(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202293102 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.22

(22) Дата подачи заявки
2021.04.28

(51) Int. Cl. ***A61F 2/02*** (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61L 27/34 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)

(54) КОНФОРМНОЕ ПОКРЫТИЕ КЛЕТОК ДЛЯ ИММУНОИЗОЛЯЦИИ

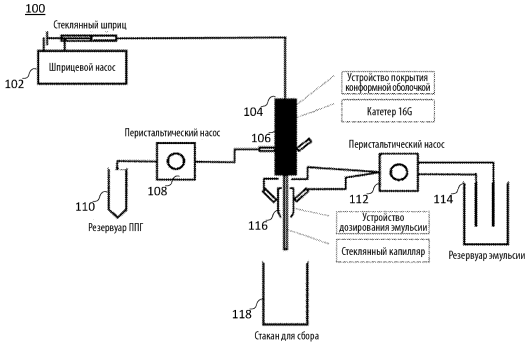
(31) **63/016,787**
(32) **2020.04.28**
(33) **US**
(86) **PCT/US2021/029744**
(87) **WO 2021/222469 2021.11.04**

(71) Заявитель:
ЮНИВЕРСИТИ ОФ МАЙАМИ (US)

(72) Изобретатель:
Томеи Элис А., Сток Аарон, Лапп Майкл (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Описаны гидродинамические способы конформного покрытия неоднородных по размеру клеток и кластеров клеток биоматериалами для имплантации, таким образом предотвращая иммунное отторжение или воспаление, или аутоиммунное разрушение, сохраняя при этом клеточную функциональность. Также описаны реактивы, устройство и способы конформного покрытия клеток и кластеров клеток биосовместимыми, механически и химически стабильными гидрогелями, имеющими поры размера, соответствующего необходимому порогу отсечения.



202293102 A1

202293102 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-576355EA/025

КОНФОРМНОЕ ПОКРЫТИЕ КЛЕТОК ДЛЯ ИММУНОИЗОЛЯЦИИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет относительно предварительной заявки на патент США № 63/016787, поданной 28 апреля 2020 года, содержание которой настоящим включено в данный документ посредством ссылки во всей полноте.

[0002] Данная заявка связана с заявкой на патент США № 15/478320, поданной 4 апреля 2017 года, которая ныне является патентом США № 10653816, который является выделенной заявкой, испрашивающей приоритет относительно заявки на патент США № 14/114690, поданной 12 февраля 2014 года, которая ныне является патентом США № 10660987, который согласно §371 Раздела 35 Кодекса Законов США является заявкой национального этапа международной заявки на патент № PCT/US2012/035696, поданной 28 апреля 2012 года, которая испрашивает приоритет относительно предварительной заявки на патент США № 61/480513, поданной 29 апреля 2011 года, содержание каждой из данных заявок настоящим включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте.

ЗАЯВЛЕНИЕ О СПОНСИРОВАНИИ ИССЛЕДОВАНИЯ ФЕДЕРАЛЬНЫМ ПРАВИТЕЛЬСТВОМ США

[0003] Данное изобретение поддерживалось грантом № R01 DK109929 от Национальных институтов здоровья США. Правительство США имеет определенные права на данное изобретение.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0004] Данное изобретение относится к области трансплантации клеток и предоставляет реактивы и способы для облегчения трансплантации клеток человеку или животному с минимальными иммунологическими реакциями или минимальным отторжением трансплантата. Более конкретно, в данном изобретении представлены биоматериалы, включительно с клетками для трансплантации, на которые нанесли конформное покрытие при нейтральном pH смесью для покрытия, которая минимально влияет на жизнеспособность, метаболизм или биологическую активность таких клеток или других биоматериалов, и реактивы, устройство и способы для получения и применения указанных биоматериалов, на которые нанесено конформное покрытие и, в частности, указанных клеток. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения покрытые конформным покрытием клетки и (или) кластеры клеток содержат клетки, продуцирующие инсулин (например, островки Лангерганса, содержащие бета-клетки), дифференцированные из стволовых клеток или выделенные из поджелудочной железы животного, более конкретно - млекопитающего и наиболее конкретно - человека. В частности, в данном документе представлены способы применения биоматериалов, в частности - клеток и (или) кластеров клеток, полученных с использованием указанных реактивов и устройства, и указанными способами.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0005] Инкапсулирование клеток является многообещающей стратегией иммуноизоляции отдельных клеток и кластеров клеток, и, следовательно, предотвращения любого иммунного ответа, который мог бы поставить под угрозу функциональность данных клеток после имплантации. Биоинкапсулирование широко использовалось в новых терапевтических испытаниях в областях сахарного диабета, гемофилии, онкологических заболеваний и почечной недостаточности. Однако большинство испытаний не были полностью успешными по целому ряду причин:

• недостаточная воспроизводимость способов инкапсулирования и выделения клеток;

• отсутствие подходящих материалов для инкапсулирования, которые должны быть биосовместимыми, механически и химически стабильными и иметь поры размера, соответствующего необходимому порогу отсечения, позволяющие питательным веществам и побочным продуктам поступать в капсулу и выходить из нее, защищая инкапсулированный биоматериал от воздействий иммунной системы;

• производство капсул с неоднородным или неконформным покрытием (что влияет на (i) диффузию кислорода и питательных веществ через капсулу, и (ii) секрецию клетками биоактивных молекул и, следовательно, жизнеспособность инкапсулированных клеток, функциональность в качестве средства доставки терапевтических молекул и общий объем инкапсулированного трансплантата);

• неспособность увеличить масштабы процесса инкапсулирования от исследований на мелких животных до доклинических исследований на нечеловекообразных приматах; и

• выбор для трансплантации неблагоприятных участков тела.

[0006] Такие проблемы, связанные с технологией инкапсулирования, можно рассматривать в контексте работы в одной из наиболее перспективных терапевтических областей для инкапсулирования клеток - в области сахарного диабета.

