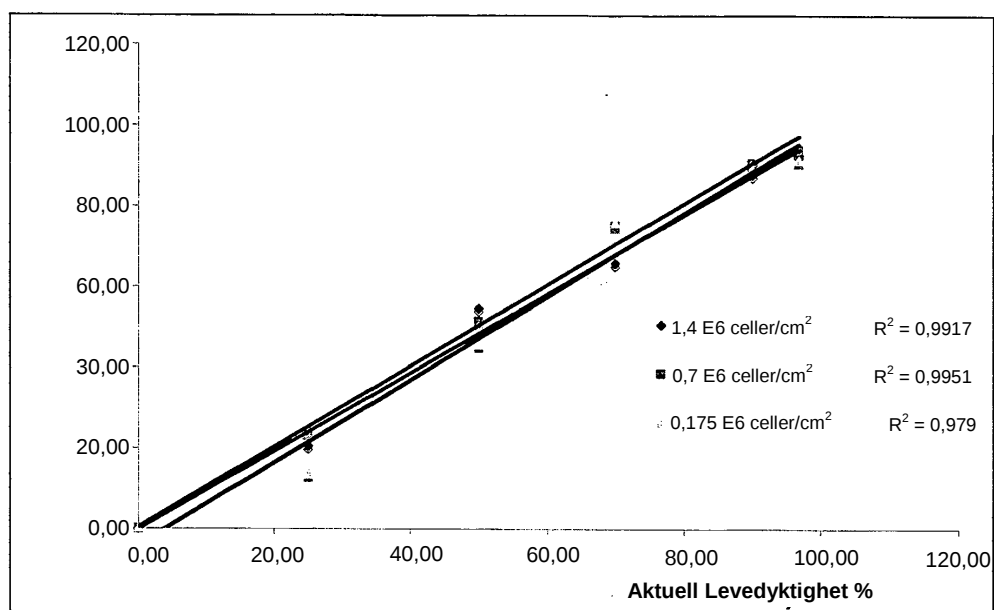
5 **31.** Fremgangsmåten ifølge krav 30, hvori den celledødstabile enzymaktiviteten er en programmert celledødstabil enzymaktivitet.

