



(19) **UA** (11) **76 594** (13) **C2**
(51)МПК

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 20040907592, 10.04.2002

(24) Дата начала действия патента: 15.08.2006

(46) Дата публикации: 15.08.2006A61K 47/32
20060101CFI20060718VHUA C08F
220/00 20060101CLI20060718VHUA
C08F 2/04
20060101CLI20060718VHUA

(86) Заявка PCT:
PCT/RU02/00164, 20020410

(72) Изобретатель:

Лопатин Владислав Викторович, RU

(73) Патентовладелец:

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ВИТАГЕЛЬ", RU

(54) ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ БИОСОВМЕСТИМЫЙ ГИДРОГЕЛЬ И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(57) Реферат:

Полифункциональный биосовместимый гидрогель содержит в мас. % акриламида - 1,95-8,0, метакриламида - 0,54-3,0, 2-гидроксиэтил метакрилата - 0,003- 0,4, N,N'-метилден-бис-акриламида - 0,006-0,6 и воды - до 100. Гидрогель получают сополимеризацией указанных мономеров в водной среде в присутствии пероксидного инициатора полимеризации, при инкубации реакционной смеси в три стадии: первую стадию проводят при температуре 20-30°C в течение 12-24 часов,

вторую стадию - путем γ -облучения в дозе 0,4-1,0 мегарад, и третью стадию - при температуре 100-130°C и давлении 0-1,2 атм. в течение 20 - 40 минут.

Официальный бюлетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2006, N 8, 15.08.2006. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.



(19) **UA** (11) **76 594** (13) **C2**
(51) Int. Cl.

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 20040907592, 10.04.2002

(24) Effective date for property rights: 15.08.2006

(46) Publication date: 15.08.2006A61K 47/32
20060101CFI20060718RHUA C08F
220/00 20060101CLI20060718VHUA
C08F 2/04
20060101CLI20060718VHUA

(86) PCT application:
PCT/RU02/00164, 20020410

(72) Inventor:

Lopatin Vladyslav Viktorovich, RU

(73) Proprietor:

VITAGEL LIMITED LIABILITY COMPANY, RU

(54) **POLYFUNCTIONAL BIOCOMPATIBLE HYDROGEL AND METHOD FOR ITS PREPARATION**

(57) Abstract:

The inventive polyfunctional biocompatible hydrogel comprises 1.95-8.0 mass % of acrylamide, 0.54-3.0 mass % of methacrylamide, 0.003-0.4 mass % of 2-hydroxyethyl methacrylate, 0.006-0.6 mass % of N,N'-methylen-bis-acrylamide, and water up to 100 mass %. The hydrogel is produced by copolymerizing said monomers in an aqueous medium in the presence of a peroxide polymerization initiator, the incubation of a reaction mixture being carried out in three stages. The first stage is carried out at a temperature ranging from 20 to 30°C during a time

of 12 to 24 hours, the second stage is carried out by irradiating with γ -radiation dose of 0.4 to 1.0 megarad, the third stage being carried out at a temperature ranging from 100 to 130°C and a pressure of 0 to 1.2 atm. during a time of 20 to 40 minutes.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2006, N 8, 15.08.2006. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.



(19) **UA** (11) **76 594** (13) **C2**
(51) МПК

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
20040907592, 10.04.2002

(24) Дата набуття чинності: 15.08.2006

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.08.2006 А 61 К 47/32
20060101CFI20060718RHUA C08F
220/00 20060101CLI20060718VHUA
C08F 2/04
20060101CLI20060718VHUA

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки
відповідно до договору РСТ:
PCT/RU02/00164, 20020410

(72) Винахідник(и):
Лопатін Владіслав Вікторович, RU

(73) Власник(и):
ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ "ВИТАГЕЛЬ", RU

(54) ПОЛІФУНКЦІОНАЛЬНИЙ БІОСУМІСНИЙ ГІДРОГЕЛЬ ТА СПОСІБ ЙОГО ОДЕРЖАННЯ

(57) Реферат:

Винахід належить до медицини і стосується матеріалу медичного призначення, зокрема носія для клітин людини і тварин, імплантованих в організм ссавця, або депо для лікарських засобів. Він являє собою біосумісний гідрогель, що містить поперечно зшитий співполімер акриламід, метакриламід та зшиваючих агентів - 2-гідроксіетилу метакрилату і N,N'-метилден-біс-акриламід. Гідрогель одержують

співполімеризацією зазначених мономерів у водному середовищі в присутності пероксидного ініціатора полімеризації, при інкубації реакційної суміші в три стадії: першу стадію проводять при температурі 20-30 °С протягом 12-24 годин, другу стадію - шляхом γ -опромінення дозою 0,4-1,0 мегарад, і третю стадію - при температурі 100-130 °С і тиску 0-1,2 атмосфер протягом 20-40 хвилин.

Опис винаходу

Винахід стосується рецептури та способу одержання біосумісного поліакриламідного гідрогелю, який може бути використаний як матеріал медичного призначення, зокрема, як носій для клітин людини і тварин, імплантованих в організм ссавців у якості депо для лікарських препаратів при тривалому медикаментозному лікуванні, наприклад, пухлин або абсцесів.

Відомо, що поліакриламідні гідрогелі (ПААГ) є досить дешевими і простими у виготовленні матеріалами і мають хімічну та біологічну інертність. Їх досить легко синтезувати з бажаною щільністю та в формі, яка зручна для введення підшкірно і/або в м'які тканини з мінімальними травмами для організму пацієнта.

