



(51) МПК  
*A61K 9/50* (2006.01)  
*A61K 35/12* (2006.01)  
*A61K 47/32* (2006.01)  
*C12N 11/04* (2006.01)  
*B01J 13/02* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2005113684/15, 14.10.2003

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
14.10.2003

(30) Конвенционный приоритет:  
11.10.2002 US 60/419,015

(43) Дата публикации заявки: 20.01.2006

(45) Опубликовано: 10.12.2008 Бюл. № 34

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 5834274 A, 10.11.1998. US 6258870 B1, 10.07.2001. US 5834559 A, 10.11.1998.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:  
11.05.2005

(86) Заявка РСТ:  
US 03/32842 (14.10.2003)

(87) Публикация РСТ:  
WO 2004/032881 (22.04.2004)

Адрес для переписки:  
190068, Санкт-Петербург, ул. Садовая, 51,  
офис 303, "Патентика", пат.пov. М.И.Ниловой,  
рег.№ 378

(72) Автор(ы):  
ШАРП Дэвид (US),  
ЛАТТА Пол (US),  
Ю Ксиаожие (US),  
ЮЕ Ченгьюн (US),  
ХАББЕЛ Джэффри (US)

(73) Патентообладатель(и):  
НОВОСЕЛЛ, Инк (US)

R U 2 3 4 0 3 3 0 C 2  
R U 2 3 4 0 3 3 0 C 2  
R U 2 3 4 0 3 3 0 C 2  
R U 2 3 4 0 3 3 0 C 2

## (54) ИМПЛАНТАЦИЯ ИНКАПСУЛИРОВАННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области лекарственных средств, в частности к составам и способам лечения заболевания, в частности диабета, путем имплантации инкапсулирующих устройств, содержащих покрытие и клетки, при этом плотность клеток составляет по меньшей мере 100000 клеток/мл, а покрытие содержит акрилатный полиэтиленгликоль (PEG) высокой

плотности с молекулярной массой от 900 до 3000 дальтон, а также сульфонированный сомономер. Кроме того, изобретение относится к способу получения указанного состава. Технический результат заключается в минимизации тканевого ответа, увеличению концентрации клеток и увеличению времени жизнеспособности клеток в указанных устройствах. 5 н. и 78 з.п. ф-лы, 34 ил., 8 табл.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

## (12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2005113684/15, 14.10.2003

(24) Effective date for property rights: 14.10.2003

(30) Priority:  
11.10.2002 US 60/419,015

(43) Application published: 20.01.2006

(45) Date of publication: 10.12.2008 Bull. 34

(85) Commencement of national phase: 11.05.2005

(86) PCT application:  
US 03/32842 (14.10.2003)(87) PCT publication:  
WO 2004/032881 (22.04.2004)

Mail address:  
190068, Sankt-Peterburg, ul. Sadovaja, 51,  
ofis 303, "Patentika", pat.pov. M.I.Nilovoj, reg.№ 378

(51) Int. Cl.  
*A61K 9/50* (2006.01)  
*A61K 35/12* (2006.01)  
*A61K 47/32* (2006.01)  
*C12N 11/04* (2006.01)  
*B01J 13/02* (2006.01)

(72) Inventor(s):  
ShARP Dehvid (US),  
LATTA Pol (US),  
Ju Ksiaozhie (US),  
JuE Cheng'jun (US),  
KhABEL Dzheffri (US)

(73) Proprietor(s):  
NOVOSELL, Ink (US)

R U  
2 3 4 0 3 3 0 C 2

## (54) IMPLANTATION OF BAGGED BIOLOGICAL MATERIALS FOR TREATMENT OF DISEASES

(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmacology.

SUBSTANCE: carrying out of treatment of disease, in particular, diabetes, by implantation of the encapsulated devices containing a covering and cells, thus density of cells makes 100000 cells/ml, and the covering contains acrylate polyethylene alcohol (PEG) high density with

molecular mass from 900 to 3000 Dalton, and also a sulfonated comonomer.

EFFECT: minimisation of the tissue response, augmentation of concentration of cells and augmentation of time of viability of cells in the specified devices.

83 cl, 33 dwg, 8 tbl, 20 ex

C 2  
C 0 3 0 3 4 0 2 3 2 R U

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Настоящая патентная заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке США № 60/419,015, зарегистрированной 11 октября 2002 г. и полностью 5 приведенной здесь в качестве ссылки.

10 Данное изобретение относится к составам и способам лечения заболевания, в частности, диабета, путем имплантации инкапсулированного биологического материала пациенту, который нуждается в лечении.

Сахарный диабет представляет собой болезнь, которую вызывает потеря 15 способности транспортирования глюкозы в клетки организма вследствие недостатка образования инсулина или уменьшения инсулиновой реакции. У здорового человека небольшие повышения содержания глюкозы в крови стимулируют образование и 20 выделение инсулина, роль которого заключается в увеличении поглощения глюкозы в клетках, возвращая содержание глюкозы в крови к оптимальному уровню. Инсулин стимулирует поглощение глюкозы из крови клетками печени и скелетных мышц и 25 превращения ее в гликоген - молекулу, аккумулирующую энергию. Он также способствует поглощению волокнами скелетных мышц аминокислот из крови и 30 превращению их в белок, который действует на адипозные (жировые) клетки, стимулируя синтез жира. В случае диабета глюкоза насыщает кровоток, но не может 35 транспортироваться в клетки, где она необходима для использования. В результате клетки организма истощаются от недостатка энергии, что объясняет нездоровое похудание многих пациентов с плохо контролируемым инсулинозависимым диабетом.

Перед открытием инсулина и его применением для лечения диабета 35 единственным способом лечения было голодание, за которым следовала прогнозируемая смерть. В настоящее время при лечении инсулином смертельные случаи все-таки имеют место в результате передозировки инсулина, которая приводит к 40 экстремальной гипогликемии и коме с последующей смертью, если пациенту быстро не ввести глюкозу. Смерть наступает также в случае существенно недостаточной дозировки, вызывающей гипогликемию и кетоацидоз, которые могут привести к коме и 45 смерти при отсутствии адекватных экстренных лечебных мер.

45

50

Благодаря современным способам лечения больных диабетом, это заболевание больше не является смертельным, однако, ни один из стандартных способов лечения не может заменить ежеминутную выработку инсулина и точное регулирование метаболизма глюкозы, которые осуществляют организм. Поэтому среднее содержание глюкозы в крови больных диабетом остается слишком высоким. Хроническое увеличение содержания глюкозы вызывает ряд длительных осложнений. Диабет является основной причиной приобретенной слепоты, почечной недостаточности, преждевременного развития порока сердца или инсульта, гангрены и ампутации, а также импотенции. Он уменьшает общую среднюю продолжительность жизни пациента на десять-двадцать лет.

Сахарный диабет представляет собой одно из наиболее широко распространенных в мире хронических заболеваний. В США диабетом страдают примерно 16 миллионов человек – более 12% взрослого населения старше 45 лет. Количество новых случаев заболевания возрастает примерно на 150 000 в год. Кроме указанных клинических больных диабетом примерно 20 миллионов человек имеют симптомы аномальной толерантности к глюкозе. Эти люди находятся на границе заболевания диабетом и занимают промежуточную позицию между здоровыми и однозначно больными диабетом. У многих из них со временем развивается диабет, и по некоторым оценкам потенциальное количество больных диабетом составляет до 36 миллионов или 25-30% взрослого населения старше 45 лет.

Диабет и его осложнения оказывают большое социально-экономическое влияние на современное общество. Примерно из 700 миллиардов долларов, которые США в настоящее время расходуют на здравоохранение, около 100 миллиардов затрачивается на лечение диабета и его осложнений. Поскольку количество заболеваний диабетом увеличивается, доля расходов на лечение диабета в общем бюджете здравоохранения будет постоянно возрастать, если не принять оперативных мер для изменения ситуации. Диабет наносит огромные медицинские, эмоциональные и финансовые потери, а число людей, страдающих диабетом, возрастает.

Сахарный диабет можно разделить на два различных типа: диабет типа 1 и диабет типа 2. Диабет типа 1 характеризуется наличием небольшой циркуляции или отсутствием циркуляции инсулина и обычно возникает у детей или подростков. Для диабета типа 1 существует генетическое предрасположение. Оно связано с разрушением бета-клеток, в инсулиновырабатывающих островках Лангерганса,

которые расположены в поджелудочной железе, представляющей собой удлиненную железу и проходящей в поперечном направлении за желудком. Бета-клетки являются объектом воздействия аутоиммунной реакции, которую вызывает неустановленный до настоящего времени фактор окружающей среды. Возможно, вирусная инфекция или неинфекционный агент (токсин или пища) заставляют иммунную систему реагировать и разрушать бета-клетки пациента в поджелудочной железе. Считается, что патогенная последовательность событий, приводящих к возникновению диабета типа 1, состоит из нескольких этапов. Во-первых, как предполагают, генетическая восприимчивость является основополагающей предпосылкой для инициирования патогенного процесса. Во-вторых, поражающий фактор из окружающей среды, связанный с вирусом или неинфекциональным патогеном, содержащимся в пище, инициирует третий этап – воспалительную реакцию в панкреатических островках (инсулитах). Четвертым этапом является такое изменение или трансформация бета-клеток, при которых иммунная система не распознает их в качестве "своих", а скорее видит их "чужими" или инородными клетками. И последний этап заключается в развитии резко выраженной иммунной реакции, направленной против "целевых" бета-клеток. В процессе этой реакции клеточные иммунные механизмы взаимодействуют с цитотоксическими антителами, разрушая бета-клетки, вырабатывающие инсулин. Несмотря на такую иммунную атаку, в течение некоторого периода времени образование новых бета-клеток является достаточно стабильным, чтобы препятствовать разрушению иммунной системы. При этом количество присутствующих бета-клеток достаточно, чтобы регулировать содержание глюкозы в крови. Однако постепенно количество бета-клеток сокращается. Когда их число падает до критического уровня (10% от нормы) регулирование содержания глюкозы в крови становится невозможным, и переход к полной неспособности выработки инсулина становится почти неизбежным. Предполагают, что регенерация бета-клеток продолжается в течение нескольких лет даже после прекращения выработки функционального инсулина, однако, клетки разрушаются при достижении зрелости.

Для снижения восприимчивости к острым и хроническим осложнениям диабета пациентам, страдающим диабетом типа 1, необходимо ежедневно вводить многократные инъекции инсулина и несколько раз в день проверять содержание сахара в их крови, прокалывая пальцы для анализа крови. Затем им необходимо принять решение, какое количество инсулина следует ввести в зависимости от принятой пищи, уровня физической активности, величины напряжения и наличия каких-либо

заболеваний в течение ближайших нескольких часов. Многократные ежедневные инъекции инсулина неадекватно имитируют ежеминутную выработку инсулина и точное регулирование метаболизма глюкозы, осуществляемые организмом.

5 Содержание инсулина в крови обычно превышает нормальный уровень, что вызывает осложнения, включающие слепоту, сердечные приступы, почечную недостаточность, инсульт, нервные нарушения и ампутации. Даже при лечении инсулином средняя

10 продолжительность жизни больного диабетом на 15-20 лет меньше, чем здорового человека.

Диабет типа 2 обычно появляется в среднем или пожилом возрасте и особенно поражает лиц с избыточным весом. Однако в течение последних нескольких лет резко выросло количество заболеваний диабетом типа 2 среди молодежи. За последние несколько лет возраст заболевания диабетом среди лиц, страдающих ожирением, 15 снизился с 40 до 30 лет. Они – новые молодые жертвы этой болезни. В случае диабета типа 2 клетки организма, которые обычно требуют инсулина, теряют свою чувствительность и перестают normally реагировать на инсулин. Такую инсулиновую 20 резистентность можно преодолевать в течение многих за счет дополнительной выработки инсулина бета-клетками поджелудочной железы. Однако в конечном счете бета-клетки постепенно истощаются, поскольку им приходится вырабатывать 25 избыточный инсулин в больших количествах из-за повышенного содержания глюкозы в крови. В результате бета-клетки умирают от перегрузки, а секреция инсулина снижается, что сопровождается повышением содержания глюкозы в крови до такого 30 уровня, который можно регулировать только инъекциями экзогенного инсулина. Диабету типа 2 обычно сопутствуют высокое кровяное давление и аномальное 35 содержание холестерина. Эти факторы вместе с высоким содержанием сахара в крови увеличивают опасность сердечного приступа, инсульта и блокирования 40 кровообращения в нижних конечностях, приводящего к ампутации. Лекарства для лечения диабета типа 2 включают некоторые препараты, которые снижают поглощение 45 глюкозы из кишечника или выработку глюкозы печенью, другие препараты, снижающие выработку дополнительной глюкозы печенью и мышечными клетками, а также препараты, которые непосредственно стимулируют бета-клетки вырабатывать 50 больше инсулина. Однако высокое содержание глюкозы является токсичным для бета-клеток, вызывая прогрессирующее угасание функциональности и смерть клеток. Вследствие этого многие пациенты, страдающие диабетом типа 2, нуждаются во введении экзогенного инсулина.

Другую форму диабета называют диабетом взрослого типа у молодежи (Maturity Onset Diabetes of the Young, MODY). Эта форма диабета связана с одним из нескольких дефектов инсулиновырабатывающих клеток, который ограничивает способность этих 5 клеток перерабатывать глюкозу, поступающую через специальные глюкозные рецепторы. Бета-клетки пациентов, страдающих MODY, не могут адекватно вырабатывать инсулин в ответ на поступление глюкозы, что приводит к 10 гипергликемии. Лечение таких пациентов в конечном итоге приходит к необходимости инсулиновых инъекций.

Современные методы лечения инсулиновозависимого диабета ограничены 15 введением инсулина и трансплантацией всей поджелудочной железы или ее сегментов.

Инсулинотерапия имеет гораздо большее распространение, чем трансплантация поджелудочной железы. Введение инсулина обычно осуществляют на основании 20 нескольких измерений содержания глюкозы в крови и с помощью под кожных инъекций, интенсивно – на основании большого количества измерений содержания глюкозы в крови и с помощью многократных под кожных инъекций инсулина или 25 путем непрерывных под кожных инъекций инсулина с помощью насоса. Обычная инсулинотерапия включает введение одной или двух инъекций в сутки инсулина среднего действия с добавлением или без добавления небольшого количества 30 регулярного инсулина. Интенсивная инсулинотерапия включает многократное введение инсулина среднего или длительного действия в течение дня вместе с регулярным инсулином или инсулином короткого действия перед каждым приемом пищи. Непрерывную под кожную инфузию инсулина осуществляют с помощью 35 миниатюрного насоса с приводом от батареи, который вводит инсулин под кожно к брюшной стенке обычно через иглу номер 27 с дроссельной заслонкой. Такой режим 40 лечения обеспечивает непрерывное круглосуточное введение инсулина с базовой скоростью и программируемым увеличением скорости перед приемами пищи. В каждом из этих методов от пациента требуется частое проведение контроля содержания 45 глюкозы в крови, а в случае необходимости – регулирование дозы инсулина. Однако регулирование содержания сахара в крови является не простой процедурой. Несмотря на тщательное внимание к правильному питанию, соблюдение режима и своевременное 50 введение соответствующей дозы инсулина, многие другие факторы могут оказывать отрицательное влияние на содержание сахара в крови пациента, включая стресс, гормональные изменения, периоды роста, болезни, инфекции и усталость. Пациенты,

страдающие диабетом типа 1, должны быть постоянно готовы к угрожающим жизни гипогликемической (низкое содержание сахара в крови) и гипергликемической (высокое содержание сахара в крови) реакциям. Инсулинозависимый диабет 5 представляет собой угрожающее жизни заболевание, которое требует постоянной бдительности.

Известно, что в отличие от введения инсулина трансплантация всей 10 поджелудочной железы или сегментов поджелудочной железы устраниет повышенное содержание глюкозы за счет регулирования выделения инсулина из новой поджелудочной железы у больных диабетом. Гистологически поджелудочная железа 15 состоит из трех типов функциональных клеток: а) экзокринные клетки, которые выделяют свои ферменты в малый проток, б) дуктальные клетки, которые переносят ферменты в кишечник и в) эндокринные клетки, которые выделяют свои гормоны в 20 кровоток. Экзокринная часть образует многочисленные мелкие железы (гроздевидные железы), содержащие столбчатые и пирамидальные эпителиальные клетки, известные как ацинарные клетки. Ацинарные клетки содержат примерно 80% панкреатических 25 клеток и выделяют в систему протоков поджелудочной железы дигестивные ферменты, в частности, амилазы, липазы, фосфолипазы, трипсин, химотрипсин, аминопептидазы, элактазу и различные другие белки. Примерно от 1,5 до 3 литров щелочной жидкости в день выделяется в общий желчный проток, чтобы способствовать пищеварению.

Система протоков поджелудочной железы содержит сложную разветвленную 30 сеть взаимосвязанных протоков, которых проходят через все секреторные ацинусы, собираются в постепенно увеличивающиеся протоки и, наконец, впадают в главный 35 панкреатический проток. Эпителий, покрывающий стенки системы панкреатических протоков, состоит из дуктальных клеток. Примерно 10% клеток поджелудочной железы составляют дуктальные клетки. Морфология дуктальных клеток изменяется от 40 кубических клеток в мелких ответвлениях, проходящих в серкторных ацинусах, до удлиненных столбчатых клеток, выделяющих слизь в главной проточной системе.

Островки, выделяющие гормоны, рассеяны в поджелудочной железе и выделяют 45 свои гормоны в кровоток, а не в протоки. Эти островки обильно васкуляризированы. Они составляют всего 1-2% поджелудочной железы, но получают примерно 10 – 15% панкреатического кровотока. Островки содержат три основных типа клеток, каждый из которых вырабатывает особый эндокринный продукт: альфа-клетки секретируют 50 гормон глюкагон (выделение глюкозы), бета-клетки вырабатывают инсулин

(потребление и хранение глюкозы) и составляют основную часть островковых клеток, а дельта-клетки секретируют гормон соматостатин (ингибитирует выделение других гормонов). Эти типы клеток упорядоченно распределяются в островке. Бета-клетки располагаются в центральной части островка, окруженные наружным слоем альфа- и дельта-клеток. Кроме инсулина, глюкагона и соматостатина определены такие продукты клеток панкреатических островков, как гастрин и вазоактивный пептид кишечника (Vasoactive Intestinal Peptide, VIP).

Трансплантацию поджелудочной железы обычно выполняют только в тех случаях, когда требуется трансплантация почки, поэтому операция отдельной трансплантации поджелудочной железы является относительно редкой. Трансплантаты поджелудочной железы весьма успешно помогают пациентам, страдающим инсулиновозависимым диабетом, регулировать содержание сахара в крови без инсулиновых инъекций и ослабляют их продолжительные осложнения, однако, существует ряд препятствий для всех трансплантатов поджелудочной железы. Наиболее важным из них является необходимость серьезной операции для трансплантации поджелудочной железы и пожизненное применение иммуносупрессивных препаратов для предотвращения разрушения поджелудочной железы иммунной системой организма. Без применения этих препаратов разрушение поджелудочной железы происходит в течение нескольких дней. Прием иммуносупрессивных препаратов представляет некоторую опасность, связанную с увеличением вероятности инфекций и опухолей, которые в свою очередь могут представлять собой угрозу для жизни. Таким образом, риск, связанный с оперативным вмешательством, необходимость пожизненного подавления иммунитета пациента для предотвращения отторжения трансплантата, а также повышение процента заболеваемости и смертности, связанных с инвазивной процедурой, представляют собой серьезные затруднения для полной трансплантации поджелудочной железы с целью лечения диабета. Поэтому альтернатива инсулиновым инъекциям или трансплантации поджелудочной железы удовлетворила бы большую потребность здравоохранения.

Процедура трансплантации островковых клеток (панкреатических островков) является гораздо более простой (и безопасной), чем полная трансплантация поджелудочной железы, и способной обеспечить такой же эффект за счет замены разрушенных бета-клеток. Как указано выше, диабет возникает вследствие

недостаточного количества бета-клеток или недостаточной секреции инсулина, независимо от причины такой недостаточности. Воспроизведение островковых бета-клеток у пациентов, страдающих диабетом, в количестве, достаточном для восстановления нормальной глюкозозависимой выработки инсулина, решает проблемы, связанные как с инсулиновыми инъекциями, так и с трансплантацией важного органа. Микроинкаapsulation и имплантация островковых клеток пациентам, страдающим диабетом, является перспективным методом лечения этого заболевания.

Капсулирование клеток для лечения ряда заболеваний и нарушений описано в литературе. Эта концепция была предложена еще 100 лет назад, однако, лишь небольшие работы были проведены до 1950 г., когда иммунологи начали применять инкаapsулированные клетки с мембранными устройствами для отделения клеток от организма хозяина, чтобы лучше изучить различные аспекты иммунной системы. Исследование имплантации проходило в 1970-е и 1980-е годы, а первый обзор был написан в 1984 г. С тех пор появились новые работы, раскрывающие различные подходы и типы разработанных устройств. Технология инкаapsулирования клеток имеет потенциальные возможности применения во многих областях медицины. В частности, некоторыми из важных потенциальных применений являются лечение диабета (Goosen, M. F. A. et al. (1985) Biotechnology and Bioengineering, 27:146), получение биологически важных химикатов (Omata, T., et al. (1979) "Transformation of steroids by Gel-Entrapped Nocardia rhodocrous Cells in Organic Solvent" Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 8:143-155) и исследование анти-ВИЧ препаратов (McMahon, J., et al. (1990) J. Nat. Cancer Inst., 82(22) 1761-1765).

Существует три основных типа инкаapsулирующих устройств, которые лучше всего классифицировать по форме инкаapsуляции. Эти три категории представляют собой а) макроустройства, б) микрокапсулы и в) конформные покрытия.

Макроустройства являются относительно крупными устройствами, которые содержат мембранны в форме листов или трубок, обладающих селективной проницаемостью, и обычно – опорные элементы. Такие устройства состоят из одной или нескольких камер, в которых содержатся инкаapsулированные клетки. Такие устройства предназначены для имплантации в экстраваскулярные или васкулярные сайты. Некоторые из них предназначены для врастания в организм хозяина с целью увеличения диффузии кислорода в эти крупные устройства. Другие не вызывают

реакции со стороны организма хозяина, что повышает простоту их удаления из различных сайтов. Разработаны два основных типа макроустройств: а) плоский лист и б) полое волокно.

Один из типов таких устройств представляет собой плоское листовое устройство (Baxter, Theracyte), состоящее из нескольких слоев для обеспечения прочности и содержит диффузионные мембранны, расположенные между опорными элементами с загрузочными отверстиями для замены клеток. Другой тип устройства имеет более простую конструкцию. В таком устройстве используют мембранны на альгинатной основе, а также другие мембранны, которые служат в качестве поддерживающих для инкапсуляции островковых клеток в альгинатной матрице между листами. Сложное устройство предназначено для врастания в организм с целью увеличения диффузии кислорода. В организме имеется всего несколько сайтов, в которые может быть помещено такое устройство относительно крупного размера для лечения заболевания, в частности, диабета. Поскольку оно врастает в организм, а предполагаемый срок жизни содержащихся клеток составляет не более нескольких лет, для длительной эксплуатации устройства требуется многократное удаление клеток и загрузка новых клеток. Извлечение и повторное введение устройства такого типа при одновременном поддержании критического расстояния для камеры с клетками с целью обеспечения диффузии кислорода, оказалось слишком сложным.

Второй вариант устройства листового типа представляет собой устройство, работающее по схеме "полного ввода/полного вывода" с незначительным взаимодействием с организмом хозяина. Установка такого устройства для лечения диабета во внутрибрюшинной полости крупных животных при сохранении его целостности также оказалась слишком сложной. Это связано с трудностью закрепления устройства в брюшной полости таким образом, чтобы кишечник не вызывал его перемещения или деформаций, способных повредить или разрушить устройство.

Другой основной тип макроустройства представляет собой полое волокно, выполненное способом экструзии термопластичных материалов в форме полых волокон. Такие полые волокна могут быть выполнены достаточно больших размеров для их использования в качестве кровеносных каналов. Одна из моделей устройства предназначена для закрепления в крупных кровеносных сосудах в организме хозяина, при этом инкапсулированные клетки размещают внутри устройства за селективно проницаемой мембраной. Такой тип устройства оказался эффективным в

экспериментах при лечении диабета у крупных животных, однако, вызвал проблемы с установкой в васкулярном сайте. Тромбоз и геморрагия осложняют дальнейшее развитие этого подхода, и в настоящее время разработка такого клинического продукта 5 прекращена. Другая модель, в которой используют полые волокна, имеет гораздо меньший диаметр и предназначена для применения в качестве экстраваскулярного устройства. Вследствие низкой плотности упаковки необходимая масса клеток для 10 инкапсуляции требует наличия полости многометровой длины. Поэтому разработки в этом направлении также были прекращены вследствие клинической нецелесообразности. Кроме того, определенные трудности вызывает герметизация 15 открытых концов волокна, а также возникает проблема прочности, зависимой от экстраваскулярного сайта.

Микрокапсула была одним из первых устройств, обладающих потенциальной 20 клинической эффективностью. Альгинатные микрокапсулы использовали для инкапсулирования островковых клеток, что позволяло излечивать диабет у грызунов при внутрибрюшинной имплантации. Однако после первых сообщений прошло около 25 лет, в течение которых не удалось продемонстрировать клиническую 25 эффективность. Одна из проблем, связанных с микрокапсулами, заключается в их относительно большом размере в сочетании с низким содержанием клеток, в особенности – для лечения диабета. Другая проблема состоит в применении альгината: 30 степень сшивки гидрогеля с ионными поперечными связями зависит от концентрации кальция. Селективную проницаемость чисто альгинатных капсул, как правило, трудно регулировать из-за широких пределов молекулярной массы. Для обеспечения 35 селективной проницаемости капсул в качестве второго покрытия добавляли различные положительно заряженные сшитые агенты, в частности, полилизин. Однако полилизин, как и большинство других аналогичных молекул, вызывает воспалительную реакцию, 40 которая требует дополнительного, третьего покрытия альгинатом, чтобы уменьшить реакцию организма хозяина на капсулу. Кроме того, весьма сложно получить очень чистые альгинаты, которые не вызывали бы реакции после трансплантации в организм 45 хозяина. Попытки уменьшить размер альгинатных микрокапсул связаны с двумя основными проблемами. Во-первых, образование очень большого количества пустых капсул, не содержащих клеток. Во-вторых, применение капсул уменьшенного размера приводит к низкому качеству покрытия клеток. Нет силы, способной удержать 50 помещенные клетки в центре микрокапсул, что вызывает опасность ухудшения

степени покрытия экспоненциально при уменьшении размера капсул. О нанесении обволакивающих покрытий на альгинатные микрокапсулы ранее не сообщалось.

И, наконец, последней категорией средств инкапсулирования клеток является 5 конформное покрытие, или оболочка. Клеточный агрегат с конформным покрытием имеет практически равномерное покрытие клеток независимо от размера или формы агрегата. Это покрытие может быть равномерным не только по толщине, но и по 10 характеру защитной селективной проницаемости покрытия, которое обеспечивает равномерную иммунную защиту. Кроме того, оно может быть равномерным по прочности и стойкости, что предотвращает разрушение материала покрытия иммунной 15 системой организма хозяина.

Важным фактором для реализации указанных различных способов является 20 соответствующий размер и сайт имплантации для обеспечения физиологического результата в 15 000 IEQ (islet equivalents, островковые эквиваленты)/кг массы тела. Инъекция выделенных островков в воротную вену требует 2-3 мл капсулированных 25 клеток. Макроустройство, содержащее плоский лист толщиной в 1 островок (около 500 мкм), требует наличия поверхности, имеющей площадь, эквивалентную двум банкнотам долларов США. Макроустройство, содержащее полые волокна с плотностью заполнения 5%, потребовало бы 30 метров волокна. Для альгинатных капсул со 30 средним диаметром 400-600 мкм необходим объем 50-170 мл. При этом для конформного покрытия островков PEG (полиэтиленгликолем) толщиной 25-50 мкм потребовался бы объем всего 6-12 мл, и имелась бы возможность для инъекции почти в любой участок тела.

Строгие требования к инкапсулирующим полимерам для обеспечения 35 биосовместимости, химической стойкости, иммунной защиты и сопротивления чрезмерному росту клеток накладывают ограничения на известные способы 40 инкапсуляции клеток и применение ряда биологических материалов. Процесс получения оболочек должен быть нетоксичным, поскольку он должен происходить в присутствии клеток, при этом оболочки должны обладать селективной 45 проницаемостью, химической устойчивостью и очень высокой биосовместимостью.

Синтетические или природные материалы, предназначенные для использования 50 при воздействии биологических жидкостей или тканей, широко известны как биоматериалы. Такие биоматериалы считаются биосовместимыми, если они вызывают минимальную реакцию организма или вообще не вызывают реакции. Для многих

областей применения биоматериалов желательно минимизировать взаимодействие между физиологической средой и материалом. В этих случаях материал считают биосовместимым, если после имплантации на его поверхности происходит 5 минимальный рост клеток, минимальная воспалительная реакция и во время использования отсутствуют признаки анафилаксии. Таким образом, материал не должен вызывать специфической гуморальной или клеточной иммунной реакции, а 10 также неспецифической реакции на инородное тело.

Материалы, которые не вызывают ни одной из вышеуказанных реакций, являются довольно редкими. Биосовместимость является в большей степени 15 относительной, чем абсолютной величиной. В первую очередь на границе раздела имплантанта и окружающих биологических жидкостей наблюдается адсорбция белков (Andrade, J. D. et al. (1986) V. Adv. Polym. Sci., 79:1-63). Если материал имеет природное происхождение, то вполне вероятно, что механизм иммунной защиты 20 организма хозяина имеет в своем наборе антитела, специфические для данного материала. В этом случае может возникнуть сильная иммунная реакция. Однако большинство синтетических материалов не вызывают такой реакции. Они могут 25 активировать каскад комплементов и/или адсорбировать сывороточные белки, в частности, молекулы неспецифической адгезии клеток (cell adhesion molecules, CAMs), которые медирируют адгезию клеток (Buck, C. A. et al. (1987) Ann. Rev. Cell Biol., 3:179- 30 205).

Белки могут адсорбироваться материалом практически любого типа. Они содержат участки, которые имеют положительный и/или отрицательный заряд, а также 35 гидрофильные или гидрофобные участки. Поэтому они могут взаимодействовать с имплантированным материалом посредством указанных различных участков, что приводит к пролиферации клеток на поверхности имплантата. Фрагменты 40 комплементов, в частности, С3b, могут быть иммобилизованы на поверхности имплантата и могут действовать в качестве хемоаттрактантов. Они в свою очередь могут активировать воспалительные клетки, в частности, макрофаги и нейтрофины, и вызывать их сцепление и активацию на имплантате. Эти клетки стараются разрушить и 45 переработать инородный материал.

Если имплантат не разлагается и слишком велик для переработки большими 50 одиночными активированными макрофагами, воспалительные клетки могут подвергнуться рассогласованному фагоцитозу. При этом может происходить

объединение некоторых таких клеток и образование гигантских клеток инородного тела. В этом процессе указанные клетки выделяют перекиси, гидролитические ферменты, а также хемоаттрактант и анафилактические агенты, в частности, интерлейкины, которые увеличивают интенсивность реакции. Они вызывают также пролиферацию фибропластов на инородных поверхностях.

В прошлом подходы к повышению биосовместимости материалов начинали с попыток минимизировать межфазное напряжение между материалом и окружающей его водной средой. Предполагали, что минимизация напряжения между твердой и жидкой фазами минимизирует движущую силу адсорбции белков и приводит к уменьшению адгезии клеток и тромбогенности поверхности. Так, например, Amudeshwari et al. использовали коллагеновые гели, спитые в присутствии НЕМА (гидроксиэтилметакрилат) и ММА (метилметакрилат) (Amudeshwari, S., et al. (1986) J. Biomed. Mater. Res. 20:1103-1109). Desai и Hubbell показали, что сополимер поли(НЕМА)-ММА является в некоторой степени нетромбогенным (Desai, N. P. et al. (1989) Polym. Materials Sci. Eng., 62:731).

Hubbell et al. (патент США 5,529,914 и родственные патенты US 5,834,274 от 10.11.1998 и US 6,258,870 от 10.07.2001) описали способы заключения биологических материалов в биосовместимые мембранны посредством фотополимеризации водорастворимых молекул. Все эти способы используют систему полимеризации, содержащую водорастворимые макромеры, полимеризацию с помощью фотоинициатора (в частности, красителя) и излучение в форме видимого или длинноволнового ультрафиолетового света.

В патенте US 5,834,274 описано полимерное покрытие, образующееся на поверхности ткани млекопитающего в результате протекания реакции свободнорадикальной фотополимеризации биосовместимого водорастворимого макромера. При этом согласно одному из вариантов реализации изобретения водорастворимый макромер представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ). В патенте US 5,834,274 предложены также полимерные оболочки, содержащие биологически активные материалы, такие как протеины, пептиды, ткани, клетки и др. В указанных патентах отсутствуют данные о функционировании клеток после капсулирования.

В патенте US 6,258,870 предложен способ инкапсулирования биологического материала, представляющего собой ткань или клетку, включающий стадии смешения биологического материала с водным раствором макромера, содержащим светочувствительный краситель, приготовления малых геометрических форм из указанной смеси и полимеризации макромера путем облучения полученных форм светом с определенной длиной волны.

Однако ни одна из разработанных ранее технологий инкапсулирования не привела к созданию клинического продукта вследствие неспособности специалистов

обеспечить то или иное свойство, важное для успешного инкапсулирования клеток. Эти свойства можно разделить на следующие категории.

Биосовместимость – материалы, используемые для изготовления инкапсулирующего устройства, не должны инициировать реакций организма хозяина, которые могут вызывать неспецифическую активацию иммунной системы только этими материалами. При выборе способа иммунной изоляции необходимо учитывать, что она будет работать только при условии отсутствия активации иммунных клеток организма хозяина соответствующими материалами. Если эти материалы будут вызывать активацию иммунных клеток организма хозяина, то реагирующие иммунные клетки будут окружать устройство и пытаться разрушить его. Этот процесс приводит к выработке большого количества цитокинов, которые будут непременно диффундировать сквозь капсулу и по всей вероятности разрушат инкапсулированные клетки. Большинство устройств, испытанных до настоящего времени, подвергалось частичным разрушениям вследствие недостаточной биологической совместимости с организмом хозяина.

Селективная проницаемость – существует важное равновесие между максимально возможным размером пор в капсule, окружающей инкапсулированные клетки, который обеспечивает прохождение сквозь капсулу всех питательных веществ и отходов для оптимального выживания и функционирования, и минимально возможным размером пор в капсule, который исключает приближение всех элементов иммунной системы к инкапсулированным клеткам и предотвращает их разрушение. Мелкие поры, не пропускающие иммунные цитокины, также вызывают смерть инкапсулированных клеток из-за недостаточной диффузии питательных элементов и отходов. Для оптимальной клеточной инкапсуляции требуется точная и стабильная селективная проницаемость, которая обеспечивает максимальное выживание и функционирование клеток, а также изоляцию от иммунной реакции организма хозяина. В идеальном случае технология инкапсулирования должна обеспечивать возможность выбора и изменения размера пор в зависимости от инкапсулированных клеток и их функций, а также варьирование размера пор в зависимости от того, являются ли клетки аллотрансплантатными или ксенотрансплантатными.

Жизнеспособность и функционирование инкапсулированных клеток – инкапсулирующие материалы не должны проявлять цитотоксичности по отношению к инкапсулированным клеткам при формировании покрытия или в процессе применения, в противном случае количество инкапсулированных клеток будет сокращаться, и возникнет опасность их недостаточности для терапевтически эффективного лечения заболевания или нарушения.

Соответствующий размер – многие устройства имеют настолько большой размер, что он ограничивает количество сайтов, доступных для практической имплантации в организм хозяина. Другим фактором является относительная

диффузионная длина между инкапсулированными клетками и организмом хозяина. Наиболее критичным диффузионным агентом для выживания клеток является кислород. Указанная диффузионная длина должна быть минимальной, поскольку исходное парциальное давление кислорода в тканях организма составляет 30-40 мм рт. ст. Возможно небольшое отклонение в сторону уменьшения диффузионной длины вследствие изначально низкого парциального давления кислорода. Это дополнительно снижает концентрацию кислорода до величины, при которой клетки не могут адекватно функционировать или выживать.

Восстановление или замена клеток – инкапсулирующее устройство должно быть восстанавливаемым, пригодным для многократного заполнения или биологически разрушаемым, и должно обеспечивать замену или пополнение клеток. Многие конструкции устройств не учитывали тот факт, что инкапсулированные клетки имеют ограниченную продолжительность жизни в организме хозяина и требуют регулярной замены.

Терапевтический эффект – имплантат должен содержать достаточное количество функциональных клеток, чтобы оказывать терапевтический эффект на протекание болезни в организме хозяина.

Клиническое соответствие – устройство для инкапсулирования клеток должно иметь общий объем или размер, который позволяет имплантировать его в наименее инвазивный или наиболее физиологичный сайт для выполнения функции, при соотношении между риском и выгодами, меньшем, чем в организме хозяина при текущем заболевании или нарушении.

Коммерческое соответствие - устройство для инкапсулирования клеток должно удовлетворять вышеуказанным требованиям, чтобы обеспечить его изготовление на основе существующей технологии для долгосрочного применения с целью лечения заболевания, для которого оно предназначено.

Все вышеуказанные факторы необходимо учитывать при оценке конкретной методики, способа или продукта для применения при имплантации островков с целью облегчения воздействия диабета.

Транспланацию островков человека с подавлением иммунитета производят путем введения неинкапсулированных островков в воротную вену с помощью прямой инъекции чрескожно между ребрами, в печень, а затем в воротную вену с флюороскопическим контролем направления. Практически все трансплантации островков человека выполняли этим способом за исключением самых первых, которые производили путем инъекции в пупочную вену с помощью веносекции. Основная опасность этой процедуры заключается в том, что инъекция островков в воротную вену приводит к повышению давления в воротной вене в зависимости от скорости инфузии

и вводимой дозы. Другая опасность состоит в повышении давления в воротной вене в результате введения большого объема островковых тканей, которые недостаточно очищены. Это приводит также к тромбозу воротной вены, который является осложнением данной процедуры. Когда рентгенохирург удаляет катетер, он оставляет желатиновый болюс для предотвращения кровотечения из места инъекции. К сожалению, после этой процедуры у некоторых пациентов имели место случаи 5 10 кровоизлияния.

Кроме инъекции островков в воротную вену некоторым пациентам вводили островки в тело селезенки. Селезенка является более хрупкой, чем печень, поэтому такие инъекции производили во время трансплантации почки, когда инъекции в 15 селезенку можно выполнить в форме открытой процедуры. Свободную инъекцию островков в брюшную полость проводили с мышными трансплантатами без всяких трудностей. При использовании этого сайта у более крупных животных и человека 20 установили, что для брюшной полости требуется в два раза большее количество островков, чем в случае имплантации через воротную вену. При возникновении отторжения или воспалительных реакций появляется тенденция к слипанию кишечных 25 петель и сальника. Реакция может создать дополнительные долгосрочные проблемы, в частности, кишечную непроходимость. Поэтому возможность введения инкапсулированных островковых трансплантатов в подкожный сайт позволила бы 30 существенно уменьшить осложнения, связанные с другими указанными сайтами.