[0007] Сахарный диабет возникает в результате аутоиммунного разрушения бета-клеток поджелудочной железы - одного из нескольких типов клеток, составляющих островки Лангерганса. В течение своей жизни пациенты с сахарным диабетом должны часто контролировать уровень глюкозы в крови и вводить инсулин, когда у них возникает гипергликемия, что имеет множество неблагоприятных эффектов, включая субоптимальный контроль метаболизма, более высокий риск гипогликемии и снижение качества жизни. Аллотрансплантация островков является чрезвычайно перспективным видом терапии для лечения пациентов с сахарным диабетом, но требует пожизненной системной иммуносупрессии, чтобы избежать отторжения аллотрансплантата. См. работы Robertson, 2010, Endocrinol Metab Clin North Am 39, 655-667; Herring et al., 2016, Diabetes Care 39: 1230-1240; Shapiro et al., 2017, Nat. Rev. Endocrinol. 13: 268-277; Pepper et al., 2018, Curr. Opin Organ Transplant. 23: 428-439; LaBlanche et al., 2018, Lancet Diabetes Endocrinol. 6: 527-537; Foster et al., 2018, Diabetes Care 41: 1001-1008; Rickels & Robertson, 2019, Endocrin. Rev. 40: 631-668.

[0008] Чтобы избежать введения иммуносупрессивных лекарственных препаратов

на системном уровне, аллотрансплантаты островков можно защитить от иммунных реакций путем покрытия трансплантируемых клеток полупроницаемой полимерной капсулой, которая обеспечивает диффузию кислорода, глюкозы и инсулина, предотвращая при этом межклеточный контакт и диффузию цитотоксических молекул, которые в противном случае вызвали бы иммунный ответ против данного трансплантата и его полное отторжение хозяином (de Vos et al., 2010, Adv Exp Med Biol 670, 38-53; Desai & Shea, 2017, Nat Rev Drug Discov 16: 338-350; Vairhilingham et al., 2017, Rev Diabetes Stud 14: 51-78; Krosgren, 2017, Diabetes 66: 1748-1754; Smink et al., 2018, Am J. Tranplant 18: 2113-2118). Островки имеют неоднородный размер, который варьирует от около 50 до 300 мкм в диаметре. Большинство процедур нанесения покрытия, известных в данной области техники, не допускают конформного покрытия островков; диаметр капсулы, как правило, постоянен и не зависит от размера островка, и, следовательно, обычно превышает 300 мкм, чтобы гарантировать покрытие более крупных островков (Teramura & Iwata, 2010, Adv Drug Deliv Rev 62, 827-840). Вследствие избытка бесклеточного материала покрытия общий объем островкового имплантата значительно увеличивается, так что единственным подходящим по размеру участком для трансплантации является плохо насыщаемая кислородом брюшная полость, что способствует гипоксии инкапсулированных клеток. Кроме того, толщина капсулы увеличивает диффузионный барьер для кислорода через данное покрытие, что также усугубляет гипоксию клеток и задерживает восприятие глюкозы и, следовательно, реакцию секреции инсулина (de Groot et al., 2004, J Surg Res 121, 141-150; Buchwald et al., 2015, Biomed. Engineer. Online 14: 28; Tomei et al., 2015, Expert. Opin. Biol. Ther. 15: 1321-1326; Villa et al., 2017, Transplant. 101-1025-1035; Buchwald et al., 2018, Biotechnol. Bioeng 115; 232-245). Большинство указанных способов инкапсулирования основаны на образовании капель материала покрытия, смешанных с островками, с помощью воздушно-струйного насоса или электростатических генераторов капель (Rabanel et al., 2009, Biotechnol Prog 25, 946-963).

[0009] В отличие от способов инкапсулирования, основанных на образовании капель, конформное покрытие кластеров клеток различного диаметра было в центре внимания некоторых недавних исследований. Большинство из таких способов основаны либо на (a) послойном нанесении покрытия непосредственно на клетки (например, путем химической реакции или фотополимеризации), либо (b) полностью гидродинамической процедуре, обычно включающей в себя образование частиц путем образования эмульсии «вода в масле» или путем разрушения струи воды в масле по гидродинамическому принципу неустойчивости Рэлея - Плато (Teramura et al., Id.; Chabert & Viovy, 2008, Proc Natl Acad Sci USA 105, 3191-3196). Применяя указанные способы возможно генерировать частицы воды с постоянным диаметром, специфически зависящим от характеристик водной и масляной фаз, поверхностного натяжения между двумя указанными фазами и соотношения гидродинамических параметров двух указанных фаз (Eggleton et al., 2001, Phys Rev Lett 87, 048302; Utada et al., 2008, Phys Rev Lett 100, 014502; Loscertales et al., 2020, Science 295, 1695-1698; Cohen et al., 2001, Science 292, 265-267). В пищевой и

фармацевтической промышленности данные способы широко использовались для наноинкапсулирования водорастворимых лекарственных препаратов и других веществ (Loscertales et al., Id.), и только недавно были распространены на инкапсулирование отдельных клеток микронного размера и клеточных кластеров, с некоторым успехом, как описано ниже.

[0010] Чаберт (Chabert) с коллегами разработали микрожидкостную высокопроизводительную систему для инкапсулирования и самосортировки одиночных клеток, основанную на принципе, описанном выше (Chabert. & Viovy, Id). Однако, их система сконструирована для инкапсулирования и сортировки одиночных клеток (имеющих диаметр 40 мкм или меньше), и не может применяться к кластерам клеток из-за микроразмерности их устройства, что подвергло бы не одиночные клетки неприемлемым напряжениям сдвига.

[0011] Гарфинкел (Garfinkel) с коллегами разработали другой способ инкапсулирования островков - путем избирательного отведения водной фазы с островками из внешней масляной фазы для создания тонкого покрытия на кластерах клеток. В данном способе струйное распыление водной фазы в масляной фазе достигается путем всасывания слоя водной фазы поверх масляной фазы. В такой конструкции в зоне отведения воды создается турбулентный поток, что в конечном итоге приводит к неполному покрытию, что требует второго цикла инкапсулирования, повышая стресс, которому подвергаются клетки, и снижая производительность данного процесса (Wyman et al., 2007, Small 3, 683-690). Кроме того, полимеризация геля достигается за счет фотополимеризации, которая может поставить под угрозу долгосрочную функцию клеток с покрытием.