У медицині відомий спосіб лікування інсулінозалежного цукрового діабету [RU 2165263] шляхом трансплантації гетерогенних В-клітин підшлункової залози у попередньо введений хворому, наприклад підшкірно, поліакриламідний гель, навколо якого сформувалася капсула.

Відомий також спосіб культивування гетерогенних клітин ссавців [RU 2152800], зокрема, клітин Лейдига і клітин меланоми, шляхом їх трансплантації у попередньо введений ссавцям поліакриламідний гель.

Це відкриває можливості лікування ряду захворювань шляхом трансплантації в організм хворого гетерогенних клітин, які виробляють необхідні йому ферменти та/або гормони, а також здійснення вакцинотерапії онкологічних захворювань.

Однак, як було експериментально встановлено, тривалість продукування гетерогенними клітками необхідних для організму хворого речовин, за інших рівних умов, залежить від властивостей поліакриламідного гелю (ПААГ).

Як відомо, при імплантації ПААГ в організм ссавця довкола нього утворюється з'єднувальнотканинна капсула [A.B.Shekhter et all "Injectable hydrophilic polyacrylamide gel Formacryl and tissue response to its implantation", у журн. "Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии", 1997, № 2, стор. 19], яка на деякий час перешкоджає проникненню Т-лімфоцитів до імплантованих в ПААГ гетерогенних клітин та знищенню імплантованих клітин.

Однак не тільки наявність з'єднувальнотканинної капсули впливає на тривалість продукування гетерогенними клітками необхідних для організму хворого речовин.

Відомий біосумісний поліакриламідний гідргель, описаний у [заявці EP №742022], який містить від 3,5 до 9,0 мас. % поперечно-зшитого співполімеру акриламідів із зшиваючим агентом - метилен-біс-акриламідом і 96,5 - 99,0 мас. % води.

Цей гідргель отримано способом, що описано там же [EP № 742022], який заключається в тому, що проводять реакцію співполімеризації акриламідів з метилен-біс-акриламідом у водному середовищі, у присутності пероксидних ініціаторів полімеризації, з витримкою реакційної суміші при кімнатній температурі протягом 20 хвилин для зшивки співполімеру. При цьому процес співполімеризації проводять в одну стадію, в якості пероксидних ініціаторів полімеризації використовують суміш персульфату амонію і тетраметилетилендіаміну, а як водне середовище беруть апірогенну воду або розчин хлориду натрію.

Гідргель, який отримано таким способом, має недостатній ступінь зшивки, що обумовлено низьким температурним режимом проведення процесу співполімеризації і його одностадійністю. Це приводить до швидкого проростання сполучної тканини в імплантований гель і до його швидкої усадки і резорбції [A.B.Shekhter et all "Injectable hydrophilic polyacrylamide gel Formacryl and tissue response to its implantation", у журн. "Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии", 1997, № 2, стор. 19].

Крім того, отриманий таким способом гідргель містить незв'язані молекули тетраметилетилендіаміну, вільні радикали

NH₂ і мономери акриламідів в кількості 1,0 - 1,2 мг на 1 грам полімеру (1,0 - 1,2 ppt), що може викликати активну асептичну запальну реакцію на ранній стадії введення гідрогелю в організм [див. A.B.Shekhter et all "Injectable hydrophilic polyacrylamide gel Formacryl and tissue response to its implantation", у журн. "Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии", 1997, № 2, стор. 19].

Відомий біосумісний гідргель, описаний у патенті RU № 2127129, що містить від 1,0 до 8,0 мас. % поперечно-зшитого співполімеру акриламідів з зшиваючим агентом - метилен-біс-акриламідом і 92,0 - 99,0 мас. % води. Спосіб одержання цього матеріалу також описаний у патенті [RU №2127129] і полягає в співполімеризації акриламідів з метилен-біс-акриламідом у водному дисперсійному середовищі в присутності пероксидного ініціатора полімеризації. При цьому як водне середовище беруть воду, піддану електролізу, яка має pH 9,0 - 9,5. Зшивку співполімеру ведуть при інкубації реакційної суміші в дві стадії: при температурі 20 - 90° С протягом 2-24 годин і потім при температурі 100 - 105°С протягом 2-4 годин.

Отриманий таким способом гідргель не містить тетраметилетилендіаміну, містить трохи більше 1% вільних радикалів NH₂ і мономери акриламідів в кількості 0,6 - 0,8 мг на 1 грам полімеру (0,6 - 0,8 ppt). Однак він також розроблений і призначений переважно для пластики м'яких тканин і не забезпечує достатньої тривалості активного функціонування гетерогенних клітин при використанні його як носія імплантованих клітин.

Розкриття винаходу

Основною задачею, на вирішення якої спрямовано пропонуваний винахід, є збільшення тривалості активної життєдіяльності поміщених у поліакриламідний гідргель гетерогенних клітин в організмі реципієнта.

Іншою задачею є зменшення степені резорбції гідрогелю і можливості проникнення в нього макрофагів після його імплантації в організм реципієнта.

Ще одною задачею є зменшення тканинної реакції організму на імплантований гідргель шляхом зменшення

вмісту в ньому вільних радикалів і мономерів.

Поставлені задачі вирішені тим, що запропоновано поліфункціональний біосумісний гідрогель, що містить поліакриламід і воду, який, відповідно до винаходу, в якості поліакриламід містить співполімер акриламід, метакриламід, 2-гідроксиетил метакрилату і N,N'- метилен-біс-акриламід.

