



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **27283** (13) **U**  
(51) МПК (2006)  
**C12N 1/00**  
**C12N 5/00**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

**(54) ПРОЦЕС МІКРОІНКАПСУЛЯЦІЇ КЛІТИН І ТКАНИНИ ПРИЩИТОПОДІБНОЇ ЗАЛОЗИ В АЛЬГІНАТНІ МІКРОКАПСУЛИ**

1

(21) u200706398

(22) 08.06.2007

(24) 25.10.2007

(72) ПАСТЕР ІГОР ПЕТРОВИЧ, UA, ТРОНЬКО  
МИКОЛА ДМИТРОВИЧ, UA

(73) ІНСТИТУТ ЕНДОКРИНОЛОГІЇ ТА ОБМІНУ  
РЕЧОВИН ІМ. В.П. КОМІСАРЕНКА АКАДЕМІЇ  
МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ, UA, ПАСТЕР ІГОР  
ПЕТРОВИЧ, UA, ТРОНЬКО МИКОЛА  
ДМИТРОВИЧ, UA

(56)

2

(57) Процес мікроінкапсуляції клітин і тканини прищитоподібної залози в альгінатні мікрокапсули, який включає рівномірне розподілення окремих клітин або шматочків тканини в розчині альгінату, їх полімеризацію в гелеутворюючому розчині з іонами кальцію та наступне промивання, який **відрізняється** тим, що на етапі полімеризації як механічний вплив додатково застосовують перемішування розчину з мікрокапсулами, які містять паратиреоїдні клітини або тканину, на магнітній мішалці з частотою 60-90 об/хв при температурі 37 °C.

Корисна модель відноситься до біотехнології, зокрема мікроінкапсуляції клітин і тканини прищитоподібної залози в альгінатні мікрокапсули.

Мікроінкапсуляція клітин і тканини прищитоподібної залози ефективно захищає їх від реакції відторгнення при трансплантації реципієнту з сталим гіпаратиреозом та дозволяє тривало функціонувати в умовах *in vivo*.

Відомі способи мікроінкапсуляції клітин і тканини прищитоподібної залози в альгінатні мікрокапсули наступним чином: пропусканням водного розчину альгінату (2%) з шматочками тканини прищитоподібної залози розміром до 1 мм через канюлю з внутрішнім діаметром 1,2 мм за допомогою перфузійного насоса з швидкістю 0,5 мл/хв разом з одночасною подачею повітря в канюлю через концентрично розташоване сопло з наступною інкубацією капсул в розчині хлорида барію (10 ммоль/л) протягом 30 секунд та промиванням звичайним сольовим розчином [Hasse C, Schrezenmeir J., Stinner B. et al. Successful allotransplantation of microencapsulated parathyroids in rats // World J. Surg. - 1994. - Vol.18, N4. - P.630-634]; пропусканням водного розчину альгінату (1,3%) з суспензією епітеліальних клітин прищитоподібної залози людини концентрацією  $5 \times 10^5$  клітин/мл шляхом видавлювання насосом через шприц з наступною інкубацією сформованих сферичних мікрокапсул в 1,1%-ному розчині хлорида кальцію; послідовним промиванням