[0012] Хаббелл (Hubbell) и коллеги разработали подход нанесения покрытия путем химической реакции непосредственно на клеточной поверхности, при котором на поверхности островков адсорбировался фотосенсибилизатор, а обработанные фотосенсибилизатором островки суспендировали в водном растворе фотополимеризующихся макромеров (патент США № 6911227). Освещение светом суспензии островков приводило к полимеризации и сшиванию макромера с образованием конформного полимерного геля, связанного с поверхностью островков.

[0013] Хаббелл и коллеги описывают способ конформного покрытия в патенте США № 10653816, в патенте США № 10660987 и в международной публикации WO2012/149496. В приведенном примере Хаббелл и соавт. раскрывают, что водная фаза состояла из (1) многоплечевого ПЭГ (10 кДа, 8 плеч, 75-90% функционализированного ПЭГ-малеимида (ПЭГ-МАЛ) или ПЭГ-винилсульфона (ПЭГ-ВС)), избыточного количества сшивающего вещества (дитиотреитола или 2 кДа ПЭГ-дитиола при молярном соотношении 3-4 к 1) для достижения полного гелеобразования ПЭГ и агента, повышающего вязкость (например, альгината, амфифильных самособирающихся полимеров или пептидов и т. д.). Однако включение сшивающего вещества и агента, повышающего вязкость, требует, чтобы pH водной фазы поддерживался на уровне 3,5-6 (в

зависимости от конкретной композиции гидрогеля), и процесс должен выполняться в течение 15 минут, чтобы предотвратить преждевременное гелеобразование водной фазы перед нанесением покрытия, которое происходит после струйного распыления и распада водной фазы в камере инкапсулирования из-за высокой реакционной способности реакции типа Михаэля, происходящей между многоплечевым ПЭГ и тиолированными сшивающими веществами. Этот низкий уровень pH может повлиять на долгосрочную функциональность клеток. Кроме того, быстрая реакция гелеобразования, возникающая при предварительном смешивании основного полимера и сшивающего вещества, ограничивает общую производительность процесса и усложняет усилия по увеличению его масштаба. Наконец, включение агента, повышающего вязкость, может повлиять на иммуноизоляционные свойства покрытий и биосовместимость. См., например, работу Manzoli et al., Am. J. Transplant, 18 (3): 590-603 (2018).

[0014] Ввиду вышеизложенного, в данной области техники сохраняется потребность в эффективных способах нанесения конформного покрытия на клетки и кластеры клеток с высоким выходом без ущерба для функциональности клеток или биосовместимости.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0015] В данном документе представлены реактивы и способы, а также устройство для нанесения конформного покрытия, для конформного покрытия биоматериалов, в частности - клеток, и в частности - секретирующих инсулин клеток, полученных из стволовых клеток, и бета-клеток, содержащих островки Лангерганса, выделенных из позвоночных, более конкретно - млекопитающих, и в частности - людей. Биоматериалы, в частности клетки и (или) кластеры клеток, и более конкретно - островковые клетки, и (или) кластеры островковых клеток покрывают оболочкой и поддерживают при нейтральном pH (например, pH ~6 - ~7,4), как описано в данном документе. В данном документе представлены дальнейшие модификации указанных реактивов, устройства и способов относительно реактивов, устройства и способов, изложенных в родственных заявках.

[0016] Следовательно, в первом аспекте данного изобретения представлены способы конформного покрытия биоматериалов материалом покрытия, включающие в себя следующие этапы:

(a) впрыскивание водной фазы в коаксиальную масляную фазу в устройстве для нанесения покрытия, сконфигурированном таким образом, чтобы обеспечить переход от капельного распыления к струйному распылению и удлинению потока указанной водной фазы в указанной масляной фазе;

(b) добавление указанного биоматериала и указанного материала покрытия к указанной водной фазе, при этом материал покрытия из указанного этапа (b) не содержит агент, повышающий вязкость; и при этом указанная водная фаза имеет pH от около 6 до около 7,4;

(c) предоставление струе указанной водной фазы возможности распадаться на

частицы; и

(d) добавление компонента указанного материала покрытия после распада струи указанной водной фазы на частицы, при этом указанный компонент представляет собой гелеобразующую эмульсию, которая способствует или катализирует полимеризацию указанного материала покрытия; вследствие этого получается биоматериал с конформным покрытием.

[0017] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает в себя этап сбора материала, вытекающего из указанного устройства для нанесения покрытия (т. е. биоматериала с конформным покрытием и любого материала покрытия, не содержащего биоматериал).

[0018] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает в себя этап очистки указанного биоматериала с конформным покрытием и указанного материала покрытия, не содержащего биоматериал, от указанной масляной фазы.

[0019] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает в себя этап отделения указанного биоматериала с конформным покрытием от указанного материала покрытия, не содержащего биоматериал.

[0020] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения очистка биоматериала с конформным покрытием и любого материала покрытия, не содержащего биоматериал, от масляной фазы включает в себя этап (e) заливка продукта с этапа (d), изложенного в способе выше, в минеральное масло при перемешивании полученной смеси (т. е. биоматериала с конформным покрытием и любого материала покрытия, не содержащего биоматериал, масляной фазы и гелеобразующей эмульсии (содержащей раствор дитиотреитола (ДТТ), растворенный в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) и эмульгированный в полипропиленгликоле (ППГ) с 10% сорбитанмоноолеата (Span80) в минеральном масле)).

[0021] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения очистка биоматериала с конформным покрытием и материала покрытия, не содержащего биоматериал, от масляной фазы включает в себя этап (f) добавление сбалансированного солевого раствора Хэнкса (HBSS) к продукту, полученному на этапе (e) (т. е. биоматериалу с конформным покрытием и любому материалу покрытия, не содержащему биоматериал, масляное фазе и гелеобразующей эмульсии (содержащей раствор дитиотреитола (ДТТ), растворенный в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) и эмульгированный в полипропиленгликоле (ППГ) с 10% сорбитанмоноолеата (Span80) в минеральном масле), выходящим из указанного устройства, и минеральному маслу).

[0022] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, продукт с этапа (f) центрифугируют и промывают в HBSS.