При цьому зазначений поліакриламід містить таке співвідношення компонентів, мас. %: акриламід - 65,0 - 80,0, метакриламід - 18,0 - 30,0, 2-гідроксиетил метакрилату - 0,1 - 4,0 N,N1- метилен-біс-акриламід - 0,2 - 6,0. Зазначений поліакриламід складає від 3,0 до 10,0 мас. % від загальної маси біосумісного гідрогелю.

Зазначений біосумісний гідрогель містить наступне співвідношення компонентів, мас. %:

- акриламід - 1,95 - 8,0,
- метакриламід - 0,54 - 3,0,
- 2-гідроксиетил метакрилату - 0,003 - 0,4,
- N,N'- метилен-біс-акриламід - 0,006 - 0,6,
- води - до 100.

В якості води гідрогель містить бідистильовану апірогенну воду.

Поліфункціональний біосумісний гідрогель має рН 3,5 -4,5.

Зазначений гідрогель зручний для ін'єкцій і розфасований у шприци.

Зазначений гідрогель зручний для утворення капсул в організмі тварин і людини, для чого його імплантують у організм людини або тварин, а потім поміщають у нього бажану культуру клітин.

Поставлені задачі вирішуються також тим, що запропоновано спосіб одержання поліфункціонального біосумісного гідрогелю шляхом співполімеризації мономерів і зшиваючих агентів у водному середовищі в присутності пероксидного ініціатора полімеризації в декілька стадій, у якому, відповідно до винаходу, як мономери беруть акриламід і метакриламід, як зшиваючі агенти беруть 2-гідроксиетил метакрилат і N,N'-метилен-біс-акриламід при такому співвідношенні компонентів, мас. %:

- акриламід - 1,95 - 8,0,
- метакриламід - 0,54 - 3,0,
- 2-гідроксиетил метакрилату - 0,003 - 0,4,
- N,N'-метилен-біс-акриламід - 0,006 - 0,6,
- води - до 100,

співполімеризацію проводять у три стадії: першу стадію - при температурі 20 - 30°C протягом 12-24 годин, другу стадію - шляхом Γ - опромінення дозою 0,4 - 1,0 мегарад, і третю стадію - при температурі 100 - 130 °C і тиску 0-1,2 атм. протягом 20 - 40 хвилин.

Зазначений гідрогель після першої стадії співполімеризації промивають у гарячій воді, яка має температуру 70 - 110°C, протягом щонайменше 3 годин, при масовому співвідношенні гідрогелю і води 1 : 8-10 і тиску 0 -1,2 атм.

Як ініціатор співполімеризації беруть перекис водню і/або персульфат амонію в кількості не більше 0,33 мас. % від сумарної ваги вихідних компонентів.

Як водне середовище беруть бідистильовану апірогенну воду.

Отриманий гідрогель поміщають або фасують у шприци і застосовують для імплантації в організм людини або тварин з утворенням капсули і наступним введенням у капсулу бажаних культур клітин.

Запропонований гідрогель може бути отриманий різними способами і заявлений спосіб одержання поліакриламідного гідрогелю ніяким чином не обмежує інших можливих варіантів його одержання, як прямих, так і непрямих, і ілюструє один з можливих шляхів одержання гідрогелю даної сполуки з визначеними заданими властивостями.

Як відомо, гідрогель, що містить поліакриламід, являє собою тривимірну сітку поперечно зшитих зшиваючими агентами мономерів, в комірках якої утримується водне середовище, у якому міститься деяка невідновлена кількість незв'язаного ініціатора полімеризації, тому що деяка, також невідновлена кількість ініціатора полімеризації безпосередньо вбудовується в структуру співполімеру [див. М.Н. Савицкая, Ю.Д. Холодова "Полиакриламид", Вид. "Техника" 1969 р., стор. 103], або ж вимивається з гідрогелю при його промиванні.

При цьому біологічно-активні властивості такого гідрогелю в значній мірі залежать від структури сітчастого полімеру, що у свою чергу залежить від умов його синтезу, а саме якісного і кількісного співвідношення вихідних реагентів, у тому числі зшиваючих агентів, і ініціаторів полімеризації, які хімічними і водневими зв'язками вбудовуються в структуру співполімеру (по групах NH, CH, COOH, NH₂, CH₂) , а також режиму здійснення полімеризації.

Сутність винаходу полягає в тому, що був підібраний якісний і кількісний склад поліакриламідного гелю й умови проведення співполімеризації, що дозволяють збільшити тривалість активної життєдіяльності імплантованих в організм гетерогенних клітин.

Умови одержання пропонованого поліакриламідного гідрогелю дозволили зменшити кількість незв'язаних аміногруп, вільних NH₂ радикалів, і неграничних подвійних зв'язків. Також удалося збільшити ступінь зшивки за рахунок утворення структурних груп (-H₂C-NH-CH₂-) , (-CO-NH-CR₂-O-R) , (-CO-NH-NH-CO-) , (H-COR-NH-CR-O-R) , (-CONH-R-NH-CO) , де R = CH₃, CH₂, NH₂, C₂H₅, C₃H₇, і збільшення кількості поперечних зшивок - N-N зв'язків.

Усе це дозволило забезпечити високу стійкість пропонованого гідрогелю до резорбції й усадки в організмі пацієнта та умови для переживання імплантованих у гелі клітин.

Короткий опис ілюстрацій.