мікрокапсул 0,1%-ним розчином 2-N-циклогексиламіноетан сульфонові кислоти і 0,85%-ним розчином хлорида натрію з наступним покриттям мікрокапсул 0,05%-ним розчином полі-L-лізину; повторним промиванням капсул 0,1%-ним розчином 2-N-циклогексиламіноетан сульфонові кислоти, 1,1%-ним розчином хлорида кальцію і 0,85%-ним розчином хлорида натрію з наступною інкубацією в 0,12%-ному розчині альгіната для формування зовнішнього шару мембрани; після промивання 0,85%-ним розчином хлорида натрію мікрокапсули обробляли розчином цитрату натрію (0,05 ммоль/л) та видаляли надлишок цитрату повторним промиванням розчином хлорида натрію [Picariello L., Benvenuti S., Recenti R. et al. Microencapsulation of human parathyroid cells: an "in vitro" study // J. Surg. Res. - 2001. - Vol.96, N1. - P.81-89]; пропусканням водного розчину альгінату (2,0%) з суспензією паратиреоцитів новонароджених поросят через голку в 1,1%-ний розчин хлорида кальцію; інкубацією у 0,1%-ному розчині 2-N-циклогексиламіноетан сульфонові кислоти протягом 3 хвилин і 0,05%-ному розчині полі-L-лізину протягом 9 хвилин; наступною послідовною інкубацією в 0,9%-ному розчині хлорида натрію протягом 3 хвилин (двічі), в розчині цитрату натрію (0,055 ммоль/л) протягом 5 хвилин і в 0,9%-ному розчині хлорида натрію протягом 3 хвилин [Lin L., Song Y., Song C. et al. Successful

**UA** (19) **27283** (11) **U** (13)

xenotransplantation of microencapsulated newborn pig parathyroid cells in the treatment of hypoparathyroidism in rats // *Chin. Med. J. (Engl.)*. - 2003. - Vol.116, N8. - P.1161-1165]; пропусканням водного розчину альгінату (1,5%) з шматочками тканини прищитоподібної залози розміром приблизно 1мм через голку 18G в 1,5%-ний розчин хлориду кальцію (забуферений 2-N-циклогексиламіноетан сульфенової кислоти) для формування мікрокапсул шляхом інкубації протягом 4 хвилин при температурі 4°C; наступною інкубацією у водному розчині фоточутливого полі-L-лізину протягом 9 хвилин та промиванням буфером 2-N-циклогексиламіноетан сульфенової кислоти з наступним опроміненням ртутною лампою потужністю 400Вт протягом 4 хвилин; додатковою інкубацією мікрокапсул в 0,15%-ному розчині альгіната з метоксиполіетиленгліколем протягом 6 хвилин; промиванням буфером 2-N-циклогексиламіноетан сульфенової кислоти з наступною обробкою цитратом натрія протягом 6 хвилин для розрідження внутрішньокапсульного альгіната кальцію; остаточним промиванням капсул 2-N-циклогексиламіноетан сульфеновою кислотою [Lee C.H., Wang Y.J., Kuo S.M., Chang S.J. Microencapsulation of parathyroid tissue with photosensitive poly(L-lysine) and short chain alginate-co-MPEG // *Artif. Organs*. - 2004. - Vol.28, N6. - P.537-542].

Проте, всі ці способи мають певні недоліки, оскільки більшість з них є достатньо складними, багатоступінчастими процедурами, та не забезпечують достатньої стабільності альгінатних мікрокапсул, які містять окремі клітини або шматочки тканини прищитоподібної залози, до дії зовнішніх фізико-хімічних чинників (зокрема, впливу механічних факторів, зміни осмоляльності розчину, підвищення температури середовища тощо), а в деяких застосовують в якості гелеутворюючого катіона іони барію, які здатні пригнічувати калієві канали в мікроінкапсульованих клітинах і, як наслідок, привести до загибелі останніх [Zimmermann U., Thurmer F., Jork A. et al. A novel class of amitogenic alginate microcapsules for long-term immunoisolated transplantation // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* - 2001. - Vol.944. - P.199-215]. Крім цього, полі-L-лізин, який використовують в якості однієї з компонент багаточастинних капсул, спричинює клітинну адгезію на поверхні мікрокапсул, здатен індукувати фіброз мікрокапсул шляхом активації компліменту і продукцію макрофагами цитокінів (зокрема, інтерлейкіну-1 і фактору некрозу пухлин- $\alpha$ ), а за певних умов може викликати навіть некроз мікроінкапсульованих клітин [King A. Evaluation of alginate microcapsules for use in transplantation of islets of Langerhans. *Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine* 1072. Uppsala, 2001. 43pp.; Strand B.L., Ryan L., Veld P.I. et al. Poly-L-lysine induces fibrosis on alginate microcapsules via the induction of cytokines // *Cell Transplant.* - 2001. - Vol.10, N3. - P.263-275].