32. Fremgangsmåten ifølge krav 30, hvori den celledødstabile enzymaktiviteten er en nekrotisk stabil enzymaktivitet.

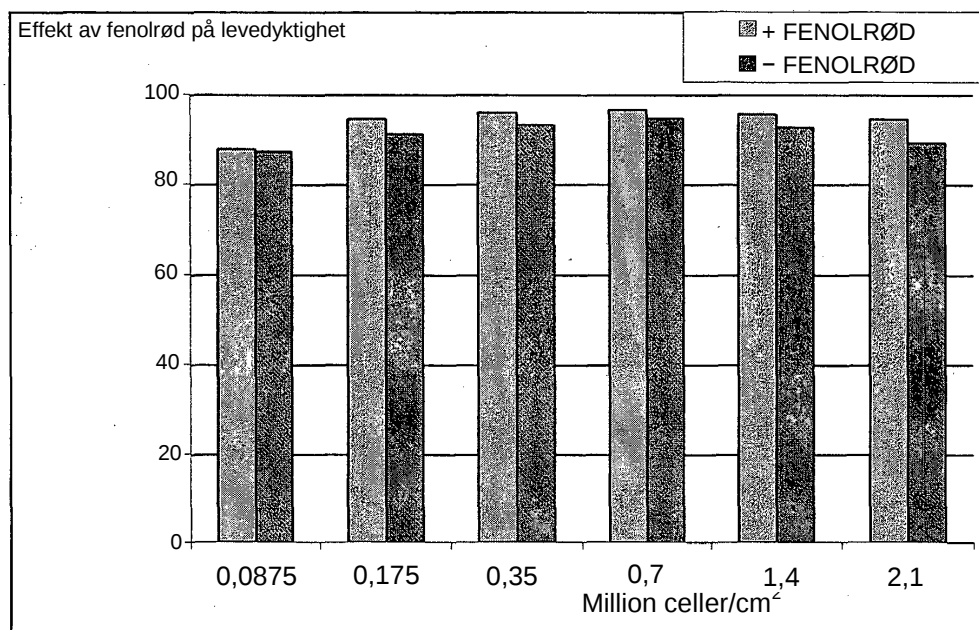
Tegning**Fig. 1**

**Fig. 2**

5