Попытки подкожной имплантации инкапсулированных островков не дали стабильных результатов при лечении диабета, возможно, вследствие некоторых или 35 всех научных предпосылок, описанных выше. Tatarkiewicz et al. (Transplantation Proceedings 1998, 30, 479-480) описали подкожную трансплантацию мышам крысиных островков, заключенных в устройства, обеспечивающие диффузию в ткани. Kawakami et al. (Cell Transplantation 1997 6, 5:541-545) подкожно имплантировали крысам 40 панкреатические бета-клетки, инкапсулированные в агарозе-PSSa (полистиролсульфоновая кислота). После трансплантации сохранялась секреция инсулина из клеток. Однако при исследовании контролировали подкожную 45 имплантацию инкапсулированных островковых клеток только в течение одной недели. Подтверждения того, что секрецию инсулина клетками можно поддерживать в подкожном имплантате в течение длительного периода, отсутствуют. Kawakami et al. (Transplantation 2002, 73, 122-129) поместили крысиные островки в смешанный гель 50

агарозы/полистиролсульфоновой кислоты и имплантировали инкапсулированные клетки в предваскуляризированный подкожный сайт. Stockley et al. (J. Lab. Clin. Med. 135:484-492) инкапсулировали аллогенные клетки MDCK, сконструированные для секреции гормона роста человека, в альгинат-поли-L-лизин-альгинат и имплантировали их в подкожно. Можно считать, что диаметр капсулы с клетками, инкапсулированными Stockley et al., составлял около 1,5 мм, если принять, что объем применяемой капсулы равен 100 мкл, и этот объем не занимали другие компоненты кроме инкапсулированных клеток. Stockley не приводит информации о фактическом объеме применявшимся инкапсулированных клеток. Специалисту в данной области невозможно определить желательный объем инкапсулированных клеток, необходимых для введения субъекту.

### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторами настоящего изобретения предложен состав для клеточной терапии, который удовлетворяет требованиям к клинически приемлемому инкапсулированному клеточному материалу и обеспечивает улучшенные свойства по сравнению с ранее описанными способами инкапсулирования.

В одном из вариантов реализации настоящее изобретение обеспечивает состав для клеточной терапии, который включает инкапсулирующие устройства, содержащие покрытие из акрилатного полиэтиленгликоля (PEG) высокой плотности с молекулярной массой примерно от 900 до 3 000 Daltonov и сульфонированного со-мономера, и клетки, инкапсулированные в указанных инкапсулирующих устройствах, при этом клеточная плотность указанного состава составляет по меньшей мере около 100 000 клеток/мл. В предпочтительном варианте реализации инкапсулирующие устройства представляют собой микрокапсулы. В более предпочтительном варианте реализации микрокапсулы представляют собой клеточные агрегаты с конформным покрытием. Клеточные агрегаты предпочтительно представляют собой панкреатические островки с клеточной плотностью по меньшей мере около 6 000 000 клеток/мл.

Предложенный состав для клеточной терапии характеризуется повышенной эффективностью по сравнению с составами, раскрытыми в патенте US 5,529,914 и родственных патентах US 5,834,274 от 10.11.1998 и US 6,258,870 от 10.07.2001.

При работе над данным изобретением неожиданно было обнаружено, что акрилатный полиэтиленгликоль с молекулярным весом 900 - 3000 Dalton вызывает меньшую тканевую реакцию по сравнению с уже известными инкапсулирующими

материалами, а использование в качестве со-мономера ПЭГ и ускорителя полимеризации группы, содержащей сульфоновую кислоту, в еще большей степени увеличивает биосовместимость. Таким образом, при использовании состава для клеточной терапии согласно настоящему изобретению согласно п.1 формулы изобретения удалось достичь плотности клеток 100000 клеток/мл, при этом впервые экспериментально была подтверждена жизнеспособность и функционирование инкапсулированных клеток, и кроме того, продемонстрирована возможность инкапсулирования индивидуальных клеток.

Так же неожиданно было обнаружено, что применение мономеров акрилированного ПЭГ с молекулярной массой, находящейся в заявленном диапазоне, в сочетании с веществами, ускоряющими реакцию полимеризации, снижает тканевый ответ при использовании инкапсулирующих устройств с полимерным покрытием согласно настоящему изобретению.

Инкапсулирующие устройства, содержащиеся в терапевтически эффективном составе согласно настоящему изобретению, отличаются от предложенных в US 5,834,274 тем, что в инкапсулирующих устройствах согласно настоящему изобретению достигнуто уменьшенное соотношение объема (размера) инкапсулирующих устройств по отношению к количеству (объему) заключенного клеточного материала, обеспечивающее более высокую концентрацию клеток, что делает возможным применение более низких лечебных доз - менее 2 мл на килограмм массы тела пациента. Кроме того, в инкапсулирующих устройствах, предложенных в настоящем изобретении, клетки являются жизнеспособными в течение длительного периода времени, сохраняя свою функциональность, а сами устройства вызывают минимальную ответную реакцию организма-хозяина, что достигается за счет применения со-мономера, содержащего группу сульфоновой кислоты и ненасыщенную группу, ускоряющего свободнорадикальную реакцию и, тем самым, улучшающего биосовместимость инкапсулирующих устройств.

Способ инкапсулирования биологического материала, предложенный в настоящем изобретении, позволяет улучшить свойства инкапсулирующих устройств для клеточной терапии за счет применения конформного покрытия.

Кроме того, в ходе исследований было обнаружено, что состав для инкапсулирования, предложенный в настоящем изобретении, позволяет улучшить биосовместимость инкапсулирующих устройств путем ускорения свободнорадикальной реакции, которое достигается за счет с использования со-мономера, содержащего группу сульфоновой кислоты и ненасыщенную группу.

В предпочтительном варианте реализации клетка является неврологической, сердечно-сосудистой, печеночной, эндокринной, кожной, кроветворной, иммунной, нейросекреторной, метаболической, системной или генетической. Предпочтительно клетка является аутологической, аллогенной, ксеногенной или генетически

модифицированной. В наиболее предпочтительном варианте реализации клетка представляет собой инсулиновырабатывающую клетку.

Согласно другой задаче изобретение обеспечивает терапевтически эффективный состав, который включает множество инкапсулирующих устройств, имеющих средний диаметр менее 400 мкм, при этом инкапсулирующие устройства содержат в инкапсулированном материале инкапсулированные клетки, а состав содержит по меньшей мере 500 000 клеток/мл. В более предпочтительном варианте реализации средний диаметр инкапсулирующего устройства составляет менее 300 микрон. В еще более предпочтительном варианте реализации средний диаметр инкапсулирующего устройства составляет менее 100 микрон. И в наиболее предпочтительном варианте реализации средний диаметр инкапсулирующего устройства составляет менее 50 микрон.

В другом варианте реализации изобретение обеспечивает терапевтически эффективный состав, который включает множество инкапсулирующих устройств, имеющих средний диаметр менее 400 мкм, при этом инкапсулирующие устройства содержат в инкапсулированном материале инкапсулированные клетки, а состав имеет отношение объема инкапсулирующего устройства к объему клеток менее, чем примерно 20:1. В более предпочтительном варианте реализации состав имеет отношение объема инкапсулирующего устройства к объему клеток менее, чем примерно 10:1. В еще более предпочтительном варианте реализации состав имеет отношение объема инкапсулирующего устройства к объему клеток менее, чем примерно 2:1.

В другом варианте реализации изобретение обеспечивает применение состава, указанного в данном описании, способом, который включает операцию имплантации состава в имплантационный сайт животного, которое нуждается в лечении заболевания или нарушения.

В предпочтительном варианте реализации изобретение обеспечивает способ применения терапевтического состава, который содержит инкапсулирующие устройства с покрытием из полиэтиленгликоля (PEG), имеющего молекулярную массу от 900 до 3 000 Дальтонов, при этом клеточная плотность указанного состава равна по меньшей мере примерно 100 000 клеток/мл, и указанный способ включает операцию имплантации состава в имплантационный сайт животного, которое нуждается в лечении заболевания или нарушения. Имплантация предпочтительно представляет собой инъекцию.

В предпочтительных вариантах реализации изобретение заболевание или нарушение является неврологическим, сердечно-сосудистым, печеночным, эндокринным, кожным, кроветворным, иммунным, нейросекреторным, метаболическим, системным или генетическим. В наиболее предпочтительном

50

варианте реализации заболевание является эндокринным заболеванием, в частности, диабетом.

В предпочтительном варианте реализации животное относится к подклассу настоящих зверей, отрядам парнокопытных, хищных, китообразных, непарнокопытных, приматов, хоботных или зайцеобразных. Более предпочтительно животным является человек.

В предпочтительном варианте реализации имплантационным сайтом является подкожный, внутримышечный, внутриорганный, артериальные/венозные сосуды органа, спинномозговая жидкость или лимфатическая жидкость. В наиболее предпочтительном варианте реализации способ включает имплантацию инкапсулированных островков в подкожный имплантационный сайт.

В предпочтительном варианте реализации способ имплантации состава в имплантационный сайт животного, которое нуждается в лечении заболевания или нарушения, включает также операцию введения иммунодепрессанта или противовоспалительного агента. Иммунодепрессант или противовоспалительный агент вводят в течение периода времени, предпочтительно меньшего 6 месяцев. Более предпочтительно иммунодепрессант или противовоспалительный агент вводят в течение периода времени, меньшего 1 месяца.

В другом предпочтительном варианте реализации изобретение обеспечивает применение терапевтического состава, который включает множество инкапсулирующих устройств, имеющих средний диаметр менее 400 мкм, при этом инкапсулирующие устройства содержат в инкапсулированном материале инкапсулированные клетки, а состав содержит по меньшей мере 500 000 клеток/мл, способом, который включает операцию имплантации состава в имплантационный сайт животного, которое нуждается в лечении заболевания или нарушения. Имплантация предпочтительно представляет собой инъекцию.

Заболевание или нарушение предпочтительно является неврологическим, сердечно-сосудистым, печеночным, эндокринным, кожным, кроветворным, иммунным, нейросекреторным, метаболическим, системным или генетическим. В наиболее предпочтительном варианте реализации заболевание представляет собой диабет.

Животное предпочтительно относится к подклассу настоящих зверей, отрядам парнокопытных, хищных, китообразных, непарнокопытных, приматов, хоботных или зайцеобразных. Более предпочтительно животным является человек.

Предпочтительно имплантационным сайтом является подкожный, внутримышечный, внутриорганный, артериальные/венозные сосуды органа, спинномозговая жидкость или лимфатическая жидкость. Более предпочтительным имплантационным сайтом является подкожный. В наиболее предпочтительном варианте реализации способ включает имплантацию инкапсулированных островков в подкожный имплантационный сайт.

5 В предпочтительном варианте реализации способ имплантации состава в имплантационный сайт животного, которое нуждается в лечении заболевания или нарушения, включает также операцию введения иммунодепрессанта или противовоспалительного агента. Иммунодепрессант или противовоспалительный агент вводят в течение периода времени, предпочтительно меньшего 6 месяцев. Более предпочтительно иммунодепрессант или противовоспалительный агент вводят в течение периода времени, меньшего 1 месяца.

10 В другом варианте реализации изобретение обеспечивает способ инкапсуляции биологического материала, включающий следующие операции:

добавление к биологическому материалу раствора, содержащего первый буфер,

15 центрифугирование биологического материала для получения гранулированного биологического материала,

удаление надосадочной жидкости,

20 добавление к гранулированному биологическому материалу раствора, содержащего фотоинициирующий краситель, конъюгированный с материалом, поглощающим клетки,

25 ресуспендривание и инкубация гранулированного биологического материала с раствором, содержащим фотоинициирующий краситель, конъюгированный с материалом, поглощающим клетки, в течение эффективного периода времени,

центрифугирование смеси,

30 удаление раствора, содержащего фотоинициирующий краситель, конъюгированный с материалом, поглощающим клетки,

35 ресуспендривание гранулированного биологического материала со вторым раствором, содержащим второй буфер,

центрифугирование и удаление второго буфера,

40 ресуспендривание и смешивание биологического материала с раствором светочувствительного полимера,

облучение ресуспендриванного биологического материала с раствором светочувствительного полимера источником энергии с целью получения инкапсулированного биологического материала. Инкапсулированный биологический

45 материал предпочтительно представляет собой островковый аллотрансплантат с конформным покрытием PEG.

Материал, поглощающий клетки, предпочтительно представляет собой поликатионный полимер. В предпочтительном варианте реализации поликатионный полимер является дендримером РАМАМ. В альтернативном предпочтительном варианте реализации поликатионный полимер представляет собой полиэтиленимин.

Биологический материал предпочтительно представляет собой орган, ткань или клетку. Более предпочтительно ткань является образованием

50

инсулиновырабатывающих клеток. Еще более предпочтительно клетка является инсулиновырабатывающей клеткой.

В предпочтительном варианте реализации первый и второй буфер имеет концентрацию от 1 до 200 мМ. Более предпочтительно концентрация первого и второго буфера составляет от 10 до 50 мМ. Наиболее предпочтительно концентрация первого и второго буфера составляет 20 мМ.

В предпочтительном варианте реализации фотоинициатор представляет собой карбоксиэозин, этилэозин, эозин Y, флуоресцин, 2,2-диметокси, 2-фенилацетофенон, 2-метокси, 2-фенилацетофеноно, камфорхинон, бенгальский розовый, метиленовый синий, эритрозин, флоксин, тионин, рибофлавин или метиленовый зеленый. Более предпочтительно фотоинициатор представляет собой карбоксиэозин.

В предпочтительном варианте реализации раствор светочувствительного полимера содержит полимеризуемый PEG высокой плотности с ненасыщенными этиленовыми связями и сульфонированный сомономер. В более предпочтительном варианте реализации полимеризуемый PEG высокой плотности с ненасыщенными этиленовыми связями представляет собой акрилатный PEG высокой плотности. Полимеризуемый акрилатный PEG высокой плотности имеет молекулярную массу, предпочтительно равную 1,1 кД.

В предпочтительном варианте реализации сульфонированный сомономер представляет собой 2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновую кислоту, винилсульфоновую кислоту, 4-стиролсульфоновую кислоту, 3-сульфопропилакрилат, 3-сульфопропилметакрилат или n-винилмалеимидсульфонат. В более предпочтительном варианте реализации сульфонированный сомономер представляет собой 2-акриламидо-2-метил-1-пропан-сульфоновую кислоту.

В предпочтительном варианте реализации раствор светочувствительного полимера содержит также сокатализатор, который представляет собой триэтаноламин, триэтиламин, этаноламин, N-метилдиэтаноламин, N,N-диметилбензиламин, дibenзиламино, N-бензилэтаноламин, N-изопропилбензиламин, тетраметилэтилендиамин, персульфат калия, лизин, орнитин, гистидин или аргинин. Более предпочтительно сокатализатор представляет собой триэтаноламин.

В предпочтительном варианте реализации раствор светочувствительного полимера содержит также ускоритель, который представляет собой N-ванилпирролидинон, 2-ванилпиридин, 1-ванилимидазол, 9-ванилкарбазон, 9-ванилкарбазол, акриловую кислоту, n-ванилкапролактам, 2-аллил-2-метил-1,3-циклопентандион или 2-оксиэтилакрилат. Более предпочтительно ускоритель представляет собой N-ванилпирролидинон.

В предпочтительном варианте реализации раствор светочувствительного полимера содержит также усилитель вязкости, который выбирают из группы, включающей природные и синтетические полимеры. В более предпочтительном

варианте реализации усилитель вязкости представляет собой PEG-триол с молекулярной массой 3,5 кД или PEG-диол с молекулярной массой 4 кД.

5 В предпочтительном варианте реализации раствор светочувствительного полимера содержит также агент, регулирующий плотность. Более предпочтительно агент, регулирующий плотность, представляет собой Nycodenz или Ficoll.

10 В предпочтительном варианте реализации раствор светочувствительного полимера содержит также буфер "Good" (буфер "Гуда"). В более предпочтительном варианте реализации буфер "Гуда" представляет собой HEPES (N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновую кислоту) или MOPS (3-(n-морфолино)пропансульфоновую кислоту). В наиболее предпочтительном варианте реализации буфер "Гуда" представляет собой MOPS.

15 В предпочтительном варианте реализации источником энергии является аргоновый лазер.

20 В предпочтительном варианте реализации биологический материал для способа инкапсуляции является неврологическим, сердечно-сосудистым, печеночным, эндокринным, кожным, кроветворным, иммунным, нейросекреторным, метаболическим, системным или генетическим.

25 В предпочтительном варианте реализации биологический материал получают из животных класса млекопитающих, подкласса настоящих зверей. В более предпочтительном варианте реализации животное относится подклассу настоящих зверей, отрядам парнокопытных, хищных, китообразных, непарнокопытных, приматов, хоботных или зайцеобразных. В наиболее предпочтительном варианте реализации животным является человек.

30 В другом варианте реализации изобретение обеспечивает состав для инкапсулирования биологического материала, содержащий полимеризуемый PEG высокой плотности с ненасыщенными этиленовыми связями и с молекулярной массой от 900 до 3 000 Даальтонов, а также сульфонированный сомономер. В предпочтительном варианте реализации полимеризуемый PEG высокой плотности с ненасыщенными этиленовыми связями представляет собой полимеризуемый акрилатный PEG высокой плотности. В более предпочтительном варианте реализации полимеризуемый акрилатный PEG высокой плотности имеет молекулярную массу, равную 1,1 кД.

35 В предпочтительном варианте реализации сульфонированный сомономер представляет собой 2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновую кислоту, винилсульфоновую кислоту, 4-стиролсульфоновую кислоту, 3-сульфопропилакрилат, 3-сульфопропилметакрилат или n-винилмалеимидсульфонат. В более предпочтительном варианте реализации сульфонированный сомономер представляет собой 2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновую кислоту.

40  
50

5 В предпочтительном варианте реализации состав для инкапсуляции биологического материала содержит также сокатализатор, который представляет собой триэтаноламин, триэтиламин, этаноламин, N-метилдиэтаноламин, N,N-диметилбензиламин, дибензиламино, N-бензилэтаноламин, N-изопропилбензиламин, тетраметилэтилендиамин, персульфат калия, лизин, орнитин, гистидин или аргинин. В более предпочтительном варианте реализации сокатализатор представляет собой триэтаноламин.

10 15 В предпочтительном варианте реализации состав для инкапсуляции биологического материала содержит также ускоритель, который представляет собой N-винилпирролидон, 2-винилпиридин, 1-ванилимидал, 9-винилкарбазон, 9-винилкарбазол, акриловую кислоту, n-винилкапролактам, 2-аллил-2-метил-1,3-цикlopентандион или 2-оксиэтилакрилат. В более предпочтительном варианте реализации ускоритель представляет собой N-винилпирролидон.

20 25 В предпочтительном варианте реализации состав для инкапсулирования биологического материала имеет по меньшей мере около 2 баллов биосовместимости. Более предпочтительно состав для инкапсуляции биологического материала имеет по меньшей мере около 2 баллов биосовместимости с организмом млекопитающих, более предпочтительно – с организмом человекообразных обезьян, и наиболее предпочтительно – с организмом человека.

30 В предпочтительном варианте реализации состав для инкапсулирования биологического материала обладает селективной проницаемостью. Более предпочтительно селективную проницаемость можно регулировать, модифицируя состав.

35 40 В предпочтительном варианте реализации состав для инкапсулирования биологического материала обеспечивает функциональность клеток по меньшей мере около 2 баллов. В более предпочтительном варианте реализации обеспечивается функциональность клеток по меньшей мере около 2 баллов в организме млекопитающих, более предпочтительно – в организме человекообразных обезьян, и наиболее предпочтительно – в организме человека.

45 В предпочтительном варианте реализации состав для инкапсулирования биологического материала является биологически разлагаемым. Более предпочтительно состав биологически разлагается в организме млекопитающих. Еще более предпочтительно состав биологически разлагается в организме человекообразных обезьян. В наиболее предпочтительном варианте реализации состав биологически разлагается в организме человека.

50 Другие задачи, особенности и достоинства данного изобретения станут очевидными из подробного описания предпочтительных вариантов реализации, приведенного далее.

Краткое описание прилагаемых фигур.

Фиг. 1 А – фотография островков, выделенных у обезьян вида Супомолгус.

5 Фиг. 1 В – фотография островков обезьян вида Супомолгус с конформным покрытием PEG.

Фиг. 2 – синтез коньюгата дендримера эозина Y.

10 Фиг. 3 – дендример второго поколения. В примерах использовали дендримеры четвертого поколения, которые имеют более высокое разветвление, чем показанный дендример второго поколения.

15 Фиг. 4 – жизнеспособность инкапсулированных клеток, измеренная с помощью теста FDA/EB по шкале 1, 2 и 4 балла.

20 Фиг. 5 – способность изменения профиля селективной проницаемости микрокапсул из альгината/PEG при изменении переменных параметров, влияющих на формирование покрытия PEG. Островки, инкапсулированные в альгинате/PEG, инкубировали в течение некоторого времени, а затем анализировали белки, выделяемые клетками, чтобы определить молекулярные массы. Белки, выделяемые 25 неинкапсулированными островками, показаны слева перед столбцом маркеров молекулярной массы. В следующих столбцах показаны белки, выделяющиеся из островков, инкапсулированных в альгинате/PEG, которые выделяли белки с 30 молекулярной массой более 100 кД, 100 кД, менее 60 кД, менее 30 кД и 0 кД, соответственно.

35 Фиг. 6 – функциональность инкапсулированных островков, определенная с помощью теста статического стимулирования глюкозы с профилями диффузационной способности различных представителей белков по следующей балльной шкале: открытые покрытия (>200 кД) - "1", промежуточные (100-200 кД) –"2" и плотные (<100 кД) – "3".

40 Фиг. 7 – графическое представление результатов измерения содержания глюкозы в крови бестимусных мышей, во внутрибрюшинный сайт которых имплантировали мышиные островки с конформным покрытием.

45 Фиг. 8 - графическое представление результатов измерения содержания глюкозы в крови бестимусных мышей, в подкожный сайт которых имплантировали мышиные островки с конформным покрытием.

50

Фиг. 9 - графическое представление результатов измерения содержания глюкозы в крови мышей CD1, во внутрибрюшинный сайт которых имплантировали мышиные островковые аллотрансплантаты с конформным покрытием.

Фиг. 10 - графическое представление результатов измерения содержания глюкозы в крови мышей CD1, в подкожный сайт которых имплантировали высокую дозу мышиных островковых аллотрансплантатов с конформным покрытием.

Фиг. 11 - графическое представление результатов измерения содержания глюкозы в крови двух NOD (non-obese diabetic, не полных, больных диабетом) мышей, которым имплантировали аллотрансплантаты с конформным покрытием PEG.

Фиг. 12 - графическое представление результатов измерения содержания глюкозы в крови бестимусных мышей, больных диабетом, в подкожный сайт которых имплантировали островки человекаобразных обезьян с конформным покрытием.

Фиг. 13 - графическое представление результатов измерения содержания глюкозы в крови бестимусных мышей, больных диабетом, во внутрибрюшинный сайт которых имплантировали островки человека с конформным покрытием.

Фиг. 14 - графическое представление результатов измерения содержания глюкозы в крови бестимусных мышей, больных диабетом, в подкожный сайт которых имплантировали островки человека с конформным покрытием.

Фиг. 15 - графическое представление результатов измерения содержания глюкозы и потребности инсулина у обезьян вида *Cynomolgus* с частичной резекцией поджелудочной железы при последующей подкожной имплантации островковых аллотрансплантатов с конформным покрытием PEG.

Фиг. 16А – гистологическая фотография подкожных имплантатов инкапсулированных островковых аллотрансплантатов через 100 дней, после антиинсулинового окрашивания.

Фиг. 16В – гистологическая фотография подкожных имплантатов инкапсулированных островковых аллотрансплантатов через 100 дней, после антиинсулинового окрашивания.

Фиг. 16С – гистологическая фотография остаточной панкреатической ткани обезьян вида *Cynomolgus* с частичной резекцией поджелудочной железы после антиглюкагонового окрашивания.

Фиг. 16D – гистологическая фотография остаточной панкреатической ткани обезьян вида *Cynomolgus* с частичной резекцией поджелудочной железы после антиглюкагонового окрашивания.

Фиг. 17 - графическое представление результатов измерения содержания глюкозы (мг/дл) в крови и потребности инсулина у обезьян вида *Cynomolgus*, больных диабетом, индуцированным стрептозотоцином, с под кожным имплантатом инкапсулированного островкового аллотрансплантата без иммунодепрессантных препаратов (◆ = глюкоза в крови, • = инсулин).

Фиг. 18 - графическое представление результатов измерения содержания глюкозы (мг/дл) в крови и потребности инсулина у обезьян вида *Cynomolgus*, больных диабетом, индуцированным стрептозотоцином, с под кожным имплантатом инкапсулированного островкового аллотрансплантата при введении в течение 30 дней низкой дозы циклоспорина и метформина (◆ = глюкоза в крови, • = инсулин).

Фиг. 19 – фотографии гистологии под кожного имплантатного сайта обезьян вида *Cynomolgus*, больных диабетом, индуцированным стрептозотоцином, с инкапсулированным островковым аллотрансплантатом при введении в течение 30 дней низкой дозы циклоспорина и метформина, на 285 день.

Фиг. 20 – фотографии гистологии под кожного имплантатного сайта обезьян вида *Cynomolgus*, больных диабетом, индуцированным стрептозотоцином, с инкапсулированным островковым аллотрансплантатом при введении в течение 30 дней низкой дозы циклоспорина и метформина, на 248 день, после антиинсулинового окрашивания.

Фиг. 21 – графическое представление результатов измерения содержания гликозилированного гемоглобина у обезьян вида *Cynomolgus* перед индукцией диабета (исходный уровень, n = 4), через 85 дней, n = 3 и через 114 дней, n = 1 после трансплантации.

Фиг. 22 - графическое представление результатов измерения содержания глюкозы (мг/дл) в крови и потребности инсулина у бабуинов, больных диабетом, индуцированным стрептозотоцином, с под кожным имплантатом инкапсулированного островкового аллотрансплантата при введении в течение 30 дней низкой дозы циклоспорина и метформина (◆ = глюкоза в крови, • = инсулин).

Фиг. 23 – графическое представление результатов измерения содержания гликозилированного гемоглобина A1с у бабуинов, больных диабетом, индуцированным стрептозотоцином, с подкожным имплантатом инкапсулированного островкового аллотрансплантата при введении в течение 30 дней низкой дозы циклоспорина и метформина.

Фиг. 24 - графическое представление результатов измерения содержания глюкозы (мг/дл) в крови и потребности инсулина у бабуинов, больных диабетом, индуцированным стрептозотоцином, с подкожным имплантатом инкапсулированного островкового аллотрансплантата при введении в течение 30 дней низкой дозы циклоспорина ( $\blacklozenge$  = глюкоза в крови,  $\bullet$  = инсулин).

Фиг. 25 – графическое представление результатов измерения содержания гликозилированного гемоглобина A1с у бабуинов, больных диабетом, индуцированным стрептозотоцином, с подкожным имплантатом инкапсулированного островкового аллотрансплантата при введении в течение 30 дней низкой дозы циклоспорина.

Фиг. 26 – процент выживания свиных островков, инкапсулированных в чистом альгинате, а также в различных конфигурациях альгинатно-PEG микрокапсул из с различными профилями селективной проницаемости покрытий после имплантации в течение 7 дней нормальным обезьянам вида *Cynomolgus*. Величина селективной проницаемости составляла 0 кД, 30-60 кД, 100 кД и более 200 кД.

Фиг. 27 – результаты имплантации свиных островков, инкапсулированных в альгинатно-PEG микрокапсулы, которые имплантировали в брюшинную полость обезьян вида *Cynomolgus*, больным диабетом и получавшим также лечение анти-CD154 антителом в течение 30 дней.

Фиг. 28А и В – применение технологии нанесения конформного покрытия PEG для различных клеточных линий (NIT) опухоли из бета-клеток, которые образуют агрегаты и сохраняют жизнеспособность в тканевой культуре в течение 2 недель. Клетки с покрытием показаны при нормальном освещении (фиг. 26А) и при люминесцентном освещении с окрашиванием FDA/EB (фиг. 26В).

Фиг. 29А и В – конформное покрытие PEG другой клеточной линии легочных клеток плода обезьяны, которая сохраняет жизнеспособность после инкапсуляции. На фиг. 29А показаны клетки при нормальном освещении, а на фиг. 29В – клетки при люминесцентном освещении с окрашиванием FDA/EB.

Фиг. 30А-Д - конформное покрытие PEG клеточных агрегатов, полученных из эмбриональных клеток печени (гепатоцитов) человека и мыши и сохраняющих жизнеспособность культуры в течение 2 недель. На фиг. 30А показаны клетки человека в двухнедельной культуре при люминесцентном освещении с окрашиванием FDA/EB. На фиг. 30В показаны клетки человека в двухнедельной культуре при нормальном освещении. На фиг. 30С и 30Д показаны мышечные клетки при люминесцентном освещении с окрашиванием FDA/EB (30С) и нормальном освещении (30Д).

Фиг. 31А-Д – реакции биосовместимости для четырех различных видов (31А - IP у мыши, 31В – PV у свиньи, 31С – PV у собаки и 31Д – PV у свиньи), которым имплантировали пустые альгинатные/PEG микрокапсулы в различные сайты. На фигуре показаны результаты инъекции пустых альгинатных микрокапсул, покрытых триакрилатом PEG с молекулярной массой 1,1 кД, которые вводили в печень через воротную вену.

Фиг. 32 – биосовместимость инкапсулированных клеток у мелких животных с репрезентативной гистологией, выраженная в баллах 1, 2 и 3.

Фиг. 33 - биосовместимость инкапсулированных клеток у крупных животных с репрезентативной гистологией, выраженная в баллах 1, 2 и 4.

Фиг. 34 – функциональность инкапсулированных островков, имплантированных бестимусным мышам, больным диабетом, индуцированным стрептозотоцином, выраженная в репрезентативных баллах 1, 2 и 3.

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Один из предпочтительных вариантов реализации настоящего изобретения относится к составам и способам лечения одного или нескольких заболеваний или нарушений, в частности, неврологических (например, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, хорея Гентингтона, рассеянный склероз, слепота, повреждение периферического нерва, повреждение спинномозгового нерва, боли и наркомания), сердечно-сосудистых (например, коронарной артерии, ангиогенных трансплантатов, клапанов и мелких сосудов), печеночных (например, острая печеночная недостаточность, хроническая печеночная недостаточность и генетическое заболевание, воздействующее на печень), эндокринных (например, диабет, ожирение, стрессовое и адреналиновое, заболевания щитовидной железы, яичек и яичника), кожных (например, хронические язвы и болезни кожных и волоссяных стволовых клеток), кроветворных (например, фактор VIII и эритропоэтин) или иммунных

(иммунная непереносимость или аутоиммунная болезнь) у субъекта, которому требуется лечение, при этом способ включает:

5 получение клеток или ткани, в частности, панкреатических островков, печеночной ткани, эндокринных тканей, кожных клеток, кроветворных клеток, стволовых клеток костного мозга, почечных тканей, мышечных клеток, нервных клеток, зародышевых стволовых клеток, или органоспецифических клеток-  
10 предшественников или генно-инженерных клеток для получения из них специфических факторов, клеток или тканей,

15 введение указанных клеток или тканей по меньшей мере в один инкапсулирующий материал, в частности, в гидрогель, полученный из физически или химически сшивающихся полимеров, включая полисахариды, например, альгинат, агароза, хитозан, полиаминокислоты, гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат, декстран, декстрансульфат, гепарин, гепаринсульфат, геперансульфат, геллановая камедь, ксантановая смола, гуаровая камедь, водорастворимые производные целлюлозы, каррагенан, или белки, в частности, желатин, коллаген, альбумин, или водорастворимые синтетические полимеры с ненасыщенными этиленовыми группами  
25 или их производные, например, полиметилметракрилат (PMMA), или поли-2-оксиэтилметакрилат (PHEMA), полиэтиленгликоль (PEG), полиэтиленоксид (PEO), поливиниловый спирт (PVA), поливинилпирролидон (PVP), политиоксазолин (PEOX)  
30 или их сочетание, например, альгинат, смешанный с PEG или с более гидрофобными или водорастворимыми полимерами, в частности, с полигликолевой кислотой (PGA), полимолочной кислотой (PLA) или их сополимерами (PLA-GA) или  
35 политетрафторэтиленом (PTFE) и

40 введение терапевтически эффективной дозы указанных инкапсулированных клеток или ткани субъекту, нуждающемуся в лечении, посредством подкожной инъекции или имплантации, или непосредственно в соответствующие органы либо путем прямой инъекции в субстанцию органа, либо путем инъекции в сосудистую систему указанных органов.

45 Указанные органы могут быть выбраны, в частности, но без ограничения, из группы, включающей печень, селезенку, почку, легкое, сердце, головной мозг, спинной мозг, мышцы и костный мозг. Субъект, нуждающийся в лечении, может быть выбран в частности, но без ограничения, из группы, включающей млекопитающих, например,  
50

человека, человекообразных обезьян, коров, овец, лошадей, свиней, собак, кошек и кроликов, а также других животных, например, куриц, индеек или рыб.

В другом варианте реализации изобретения клетки или ткань можно вводить 5 субъекту, нуждающемуся в лечении, в сочетании с иммунодепрессантом и/или противовоспалительным агентом. Иммунодепрессант может быть выбран в частности, но без ограничения, из группы, включающей циклоспорин, сиролимус, рапамицин или 10 такролимус. Противовоспалительный агент может быть выбран в частности, но без ограничения, из группы, включающей аспирин, ибупрофен, стероидные и нестероидные противовоспалительные агенты. Иммунодепрессант и/или 15 противовоспалительный агент предпочтительно вводят в течение шести месяцев после имплантации или инъекции инкапсулированных клеток или ткани. Более предпочтительно иммунодепрессант и/или противовоспалительный агент вводят в 20 течение одного месяца после имплантации или инъекции инкапсулированных клеток или ткани.

В предпочтительном варианте реализации инкапсулированные островки 25 имплантируют или вводят в форме инъекции подкожно или в печень или селезенку. Согласно одной из задач изобретения островки с конформным покрытием вводят подкожно.

Инкапсулированный материал предпочтительно содержит акрилатный PEG и по 30 меньшей мере один сомономер, в частности, N-винилпирролидон, 2-винилпирридин, 1-венилимидазол, 9-венилкарбазон, акриловую кислоту и 2-аллил-2-метил-1,3-циклопентандион, 2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновую кислоту, винилсульфоновую кислоту, 3-сульфопропилакрилат, 3-сульфопропилметакрилат и 2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновую кислоту плюс N-винилпирролидон. Наиболее предпочтительно инкапсулирующий материал содержит акрилатный PEG с 35 2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновой кислотой (AMPS) и/или N-винилпирролидон (NVP) в качестве сомономера для получения инкапсулированных клеток или ткани, на которые наносят конформное покрытие каким-либо способом, в 40 частности, способом межфазной фотополимеризации.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения концентрация 45 ингредиентов и состав инкапсулирующего раствора могут изменяться. Предпочтительную концентрацию поддерживают в следующих пределах.

50

Для раствора буфера предпочтительная концентрация составляет от 1 до 200 мМ, более предпочтительная – от 5 до 100 мМ и еще более предпочтительная – от 10 до 50 мМ.

5 Для  $\text{CaCl}_2$  предпочтительная концентрация составляет от 0,1 до 40 мМ, более предпочтительная – от 0,5 до 20 мМ и еще более предпочтительная – от 1 до 5 мМ.

10 Для маннитола предпочтительная концентрация составляет от 10 мМ до 6 М, более предпочтительная – от 100 мМ до 1 М и еще более предпочтительная – от 200 до 300 мМ.

15 Для pH раствора  $\text{CaCl}_2$ /маннитол предпочтительная величина составляет от 6 до 8, более предпочтительная – от 6,4 до 7,6 и еще более предпочтительная – от 6,6 до 7,4.

20 Для DEN-EY предпочтительная концентрация составляет от 0,005 до 8 мг/мл, более предпочтительная – от 0,01 до 4 мг/мл и еще более предпочтительная – от 0,05 до 2 мг/мл.

Для конъюгации DEN-EY предпочтительный уровень составляет от 0,15 до 68, более предпочтительный – от 1 до 34 и еще более предпочтительный – от 1,5 до 15.

25 Для pH раствора макромера предпочтительная величина составляет от 6,5 до 9,5, более предпочтительная – от 7 до 9 и еще более предпочтительная – от 7,5 до 8,5.

30 Для PEG TA предпочтительная концентрация составляет от 0,1 до 100%, более предпочтительная – от 0,2 до 50% и еще более предпочтительная – от 1 до 25%.

35 Для PEG TA предпочтительная плотность составляет от 0,05 до 20 К, более предпочтительная – от 0,1 до 10 К, еще более предпочтительная – от 0,5 до 5 К и наиболее предпочтительная – от 0,8 до 2,5 К.

Для PEG-триола предпочтительная концентрация составляет от 0,1 до 100%, более предпочтительная – от 1 до 75% и еще более предпочтительная – от 2 до 50%.

40 Для PEG-триола предпочтительная плотность составляет от 0,15 до 70 К, более предпочтительная – от 0,3 до 35 К, еще более предпочтительная – от 1,5 до 15 К и наиболее предпочтительная – от 2,3 до 7,5 К.

45 Для PEG-диола предпочтительная концентрация составляет от 0,1 до 100%, более предпочтительная – от 1 до 75% и еще более предпочтительная – от 2 до 50%.

Для PEG-диола предпочтительная плотность составляет от 0,2 до 80 К, более предпочтительная – от 0,5 до 40 К, еще более предпочтительная – от 1 до 20 К и наиболее предпочтительная – от 2 до 10 К.

5 Для TEoA предпочтительная концентрация составляет от 5 мМ до 2 М, более предпочтительная – от 10 мМ до 1 М, еще более предпочтительная – от 50 до 500 мМ и наиболее предпочтительная – от 75 до 125 мМ.

10 Для AMPS предпочтительная концентрация составляет от 2 до 640 мг/мл, более предпочтительная – от 5 до 300 мг/мл и еще более предпочтительная – от 10 до 150 мг/мл.

15 Для NVP предпочтительная концентрация составляет от 0,01 до 40 мкл/мл, более предпочтительная – от 0,1 до 20 мкл/мл и еще более предпочтительная – от 0,5 до 10 мкл/мл.

20 Для Nycodenz предпочтительная концентрация составляет от 0,1 до 100%, более предпочтительная – от 1 до 50% и еще более предпочтительная – от 5 до 25%.

25 Для лазера предпочтительная мощность составляет от 10 мВ/см<sup>2</sup> до 4 В/см<sup>2</sup>, более предпочтительная – от 25 мВ/см<sup>2</sup> до 2 В/см<sup>2</sup> и еще более предпочтительная – от 75 мВ/см<sup>2</sup> до 1 В/см<sup>2</sup>.

30 Для источника излучения предпочтительное время составляет от 3 секунд до 20 минут, более предпочтительное – от 6 секунд до 10 минут и еще более предпочтительное – от 12 секунд до 3 минут.

35 В одном из вариантов реализации инкапсулирующий материал содержит гидрогель, который образует сферу вокруг по меньшей мере одной частицы или ткани. В другом варианте реализации инкапсулирующий материал представляет собой альгинатную микрокапсулу, образующую конформное покрытие с другим инкапсулирующим материалом, содержащим акрилатный PEG. В одном из вариантов 40 реализации клетка или ткань может быть инкапсулирована в биосовместимой альгинатной микрокапсule, при этом биосовместимость альгината обеспечивается за счет его покрытия биосовместимым материалом, в частности, PEG или гиалуроновой 45 кислотой, очистки альгината и/или удаления полилизина и замены его на PEG.

Наиболее предпочтительно заболевание, подвергающееся лечению, представляет собой диабет, клетки или ткань включают инсулиновырабатывающие клетки или ткань, 50 или клетки или ткань, полученные из панкреатических клеток или ткани, или клетки,

полученные из клеток-предшественников или стволовых клеток, превращенных в инсулиновырабатывающие клетки, а инкапсулированные клетки или ткань вводят субъекту, нуждающемуся в лечении, посредством подкожной инъекции, инъекции в печень или трансплантации.