[0023] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном

документе, после центрифугирования и промывки сбалансированным солевым раствором Хэнкса (HBSS) биоматериал с покрытием и любой материал, не содержащий биоматериал, инкубируют с раствором ПЭГ-дитиола.

[0024] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения агент, повышающий вязкость, который исключен из способов, описанных в данном документе, выбирают из полисахаридов, таких как альгинат, децеллюляризованных тканей, сборок наноматериалов на основе ПЭГ, гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата, декстрана, декстрансульфата, гепарина, гепаринсульфата, гепарансульфата, хитозана, геллановой камеди, ксантановой камеди, гуаровой камеди, водорастворимых производных целлюлозы, желатина, коллагена и альбумина.

[0025] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представлены способы конформного покрытия биоматериалов материалом покрытия, включающие в себя следующие этапы: (a) впрыскивание водной фазы в коаксиальную масляную фазу в устройстве для нанесения покрытия, сконфигурированном так, чтобы обеспечить переход от капельного распыления к струйному распылению и удлинению потока указанной водной фазы в указанной масляной фазе; (b) добавление указанного биоматериала и указанного материала покрытия к указанной водной фазе, при этом полимеризация указанного материала покрытия происходит после распада струи указанной водной фазы на частицы, что приводит к конформному покрытию указанного биоматериала указанным материалом покрытия; (c) добавление компонента указанного материала покрытия после распада струи указанной водной фазы на частицы, при этом указанный компонент стимулирует/катализирует полимеризацию указанного материала покрытия; (d) необязательно - сбор материала, вытекающего из указанного устройства для нанесения покрытия; e) необязательно - очистка указанного биоматериала с конформным покрытием и указанного материала покрытия, не содержащего биоматериал, от указанной масляной фазы; и (f) необязательно - отделение указанного биоматериала с конформным покрытием от указанного материала покрытия, не содержащего биоматериал.

[0026] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиэтиленоксид (ПЭО), поли(N-винилпирролидинон) (ПВП), полиэтилоксазолин, поливиниловый спирт (ПВС), полиэтилоксазолин (ПЭОК), поли(аминокислоты), их производные или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия представляет собой одно или большее число из следующего: полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиэтиленоксид (ПЭО), поли(N-винилпирролидинон) (ПВП), полиэтилоксазолин, поливиниловый спирт (ПВС), полиэтилоксазолин (ПЭОК) и (или) поли(аминокислоты). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), ПЭГ-малеимид, ПЭГ-акрилат, ПЭГ-винилсульфон, ПЭГ-тиол или их модифицированные производные, или комбинации их конкретных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), ПЭГ-малеимид, ПЭГ-акрилат

или ПЭГ-винилсульфон. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит многоплечевой полиэтиленгликоль (ПЭГ), минимально сшитый (5-50%) с ПЭГ-дитиолом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит многоплечевой полиэтиленгликоль (ПЭГ), минимально сшитый (1-30%) с ПЭГ-дитиолом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит 5-10% ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза содержит среду без сыворотки, имеющую pH около 6-7,4; или сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS), имеющий pH около 6-7,4; в частности, представлен pH водной фазы, составляющий около pH 6-7,4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза содержит среду без сыворотки, имеющую pH 6-7,4; или сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS), имеющий pH 6-7,4; в частности, представлен pH водной фазы, составляющий pH 6-7,4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза имеет pH, составляющий от около 6 до около 7,4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза имеет pH, составляющий от 6 до 7,4.

[0027] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биоматериал содержит клетки, кластеры клеток, покрытые биоматериалом клетки или кластеры клеток, субклеточные органеллы, биологические молекулы, небиологические лекарственные препараты или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биоматериал содержит одно или большее число из следующего: клетки, кластеры клеток, покрытые биоматериалом клетки или кластеры клеток, субклеточные органеллы, биологические молекулы и небиологические лекарственные препараты. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биоматериал содержит клетки или кластеры клеток, более конкретно - островковые клетки или их кластеры. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биоматериал содержит клетки или кластеры клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза содержит около 100000000 - около 200000000 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза содержит около 200000000 клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза содержит около 50000 - около 100000 кластеров клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза содержит около 100000 кластеров клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза содержит 500-750000 клеток и (или) кластеров клеток /мл, в частности - островковых клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биоматериал содержит около 100000000 - около 200000000 клеток/мл и (или) около 50000 - около 100000 кластеров клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биоматериал содержит около 100000000 - около 200000000 островковых клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения

указанный биоматериал содержит около 50000 - около 100000 островковых клеток/мл. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза содержит около 2500-250000 островковых клеток и (или) кластеров островковых клеток /мл.

[0028] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза содержит тиолированный реактив, восстанавливающий реактив, поверхностно-активное вещество или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водная фаза, используемая при реализации на практике способов данного изобретения, может необязательно содержать один или большее число тиолированных реактивов, восстанавливающий реактив и (или) поверхностно-активное вещество. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество представляет собой блок-сополимер полиоксиэтилен-полиоксипропилен или поли(этиленгликоль-bl-пропиленсульфид), более конкретно - 2% блок-сополимер полиоксиэтилен-полиоксипропилен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный тиолированный или восстанавливающий реактив представляет собой дитиотреитол (ДТТ) или ПЭГ-дитиол. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный тиолированный или восстанавливающий реактив в указанной водной фазе представляет собой 0,01-0,62% дитиотреитол (ДТТ). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный тиолированный или восстанавливающий реактив в указанной водной фазе представляет собой 0,01-3,1% ПЭГ-дитиол.

[0029] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная гелеобразующая эмульсия содержит дитиотреитол (ДТТ), растворенный в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) и эмульгированный в полипропиленгликоле (ППГ) с 10% об./об. сорбитанмоноолеатом (Span80).

[0030] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, указанная масляная фаза содержит полипропиленгликоль (ППГ). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная масляная фаза содержит полипропиленгликоль (ППГ) с 10% сорбитанмоноолеата, при этом указанная масляная фаза необязательно содержит триэтаноламин. В вариантах осуществления данного изобретения, которые включают в себя триэтаноламин, указанная масляная фаза 0,01-0,2% триэтаноламина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная масляная фаза содержит минеральное масло с вязкостью, которая по меньшей мере в 2,5 раза превышает вязкость указанной водной фазы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вязкость указанной масляной фазы составляет около 1300 кП.