Для кращого розуміння винаходу нижче наведені приклади конкретного одержання пропонованого біосумісного гідрогелю із посиланнями на прикладені ілюстрації, де:

На Фіг. 1а наведено інфрачервоний (14) спектр поглинання пропонованого гідрогелю;
Фіг. 16 - 14 спектр поглинання гідрогелю - прототипу, що випускається в Росії за патентом RU №2127129 під торговим найменуванням "Формакирил";

Обидва 14 спектри записані в області 4000-500 см⁻¹. (Вздовж осі "х" - відкладена довжина хвилі світла (см⁻¹) ; вздовж осі "у" - ступінь поглинання світла Т (у %);

На Фіг. 2а представлена фотографія пропонованого гідрогелю, яка отримана за допомогою растрової електронної мікроскопії (РЕМ),

Фіг. 2б - фотографія гідрогелю "Формакирил", також отримана за допомогою растрової електронної мікроскопії (РЕМ).

Обидві фотографії отримані з використанням електронного мікроскопа Hitachi S 405A.

Приклади здійснення винаходу.

Для одержання пропонованого біосумісного гідрогелю беруть:

- Акриламід (acrylamide) : C₃H₅NO, мол. маса 71.08, білий кристалічний порошок без запаху; температура плавлення 84,5 °C/ виробництво фірми Sigma [Каталог "Реактивы для биохимии и исследований в области естественных наук" SIGMA, 1999, с. 47, каталожний №A8887;

- Метакриламід (methacrylamide): C₅H₇NO; мол. маса 73.08, білий порошок; температура плавлення 111°C; виробництво фірми Fluka [Fluka Katalogue "Chemica-Biochemica", Fluka AG, Switzerland, 1986/87, p.1151];

2-гідроксиетил метакрилат - (2-hydroxyethyl methacrylate): C₆H₁₀O₃, мол. маса 130.1, рідина; температура кипіння 205-208 °C; густина 1,07 г/мл; виробництво фірми Sigma [Каталог "Реактивы для биохимии и исследований в области естественных наук" SIGMA, 1999, с. 567, каталожний № H8 633];

- N,N'- метилен-біс-акриламід (N,N' - methylene - bis -acrylamide):

C₇H₁₀N₂O₂, мол. маса 154,16, білий кристалічний порошок без запаху, температура плавлення 185 °C, виробництво фірми Sigma [Каталог " Реактивы для биохимии и исследований в области естественных наук " SIGMA, 1999, с. 696, каталожний № M7256];

- Персульфат амонію: (NH₄)₂ S₂O₈ - мол. маса 228.19; безбарвні плоскі кристали; температура руйнування 120°C; виробництво фірми Sigma [Каталог " Реактивы для биохимии и исследований в области естественных наук " SIGMA, 1999, с.117];

- Перекис водню: H₂O₂- мол. маса 34,0; безбарвна рідина, густина при 0°C -1,465; температура плавлення -0,89°C; виробництво фірми Sigma [Каталог " Реактивы для биохимии и исследований в области естественных наук " SIGMA, 1999, с. 556, каталожний № H6520];

Усі вищевказані мономері беруть придатними для біологічних цілей і не потребуючими додаткового очищення.

Воду беруть бідистильовану апірогенну (pH=5,6).

Спосіб здійснюють таким чином:

Для приготування реакційної суміші беруть бідистильовану апірогенну воду, що має pH 5,6.

Готують водний розчин, який містить акриламід, метакриламід, 2 -гідроксиетил метакрилат і N,N'- метилен-біс-акриламід, узяті в співвідношенні 65,0 - 80,0:18,0 - 30,0:0,1 - 4,0:0,2 - 6,0.

Загальна маса вихідних мономерів у розчині складає при цьому від 3,0 до 10,0 %. (Варіюючи кількість вихідних мономерів у суміші, одержують гідрогель різної щільності й еластичності).

В отриманий розчин вводять ініціатори полімеризації перекис водню у кількості 0,1-0,3 мас. %, або персульфат амонію в кількості 0,0006-0,03 мас. %, або їх суміш у будь-якому співвідношенні й у кількості, що не перевищує суму їхніх максимальних значень. Варіюючи кількість перекису водню і персульфату амонію одержують матеріал, що має бажаний pH у діапазоні 3,5 -4,5.

Готову реакційну суміш фільтрують через бактерицидні полімерні фільтри, наприклад, марки F8273 з розміром пор 0,45mm CA/CN, виробник Sigma (США), і поміщають для співполімеризації мономерів на інкубацію при температурі 20 -30 °C протягом 12-24 годин. Після цієї інкубації роблять промивання гідрогелю, який вже має вигляд гелю, гарячою водою, для чого поміщають гель у ємність з водою, яка має температуру 70 - 110 °C, при тиску 0 - 1,2 атм. і співвідношенні об'єму гелю і води 1 : 8-10 на 4-6 годин.

Потім проводять другу стадію співполімеризації, обробляючи напівпродукт Г-опроміненням дозою 0,4-1,0 мегарад.

Після цього напівпродукт фасують у необхідному об'ємі у флакони або шприци і проводять третю стадію співполімеризації, витримуючи гель при температурі 120°C і тиску 1,2 атм. протягом 20-40 хвилин.

Були проведені фізико-хімічні, санітарно-хімічні і токсикологічні дослідження зразків пропонованого гідрогелю, у відповідності зі [Стандартом ИСО 10993 "Оценка биологического действия медицинских изделий", "Методическими указаниями по санитарно-гигиенической оценке резиновых і латексных изделий медицинского назначения" (Минздрав СРСР, М., 1988р.), а і [методичними рекомендаціями "Допустимые количества миграции химических веществ, выделяющихся из полимерных и других материалов, контактирующих с пищевыми гидрогелями и методы их определения" СанПиН 42-122-42-40-86].