Согласно одному из вариантов реализации изобретения микрокапсулы с инкапсулированными инсулиновырабатывающими клетками или тканью могут иметь средний диаметр от 10 мкм до 1000 мкм, предпочтительно - от 100 мкм до 600 мкм, более предпочтительно – от 150 мкм до 500 мкм и наиболее предпочтительно – от 200 мкм до 300 мкм. В другом варианте реализации изобретение относится к инсулиновырабатывающей клетке или ткани, инкапсулированной в микрокапсулы, с концентрацией по меньшей мере 2 000 IEQ (islet equivalents, островковые эквиваленты)/мл, предпочтительно - по меньшей мере 9 000 IEQ/мл и более предпочтительно - по меньшей мере 200 000 IEQ/мл. В следующем варианте реализации изобретения объем инсулиновырабатывающих клеток или ткани, инкапсулированных в микрокапсулы, который вводят субъекту, в расчете на один килограмм массы тела может составлять от 0,001 мл до 10 мл, предпочтительно – от 0,01 мл до 7 мл, более предпочтительно – от 0,05 мл до 2 мл. В другом варианте реализации изобретения отношение объема микрокапсулы к объему инсулиновырабатывающих клеток или ткани, составляет менее 300:1, предпочтительно – менее 100:1, более предпочтительно – менее 50:1 и наиболее предпочтительно – менее 20:1.

Согласно одному из вариантов реализации изобретения инсулиновырабатывающие клетки или ткань с нанесенным конформным покрытием могут иметь среднюю толщину оболочки от 1 до 400 мкм, предпочтительно – от 10 до 200 мкм и более предпочтительно – от 10 до 100 мкм. В другом варианте реализации изобретение относится к инсулиновырабатывающим клеткам или ткани с нанесенным конформным покрытием, имеющим концентрацию по меньшей мере 10 000 IEQ/мл, предпочтительно - по меньшей мере 70 000 IEQ/мл, более предпочтительно - по меньшей мере 125 000 IEQ/мл и наиболее предпочтительно - по меньшей мере 200 000 IEQ/мл.

Согласно одному из вариантов реализации изобретения объем инсулиновырабатывающих клеток или ткани с нанесенным конформным покрытием, вводимый субъекту в расчете на один килограмм массы тела, может составлять от 0,01

мл до 7 мл, предпочтительно – от 0,01 мл до 2 мл и более предпочтительно – от 0,04 мл до 0,5 мл. В другом варианте реализации изобретения отношение объема конформного покрытия к объему инсулиновырабатывающих клеток или ткани составляет менее 13:1, 5 предпочтительно – менее 8:1, более предпочтительно – менее 5:1 и наиболее предпочтительно – менее 2,5:1.

Согласно одному из вариантов реализации изобретения микрокапсулы с 10 инкапсулированными клетками или тканью могут иметь средний диаметр от 10 мкм до 1000 мкм, предпочтительно – от 100 мкм до 600 мкм, более предпочтительно – от 150 мкм до 500 мкм и наиболее предпочтительно – от 200 мкм до 300 мкм. В другом 15 варианте реализации изобретения отношение объема микрокапсулы к объему инсулиновырабатывающих клеток или ткани составляет менее 300:1, предпочтительно – менее 100:1, более предпочтительно – менее 50:1 и наиболее предпочтительно – менее 20:1. 20

Согласно одному из вариантов реализации изобретения клетки или ткань с 25 нанесенным конформным покрытием могут иметь среднюю толщину оболочки от 1 до 400 мкм, предпочтительно – от 10 до 200 мкм и более предпочтительно – от 10 до 100 мкм. В другом варианте реализации изобретения отношение объема конформного покрытия к объему клеток или ткани составляет менее 13:1, предпочтительно – менее 8:1, более предпочтительно – менее 5:1 и наиболее предпочтительно – менее 2,5:1.

Один из вариантов реализации изобретения относится к инкапсулированным 30 клеткам или ткани, при этом плотность клеток составляет по меньшей мере около 100 000 клеток/мл. Инкапсулированная клетка предпочтительно имеет конформное 35 покрытие. Более предпочтительно инкапсулированная клетка имеет конформное покрытие из инкапсулирующего материала, содержащего акрилатный PEG. В другом варианте реализации изобретение относится к способу лечения диабета у субъекта, 40 включающему введение инкапсулированных островков с клеточной плотностью по меньшей мере 6 000 000 клеток/мл, при этом предпочтительно, чтобы лечебная доза составляла менее примерно 2 мл на килограмм массы тела субъекта.

Другой вариант реализации изобретения относится к сельскохозяйственным или 45 домашним животным, в частности, коровам, овцам, лошадям, свиньям, курам, индюкам, кроликам, рыбам или собакам и кошкам и обеспечивает изменение скорости роста или состояния животных (например, с целью повышения производства мяса или 50 молока), а также их защиту или лечение от различных заболеваний. Согласно этому

варианту реализации способ введения клеток или ткани соответствующим сельскохозяйственным животным включает:

5 а) получение клетки или ткани,

б) введение указанной клетки или ткани по меньшей мере в один инкапсулирующий материал, в частности, в гидрогель, полученный из физически или химически спивающихся полимеров, включая полисахариды, например, альгинат, 10 агароза, хитозан, полiamинокислоты, гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат, декстран, декстрансульфат, гепарин, гепаринсульфат, геперансульфат, геллановая камедь, ксантановая смола, гуаровая камедь, водорастворимые производные 15 целлюлозы, каррагенан, или белки, в частности, желатин, коллаген, альбумин, или водорастворимые синтетические полимеры или их производные, например, метилметакрилат (ММА), или 2-оксиэтилметакрилат (HEMA), полиэтиленгликоль (PEG), полиэтиленоксид (PEO), поливиниловый спирт (PVA), поливинилпирролидон (PVP), политилоксазолин (PEOX) или их сочетание, например, альгинат, смешанный с PEG или с более гидрофобными или водонерастворимыми полимерами, в частности, с полигликолевой кислотой (PGA), полимолочной кислотой (PLA) или их сополимерами 20 (PLA-GA) или политетрафторэтиленом (PTFE) и

25 в) введение указанных инкапсулированных клеток или ткани субъекту, нуждающемуся в лечении, посредством подкожной инъекции или имплантации, или непосредственно в соответствующие органы либо путем прямой инъекции в 30 субстанцию органа, либо путем инъекции в сосудистую систему указанных органов.

35 Термины, используемые в настоящем описании, имеют следующие определения:

Аллотрансплантаты – трансплантаты двух или нескольких особей с различным строением иммунных антигенов HLA (Histocompatibility Leukocyte Antigen, лейкоцитарный антиген гистосовместимости) или BLC в одном или нескольких 40 локусах (обычно со ссылкой на локус гистосовместимости).

Бестимусная мышь – мышь, имеющая неполную иммунную систему.

45 Аутотрансплантат – трансплантат, взятый из одной части организма и возвращенный той же самой особи.

ApoE2 – белок, который обеспечивает перемещение липидов по организму.

Биосовместимость – способность существования живых объектов без 50 нанесения какого-либо ущерба.

Клеточный агрегат – скопление в массе, элементе или органоиде клеток, которые объединяются за счет соединения субстанций, матриц или структур.

5 Клинически соответствующее и клиническое соответствие - устройство для инкапсуляции клеток или ткани должно иметь общий объем или габаритные размеры, позволяющие имплантировать его в наименее инвазивный и наиболее физиологичный сайт для обеспечения функционирования с отношением риск/польза, меньшим, чем 10 имеет организм хозяина, страдающий заболеванием или нарушением, от указанного заболевания или нарушения.

Среда CMRL (Connaught Medical Research Labs) – среда, хорошо 15 приспособленная для выращивания культур клонированных почечных клеток обезьяны и для выращивания клеточных линий других млекопитающих при обогащении сывороткой крови лошади или теленка. Особенно богата нуклеозидами и некоторыми 20 витаминами.

25 Коммерчески соответствующее и коммерческое соответствие - устройство для инкапсуляции клеток должно удовлетворять таким требованиям, как биосовместимость, селективная проницаемость, жизнеспособность и функциональность инкапсулированных клеток, размер, обеспечение восстановления или замены клеток, терапевтический эффект, чтобы создать его на существующей основе для лечения процесса заболевания, для которого предназначено данное 30 устройство, представляющее собой продукт, успешно реализуемый в рыночных условиях.

35 Конформное покрытие – относительно тонкое полимерное покрытие, которое соответствует форме и размеру покрытой частицы.

40 С-пептид – полипептидная цепь в проинсулине, которая связывает альфа- и бета- цепи активного инсулина. Инсулин вначале синтезируется в форме проинсулина. Для 45 каждой молекулы инсулина в крови имеется одна молекула С-пептида. Содержание С- пептида в крови можно измерить и использовать в качестве показателя выработки инсулина, когда экзогенный инсулин (из инъекции) присутствует и смешивается с эндогенным инсулином (который вырабатывается организмом). С-пептидный тест 50 можно также использовать в качестве вспомогательного анализа, если высокое содержание глюкозы в крови вызвано снижением выработки инсулина или пониженным потреблением глюкозы клетками. У больных диабетом типа 1 С-пептид имеет низкое содержание в крови или вообще отсутствует, в то время как больные

диабетом типа 2 могут иметь пониженный или нормальный уровень С-пептида. Концентрация С-пептида у лиц, не больных диабетом, составляет 0,5 – 3,0 нг/мл.

5                   Обезьяна вида *Cynomolgus* – макак-крабоед, *Macaca fascicularis*, обитает в Юго-  
Восточной Азии.

Гранулы Cytodex – гранулы микроносителя из декстрана с положительно заряженными триметил-2-оксиаминопропиловыми группами на поверхности.

10                  Дендример – искусственно полученная или синтезированная полимерная молекула, состоящая из разветвленных элементов, называемых мономерами. Регулярные, высоко разветвленные мономеры образуют древовидные структуры или 15 структуры поколений. Синтез посредством ступенчатых реакций приводит к единовременному образованию одного слоя или "поколения" дендримера. Каждый дендример состоит из многофункциональной сердцевинной молекулы с дендритными 20 клиньями, присоединенными ко всем функциональным сайтам. Сердцевинную молекулу называют "поколение 0". Каждый последовательно повторяющийся в разветвлении элемент образует следующее поколение: "поколение 1", "поколение 2" и 25 так далее до последнего поколения.

25                  Диабет – переменное нарушение углеводного метаболизма, вызываемое сочетанием наследственных и внешних факторов и обычно характеризующееся неадекватной секрецией или потреблением инсулина, чрезмерной выработкой мочи, 30 чрезмерным содержанием сахара в крови и моче, а также чувством жажды, голода и потерей массы.

35                  DTZ (дифенилтиокарбазон) – краситель, который связывается с цинком в инсулиновых гранулах.

40                  Эозин Y –  $C_{20}H_6O_5Br_4Na_2$  (молекулярная масса 691,914), красный краситель, растворимый в воде (40%) и обладающий сильной люминесценцией. Структуры аналогичные эозину Y в широком смысле: этилэозин, эозин В, флоксин, эритрозин В, флуоресцеин, бенгальский розовый и меркурохром.

45                  Синий краситель Эванса – азокраситель, применяемый для измерения объема крови и минутного сердечного выброса способом разбавления красителя. Он очень хорошо растворяется, сильно связывается с альбумином плазмы и очень медленно исчезает.

Ficoll<sup>TM</sup> – полимеры сахарозы с высокой молекулярной массой, применяемые для разделения клеток.

5                   Окрашивание FDA/EB (флуоресцеиндиацетат/этидиумбромидом) – при окрашивании живые клетки проявляются в виде зеленых окрашенных клеток, в то время как клетки с цитотоксичностью и с нарушением функций клеточной оболочки окрашиваются в красный цвет ядер.

10                  Буфер "Гуда" – группа буферов, разработанная N. E. Good и S. Izawa (Hydrogen ion buffers, Methods Enzymol (1972) 24, 53-68).

15                  Тест HbA1c (эквивалент гемоглобина A1C; гликозилированный гемоглобин) – тест, используемый для долгосрочного контроля содержания глюкозы при диабете. Альтернативные названия этого теста включают гликозилированный гемоглобин или Hgb, гемоглобин гликозилированный или гликозилированный белок и фруктозамин.

20                  HbA1c относится к общему гликозилированному гемоглобину, присутствующему в эритроцитах. Вследствие того, что глюкоза остается присоединенной к клетке в течение всей ее жизни (около 3 месяцев), тест показывает среднее содержание глюкозы в крови пациента за период 4-8 недель. Это – более приемлемый тест для пациента, способного осуществлять долгосрочный постоянный контроль. Результаты теста выражают в процентах, при этом от 4 до 6% считается нормальным результатом.

25                  "Общая картина" HbA1c дополняет ежедневные "снимки", полученные с помощью самоконтроля содержания глюкозы в крови (мг/мл). Эти два теста связаны уравнением: HbA1c = (глюкоза в плазме крови + 77,3) / 35,6. Гликозилированный белок в сыворотке/плазме позволяет производить гликемический контроль за период 1-2

30                  недели. Низкий нормальный результат теста полезен для определения гипогликемического состояния пациента в соответствующих условиях.

35                  

40                  HEMA (2-оксиэтилметакрилат) – используется в системе светового отверждения полимеров и высококачественных покрытий с долговечным высоким глянцем для защиты от царапин, растворителей и атмосферного влияния. Его используют в сшивающихся смолах для лаков и эмульсиях, в связующих составах для тканей и бумаги. Его используют в качестве активатора склеивания для металлических покрытий.

45                  

50                  IBMX – сильный циклический нуклеотидный ингибитор диэстеразы; вследствие этого действия соединение увеличивает содержание циклического AMP (аденозин-5'-

монофосфата) и циклического GMP (гуанозинмонофосфата) в ткани и тем самым активирует многочисленные клеточные процессы.

5 IP (внутрибрюшинный) – в брюшной полости, в зоне, которая содержит абдоминальные органы.

10 IEQ (островковый эквивалент) – определение основано на содержании инсулина и морфологии/размере. Инсулиновую гранулу, связывающую краситель, в частности, дифенилтиокарбазон (DTZ) обычно используют для идентификации бета-клеток. Поскольку бета-клетки представляют собой только один из нескольких типов клеток, необходимых для образования островка, для определения островкового эквивалента 15 дополнительно к окрашиванию DTZ применяют морфологический анализ, исходя из среднего диаметра 150 мкм.

20 M199 – состав, первоначально разработанный для проведения исследований питательности фибробластов куриных эмбрионов. Содержит соли Эрла, L-глутамин и 2200 мг/мл бикарбоната натрия.

25 Диабет взрослого типа у молодежи (Maturity Onset Diabetes of the Young, MODY) – форма диабета, отличающаяся ранним возрастом начала появления симптомов (обычно моложе 25 лет), автосомальной доминантной наследственностью (т. е. наследуют от родителей 50% детей) при наличии диабета по меньшей мере в 2 30 поколениях семьи. Диабет MODY можно часто контролировать с помощью режима питания или противодиабетических препаратов, по меньшей мере на ранних стадиях заболевания. Он отличается от диабета типа 2, при котором пациенты страдают 35 нарушением инсулиновой секреции или метаболизма глюкозы и не имеют резистентности к инсулину. На MODY приходится около 2% заболеваний диабетом во всем мире. Обнаружено 6 генов, вызывающих MODY, хотя не все пациенты, страдающие MODY, имеют один из этих генов. Поскольку MODY протекает в семьях, 40 он используется для исследования генов диабета и дал исследователям полезную информацию, о том, каким образом происходит выработка и регулирование содержания инсулина поджелудочной железой.

45 Клетки MDCK (почечные клетки собак Медина-Дерби) – эпителиально-подобные клеточные линии, полученные из нормальных почек собаки, чувствительные ко многим типам вирусов.

50 Микрокапсулы – мелкие частицы, которые содержат активный агент или материал сердцевины, окруженный покрытием или оболочкой.

5 MMA (метилметакрилат) – акриловый мономер, представляющий собой бесцветную жидкость со слабым раздражающим запахом.

10 Клеточная линия NIT (инсулономная опухоль NOD) – клеточная линия, полученная из панкреатических бета-клеток трансгенных мышей NOD (non-obese diabetic, не полных, больных диабетом).

15 NVP (N-винилпирролидон) – мономер, полученный в результате реакции ацетилена с 2-пирролидоном. Служит в качестве реактивного разбавителя в различных областях применения.

20 Nycodenz<sup>TM</sup> (Nycomed Pharma, Осло, Норвегия) – диатrizойная кислота, неионная рентгеновская контрастная среда, используемая для получения градиентов плотности. Достоинство растворов Nycodenz заключается в том, что их осмотическое давление и плотность можно легко изменять в широких пределах. Эффективный 25 неионный, водорастворимый контрастный агент, который применяют в миелографии, артографии, нефроангиографии, артериографии и других рентгенографических способах. Его низкая системная токсичность является результатом сочетания низкой химической токсичности и низкого осмотического давления.

30 OGGT (оральный тест на толерантность к глюкозе) - скрининговый тест на диабет, который включает определение содержание глюкозы в плазме пациента после того, как он выпивает раствор, содержащий 75 грамм глюкозы. В настоящее время пациенту ставят диагноз диабета, если содержание глюкозы в его плазме составляет 200 мл/дл или более через два часа после приема глюкозы. Если у пациента содержание глюкозы в его плазме меньше 200 мл/дл, но больше или равно 140 мл/дл, ему ставят 35 диагноз состояния, которое называют ослабленной толерантностью к глюкозе. Пациенты с таким состоянием страдают нарушением метаболизма глюкозы, однако, это нарушение не считается достаточно тяжелым для того, чтобы классифицировать их 40 как больных диабетом. Лица с ослабленной толерантностью к глюкозе подвергаются несколько повышенной опасности развития высокого кровяного давления, липидных нарушений крови и диабета типа 2.

45 Селективная проницаемость – предпочтительная проницаемость оболочки для определенных видов ионов.

50 PoERV (свиной эндогенный ретровирус) – эндогенный ретровирус, существующий как часть ДНК у млекопитающих и передаваемый потомкам через следующие поколения.

Послеобеденный – возникающий после приема пищи.

Проинсулин – белок, который вырабатывается панкреатическими бета-клетками и расщепляется на 3 элемента: С-пептид, альфа-цепь и бета-цепь. Альфа- и бета-цепи являются функциональными элементами инсулина.

SGS (статическая стимуляция глюкозы) – статический тест на глюкозу, позволяющий оценивать секрецию инсулина островками в зависимости от изменения концентрации глюкозы.

Стрептозотоцин – антибиотик,  $C_8H_{15}N_3O_7$ , вырабатывается актиномицетом (*Streptomyces achromogenes*) и является активным противоопухолевым агентом, однако, повреждает инсулиновырабатывающие клетки и в настоящее время считается канцерогеном.

Теофиллин – стимулирует выделение катехоламинов и уменьшает церебральный кровоток, способствуя при этом усилиению метаболических реакций и повышению чувствительности к уменьшению содержания глюкозы.

Терапевтически эффективная доза – доза терапевтического агента, образованного клетками или тканью, которая при введении субъекту, нуждающемуся в соответствующем лечении, является достаточной для обеспечения лечения заболевания или нарушения или для эффективного изменения скорости роста или состояния животного. Количество инкапсулированных клеток или ткани, соответствующее терапевтически эффективной дозе, изменяется в зависимости от таких факторов, как состояние заболевания и его тяжесть, индивидуальные особенности субъекта, который нуждается в лечении, и тип терапевтического агента, доставляемого клетками или тканью с целью лечения заболевания или нарушения, однако, специалист в данной области может легко определить указанную дозу.

Лечение – облегчение заболевания или нарушения у субъекта, в частности, у человека, путем дозированного введения субъекту, нуждающемуся в лечении, инкапсулированных клеток или ткани посредством подкожной инъекции или трансплантации или непосредственного введения в соответствующие органы путем прямой инъекции в субстанцию органа или инъекции в сосудистую систему этих органов, при этом лечение включает:

а) профилактическое лечение субъекта, в особенности, если установлена предрасположенность субъекта к заболеванию или нарушению, которые еще не диагностированы у него,

- 5            б) подавление заболевания или нарушения,  
               в) полное или частичное устранение заболевания или нарушения и/или  
               10      г) улучшение здоровья и самочувствия субъекта.

15           Диабет 1-го типа (также инсулинов зависимый диабет, инсулинов независимый сахарный диабет) – форма сахарного диабета, которая обычно развивается в детстве или юности, характеризуется тяжелой недостаточностью секреции инсулина вследствие атрофии островков Лангерганса и вызывает гипергликемию и заметную 20 тенденцию к кетоацидозу.

25           Диабет 2-го типа (также инсулин независимый диабет, инсулин независимый сахарный диабет) – распространенная форма сахарного диабета, которая развивается в особенности у взрослых и наиболее часто – у лиц с избыточным весом, и характеризуется гипергликемией, вызванной нарушением потребления инсулина в сочетании с неспособностью организма компенсировать повышенную выработку инсулина.

30           Ксенотрансплантаты – трансплантат или ткань, полученные у особей одного вида и хирургически пересаженные особям другого вида, рода или семейства. Известны также как гетеротрансплантаты.

### 35           ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫЕ ПРИМЕРЫ РЕАЛИЗАЦИИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам лечения заболевания или 40 нарушения путем имплантации инкапсулированного биологического материала пациентам, которые нуждаются в лечении. Особый интерес в этом отношении 45 представляет диабет, поскольку для этого заболевания требуется способ предотвращения осложнений, связанных с недостатком хорошего гликемического контроля у больных диабетом, которым требуется инсулин. В частности, как показано далее, островковые аллотрансплантаты с конформным покрытием PEG были успешно 50 введены путем инъекции в подкожный сайт больным диабетом обезьянам и обеспечивали относительно нормальный уровень глюкозы в крови в течение 220 дней после имплантации. Осложнений, встречающихся при клинической трансплантации

островков, а также большого риска и дискомфорта от непрерывной иммунодепрессии можно избежать, применяя описанные здесь способы для лечения пациентов, страдающих инсулинозависимым диабетом. Кроме того, предполагается, что инкапсулированные островковые имплантаты обеспечат защиту таких пациентов, страдающих инсулинозависимым диабетом, и предотвратят развитие у них осложнений, связанных с неадекватным гликемическим контролем, независимо от 5 экзогенной инсулиновой терапии.

Способы согласно настоящему изобретению могут обеспечить терапевтические 10 эффекты для различных заболеваний и нарушений кроме диабета, при этом 15 критические клеточные продукты, которые утрачиваются в результате заболевания или нарушения, могут быть заменены путем имплантации в организм соответствующих 20 клеток или ткани. Предпочтительный вариант реализации изобретения заключается в применении инсулиновырабатывающих клеток из поджелудочной железы человека или 25 клеток, производных от инсулиновырабатывающих клеток из поджелудочной железы человека, которые инкапсулируют в форме клеточных кластеров для имплантации в 30 подкожный сайт пациентов, имеющих потребность в инсулине. Лечение заболевания с помощью инкапсулированных биологических материалов требует, чтобы на инкапсулированный материал было нанесено биосовместимое покрытие, таким образом, чтобы иммунная система пациента, подвергаемого лечению, не разрушила 35 материал до реализации терапевтического эффекта.

Селективная проницаемость покрытия является одним из факторов, определяющих эффективность такого лечения, поскольку она регулирует поступление 35 питательных веществ в клетки или ткань и играет определенную роль в предотвращении отторжения биологических материалов. Селективная проницаемость покрытия влияет на питание инкапсулированных клеток или ткани, а также на 40 функционирование этих клеток или ткани. Селективную проницаемость можно регулировать, изменяя компоненты биосовместимого покрытия или технологию их применения для получения клеточного покрытия. Лечение посредством инъекции 45 инкапсулированных биологических материалов согласно настоящему изобретению обеспечивает стабильный и безопасный способ лечения. Размер имплантата и сайт имплантации, а также восстановление и/или замена инкапсулированных материалов тоже рассматриваются в описанных здесь способах. Эти способы обеспечивают 50 лечение, которое имеет широкий спектр применений для заболеваний с

использованием различных сайтов имплантации и позволяет избежать осложнений, связанных с другими способами лечения.

Описанные здесь конформные покрытия могут быть получены с различными 5 размерами пор для того, чтобы ограничить доступ к клеткам белков в широком интервале молекулярных масс, а также исключить доступ антител. Такое 10 регулирование позволяет сохранить жизнеспособность и функциональность инкапсулированных материалов за счет исключения контактов с компонентами иммунной системы организма хозяина. Соответствующий размер пор конформного 15 покрытия можно подобрать с помощью стандартных экспериментов для каждого типа клеток или ткани, а также заболевания или нарушения, подлежащих лечению. Описанные здесь конформные покрытия обеспечивают получение миниатюрного 20 продукта с инкапсулированными клетками, имеющего минимальный объем материала покрытия и поэтому позволяющего имплантировать материалы с нанесенным покрытием в различные участки организма, включая прямую инъекцию в печень, 25 селезенку, мышцу или другие органы, инъекцию в орган посредством сосудистой системы, инъекцию в брюшинную полость и имплантацию в подкожный сайт.

Важным фактором успешности инкапсуляционной клеточной терапии является 25 инертность и отсутствие воспалительных реакций со стороны организма хозяина в отношении покрытия с селективной проницаемостью, используемого для инкапсулирования клеток. Ранее используемые инкапсулирующие покрытия не имели 30 полной биосовместимости. Для некоторых устройств достаточно наличия небольшой перегородки. Однако, если покрытие с селективной проницаемостью используют для 35 защиты инкапсулированных клеток от иммунной системы организма хозяина, не допускается возникновение неспецифической воспалительной реакции с системой комплемента или макрофагами организма хозяина. В противном случае 40 воспалительной и/или иммунной реакции оказывается достаточно для выделения цитокинов, которые легко проникают сквозь оболочку и могут вызывать потерю инкапсулированных клеток. Большинство технологий инкапсуляции островков, 45 которые имели сложности с адекватным функционированием, вызывали неспецифические воспалительные реакции вследствие недостаточной биосовместимости с материалами покрытия.

Такие проблемы, как хроническое воспаление, существенно уменьшаются 50 вследствие отсутствия реакции организма хозяина на биосовместимые конформные

покрытия, применяемые для инкапсуляции клеток и тканей в способах согласно настоящему изобретению. Показано, что компоненты, применяемые для получения конформных покрытий согласно настоящему изобретению, обеспечивают полную биосовместимость при инъекции животным, в частности, грызунам, собакам, свиньям и обезьянам.

Авторы настоящего изобретения установили, что биосовместимость гидрогелей, синтезированных из высоко акрилированного PEG, была исключительно высокой и гораздо лучшей, чем из умеренно акрилированного PEG. Высоко акрилованные PEG либо приобретали в готовом виде, либо изготавливали своими силами путем акрилирования соответствующих PEG. Гидрогели из высоко акрилированного PEG конформно покрывали поверхность альгинатных микропранул с помощью технологии межфазной фотополимеризации. Этот способ можно распространить на другие, биомедицинские, биотехнологические и фармацевтические области применения, где требуется биосовместимость устройств или составов.

Некоторые описанные здесь конформные покрытия PEG биологически разлагаются с течением времени, что исключает необходимость восстановления инкапсулированных материалов, как этого требуют другие способы лечения. Замену клеток можно производить в любой момент, после того как предыдущая доза начнет утрачивать свою функцию. Можно ожидать, что жизнеспособность инкапсулированных островков сохранится в течение от двух до пяти лет или более. В случае под кожных инъекций замену инкапсулированных материалов можно просто произвести с помощью другой под кожной инъекции новых материалов пациенту в другой сайт перед окончанием действия предшествующей дозы. В случае инкапсулированных островков их замену можно произвести до окончания функционирования первой дозы островков, не опасаясь низких значений содержания глюкозы, поскольку инкапсулированные островки обеспечивают саморегуляцию для предотвращения гипогликемии. Для лечения заболеваний и нарушений с помощью клеток или тканей, не обеспечивающих саморегуляции выделения их продукта, может потребоваться определение соответствующих интервалов времени трансплантации.

Важным фактором для получения инкапсулированных клеточных продуктов является источник клеток. Эти клетки могут быть эмбриональными клетками, растянутыми клетками, дифференцированными клетками, клеточными линиями или клетками, полученными с помощью генной инженерии. В случае островков человека

5 первичные островки можно выделять из поджелудочной железы трупов, однако, количество поджелудочных желез человека, доступных для выделения островков весьма ограничено. Поэтому для получения клеток, предназначенных для инкапсуляции и инъекции, можно использовать альтернативные источники.

10 Одним из альтернативных источников клеток, в особенности инсулиновырабатывающих клеток, являются эмбриональные стволовые клетки.  
 15 Эмбриональные стволовые клетки человека получают из плода на очень ранней стадии развития. Они являются пригодными только, если выращены из замороженных оплодотворенных яйцеклеток человека, полученных у пар, которые успешно прошли искусственное оплодотворение и больше не хотят хранить эти оплодотворенные яйцеклетки для будущих детей. Эмбриональные стволовые клетки способны расти бесконечно, что потенциально устраниет потребность в массе тканей, необходимых для 20 трансплантации. Существует ряд операций, которые необходимо выполнить, чтобы модифицировать эти эмбриональные стволовые клетки в клетки, производящие инсулин с клиническим соответствием. Некоторые исследования показали, что 25 эмбриональные стволовые клетки мыши и человека могут вырабатывать инсулин при обработке в тканевой культуре с различными факторами. Инсулиновырабатывающие клетки, полученные из эмбриональных стволовых клеток могут быть приемлемым источником для трансплантации и имплантации инкапсулированных клеток или 30 тканей.

### **Источники клеток**

35 Дополнительные источники клеток – органоспецифические клетки-предшественники из головного мозга, печени и кишечника, которые, как было показано, также вырабатывают инсулин. Органоспецифические клетки-предшественники из многих других органов, в частности, из костного мозга, почки, 40 селезенки, мышцы, кости, хряща, кровеносных сосудов и других эндокринных органов могут быть также полезны для получения инсулиновырабатывающих клеток.

Панкреатические клетки-предшественники можно использовать способами согласно изобретению. Поджелудочная железа, по-видимому, имеет 45 органоспецифические стволовые клетки, которые могут вырабатывать в организме при нормальных и восстановительных условиях три типа панкреатических клеток. Предполагают, что островковые клетки отпочковываются от дуктальных клеток, 50 образуя дискретные островки. Инсулиновырабатывающие бета-клетки, а также клетки,

вырабатывающие другие гормоны, могут образовываться непосредственно из видоизменяющихся дуктальных клеток или из панкреатических клеток-предшественников, расположенных среди дуктальных клеток. Эти панкреатические клетки-предшественники можно использовать для получения инсулиновырабатывающих клеток, предназначенных для инкапсуляции и имплантации способами согласно настоящему изобретению.

Проведено множество исследований по генетической инсерции генов в клетки, не вырабатывающие инсулина, чтобы заставить их вырабатывать инсулин. Клетки, полученные методами генной инженерии, способные вырабатывать инсулин, также могут быть использованы для инкапсуляции и имплантации способами согласно настоящему изобретению.

Применение свиных клеток обычно рассматривают в качестве островковых клеток для имплантации пациентам, страдающим диабетом. Только в США для производства мяса выращивают более 90 миллионов свиней в год. Поэтому количество островков для лечения миллионов пациентов с инсулиновозависимым диабетом можно легко получить за счет массовой переработки поджелудочной железы взрослых свиней в очищенные свиные островковые клетки, предназначенные для инкапсуляции. Одним из факторов, ограничивающих этот подход, является аккумулирование организмом свиной эндогенного ретровируса (PoERV). Предпринимались попытки устраниć PoERV из свиных штаммов. Не содержащие вирусов свиные ксенотрансплантаты можно легко инкапсулировать и использовать в качестве предпочтительного источника клеток для лечения диабета у человека.

Альтернативные источники ксенотрансплантатов для имплантации человеку можно получить из эмбриональных клеток других видов животных, кроме свиней. К таким типам относятся сельскохозяйственные животные, в частности, коровы, овцы и даже рыбы. С помощью развития и видоизменения инсулиновырабатывающих клеток, получаемых из панкреатических источников или других стволовых клеток или клеток-предшественников, можно предположить использование инсулиновырабатывающих клеток из множества других экзогенных источников, в частности, обезьян, грызунов, кроликов, рыб, сумчатых, копытных и других животных.

## Лечение заболеваний

Диабет и другие заболевания, при которых имеет место недостаточность или отсутствие локального или циркуляционного фактора, можно лечить способами согласно настоящему изобретению. Инкапсуляционную клеточную терапию можно применять для лечения неврологических, сердечно-сосудистых, печеночных, эндокринных, кожных, кроветворных и иммунных нарушениях и заболеваниях.

Неврологические заболевания и поражения, в частности, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, хорея Гентингтона, рассеянный склероз, слепоту, повреждение периферического нерва, повреждение спинномозгового нерва, боли и наркоманию, можно лечить с помощью инкапсулированных клеток, которые способны выделять локальные и/или циркуляционные факторы, необходимые для лечения этих заболеваний. Можно лечить также сердечно-сосудистую ткань, в частности, коронарную артерию, а также ангиогенный фактор роста, выделяющий клетки, которые используются для восстановления кровоснабжения ишемической сердечной мышцы, клапанов и мелких сосудов. Возможно также лечение острых заболеваний печени, хронических заболеваний печени и генетических заболеваний, оказывающих влияние на печень. Можно лечить также эндокринные нарушения и заболевания, в частности, диабет, ожирение, стрессовое и адреналиновое, заболевания околощитовидной железы, яичек и яичника. Возможно также лечение кожных заболеваний, например, хронических язв и болезней кожных и волосяных стволовых клеток. Кроветворные факторы, например, фактор VIII и эритропоэтин, можно регулировать или контролировать путем введения клеток, способных стимулировать у пациента кроветворную реакцию. Инкапсулированные биологические материалы могут быть полезными также для получения стволовых клеток костного мозга. Инкапсулированные материалы, в частности, антигены из эмбриональных клеток или клеток, полученных с помощью генной инженерии, могут быть полезными для обеспечения иммунной непереносимости или предотвращения аутоиммунного заболевания. Кроме того, эти материалы можно использовать в вакцинах.

## Компоненты конформного покрытия

Компоненты покрытия можно изменять в зависимости от конкретного типа клеток и желаемой селективной проницаемости. Для получения клеток или тканей с

конформным покрытием можно использовать различные полимеризуемые мономеры или макромеры, фотоинициирующие красители, сокатализаторы и ускорители.

5

### Мономеры или макромеры

10

15

20

Мономеры или макромеры используют в качестве функциональных блоков для полимеризации биосовместимых покрытий, применяемых способами согласно настоящему изобретению. Мономеры представляют собой миниатюрные полимеры, склонные к полимеризации в более крупные полимерные мембранны согласно изобретению. Полимеризация оказывается возможной, поскольку макромеры содержат углерод-углеродные группы с двойной связью, в частности, акрилат, метакрилат, этакрилат, 2-фенилакрила, 2-хлоракрилат, 2-бромакрилат, итаконат, акриламид, метакриламид и стирольные группы. Мономеры и макромеры являются нетоксичными для биологического материала до и после полимеризации.

25

30

35

40

Примерами мономеров являются метилметакрилат (ММА) и 2-оксиэтилметакрилат (HEMA). Примеры макромеров – ненасыщенные этиленовые производные полиэтиленоксида (PEO), полиэтиленгликоль (PEG), поливиниловый спирт (PVA), поливинилпирролидон (PVP), политиоксазолин (PEOX), полиаминокислоты, полисахариды, в частности, альгинат, гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат, декстран, декстрансульфат, гепарин, гепаринсульфат, геперансульфат, хитозан, геллановая камедь, ксантановая смола, гуаровая камедь, водорастворимые производные целлюлозы, каррагенан и белки, в частности, желатин, коллаген и альбумин. В зависимости от области применения в этих макромерах можно изменять молекулярную массу и количество ветвей. Для получения минимальной тканевой реакции при инкапсуляции клеток и ткани предпочтительным исходным макромером является PEG-триакрилат с молекулярной массой 1,1 кД. Молекулярная масса указывается как средняя молекулярная масса полимера смешанной длины.

### Фотоинициирующие красители

45

50

Фотоинициирующие красители поглощают световую энергию и инициируют полимеризацию макромеров и мономеров. При этом можно использовать любой краситель, который поглощает световую энергию с частотой от 320 нм до 900 нм, может образовывать свободные радикалы, по меньшей мере частично растворяется в

воде и является нетоксичным для биологического материала при концентрации, применяемой для полимеризации. Примерами таких красителей являются этилэозин, эозин Y, флуоресцин, 2,2-диметокси,2-фенилацетофенон, 2-метокси, 2-фенилацетофеноно, камфорхинон, бенгальский розовый, метиленовый синий, эритрозин, флоксин, тионин, рибофлавин и метиленовый зеленый. Для увеличения поверхности связывания краситель-клетка применяемые красители конъюгируют с 5 полимерами, которые имеют сильное взаимодействие с поверхностью клеток, в частности, с поликатионными полимерами, с полимерами, к которым присоединено множество групп фенилборной кислоты. Примеры поликатионных полимеров 10 включают дендример РАМАМ, линейный, разветвленный или дендритный полиэтиленимин (PEI), поливиниламин, полиаллиламин, полилизин, хитозан и полигистидин. Предпочтительный инициирующий краситель – карбоксиэозин, 15 конъюгированный с дендримером РАМАМ 4 поколения.

20

### Сокатализатор или генератор радикалов

Сокатализатор представляет собой соединение на основе азота, способное 25 стимулировать реакцию свободных радикалов. Первичные, вторичные, третичные или четвертичные амины являются пригодными сокатализаторами, как и любые богатые 30 электронами молекулы, содержащие атом азота. Сокатализаторы включают, в частности, но без ограничения триэтаноламин, триэтиламин, этаноламин, N-метилдиэтаноламин, N,N-диметилбензиламин, дibenзиламино, N-бензилэтаноламин, 35 N-изопропилбензиламин, тетраметилэтилендиамин, персульфат калия, лизин, орнитин, гистидин и аргинин. Предпочтительным сокатализатором является триэтаноламин.

40

### Ускоритель или сомономер

45

Ускоритель, который может быть включен в полимеризационную смесь, представляет собой небольшую молекулу, содержащую аллиловую, виниловую или акрилатную группу и способную ускорять реакцию свободных радикалов. Введение в 50 ускоритель группы сульфоновой кислоты может также улучшать биосовместимость готового продукта. Ускорители включают, в частности, но без ограничения N-винилпирролидинон, 2-винилпиридин, 1-вилимидазол, 9-винилкарбазон, 9-винилкарбазол, акриловую кислоту, 2-аллил-2-метил-1,3-цикlopентандион, 2-оксиэтилакрилат, 2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновую кислоту, винилсульфоновую

кислоту, 4-стиролсульфоновую кислоту, 3-сульфопропилакрилат, 3-сульфопропилметакрилат, *n*-винилкапролактам, *n*-ванилмалеимидсульфонат (производства SurModics), при этом предпочтительной комбинацией ускорителей является 2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновая кислота плюс *N*-ванилпирролидинон.

### Усилиатель вязкости

Для получения конформного покрытия, не образующего длинных хвостов на клеточных агрегатах, можно оптимизировать вязкость раствора макромера. Это можно реализовать с помощью усилителей вязкости, добавляемых в раствор макромера. Предпочтительными усилителями вязкости являются PEG-триол с молекулярной массой 3,5 кД и PEG-диол с молекулярной массой 4 кД.