[0031] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представлены способы, в которых указанный компонент материала покрытия добавляют после распада струи указанной водной фазы на частицы, гелеобразующая эмульсия представляет собой раствор дитиотреитола (ДТТ), растворенный в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) и эмульгированный в полипропиленгликоле (ППГ) с 10%

сорбитанмоноолеата (Span80).

[0032] Во втором аспекте данного изобретения представлен биоматериал, на который нанесено конформное покрытие с помощью способа, описанного в данном документе.

[0033] В третьем аспекте данного изобретения представлены способы для лечения заболевания или нарушения у пациента, включающие в себя этап имплантации указанному пациенту биоматериала с конформным покрытием, полученного с помощью способов согласно данному изобретению. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения указанное заболевание представляет собой и указанный биоматериал с конформным покрытием включает в себя клетки и кластеры клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное нарушение представляет собой сахарный диабет.

[0034] Способы, представленные в данном документе, включают в себя приведение покрытого биоматериала в контакт с эмульсией дитиотреитола (ДТТ) и сбалансированного солевого раствора Хэнкса (HBSS) в полипропиленгликоле (ППГ) после распада струи указанной водной фазы на частицы. В определенных вариантах осуществления данного изобретения устройство, полученное посредством 3D-печати, подключено к указанной камере для инкапсуляции для дозированного введения указанной гелеобразующей эмульсии коаксиально к указанному покрытому биоматериалу. В определенных вариантах осуществления данного изобретения устройство, полученное посредством 3D-печати, подключено к указанной камере для инкапсуляции для дозированного введения гелеобразующей эмульсии ДТТ/HBSS/ППГ коаксиально к указанному покрытому биоматериалу.

[0035] Способы согласно данному изобретению, обеспечивая преимущество, необязательно обеспечивают очистку покрытых биоматериалов. В таких вариантах осуществления данного изобретения очистку указанного биоматериала с конформным покрытием и указанного материала покрытия, не содержащего биоматериал, от указанной масляной фазы выполняют путем вливания продукта от продукта покрытия в минеральное масло при перемешивании. В определенных вариантах осуществления указанных этапов очистки в способе, представленном в данном документе, во время очистки минеральным маслом при перемешивании добавляют сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS), продолжая перемешивать эмульсию. В дополнительных вариантах осуществления данного изобретения после очистки минеральным маслом и сбалансированным солевым раствором Хэнкса (HBSS) указанный продукт центрифугируют и промывают HBSS. В других вариантах осуществления данного изобретения после очистки и промывки сбалансированным солевым раствором Хэнкса (HBSS) покрытые материалы инкубируют с раствором ПЭГ-дитиола.

В четвертом аспекте данного изобретения представлено устройство для нанесения конформного покрытия, включающее в себя:

(1) камеру для инкапсулирования, включающую в себя:

(a) корпусную часть, соединенную с катетером через первое входное отверстие на первом конце указанной корпусной части и соединенную с первым насосом;

(b) крепежную часть, включающую в себя первый конец, сконфигурированный для взаимодействия с внутренней поверхностью второго конца указанной корпусной части; и

(c) часть для нанесения покрытия, включающую в себя первый конец, сконфигурированный для взаимодействия с внешней поверхностью второго конца указанной крепежной части, камеру, сконфигурированную для нанесения покрытия, второй впускной канал, соединенный со вторым насосом, и второй конец указанной части для нанесения покрытия;

при этом указанный катетер, соединенный с указанным первым насосом, сконфигурирован для впрыскивания материала покрытия и биоматериала, подлежащего покрытию, в водной фазе в указанное первое входное отверстие на внутренней стороне указанной корпусной части, при этом указанная водная фаза имеет уровень pH, составляющий ровно или около 6-7,4; и при этом вводимый материал покрытия не содержит агент, повышающий вязкость;

при этом указанный второй насос сконфигурирован для впрыскивания масляной фазы, содержащей поверхностно-активное вещество, во второе входное отверстие на внешней стороне указанной части для нанесения покрытия, при этом впрыскивание указанной масляной фазы сконфигурировано для протекания коаксиально к указанной внутренней водной фазе и снаружи от нее;

(2) капилляр, соединенный с указанным вторым концом указанной части для нанесения покрытия, при этом указанный капилляр расположен ниже по потоку от точки, где поток указанной водной фазы контактирует с указанной внешней масляной фазой и удлиняется внутри нее, образуя двухфазную текучую среду, которая сконфигурирована для коаксиального протекания через указанный капилляр из указанной части для нанесения покрытия, и

(3) третий насос, соединенный с указанным капилляром и сконфигурированный для впрыскивания гелеобразующей эмульсии коаксиально к указанному капилляру, при этом указанная эмульсия содержит катализатор для полимеризации указанной водной фазы.

[0036] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный первый конец указанной части для нанесения покрытия по существу окружает указанный второй конец указанной крепежной части, образуя камеру, в которой поток указанной водной фазы контактирует с указанной масляной фазой, образуя двухфазную текучую среду.

[0037] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная камера для инкапсулирования содержит коническое отверстие, включающее в себя угол конусности выходного сопла, сконфигурированное для подачи двухфазной жидкости в указанный капилляр, и второе входное отверстие, соединенное с указанной камерой под

углом конусности.

[0038] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный первый насос представляет собой прецизионный проточный шприцевой насос.

[0039] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный второй насос представляет собой первый перистальтический насос.

[0040] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный третий насос представляет собой второй перистальтический насос.

