



⁽¹²⁾ A **Terinzagelegging** ⁽¹¹⁾ **8500352**

Nederland

⁽¹⁹⁾ NL

- ⁽⁵⁴⁾ **Verbeterde capsulemembraanvormingstechniek.**
- ⁽⁵¹⁾ Int.Cl⁴.: B01J 13/02, C12N 5/00, C12N 11/04, B01D 13/04, A61K 9/50.
- ⁽⁷¹⁾ Aanvrager: Damon Biotech, Inc. te Needham Heights, Massachusetts, Ver. St. v. Am.
- ⁽⁷⁴⁾ Gem.: Ir. G. Jacobson c.s.
Octrooibureau Los en Stigter B.V.
Weteringschans 96
1017 XS Amsterdam.

- ⁽²¹⁾ Aanvraag Nr. 8500352.
- ⁽²²⁾ Ingediend 7 februari 1985.
- ⁽³²⁾ Voorrang vanaf 13 februari 1984.
- ⁽³³⁾ Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).
- ⁽³¹⁾ Nummer van de voorrangsaanvraag: 579494 .
- ⁽⁶²⁾ - -

- ⁽⁴³⁾ Ter inzage gelegd 2 september 1985.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Verbeterde capsulemembraanvormingstechniek.

De uitvinding heeft in het algemeen betrekking op het inkapselen van kernmaterialen, waaronder levende cellen, in een intracapsulair volume, omgeven door een semipermeabel membraan. Meer in het bijzonder heeft de uitvinding betrekking op een werkwijze voor de bereiding van grote hoeveelheden capsules met uniforme membranen met verbeterde poreusheidsbeheersing voor het bevorderen van de groei van de cellen binnen de capsules.

Het Amerikaanse octrooischrift No. 4.352.883, verleend op 5 oktober 1982, aangevraagd door Dr. Franklin Lim, beschrijft een basisprocedure voor het inkapselen van kernmaterialen, waaronder levende cellen, in capsules met semipermeabele membranen. Levende cellen, die volgens de Lim-procedure zijn ingekapseld, zijn in staat het metabolisme, waaronder mitosis, voort te zetten en scheiden materialen uit, die zij normaal in hun niet-ingekapselde vorm zouden uitscheiden. Capsules, verkregen volgens de Lim-techniek, kunnen zodanig worden opgebouwd, dat zij membranen hebben, die permeabel zijn voor moleculen beneden een bepaald molecuulgewicht, doch praktisch impermeabel zijn voor moleculen met hoger molecuulgewicht en voor cellen. Aangenomen wordt, dat de poriën van de membranen kronkelige kanaaltjes zijn, die worden gevormd door tussenruimtes van de membraanstructuur. Doorlating van de moleculen boven een bepaald molecuulgewicht wordt door deze poriën met kronkelige kanaaltjes gehinderd, terwijl boven een bepaald hoger molecuulgewicht en daarmee gepaard gaande effectieve molecuulafmeting de hindering voldoende groot is opdat het membraan praktisch impermeabel is voor deze moleculen.

De beheersing van de poreusheid is een belangrijke factor in een aantal belangrijke toepassing van dergelijke microcapsules. Het microcapsulemembraan kan worden gebruikt voor differentieel zeven, dat wil zeggen voor het scheiden van moleculen op een molecuulgewichtbasis. Zo beschrijft bijvoorbeeld het Amerikaanse octrooischrift No. 4.409.331, verleend op 11 oktober 1983, een werkwijze, waarbij door cellen in de capsule uitgescheiden stoffen het membraan kunnen pas-

seren, kunnen andere hoogmoleculaire stoffen in de capsules worden vastgehouden. Dergelijke capsules kunnen het verzamelen van een van belang zijnde stof enorm vereenvoudigen. Van belang zijnde stoffen met een laag molecuulgewicht kunnen
5 door het membraan diffunderen in het extracapsulaire medium, terwijl celfragmenten en stoffen met hoo molecuulgewicht alsmede verontreinigingen, bijvoorbeeld pyrogenen, blijven ingesloten in het intracapsulaire volume.

De selectieve zeefeigenschappen van het capsulemem-
10 braan maken het bovendien mogelijk, de capsules te gebruiken voor "cross-strain" in vivo groei van hybridoma's. Het capsulemembraan maakt de groei van "cross-strain" hybridoma's binnen een lichaamsholte van een dier, waarvan het immune system normaliter de hybridoma's zou aanvallen, mogelijk.
15 Een juiste engineering van membraanpermeabiliteitseigenschappen maakt een zeer specifieke verzameling van de uitgescheiden stof mogelijk.

Effectieve membraanpermeabiliteitsbeheersing maakt ook de toepassing mogelijk van geïmplanteerde capsules met
20 daarin cellen, die een antigeen als een immuniserend middel uitscheiden. De zeefeigenschappen van het membraan leveren naar verhouding zuiver antigeen als het immuniserend middel op zonder de noodzaak van een tijdrovende antilichaamzuiveringsprocedure en kunnen leiden tot stimulering van specifieke antilichaamproductie.
25

Capsules met dergelijke membranen kunnen ook worden gebruikt als een deel van een celzeefprocedure. Extracapsu-
lair medium wordt onderzocht voor een stof, die is uitgescheiden door het membraan. Verontreinigingen met een mole-
30 cuulgewicht groter dan de stof worden binnen de capsule vastgehouden, om daarbij valse positieve resultaten te verlagen.