### Агенты, регулирующие плотность

Для получения конформного покрытия, не образующего длинных хвостов на клеточных агрегатах, можно оптимизировать плотность раствора макромера. Это можно реализовать, добавляя в раствор макромера, агенты, регулирующие плотность. Предпочтительными агентами, регулирующими плотность, являются Nicodenz<sup>TM</sup> и Ficoll<sup>TM</sup>.

### Длина волны излучения

Излучение, которое применяют, чтобы инициировать полимеризацию, представляет собой либо длинноволновое ультрафиолетовое излучение, либо видимый свет с длиной волны от 320 до 900 нм. Предпочтительно использовать световое излучение в диапазоне 350-700 нм, более предпочтительно - в диапазоне 365-550 нм. Свет может создаваться любым источником, способным генерировать желательное излучение, в частности, ртутной лампой, длинноволновой ультрафиолетовой лампой, гелиево-неоновым лазером, аргоновым ионным лазером или ксеноновым источником света с соответствующей фильтрацией.

Приведенные ниже примеры представлены исключительно для иллюстрации настоящего изобретения, и их не следует рассматривать в качестве ограничения области распространения настоящего изобретения.

## ПРИМЕРЫ

### Пример 1

#### Выделение островковых клеток у мышей

Донорских мышей [C57BL/6] возрастной категории 18 недель и средней массой 33 грамма получили от поставщика. Вскрыли поджелудочные железы с помощью эвтаназийной лапаротомии. Разрыхлили поджелудочные железы коллагеназой производства компании Sigma, тип V. Удалили поджелудочные железы и поместили в холодную коллагеназу на время транспортировки в лабораторию, где производили выделение клеток. Для выделения использовали 30 поджелудочных желез, подвергнутых биологической обработке. Дигестат промыли 10% раствором сыворотки из эмбрионов крупного рогатого скота в среде RPMI (разработка Roswell Park Memorial Institute) и подвергли центрифугированию. Для проведения очистки приготовили СОВЕ и использовали маркер непрерывного градиента, чтобы получить градиент плотности. Градиент загрузили в СОВЕ, а поверх него загрузили дигестат поджелудочной железы, чтобы произвести очистку. Очищенные островки собрали и промыли в среде RPMI. Островки культивировали в колбах T75 с модифицированной средой ICM, содержащей добавку 10% раствора сыворотки из эмбрионов крупного рогатого скота, до готовности к инкапсуляции.

#### Выделение островковых клеток у обезьян

Молодых обезьян вида *Cupomolgus* (*Macaca fascicularis*, макак-крабоед) с массой в пределах 2,5 – 4,5 кг и взрослых бабуинов (*Papio anubis*, павиан анубис) с массой в пределах 10 – 30 кг использовали в качестве доноров поджелудочной железы (таблица 1). Поджелудочную железу удалили при аутопсии, канюлировали протоки и разрыхлили в холодном растворе UW, поместив в раствор UW с перфторированным углеводородом при барботировании кислородом, и доставили курьером в лабораторию для выделения островков. Использовали модифицированный способ выделения островков обезьян (O'Neil, J. Cell Transplantation 10; 539, 2001) с помощью либеразы человека, чтобы выделить островки при минимальном механическом повреждении и с непрерывными градиентами плотности СОВЕ. Очищенные островки культивировали в колбах T75 с модифицированной средой CMRL, содержащей добавку 10% раствора

сыворотки из эмбрионов крупного рогатого скота, при 37°C в течение 3-7 дней до инкапсуляции, чтобы обеспечить их восстановление после технологических повреждений. На фиг.1 А показан типичный выход очищенных островков обезьян вида 5 *Cynomolgus*, полученных из донорских поджелудочных желез.

Таблица 1

10

Сравнение процедур выделения островков у обезьян вида <i>Cynomolgus</i> и бабуинов	
15 <i>Cynomolgus</i>	Бабуин
Методика	Методика
20 молодой донор	доноры в возрасте 10-20 лет
поджелудочные железы 4 г	поджелудочные железы 25 г
25 групповая обработка поджелудочных желез	индивидуальная обработка поджелудочных желез
коллагеназа с концентрацией 0,5 мг/мл	коллагеназа с концентрацией 0,20 мг/мл
время обработки 40 мин.	время обработки < 20 мин.
30 Результаты	Результаты
30 000 – 50 000 IEQ на поджелудочную железу	150 000 – 200 000 IEQ на поджелудочную железу
островковый коэффициент 0,80	островковый коэффициент 1,00
35 Количество доноров на трансплантат: 5-10	Количество доноров на трансплантат: 2

Пример 2

## 40 Получение материалов для конформного покрытия

В зависимости от типа инкапсулируемых клеток на клетки непосредственно наносили конформное покрытие или помещали их в матрицу, в частности, в альгинат, а 45 затем покрывали капсулой из PEG с селективной проницаемостью. На фиг. 2 показана схема синтеза предпочтительного варианта этого покрытия - дендримерного конъюгата эозина Y, дендримера-EY, который описан далее.

50

В качестве дендримера для инкапсулирования использовали дендример РАМAM поколения 4, производства компании Dendritech (фиг. 3). Путем бромирования 5(6)-карбоксифлуоресцеина получили 5(6)-карбоксиэозин. Затем защитили гидроксильную 5 группу и 1-карбоксильную группу путем формирования ацетата. Защищенный 10 5(6)-карбоксиэозин активировали N,N,N'N'-тетраметил-O-(T-сукцинимидил)урановым тетрафторборатом (TSTU). Без дополнительной очистки активированный 5(6)-карбоксиэозиндиацетат смешали с дендримером РАМAM, получив конъюгат 15 дендример-EY. Затем удалили защитную группу с помощью реакции с водным раствором аммиака. Произвели ультра-очистку готового продукта с использованием мембранных 20 с 5 K MWCO и 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  в качестве промывного буфера. Изменяя стехиометрическое отношение EY и дендримера, можно получить дендример-EY с различными уровнями конъюгирования. Оптимальный уровень конъюгирования, используемый для инкапсуляции островков, составлял 3,4 EY/дендример.

Уровень конъюгирования определяли с помощью спектрофотометрического анализа в видимой и ультрафиолетовой областях света. Максимальное поглощение при длине волны 523 нм получили для раствора дендример-EY в 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ . 25 Рассчитали уровень конъюгации, используя коэффициент поглощения 5(6)-карбоксиэозина,  $\Sigma = 8,4 \times 104$ .

Триэтаноламин (TEOA), 2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновую кислоту 30 (AMPS) и N-винилпирролидон (NVP) был приобретен у компании Aldrich без дополнительной очистки.

Триметилпропанэтоксилаттриакрилат (PEG 1.1K-TA) был приобретен у 35 компании Sartomer и далее использован без дополнительной очистки. Уровень акрилирования изменялся от верхних 60-х до верхних 80-х. Молекулярные массы лежали в пределах от 1100 до 1300.

Этоксилированный триметилолпропан (PEG 3,5K-триол) был синтезирован по 40 заказу компанией Carbotech. Полиэтиленгликоль 3400 (PEG 4K-диол) приобрели у компании Union Carbide. PEG 3,5K-триол и PEG 4K-диол растворили в воде для инъекций и лиофилизировали перед применением.

## 50 Пример 3

## Инкапсулирование островков

### Инкапсулирование мышиных островков

Предпочтительный способ инкапсулирования мышиных островков описан ниже.

Пятнадцать миллилитров 20 мМ низкого ионного буфера HEPES (содержащего 1,8 мМ CaCl<sub>2</sub> и 260 мМ маннитола, pH = 7,0) добавили в 15 мл коническую пробирку, содержащую 10 мкл островков. После центрифугирования удалили надосадочный слой.

15 мл раствора дендример-EY (0,1 мг/мл к 0,4 мг/мл в низком ионном буфере HEPES) добавили к осадку и выдержали пробирку горизонтально в течение 10-30 минут при комнатной температуре. Окрашенные островки дважды промыли низким ионным 20 мМ буфером HEPES, через который не менее 30 минут барботировали аргон. Осадок, содержащий окрашенные островки, смешали с 10 мл раствора светочувствительного полимера, через который также барботировали аргон и предварительно стабилизировали в водяной бане при 8°C не менее 30 минут. Получили раствор светочувствительного полимера в 20 мМ буфере HEPES, pH = 8,0, содержащий до 20% PEG, 100 мМ TEoA, 32 мг/мл AMPS, 2 мкл/мл NVP и 13% Nycodenz. Раствор перенесли в чашку Петри и облучили его аргоновым лазером с плотностью излучения 200 мВ/см<sup>2</sup> в течение 1 минуты. Полимеризацию погасили добавлением 1-2 мл M199 в чашку Петри. Содержимое чашки Петри перенесли в коническую колбу, содержащую 40 мл M199. После промывки в M199 инкапсулированные островки возвратили в культуру.

### Инкапсулирование островков обезьян

Островки загрузили в фотоинициатор (эозин Y) и поместили в инкапсулирующий раствор PEG, содержащий акрилатный мономер PEG, TEoA и NVP. При облучении островков аргоновым лазером связанный эозин Y активировался до более высокого энергетического состояния и захватывался TEoA с образованием свободных радикалов. Эти радикалы TEoA диффундировали с поверхности островков, разрушали углерод-углеродные двойные связи (C=C) между акрилатами, которые ковалентно соединяли акрилатные PEG, и образовывали конформные покрытия непосредственно вокруг каждого островка. Затем инкапсулированные островки культивировали при 37°C в CMRL с добавкой 10% термоактивированной сыворотки аллотрансплантата обезьяны вида *Cynomolgus* от 4 до 21 дня до имплантации.

Отдельные островки обезьяны вида *Cynomolgus* легко инкапсулировались конформным покрытием, полностью окружающим поверхность островка независимо

от его формы и размеров. На фигуре 1А показаны неинкапсулированные выделенные островки обезьяны вида *Cynomolgus*. На фигуре 1А представлены инкапсулированные выделенные островки обезьяны вида *Cynomolgus*, при этом фазоконтрастная 5 микроскопия показывает равномерное конформное покрытие островков.

#### Пример 4

##### 10 Исследование инкапсулированных островков в искусственных условиях

Эффективность покрытия инкапсулированных островков оценивали с помощью окрашивания синим красителем Эванса. Пятнадцать миллилитров 0,008% синего красителя Эванса добавили к 0,5 мл суспензии инкапсулированных островков. После 15 инкубации в течение трех минут удалили надосадочный слой с помощью центрифугирования и аспирации. Островки три раза промыли средой M199. Суспензию 20 островков (в M199) поместили под микроскоп. Гидрогель PEG окрасился в голубой цвет.

Жизнеспособность инкапсулированных островков определяли с помощью 25 окрашивания флуоресцеиндиацетатом (FDA)/этидиумбромидом (EB). 2,5 мл маточного раствора EB (1 мг в 50 мл физиологического раствора с фосфатным буфером) и 12,5 мкл маточного раствора FDA (5 мг/мл в ацетоне) добавили к 0,5 мл суспензии 30 инкапсулированных островков в среде, свободной от сыворотки. Через десять минут после добавления красителя образец поместили в люминесцентный микроскоп с использованием блока полей для флуоресцина. Мертвые клетки окрасились в красный цвет, а живые клетки – в зеленый. Определили процентное содержание живых 35 островковых клеток. Пример показан на фиг. 4.

Проницаемость инкапсулированных островков определили с помощью 40 электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE). Небольшую аликвоту инкапсулированных островков подвергли анализу способом SDS- 45 PAGE перед тем, как их поместили в среду, содержащую сыворотку. Один или два островка среднего размера поместили в поле микроскопа и инкубировали отдельно в планшете с 96 лунками в культуре, содержащей 0,1% раствор додецилсульфата натрия (SDS), в течение примерно 14-16 часов при комнатной температуре. Обычно отбирали и инкубировали не менее восьми серий островков. Кроме того, одновременно отобрали 50 и инкубировали пул из 10 островков. После инкубации отобрали надосадочный слой и инкубировали при 100°C в течение 5 минут. После охлаждения девять надосадочных

слоев загрузили на соответствующий полиакриламидный гель. В последнюю лунку загрузили смесь маркеров со стандартной молекулярной массой. После электрофореза материала в лунках гель зафиксировали и окрасили серебряным красителем в течение 5 контрольного периода. Отсечку молекулярной массы геля PEG для каждой серии инкапсулированных островков определяли путем сравнения со стандартной молекулярной массой маркера. Пример показан на фиг. 5.

10       Функционирование инкапсулированных островков определяли с помощью статической стимуляции глюкозы или перфузационного анализа. Для статической стимуляции глюкозы отобрали вручную четыре аликвоты по 20 островков и поместили 15 их в четыре лунки планшета с 12 лунками. Островки промыли дважды и инкубировали с основным раствором G50 (концентрация глюкозы – 50 мг/дл) в течение 45 минут, затем – со стимулирующим раствором G300 (концентрация глюкозы – 300 мг/дл) в 20 течение 45 минут, затем – с раствором IBMX в течение 45 минут и затем – с основным раствором G50 в течение 45 минут. В конце каждой инкубации отбирали 0,5 мл образца надосадочного слоя. Между инкубациями островки дважды промывали. После отбора последних основных образцов все островки инкубировали с кислым спиртом в течение 25 ночи для экстракции инсулина. После экстракции инсулина отобрали образцы надосадочного слоя по 0,5 мл. Во всех отобранных образцах измерили концентрацию инсулина с помощью соответствующего инсулинового набора для 30 радиоиммунологического анализа (RIA) или иммуносорбентного анализа с применением фиксированных ферментов (ELISA). В случае некоторых инкапсулированных островков имела место задержка выделения инсулина, и лишь 35 минимальное содержание инсулина обнаружили после инкубации в течение 45 минут со стимулирующей средой G300. Эти образцы инкубировали в стимулирующей среде G300 в течение дополнительного периода времени и отбирали образцы через различные интервалы времени, в частности, через 1, 2 и 3 часа, чтобы проследить 40 кинетику выделения инсулина. Пример показан на фиг. 6.

Для исследования перфузии островковый препарат поместили на фильтр перфузационной системы, вначале выдержали в течение 40 минут с основным раствором 45 G50, затем в течение 40 минут выдержали в стимулирующем растворе G300, а после этого дополнительно стимулировали раствором G300 плюс теофиллин или IBMX. Перфузии островков закончили возвращением к основному уровню глюкозы. Образцы

отбирали с интервалом 5 минут и измеряли концентрацию инсулина с помощью соответствующего инсулинового набора для RIA или ELISA.

5

### Пример 5

#### Имплантация мышам островков с конформным покрытием

На мышиные островки нанесли конформное покрытие способом, аналогичным описанному в примере 2. Инкапсулированные островки имплантировали во внутрибрюшинный (IP) и подкожный (SQ) сайты бестимусных мышей, в крови которых контролировали содержание глюкозы до трансплантации и после нее.

15

На фиг. 7 показано содержание глюкозы в крови двух бестимусных мышей, которым во внутрибрюшинный сайт имплантировали мышиные островки [2805 IEQ] с конформным покрытием. Имплантированные островки оказались способными регулировать содержание глюкозы в крови в диапазоне, близком к нормальному, до 130 дней после имплантации.

На фиг. 8 показано содержание глюкозы в крови двух бестимусных мышей, которым в подкожный сайт имплантировали мышиные островки [3300 IEQ] с конформным покрытием. Обе мыши имели пониженные уровни глюкозы в крови за исключением нескольких выбросов между 20 и 30 днем после имплантации. Одна из мышей имела устойчивый, близкий кциальному уровню глюкозы в крови до 145 дня после имплантации. Другая мышь имела случайные выбросы содержания глюкозы в крови, однако, имплантированные островки оказались способными снизить уровень до нормальной величины через 30 дней после имплантации.

35

Конформные покрытия обеспечивали длительное выживание островков в IP сайте. Островки с покрытием также хорошо функционировали в SQ имплантатах в зависимости от дозировки островков. SQ сайт проявил превосходную биосовместимость у бестимусных мышей.

40

Аллотрансплантаты мышиных островков с конформным покрытием имплантировали также мышам CD1 в IP и SQ сайты, соответственно. На фиг. 9 показаны уровни глюкозы в крови, измеренные у двух мышей CD1, которым во внутрибрюшинный сайт имплантировали аллотрансплантаты мышиных островков [3300 IEQ и 2160 IEQ] с конформным покрытием. Имплантация 3300 IEQ обеспечила быстрое возвращение содержания глюкозы в крови кциальному уровню и

сохранение этого уровня до 90 дней после имплантации. Имплантат 2160 IEQ снизил содержание глюкозы в крови с 600 мг/дл до 100-300 мг/дл с низкими колебаниями ежедневных уровней.

На фиг. 10 показаны уровни глюкозы в крови, измеренные у двух мышей CD1, которым в подкожный сайт имплантировали высокие дозы аллотрансплантатов мышиных островков [3323 IEQ и 2000 IEQ] с конформным покрытием. Имплантат 3623 IEQ был способен снижать содержание глюкозы в крови до уровня, близкого к нормальному, и сохранять этот уровень до 35 дней после имплантации. Имплантат 2000 IEQ снижал содержание глюкозы в крови до нормального уровня и сохранял этот уровень до 30 дней.

Конформные покрытия защищали от иммунного отторжения аллотрансплантатов как в IP, так и в SQ сайтах. Установили, что постоянная минимальная функциональная доза инкапсулированных островков составляет 1500 IEQ/мышь в SQ сайте. Аллотрансплантаты некапсулированных мышиных островков не выживали в сайте SQ. Аллотрансплантаты мышиных островков с конформным покрытием имплантировали также мышам NOD (600-700 островков на одного реципиента). При этом конформные покрытия защищали не только от иммунного отторжения аллотрансплантатов, но также и от аутоиммунного рецидива диабета у этой мышевой модели диабета типа I человека. На фиг. 11 показано содержание глюкозы в крови больных диабетом мышей NOD, которым имплантировали аллотрансплантаты мышиных островков с конформным покрытием.

На фиг. 12 показано содержание глюкозы в крови бестимусных мышей, которым в подкожный сайт имплантировали островки человекообразных обезьян [5000 IEQ] с конформным покрытием. Имплантат быстро снижал содержание глюкозы в крови с 600 мг/дл до 35 мг/дл в период с 15 до 105 дня после имплантации.

На фиг. 13 показано содержание глюкозы в крови двух бестимусных мышей, которым в IP сайт имплантировали островки человека [11573 IEQ и 14688 IEQ]. Имплантаты снижали содержание глюкозы в крови до нормального уровня и сохраняли этот уровень до 110 дней после имплантации.

На фиг. 14 показано содержание глюкозы в крови бестимусной мыши, которой в SQ сайт имплантировали островки человека [10000 IEQ]. Имплантаты снижали содержание глюкозы в крови до нормального уровня и сохраняли этот уровень до 40 дней после имплантации.

Эти результаты показали, что конформное покрытие островков человекаобразных обезьян и человека обеспечивает выживание островков в IP и SQ сайтах бестимусных мышей.

5

### Пример 6

Подкожная имплантация инкапсулированных островков обезьянам вида *Cynomolgus*  
10 Обезьяны-реципиенты

Нормальной обезьяне вида *Cynomolgus* произвели резекцию поджелудочной железы (95%), а затем подкожно имплантировали островковый аллотрансплантат с 15 конформным покрытием. На фиг. 15 показаны содержание глюкозы и потребность в инсулине обезьяны вида *Cynomolgus* с частичной резекцией поджелудочной железы за 10 дней до и через 105 дней после имплантации островковых аллотрансплантатов с 20 конформным покрытием PEG. Вначале животное имело нормальное содержание глюкозы в крови без необходимости дополнительного введения инсулина. Через несколько дней после резекции поджелудочной железы содержание глюкозы в крови 25 повысилось до 300 мг/дл и вызывало потребность введения инсулина для снижения этого уровня до нормальной величины. После подкожной имплантации островковых аллотрансплантатов с конформным покрытием PEG содержание глюкозы в крови снизилось, однако, превышало первоначальный нормальный уровень. Потребность в 30 инсулине сохранялась в течение нескольких дней после имплантации, однако, его дозу медленно снижали до 55 дня после трансплантации, когда инсулиновые инъекции 35 больше не требовались для поддержания уровня глюкозы в крови. С 55 до 105 дня после трансплантации содержание глюкозы в крови обезьяны медленно повышалось над базовым уровнем, соответствующим предоперационному периоду, однако, имплантированные островки с покрытием PEG поддерживали соответствующее 40 содержание без инъекций инсулина.

При вскрытии в подкожном сайте обнаружили хорошо гранулированные инкапсулированные островки с минимальной реакцией организма хозяина. 45 Окрашивание глюкозы и инсулина было показано в капсулах, содержащих островковую ткань (фиг. 16-D). Многие инкапсулированные островки, вероятно, разрушенные после имплантации, не имели островковой ткани. Организм хозяина 50 разрушил эти капсулы с помощью воспалительных цитокинов, образовавшихся в результате хирургической инсерции и реакции на аллотрансплантат. Одним из

ограничений модели диабета у молодых обезьян с частичной резекцией поджелудочной железы является потенциальная способность остатка поджелудочной железы излечивать диабет за счет расширения сохраненной островковой ткани, при этом получены некоторые доказательства такого расширения в форме увеличенных островков в остаточной ткани.

Поскольку частичная резекция поджелудочной железы приводит к возникновению у обезьян различных моделей диабета с потенциальной возможностью спонтанного излечения за счет островков, сохранных в головной части поджелудочной железы, для индуцирования диабета стали использовать стрептозотоцин. У всех четырех последующих реципиентов диабет индуцировали внутривенной инъекцией стрептозотоцина.

Индукцию диабета у других животных с имплантатами производили с помощью внутривенной инъекции стрептозотоцина, растворенного в солевом растворе, с дозой 150 мг/кг. Нормальных обезьян вида *Cynomolgus* тестировали на толерантность к глюкозе в течение 1 недели перед индуцированием диабета с помощью инъекции стрептозотоцина. Через 3-4 недели после начала диабета снова провели тестирование на толерантность к глюкозе перед имплантацией островков. Двух больных диабетом обезьян вида *Cynomolgus* использовали в качестве контрольных и не вводили им инкапсулированных островков. У них возникла быстрая потеря гомеостаза глюкозы в крови с содержанием, достигающим 500 мг/дл. Потребовались большие дозы инсулина, чтобы снизить содержание глюкозы в крови до уровня, близкого к нормальному. Содержание глюкозы в крови имело сильные колебания с сопутствующей потребностью в инсулиновых инъекциях. Имело место также несколько эпизодов с весьма низким содержанием глюкозы в крови или гипогликемией. Организм животных не мог поддерживать нормальный постоянный уровень глюкозы в крови даже при ежедневных инъекциях инсулина. Инъекции стрептозотоцина вызывали быстрое разрушение  $\beta$ -островков, и организм животных был неспособен сохранять гомеостаз глюкозы в крови.

#### 45 Островковые имплантаты

После инъекции кетамина, цилозина и атропина обезьянам вида *Cynomolgus* побрали живот, подготовили и обложили операционными простынями для проведения стерильных инъекций. Внутренний катетер номер 14 вставили под кожу с каждой

стороны средней линии. Иглу удалили, заменили троакаром и сделали сбоку от поля инсерции 4-5 карманов в радиальных направлениях, вводя троакар в подкожную ткань. После получения карманов троакар удалили, оставив катетер на месте.

5 Инкапсуированные островки объединили из колб и загрузили в шприц объемом 10 мл, который присоединили к вставленному подкожно катетеру. Сделали различные проходы в созданных подкожных карманах, перемещая в них катетер во время 10 инъекции инкапсуированных островков в подкожные сайты. Проленовым кистетным швом 4-0 зашили инъекционный сайт в коже. Эту процедуру введения инкапсуированных островков по мере необходимости повторяли для каждого 15 реципиента по обеим сторонам от средней линии до тех пор, пока не ввели все инкапсуированные островки. Реципиентам дали возможность оправиться и возвратили в их клетки для дополнительного контроля содержания глюкозы.

20

#### Лечение препаратами

Реципиенту с частичной резекцией поджелудочной железы и одному из реципиентов с введенным стрептозотоцином не давали никаких лечебных препаратов.

25 Трем из четырех реципиентов с введенным стрептозотоцином и инкапсуированными островковыми аллотрансплантатами давали низкую дозу циклоспорина от -7 дня перед трансплантацией до +30 дня после трансплантации. Низкую дозу неоралциклоспорина 30 (10-30 мг/кг/день) вводили перорально два раза в день, впрыскивая ее в защечный мешок обезьянам вида *Cynomolgus* во время кормления. В течение 12 часов поддерживали уровень в пределах 25-100 нг/мл с помощью ELISA. Установили, что эта 35 доза не способна предотвратить отторжение почечного аллотрансплантата у обезьян вида *Cynomolgus*.

40

#### Контроль обмена веществ

Ежедневно проводили измерения содержания глюкозы до полудня и после обеда в 2 часа дня с помощью мониторов Accuchek и определяли среднее значение за день.

45 Оральный тест на толерантность к глюкозе (OGTT) проводили с поддержкой 7 ккал/кг и 2 мг/кг глюкозы в зондовом кормлении при анестезии кетамином, цилазином и атропином. Образцы для определения содержания глюкозы и С-пептида отбирали через 0, 30, 60, 90 и 120 минут.

50

Вскрытие

Животное с частичной резекцией поджелудочной железы вскрыли на 100-й день после имплантации. Удалили все основные ткани и произвели обработку для гистологического анализа.

Анализ

Мониторы глюкозы Accuchek использовали для ежедневного определения содержания глюкозы в крови. Содержание С-пептида определяли с помощью анализа ELISA (компания Linco) и антитело С-пептида человека подтвердило перекрестную реакцию с С-пептидом обезьяны вида *Cynomolgus* на 100% уровне. С помощью радиоиммунного анализа определяли содержание гликозилированного гемоглобина. Обычные химические анализы крови проводили для всех больных диабетом и реципиентов через регулярные интервалы времени. Для тестирования жизнеспособности инкапсулированных островков использовали анализ с флуоресцеиндиацетатом / этидиумбромидом (FDA/EB).

25

Реципиент с диабетом, индуцированным стрептозотоцином, не получавший лекарственного лечения

Обезьяны вида *Cynomolgus* - реципиенты с диабетом, индуцированным стрептозотоцином, имели тяжелую степень диабета (глюкоза: 150 – 350 мг/дл) и перед имплантацией нуждались в 16-18 единицах инсулина в день, что превышало потребность реципиента с частичной резекцией поджелудочной железы. Имели место типичные широкие отклонения содержания глюкозы, а также гипогликемические эпизоды. Содержание С-пептида, наблюдаемое у этих контрольных реципиентов, больных диабетом, по результатам теста на толерантность к глюкозе, было очень низким и не изменялось при введении глюкозы. Инкапсулированные островки имплантировали в подкожный сайт без иммунодепрессивных препаратов. Результаты, полученные для этих обезьян вида *Cynomolgus*, показаны на фиг. 17.

45

После подкожной имплантации наблюдали уменьшение в потребности инсулина на 50% в течение 80-90 дней, а затем функция островков несколько снизилась. Полной независимости от инсулина не удалось достичь, однако, после

50

имплантации результаты определения С-пептида по OGTT были аналогичны значениям, полученным до заболевания диабетом, или нормальным значениям, что указывает на функционирование имплантированных островков. Эти результаты соответствуют наблюдениям больных диабетом пациентов с частичной трансплантатной функцией после трансплантации островков с полной иммунодепрессией в клинических исследованиях, проводимых в настоящее время.

Гистологический анализ подкожных имплантатов реципиента показал наличие инкапсулированных островков с окрашиванием инсулина и глюкагона, рассеянных в сайтах имплантации среди множества пустых капсул. При этом возникает вопрос о причине потери такого большого количества инкапсулированных островков. Один из возможных ответов состоит в том, что разрушение инкапсуляции части островков макрофагами организма хозяина вызывает очаговую иммунную реакцию на аллотрансплантат вокруг соответствующей разрушенной капсулы, что приводит к уничтожению окружающих островков, не разрушенных макрофагами. Вместо этого указанные инкапсулированные островки могут быть уничтожены местными цитокинами, которые выходят из иммунных клеток, реагирующих с разрушенными капсулами. Другое объяснение состоит в недостаточности ангиогенеза в данном сайте, поэтому множество островков вскоре после имплантации погибает от гипоксии. Третье объяснение множества пустых капсул заключается в том, что плохое качество инкапсулированных островков обезьян вида *Cynomolgus*, полученных у молодых доноров, не позволяет им выживать и успешно функционировать в живом организме. Для ответа на эти вопросы исследовали различные подходы с целью улучшения результатов частичного функционирования, полученных в данной работе.

35

Реципиенты с диабетом, индуцированным стрептозотоцином, получавшие в течение 30 дней низкую дозу циклоспорина

40

Следующие животные с диабетом, индуцированным стрептозотоцином, имели такую же тяжелую степень диабета, как и предыдущие. Всем животным имплантировали примерно 45000 IEQ островков с конформным покрытием PEG в подкожный слой передней брюшной стенки. От -7 до +30 дня животные получали низкую дозу циклоспорина с целью уменьшения очаговой иммунной реакции на аллотрансплантат, которая происходит вокруг разрушенных капсул, и определения возможности улучшения функционирования островков. Низкую дозу циклоспорина

определили как дозу, которая на протяжении 24 часов создает в крови уровень 50-90 нг/мл циклоспорина, что является более низкой величиной, чем иммунодепрессивная терапевтическая доза 100-300 нг/мл. После +30 дня прекратили введение низкой дозы циклоспорина, как единственного препарата, который давали реципиентам (за исключением послеоперационных болеутоляющих средств, необходимого количества инсулина и кетаминового коктейля для аналитических процедур).

У первого реципиента имело место 50% снижение уровня глюкозы и дозы инсулина в течение первых 10 дней после подкожной имплантации. Эти значения продолжали снижаться до прекращения введения инсулина на 30 день после имплантации (одновременное прекращение введения циклоспорина), при этом содержание глюкозы в крови до 220 дня сохранялось в пределах 75-150 мг/дл. Результаты определения содержания глюкозы в крови и потребность в инсулине показаны на фиг. 18.

На 120 день после имплантации получили гипергликемические значения, поэтому начали вводить метформин, в результате чего гипергликемические значения возвратились к нормальным пределам. Метформин представляет собой лекарственный препарат для лечения диабета типа II, снижающий печеночный и мышечный глюконеогенез и обычно применяемый для лечения пациентов, страдающих диабетом типа II. Его также используют для улучшения уровня глюкозы у пациентов с диабетом типа I, у которых подавлен иммунитет для трансплантации островков. Это наблюдение показало, что количество имплантированных островков уменьшилось, и они постепенно утрачивали свою функцию.

Второй инкапсулированный островковый аллотрансплантат имплантировали подкожно и в течение последующих 30 дней вводили реципиенту низкую дозу циклоспорина. Животное вернулось к нормогликемии еще на 120 дней. Через 235 после первой трансплантации наблюдали повышенный уровень глюкозы, что указывало на ухудшение гликемического контроля, поэтому возобновили введение низкой дозы инсулина. В течение двух последующих месяцев островки постепенно теряли свою функцию, что потребовало полноценного лечения инсулином. Учитывая, что доза выживания островков была на нижнем пределе, позволяющем в течение длительного времени поддерживать этого больного диабетом реципиента, второй инкапсулированный трансплантат ввели подкожно на 80 день после первой трансплантации с лечением низкой дозой циклоспорина в течение последующих 30

дней. После второй трансплантации и лечения низкой дозой циклоспорина содержание глюкозы в крови сохранялось в пределах 150-225 мг/дл. Анализ результатов OGTT показывает существенное выделение С-пептида из имплантированных островков даже 5 после возобновления лечения инсулином.

На 285 день животное умертвили для гистологического анализа, результаты которого показаны на фиг. 19. Гистологические образцы, полученные у этого 10 животного, содержали множество выживших островков в подкожном сайте. Вокруг некоторых островков имелись очаговые лимфоциты, несмотря на отсутствие следов разрушения капсул. Их роль осталась невыясненной, однако, можно предположить, что 15 эти капсулы начали биологически разлагаться на 9 месяце после трансплантации. Имелись также очевидные подтверждения наличия множества капилляров, расположенных рядом с капсулами. Инкапсулированные островки выстраивались в карманах, полученных с помощью троакара в подкожном сайте. При наблюдении не 20 обнаружили гигантоцитов посторонних тел или других свидетельств наличия воспаления в большинстве инкапсулированных островков.

Третьей обезьяне вида *Cynomolgus*, больной диабетом, имплантировали 25 инкапсулированные островки и в течение 30 дней вводили низкую дозу циклоспорина. У этого животного оказалось сложным поддерживать содержание циклоспорина в течение 24 часов при введении низкой дозы, и после первой имплантации наблюдали 30 свидетельства токсического воздействия циклоспорина на островки. После прекращения введения циклоспорина на +30 день потребность в инсулине быстро 35 снизилась, и в течение короткого периода времени наблюдали нормальный уровень глюкозы в крови. На 120 день потребность в инсулине начала возрастать, поэтому провели вторую имплантацию с введением низкой дозы циклоспорина, что 40 стабилизировало потребность в инсулине на уровне 50% от потребности перед имплантацией. Примерно на 230 день потребность в инсулине начала возрастать, указывая на ухудшение гликемического контроля. С-пептидные реакции подтверждали 45 функционирование трансплантата инкапсулированных островков, несмотря на возобновление инсулиновой терапии. Данное животное умертвили на 248 день. Результаты гистологического анализа представлены на фиг. 20.

При низком оптическом увеличении просматривали инкапсулированные островки, выстроенные в микрокармане, полученном при инсерции с помощью 50 троакара. В этих сайтах имелось множество выживших инкапсулированных

островковых аллотрансплантатов, а также ряд пустых капсул. Наблюдали также некоторые инкапсулированные островки, окруженные в последнее время кольцом лимфоцитов и макрофагов организма хозяина. Контроль при более высоком 5 увеличении показал, что многие из этих островков имели превосходную гистологию, включая сильное окрашивание инсулина в островках. Некоторые капсулы со временем утратили островковые клетки и оказались пустыми. Контроль сайта имплантации при 10 сильном увеличении показал наличие высокой плотности капилляров, проходящих по всему сайту трансплантации и окружающих инкапсулированные островки. Этот 15 капиллярный слой окружал снаружи покрытия PEG практически во всех направлениях и имел гораздо более высокую плотность, чем капилляры, которые окружали подкожный сайт, не содержащий трансплантата. Развитие этих новых капилляров, связанных с инкапсулированными островками, могла стимулировать реакция на 20 сигналы, поступающие из трансплантата инкапсулированных островков, что объясняет способность функционирования этих инкапсулированных островков в течение 25 длительного периода времени. Пустые капсулы могли образоваться вследствие неспособности островков сохраняться до формирования капилляров в течение 30 нескольких первых недель после трансплантации. Кроме того, могло иметь место повреждение капсул цитокинами, образующимися в непосредственной близости от этих капсул в результате ранних иммунных реакций на капсулы, разрушенные организмом хозяина.

Четвертой обезьяне вида *Cynomolgus* с диабетом, индуцированным стрептозотоцином, также ввели имплантат в подкожный сайт с использованием низкой дозы циклоспорина. Вначале животному ввели два отдельных подкожных имплантата с 35 интервалом в 2 недели, чтобы получить у него инсулиновую независимость, которая была достигнута через 30 дней. Примерно на 115 день после трансплантации возобновили лечение инсулином вследствие повышения уровня глюкозы. Ввели еще 40 один подкожный имплантат с использованием низкой дозы циклоспорина. После временного улучшения состояния гипергликемия возвратилась с повышением потребности в инсулине. С-пептидные реакции наблюдали во время OGTT в период 45 инсулиновой независимости, а также после возобновления частичного функционирования островков. Гистология этого реципиента была аналогична другим и содержала множество капсул со здоровыми островками, а также капсулы без клеток. Некоторые капсулы были окружены лимфоцитами.

Результаты орального теста на толерантность к глюкозе

Содержание С-пептида у четырех обезьян вида *Cynomolgus* измеряли в различные периоды времени: а) перед индуцированием диабета (базовый уровень), б) 5 после индуцирования диабета (перед трансплантацией), в) через 30 дней после имплантации инкапсулированных островков, г) через 60 дней после имплантации инкапсулированных островков и д) через 90 дней после имплантации 10 инкапсулированных островков. Перед введением через зонд поддержки и глюкозы предварительное содержание С-пептида составляло -2,5 нг/мл, что превышало соответствующее значение в образцах, предварительно полученных у реципиентов без 15 кетамина. После зондового питания средние значения остались практически неизменными, однако, у некоторых животных началось повышение С-пептидной 20 реакции периферийной крови. Через 120 минут после зондового питания среднее значение выросло почти до 4 нг/мл. По меньшей мере в течение 3 недель после стрептозотоцина ни у одной из четырех обезьян вида *Cynomolgus* не возникало 25 увеличения содержания С-пептида в ответ на стимулирование OGTT. Очень узкие пределы стандартных отклонений в результате введения глюкозы при диабетическом состоянии подтверждают эту недостаточность С-пептидной реакции. По некоторым 30 сообщениям, опубликованным в литературе, абсолютные значения содержания С-пептида при диабетическом состоянии имеют колебания. Это может быть связано с тем, что шесть С-пептидных наборов, выпускаемых различными изготовителями, 35 отличаются по перекрестной реактивности С-пептида человека с С-пептидом обезьяны от 30% перекрестной реактивности до 100% перекрестной реактивности. Антитело, используемое Linco, проявило 100% перекрестную реактивность. Через 30 дней после 40 подкожной имплантации островков у всех четырех реципиентов, больных диабетом, независимо от потребности в инсулине содержание С-пептида существенно повысилось по сравнению с любым моментом времени диабетического состояния. Такое положение сохранялось в течение 60 дней после имплантации. У этих четырех 45 реципиентов не наблюдали существенного отличия от их нормального базового уровня С-пептидных реакций через 30 и 60 дней после подкожной имплантации островков.

45

Результаты определения гликозилированного гемоглобина

50

На фиг. 21 показаны результаты определения гликозилированного гемоглобина у обезьян вида *Cynomolgus* перед индуцированием диабета (базовый уровень, n = 4; 5 через 85 дней, n = 3 и через 114 дней, n = 1). Поскольку при определении гликозилированного гемоглобина проводят измерение содержания белка, которое длится 90 дней, об анализе до указанной даты получили немного информации. Перед индуцированием диабета у этих четырех обезьян получили базовый уровень Hb<sub>A1c</sub>, 10 равный 3,0. Через 85 дней после имплантации повторные уровни гликозилированного гемоглобина немного повысились до 3,8, однако, это увеличение не было значимым. Результат, полученный у одного животного через 114 дней, был несколько выше – 4,1. 15 Хотя немногое было известно об уровне гликозилированного гемоглобина у обезьян вида *Cynomolgus*, результаты, полученные через 85 дней не только включают 30 дней диабетического состояния с существенно повышенным уровнем глюкозы, но и 85-дневный период после имплантации без существенного превышения базового уровня. 20 Это имело место, несмотря на некоторые свидетельства гипергликемии, отмеченной по ежедневным определениям содержания глюкозы.