Визначення вмісту в зразках отриманого гідрогелю мономерів акриламід у N,N1- метилен-біс-акриламід у, проводили відповідно до методики, яка описана в [роботі V.V. Kuznetsov et al. "Determination of Acrylamide in Polyacrylamidic gels"// The 52-nd Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy. - New Orleans, LA, 2001, Abstract Book, № 1648].

Цими дослідженнями було встановлено, що пропонований гідрогель має наступні фізико-хімічні характеристики:

- Зовнішній вигляд - гель
- Колір - від безбарвного до напівпрозорого темно-коричневого, опалесцюючого;
- Показник заломлення - 1,328-1,360;
- Густина - 1,0 - 1,2 г/см³;
- pH - 3,5 - 4, 5;
- Вміст мономерів - до 0,4 ррт;

Рівень бромовання - не вище 1,0 (мг броду на 1л). Санітарно-хімічні випробування показали, що:

- міграція металів - Cu, Fe, Ni, Zn, Al, Ti, Ag у водну витяжку з гідрогелю, визначена атомно-абсорбційним методом, не знайдена в межах чутливості методу (0,02; 0,05; 0,05; 0,02; 0,005; 0,04 мг/л відповідно), що істотно нижче припустимих рівнів, прийнятих для питної води;

- міграція натрію складала не більш 0,12 мг/л при припустимому рівні в питній воді 200 мг/л; Токсикологічні випробування показали, що водні витяжки з гідрогелю не виявили гемолітичного ефекту в дослідях "in vitro" з ізольованими еритроцитами кроликів. Встановлено гемоліз 0,04% при припустимому значенні показника 2%.

У гострому досліді на білих мишах при парентеральному введенні зразків гідрогелю в дозі 50,0 мол на 1кг маси тіла не відзначено загибелі тварин і клінічних ознак інтоксикації: загальний стан дослідних мишей, їх поводження, поїдання корму, стан шерстного покриву не відрізнялися від контрольних.

При розтині дослідних мишей встановлено, що тканини в місці введення гідрогелю, регіональні лімфатичні вузли, внутрішні органи (печінка, нирки, селезінка) були в межах фізіологічної норми і контролю.

Не було відзначено статистично достовірних відмінностей динаміки маси тіла, клініко-біохімічних показників крові, коефіцієнтів внутрішніх органів у дослідних тварин у порівнянні з контролем при підшкірній імплантації гелю терміном на 2,5 місяці.

Не виявлено сенсibilізуючого ефекту гідрогелю при проведенні імунологічної діагностичної реакції деградуляції тучних клітин (РДТК).

Мікроядерним тестом на препаратах кісткового мозку не встановлено мутагенного ефекту дії гідрогелю. Гістологічне вивчення області імплантації гідрогелю і внутрішніх органів (печінка, нирки, селезінка, сім'яні залози) показало наявність слабо вираженої реакції тканин на гідрогель тільки в перші дні після імплантації і відсутність дистрофічних і некротичних змін в органах.

Нижче наведені конкретні приклади одержання пропонованого біосумісного гідрогелю і застосування його для культивування гетерогенних клітин в організмі реципієнта.

Приклад 1

Для одержання гідрогелю брали 384 мл бідистильованої апірогенної води, яка має pH 5,6, і розчиняли в ній 11,2 г, акриламід, 3,6 г, метакриламід, 0,48, 2-гідроксиетил метакрилату і 0,72 г N,N'-метилєн-біс-акриламід, придатних для біологічних цілей. Потім у вихідний розчин вносили 0,04 г персульфату амонію і 2мл 30%-ного перекису водню. Отриману суміш фільтрували через бактерицидний полімерний фільтр марки F8273 з розміром пор 0,45 мкм CA/CN, виробник Sigma (США) і поміщали в ємність, яку ставили для інкубації на водяну баню при температурі 30° С протягом 22 годин.

Потім гідрогель у вигляді гелю промивали в гарячій воді при співвідношенні води і гелю 10:1, при температурі 90° протягом 4 годин і проводили другу стадію співполімеризації, обробляючи напівпродукт γ -опроміненням дозою 0,8 мєгарад. Після цього напівпродукт фасували в шприци об'ємом 0,5 -3,0 мл і проводили третю стадію співполімеризації, витримуючи гель при температурі 120°С і тиску 1,2 атм. протягом 30 хвилин.

Отриманий гель містить 96 мас. % водної фази і 4 мас. % співполімеру, у якому на 70,0 мас. % акриламід, приходитьсь 22,5 мас. % метакриламід, 0,3 мас. % 2-гідроксиетил метакрилату і 0,4 мас. % N,N'-метилєн-біс-акриламід і має pH = 4,3.

Отриманий зразок гідрогелю має наступні фізико-хімічні характеристики:

- Зовнішній вигляд - безбарвний, напівпрозорий, опалесцентний гель;
- Показник заломлення - 1,348;
- pH - 4,3;
- Густина - 1,0 г/см³;
- Вміст мономерів 0,1 ррт;
- Рівень бромовання - 0,1(мг броду на 1л).

Були отримані 14 спектри і проведені електронно-мікроскопічні дослідження висушеного зразка цього гідрогелю, які наведені відповідно на Фіг. 1а і Фіг. 2а.

Для порівняння на Фіг. 1б і Фіг. 2б представлені 14 спектри і хроматограма екстракту відомого гідрогелю прототипу, який випускається в Росії за патентом RU № 2127129 під торговельною назвою "Формаєрил", що містить 96 мас. % водної фази і 4 мас. % співполімеру, де на 96 мас. % акриламід, приходитьсь 4,0 мас. % N,N'-метилєн-біс-акриламід, має pH = 5,4, рівень бромовання 0,27 (мг броду на 1л) , і отриманий при інкубації вихідної суміші в присутності перекису водню і персульфату амонію в сумарній кількості 0,3 мас. %, при температурі 60°С протягом 12 годин, а потім при температурі 100°С ще 2 години.