Een voorkeursuitvoeringsvorm van de Lim-incapsuleringstechniek omvat de vorming van vorm-behoudende geleerde massa's, die het te inkapselen materiaal bevatten, gevolgd
35 door afzetting van een membraan op het oppervlak van de geleerde massa. Het membraan wordt gevormd als naar verhouding hoogmoleculaire materialen in contact komen met gel-
massa's en ionogene verknopingen met het gel vormen. Lim be-
BAD ORIGINAL
schrijft, dat verknopende polymeren met laag molecuulgewicht

verder in de structuur van de gegeleerde massa's doordringen en in een verkleining van de poriëngrootte resulteren. Lim beschrijft ook, dat de duur van de membraanvorming invloed heeft op de poriëngrootte. Bij een tweetal reagentia is ge-
5 bleken, dat hoe langer de verknopingspolymeeroplossing wordt blootgesteld aan de gegeleerde massa, des te dikker en minder permeabel het membraan is.

Ofschoon de in het Lim-octrooi beschreven technieken voor de beheersing van de poreusheid en voor de vorming van
10 het membraan aanvaardbare membranen kunnen opleveren, kunnen veel van de voorgaande toepassingen van de capsuletechnologie verder worden verbeterd indien membranen konden worden bereid met verbeterde beheersing van de poreusheid en betere uniformiteit. De technieken van Lim voor de beheersing van
15 de poreusheid zijn niet in staat een fijne afstelling van de poreusheid van het membraan mogelijk te maken, maar in tegendeel kan die techniek resulteren in ruwe differentiële filtereergrenzen.

Naast de verbeterde poreusheid is het voor commerciële doeleinden ook van belang, dat er constant microcapsules in grote getale kunnen worden bereid met defectvrije membranen. In dit opzicht hebben de volgens de Lim-technieken gevormde membranen nu en dan uitstekende celdelen of cellen, die zijn verankerd op de capsules. De Lim-technieken kunnen
25 ook aanleiding geven tot de vorming van capsules met lege ruimtes, met het gevolg, dat cellen, die van belang zijnde stof of ongewenste verontreinigingen uit de capsule kunnen ontsnappen. Indien een gering gedeelte van de microcapsules, bereid met een specifiek doel voor ogen, lege ruimtes in het
30 membraan vertoont, worden veel van de doeleinden en voordelen van de werkwijze gefrustreerd. Dienovereenkomstig zijn modificaties van de inkapselingsmethoden, waarbij membraanuniformiteit wordt bevorderd en willekeurige membraandefecten worden vermeden, gunstig voor de commerciële praktijk van vele
35 van de voorgaande methoden.

Dientengevolge is het doel van de uitvinding het verbeteren van de beheersing van de poreusheid van microcapsulemembranen. Een ander doel van de uitvinding is het bevorderen van een meer uniforme membraanvorming. Een verder
40 doel van de uitvinding is het ontwikkelen van een werkwijze.

die de vorming van membranen mogelijk maakt, welke de cellulaire groei en uitscheiding van stoffen, geproduceerd door de cellen, optimaliseert. Nog een doel van de uitvinding is het verschaffen van een werkwijze voor de bereiding van permeabele capsulemembranen met nauwkeurigere permeabiliteitsgrenzen en voor het reproduceerbaar opbouwen van dergelijke grenzen. Andere doelen en aspecten van de uitvinding zullen aan de hand van de volgende beschrijving duidelijk worden.

De onderhavige uitvinding omvat een verbetering van de Lim-techniek voor het inkapselen van een kernmateriaal in een intracapsulair volume, begrensd door een membraan. Het in praktijk brengen van de uitvinding kan een verbeterde membraanuniformiteit en beheersing van de poreusheid teweegbrengen en de capsules meer geschikt maken voor het kweken van cellen.

Zoals in het Lim-octrooi beschreven, wordt het kernmateriaal gesuspendeerd in een oplossing van een water-oplosbaar polyanionogeen polymeer, dat in staat is te worden gegeleerd, waarna de polymeer-kernmateriaalsuspensie tot druppels of andere afzonderlijke vormen wordt gevormd. De druppels worden vervolgens onmiddellijk blootgesteld aan een oplossing van meerwaardige kationen onder oplevering van zachte, vormbehoudende gehydrateerde gegeleerde massa's. Overeenkomstig de uitvinding worden de gegeleerde massa's, voor de hierna te beschrijven doeleinden, vervolgens geëxpandeerd en verder gehydrateerd door contact met een waterige oplossing, die een deel van de meerwaardige kationen verwijdt, bijvoorbeeld een zoutoplossing. Daarna wordt om elk van de geëxpandeerde gegeleerde massa's een membraan gevormd door reactie tussen anionogene groepen op het polyanionogene polymeer hydrogel en kationogene groepen op een polykationogeen polymeer met een molecuulgewicht van bij voorkeur groter dan ca. 3.000 daltons. De voorkeurs-polyanionogene polymeren zijn zure polysacchariden en bij voorkeur alginaatzouten. Geschikte polykationogene verknopende polymeren zijn proteïnen en peptiden met meervoudig reactieve stikstof bevattende kationogene groepen, bijvoorbeeld primaire aminen, polyvinylamine, geamineerde polysacchariden, water-oplosbare zouten ervan alsmede mengsels ervan. Het polykationogene polymeer,

dat de meeste voorkeur verdient, is polylysine. Polyglutamine en polyornithine doen het ook goed. Een tweede membraanlaag kan worden gevormd rondom de eerste door reactie met een ander polykationogeen polymeer. Elk van de genoemde kationogene materialen kan worden gebruikt voor de vorming van het tweede membraan. De identiteit van het reagens en het molecuulgewicht van het polykationogene polymeer of polymeren worden zodanig gekozen, dat deze de poreusheidskarakteristieken van de capsules bepalen. Ontdekt is ook, dat de ladingsdichtheid van de gebruikte polykationogene polymeren een belangrijke invloed kan hebben op de beheersing van de poreusheid.