25 Обобщение результатов подкожной имплантации инкапсулированных островков обезьянам вида *Cynomolgus*

Имплантация островковых аллотрансплантатов с конформным покрытием PEG в 30 подкожный сайт четырем обезьянам вида *Cynomolgus* с диабетом, индуцированным стрептозотоцином, привела к получению практически нормального уровня глюкозы в крови и устранила потребность в лечении инсулином на период до 120 дней без 35 необходимости длительной иммуносупрессии. Введение низкой дозы циклоспорина в течение первых 30 дней после имплантации увеличило процентное содержание выживавших инкапсулированных островков в подкожном сайте у всех трех реципиентов, получавших указанную дозу, в отличие от одного реципиента, который 40 не получал ее и имел лишь частичную функцию имплантированных островков. Метаболическое тестирование реципиентов путем стимулирования OGTT после подкожной имплантации инкапсулированных островковых аллотрансплантатов 45 показало существенное повышение С-пептидных реакций в течение всего периода времени после зондового кормления по сравнению с диабетическими значениями, при этом С-пептидные реакции после подкожной имплантации островковых 50 аллотрансплантатов не отличались статистически от нормальных реакций,

предшествовавших индуцированию диабета. Общие результаты исследования имплантации обезьянам вида *Cynomolgus* представлены в таблице 2.

5

Таблица 2

Имплантаты у обезьян вида <i>Cynomolgus</i>	
<b>Положительные факторы</b>	
	Превосходная биосовместимость
10	Островки выживают при инкапсуляции и функционировании
15	Подкожный сайт работает
20	Циклоспорин помогает при потере островков на начальном этапе
25	Покрытия обеспечивают долгосрочную защиту от иммунных реакций
30	Повторная трансплантация возможна без всяких трудностей
	Остаточный С-пептид подтверждает частичное функционирование после потери независимости от инсулина
	Инкапсулированные островки извлекаются почти через 300 дней
	Свидетельство васкуляризации инкапсулированных островков в подкожном сайте предполагает механизмы долгосрочного функционирования

### Пример 7

35 Подкожный имплантат инкапсулированных островков у бабуинов

#### Хирургические процедуры:

У доноров-бабуинов удалили поджелудочные железы, канюлировали, промыли 40 раствором для консервации поджелудочной железы и направили в Novocell для препарирования и инкапсуляции. Затем их культивировали, поместили в фиксирующую среду для имплантации, подготовили к хирургической имплантации 45 путем сусpendирования в культурной среде, используя протоколы, аналогичные предлагаемым для препарирования островков человека. Бабуинов анестезировали и в подкожный сайт передней стенки брюшной полости поместили катетер номер 16. Сквозь имплантированный катетер вставили троакар, чтобы создать "веерообразную" 50 зону из 5 подкожных трактов (каждый длиной около 3 дюймов) в брюшной полости.

Пробный материал (около 17% общего островкового имплантата объемом около 2,5 мл) слегка перемешали, набрали в шприц объемом 5 кубических сантиметров и ввели в подкожные тракты (или "карманы") с равномерным распределением в карманах.

5 Кисетным швом 4-0 зашили сайт введения иглы, чтобы предотвратить утечку из инсерционного сайта. В результате получили удлиненные, глубоко расположенные участки с опытным материалом и буфером. Жидкая фаза быстро рассосалась и оставила слабо гранулярную поверхностную текстуру. Для полной процедуры имплантации использовали всего 6 сайтов. Чтобы отметить местоположение сайта инъекции на соответствующий участок нанесли татуировку. Локальных реакций, 10 указывающих на воспаление, не обнаружили.

15

### Лечение лекарственными препаратами

20 Циклоспорин (суб-иммуносупрессивную дозу, обеспечивающую в течение 24 часов уровень 50-95 нг/мл) вводили в период от -7 дня до +30 дня после имплантации. Циклоспорин вводили с целью предотвращения побочной потери инкапсулированных островков вследствие непосредственной очаговой иммунной реакции на аллотрансплантат с некоторыми островками, слабо инкапсулированными в имплантате. Дополнительно к имитирующему клиническому сопутствующему лечению, начиная с +1 дня и в течение всего эксперимента, вводили метформин. Доза островков с 25 нанесенным покрытием, введенная по меньшей мере через 4 недели после введения стрептозотоцина, предназначенного для индуцирования диабета, составляла около 40К IEQ/ на кг массы тела. Разность между эффективной дозой островков, используемой в наших исследованиях, и дозой, применяемой в текущих опытах с организмом человека 30 (15 IEQ/ кг), вероятно, связана с сайтом имплантации (подкожный и воротная вена) и с 35 потерей островков после имплантации.

40

### Мониторинг

Задача мониторинга живого организма заключалась в том, чтобы обеспечить 45 всесторонний анализ информации, необходимый для отслеживания терапии диабета и функционирования имплантата, а также стандартных показателей локальной толерантности и глобальных показателей общего состояния здоровья/оценки 50 безопасности. Мониторинг групп производили в пред-диабетический период (базовый уровень), во время диабетического периода и после имплантации. Измерения до начала

диабета, во время диабета и ежемесячно после имплантации включали OGTT и AST (Arginine Stimulation test, тест на стимуляцию аргинином) (с определением содержания в крови глюкозы, инсулина и С-пептида), а также определение содержания 5 гемоглобина A1c. Ежедневный контроль в период заболевания диабетом и после имплантации включал анализ содержания глюкозы в крови (натощак, через 2 часа после обеда и перед ужином), содержания глюкозы и кетонов в моче (с утра натощак и 10 перед ужином), приема пищи (масса углеводов, жира и белка в граммах), дозу введенного инсулина (терапия диабета) и дозы других медикаментов. Еженедельные измерения включали определение массы тела и клинические наблюдения.

15

### Вскрытие

Гистопатологическое исследование сайта подкожной имплантации и 20 контрольного сайта без имплантации провели с помощью окрашивания гематоксилином и эозином (H&E), а также иммуногистохимического окрашивания (инсулин, глюкагон, антиогенный актин, макрофаги и лимфоциты, CD3, CD4, CD8). Гистопатологический контроль всех стандартных органов и тканей проводили с 25 помощью окрашивания H&E, заключение давал дипломированный ветеринар-патологоанатом. Иммуногистологическое окрашивание поджелудочной железы производили, чтобы определить присутствие инсулина и глюкогена.

30

### Аллотрансплантат инкапсулированных островков у бабуинов с диабетом, индуцированным стрептозотоцином

На фиг. 22 показаны начальные результаты исследования первого бабуина, 35 больного диабетом, с имплантированными аллотрансплантатами инкапсулированных островков. Этот больной диабетом бабуин-реципиент достиг инсулиновой независимости в течение 17 дней после подкожной имплантации инкапсулированных 40 островковых аллотрансплантатов. В этом заключалось отличие от больных диабетом обезьян вида *Cynomolgus*, которые не могли достичь независимости от инсулина ранее, чем через 30 дней после имплантации. Модель бабуина, больного диабетом, изменили: 45 вместо перорального введения циклоспирона, как в случае обезьян вида *Cynomolgus*, для крупных бабуинов использовали внутримышечную инъекцию. Это устранило колебания уровня содержания в течение 24 часов, которые наблюдали на модели обезьян вида *Cynomolgus*. Как показано на фиг. 23, данный реципиент достиг 50

нормального уровня гемоглобина A1с через 60 дней после имплантации, который сохранился в течение 180 дней после прекращения введения инсулина.

Результаты OGTT и AST показали значимое выделение С-пептида в любой 5 момент времени после имплантации. Нормальная реакция показала некоторый пик С-пептида в пределах 30 минут с последующим снижением до нормального уровня глюкозы в любой момент времени. Во время заболевания диабетом содержание 10 глюкозы продолжало повышаться вследствие очень низкого уровня С-пептида, который не реагировал на стимулирование глюкозой. После имплантации появились 15 сильные реакции С-пептида на стимулирование глюкозой, однако, эти реакции имели некоторую задержку, и пики появлялись через 60 – 90 минут после стимулирования. При контроле содержания глюкозы результаты анализов через 30 и 60 минут 20 превышали нормальный уровень вследствие этой задержки реакции С-пептида. Однако через 90 и 120 минут содержание глюкозы снижалось до уровня, близкого к нормальному. До сих пор остается неизвестным, связана ли эта задержка реакции С-пептида с подкожным сайтом имплантации или с инкапсуляцией островков. Указанные 25 результаты очень близки к результатам имплантации островков в воротную вену людям, страдающим диабетом, при применении иммуносупрессии.

Второму бабину также ввели имплантат в подкожный сайт в сочетании с 30 низкой дозой циклоспорина. Произошло снижение содержания глюкозы при сохранении почти постоянной потребности в инсулине. Потребность в инсулине медленно снижалась в течение 100 дней, но медленно возрастала почти до 200 дней, в то время как содержание глюкозы оставалось пониженным. Контроль содержания 35 гемоглобина A1с показал, что частичное функционирование несомненно достигалось и обеспечивало снижения уровня от 12% до 8,0% через 90 дней и до нормального уровня через 120 дней. Затем значения медленно повышались до уровня 8% и оставались неизменными до 180 дней. Эти значения подтвердили частичное функционирование, 40 что согласовывалось с результатами, полученными у реципиентов с трансплантацией островков, у которых не достигалось независимости от инсулина, однако, уровни гемоглобина A1с после имплантации сохранялись близкими к нормальным.

45 Анализ результатов OGTT и AST показал более низкое содержание С-пептида и более высокое содержание глюкозы в течение всего пост-имплантационного периода по сравнению с первым реципиентом. Однако С-пептидные реакции были существенно 50 более высокими, чем значения, полученные в период заболевания диабетом.

Третьему реципиенту также ввели имплантат в подкожный сайт в сочетании с низкой дозой циклоспорина (фиг. 24). У этого реципиента после имплантации также возникла частичная реакция с более, чем 50% снижением содержания глюкозы и инсулина по сравнению с периодом заболевания диабетом. Эти значения сохранялись в течение 140 дней после имплантации.

Содержание гемоглобина A1c (фиг. 25) у этого реципиента достигло нормальных пределов через 60 дней после имплантации, однако, поднялось до диабетического уровня к 120 дням. Это также подтвердило частичное функционирование островков в течение 90 дней со снижением реакции после этого периода времени.

Реакции на OGTT и AST были аналогичны тем, которые наблюдались у предыдущего реципиента с частичным функционированием островков, а именно, повышение содержания С-пептида после имплантации с пиковыми значениями в пределах от 60 до 90 минуты.

Результаты, полученные у одного реципиента с нормальным и двух реципиентов с частичным функционированием островков, важно было сравнить с результатами реципиента, больного диабетом, с имплантацией в воротную вену. Для выполнения этой задачи провели предварительное исследование с использованием первого реципиента-бабуина, которому ввели инкапсулированные островки в подкожный сайт еще до того, как результаты выделения островков у бабуинов достигли приемлемого уровня. Этого реципиента использовали для практической отработки доставки поджелудочной железы и инкапсулированных островков для имплантации. Приготовили два маргинальных подкожных инкапсулированных островка, не ожидая высоких результатов. Реципиента продолжали обследовать и использовали для определения возможности инъекции в воротную вену инкапсулированных островковых аллотрансплантов, которые были выделены и инкапсулированы в тех же самых условиях, что и в случае первых трех реципиентов.

Два первых маргинальных имплантата ввели на 0 и 110 дни. В обоих случаях имело место некоторое улучшение состояния, которое не являлось продолжительным, как и ожидали от введенных маргинальных трансплантов. Затем на 240 день после первой имплантации с помощью прямой инъекции в воротную вену в виде хирургической процедуры ввели инкапсулированные островковые аллотранспланты без существенного повышения давления в воротной вене или каких-либо изменений

тестов функции печени. В течение нескольких дней возникла резкая реакция на имплантат с сокращением потребности в инсулине более, чем на 50%. После прекращения введения циклоспорина на 30 день после имплантации данному реципиенту прекратили лечение инсулином при нормальном уровне глюкозы до 290 дней после имплантации. При анализе содержания гемоглобина A1c после введения маргинальных подкожных имплантатов у этого реципиента наблюдали некоторое снижение, однако, не до нормального уровня. Единственное значение, полученное после введения имплантата в воротную вену, относится к 30 дню после имплантации, что было слишком рано, чтобы видеть ожидаемое улучшение состояния. Определение содержания гемоглобина A1c у бабуина отставало от клинических результатов примерно на 30 дней.

После имплантации маргинальных подкожных островков сохранялся низкий уровень С-пептида, который был очевидно выше, чем диабетические значения, однако, эти реакции не могли нормализовать уровня гемоглобина A1c, хотя он был понижен. В это время имелось значение только на 30 день после имплантации в воротную вену. Проверяя реакцию глюкозы, установили заметное снижение, связанное со значительным повышением содержания С-пептида. Существенное усовершенствование первого имплантата в воротную вену предполагало потенциальное увеличение подкожного сайта, чтобы получить более высокие результаты.

30

### Пример 8

Клетки, инкапсулированные в альгинатные микрокапсулы с применением и без применения PEG

Клетки и ткани могут иметь покрытие матрицами, содержащими альгинат или другие гидрогели. Ниже описаны предпочтительные способы покрытия островков альгинатными микрокапсулами с применением и без применения PEG.

### Покрытие островков альгинатными микрокапсулами

45 100 мкл культивированных островков равномерно суспендировали в 1,25 мл 1,6% раствора альгината натрия в 10 mM буфера HEPES. Альгинатные микрокапсулы, содержащие островки, получили с помощью шприцевого насоса/выдавливания струей 50 аргона через иглу номер 21 с установленным давлением аргона 10,5 фунтов/дюйм<sup>2</sup>

[72394,95 Па ( $\text{Н}/\text{м}^2$ )] и собрали в 100 мл 80 мМ хлорида кальция в 10 мМ раствора HEPES. Альгинатные гранулы три раза промыли составом M199, осадили под действием силы тяжести в течение 15 минут и декантировали. Альгинатные микрокапсулы имели распределение размеров от 250 до 350 мкм.

#### Покрытие PEG альгинатных микрокапсул, содержащих островки

Пятнадцать миллилитров 20 мМ низкого ионного буфера HEPES (содержащего 1,8 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 260 мМ маннитола,  $\text{pH} = 7,0$ ) добавили в 15 мл коническую колбу со 100 мкл микрокапсул, содержащих островки. Колбу центрифугировали, чтобы получить гранулу, удалили надосадочный слой, добавили к грануле 15 мл раствора Den-EY (0,1 мг/мл в низком ионном буфере HEPES) и выдержали пробирку горизонтально в течение 10 минут при комнатной температуре. Окрашенные островки промыли 20 мМ низким ионным буфером HEPES, через который не менее 30 минут барботировал аргон. Окрашенные островки смешали с 20 мл раствора светочувствительного полимера, через который барботировал аргон, и предварительно 25 уравновесили на водяной бане при  $8^\circ\text{C}$  в течение по меньшей мере 30 минут. Раствор светочувствительного полимера приготовили в 20 мМ буфера HEPES,  $\text{pH} = 8,0$ , который содержал 5% PEG 1.1 K-TA, 10% PEG 3.5K-триола или PEG 4K-диола, 100 мМ TEoA, 32 мг/мл AMPS и 2 мкл/мл NVP, а также 13% Nicoden. Суспензию перенесли в 30 10 мл мензурку и облучили мензурку аргоновым лазером при плотности облучения 200 мВт/ $\text{см}^2$  в течение 1 минуты. Полимеризацию прекратили путем добавления 1-2 мл M199 в чашку Петри, и содержимое мензурки перенесли в 50 мл коническую колбу, 35 содержащую 40 мл M199. После трехкратной промывки M199 островки снова поместили в культуру.

#### Имплантация альгинатных микрокапсул и альгинатно-PEG микрокапсул, содержащих свиные островки, в качестве ксенотрансплантатов в подкожный сайт обезьян, не болеющих диабетом

В эксперименте с обезьянами микрокапсулы с альгинатным и альгинатно-PEG покрытием имплантировали трем обезьянам вида *Cynomolgus*, не болеющим диабетом. Микрокапсулы с покрытием PEG изготавливали в различных условиях, чтобы изменить их проницаемость. Все имплантированные микрокапсулы (только альгинатные или альгинатно-PEG) содержали первичные свиные островки, которые

использовали в качестве ксенотрансплантатов для обезьян. Этим реципиентам вводили экспериментальное анти-CD 154 моноклональное антитело. Через 7 дней после имплантации вырезали подкожные имплантаты и определили процентное содержание инкапсулированных свиных островков, выживших в этих различных микрокапсулах.

На фиг. 26 показаны проценты выживания свиных островков, инкапсулированных в чисто альгинатных или в различных конфигурациях альгинатно-PEG микрокапсул с различными профилями проницаемости покрытий после того, как они были имплантированы в течение 7 дней нормальным обезьянам вида *Cynomolgus*. Различные значения селективной проницаемости составляли 0 кД, 30-60 кД, 100 кД и более 200 кД. Выживание свиных островков в чисто альгинатных капсулах составляло 55%. В микрокапсулах с альгинатно-PEG покрытием процент выживания островков отличался. Через 24 часа выживание составляло 37% для микрокапсул с очень низкой селективной проницаемостью для диффузии (белки размером 0 кД или < 30 кД). Для микрокапсул с селективной проницаемостью для диффузии белков размером 30-60 кД выживание через 24 часа выросло до 70%. Для микрокапсул, которые обеспечивали диффузию белков размером < 100 кД, выживание через 24 часа составляло 58%. И, наконец, в широко открытых микрокапсулах (диффузия белков размером > 200 кД) через 24 часа имело место пониженное выживание островков – 32%.

Окрашивание инсулина и глюкагона в неонатальной свиной островковой ткани, инкапсулированной в альгинатно-PEG микрокапсулы, которые имплантировали в подкожный сайт нормальным обезьянам вида *Cynomolgus* на 7 дней, показало способность альгинатно-PEG микрокапсул обеспечивать выживание инкапсулированной неонатальной свиной островковой ткани в течение 7 дней при систематическом введении низкой дозы циклоспорина.

#### 40 Имплантация альгинатно-PEG микрокапсул, содержащих свиные островки, в качестве ксенотрансплантатов в брюшинную полость обезьян, больных диабетом

Последующий эксперимент с обезьянами, больными диабетом, показал, что свиные островки, инкапсулированные в альгинатно-PEG микрокапсулы, ослабляли потребность в инсулине в течение 30 дней при использовании системной терапии анти-CD154 антителом. На фиг. 27 показаны результаты имплантации свиных островков, инкапсулированных в альгинатно-PEG микрокапсулы, в брюшинную полость обезьян вида *Cynomolgus*, больным диабетом и получавшим также лечение анти-CD154

антителом в течение 30 дней. Имплантированные островки были способны поддерживать нормальный уровень глюкозы без инсулиновых инъекций.

5

Получение микрокапсул, содержащих островки, с альгинатно-PEG покрытием и различной селективной проницаемостью для белков

10

Островки инкапсулировали в альгинатно-PEG микрокапсулы в различных условиях инкапсуляции, чтобы изменить размер пор в покрытии, и поместили в тканевую культуру. Инкапсулированные островки обработали детергентом (SDS, додецилсульфат натрия), чтобы убить инкапсулированные клетки и растворить белки. 15 Эти обработанные микрокапсулы поместили в культурную среду, не содержащую белков, и отбирали пробы среды через различные периоды времени. Размеры белков определяли, поместив диффузат на полиакриламидные гели и отделив белки с различными размерами с помощью электрофореза в поликарбамидном геле (PAGE). 20 Результаты показали, что изменение концентрации PEG, размера PEG, концентрации сомономеров, интенсивности лазера и времени облучения островков являются некоторыми из множества способов изменения селективной проницаемости покрытия PEG. 25

30

На фиг. 5 показана возможность изменения профиля селективной проницаемости альгинатно-PEG микрокапсул путем изменения переменных параметров, участвующих в формировании покрытия PEG. Островки, инкапсулированные в альгинатно-PEG микрокапсулах, инкубировали, а белки, выделявшиеся из клеток с течением времени, анализировали с целью определения их молекулярных масс. Белки, выделявшиеся из неинкапсулированных островков, показаны в крайнем левом столбце, за которым следует столбец с молекулярными 35 массами маркеров. В следующих столбцах показаны белки, выделявшиеся из островков, инкапсулированных в альгинатно-PEG микрокапсулах. Выделявшиеся белки имели молекулярные массы более 100 кД, 100 кД, менее 60 кД, менее 30 кД и 0 40 кД, соответственно.

45

Пример 9

Альгинатная инкапсуляция /покрытия PEG типов клеток, отличных от островков

50

Кроме островков в альгинатные микрокапсулы инкапсулировали клетки с аналогичной агрегацией способом, похожим на описанный в примере 3, за исключением того, что клетки объединяли в кластеры перед применением описанной 5 технологии инкапсуляции островков в альгинатных микрокапсулах различных размеров. Эти способы обеспечили нанесение конформного покрытия PEG на опухолевую клеточную линию, вырабатывающую инсулин – клетки инсулиномы мыши 10 ВНС8. Кроме того, используя клетки, которые нелегко агрегируют, инкапсулировали их вначале в альгинатной капсule даже в том случае, когда они не объединялись в 15 клеточные кластеры. Этот способ обеспечил получение конформного покрытия PEG клеток из опухолевой клеточной линии, вырабатывающей инсулин – клеток инсулиномы крысы (RIN).

Клетки из клеточной линии С-127, сконструированные для получения АроE2, 20 вырастили в альгинатной матрице, а не в кластерах. Затем на эти клетки, выращенные в альгинатной матрице, нанесли покрытие PEG. Кроме того, оказалось возможным 25 захватывать неагрегирующие клетки (CHO) в альгинатные микрокапсулы, которые позволяли им разрастаться в культуру в этих альгинатных сферах, а затем наносить на них покрытия PEG, которые завершали комплекс альгинатно-PEG покрытия.

#### Пример 10

Получение альгинатно-PEG покрытий на островках и других клетках с помощью 30 совместной экструзии полимерных смесей альгината и PEG

Агрегаты или отдельные клетки смешали в альгинатном растворе, который 35 загружали в один шприц системы шприцевого насоса/выдавливания струей аргона. Выход этого шприца соединили с внутренней иглой номер 21 коаксиальной игольной 40 системы, содержащей три иглы. Второй шприц содержал только смесь PEG для инкапсуляции и был соединен со средней иглой номер 18 коаксиальной игольной системы. Газообразный аргон подавали в наружную иглу номер 16. Альгинатный 45 шприц, содержащий клетки, и шприц с PEG подключили к одному насосу, поэтому скорости потоков из обоих шприцов были идентичными. Расход газа для получения капель настраивали таким образом, чтобы регулировать размер капель. Капли, 50 образующиеся из этих двух шприцев/аргоно-воздушной струи, собирали в длинную стеклянную колонку, содержащую в верхних  $\frac{3}{4}$  неводный растворитель, в частности, масло, а в нижней  $\frac{1}{4}$  - раствор, содержащий кальций или барий (80 мМ). Через

неводную часть коллекторной колонки пропускали излучение аргонового лазера, которое вызывало сшивку наружного покрытия PEG прежде, чем инкапсулирующая капсула начинала падать через неводную часть коллекторной колонки. Когда сшитая 5 PEG капсула, содержащая клетки, достигала нижней  $\frac{1}{4}$  коллекторной колонки, альгинат в сердцевине оказывался сшитым. Капсулы с альгинатной сердцевиной и покрытием PEG вынимали из нижней части колонки и промывали, чтобы удалить 10 неводный растворитель. При необходимости производили дополнительную сшивку PEG, дополнительно облучая эти капсулы лазерным излучением в водной фазе в 15 присутствии добавки эозина Y. Результат этого примера показал возможность 1) инкапсулировать отдельные клетки и 2) обеспечить центр роста в капсule PEG, способный выращивать новые клетки, которые оказываются инкапсулированными. Применение покрытия такого типа опробовали на красных кровяных тельцах (RBC).

20

#### Инкапсуляция островков в микрокапсулах PEG

25

30 35

500 островков, сuspendedированных в среде M199, содержащей 10% зародышевой сыворотки крупного рогатого скота осадили центрифугированием при 100 g в течение 3 минут. Осадок повторно сuspendedировали в 1 мл 10% (масса/объем) раствора макромера триакрилата PEG 3,5 кД в среде M199, содержащей эозин Y (1 мг/мл), винилпирролидон (16 мг/мл) и триэтаноламин (100 мМ). Затем добавили в пробирку минеральное масло (20 мл) и интенсивно встряхивали ее, чтобы получить дисперсию капель размером 200-500 мкм. Эту дисперсию облучали аргоновым ионным лазером с мощностью 200 мВт/см<sup>2</sup> с длиной волны 514 нм в течение 60 секунд. После этого отделили минеральное масло, осадив микрокапсулы, и промыли полученные микрокапсулы дважды PBS, затем один раз гексаном и, наконец, трижды – средой.

40

#### Пример 11

Островковые или другие клетки с конформным покрытием на микроГранулах

45 50

Один из способов инкапсуляции клеток, которые не образуют агрегатов, предотвращает образование конформного покрытия и заключается в выращивании клеток на гранулированных микроносителях. После такого выращивания использовали способ нанесения конформного покрытия PEG, аналогичный описанному в примере 2 для выделенных островков, чтобы нанести конформные покрытия PEG на эти

гранулированные микроносители, содержащие наружные слои опухолевых клеток. Конформные покрытия, полученные таким способом, имели приемлемую жизнеспособность. Можно констатировать, что способом, описанным в данной заявке, на различные типы гранулированных микроносителей, применяемых для выращивания на их поверхности множества различных клеток, успешно наносятся конформные покрытия.

Существует множество различных типов гранулированных микроносителей, предназначенных для выращивания клеток на их поверхности. Клеточная линия C-127, сконструированная для получения АроE2 (как описано выше в примере 7), не образовывала агрегатов, однако, вырастала на гранулах Cytodex. Эти клетки вместе с гранулированными микроносителями легко инкапсулировались с помощью конформных покрытий PEG, наносимых непосредственно на наружную поверхность гранулированных микроносителей и присоединенные клетки.

#### Пример 12

##### Другие типы клеток, инкапсулированных конформными покрытиями PEG

Другой тип клеток, которые могут образовывать агрегаты и на которые можно наносить конформные покрытия PEG, включает NIT, клеточную линию мышевой инсулиномы. На фиг. 28 показан результат нанесения тонких конформных покрытий способом, описанным выше для агрегатов островковых клеток, при этом инкапсулированные клетки сохраняли жизнеспособность в тканевой культуре в течение 2 недель. После пребывания в культуре в течение одной недели жизнеспособность клеток подтверждало окрашивание этидиумбромидом/ флуоресцеиндиацетатом. Клетки с нанесенным покрытием показаны при нормальном освещении (фиг 28A) и при люминесцентном свете с окрашиванием FDA (флуоресцеиндиацетатом)/EB (этидиумбромидом) (фиг. 28B).

Получили агрегаты клеточной линии почки обезьяны в тканевой культуре и успешно нанесли на них конформное покрытие PEG. На фиг. 29А показаны клетки при нормальном освещении, а на фиг. 29В – клетки при люминесцентном излучении с окрашиванием FDA/EB. В этом случае жизнеспособность инкапсулированных опухолевых клеток также подтверждает окрашивание FDA/EB.

В другом примере получили агрегаты первичных клеток, отличных от панкреатических островковых клеток, а затем успешно нанесли на них конформное покрытие PEG. На фиг. 30 показано конформное покрытие PEG клеточных агрегатов,

полученных из первичных печеночных клеток (гепатоцитов) человека и мыши и сохраняющих жизнеспособность в культуре в течение двух недель. На фиг. 30А показаны клетки человека при нормальном освещении после нахождения в культуре в течение 2 недель. На фиг. 30В показаны клетки человека при люминесцентном излучении с окрашиванием FDA/EB после нахождения в культуре в течение 2 недель. На фиг. 30С показаны клетки мыши при нормальном освещении, а на фиг. 30Д - при люминесцентном излучении с окрашиванием FDA/EB. На агрегаты гепатоцитов мыши и человека успешно наносили конформное покрытие PEG, в результате чего жизнеспособность клеток обеспечивалась даже после нахождения в культуре в течение 2 недель.

15

### Пример 13

20 Определение лечебной дозы островков, инкапсулированных в микрокапсулы или имеющих конформное покрытие

25 В таблицах 3 и 4 представлены данные, которые помогут специалисту в данной области определить лечебную дозу островков для пациента. Приведенные ниже данные рассчитывали на основании нескольких допущений: а) все микрокапсулы являются сферическими, б) один островок содержит 1500 клеток, в) минимальная лечебная доза составляет 15000 IEQ/кг массы тела, г) 5% составляют пустые микрокапсулы или 0% -  
30 пустые капсулы с конформным покрытием, д) максимальная плотная упаковка микрокапсул/капсул с конформным покрытием составляет 75% от общего объема и е) каждая микрокапсула/капсула с конформным покрытием содержит один островок  
35 диаметром 150 мкм. Максимальную плотность клеток,  $8,2 \times 10^8$  клеток/мл, можно получить путем конформного покрытия островков капсулой в 1 мкм.

40 Указанные объемы не учитывают объема суспензионной жидкости или матрицы. Специалисты в данной области могут использовать приведенные ниже  
45 данные в качестве руководства для расчета лечебной дозы, однако, указанные числовые значения не ограничивают пределов количества и концентрации островков, которые могут быть использованы. Допущения, сделанные при выполнении этих вычислений, не ограничивают настоящего изобретения. Эти числовые значения просто относятся к отдельным вариантам реализации изобретения ( $V$  островков (мл) = 0,0264938).

50

Таблица 3

Островки, инкапсулированные в микрокапсулы

Диаметр микрокапсулы (мкм)	Объем микрокапсулы (мл · 10 <sup>-6</sup> )	Объем островка (мл · 10 <sup>-6</sup> )	Отношение объемов микрокапсул и островка	Кол-во островков / мл	Лечебная доза (мл/кг)	Лечебная доза (мл для пациента массой 100 кг)	Клеточная плотность панкреатических островковых клеток (10 <sup>-6</sup> /мл)
1000	523,60	1,77	296	1910	7,8540	785	2,0
900	381,70	1,77	216	2620	5,7256	573	2,8
800	268,08	1,77	151	3730	4,0212	402	4,0
700	179,59	1,77	101	5568	2,6939	269	6,0
600	113,10	1,77	64	8842	1,6965	170	9,4
500	65,45	1,77	37	15279	0,9817	98	16,3
400	33,51	1,77	19	29842	0,5027	50	31,9
300	14,14	1,77	8	70736	0,2121	21	75,6
200	4,19	1,77	2	238732	0,0628	6	255,1

Таблица 4

Островки с конформным покрытием

Толщина покрытия (мкм)	Объем микрокапсулы (мл · 10 <sup>-6</sup> )	Объем островка (мл · 10 <sup>-6</sup> )	Отношение объемов микрокапсул и островка	Островки/мл	Лечебная доза (мл/кг)	Лечебная доза (мл для пациента массой 100 кг)	Клеточная плотность панкреатических островковых клеток (10 <sup>-6</sup> /мл)
400	448,92	1,77	254	2228	6,7338	673	2,5
350	321,56	1,77	182	3110	4,8233	482	3,5
300	220,89	1,77	125	4527	3,3134	331	5,1
250	143,79	1,77	81	6954	2,1569	216	7,8

200	87,11	1,77	49	11479	1,3067	131	12,9
150	47,71	1,77	27	20959	0,7157	72	23,6
100	22,45	1,77	13	44545	0,3367	34	50,1
75	14,14	1,77	8	70736	0,2121	21	79,6
50	8,18	1,77	5	122231	0,1227	12	137,5
25	4,19	1,77	2	238732	0,0628	6	268,6
10	2,57	1,77	1	388736	0,0386	4	437,3

Определение количества клеток, инкапсулированных в микрокапсулы или имеющих конформное покрытие

В таблицах 5 и 6 представлены данные, которые могут оказать помощь специалисту в данной области в определении лечебной дозы клеток, необходимой для пациента, страдающего различными заболеваниями или нарушениями. Приведенные ниже данные рассчитывали на основании нескольких допущений: а) инкапсулированные клетки или клетки с нанесенным конформным покрытием имеют средний диаметр 50 мкм, б) суммарный объем клеточного агрегата в каждой микрокапсule составляет  $1,77 \times 10^{-6}$  мл, в) 5% составляют пустые микрокапсулы или 0% - пустые капсулы с конформным покрытием, д) максимальная плотная упаковка микрокапсул/капсул с конформным покрытием составляет 75% от общего объема и е) каждая микрокапсул/капсул с конформным покрытием содержит один островок диаметром 150 мкм. Максимальную плотность клеток,  $1,36 \times 10^7$  клеток/мл, можно получить путем конформного покрытия островков капсулой в 1 мкм.

Указанные объемы не учитывают объема суспензионной жидкости или матрицы. Специалисты в данной области могут использовать приведенные ниже данные в качестве руководства для расчета лечебной дозы, однако, указанные числовые значения не ограничивают пределов количества и концентрации клеток, которые могут быть использованы. Допущения, сделанные при выполнении этих вычислений, не ограничивают настоящего изобретения. Эти числовые значения просто относятся к отдельным вариантам реализации изобретения

Таблица 5

Клетки, инкапсулированные в микрокапсулы

	Диаметр микрокапсулы (мкм)	Объем микрокапсулы (мл X 10 <sup>-6</sup> )	Объем клеток (мл X 10 <sup>-6</sup> )	Отношение объемов микрокапсулы и клеток	Клеточная плотность (средняя клетка человека) (10 <sup>3</sup> /мл)
5	1000	523,60	1,77	296	34,0
	900	381,70	1,77	216	46,7
10	800	268,08	1,77	151	66,4
	700	179,59	1,77	101	99,2
15	600	113,10	1,77	64	157,5
	500	65,45	1,77	37	272,2
20	400	33,51	1,77	19	531,6
	300	14,14	1,77	8	1260,0
	200	4,19	1,77	2	4254,4

25

## 30 Таблица 6

Клетки с конформным покрытием

	Толщина покрытия (мкм)	Объем микрокапсулы (мл X 10 <sup>-6</sup> )	Объем клеток (мл X 10 <sup>-6</sup> )	Отношение объемов микрокапсулы и клеток	Клеточная плотность (средняя клетка человека) (10 <sup>3</sup> /мл)
35	400	448,92	1,77	254	41,8
	350	321,56	1,77	182	58,3
40	300	220,89	1,77	125	84,9
	250	143,79	1,77	81	130,4
45	200	87,11	1,77	49	215,2
	150	47,71	1,77	27	393,0
	100	22,45	1,77	13	835,2

50

75	14,14	1,77	8	1326,3
50	8,18	1,77	5	2291,8
25	4,19	1,77	2	4476,2
10	2,57	1,77	1	7288,8

10 Пример 14

Характеристики альгинатно-PEG микрокапсул

Акрилаты PEG различных типов, длины и размеров испытывали на животных, чтобы определить биосовместимость и селективную проницаемость состава, а также функциональность и жизнеспособность инкапсулированных клеток после инкапсуляции. Одно из покрытий акрилатного PEG представляло собой PEG-триакрилат с молекулярной массой 1,1 кД. Этот весьма короткий акрилат PEG, будучи сшитым, обладает уникальными свойствами биосовместимости.

Альгинатные гранулы, инкапсулированные в гидрогель, имплантировали нормальным мелким и крупным животным на 14 дней, в течение которых не применяли иммunoисупрессии. Затем капсулы культивировали в искусственной среде и провели гистологический анализ природы и интенсивности реакции ткани на эти капсулы. Реакции на опытные образцы были минимальными или вообще отсутствовали, указывая, что гидрогельные составы обладали очень хорошей биосовместимостью в живом организме.

На фиг. 31 показаны реакции биосовместимости у мышей, свиньи, собаки и обезьяны, в различные сайты которых имплантировали пустые альгинатно-PEG микрокапсулы. Пустые альгинатные микрокапсулы с PEG-триакрилатом, имеющим молекулярную массу 1,1 кД, вводили в воротную вену печени. Через две недели после имплантации у свиньи и обезьяны реакция на эти пустые микрокапсулы PEG отсутствовала. Наибольшую реакцию из всех животных, которым ввели PEG, наблюдали у собаки, однако, и в этом случае реакционную способность проявило лишь очень небольшое количество клеток. Определили состав инкапсулирующего материала и оценили биосовместимость, селективную проницаемость, функциональность и жизнеспособность. Балльную систему (от 1 до 4) использовали для количественной оценки реакции организма животного на имплантацию инкапсулированных клеток.

В таблице 7 представлена оценка присутствия макрофагов, гигантоцитов FB, воспалительной реакции, лимфоцитов и эозинофилов. Общий балл биосовместимости представляет собой средний балл по этим пяти категориям. На фиг. 32 показана биосовместимость инкапсулированных клеток у мелких животных с помощью 5 репрезентативной гистологии балльных оценок 1, 2 и 3. На фиг. 33 показана биосовместимость инкапсулированных клеток у крупных животных с помощью 10 репрезентативной гистологии балльных оценок 1, 2 и 4.

Таблица 7

Балл	Макрофаги	Гигантоциты FB	Воспалительная реакция	Лимфоциты	Эозинофилы
1	отсутствуют или минимальны	отсутствуют	отсутствует	отсутствуют	отсутствуют
2	смешанная активность	рассеяны, < 50%	минимальная	слабо рассеянные	слабо рассеянные
3	активированы, некоторое наслаждение	> 50%	умеренная	умеренные	умеренные
4	палисадная структура	пенистые	обширная	обильные	обильные

В таблице 8 показано изменение селективной проницаемости в зависимости от 30 изменения ингредиентов и их содержания в составе. Сочетание 10% 3.5K-TA и 10% 10K-TA делает структуру геля очень плотной и предотвращает прохождение практических всех белков из крови в инкапсулированные клетки. Если заменить 35 компоненты состава на 5% 3.5K-TA и 5% 8K-DA, то структура геля обеспечивает прохождение белков среднего размера (от 100 до 60 кД) из крови в инкапсулированные клетки. Состав 20% 10K-TA образует гель, который позволяет белкам с большой 40 молекулярной массой (> 100 кД) проходить из крови в инкапсулированные клетки.

Таблица 8

Состав	>100K	<100K	<60K	<30K	<18K	Без связи
10% 3.5K-TA +	0	0	0	0	0	100
10% 10K-TA	0	0	0	0	0	100

	5% 3.5K-TA +	0	0	100	0	0	0
	5% 8K-DA	0	0	88	0	0	0
5	20% 10K-TA	75	25	0	0	0	0
		100	0	0	0	0	0
		88	0	12	0	0	0
10							

Состав инкапсулирующего материала оказывает большое влияние на функциональность и жизнеспособность инкапсулированных клеток. Химикаты и способы, применяемые для получения геля, могут быть цитотоксичными или повреждающими клетку. На фиг. 34 показаны результаты имплантации инкапсулированных островков бестимусной мыши с диабетом, индуцированным стрептозотоцином. Балл "1" представляет инкапсулированные клетки, которые устраняют диабет и обеспечивают уровень глюкозы в крови < 150 нг/мл, "2" представляет инкапсулированные клетки, которые снижают диабет, однако, неспособны ежедневно поддерживать гомеостаз и обеспечивают уровень глюкозы в крови от 150 до 300 нг/мл, а "3" представляет инкапсулированные клетки, которые не способны управлять диабетом и обеспечивают уровень глюкозы в крови > 300 нг/мл.

Функциональность инкапсулированных клеток также можно определить с помощью теста на статическую стимуляцию глюкозы. Этот тест основан на сравнении базового уровня выработки инсулина при низкой концентрации глюкозы с выработкой инсулина при высокой концентрации глюкозы (стимуляция) и при высокой концентрации глюкозы с IBMX (изобутилметилксантином). На фиг. 6 показана балльная оценка теста на статическую стимуляцию глюкозы. Балл "1" представляет выработку инсулина при стимуляции, превышающую базовый уровень, более, чем в 2 раза, и выработку инсулина с IBMX, превышающую базовый уровень, более, чем в 10 раз. Балл "2" представляет выработку инсулина при стимуляции, превышающую базовый уровень, в 1,5 – 2 раза, и выработку инсулина с IBMX, превышающую базовый уровень в 5-10 раз. Балл "3" представляет выработку инсулина при стимуляции, превышающую базовый уровень, менее, чем в 1,5 раза, и выработку инсулина с IBMX, превышающую базовый уровень, менее, чем в 5 раз.