[0041] В некоторых вариантах осуществления в данном изобретении представлено устройство для нанесения конформного покрытия, включающее в себя камеру для инкапсулирования, образованную сборкой из трех частей. Катетер, соединенный с прецизионным проточным шприцевым насосом, сконфигурирован для введения материала покрытия и биоматериала, на который наносится данное покрытие, в первое входное отверстие указанной камеры инкапсулирования (внутренняя фаза), при этом данная водная фаза имеет уровень pH, составляющий ровно или около 6-7,4. Первый перистальтический насос сконфигурирован с возможностью впрыска масляной фазы, содержащей поверхностно-активное вещество, ко второму входному отверстию указанной камеры инкапсулирования, при этом впрыск указанной масляной фазы (внешняя фаза) сконфигурирован для протекания коаксиально к указанной внутренней водной фазе. Капилляр, соединенный с концом указанной камеры для инкапсулирования, при этом указанный капилляр находится ниже по потоку от точки, где поток указанной внутренней водной фазы удлиняется внутри указанной внешней масляной фазы (двухфазная жидкость) так, что указанная двухфазная жидкость сконфигурирована для протекания в указанный капилляр из указанной камеры для инкапсулирования, и при этом указанная внутренняя водная фаза (содержащая материал покрытия и биоматериал, на который наносится покрытие) и указанная внешняя масляная фаза сконфигурированы для коаксиального протекания через указанный капилляр. Указанное устройство дополнительно содержит второй перистальтический насос, сконфигурированный для впрыскивания гелеобразующей эмульсии коаксиального к указанному капилляру, при этом указанная эмульсия содержит катализатор для полимеризации указанного материала покрытия, при этом указанная эмульсия сконфигурирована для коаксиального контакта с указанным материалом покрытия и указанным биоматериалом, на который наносится покрытие. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство для нанесения конформного покрытия дополнительно содержит выпускное отверстие для выпуска воздуха из указанного устройства. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство для нанесения конформного покрытия может дополнительно содержать выпускное отверстие для выпуска воздуха из указанного устройства. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное выпускное отверстие для выпуска воздуха расположено до входа для водной фазы в указанное устройство. Указанное выпускное отверстие для выпуска воздуха закрыто во время процесса нанесения покрытия.

[0042] Эти и другие особенности и преимущества данного изобретения будут более полно поняты из нижеследующего подробного описания вместе с прилагаемой формулой данного изобретения. Следует отметить, что объем формулы данного изобретения определяется содержащимися в ней положениями, а не конкретным обсуждением признаков и преимуществ, изложенным в данном документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0043] Данный патент или заявка на патент содержит по меньшей мере одно цветное изображение. Копии данного патента или данной патентной публикации с цветным (-и) изображением (-ями) будут предоставлены уполномоченной патентной организацией после запроса и уплаты необходимых сборов.

[0044] Фиг. 1. Схематическое изображение модификации конформного покрытия, позволяющей исключить усилители вязкости (альгинат, матригель или амфифильные самособирающиеся пептиды) для улучшения биосовместимости гелей конформного покрытия (КП) и обеспечения возможности инкапсулирования при физиологическом pH для максимизации функциональности островков от нечеловекообразных приматов (НЧП). Как представлено в заявках предшествующего уровня техники (здесь и далее по тексту - «способ с низким pH»), водная фаза состоит из многоплечевого ПЭГ, сшивающего вещества (ПЭГ-дитиола или дитиотреитола, ДТТ) и усилителей вязкости при pH меньше чем 6 для предотвращения сшивания ПЭГ и образования геля до образования капсул (вниз по потоку после распада струи водной фазы). Способы, представленных в данном документе, выполняются при физиологическом pH, при этом водная фаза состоит только из многоплечевого ПЭГ, который сшит на 1-30% с ПЭГ-SH для достижения оптимальной вязкости при физиологическом pH (7,4). Сшивание ПЭГ на 100% и гелеобразование достигаются после образования капсул, при этом эмульсия ДТТ в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (ДТТ/HBSS) и полипропиленгликоля (ППГ) подается вниз по потоку после распада струи водной фазы и коаксиально выходному потоку данного устройства. Очистка достигается путем разбавления легким минеральным маслом и HBSS при перемешивании и центрифугировании, а не путем экстракции органическими растворителями, такими как гексан, как в заявках предшествующего уровня техники. Следовательно, инновация основана на (i) составе водной фазы, содержащей только островки и чистый ПЭГ без каких-либо добавок, (ii) введении сшивающего ПЭГ вещества после образования капсулы путем дозированного введения гелеобразующей эмульсии с помощью устройства, (iii) способе очистки капсулы, который не включает в себя органические растворители.

[0045] Фиг. 1A. Схематическое изображение представленной в данном документе установки для нанесения конформного покрытия, включающей в себя устройство для нанесения конформного покрытия и устройство для дозированного введения гелеобразующей эмульсии. Указанное устройство для нанесения конформного покрытия получается путем сборки трех разных деталей: Панели (ii), (iii) и (iv) представляют собой иллюстрации трех основных компонентов одной версии устройства для нанесения

конформного покрытия, используемого с внутривенным катетером 16G, для нанесения покрытия на кластеры клеток размером 50-250 мкм. Данные три части собраны и свинчены вместе со стеклянным капилляром для образования полного устройства. На панели (v) указаны критические конструктивные компоненты внутренней камеры устройства для нанесения конформного покрытия и относительные показатели, необходимые для достижения условий текучести, которые позволяют формировать покрытия, которые являются конформными, вокруг кластеров клеток. В таблице указаны данные относительные показатели и конкретные показатели, используемые с внутривенным катетером 16G, для нанесения покрытия на кластеры клеток размером 50-250 мкм.

[0046] Фиг. 1B. Фотография представленного в данном документе устройства для нанесения конформного покрытия.

[0047] Фиг. 1C. Иллюстративное изображение выполненной посредством 3D-печати детали, представленной в данной документе, для дозированного введения гелеобразующей эмульсии.