За прототип авторами взято спосіб мікроінкапсуляції острівців підшлункової залози телят в альгінатні мікрокапсули, який включає пропускання суміші острівців в 1,7-2,5%-ному розчині альгінату через генератор мікрокапсул, полімеризацію мікрокапсул в розчині хлориду кальцію (100ммоль/л) та їх промивання в розчині Кребса-Пінгера [Figliuzzi M., Plati T., Cornolti R., et al. Biocompatibility and function of microencapsulated pancreatic islets // *Acta Biomaterialia*. - 2006. - Vol.2, N2. - P.221-227].

Недоліками цього способу мікроінкапсуляції острівців підшлункової залози телят також є недостатня стабільність альгінатних мікрокапсул, які містять суспензію клітин, до дії зовнішніх фізико-хімічних чинників (зокрема, впливу механічних факторів, зміни осмоляльності розчину, підвищення температури середовища тощо).

Таким чином, вказані недоліки знижують ефективність функціонування мікроінкапсульованих в альгінатні мікрокапсули острівців підшлункової залози телят.

В основу даної корисної моделі поставлено задачу розробити такий процес мікроінкапсуляції клітин і тканини прищитоподібної залози в альгінатні мікрокапсули, в якому за рахунок підбору технологічних режимів на одному з етапів приготування підвищується механічна та осмотична стійкість альгінатних мікрокапсул, які містять паратиреоїдні клітини або тканину, до дії зовнішніх фізико-хімічних чинників (зокрема, впливу механічних факторів, зміни осмоляльності розчину, підвищення температури середовища тощо).

Поставлена задача досягається тим, що в процесі мікроінкапсуляції клітин або тканини прищитоподібної залози в альгінатні мікрокапсули, який включає рівномірне розподілення окремих клітин або шматочків тканини в розчині альгінату, їх полімеризацію в гелеутворюючому розчині з іонами кальцію та наступне промивання, згідно з даною корисною моделлю, на етапі полімеризації в якості механічного впливу додатково застосовують перемішування розчину з мікрокапсулами, які містять клітини або тканину, на магнітній мішалці з частотою 60-90об/хв при температурі 37°C.

До даного рішення автори прийшли після дослідження фізичних характеристик мікроінкапсульованої в альгінатні мікрокапсули тканини прищитоподібної залози на всіх етапах виготовлення та виявленні певної залежності стабільності мікрокапсул, які містять паратиреоїдну тканину, від додаткового механічного перемішування розчинів при оптимальній температурі. На відміну від прототипу, запропонований авторами процес підвищення стабільності мікроінкапсульованої паратиреоїдної тканини перемішуванням на магнітній мішалці з частотою 60-90об/хв при температурі 37°C дає можливість оптимізувати процедуру мікроінкапсуляції тканини прищитоподібної залози в альгінатні мікрокапсули. Даний механічний вплив є оптимальним, оскільки

сприяє кращому контакту іонів кальція з альгінатними мікрокапсулами, які містять паратиреоїдні клітини або тканину, та кращому проникненню іонів кальція через поверхню цих мікрокапсул, що дозволяє значно прискорити гелеутворюючі процеси в мікрокапсулах без їх пошкодження, а також виключає можливість утворення конгломератів. Даний температурний режим відповідає температурі людського тіла, як можливого місця трансплантації альгінатних мікрокапсул, і є оптимальним для мікроінкапсуляції клітин або тканини прищитоподібної залози, оскільки при зниженні температури уповільнюється швидкість цього процесу, а при зростанні температури збільшується ймовірність деградації біополімеру та втрати його основних фізико-хімічних властивостей (зокрема, здатності формувати гель в присутності катіонів).

Процес здійснюється наступним чином.