Оценили жизнеспособность клеток в процессе инкапсуляции. При этом использовали следующую систему баллов жизнеспособности: "1" = > 90%, "2" = < 90%

до 75%, "3" = < 75% до 50%, "3" = < 50% до 25% и "4" = < 25%. На фиг. 4 показана жизнеспособность и гистология инкапсулированных клеток с баллами 1, 2 и 4.

5

### Пример 15

Имплантация в ишемические мышцы клеток, полученных с помощью генной инженерии и вырабатывающих ангиогенные факторы роста, с нанесенным 10 конформным покрытием PEG

С помощью генной инженерии можно получить множество различных типов клеток, вырабатывающих различные факторы роста. Такие клетки представляются 15 собой фибробласты человека или животных, васкулярные клетки или различные неканцерогенные клеточные линии. Ангиогенные факторы роста, в частности, VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor, васкулярный эндотелиальный фактор роста), bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor, основной фактор роста фибробластов) и PDGF (Platelet 20 Derived Growth Factor, тромбоцитарный фактор роста) используют в качестве генно-инженерной клеточной линии для инкапсуляции. Итоговыми данными, необходимыми 25 для рассмотрения имплантации в экспериментальных моделях на животных с ишемическими мышцами, являются выделения выбранного ангиогенного фактора роста на уровне, предположительно, обеспечивающем клиническую реакцию в 30 микросреде ишемической мышцы. Если клетки образовывали агрегаты, то конформные покрытия на такие клеточные агрегаты наносили, используя такие же условия, как 35 описано в примере 2. Эти инкапсулированные клетки, вырабатывающие фактор роста, имплантировали в модели на грызунах с экспериментально индуцированной ишемией сердечной мышцы или экспериментально индуцированной ишемией мышц 40 конечностей. В итоге получили гистологическую демонстрацию увеличения мышечной массы и функциональное подтверждение увеличения усилия выбранных ишемических мышц, включая сердечную мышцу. Имплантацию этих клеток, вырабатывающих 45 ангиогенный фактор роста, более крупным животным, включая людей, проводили посредством васкулярного доступа с рентгенологическим контролем, позволяющего выполнять прямую инъекцию в сердечную мышцу, например, без необходимости проведения открытой хирургической операции.

50

### Пример 16

Имплантация в селезенку островков, гепатоцитов или клеток, полученных с помощью генной инженерии, с конформным покрытием PEG для лечения различных заболеваний

В случае островков неинкапсулированные островки успешно имплантировали в селезенку собакам, больным диабетом, а также людям, больным диабетом, таким же образом, как имплантацию неинкапсулированных островков в печень. Теперь инкапсулированные островки успешно функционируют в селезенке и в подкожном сайте. Аналогично этому имплантация клеток, полученных с помощью генной инженерии, в частности, гепатоцитов, в селезенку обеспечивает клетки хорошо васкуляризованным сайтом, в котором также происходит выделение в печень продукта, полученного с помощью генной инженерии. Это важно для таких заболеваний, в которых печень играет главную роль в переработке или использовании клеточного продукта, полученного с помощью генной инженерии и имплантируемого в селезенку. Простой доступ к селезенке и ее способность удерживать объемы клеток делает ее привлекательным сайтом для терапии инкапсулированными клетками.

### Пример 17

Интратекальная инъекция инкапсулированных клеток для доставки агентов в CNS (центральная нервная система) с целью лечение заболеваний или нарушений

Ряд различных заболеваний CNS лечат инкапсулированными клетками. Некоторые заболевания могут требовать прямой инъекции в специфический больной участок головного мозга, например, инъекция инкапсулированных клеток, вырабатывающих допамин, в черную субстанцию пациентов, страдающих паркинсонизмом. Однако множество различных заболеваний или нарушений CNS лечат простой инъекцией инкапсулированных клеток, вырабатывающих необходимый фактор CNS, в спинномозговую жидкость спинного мозга или ниже него, обеспечивая выделения продукта инкапсулированных клеток. Циркуляция спинномозговой жидкости переносит продукт в нужный участок головного или спинного мозга. Другой пример такого подхода заключается в инкапсуляции клеток, вырабатывающих допамин, в полые волокна, которые вставляют в поясничный спинномозговой канал для лечения хронических болевых состояний, которые имеют место, в частности, у пациентов, страдающих метастатическим раком. Используя такие конформные покрытия, можно доставлять клетки в больших количествах. В другом варианте применения эти инкапсулированные клетки помещают в полые трубки,

которые можно закреплять снаружи, не обеспечивая их иммунной защиты. Одним из указанных заболеваний является рассеянный склероз, который лечат инкапсулированными олигодендроцитами или другими клетками, вырабатывающими другие известные факторы, заставляющие необходимые субстанции восстанавливать повреждение миелина, вызываемое этим заболеванием. Еще один пример представляет собой лечение боли, когда эта форма инкапсуляции увеличивает количество клеток, вырабатывающих допамин. Применение допамина полезно также при лечении различных форм наркомании и алкоголизма за счет повышения уровня допамина, циркулирующего в спинномозговой жидкости пациентов с указанной зависимостью. Применение NGF (фактора роста нервов) и других агентов полезно при лечении пациентов с травмами спинного мозга. NGF и другие агенты выделяются из инкапсулированных клеток в жидкость спинномозгового канала.

20

### Пример 18

Имплантация инкапсулированных клеток околощитовидной железы или надпочечников в мышцу, селезенку или печень пациентов, не имеющих собственных функционирующих клеток околощитовидной железы или надпочечников вследствие заболевания или хирургического удаления из-за фактических опухолей или потенциальной опасности возникновения опухолей

30

У ряда пациентов удаляют околощитовидные железы или надпочечники из-за фактических опухолей. У второй группы пациентов эти органы удаляют из-за опасности возникновения опухоли в будущем вследствие генетических наследственных заболеваний. Нормальные клетки околощитовидной железы или надпочечников человека из органов трупных доноров инкапсулировали PEG с удалением этих тканей во время извлечения органов. Эти органы содержат ряд клеточных препаратов, пригодных для экспериментальной работы, и специалист в данной области может легко получить клетки из этих органов. Инкапсуляцию PEG проводят с помощью нанесения конформного покрытия или покрытий PEG на альгинатной основе с целью имплантации этих инкапсулированных клеток тем пациентам, которые утратили функции одного из указанных органов вследствие фактических опухолей или потенциального образования опухолей.

50

### Пример 19

## Имплантация инкапсулированных клеток для лечения генетических наследственных заболеваний

Генетические дефекты вызывают множество заболеваний у человека и животных. Роль генной терапии в прямом введении соответствующих генов в различные ткани организма в настоящее время не получила достаточного развития. Многие из указанных наследственных заболеваний лечат инкапсулированными клетками, которые вырабатывают продукт недостающего гена, используя вырабатывающие продукт первичные клетки или клетки, полученные с помощью генной инженерии. Инкапсуляцию этих клеток можно выполнить способами, приведенными в данном описании. Имплантацию таких инкапсулированных клеток можно произвести в любой сайт, если не требуется введения продукта в какой-либо определенный сайт. Таким образом, инкапсулированные клетки вводят подкожно, в печень – путем инъекции в воротную вену или прямой инъекции, в селезенку – путем васкулярной или прямой инъекции, в мышцу – путем васкулярной или прямой инъекции, в почку – путем васкулярной или прямой инъекции, в сердце – путем васкулярной или прямой инъекции, в спинномозговой канал – путем инъекции, в головной мозг – путем васкулярной или прямой инъекции, в глаз – путем васкулярной или прямой инъекции, в легкое – путем васкулярной или прямой инъекции, в щитовидную железу – путем васкулярной или прямой инъекции, в костный мозг – путем прямой инъекции, в сустав – путем прямой инъекции или непосредственно в рану – путем прямой инъекции или аппликации.

### Пример 20

Применение инкапсулированных клеток, вырабатывающих гормоны роста, для применения в животноводстве с целью повышения скорости роста животных или удоев молока

Гормоны роста используют в молочном животноводстве для повышения удоев молока. Предлагается также вводить гормоны роста поросятам, чтобы повысить скорость нарастания мяса и увеличения размеров и тем самым сократить время выращивания. Инкапсуляция клеток, вырабатывающих гормоны роста, и имплантация их указанным сельскохозяйственным животным дают такие же результаты, устранив необходимость ежедневных дорогостоящих инъекций. В случае свиной модели покрытие PEG можно сделать рассасывающимся в течение 6 недель, чтобы во время

забоя и последующего потребления человеком мясо животного не содержало гормонов роста. В альтернативном варианте реализации инкапсулированные клетки содержатся в легко удаляемом вводимом контейнере, что позволяет устраниить образование гормона 5 роста.

Следует понимать, что приведенное выше описание содержит типичные примеры и пояснения и служит для иллюстрации изобретения и его предпочтительных 10 вариантов реализации. С помощью обычных экспериментов специалист в данной области может определить модификации и вариации, которые можно реализовать, не отклоняясь от сути данного изобретения. Таким образом, следует четко понимать, что 15 формы настоящего изобретения являются только иллюстративными и не ограничивают области распространения изобретения. Все работы, цитируемые в данном описании, включены полностью в качестве ссылки.

#### 20 Формула изобретения

1. Состав для клеточной терапии, содержащий:  
инкапсулирующие устройства, содержащие покрытие и клетки, при этом указанный состав имеет плотность клеток по меньшей мере примерно 100000 клеток/мл, а указанное покрытие для инкапсулирующих устройств содержит акрилатный полиэтиленгликоль (PEG) 25 высокой плотности с молекулярной массой от 900 до 3000 Д, а также сульфонированный смономер.
2. Состав по п.1, отличающийся тем, что инкапсулирующие устройства представляют собой микрокапсулы.
3. Состав по п.2, отличающийся тем, что микрокапсулы представляют собой клеточные 30 агрегаты с нанесенным конформным покрытием.
4. Состав по п.3, отличающийся тем, что клеточные агрегаты представляют собой панкреатические островки.
5. Состав по п.4, отличающийся тем, что плотность клеток составляет по меньшей мере 6000000 клеток/мл.
- 35 6. Состав по п.1, отличающийся тем, что клетку выбирают из группы, включающей неврологическую, сердечно-сосудистую, печеночную, эндокринную, кожную, кроветворную, иммунную, нейросекреторную, метаболическую, системную и генетическую клетку.
7. Состав по п.6, отличающийся тем, что клетку выбирают из группы, включающей аутологическую, аллогенную, ксеногенную и генетически модифицированную клетку.
- 40 8. Состав по п.7, отличающийся тем, что эндокринная клетка представляет собой клетку, вырабатывающую инсулин.
9. Состав по пп.1-8, предназначенный для лечения животного от заболевания или нарушения.
10. Состав по п.9, отличающийся тем, что заболевание или нарушение выбирают из 45 группы, включающей неврологические, сердечно-сосудистые, печеночные, эндокринные, кожные, кроветворные, иммунные, нейросекреторные, метаболические, системные и генетические заболевания.
11. Состав по п.10, отличающийся тем, что эндокринное заболевание представляет собой диабет.
- 50 12. Состав по п.9, отличающийся тем, что указанное животное представляет собой человека.
13. Состав по п.9, отличающийся тем, что представляет собой состав для инъекций.
14. Состав по п.9, отличающийся тем, что предназначен для имплантации в сайт,

выбранный из группы, включающей подкожный, внутримышечный, внутриорганный сайт, артериальные/венозные сосуды органа, спинномозговую жидкость и лимфатическую жидкость.

- 15. Состав по п.13, отличающийся тем, что состав для инъекций помещают в шприц.
- 5 16. Состав по п.9, отличающийся тем, что применяется в сочетании с иммунодепрессантом или противовоспалительным агентом.
- 17. Состав по п.16, отличающийся тем, что иммунодепрессант или противовоспалительный агент вводят в течение периода менее 6 мес, предпочтительно менее 1 мес.
- 10 18. Терапевтически эффективный состав, содержащий множество инкапсулирующих устройств, имеющих средний диаметр менее 400 мкм, при этом указанные инкапсулирующие устройства содержат инкапсулированные клетки в инкапсулирующем материале, указанный состав содержит акрилатный PEG высокой плотности с покрытие для инкапсулирующих устройств содержит акрилатный PEG высокой плотности с молекулярной массой от 900 до 3000 Д, а также сульфонированный сомономер.
- 15 19. Терапевтически эффективный состав по п.18, отличающийся тем, что диаметр инкапсулирующего устройства составляет менее 300 мкм, предпочтительно менее 200 мкм, более предпочтительно менее 100 мкм, наиболее предпочтительно менее 50 мкм.
- 20 20. Состав по пп.18 и 19, предназначенный для лечения животного от заболевания или нарушения.
- 21. Состав по п.20, отличающийся тем, что заболевание или нарушение выбирают из группы, включающей неврологические, сердечно-сосудистые, печеночные, эндокринные, кожные, кроветворные, иммунные, нейросекреторные, метаболические, системные и генетические заболевания.
- 25 22. Состав по п.21, отличающийся тем, что эндокринное заболевание представляет собой диабет.
- 23. Состав по п.20, отличающийся тем, что указанное животное представляет собой человека.
- 24. Состав по п.20, отличающийся тем, что представляет собой состав для инъекций.
- 30 25. Состав по п.20, отличающийся тем, что предназначен для имплантации в сайт, выбранный из группы, включающей подкожный, внутримышечный, внутриорганный сайт, артериальные/венозные сосуды органа, спинномозговую жидкость и лимфатическую жидкость.
- 26. Состав по п.24, отличающийся тем, что состав для инъекций помещают в шприц.
- 35 27. Состав по п.20, отличающийся тем, что применяется в сочетании с иммунодепрессантом или противовоспалительным агентом.
- 28. Состав по п.27, отличающийся тем, что иммунодепрессант или противовоспалительный агент вводят в течение периода менее 6 мес, предпочтительно менее 1 мес.
- 40 29. Терапевтически эффективный состав, содержащий множество инкапсулирующих устройств, имеющих средний диаметр менее 400 мкм, при этом указанные инкапсулирующие устройства содержат инкапсулированные клетки в инкапсулирующем материале и в указанном составе отношение объема инкапсулирующего устройства к объему клеток составляет менее примерно 20:1, предпочтительно менее примерно 10:1, более предпочтительно менее примерно 2:1, а указанное покрытие для указанных инкапсулирующих устройств содержит акрилатный PEG высокой плотности с молекулярной массой от 900 до 3000 Д, а также сульфонированный сомономер.
- 45 30. Состав по любому из пп.1, 18 или 29, отличающийся тем, что полимеризуемый акрилатный PEG высокой плотности имеет молекулярную массу 1,1 кД.
- 50 31. Состав по любому из пп.1, 18 или 29, отличающийся тем, что сульфонированный сомономер выбирают из группы, включающей 2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновую кислоту, винилсульфоновую кислоту, 4-стиролсульфоновую кислоту, 3-сульфопропилакрилат, 3-сульфопропилметакрилат и п-винилмалеимидсульфонат.

32. Состав по любому из пп.1, 18 или 29, отличающийся тем, что содержит также сокатализатор, который выбирают из группы, включающей триэтаноламин, триэтиламин, этианоламин, N-метилдиэтаноламин, N,N-диметилбензиламин, дibenзиламино, N-бензилэтаноламин, N-изопропилбензиламин, тетраметилэтилендиамин, персульфат калия,
- 5 лизин, орнитин, гистидин и аргинин.
33. Состав по любому из пп.1, 18 или 29, отличающийся тем, что содержит также ускоритель, который выбирают из группы, включающей N-винилпирролидинон, 2-винилпиридин, 1-ванилимидазол, 9-винилкарбазон, 9-винилкарбазол, акриловую кислоту, n-винилкапролактам, 2-аллил-2-метил-1,3-цикlopентандион и 2-оксиэтилакрилат.
- 10 34. Состав по любому из пп.1, 18 или 29, отличающийся тем, что состав является биосовместимым с показателем биосовместимости по меньшей мере около 2 баллов.
35. Состав по п.34, отличающийся тем, что состав является биосовместимым с организмом млекопитающих.
- 15 36. Состав по п.35, отличающийся тем, что является биосовместимым с организмом человекаобразных обезьян.
37. Состав по п.36, отличающийся тем, что является биосовместимым с организмом человека.
38. Состав по любому из пп.1, 18 или 29, отличающийся тем, что он обладает селективной проницаемостью.
- 20 39. Состав по любому из пп.1, 18 или 29, отличающийся тем, что обеспечивает клеточную функциональность с баллом по меньшей мере 2.
40. Состав по п.39, отличающийся тем, что обеспечивает функциональность клеток в организме млекопитающих.
- 25 41. Состав по п.40, отличающийся тем, что обеспечивает функциональность клеток в организме человекаобразных обезьян.
42. Состав по п.41, отличающийся тем, что обеспечивает функциональность клеток в организме человека.
43. Состав по любому из пп.1, 18 или 29, отличающийся тем, что он способен к биологическому разложению.
- 30 44. Состав по п.43, отличающийся тем, что он биологически разлагается в организме человека.
45. Состав по п.29, предназначенный для лечения животного от заболевания или нарушения.
- 35 46. Состав по п.45, отличающийся тем, что заболевание или нарушение выбирают из группы, включающей неврологические, сердечно-сосудистые, печеночные, эндокринные, кожные, кроветворные, иммунные, нейросекреторные, метаболические, системные и генетические заболевания.
47. Состав по п.46, отличающийся тем, что эндокринное заболевание представляет собой диабет.
- 40 48. Состав по п.45, отличающийся тем, что указанное животное представляет собой человека.
49. Состав по п.45, отличающийся тем, что представляет собой состав для инъекций.
50. Состав по п.45, отличающийся тем, что предназначен для имплантации в сайт, выбранный из группы, включающей подкожный, внутримышечный, внутриорганный сайт,
- 45 артериальные/венозные сосуды органа, спинномозговую жидкость и лимфатическую жидкость.
51. Состав по п.49, отличающийся тем, что состав для инъекций помещают в шприц.
52. Состав по п.45, отличающийся тем, что применяется в сочетании с иммунодепрессантом или противовоспалительным агентом.
- 50 53. Состав по п.52, отличающийся тем, что иммунодепрессант или противовоспалительный агент вводят в течение периода менее 6 мес, предпочтительно менее 1 мес.
54. Применение состава по пп.1-53 для получения имплантируемого медикамента,

предназначенного для лечения заболевания или нарушения.

55. Применение по п.54, отличающееся тем, что заболевание или нарушение выбирают из группы, включающей неврологические, сердечно-сосудистые, печеночные, эндокринные, кожные, кроветворные, иммунные, нейросекреторные, метаболические, системные и

5 генетические.

56. Применение по п.55, отличающееся тем, что эндокринное заболевание представляет собой диабет.

57. Применение по п.54, отличающееся тем, что состав применяют для лечения человека.

10 58. Применение по п.54, отличающееся тем, что медикамент представляет собой состав для инъекций.

59. Применение по п.54, отличающееся тем, что медикамент предназначен для имплантации в сайт, выбранный из группы, включающей подкожный, внутримышечный, внутриорганный сайт, артериальные/венозные сосуды органа, спинномозговую жидкость и

15 лимфатическую жидкость.

60. Применение по п.58, отличающееся тем, что состав для инъекций помещают в шприц.

61. Применение по п.54, отличающееся тем, что указанный медикамент предназначен для совместного введения с иммунодепрессантом или противовоспалительным агентом.

20 62. Применение по п.61, отличающееся тем, что совместное введение

иммунодепрессанта или противовоспалительного агента осуществляют менее 6 мес, предпочтительно менее 1 мес.

63. Способ инкапсулирования клеток, включающий:

a) добавление к указанным клеткам раствора, содержащего первый буфер;

25 b) центрифугирование указанных клеток с формированием пеллетированных клеток;

b) удаление супернатанта;

d) добавление к пеллетированным клеткам раствора, содержащего фотоинициирующий краситель, конъюгированный с материалом, адсорбирующими клетки;

e) ресуспендиование и инкубирование в течение продолжительного периода времени

30 пеллетированных клеток с раствором, содержащим фотоинициирующий краситель, конъюгированный с материалом, адсорбирующими клетки;

f) центрифугирование смеси;

g) удаление раствора, содержащего фотоинициирующий краситель, конъюгированный с материалом, адсорбирующими клетки;

35 h) ресуспендиование пеллетированных клеток со вторым раствором, содержащим второй буфер;

i) центрифугирование и удаление второго буфера;

j) ресуспендиование и смешение клеток с раствором фотоактивного полимера, который содержит полимеризуемый акрилатный PEG высокой плотности, а также

40 сульфонированный сомономер;

k) облучение ресуспендированных клеток с раствором фотоактивного полимера от источника энергии с образованием инкапсулированных клеток,

где указанные первый и второй буфер имеют концентрацию 1-200 мМ, предпочтительно 10-50 мМ, более предпочтительно 20 мМ.

45 64. Способ по п.63, отличающийся тем, что материал, адсорбирующий клетки, является поликатионным полимером.

65. Способ по п.64, отличающийся тем, что поликатионным полимером является РАМАМ Dendrimer.

66. Способ по п.64, отличающийся тем, что поликатионным полимером является

50 полиэтиленимин.

67. Способ по п.63, отличающийся тем, что клетки представляют собой кластер клеток, вырабатывающих инсулин.

68. Способ по п.67, отличающийся тем, что клетка представляет собой клетку,

вырабатывающую инсулин.

69. Способ по п.63, отличающийся тем, что инкапсулированные клетки представляют собой островковый аллотрансплантат с нанесенным конформным покрытием из полиэтилен гликоля (PEG).

5 70. Способ по п.63, отличающийся тем, что фотоинициатор выбирают из группы, включающей карбоксиэозин, этилэозин, эозин Y, флуоресцин, 2,2-диметокси, 2-фенилацетофенон, 2-метокси, 2-фенилацетофеноно, камфорхинон, бенгальский розовый, метиленовый синий, эритрозин, флоксин, тионин, рибофлавин или метиленовый зеленый.

10 71. Способ по п.63, отличающийся тем, что полимеризуемый акрилатный PEG высокой плотности имеет молекулярную массу, равную 1,1 кД.

72. Способ по п.63, отличающийся тем, что сульфонированный сомономер выбирают из группы, включающей 2-акриламидо-2-метил-1-пропансульфоновую кислоту, винилсульфоновую кислоту, 4-стиролсульфоновую кислоту, 3-сульфопропилакрилат, 3-сульфопропилметакрилат и *n*-винилмалеимидсульфонат.

15 73. Способ по п.63, отличающийся тем, что раствор светочувствительного полимера содержит также сокатализатор, который выбирают из группы, включающей триэтаноламин, триэтиламин, этаноламин, N-метилдиэтаноламин, N,N-диметилбензиламин, дibenзиламино, N-бензилэтаноламин, N-изопропилбензиламин, тетраметилэтилендиамин, персульфат калия, лизин, орнитин, гистидин и аргинин.

20 74. Способ по п.63, отличающийся тем, что раствор светочувствительного полимера содержит также ускоритель, который выбирают из группы, включающей N-винилпирролидинон, 2-винилпиридин, 1-ванилимидазол, 9-винилкарбазон, 9-винилкарбазол, акриловую кислоту, *n*-винилкапролактам, 2-аллил-2-метил-1,3-циклопентандион и 2-оксиэтилакрилат.

25 75. Способ по п.63, отличающийся тем, что раствор светочувствительного полимера содержит также усилитель вязкости, который выбирают из группы, включающей природные и синтетические полимеры.

76. Способ по п.75, отличающийся тем, усилитель вязкости выбирают из группы, включающей PEG-триол с молекулярной массой 3,5 кД и PEG-диол с молекулярной массой 4 кД.

30 77. Способ по п.63, отличающийся тем, что раствор светочувствительного полимера содержит также агент, регулирующий плотность.

78. Способ по п.77, отличающийся тем, что агент, регулирующий плотность, выбирают из группы, включающей Nycodenz и Ficoll.

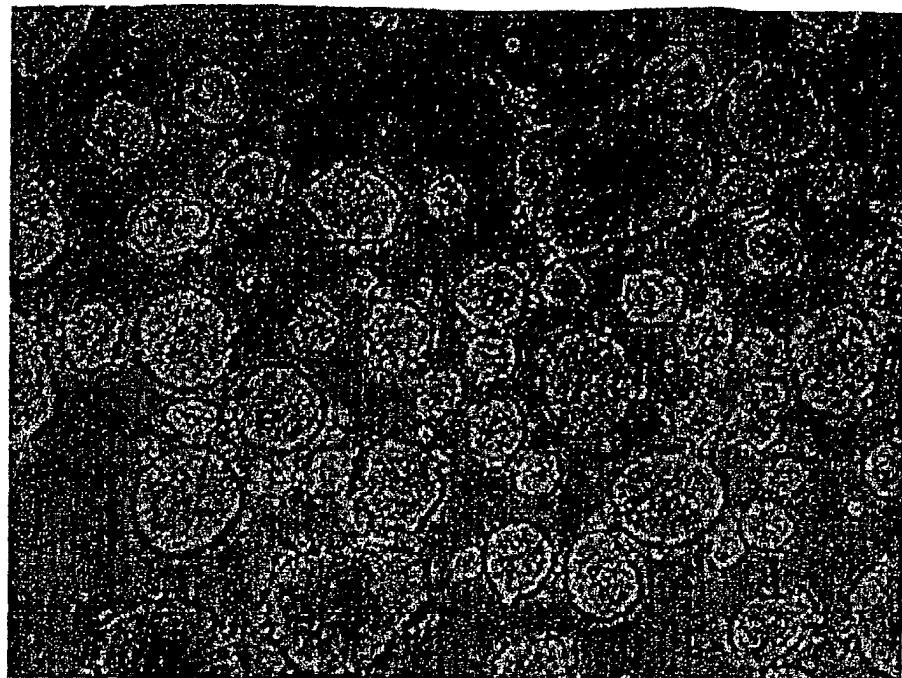
35 79. Способ по п.63, отличающийся тем, что раствор светочувствительного полимера содержит также буфер "Гуда" ("Good" buffer).

80. Способ по п.79, отличающийся тем, что буфер "Гуда" выбирают из группы, включающей HEPES (M-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновую кислоту) и MOPS (3-(*n*-морфолино)пропансульфоновую кислоту).

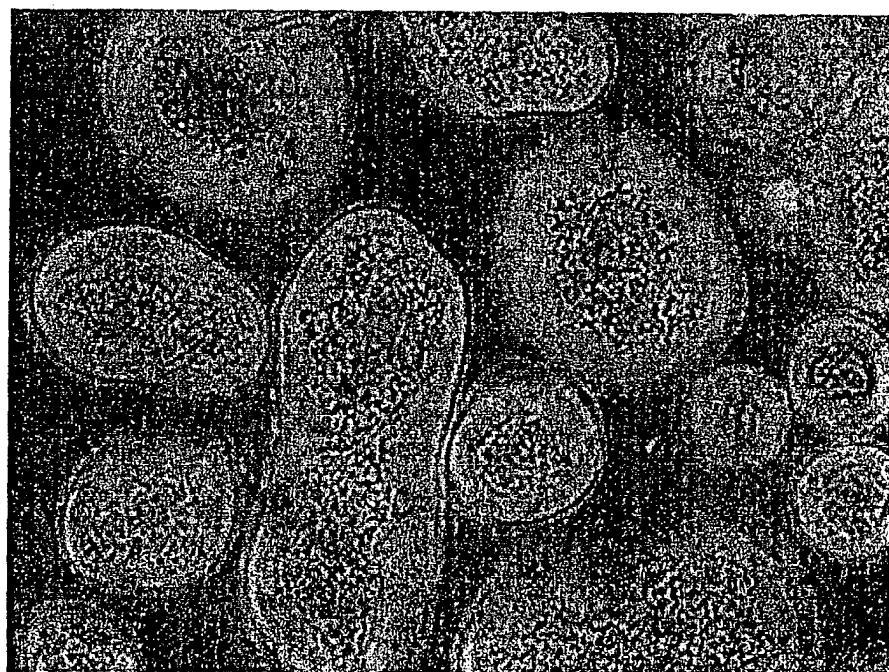
40 81. Способ по п.63, отличающийся тем, что источником энергии является аргоновый лазер.

82. Способ по п.63, отличающийся тем, что клетки выбирают из группы, включающей неврологические, сердечно-сосудистые, печеночные, эндокринные, кожные, кроветворные, иммунные, нейросекреторные, метаболические, системные и генетические клетки.

45 83. Способ по п.63, отличающийся тем, что клетки получают от животных подкласса Theria (настоящих зверей) класса млекопитающих.