[0048] Фиг. 2. Оценка покрытых конформным покрытием (КП) островков от нечеловекообразных приматов (НЧП) in vitro и in vivo. На НЧП-островки от яванских макак наносили конформное покрытие (КП) гидрогелями ПЭГ/ПЭГ-дитиол (ПЭГ-SH) / пептид согласно способу с низким pH. На панели A показаны изображения, полученные способом фазово-контрастной микроскопии, островков КП НЧП, на которых видно, что крупные островки имели очень тонкие и потенциально неполные покрытия. Панель B: Функциональность малых (< 200 мкм) и больших (> 200 мкм) островков от НЧП без покрытия (БП) и с конформным покрытием (КП) на основании статической стимулированной глюкозой секреции инсулина (СГСИ), на основании последовательной стимуляции глюкозой в концентрации 2,2 мМ (1 час, L1), 16,7 мМ (1 час, H), 2,2 мМ (1 час, L2) и 25 мМ KCl (1 час); продемонстрирована более высокая функциональность малых островков (стрелки), но сниженная секреция инсулина островками КП НЧП по сравнению с островками без покрытия. Функциональность оценивали по секретируемому инсулину (слева), индексу СГСИ (соотношение секреции инсулина при стимуляции глюкозой в концентрации 16,7 мМ и в концентрации 2,2 мМ: H, разделенный на L1) и разности СГСИ (разность между секрецией инсулина при стимуляции глюкозой в концентрации 16,7 мМ и в концентрации 2,2 мМ: H минус L1). Панель C: Функциональность островков КП НЧП на основании динамической стимулированной глюкозой секреции инсулина (перифузия); продемонстрировано снижение секреции инсулина для островков КП НЧП по сравнению с островками без покрытия, но индекс стимуляции составил 2,6, что указывает на функциональность. Панели D-G: Функциональность островков КП НЧП in vivo по сравнению с островками без покрытия после трансплантации 2000 или 4000 эквивалентов островковых клеток (ЭОК) / мышь в эпидидимальную жировую ткань (ЭЖТ) или почечную капсулу (ПК) мышей NSG с диабетом или мышей NODscid на основании глюкозы в крови (панели D, F, G) и

случайного С-пептида человека в сыворотке крови через 7 суток после трансплантации островков (панель Е). Показаны данные от трех независимых островков НЧП: партия № 1 (панели D, E); партия № 2 (панель F); партия № 3 (панель G).

[0049] Фиг. 3. Влияние pH раствора для покрытия на жизнеспособность секретирующих инсулин островков поджелудочной железы (ядра, цитоплазма живых клеток и ядра мертвых клеток были окрашены согласно анализу на живые/мертвые клетки); продемонстрировано снижение жизнеспособности при снижении pH.

[0050] Фиг. 4. Оценка островков КП НЧП (способ с низким pH, гидрогели ПЭГ/ПЭГ-SH/пептид) в сальниковой сумке НЧП с сахарным диабетом. На панели А показана возможность лапароскопической процедуры иммобилизации островков КП НЧП на сальниковой поверхности яванской макаки с использованием биологических каркасов. На панели В показана потребность в экзогенном инсулине (ПЭИ, пунктирная линия), уровень глюкозы в крови (точки) и С-пептид реципиента островков КП НЧП, демонстрирующие минимальную функцию островков КП НЧП. На панелях С и D показана гистологическая оценка эксплантированных сальниковых трансплантатов КП НЧП, проанализированных на выживаемость островков (инсулин) и иммуноизоляцию капсулы от Т-клеток (CD3, зеленая метка) (панель D; стрелки указывают на окрашивание в отношении инсулина (красная метка)) и на биосовместимость (панель С, стрелки указывают на многоядерные гигантоциты). Воспалительная реакция на капсулу в сальниковом участке НЧП была обширной, хронической и активной.

[0051] Фиг. 5. Оценка in vitro и in vivo представленного в данном документе способа нанесения конформного покрытия (чистый ПЭГ и физиологический pH) с островками человека. Качество покрытия оценивали с помощью фазово-контрастной микроскопии (панель А); жизнеспособность покрытых островков - с помощью окрашивания живых/мертвых клеток и конфокальной микроскопии (панель В); функцию in vitro - на основании статической (панели С, Е) и динамической (перифузия, панели D, F) стимулированной глюкозой секреции инсулина островками от трех разных доноров и двух партий инкапсулирования (партия № 1: С, D; партия № 2: Е, F); функцию in vivo - путем мониторинга уровня глюкозы в крови (панель G), оценки глюкозотолерантности при внутрибрюшинном анализе на глюкозу (панель Н) и стимулированного С-пептида человека (панель I) после трансплантации 4000 ЭОК/мышь островков человека без покрытия или с КП в жировую подушку иммунодефицитных мышей NSG (NOD scid гамма) с сахарным диабетом.

[0052] Фиг. 6. Трансплантация КП-островков человека с использованием способа с физиологическим pH, представленного в данном документе, в сальниковую сумку диабетических НЧП-островков с ко-стимулирующей блокадой.

(Панель А) Осуществимость процедуры лапаротомии для имплантации островков КП НЧП в сальниковую сумку яванской макаки с сахарным диабетом. (Панель В, фиг. 6С) Потребность в экзогенном инсулине (ПЭИ, сплошная линия), уровень глюкозы в крови (точки), С-пептид и сводная таблица (панель С) для реципиента островков КП НЧП,

демонстрирующая минимальную функцию трансплантированных КП-островков человека при снижении уровней глюкозы в крови. (Панель D, панель E, панель F) Гистологическая оценка эксплантированных трансплантатов КП НЧП, проанализированных с помощью окрашивания гематоксилином-эозином, на предмет биосовместимости (панели D, E) и реваскуляризации трансплантата (панель E, CD31: кровеносные сосуды; окрашивание против SMA: фиброз и (или) зрелость кровеносных сосудов). Воспалительная реакция на капсулу в сальниковой сумке НЧП была хронической и активной, но умеренной.

[0053] Фиг. 7. Трансплантация сингенных островков от крысы линии Льюис (Lewis) в сальник иммунокомпетентной крысы линии Льюис с сахарным диабетом. Панель A: Глюкоза крови реципиентов островков от крысы линии Льюис без покрытия (сплошная линия, точечные маркеры) и с конформным покрытием (пунктирная линия, квадратные маркеры). (Панель B) Послеоперационные сутки (ПОС) 30: внутрибрюшинный тест на глюкозотолерантность (ВБТГТ) у реципиентов островков от крысы линии Льюис без покрытия (сплошная линия, точечные маркеры) и с конформным покрытием (пунктирная линия, квадратные маркеры), и (панель C) площади под кривыми ВБТГТ. (Панель D) Уровни C-пептида натощак и после стимуляции при ВБТГТ у реципиентов островков от крысы линии Льюис без покрытия (сплошная линия, точечные маркеры) и с конформным покрытием (пунктирная линия, квадратные маркеры). Статистический анализ подтверждает функциональность сингенных трансплантатов КП-островков крысы in vivo, сопоставимую с таковой для трансплантатов без покрытия, в сальнике крысы.