Як видно зі спектра, представленого на Фіг. 1а, у ньому відсутній пік у районі смуги 1620 см⁻¹. Це свідчить про те, що в структурі полімеру відсутні вільні NH₂ радикали, які могли б утворити координаційні зв'язки зі структурною сіткою гідрогелю.

Як видно зі спектра, представленого на Фіг. 1б, у ньому присутня смуга - 1620 см⁻¹, що вказує на наявність NH₂ радикалів у кількості трохи більше 1%.

Для проведення електронно-мікроскопічних досліджень заявленого гідрогелю і гідрогелю "Форма-крил" зразки гелів, отриманих як описано в цьому прикладі, висушували до постійної ваги. При цьому зразки мали вигляд плівки. Структуру гідрогелів досліджували методом растрової (РЕМ) електронної мікроскопії з використанням електронного мікроскопа Hitachi S 405A, для чого проводили препарування методом сколу заморожених у рідкому азоті висушених зразків гідрогелів. Перед переглядом методом растрової електронної мікроскопії на поверхню зразків напиляли золото.

Електронно-мікроскопічні (РЕМ) фотографії пропонованого гідрогелю і гідрогелю "Форма-крил" представлені відповідно на Фіг. 2а і 2б.

Як видно з порівняння представлених на Фіг. 2 фотографій пропонований гідрогель має більш дрібнопористу структуру в порівнянні з гідрогелем "Форма-крил".

Приклад 2

Використання пропонованого гідрогелю для культивування ксеногенних пухлинних клітин.

Отриманий як описано в прикладі 1 гідрогель імплантували підшкірно в об'ємі 1 мл. мишам лінії C57 Black. Через 1,5 міс. в імплантований гель, навколо якого сформувалася з'єднувально-тканя капсула, вносили клітини меланоми людини лінії SKMEL-1 по 1 млн. клітин на кожну капсулу з гідрогелем.

Через 3, 6 і 9 місяців гелеві капсули витягали з тварин і тестували життєздатність і фізіологічну активність клітин, що знаходяться в цих капсулах, меланоми людини.

Установлено, що клітини меланоми людини лінії SKMEL-1 зберігали життєздатність навіть через 9 місяців після культивування їх у капсули пропонованого гідрогелю.

При переведенні виділених з капсули клітин меланоми в культуру встановили за допомогою звичайного методу полімеразної ланцюгової реакції повну ідентичність консервативного міоглобіну людини в клітинах меланоми, культивованих у живильному середовищі і клітин, культивованих протягом 9 міс. у капсулі гідрогелю, імплантованого в організм миші.

Цей приклад свідчить про можливість тривалого культивування за допомогою пропонованого гідрогелю імплантованих клітин в організмі реципієнта при збереженні ними життєздатності.

Приклад 3

Використання пропонованого гідрогелю для культивування свинячих клітин Лейдіга в організмі людини для лікування безплідності.

Отриманий як описано в прикладі 1 гідрогель імплантували хворим людям чоловічої статі. Після утворення з'єднувально-тканної капсули навколо гелю в нього вносили клітини Лейдіга, отримані від статевозрілих поросят.

Рівень тестостерону в крові пацієнтів визначали за допомогою діагностичного набору фірми ХемаМедіка (Росія), відповідно до інструкції виробника.

Рівень тестостерону у пацієнтів після імплантації їм свинячих клітин Лейдіга представлений у Таблиці 1.

Таблиця 1

Рівень тестостерону	Тривалість імплантації клітин Лейдіга в пропонованому гідрогелі						
	0 міс.	3 міс.	6 міс.	10 міс.	12 міс.	16 міс.	22 міс.
1-ий пацієнт 52 року	4,8 нмол/л	8,6 нмол/л	10,8 нмол/л	16,0 нмол/л	12,0 нмол/л	16,2 нмол/л	18,0 нмол/л
2-ий пацієнт 38 років	6,8 нмол/л	12,6 нмол/л	16,4 нмол/л	18,6 нмол/л		22,4 нмол/л	
	Тривалість імплантації клітин Лейдіга в гідрогелі - «Форма-крил» (прототип)						
	0 міс.	3 міс.	6 міс.	10 міс.	12 міс.	16 міс.	22 міс.
3-й пацієнт 50 років	3,8 нмол/л	5,8 нмол/л	10,8 нмол/л	10,6 нмол/л	8,0 нмол/л	6,2 нмол/л	0
4-й пацієнт 36 років	5,6 нмол/л	8,6 нмол/л	13,4 нмол/л	12,6 нмол/л	9,5 нмол/л	8,4 нмол/л	5,2 нмол/л

Як видно з цієї таблиці, пропонований гідрогель забезпечує можливість культивування свинячих клітин Лейдіга в організмі людини при збереженні цими клітинами здатності синтезувати тестостерон протягом 22 місяців, у той час як при імплантації клітин у гель-прототип (Форма-крил) їх здатність до активного синтезу гормону починає знижуватися вже через 10 місяців.