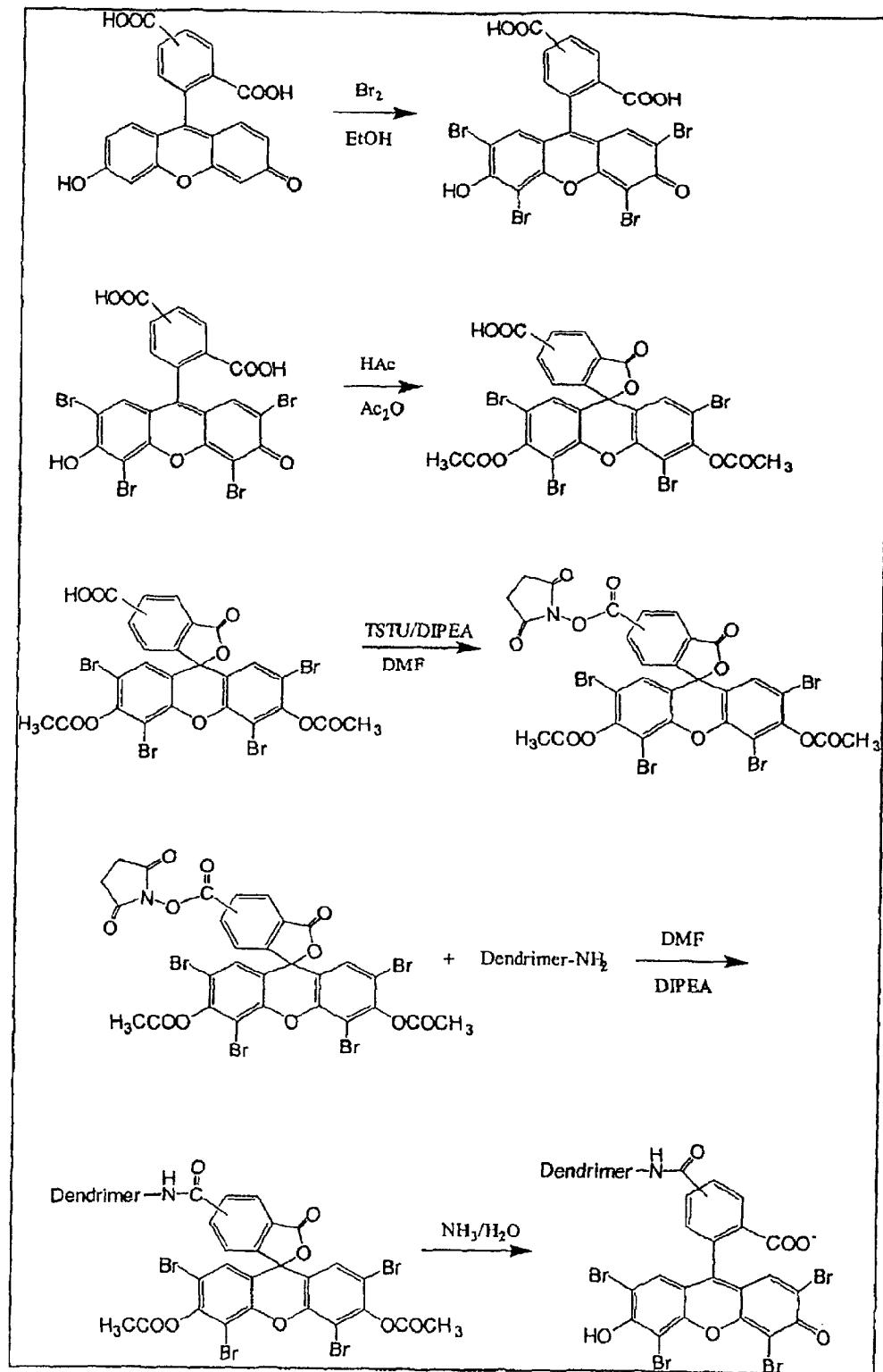


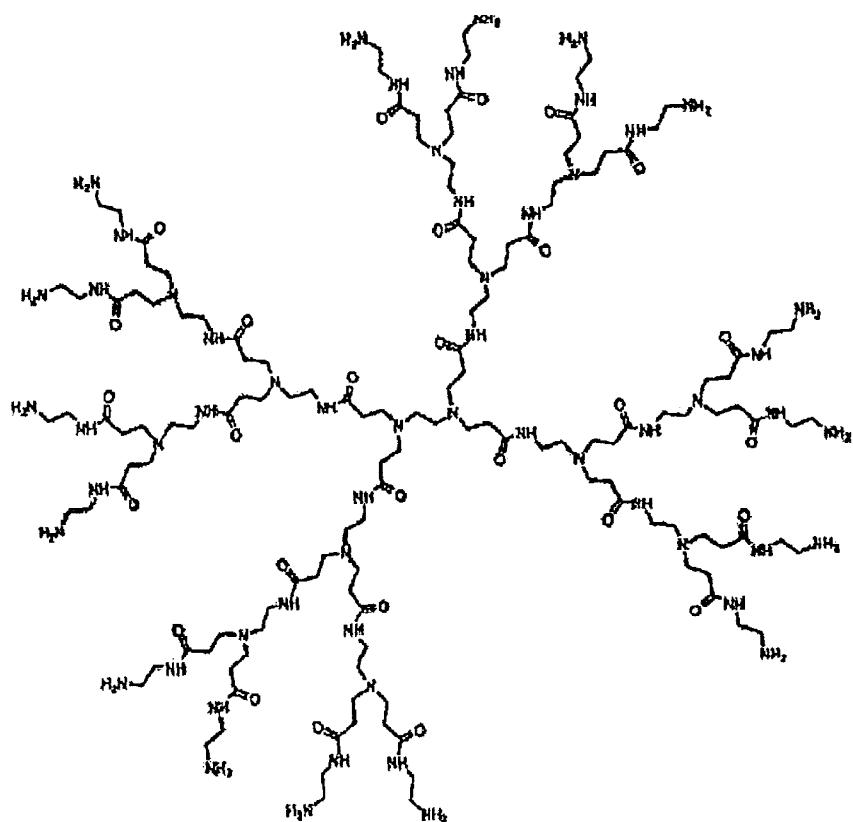
A



B

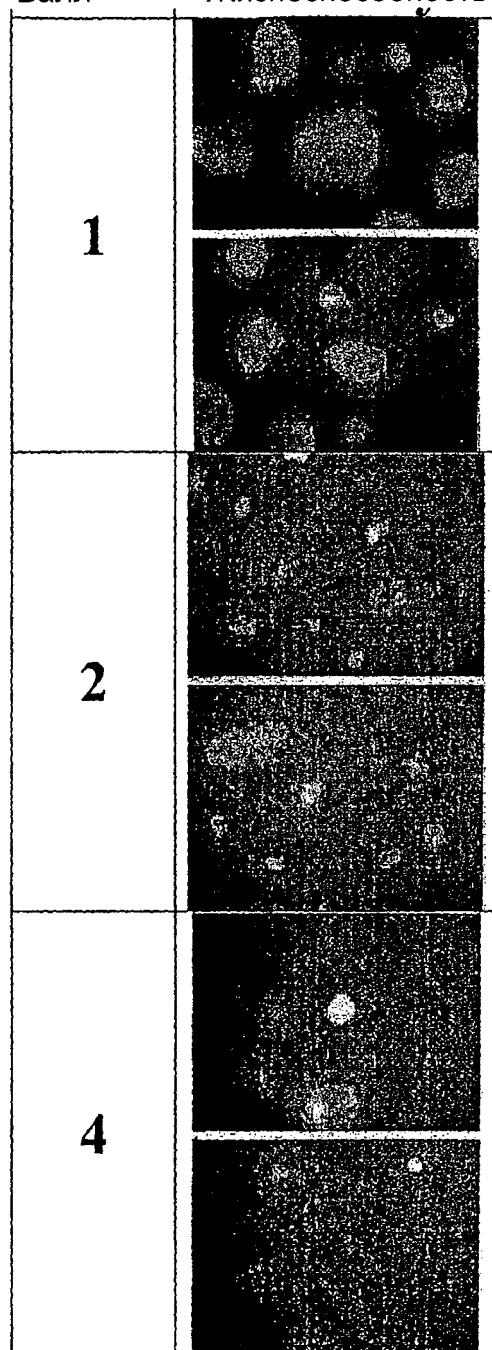
ФИГ. 1



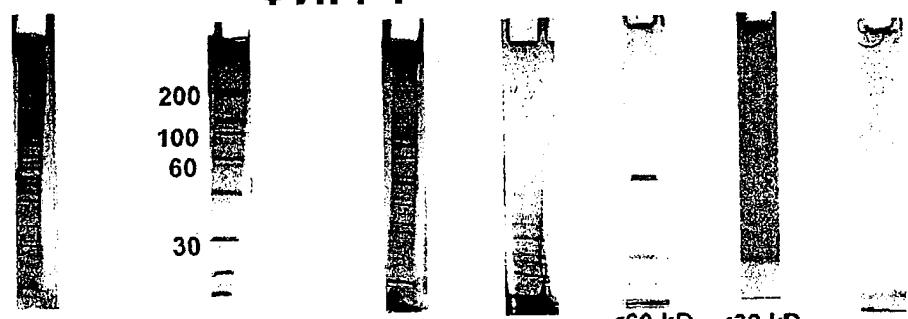


ФИГ. 3

Балл	Жизнеспособность
------	------------------



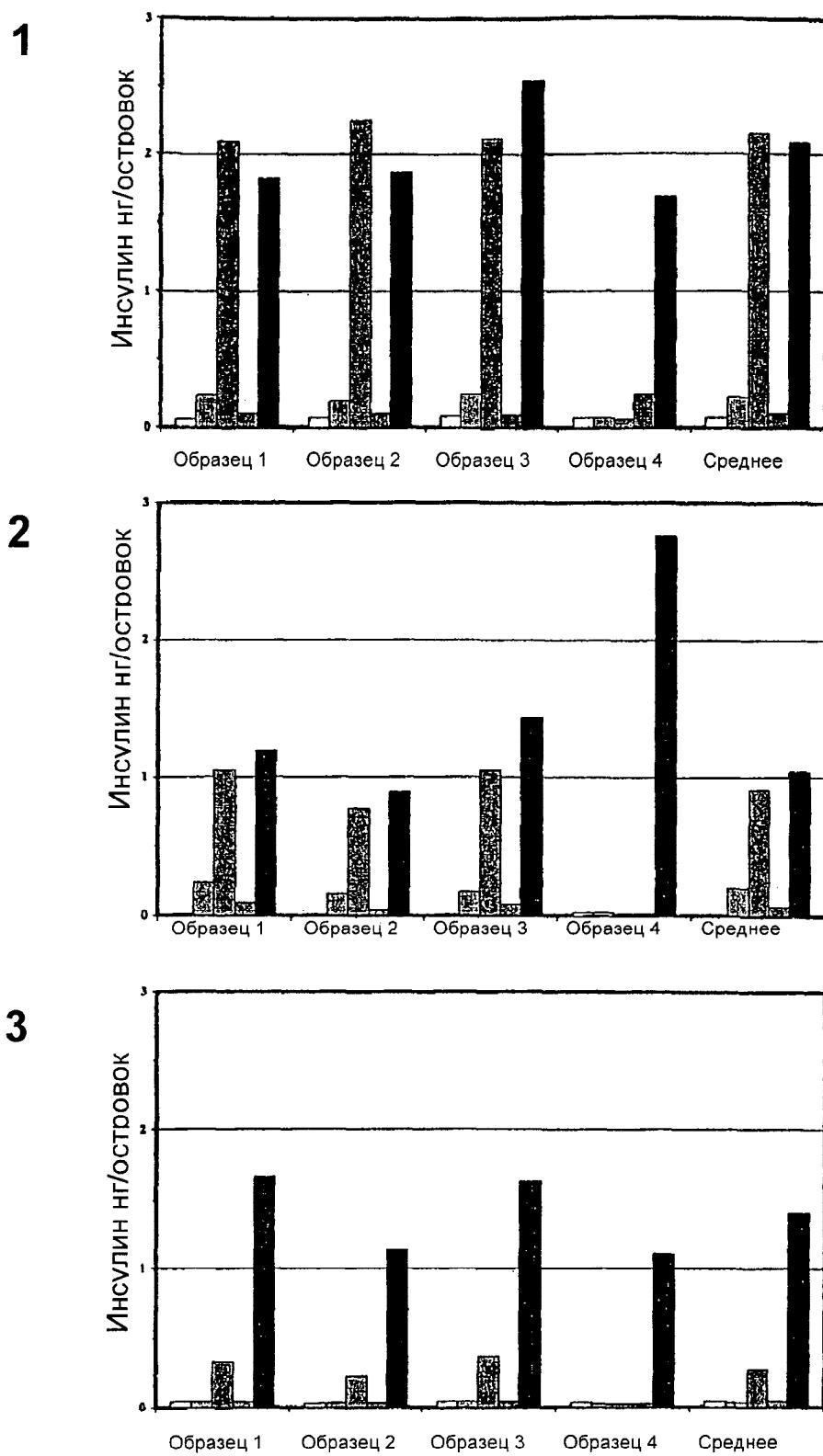
ФИГ. 4

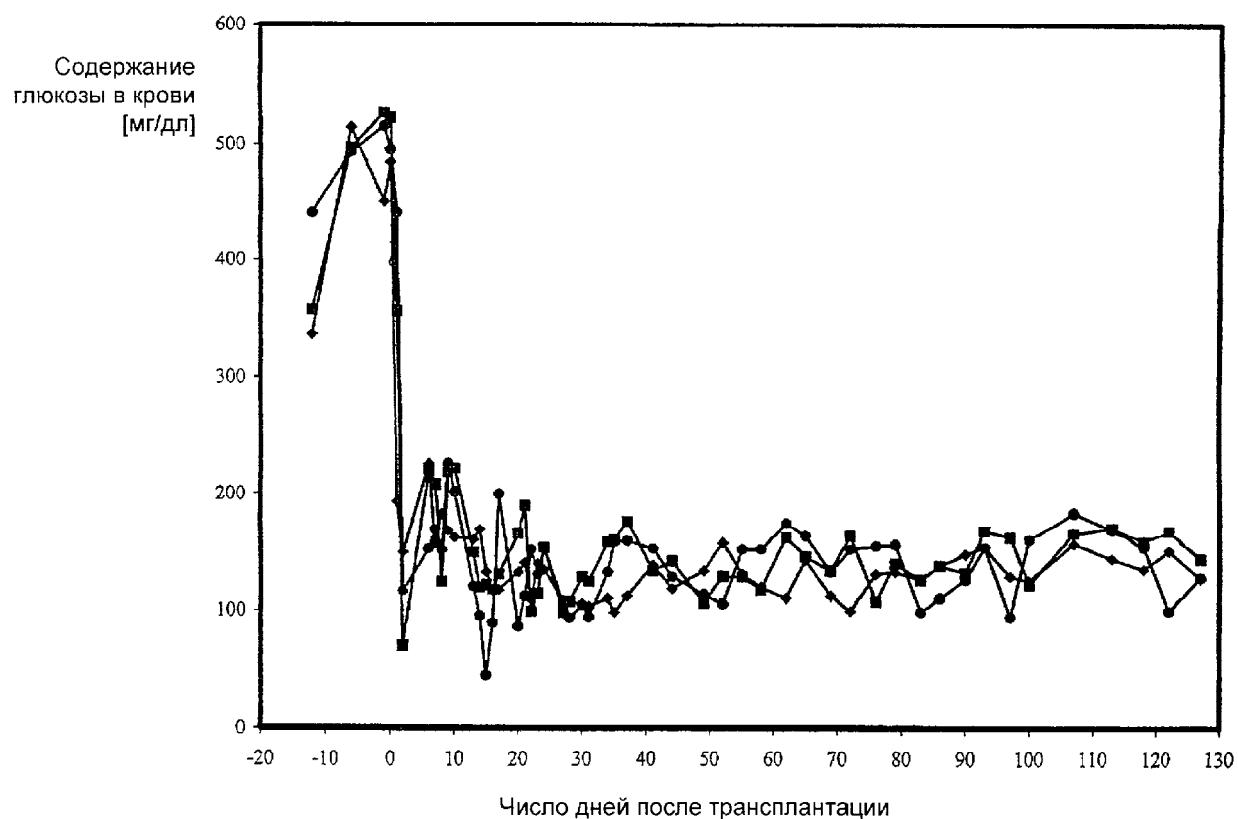


Некапсулированные  
островки

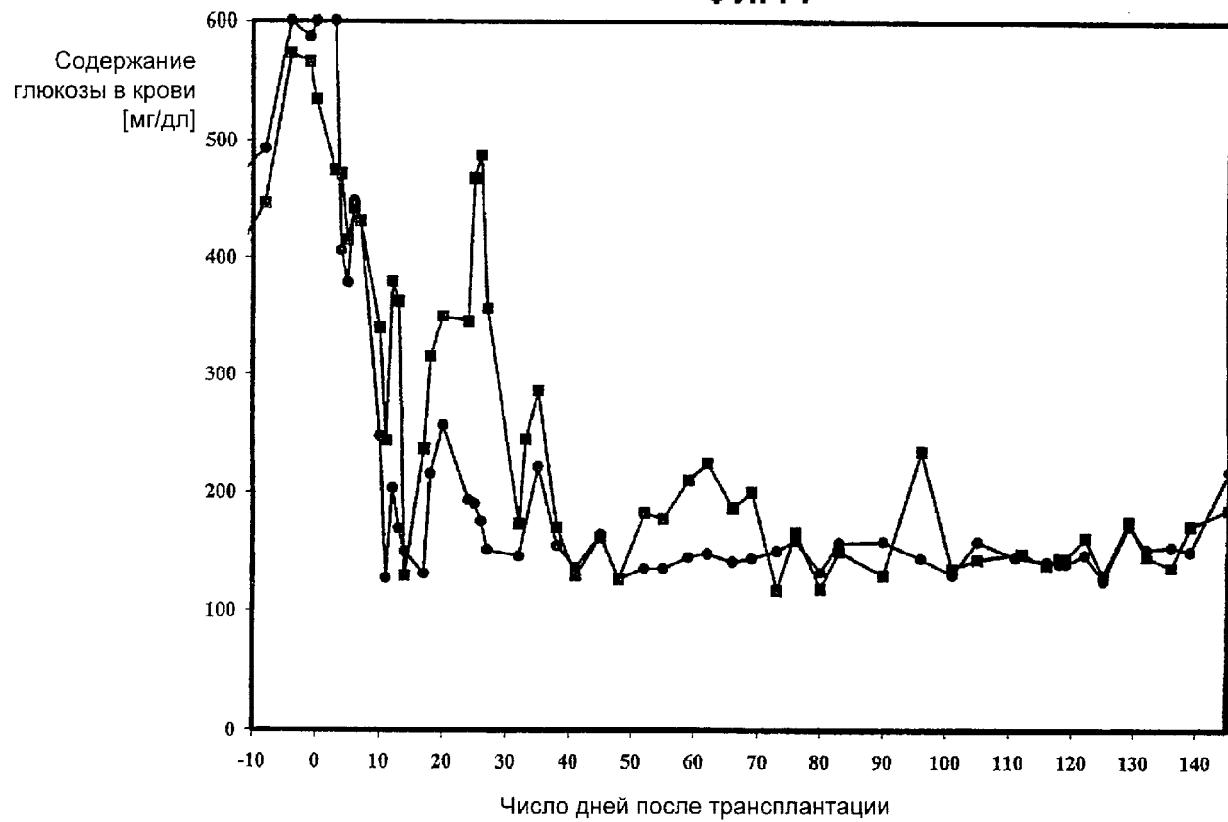
ФИГ. 5

Базовый   Стимулирование   IBMX   Базовый   0,1  
 Базовый   кислота

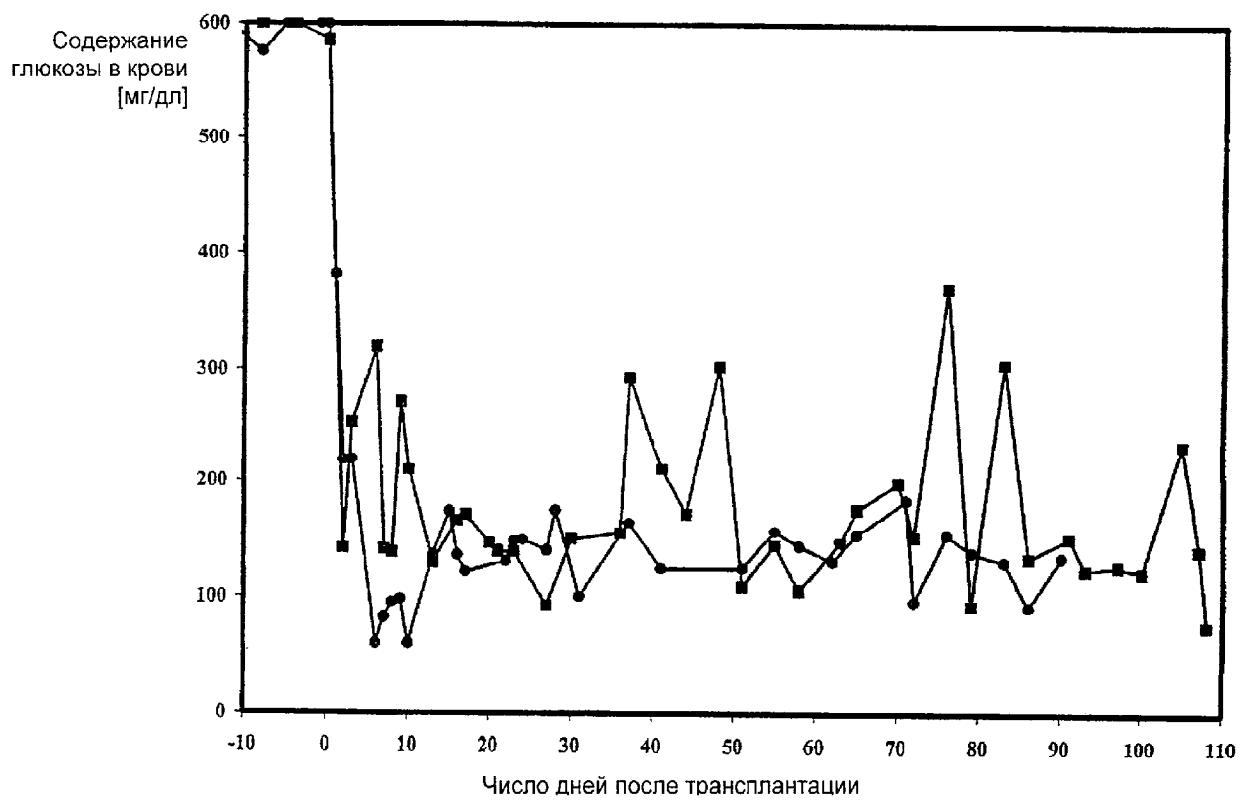
**ФИГ. 6**



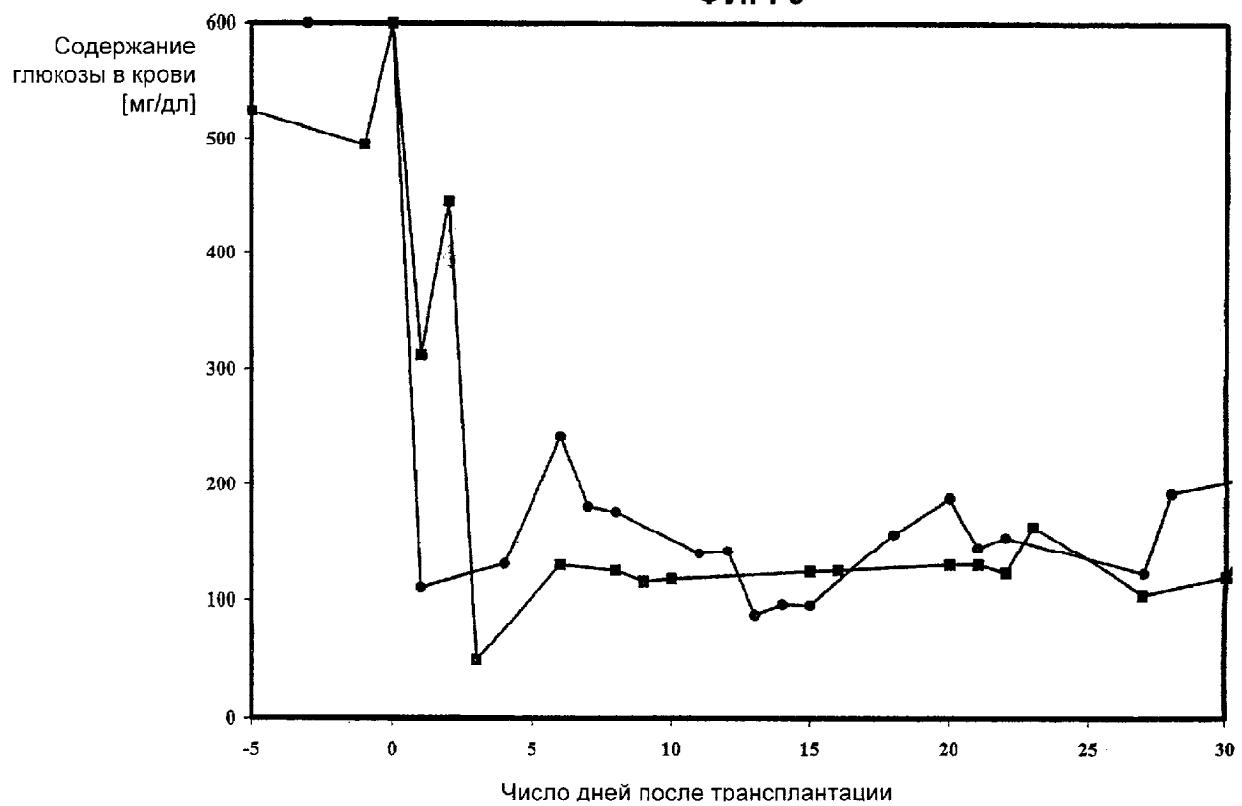
ФИГ. 7



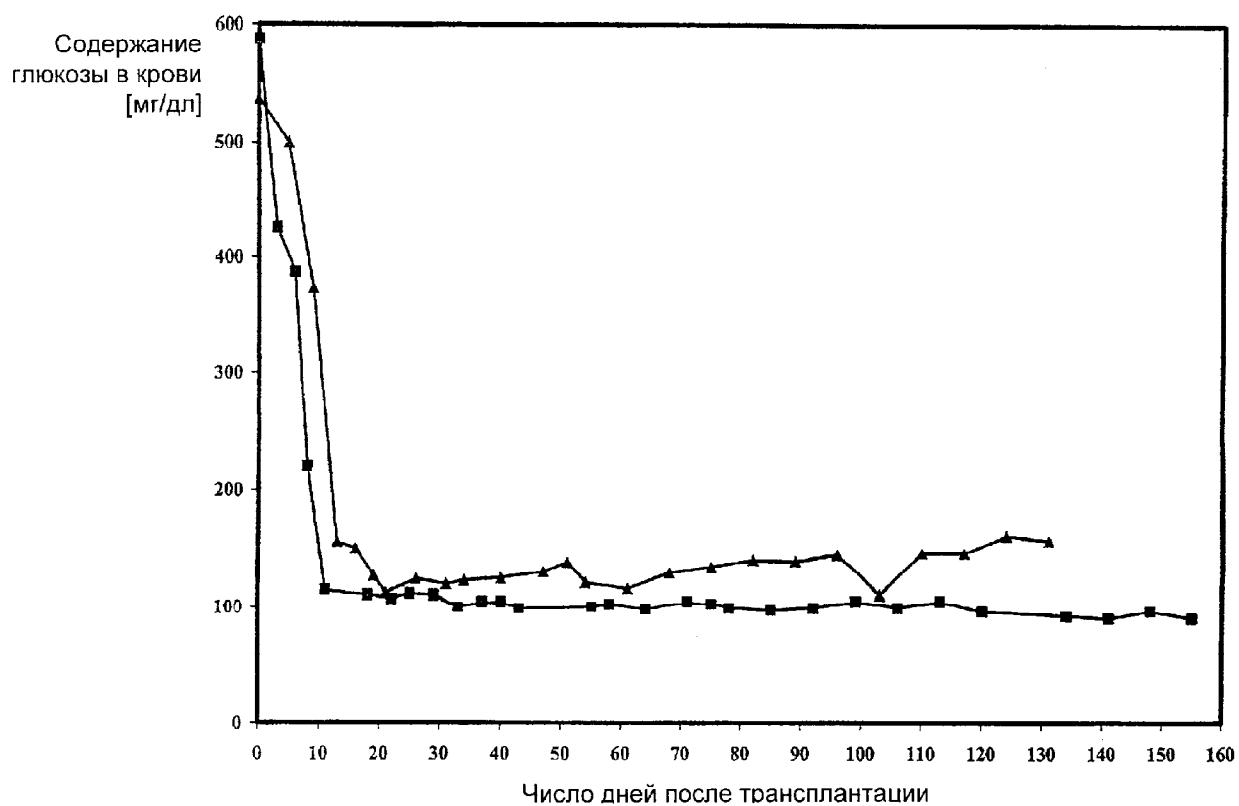
ФИГ. 8



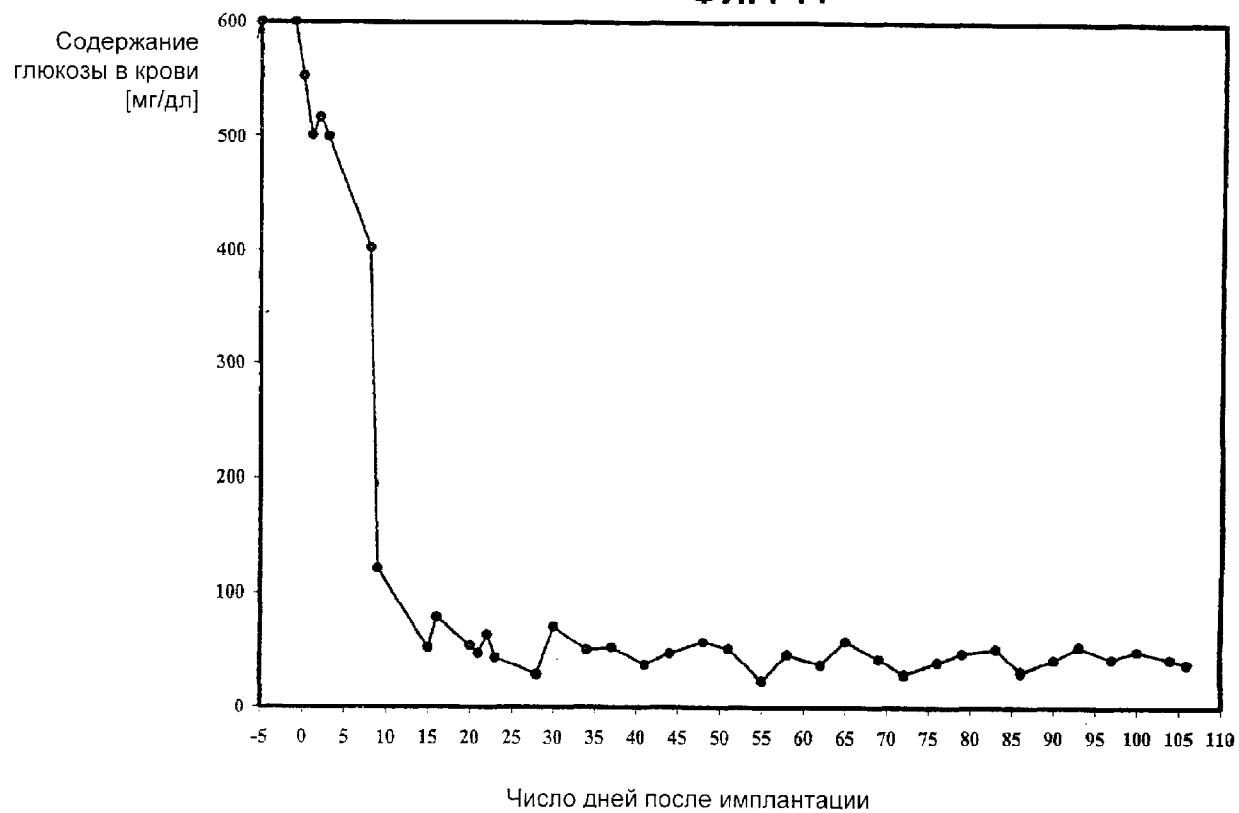
ФИГ. 9



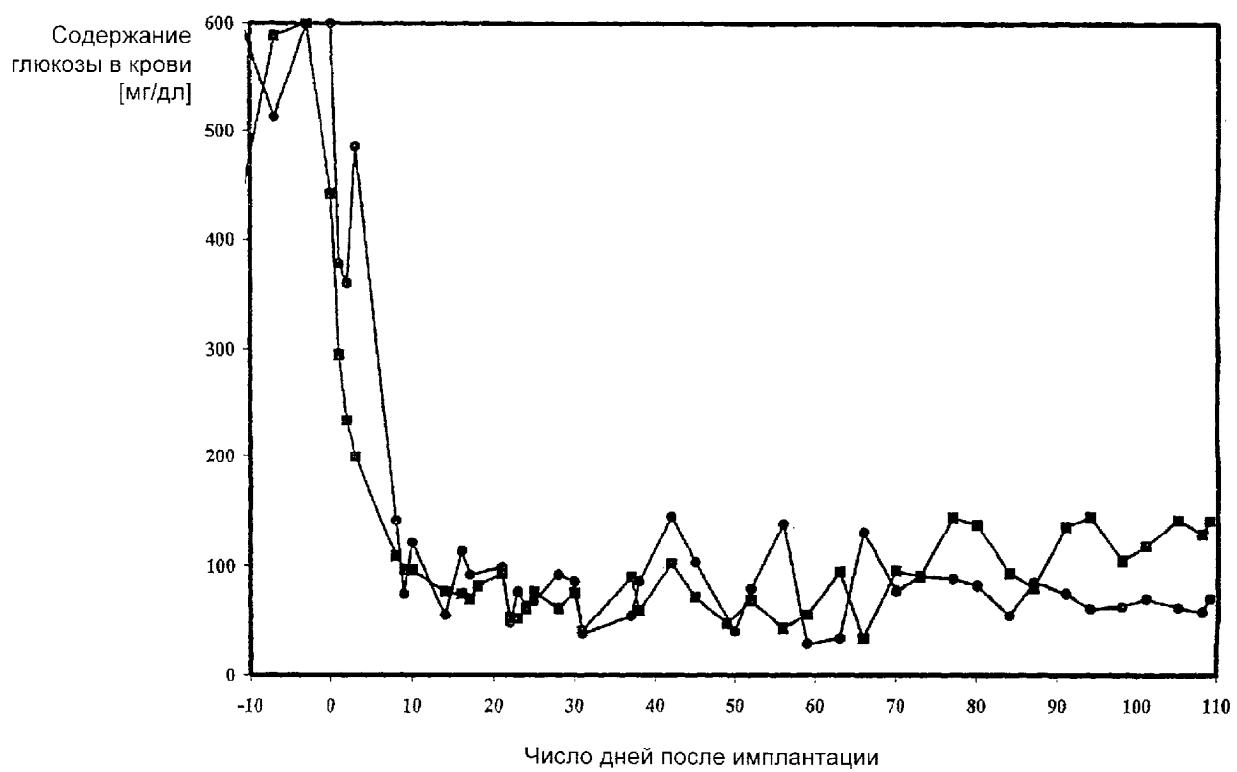
ФИГ. 10



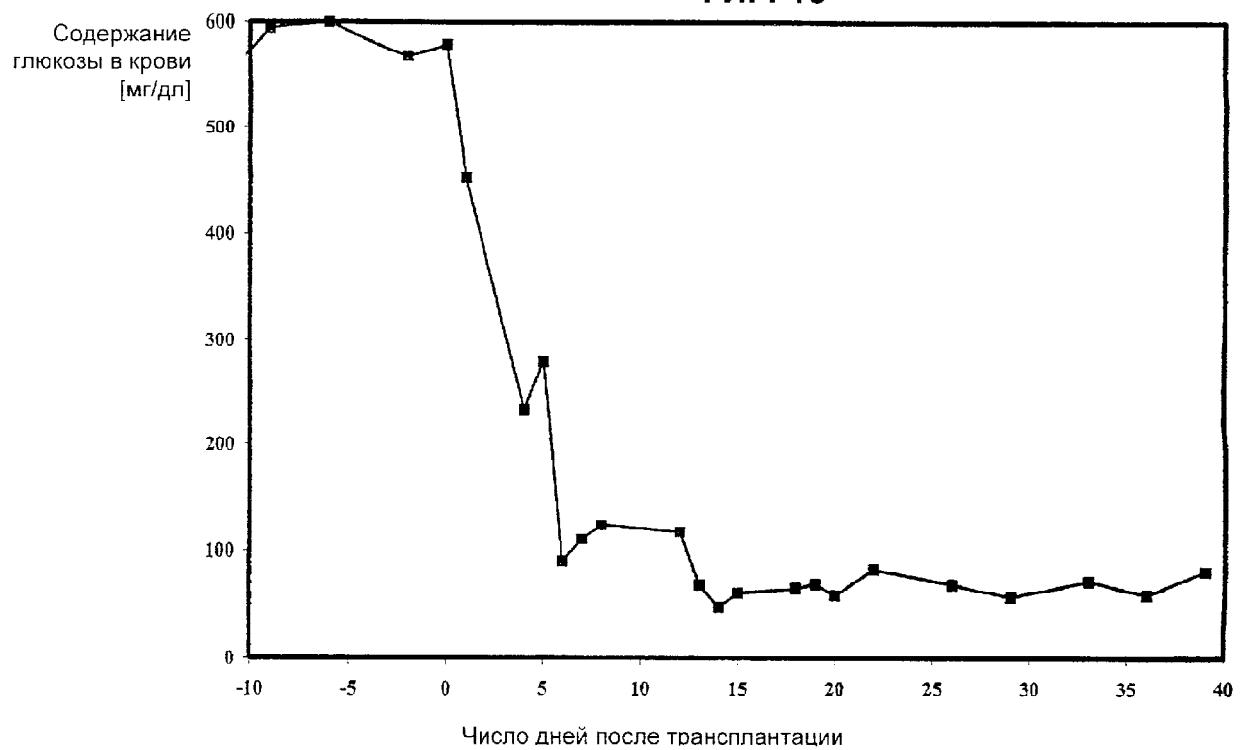
ФИГ. 11



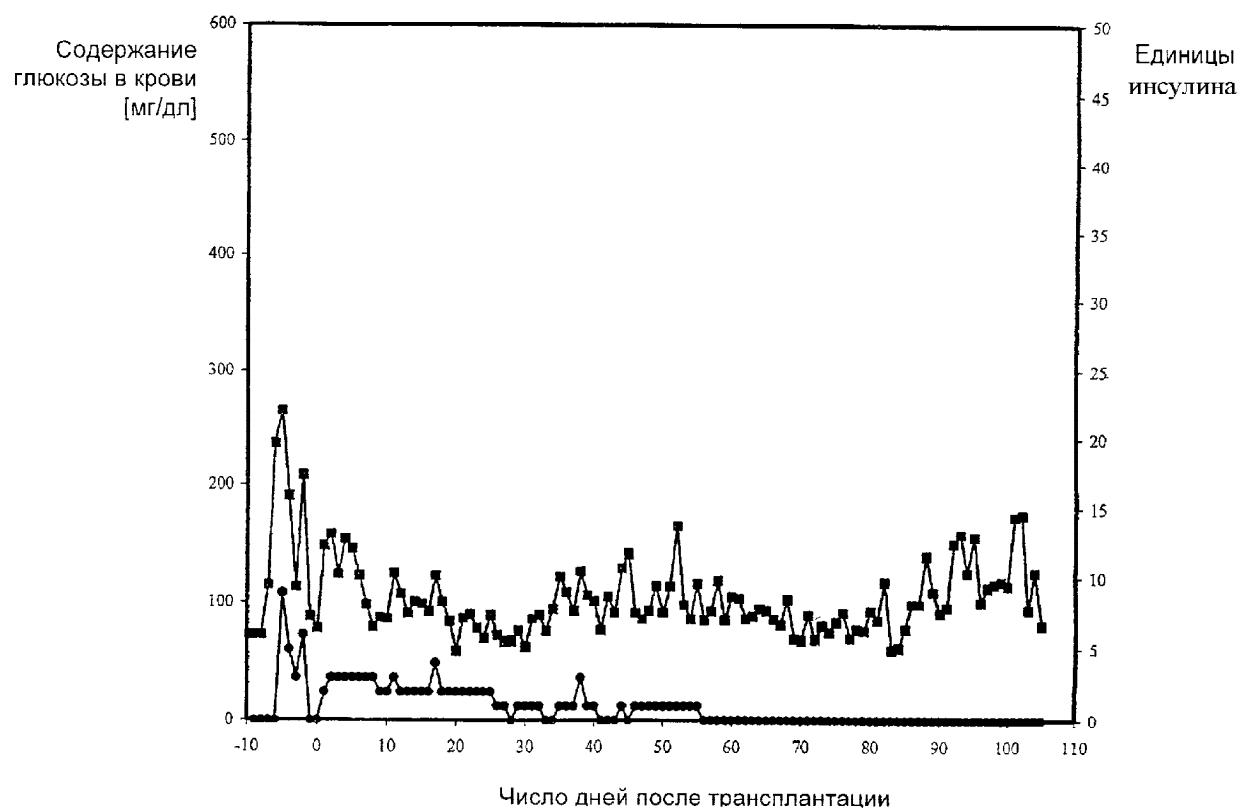
ФИГ. 12



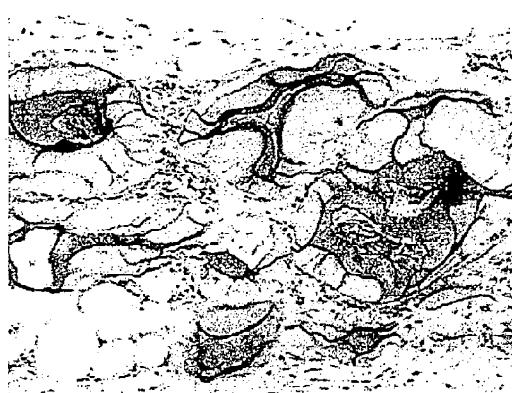
ФИГ. 13



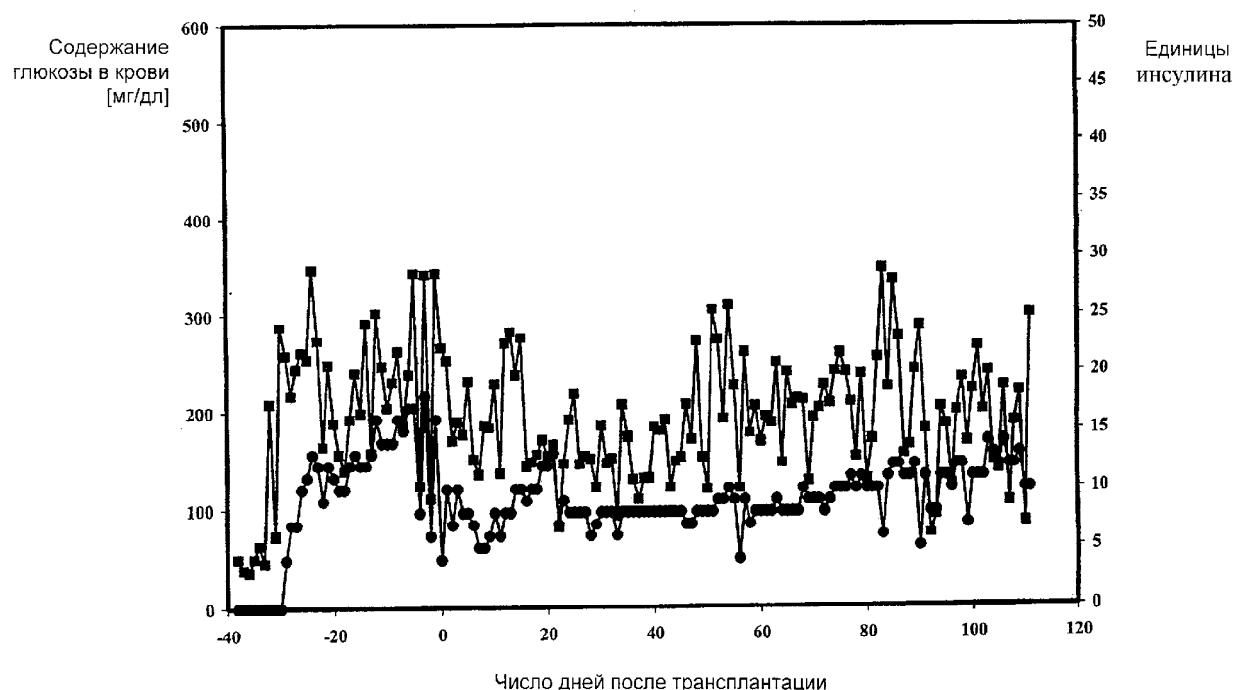