Als kernmateriaal komen levende cellen, zoals genetisch gemodificeerde cellen, bijvoorbeeld hybridoma's, eukaryotische cellen, waaronder dierlijke weefselcellen, of prokaryotische cellen in aanmerking. De werkwijze kan ook omvatten de stap van nabekleding van het membraan met een water-oplosbaar polyanionogeen polymeer, bijvoorbeeld algi-naat, dat een reactie aangaat met de overgebleven kationogene plaatsen op het membraan. De gegeleerde massa's kunnen opnieuw vloeibaar worden gemaakt na de membraanvorming door reactie met een chelaatmiddel. Ethyleenglycol-bis-(β -amino-ethylether)-N,N-tetra-azijnzuur en zouten ervan (EGTA) zijn de te kiezen chelaatmiddelen, wanneer de capsules worden bestemd voor toepassing in het kweken van cellen. In dit opzicht is het ontdekt, dat het opnieuw vloeibaar maken met EGTA de cellulaire productie van biologische materialen met de capsules vergeleken met andere chelaten, zoals EDTA of citraat, significant verhoogt.

Een juiste keuze van reagentia en reactieomstandigheden leidt tot de vorming van membranen met naar verhouding specifieke permeabiliteit. Zo kunnen bijvoorbeeld membranen worden gebouwd, die praktisch impermeabel zijn voor moleculen met een molecuulgewicht groter dan ca. 150.000 dalton en derhalve praktisch impermeabel zijn voor alle gangbare immunoglobulinen. De membranen kunnen permeabel zijn voor moleculen met een molecuulgewicht tot aan 500.000 daltons, terwijl materialen met een hoger molecuulgewicht worden tegengehouden. Dergelijke capsules maken het ontsnappen van IgG mogelijk,

terwijl IgM wordt vastgehouden. Alternatief kunnen de membranen zodanig worden gebouwd, dat zij permeabel zijn voor moleculen met een molecuulgewicht groter dan 500.000 daltons, doch praktisch impermeabel voor cellen.

5 Wanneer bijvoorbeeld een molecuulgewichtfractie bij of beneden 150.000 daltons aan de orde is, kan een tweede membraan worden gevormd rondom de capsules met een polykationogeen polymeer met dezelfde of met bij voorkeur een hogere ladingsdichtheid dan een eerste polykationogeen polymeer, 10 bijvoorbeeld een polylysinemembraan kan worden nabehandeld door immersie in een polyornithine of polyvinylamino-oplossing. Indien het membraan permeabel moet zijn voor moleculen met een molecuulgewicht groter dan 500.000 daltons, kan er gebruik worden gemaakt van een hoogmoleculair verknopings- 15 polymeer, zoals polylysine met een molecuulgewicht groter dan 200.000 daltons. De praktijk van de gelexpansiestap volgens de uitvinding verbetert op significante wijze de capsulemembraanuniformiteit en verhoogt de efficiëntie van de poreusheidsbeheersingstechnieken.

20 Zoals eerder genoemd, maakt de onderhavige uitvinding de verbeterde beheersing van de poreusheid van membranen mogelijk en bevordert de vorming van meer uniforme membranen. De uitvinding is ten dele gebaseerd op de waarneming, dat geleerde massa's van polyanionogene polymeren, bijvoorbeeld 25 alginaat, kunnen worden geëxpandeerd of gecontracteerd door wijziging van de hydratatiegraad van het polymeer. De gelmassa's bevatten meer dan 98% water en zijn in hoofdzaak zachte, vormbehoudende ballen met een verknoopte gelstructuur. Ontdekt is, dat door expanderen van de gelmassa's na 30 gelering en voorafgaande aan membraanafzetting de permeabiliteitseigenschappen en uniformiteit van de membranen beter beheerst kunnen worden. Door immersie van de geleerde massa's in een oplossing van eenwaardige kationen, bijvoorbeeld zout, een of meer keer, wordt een deel van de verknopende meerwaardige kationen uit het gel verwijderd en wordt de hydratatie- 35 toestand verhoogd, waardoor de gelstructuur expandeert. Een dergelijke behandeling resulteert in de bereiding van uniforme gehydrateerde gelmassa's, die bijzonder geschikt zijn voor de volgende membraanafzettingstap. Bij het uitblijven

van een dergelijke behandeling variëren de gelmassa's in grootte en eigenschappen, omdat de eerstgevormde massa langer in de geleringsoplossing wordt ondergedompeld dan de laatstgevormde massa's. Een ander belangrijke waarneming is, dat
5 het in evenwicht brengen van de gegeleerde massa's met een oplossing van meerwaardige kationen, zoals calciumchloride-oplossing, de gegeleerde massa contracteert. Een verder verschijnsel, dat ontdekt is, is het feit, dat wanneer een keer een membraan gevormd is rondom een gegeleerde massa, immersie
10 van de capsule in een eenwaardige kationoplossing het membraan gaat uitrekken onder toename van de poriëngrootte. Deze verschijnselen, gekoppeld aan de waarneming, dat verknopingsmiddelen met hogere ladingsdichtheid de neiging hebben de poriëngrootte te verlagen, maken het mogelijk de beheersing van
15 de membraanpermeabiliteit nauwkeuriger te doen plaatsvinden. Wanneer deze waarnemingen worden gekoppeld aan de permeabiliteitsbeheersingstechnieken, zoals beschreven in het bovengenoemde Lim-octrooi, dan biedt de techniek aan de deskundige een set parameters, die de bereiding van uniforme capsules
20 met constante en meer nauwkeurige permeabiliteitseigenschappen mogelijk maakt.