Приклад 4

Використання пропонованого гідрогелю для культивування гетерогенних клітин підшлункової залози в організмі людини для лікування інсулінозалежного цукрового діабету. 1. Хвора Ф., 37 років. Інсулінозалежний цукровий діабет діагностовано 11 років тому, через рік після пологів. Вагітність у хворої протікала важко: з

токсикозом в другій половині терміну вагітності, нефропатологією, значним до 26 кг збільшенням ваги. Захворювання носило всі роки нестабільний характер, що вимагало великих зусиль у підборі адекватної інсулінотерапії. Споживання екзогенного інсуліну варіювалось з 58 од/доб до 30 од/доб. В останні два роки діагностовано патологічні зміни з боку нирок, що визначається як діабетична нефропатія. В аналізах сечі відзначено збільшення верхньої границі протеїнурії в 10-12 разів. Підвищення артеріального тиску до 170/110 мм рт.ст.

Отриманий як описано в прикладі 1 гідрогель імплантували цій хворій. Після утворення з'єднувально-ткані капсули навколо гелю в нього ввели культуру клітин підшлункової залози новонароджених кроликів.

Вже через 7 днів після введення клітин підшлункової залози пацієнтка відзначала поліпшення загального стану, зменшення почуття спраги і сухості слизової оболонки порожнини рота, зниження артеріального тиску до 140/90 мм рт.ст. Через 15 днів стан пацієнтки дозволив знизити потребу в екзогенному інсуліні з 30 од до 18 од (контроль крові і сечі). Через 30 днів потреба в екзогенному інсуліні знизилася до 12 од/доб, а наприкінці 2-го місяця до 4 од/доб.

Після введення клітин підшлункової залози хвора спостерігається протягом 12 місяців. Клінічних проявів нефропатії не виявляється, артеріальний тиск у межах вікової норми. Пацієнтка переведена на пероральні антидіабетичні препарати з обов'язковою умовою дотримання діабетичної дієти і контролю глюкози в крові, у сечі і глікозильованого гемоглобіну.

2. Хворий К., 52 роки. Інсулінозалежний цукровий діабет діагностовано з 18 років на тлі сильної стресової ситуації. Характер захворювання спочатку був нестабільно важким. Дози екзогенного інсуліну досягали 70 од/доб. Згодом характер плину захворювання стабілізувався, але погіршення стану виникали після стресових ситуацій і похибках у дієті.

В останні три роки відзначалося погіршення стану судин нижніх кінцівок, зниження лібідо, погіршення ерекції і якості полового акта. Діагностовано діабетична ангіопатія нижніх кінцівок і полового члена. Потреба в екзогенному інсуліні за останній рік від 20 од/доб до 40 од/доб.

Отриманий як описано в прикладі 1 гідрогель імплантували цьому хворому. Після утворення з'єднувально-ткані капсули навколо гелю в нього ввели культуру клітин підшлункової залози 14-ти денних поросят.

Через два тижні після введення клітин підшлункової залози пацієнт відзначав поліпшення загального стану. Через місяць потреба в екзогенному інсуліні знизилася до 12 од/доб. Через 2 місяці - до 6 од/доб. Через 4 місяці після трансплантації хворого переведено на пероральні антидіабетичні препарати. Нормалізувалося сексуальне життя пацієнта, значно покращився стан судин нижніх кінцівок.

Суб'єктивні й об'єктивні симптоми обстежуваних пацієнтів, дані додаткових методів дослідження (крові, сечі) дозволяють говорити про високу ефективність лікування цукрового діабету шляхом введення гетерогенних клітин підшлункової залози в гідрогель пропонованого складу.

Терапевтичний ефект триває, як правило, від 10 до 20 місяців в залежності від тяжкості захворювання. Кількість клітин, що трансплантується, також визначається тяжкістю плину цукрового діабету, зокрема кількістю споживаного хворим екзогенного інсуліну.

Промислова застосовність

Таким чином, приведені приклади конкретного виконання підтверджують, що пропонований біосумісний гідрогель може бути отриманий за допомогою пропонованого способу.

Пропонований гідрогель практично не викликає тканинної реакції, не викликає сенсibiliзації організму, не викликає дистрофічні і некротичні зміни і може бути використаний для імплантації в організм тварин і людини для утворення капсули і наступного культивування в ній бажаних клітинних культур.

У порівнянні з відомим гідрогелем-прототипом (гідрогель "Формакаріл") у структурі пропонованого гідрогелю відсутні вільні NH_2 радикали, що могли б утворити координаційні зв'язки зі структурною сіткою гідрогелю.

Пропонований гідрогель у порівнянні з прототипом має більш дрібнопористу структуру і забезпечує можливість більш тривалого культивування імплантованих клітин в організмі реципієнта зі збереженням ними життєздатності і здатності виробляти необхідні для людини продукти, зокрема тестостерон і інсулін.

Формула винаходу

1. Поліфункціональний біосумісний гідрогель, який містить поліакриламід і воду, який відрізняється тим, що як поліакриламід він містить поперечно зшитий співполімер акриламіду, метакриламіду та зшиваючих агентів - 2-гідроксіетилену метакрилату і N,N'-метилен-біс-акриламіду при наступному співвідношенні компонентів, мас. %:

акриламід	65,0-80,0
метакриламід	18,0-30,0
2-гідроксіетилену метакрилат	0,1-4,0
N,N'- метилен-біс-акриламід	0,2-6,0.

2. Поліфункціональний біосумісний гідрогель за п. 1, який відрізняється тим, що містить зазначеного поліакриламіду від 3,0 до 10,0 мас. % від загальної маси біосумісного гідрогелю.

3. Поліфункціональний біосумісний гідрогель за п. 1, який відрізняється тим, що має таке співвідношення компонентів, мас. %:

акриламід	1,95-8,0
метакриламід	0,54-3,0
2-гідроксіети́лу метакрилат	0,003-0,4
N,N'- метилен-біс-акриламід	0,006-0,6
води	до 100.