Попередньо готують водний розчин альгілату [Пастер І.П., Тронько М.Д. Процес приготування водного розчину альгілату, призначеного для виготовлення мікрокапсул. Патент №20265 UA, МПК C12N11/00. Опубл. 15.01.2007]. Через генератор альгінатних мікрокапсул подають: розчин альгілату (0,25%) з рівномірно розподіленими окремими клітинами або шматочками тканини прищитоподібної залози розміром до  $1\text{мм}^3$  із швидкістю 0,03мл/хв та кисень із швидкістю 6,5л/хв. Мікроінкапсульовані паратиреоїдні клітини або тканину інкубують в розчині хлориду кальцію (100ммоль/л, 290мосмоль/л, рН 7,4) при додатковому постійному перемішуванні на магнітній мішалці з частотою 60-90об/хв при температурі 37°C протягом 15-20 хвилин і тричі промиванням в розчині хлориду натрію (0,9%, 290мосмоль/л). Після мікроінкапсуляції вимірюють діаметри альгінатних мікрокапсул, які містять паратиреоїдні клітини або тканину, за допомогою світлового мікроскопа з окулярною вставкою, а також проводять оцінку цілісності, механічної та осмотичної стійкості та відбирають найбільш стабільні альгінатні мікрокапсули [Пастер І.П., Тронько М.Д. Процес визначення механічної стійкості альгінатних капсул, призначених для мікроінкапсуляції тканин або клітин. Патент №15729 UA, МПК G01N33/15, C12N5/00, A61B10/00. Опубл. 17.07.2006; Пастер І.П., Тронько М.Д. Процес визначення осмотичної стійкості альгінатних капсул, призначених для мікроінкапсуляції тканин або клітин. Патент №15730 UA, МПК G01N33/15, C12N5/00, A61B10/00. Опубл. 17.07.2006].

Приклад

Мікроінкапсуляція тканини прищитоподібної залози людини в альгінатні мікрокапсули з метою отримання стабільних мікрокапсул, які містять паратиреоїдну тканину.

Мікроінкапсуляцію тканини прищитоподібної залози людини проводять як за методом для мікроінкапсуляції острівців підшлункової залози телят [Figliuzzi M., Plati T., Comolli R., et al. Biocompatibility and function of microencapsulated pancreatic islets // Acta Biomaterialia. - 2006. - Vol.2,

N2. - P.221-227] (перший дослід), так і запропонованим методом, суть якого полягає в додатковому постійному перемішуванні на магнітній мішалці з частотою 60-90об/хв при температурі 37°C мікроінкапсульованої в альгінатні мікрокапсули паратиреоїдної тканини під час інкубації в розчині хлориду кальцію (100ммоль/л, 290мосмоль/л, рН 7,4) протягом 15-20 хвилин на етапі полімеризації (другий дослід). Після мікроінкапсуляції вимірюють діаметри альгінатних мікрокапсул, які містять тканину прищитоподібної залози, за допомогою світлового мікроскопа з окулярною вставкою, а також проводять оцінку цілісності, механічної та осмотичної стійкості та відбирають найбільш стабільні альгінатні мікрокапсули [Пастер І.П., Тронько М.Д. Процес визначення механічної стійкості альгінатних капсул, призначених для мікроінкапсуляції тканин або клітин. Патент №15729 UA, МПК G01N33/15, C12N5/00, A61B10/00. Опубл. 17.07.2006; Пастер І.П., Тронько М.Д. Процес визначення осмотичної стійкості альгінатних капсул, призначених для мікроінкапсуляції тканин або клітин. Патент №15730 UA, МПК G01N33/15, C12N5/00, A61B10/00. Опубл. 17.07.2006].

Результати визначення механічної стійкості альгінатних мікрокапсул, які містять клітини або тканину, показали, що 24-годинна інкубація призводить до збільшення розмірів мікрокапсул на 84% в першому досліді та 69% в другому досліді (таблиця 1). Крім цього, в першому і другому досліді реєструється відповідно 45% і 35% пошкоджених мікрокапсул. Наступна інкубація протягом додаткових 72 годин не призводить до подальших суттєвих змін розмірів мікрокапсул, які містять клітини або тканину.