Zoals beschreven in het Lim-octrooi wordt het kernmateriaal gesuspendeerd in een oplossing van een water-oplosbaar, reversibel, geleerbaar polyanionogeen polymeer, bij
25 voorkeur natriumalginaat, waarna de polymeer-kernmateriaalsuspensie wordt gevormd tot druppels onder gebruikmaking van gangbare technieken, bijvoorbeeld een straalkop-druppelvormingsapparaat. Het straalkopapparaat bestaat uit een huis met een bovenste luchtinlaatmondstuk en een langgerekte holle
30 lichaamsfrictie, ondergebracht in een stop. Een spuit, bijvoorbeeld een 10 cc-spuut, voorzien van een doseerpomp, is aangebracht boven op het huis met een naald, bijvoorbeeld een 0,025 cm I.D. Teflon-beklede naald, die door de lengte van het huis passeert. Het inwendige van het huis is zodanig ont-
35 worpen, dat het uiteinde van de naald wordt onderworpen aan een constante laminaire luchtstroom, die als een luchtmes fungeert. Tijdens de toepassing wordt de spuit gevuld met de
BAD ORIGINAL oplossing met daarin het in te kapselen materiaal aangebracht bovenop het huis, terwijl de doseerpomp wordt geactiveerd

voor het incrementeel forceren van druppels van de oplossing naar het eind van de naald. Elke druppel wordt "afgesneden" met behulp van de luchtstroom en valt ca. 2,5-3,5 cm in een geleeroplossing, waar de druppel onmiddellijk wordt gegeleerd
5 door absorptie van verknopende ionen. De voorkeursgeleeroplossing is een calciumionoplossing, bijvoorbeeld 1,2% (gew./vol.) calciumchloride. De afstand tussen het uiteinde van de naald en de calciumchlorideoplossing is bij voorkeur zodanig, dat de polymeer-kernmateriaaloplossing fysisch de meest gunstige
10 vorm, een bolvorm (maximum volume/oppervlak) kan innemen. De lucht binnen de buis passeert door een opening in de stop. De gegeleerde, vormbehoudende bolvormige massa's of tijdelijke capsules, die bij voorkeur een diameter hebben van tussen 50 microns en enkele millimeters, hopen zich op in de oplossing in de vorm van een afzonderlijke fase en kunnen worden
15 gewonnen door afzuigen.

Volgens de uitvinding worden vervolgens de gegeleerde massa's geëxpandeerd door middel van een of meer afzonderlijke immersies of wasbehandelingen in een eenwaardige kationoplossing, bijvoorbeeld een zoutoplossing. Door deze im-
20 mersie wordt een gedeelte van de verknopende calciumionen verwijderd, waarbij vervolgens het gel wordt gehydrateerd. De aldus geëxpandeerde gegeleerde massa's leveren een betere bedekking van het kernmateriaal, dat wil zeggen dat het vaste
25 fase-kernmateriaal niet door het oppervlak van de gelmassa's steekt. Het vaste fase-kernmateriaal, dat vastgeankerd is aan de buitenkant van het gel wordt door wassen met de zoutoplossing verwijderd. Dit betekent, dat slechts kernmateriaal in het inwendige van het gel is ingekapseld.

30 Het wassen met zoutoplossing bevordert ook de vorming van meer uniforme capsulemembranen door het in evenwicht brengen van de hoeveelheid calciumionen, die de alginaatstructuur van de gelmassa's verknoopt. Niet alle gelmassa's worden tegelijkertijd gevormd; de druppels, die in het begin van de
35 cyclus in het calciumbad terechtkomen, brengen een langere tijd in het bad door en derhalve houden zij meer calciumionen in de gelstructuur vast dan die welke later in de cyclus
40 ~~BAD ORIGINAL~~ calciumbad in aanraking komen. Door wassen met zoutoplossing worden meer calciumionen uit de massa's met hogere dichtheid (de eerder gegeleerde druppels) verwijderd dan uit

de gelmassa's met kleiner dichtheid om zodoende het calcium-
gehalte van de gelmassa's in evenwicht te brengen.

Membranen, gevormd rondom de geëxpandeerde gel-
massa's zijn ook minder onderhevig aan breuk tengevolge van
5 de spanning, die wordt veroorzaakt door degelering. Het
blijkt, dat het geëxpandeerde roosternetwerk meer veerkracht
bezit, waardoor een betere compensatie wordt verkregen voor
de spanning, welke ontstaat tijdens het degeleren.

Rondom de geëxpandeerde gegeleerde massa wordt ver-
10 volgens een membraan gevormd door reactie tussen kationogene
groepen op het geëxpandeerde, gegeleerde polyanionogene poly-
meer, en de anionogene groepen op een polykationogeen poly-
meer, bijvoorbeeld polylysine. Het polykationogene polymeer
kan een molecuulgewicht hebben tot slechts 3.000 daltons, of-
15 schoon polylysine met een molecuulgewicht van 35.000 daltons
of hoger de voorkeur verdient. Nadat het membraan rondom de
geëxpandeerde gegeleerde massa's is gevormd, worden er andere
stappen toegepast voor het fijn afstemmen van de poreusheid
van het membraan. Zo kan bijvoorbeeld een reeks wasbewerkin-
20 gen worden uitgevoerd in een zoutoplossing, waarbij de poriën
van het membraan zullen expanderen, terwijl een reeks wasbe-
werkingen in calciumchlorideoplossing de poriën zou contrac-
teren. Er kan een tweede membraanlaag worden gevormd rondom
de capsules onder gebruikmaking van een extra polykationogeen
25 polymeer, bijvoorbeeld door blootstelling aan een polyorni-
thineoplossing of aan een polymeer met hoger ladingsdichtheid,
zoals polyvinylamine. Deze techniek kan worden toegepast voor
het doen afnemen van de poriëngrootte.