4. Поліфункціональний біосумісний гідрогель за будь-яким з пп. 1-3, який відрізняється тим, що як воду він містить бідистильовану апірогенну воду.

5. Поліфункціональний біосумісний гідрогель за будь-яким з пп. 1-4, який відрізняється тим, що він має рН 3,5-4,5.

6. Поліфункціональний біосумісний гідрогель за п.1, який відрізняється тим, що він придатний для ін'єкцій.

7. Поліфункціональний біосумісний гідрогель по п.1, який відрізняється тим, що він придатний для утворення капсули в тканинах тварин і людини.

8. Поліфункціональний біосумісний гідрогель за п. 1, який відрізняється тим, що він придатний для культивування гетерогенних (алогенних або ксеногенних) або аутогенних клітин.

9. Поліфункціональний біосумісний гідрогель за п. 6, який відрізняється тим, що він розфасований у шприци.

10. Спосіб одержання поліфункціонального біосумісного гідрогелю шляхом співполімеризації мономерів і зшиваючих агентів у водному середовищі в присутності пероксидного ініціатора полімеризації в кілька стадій, який відрізняється тим, що як мономери беруть акриламід і метакриламід, як зшиваючі агенти беруть 2-гідроксіети́лу метакрилат і N,N'- метилен-біс-акриламід при такому співвідношенні компонентів, мас. %:

акриламід	1,95-8,0
метакриламід	0,54-3,0
2-гідроксіети́лу метакрилат	0,003-0,4
N,N'- метилен-біс-акриламід	0,006-0,6
води	до 100,

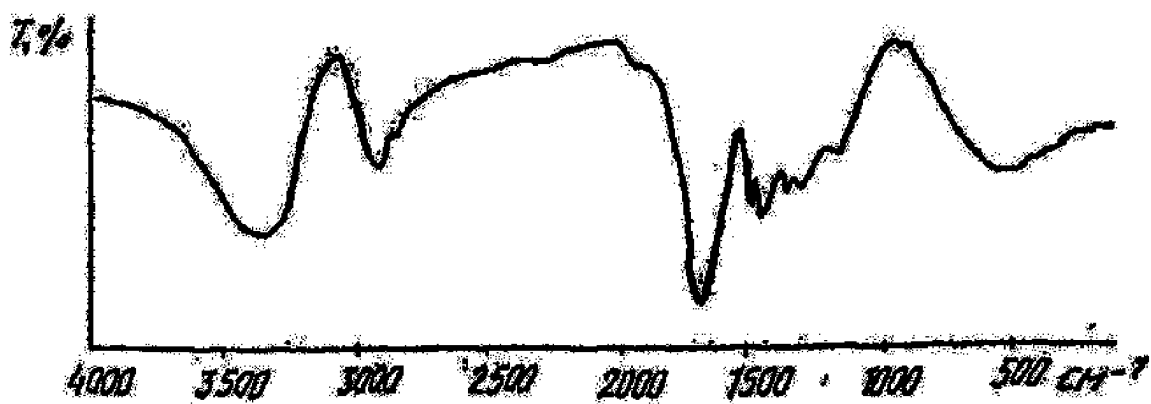
співполімеризацію проводять у три стадії: першу стадію - при температурі 20-30 °С протягом 12-24 годин, другу стадію - шляхом γ -опромінення дозою 0,4-1,0 мегарад, і третю стадію - при температурі 100-130 °С і тиску 0-1,2 атмосфер протягом 20-40 хвилин.

11. Спосіб за п. 10, який відрізняється тим, що зазначений гідрогель після першої стадії співполімеризації промивають у гарячій воді, що має температуру 70-110 °С, протягом щонайменше 3 годин, при тиску 0-1,2 атмосфер і масовому співвідношенні гідрогелю і води 1:8-10.

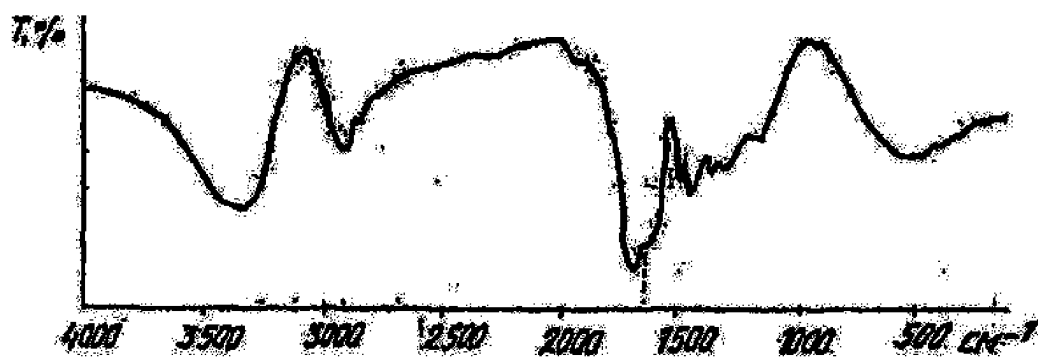
12. Спосіб за п. 10, який відрізняється тим, що як ініціатор співполімеризації беруть перекис водню і/або персульфат амонію в кількості не більше, ніж 0,33 мас. % від сумарної ваги вихідних компонентів.

13. Спосіб за п. 11, який відрізняється тим, що як водне середовище беруть бідистильовану апірогенну воду.

14. Спосіб за п. 11, який відрізняється тим, що зазначений гідрогель фасують у шприци.



a)



б)

Fig. 1



a)



b)

30 мкм

Фіг. 2

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2006, N 8, 15.08.2006. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.