**Fig. 3**

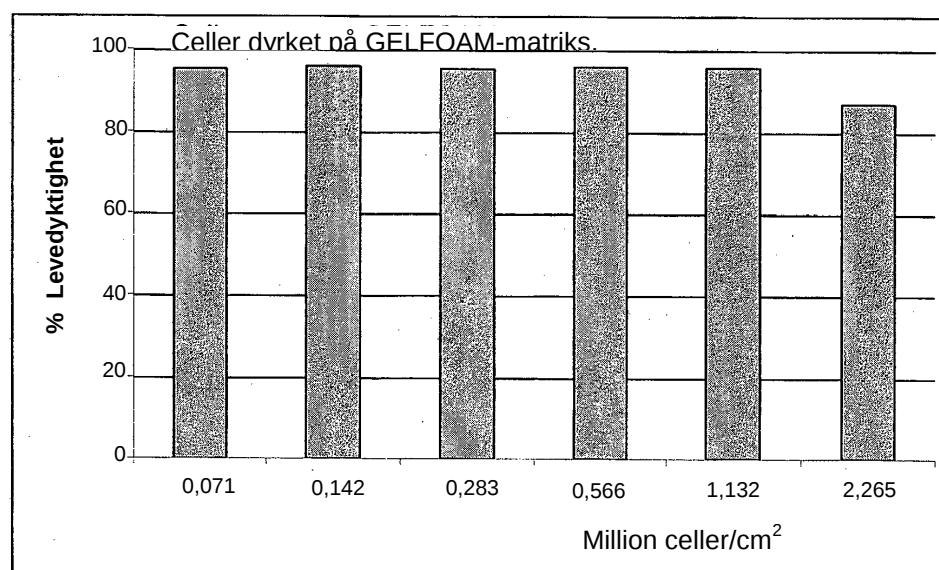
10

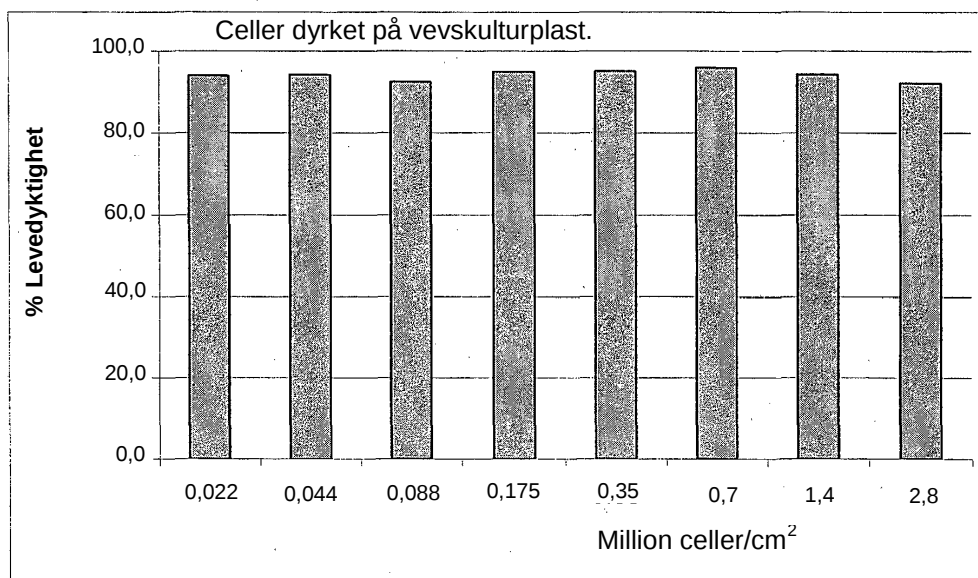


15

20

Fig. 4

**Fig. 5**



10

Fig. 6

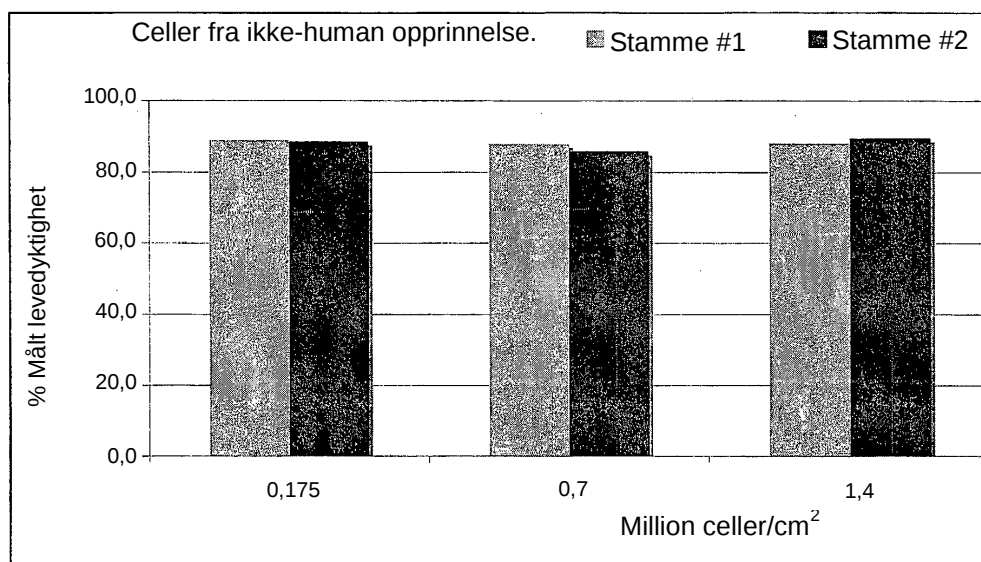
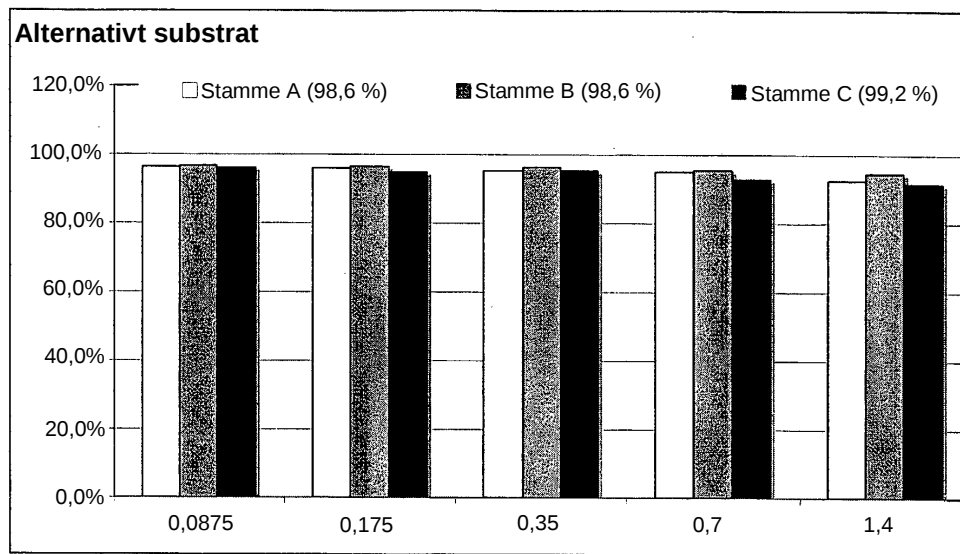


Fig. 7

**Fig. 8**