Zoals beschreven in het Lim-octrooi wordt het intra-
30 capsulaire volume bij voorkeur vloeibaar gemaakt door immer-
sie van de capsules in een oplossing van een chelaatmiddel.
Chelaatmiddelen, die met succes zijn gebruikt, zijn ethyleen-
diaminetetra-azijnzuur (EDTA), natriumcitraat, natriumsucci-
naat, terwijl de meeste voorkeur verdient ethyleenglycol-bis-
35 -(β -aminoethylether)-N,N-tetra-azijnzuur (EGTA). Indien natrium-
citraat wordt gebruikt als chelaatmiddel kunnen in de capsule-
membranen lege ruimtes ontstaan, aangezien de membranen een

BAD ORIGINAL matige vorm aannemen als reactie op de druk van het
citraat. Het membraan herkrijgt zijn originele vorm als het

citraat het evenwicht met het intracapsulaire volume benadert, maar wanneer het kernmateriaal een voor citraat gevoelige cel is, kan de celgroei of het vermogen van de cel om biologische materialen te produceren worden belet. Daarentegen blijkt immersie van een capsule in EGTA-oplossing het membraan naar binnen toe te vouwen met het gevolg, dat het membraan in deze gewijzigde configuratie blijft totdat het EGTA is verwijderd. Zoals beschreven in voorbeeld IV, infra, blijkt, dat de cellen beter groeien en metabolisch actiever zijn in capsules, die zijn behandeld met EGTA in tegenstelling tot citraat of andere onderzochte chelaatmiddelen.

Zoals beschreven in het Lim-octrooi neemt door nabekleding van de capsules met een polyanionogeen polymeer, bijvoorbeeld natriumalginaat, de neiging van de capsules tot klontervorming aanzienlijk af. Het anionogene polymeer reageert met de overgebleven kationogene plaatsen op het membraan onder het teweegbrengen van negatieve oppervlaktepolariteit. Zoals bekend uit de stand der techniek kunnen negatieve oppervlakken de groei en de hechting van cellen belemmeren. Een dergelijke groei kan intracapsulaire celgroei belemmeren of de permeabiliteit nadelig beïnvloeden. Bovendien kan door immersie van de capsule in een neutralisatiemiddel, zoals bijvoorbeeld 2-N-cyclohexylaminoethaansulfonzuur (CHES) of een ander zwitterionbuffer de reactiviteit ervan verlagen en het capsulemembraan verbeteren.

De volgende, niet-beperkende voorbeelden dienen ter verduidelijking van de werkwijze volgens de uitvinding alsmede de voordelen daarvan.

VOORBEELD I

De volgende procedure kan worden toegepast voor de bereiding van capsules, die praktisch impermeabel zijn voor moleculen met een molecuulgewicht groter dan ca. 150.000 daltons. In deze proef werd een hybridoma, die IgG produceert (molecuulgewicht ca. 160.000 daltons), gebruikt.

Ca. 2,1 l van een suspensie van $2,2 \times 10^6$ cellen/ml in 1% (gew./vol.) natriumalginaat (NaG-Kelco LV) werd overgedragen in een straalkop-apparaat, zoals eerder beschreven, waarna druppels werden gevormd door het forceren van de sus-

pensie door zestien 22 "gauge"-naalden bij een snelheid van ca. 50 ml/min. De druppels vielen ca. 3 cm naar beneden in 5 l van een 1,2% (gew./vol.) calciumchlorideoplossing, onder vorming van gegeleerde massa's, die door afzuigen werden verzameld en vervolgens overgebracht in een 10 l kolf met daarin ca. 5 l isotonische zoutoplossing voor de gelexpansie. De zoutoplossing werd verwijderd en twee keer aangevuld. In totaal nam de zoutoplossingexpansie ca. 11 min in beslag. Vervolgens werd een membraan rond de gegeleerde massa's gevormd door contact met 5 l van een 750 mg/l poly-L-lysine (Sigma Chemical Company, 65.000 dalton molecuulgewicht) in een isotonische zoutoplossing. Na 12 min reactie werden de verkregen capsules gedurende 10 min gewassen met 5 l van een 1,4 g/l oplossing van CHES-buffer (Sigma) met daarin 0,2% (gew./vol.) calciumchloride in zoutoplossing. De capsules werden gedurende ca. 8 min gewassen met 5 l 0,3% (gew./vol.) calciumchloride in zoutoplossing, waarna om de capsules een tweede membraan werd gevormd door een 10 min durende reactie in 5 l van een 150 mg/l polyvinylamine (Polyscience, 50.000-150.000 dalton molecuulgewicht) in zoutoplossing. De capsules werden wederom gewassen met twee keer 5 l volumina isotonische zoutoplossing, gedurende 7 min en vervolgens na-bekleed met een 7 min immersie in 5 l van een 5×10^{-2} % (gew./vol.) NaG in zoutoplossing. De capsules werden gedurende nog eens 4 min gewassen in 5 l zoutoplossing, waarna de intracapsulaire volumes werden vloeibaar gemaakt via twee immersies in 5 l volume van 55 mM natriumcitraat in zoutoplossing, waarbij de eerste immersie ca. 10 min en de tweede ca. 6 min in beslag nam. Zoals uiteengezet in voorbeeld IV, infra, zou door vervanging van de natriumcitraatoplossing met een EGTA-oplossing de antilichaamopbrengst worden verhoogd. De capsules werden twee keer gewassen in 5 l zoutoplossing en vervolgens een keer gedurende 4 min in een RPMI-medium. De capsules liet men vervolgens groeien in het groeimedum, RPMI plus 10% foetaal kalfserum. In de capsules hoopte zich IgG op, terwijl slechts sporenhoeveelheden konden worden gedetecteerd in het extracapsulaire medium. Volgens deze procedure bereide capsules

BAD ORIGINAL en overeenkomstig praktisch impermeabel voor IgG, terwijl zij vrije doorgang aan de vereiste voedingsstoffen

geven om zodoende de celgroei en antilichaamproductie binnen het intracapsulaire volume mogelijk te maken.