NN	Показник, який досліджується	0 годин
1	Діаметр мікрокапсул (мм)	2,82±0,1
2	Інтактні мікрокапсули (%)	100,0
Другий дослід		
1	Діаметр мікрокапсул (мм)	2,84±0,0
2	Інтактні мікрокапсули (%)	100,0

Примітка. \* -  $P < 0,001$  порівняно з 0 годин інкубації.

За результатами проведених досліджень механічної стійкості можна зробити висновок, що в першому дослідженні альгінатні мікрокапсули, які містять клітини, були механічно менш стійкі ніж альгінатні мікрокапсули в другому дослідженні. Для подальшого використання рекомендовані альгінатні мікрокапсули, які містять клітини або тканину, з другого досліді.

Результати визначення осмотичної стійкості показали, що в першому дослідженні 24-годинна інкубація альгінатних мікрокапсул, які містять клітини або тканину, в розчині хлориду натрію з осмоляльністю 300мосмоль/л в термостаті при температурі 37°C не призводить до пошкодження

мікрокапсул і значного зростання їх розмірів (таблиця 2). При 24-годинній інкубації в розчинах хлориду натрію з осмоляльністю 200, 100 і 0 мосмоль/л розміри мікрокапсул, які містять клітини або тканину, зростають на 78%, 128% і 178% відповідно, а частка пошкоджених мікрокапсул становить відповідно 15, 20% і 30%. Наступна інкубація протягом додаткових 72 годин не призводить до подальших суттєвих змін цілісності та розмірів мікрокапсул.

Таблиця 2

NN	Осмоляльність розчину, мосмоль/л	Розміри альгінатних мікрокапсул залежно від часу інкубації (мм)		
		0 годин	24 години	96 годин
Перший дослід				
1	300	2,85±0,08	3,58±0,10*	3,76±0,11*
2	200	2,85±0,09	5,06±0,14*	5,56±0,11*
3	100	2,86±0,09	6,52±0,25 *	7,01±0,17*
4	0	2,84±0,05	7,89±0,33 *	8,38±0,38*
Другий дослід				
1	300	2,86±0,05	3,28±0,08**	3,43±0,09 *
2	200	2,84±0,07	4,30±0,09 *	4,66±0,15*
3	100	2,87±0,05	5,52±0,14*	5,83±0,17*
4	0	2,85±0,09	6,70±0,25 *	6,92±0,31*

Примітка. \* -  $P < 0,001$  і \*\* -  $P < 0,05$  порівняно з 0 годин інкубації.

Результати другого дослідження показали, що 24-годинна інкубація альгінатних мікрокапсул, які містять клітини або тканину, в розчинах хлориду натрію призводить до вірогідного зростання розмірів мікрокапсул на 51-135% при осмоляльності розчинів від 0 до 200 мосмоль/л. В подальшому розміри мікрокапсул, які містять клітини або тканину, залишаються без суттєвих змін. При умовах інкубації, які розроблені в даній корисній моделі, частка пошкоджених мікрокапсул, які містять клітини або тканину, становить в другому дослідженні відповідно 5, 15% і 20%.

За результатами проведених досліджень осмотичної стійкості можна зробити висновок, що в першому дослідженні альгінатні мікрокапсули, які містять клітини або тканину, були осмотично не стійкі, на відміну від альгінатних мікрокапсул в другому дослідженні, які можна охарактеризувати як осмотично стійкі. Для подальшого використання рекомендовані альгінатні мікрокапсули, які містять клітини або тканину, з другого дослідження. Дослідження достатньо проводити після 24 годин інкубації, оскільки в подальшому суттєвих змін досліджуваних показників не відбувається.

Таким чином, запропонований авторами процес мікроінкапсуляції клітин або тканин прищитоподібної залози в альгінатні мікрокапсули дозволяє підвищити механічну і осмотичну стійкість альгінатних мікрокапсул, які містять паратиреоїдні клітини або тканину, та досягти максимального ефекту мікроінкапсуляції тканин або клітин.