ФИГ. 14



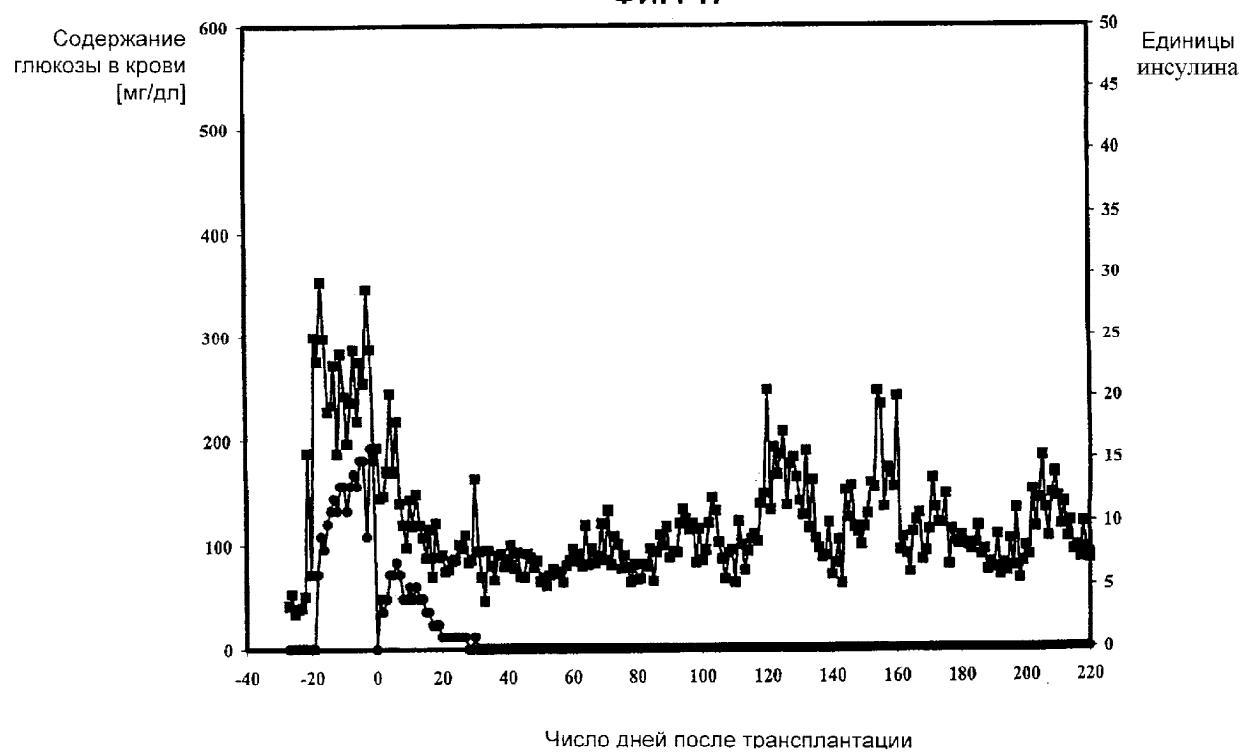
ФИГ. 15

**A****B****C****D**

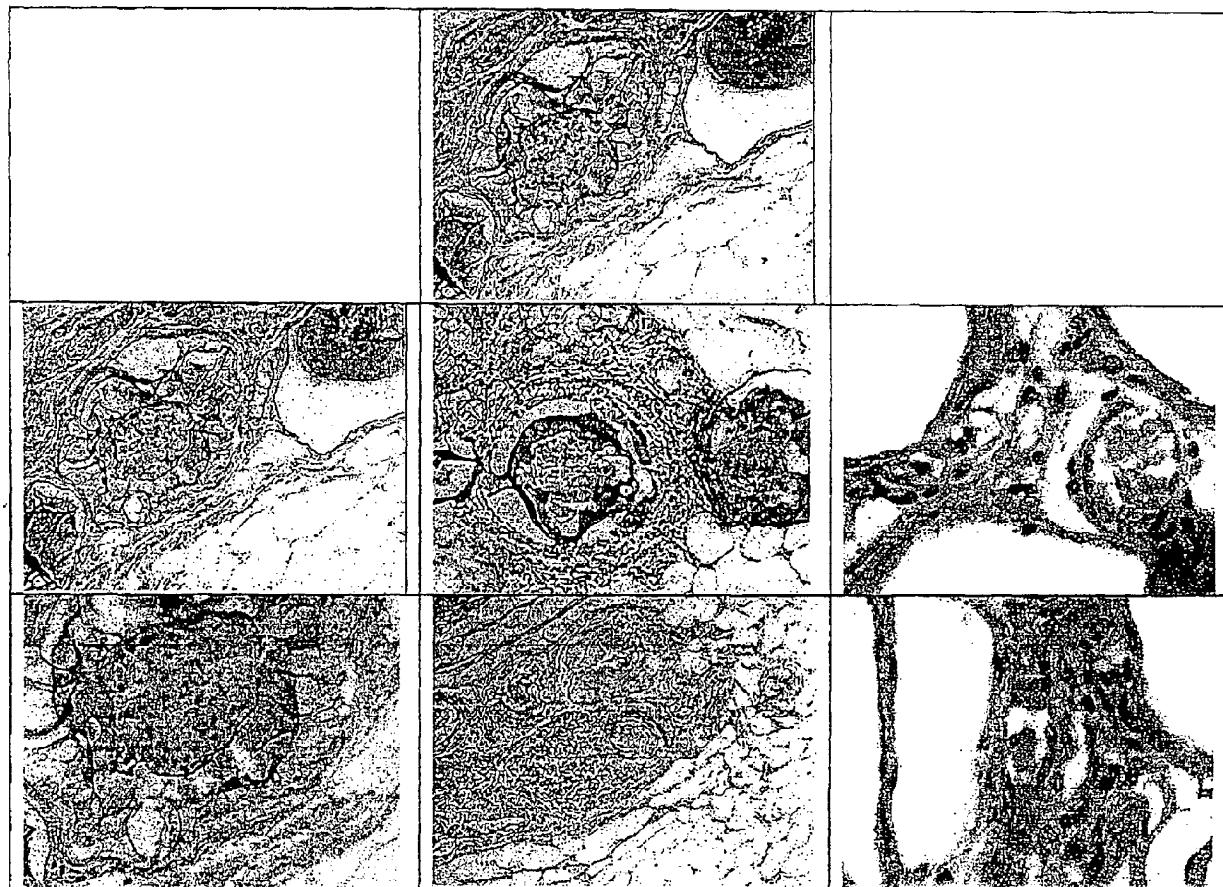
ФИГ. 16



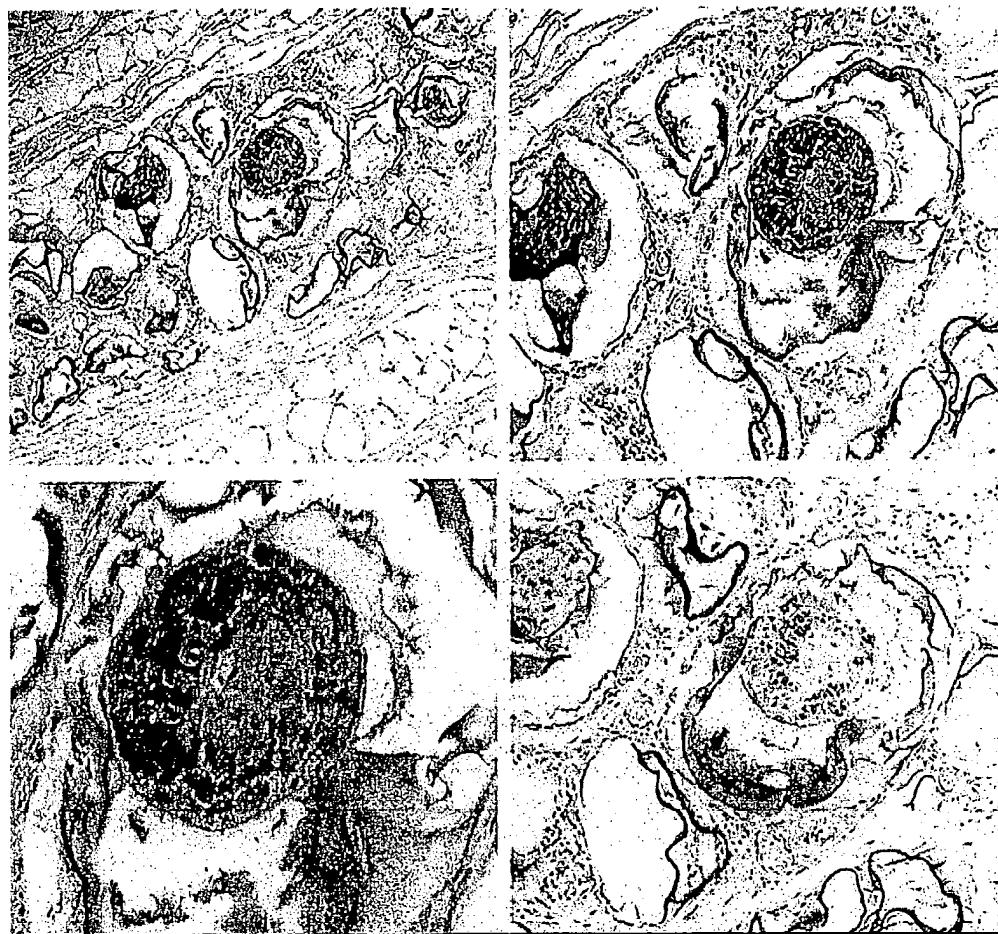
ФИГ. 17



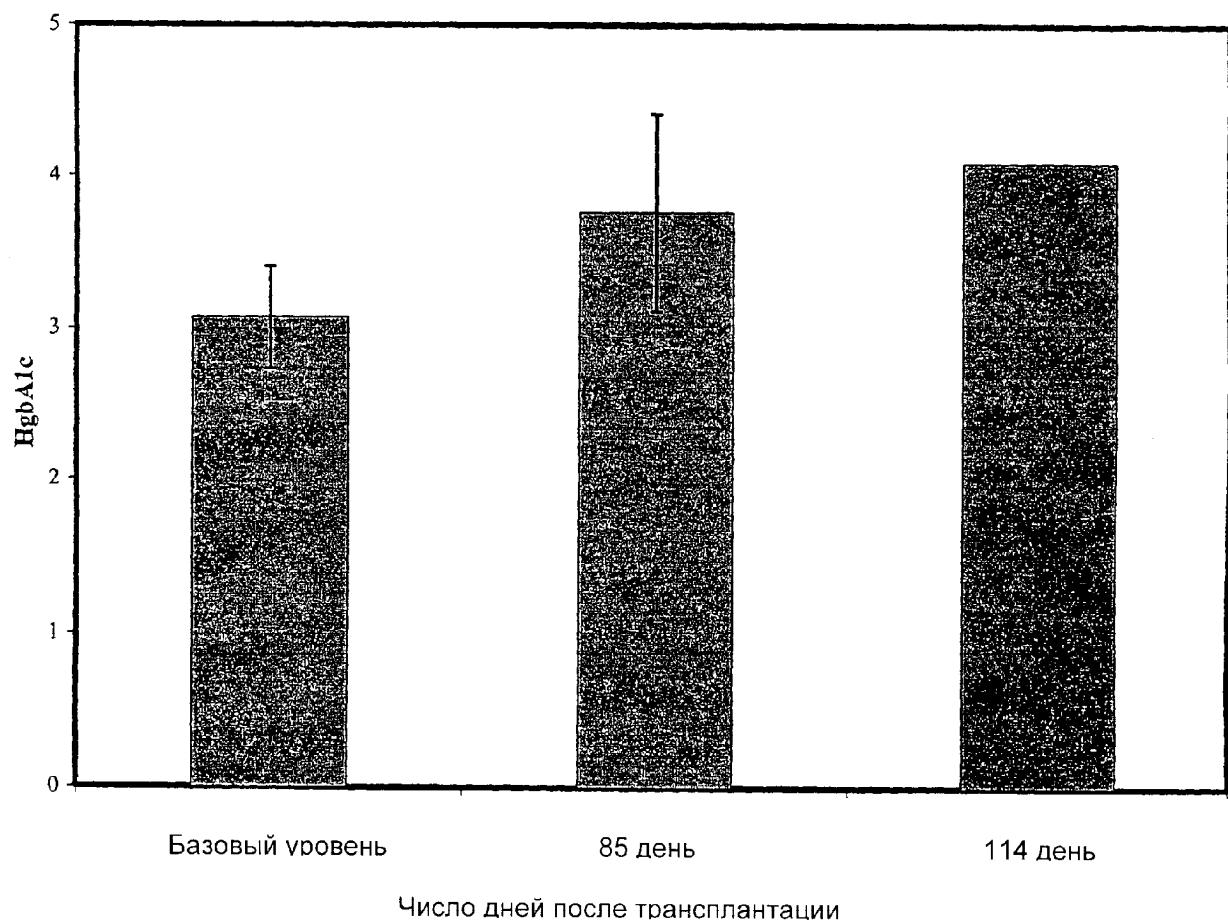
ФИГ. 18



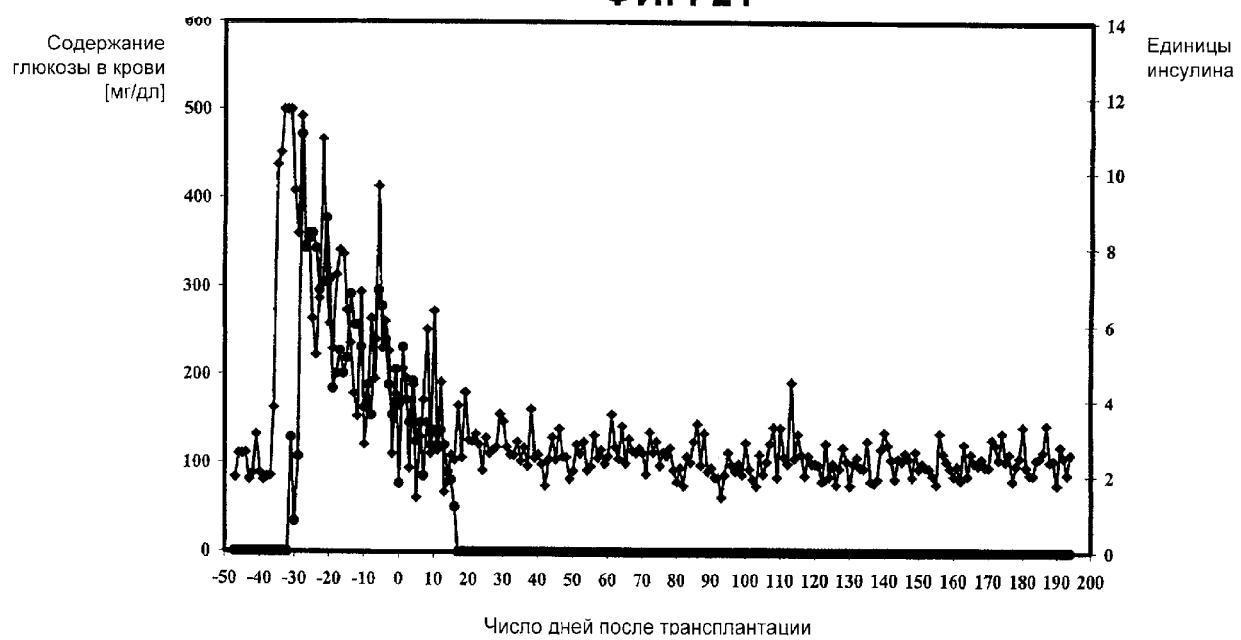
ФИГ. 19



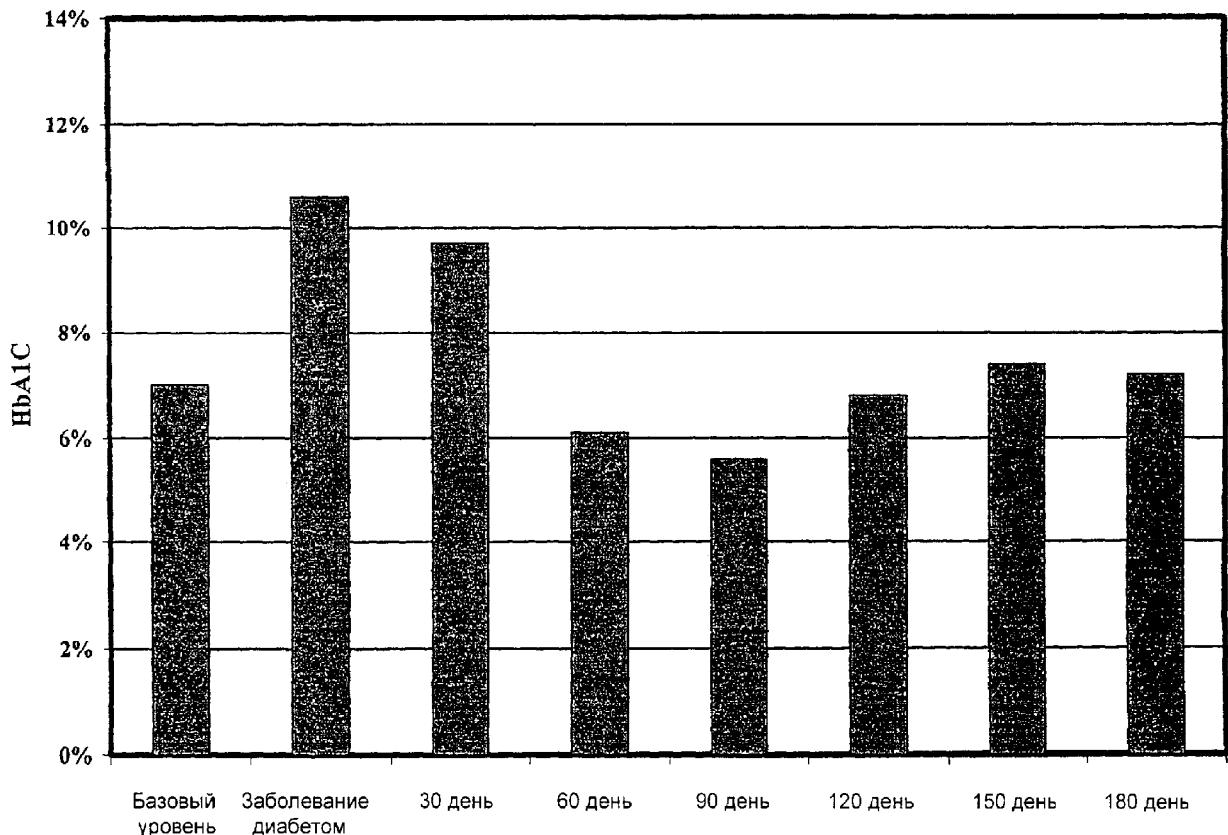
ФИГ. 20



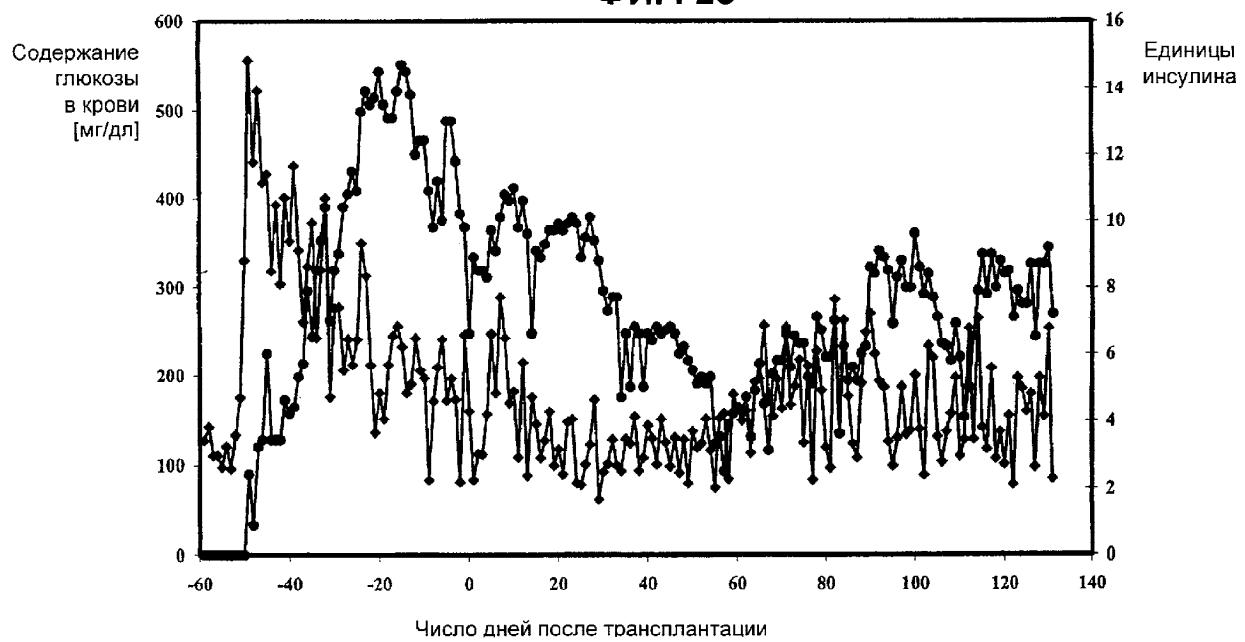
ФИГ. 21



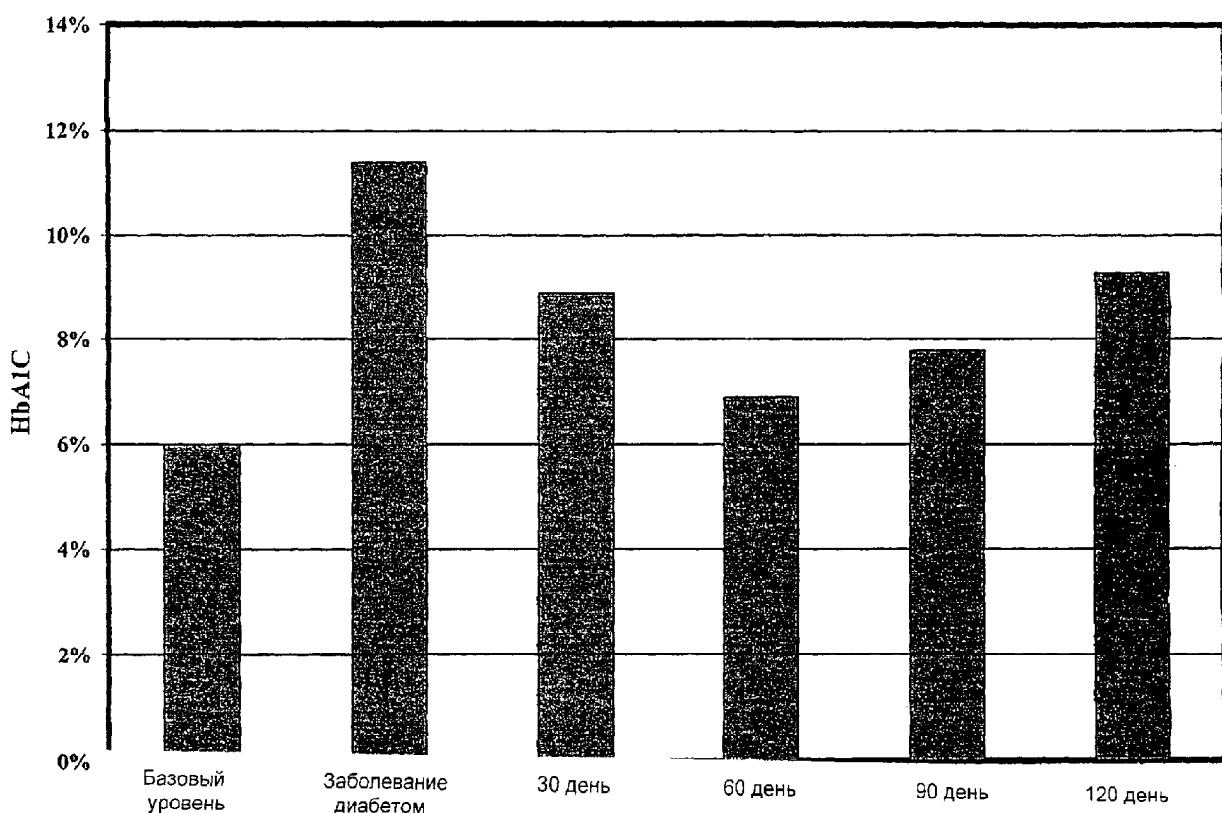
ФИГ. 22



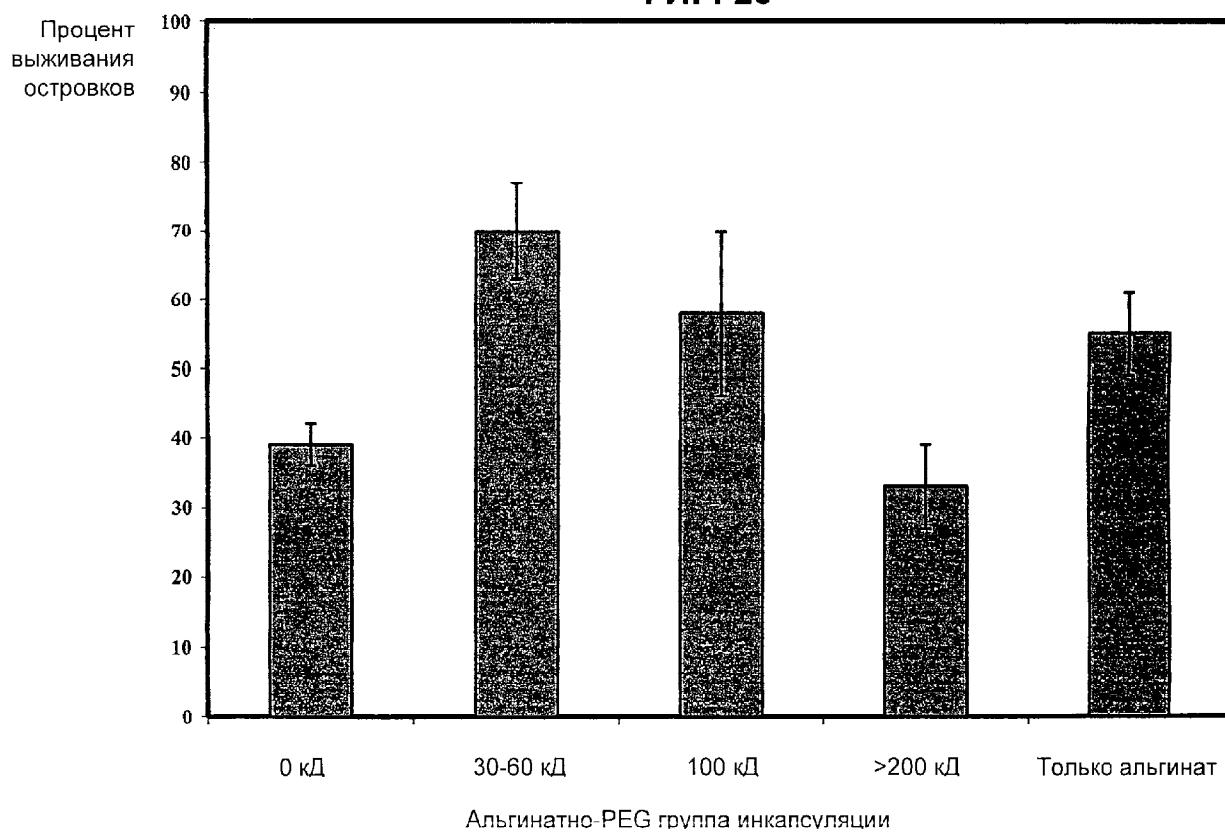
ФИГ. 23



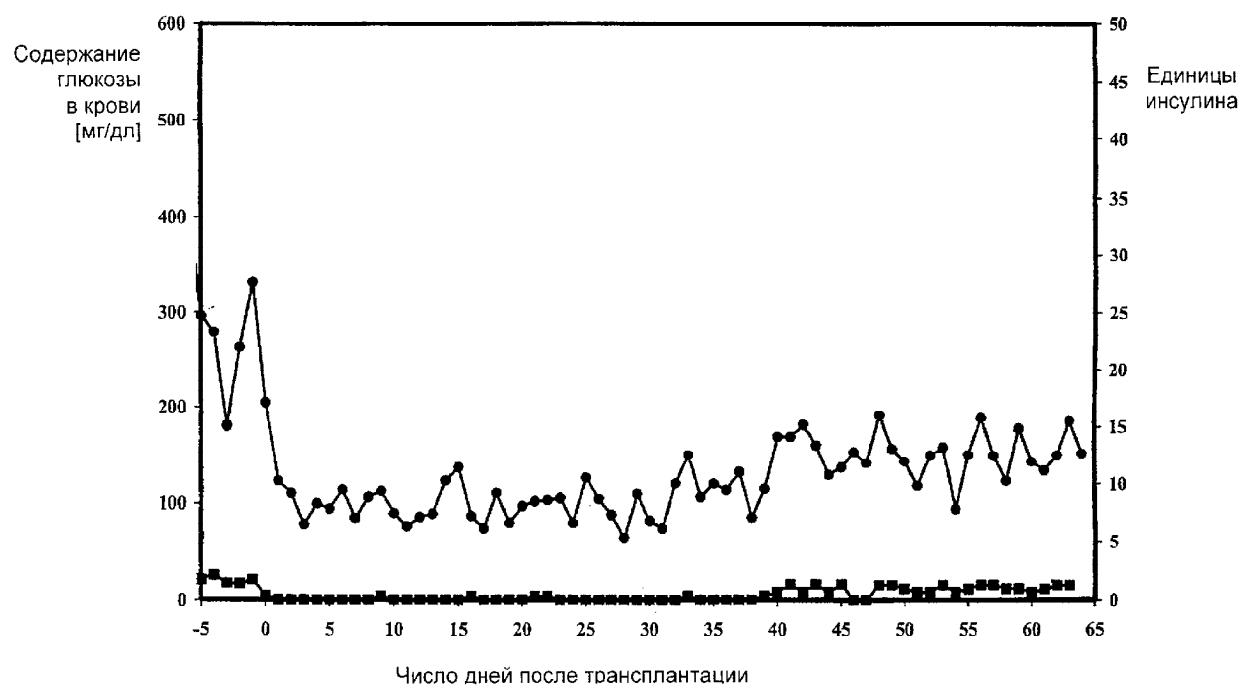
ФИГ. 24



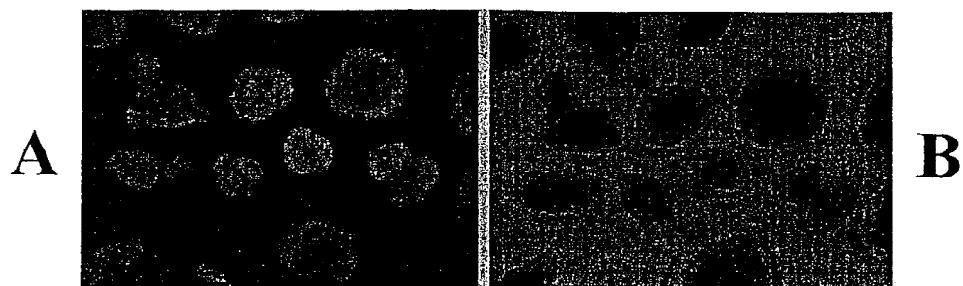
ФИГ. 25



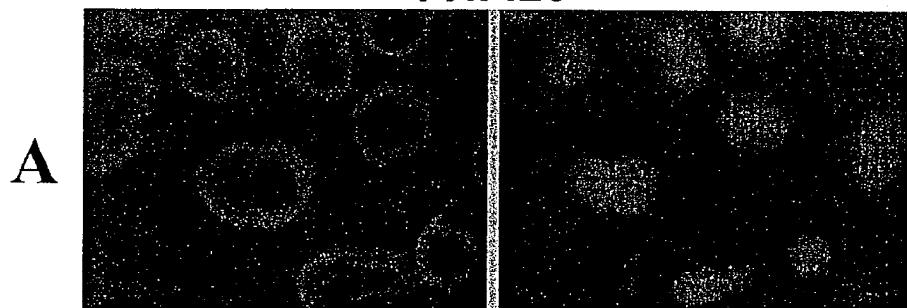
ФИГ. 26



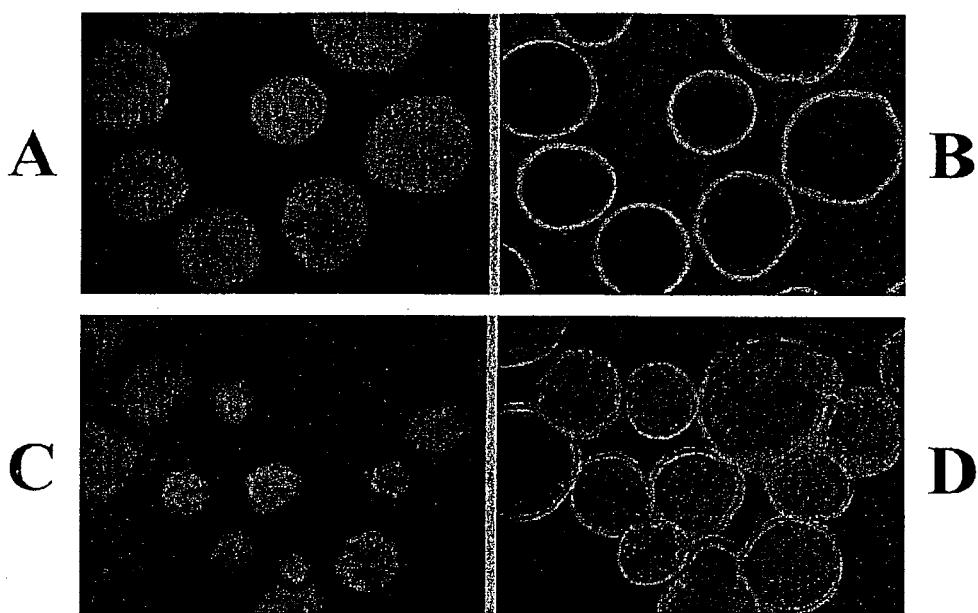
ФИГ. 27



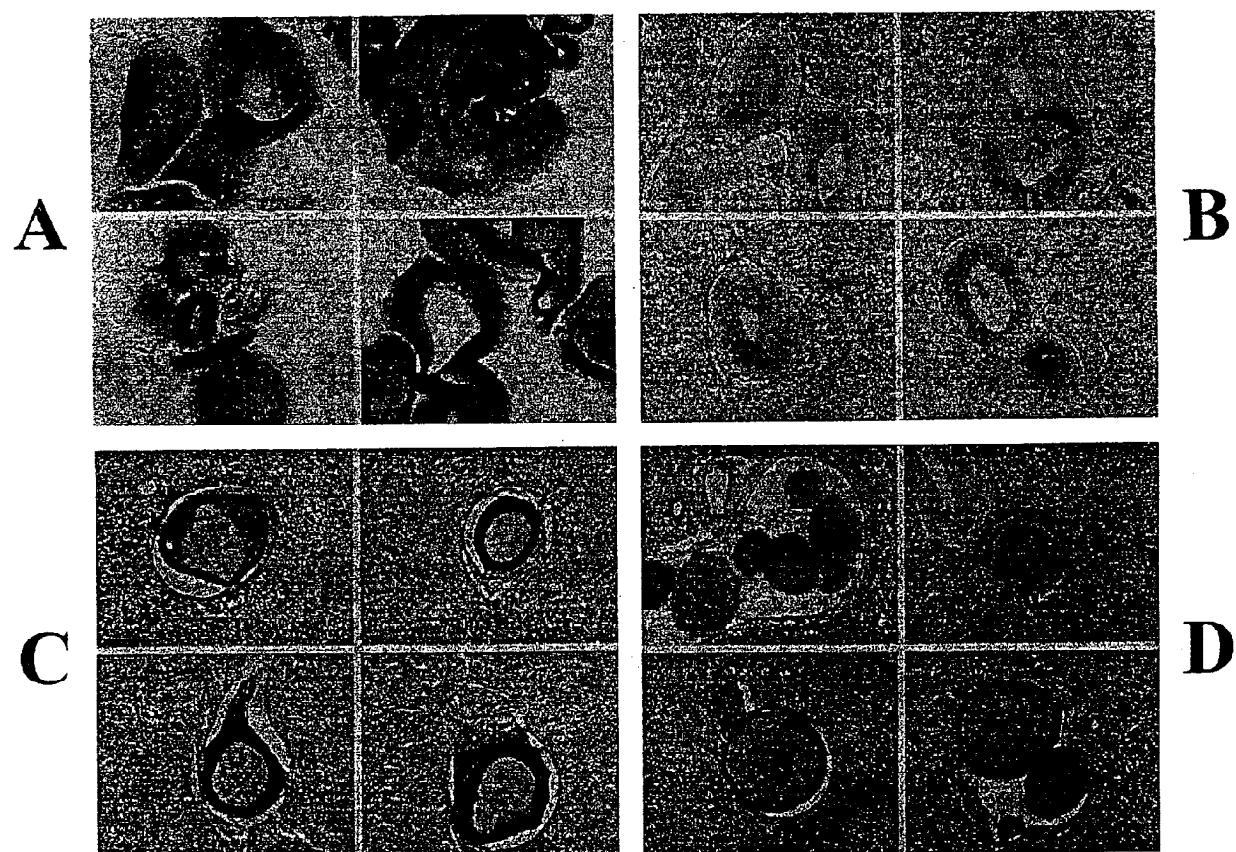
ФИГ.28



ФИГ.29



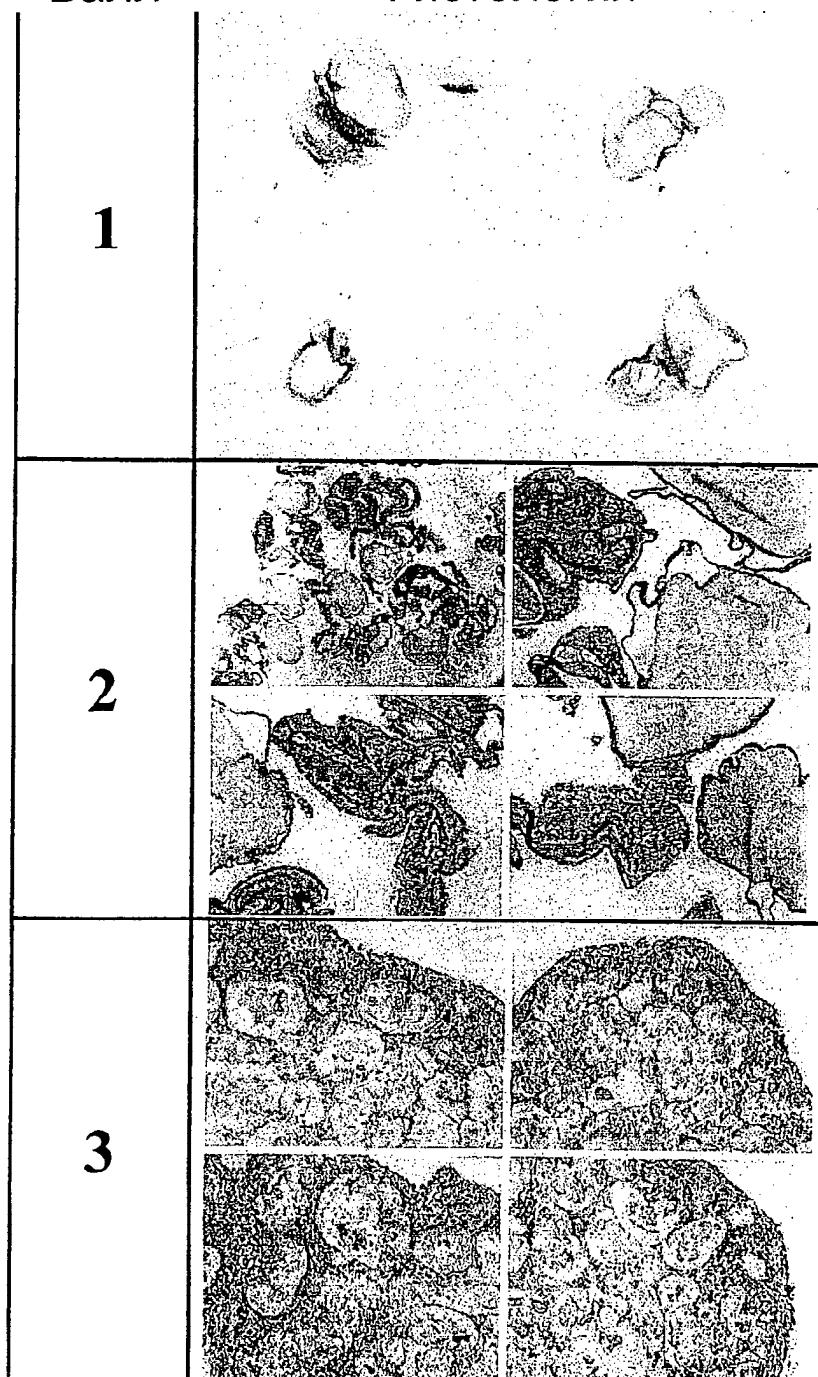
ФИГ. 30



ФИГ. 31

Балл

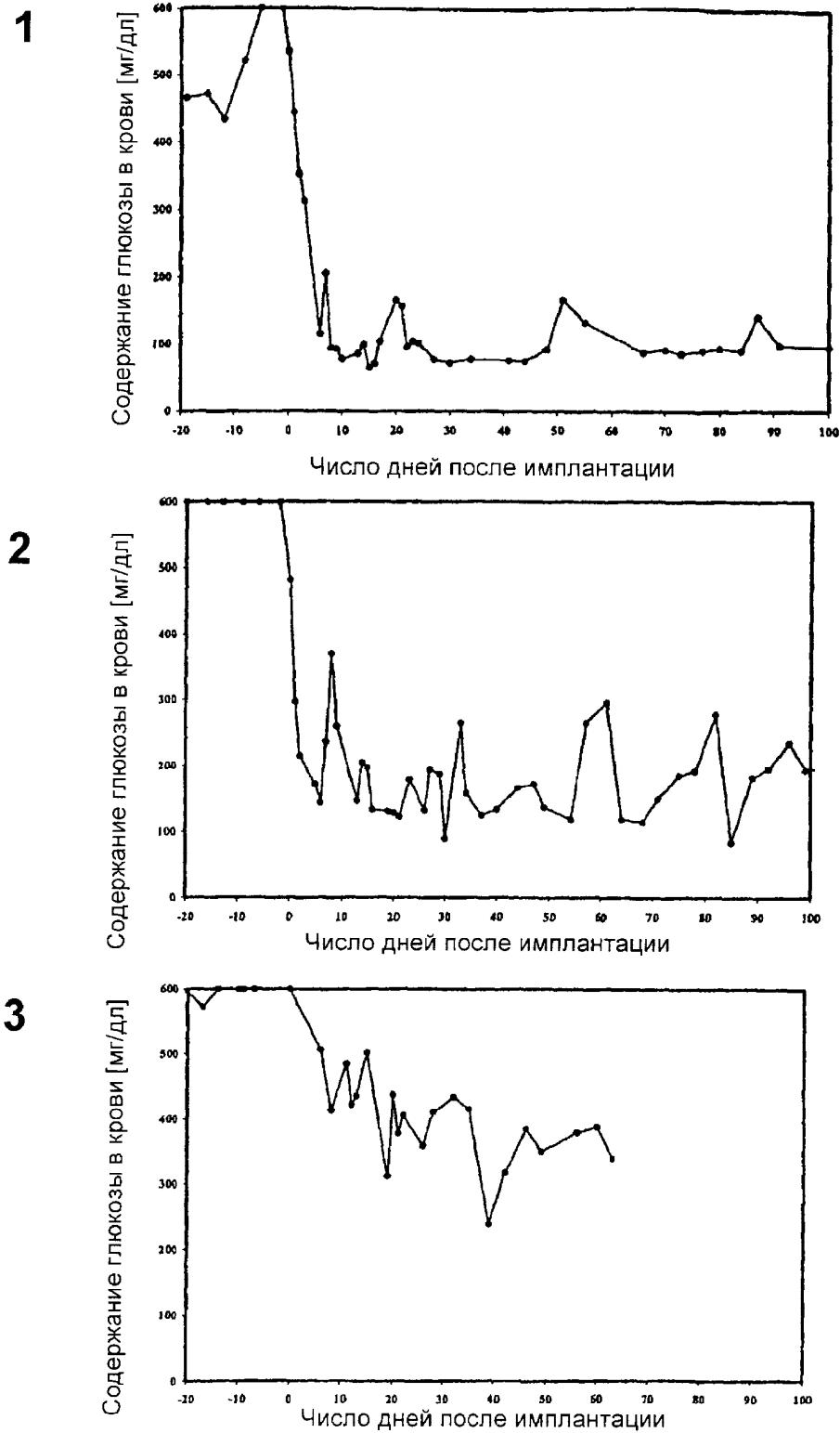
Гистология



ФИГ. 32

Балл	Гистология	
1		
2		
4		

ФИГ. 33

**ФИГ. 34**