VOORBEELD II

Dit voorbeeld toont een procedure voor de bereiding
5 van capsules, die permeabel zijn voor IgG (molecuulgewicht
ca. 160.000 daltons), doch praktisch impermeabel voor IgM
(molecuulgewicht ca. 900.000 daltons). De toegepaste cel was
een mens-menshybridoma 77 afkomstig van het National Insti-
tute of Health, die menselijk IgM produceert en uitscheidt.
10 400 ml van een oplossing met daarin 1×10^6 cellen/
ml in 1% NaG (gew./vol.) werden gevormd tot druppels onder
gebruikmaking van een stel van acht 22 "gauge"-naalden in
een straal-kopapparaat, zoals eerder beschreven. De aanvoer-
snelheid was ca. 30 ml/min en de afstand van het naaldeinde
15 tot de geleeroplossing, 1 l 1,2% (gew./vol.) calciumchloride,
bedroeg ca. 3 cm. De gegeleerde massa's werden drie keer ge-
wassen met 1 l volumina isotonische zoutoplossing gedurende
8 min en vervolgens gedurende 10 min ondergedompeld in 1 l
750 mg/ml poly-L-lysine (Sigma, 65.000 dalton molecuulge-
20 wicht) onder vorming van een permanent membraan. De verkregen
capsules werden gedurende 5 min gewassen in 1 l 1,4 g/l CHES
met daarin 0,2% (gew./vol.) calciumchloride in zoutoplossing,
gevolgd door wassen gedurende 5 min met 1 l 0,3% (gew./vol.)
calciumchloride in zoutoplossing. De capsules werden geduren-
25 de 4 min geëxpandeerd met 1 l zoutoplossing en vervolgens na-
bekleed gedurende 7 min in 1 l 3×10^{-2} % (gew./vol.) NaG in
een zoutoplossing. De na-beklede capsules werden gedurende
5 min gewassen in een 1 l zoutoplossing, waarna de intracap-
sulaire volumes werden vloeibaar gemaakt via twee 6 min duren-
30 de onderdompelingen in 1 l van een 55 mM natriumcitraat in
zoutoplossing. Het citraat werd verwijderd door twee keer was-
sen met een zoutoplossing, 1 l elk, waarna de verkregen cap-
sules gedurende 5 min werden gewassen in RPMI-medium. De cap-
sules werden vervolgens gesuspendeerd in 1 l medium (RPMI
35 plus 20% foetaal kalfserum en antibiotica), waarna men de cel-
len daarin liet groeien. Het extracapsulaire medium werd be-
monstert. Via proeven is gebleken, dat het extracapsulaire
medium geen IgM bevatte, hetgeen betekent, dat de capsules

praktisch impermeabel waren voor moleculen met een molecuulgewicht van 900.000 daltons.

VOORBEELD III

Dit voorbeeld beschrijft een procedure voor de be-
5 reiding van capsules, die permeabel zijn voor IgM (molecuulgewicht ca. 900.000 daltons), doch impermeabel voor cellen. 200 ml van een 1% (gew./vol.) oplossing NaG (Kelco LV) en de hybridomacellen van voorbeeld II werden tot druppels gevormd door vijf 26 "gauge"-naalden in een straal-kopapparaat, zo-
10 als eerder beschreven. De verkregen druppels vielen ca. 2,5 cm in de geleringsoplossing, 1 l 1,2% (gew./vol.) calciumchloride, bij een snelheid van 9,5 ml/m. De verkregen geleerde massa's werden geëxpandeerd door drie immersies in 0,5 l volume van een zoutoplossing, waarbij een permanent
15 membraan werd gevormd door een 10 min durende reactie met 0,5 l van 1 g/l poly-L-lysine (Sigma, gemiddeld molecuulgewicht ca. 260.000 daltons). De capsules werden gewassen gedurende 5 min in 0,5 l van een 1,4 g/l CHES-zoutoplossing met daarin 0,6% (gew./vol.) calciumchloride en gedurende nog
20 eens 5 min in 0,5 l 0,8% (gew./vol.) calciumchloride in zoutoplossing. De capsules werden vervolgens een keer gewassen in 0,5 l van een zoutoplossing en vervolgens na-bekleed met 0,5 l 0,03% (gew./vol.) NaG. De na-beklede capsules werden gedurende 5 min geassen in 0,5 l van een zoutoplossing, waar-
25 na het intracapsulaire volume werd vloeibaar gemaakt door twee keer wassen gedurende 5 min, 0,5 l elk, met een 55 mM natriumcitraat. De capsules werden een keer gewassen in een zoutoplossing, een keer in een basaal medium en vervolgens in een basaal medium gesuspendeerd waarin 20% foetaal kalf-
30 serum plus antibiotica aanwezig waren. IgM bleek het capsulaire membraan te passeren, doch de cellen werden tegengehouden, hetgeen betekent, dat het membraan permeabel is voor moleculen met een molecuulgewicht van ten minste 900.000 daltons, doch impermeabel is voor cellen.

35

VOORBEELD IV

BAD ORIGINAL Dit voorbeeld toont, dat de metabolische activiteit van ingekapselde cellen sterk kan worden verhoogd door juiste keuze van het chelaatmiddel dat wordt gebruikt voor het

voor het vloeibaar maken van het intracapsulaire volume. Er werden vier verschillende chelaatmiddelen onderzocht: EDTA, EGTA, natriumcitraat en natriumsuccinaat, onder gebruikmaking van ingekapseld IgG, dat Li8 hybridoma produceert, als proef-
 5 systeem. De capsules werden bereid volgens de in voorbeeld I beschreven procedure, behalve dat het natriumcitraat van voorbeeld I werd vervangen door concentraties van de hierna vermelde chelaatmiddelen.

TABEL A

10	<u>Degelerings- reagens</u>	<u>Conc. (mM)</u>	<u>Totaal aantal cellen bij (dagen)</u>	<u>Dagen van kweek</u>	<u>Eindculture µg/ml (dag)</u>
	EDTA	55	$1,0 \times 10^6$ (6)	6	0
	EGTA	55	$4,3 \times 10^7$ (17)	27	1026
	Citraat	55	$2,3 \times 10^7$ (16)	19	366
	EGTA	55	$3,5 \times 10^7$ (16)	19	741
15	Succinaat	55	$2,3 \times 10^7$ (16)	19	-
	EGTA	55	$3,6 \times 10^7$ (19)	21	939
	EGTA	36	$4,1 \times 10^7$ (19)	21	892
	EGTA	28	$3,7 \times 10^7$ (19)	21	734
	EGTA	28	$9,3 \times 10^7$ (27)	27	659
20			$5,3 \times 10^7$ (20)		578 (20)
	EGTA	28	$6,0 \times 10^7$ (27)	27	693
			$4,1 \times 10^7$ (20)		590 (20)
	EGTA	14	$7,3 \times 10^7$ (27)	27	887
			$5,4 \times 10^7$ (20)		780 (20)

25 De tabel laat zien, dat EGTA het beste chelaatmiddel voor de celgroei is en resulteert in een verbeterde anti-lichaamproductie vergeleken met citraat en wel met een factor van 2.

De overige gegevens in de tabel illustreren proeven
 30 voor het bepalen van de optimale EGTA-concentratie voor degelering en antilichaamproductie. Zoals uit de gegevens duidelijk blijkt, is dat 36 mM en 55 mM concentraties van EGTA ongeveer equivalent zijn voor wat betreft de bevordering van de antilichaamproductie, terwijl lagere concentraties EGTA
 35 gepaard gaan met lagere antilichaamconcentraties met daarnaast een ruwweg identieke celgroei.

VOORBEELD V

Dit voorbeeld illustreert de invloed van de toepassing van meerdere wasbewerkingen met een zoutoplossing ten einde de gelmassa's te expanderen voorafgaande aan de vorming van het membraan. Dezelfde capsulevormingsprocedure en hybridoma zijn toegepast als in voorbeeld I, behalve dat het aantal wasbewerkingen met een zoutoplossing, uitgevoerd voorafgaande aan de membraanvorming, werd gemodificeerd. Na de capsulevorming werden de ingekapselde hybridoma's gedurende 20 dagen gekweekt in het cultuurmedium, waarbij het totaal celtellingen en intracapsulaire antilichaamconcentratie werd gemeten. De tabel vermeldt de resultaten van deze proef.

TABEL

Proef No.	Aantal wasbewerkingen met een zoutoplossing	Dagen in culture	Totaal aantal cellen	Intracapsulair Ab conc. $\mu\text{g/ml}$
10 441A	Geen	20	$4,3 \times 10^7$	360
441B	1	20	$5,0 \times 10^7$	560
441C	2	20	$7,2 \times 10^7$	702
441C	3	20	$6,5 \times 10^7$	717

Zoals uit de gegevens van de tabel volgt, worden bij toepassing van twee of drie wasbewerkingen met een zoutoplossing het hoogste celgetal en de hoogste intracapsulaire antilichaamconcentratie verkregen. Meer in het bijzonder bleek de culture na drie premembraanvormings-wasbewerkingen met een zoutoplossing ca. 50% meer cellen op te leveren en produceerde bijna het dubbele van de intracapsulaire antilichaamconcentratie vergeleken met de culture, die niet met de zoutoplossing werd gewassen. Deze proef laat zien, dat de premembraanvormings-wasbewerking met de zoutoplossing de capsules zodanig verbeterde, dat de ingekapselde hybridoma's gezonder waren en meer antilichaam produceerden.

Uit het bovenstaande volgt duidelijk, dat aan de hand van de beschrijving de deskundige in staat zal zijn specifieke incapsuleringstechnieken te ontwikkelen, die constant uniforme capsulemembranen zullen produceren met permeabiliteitseigenschappen toegesneden op de specifieke toepas-

singen onder gebruikmaking van empirische procedures. Dus door de juiste exploitatie van de incapsuleringsparameters, die hierin zijn beschreven, kan de deskundige capsules bereiden, die het vrije transport door het membraan van moleculen tot op een gekozen molecuulgewicht mogelijk maken, het transport van moleculen in een molecuulgewicht daarboven hinderen en de doorlating van moleculen met een molecuulgewicht en de daarmee verwante effectieve moleculaire afmetingen boven dat gebied tegenhouden. Nadat de procedure eenmaal ontwikkeld is, kan deze worden toegepast voor de bereiding van zo veel capsules als gewenst is voor het beoogde doel.

Bij het ontwerpen van een procedure voor de bereiding van capsules met een specifiek permeabiliteitsgedrag dient het volgende te worden gebruikt als algemene richtlijn-principes. De gelexpansiestap verbetert de capsulemembraan-uniformiteit en verhoogt de effectiviteit van de beheersingstechnieken van de poreusheid. Toename in de ladingsdichtheid van het polykationogene membraanvormende polymeren resulteert in het algemeen in kleinere poriën. Toename in het molecuulgewicht van het polykationogene polymeer resulteert in het algemeen in grotere poriën en dunnere membranen. Toename in de duur van de blootstelling van het polykationogene polymeer aan de gelmassa's levert een dikker, minder permeabel membraan op. Afzetting van een tweede polykationogeen polymeer boven het eerste leidt tot vermindering van de poriëngrootte. Expansie van het gel door hydratatie na membraanvorming doet de poreusheid toenemen en de contractie doet de poreusheid afnemen. Bij het ontwerpen van capsules voor implantatie is een na-bekleding met een polyanionogeen polymeer gewenst en fysiologisch onverenigbare membraanvormende materialen, die ontsteking of fibroblastische overgroei veroorzaken, dienen te worden vermeden. Bij het ontwerpen van capsules voor het kweken van cellen is vloeibaarmaking gewenst en wordt het best uitgevoerd onder toepassing van EGTA.

Dientengevolge kan de uitvinding voorkomen in andere specifieke vormen zonder af te wijken van de beschermingsomvang, waarbij de voorgaande uitvoeringsvormen slechts als illustratie dienen te worden beschouwd. Andere uitvoeringsvormen worden mede door de conclusies omvat.

C O N C L U S I E S

1. Werkwijze voor het inkapselen van een kernmateriaal binnen een intracapsulair volume omgeven door een permeabel membraan, welke werkwijze is aangepast voor het verbeteren van de membraanuniformiteit en poreusheidsbeheersing, m e t
5 h e t k e n m e r k, dat

A. een water-oplosbaar polyanionogeen polymeer met een kernmateriaal erin wordt gegeleerd met een waterige oplossing van meerwaardige kationen onder vorming van gehydrateerde, afzonderlijke, vormbehoudende gegeleerde massa's;

10 B. de aldus verkregen gegeleerde massa's worden geëxpandeerd met een waterige oplossing, die een deel van de meerwaardige kationen verwijderd en de gegeleerde massa's verder hydrateert;

C. om de geëxpandeerde gegeleerde massa's een membraan wordt gevormd onder oplevering van capsules door reactie
15 tussen anionogene groepen op het polyanionogene polymeer en kationogene groepen op een polykationogeen polymeer met een molecuulgewicht groter dan 3.000 daltons.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, m e t h e t k e n-
20 m e r k, dat het onder C gevormde membraan aan na-bekleding wordt onderworpen met behulp van een water-oplosbaar anionogeen polymeer door reactie met de achtergebleven kationogene plaatsen op het membraan.

3. Werkwijze volgens conclusie 1, m e t h e t k e n-
25 m e r k, dat de gegeleerde massa's opnieuw vloeibaar worden gemaakt na de membraanvorming.

4. Werkwijze volgens conclusie 3, m e t h e t k e n-
m e r k, dat het opnieuw vloeibaar maken plaatsvindt door blootstelling van de capsules aan een chelaatmiddel.

30 5. Werkwijze volgens conclusie 4, m e t h e t k e n-
m e r k, dat als chelaatmiddel ethyleenglycol-bis-(β -amino-ethylether)-N,N-tetra-azijnzuur of een zout ervan wordt gebruikt.

6. Werkwijze volgens conclusie 1, m e t h e t k e n-
35 m e r k, dat een tweede membraanlaag wordt gevormd om het in stap C gevormde membraan door reactie met een tweede poly-
BAD ORIGINAL kationogeen polymeer.

7. Werkwijze volgens conclusie 6, m e t h e t k e n-

m e r k, dat het membraan aan na-bekleding wordt onderworpen met behulp van een water-oplosbaar polyanionogeen polymeer door reactie met de achtergebleven kationogene plaatsen op ten minste een van de polykationogene polymeren.

5 8. Werkwijze volgens conclusie 7, m e t h e t k e n-
m e r k, dat de gegeleerde massa's opnieuw vloeibaar worden gemaakt na de membraanvorming.

9. Werkwijze volgens conclusie 8, m e t h e t k e n-
m e r k, dat het opnieuw vloeibaar maken plaatsvindt door de
10 capsules bloot te stellen aan een chelaatmiddel.

10. Werkwijze volgens conclusie 9, m e t h e t k e n-
m e r k, dat als chelaatmiddel ethyleenglycol-bis-(β -amino-
ethylether)-N,N-tetra-azijnzuur of een zout ervan wordt ge-
bruikt.

15 11. Werkwijze volgens conclusie 1, m e t h e t k e n-
m e r k, dat het polykationogene polymeer wordt gekozen uit
een groep bestaande uit zure polysacchariden.

12. Werkwijze volgens conclusie 11, m e t h e t k e n-
m e r k, dat als zure polysaccharide een alginaatzout wordt
20 gebruikt.

13. Werkwijze volgens conclusie 1, m e t h e t k e n-
m e r k, dat het polykationogene polymeer wordt gekozen uit
een groep bestaande uit proteïnen met meerdere reactieve stik-
stofhoudende kationogene groepen, polypeptiden met meerdere
25 reactieve stikstofhoudende kationogene groepen, polyvinyl-
aminen, geamineerde polysacchariden, zouten ervan en mengsels
ervan.

14. Werkwijze volgens conclusie 13, m e t h e t k e n-
m e r k, dat het polykationogene polymeer wordt gekozen uit
30 een groep bestaande uit polylysine, polyglutamine en poly-
ornithine.

15. Werkwijze volgens conclusie 6, m e t h e t k e n-
m e r k, dat het tweede polykationogene polymeer wordt ge-
kozen uit een groep bestaande uit proteïnen met meerdere
35 reactieve stikstofhoudende kationogene groepen, polypeptiden
met meerdere reactieve stikstofhoudende kationogene groepen,
polyvinylaminen, polyethyleenaminen, geamineerde polysaccha-
BADO ORIGINAL gsels ervan en zouten ervan.

16. Werkwijze volgens conclusie 15, m e t h e t k e n-

m e r k, dat het tweede polykationogene polymeer wordt gekozen uit de groep bestaande uit polylysine, polyglutamine, en polyornithine.

17. Werkwijze volgens conclusie 1, m e t h e t k e n-
5 m e r k, dat de waterige oplossing van stap B monovalente kationen bevat.

18. Werkwijze volgens conclusie 1, m e t h e t k e n-
m e r k, dat de waterige oplossing gebruikt in stap B een zoutoplossing is.

10

BAD ORIGINAL

0500750