[0054] Фиг. 8. Трансплантация аллогенных кластеров клеток инсулиномы MIN6 мышам NOD со спонтанным сахарным диабетом. (Панель A) Изображения, полученные способом фазово-контрастной микроскопии, кластеров MIN6 без покрытия (верхний ряд) и с конформным покрытием (средний и нижний ряды). (Панель B) Изображения, полученные способом конфокальной микроскопии, кластеров MIN6 с конформным покрытием, при окрашивании против ПЭГ и со смежными ортогональными проекциями, показывающими полноту капсулы в трех измерениях. (Панель C) Смертность реципиентов кластеров MIN6 без покрытия (сплошная линия, точечные маркеры) и с конформным покрытием (пунктирная линия, квадратные маркеры), демонстрирующая улучшенную выживаемость кластеров КП. (Панель D) Уровни случайного C-пептида не натощак у реципиентов кластеров MIN6 без покрытия и с конформным покрытием, демонстрирующие персистенцию C-пептида в кластерах КП, но не в кластерах без покрытия. (Панель E) Гистологическая оценка эксплантированных трансплантатов кластеров КП MIN6, проанализированных с помощью окрашивания гематоксилином-эозином, на выживаемость клеточных кластеров внутри капсул КП и оценка биосовместимости, демонстрирующая, что капсулы КП обеспечивают иммуноизоляцию аллогенных кластеров клеток при наличии как аллорезекции, так и аутоиммунитета.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения и общие методики

[0055] Если в данном документе не определено иное, научные и технические термины, употребляемые в данной заявке, имеют значения, которые обычно понимаются рядовыми специалистами в данной области техники. В целом, номенклатура, употребляемая в связи с культурой клеток и тканей, молекулярной биологией, биохимией, иммунологией, микробиологией, генетикой и смежными областями, как описано в данном документе, и их способы находятся в пределах данного уровня техники. В случае противоречий данное описание патента, включая определения, будет иметь решающее значение.

[0056] Данная заявка ссылается на различные выданные патенты, опубликованные патентные заявки, статьи в научных журналах и другие публикации, все из которых включены в данный документ посредством ссылки. В случае конфликта между какой-либо из ссылок, включенных в данный документ, и данным описанием, действуют положения данного описания. В дополнение к этому, любой конкретный вариант осуществления данного изобретения, который относится к предшествующему уровню техники, может быть явно исключен из любого одного или большего числа пунктов формулы данного изобретения. Поскольку такие варианты осуществления считаются известными специалисту в данной области техники, они могут быть исключены, даже если исключение не указано в данном документе явным образом. Любой конкретный вариант осуществления данного изобретения может быть исключен из любого пункта формулы данного изобретения по любой причине, независимо от того, связан он с существованием предшествующего уровня техники или нет.

[0057] Термин «в данном документе» означает всю данную заявку.

[0058] Следует понимать, что любые из вариантов осуществления данного изобретения, описанные в данном документе, включительно с теми, которые описаны в различных аспектах данного описания и различных частях данного документа (включительно с вариантами осуществления данного изобретения, описанными только в примерах), могут комбинироваться с одним или большим числом других вариантов осуществления данного изобретения, кроме случаев, когда явно оговорено иное или это является недопустимым. Комбинации вариантов осуществления данного изобретения не ограничены теми конкретными комбинациями, которые заявлены в многочисленных зависимых пунктах формулы данного изобретения.

[0059] Кроме того, данное изобретение охватывает все варианты, комбинации и перестановки, в которых одно или большее число ограничений, элементов, оговорок и описательных терминов из одного или большего числа перечисленных пунктов формулы данного изобретения вводится в другой пункт формулы данного изобретения. Например, любой пункт формулы данного изобретения, который зависит от другого пункта формулы данного изобретения, может быть изменен, чтобы включить в себя одно или большее число ограничений, обнаруживаемых в любом другом пункте формулы данного изобретения, который зависит от того же базового пункта формулы данного изобретения. Когда элементы представлены в виде перечней, например, в формате группы Маркуша,

также раскрывается каждая подгруппа элементов, и любой (-ые) элемент (-ы) может (могут) быть удален (-ы) из данной группы.

[0060] По всему тексту данного описания и вариантов осуществления данного изобретения фраза «включать в себя» или ее варианты, такие как «включает (-ют) в себя» или «включающий (-ая, -ее, -ие) в себя», следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа (или компонентов) или группы целых чисел (или компонентов), но не исключение любого другого целого числа (или компонентов) или группы целых чисел (или компонентов).

[0061] По всему тексту данного документа, когда композиции или устройства описаны как имеющие, содержащие, включающие в себя или охватывающие собой (или употребляются варианты данных формулировок) конкретные компоненты, предполагается, что такие композиции также могут состоять по существу из, или состоять из, указанных компонентов. Подобным образом, когда способы или процессы описаны как имеющие, содержащие, включающие в себя или охватывающие собой конкретные этапы процесса, такие процессы также могут состоять по существу из, или состоять из, перечисленных этапов процесса. Кроме того, следует понимать, что порядок этапов или порядок выполнения определенных действий не имеет значения до тех пор, пока композиции, устройства и способы, описанные в данном документе, остаются работоспособными. Более того, два или большее число этапов или действий могут выполняться одновременно. В целях простоты такие варианты осуществления данного изобретения не были конкретно дословно изложены в данном документе.

[0062] Термин «включая» употребляется для обозначения «включая, но не ограничиваясь». «Включая» и «включая, но не ограничиваясь» употребляются взаимозаменяемо. Следовательно, данные термины следует понимать как подразумевающие включение указанного целого числа (или компонентов) или группы целых чисел (или компонентов), но не исключение любого другого целого числа (или компонентов) или группы целых чисел (или компонентов).

[0063] При употреблении в контексте данного документа «около» или «приблизительно» означает «в пределах допустимого диапазона погрешностей» для конкретного значения, определенного рядовым специалистам в данной области техники, который будет частично зависеть от того, как измеряется или определяется данное значение, т. е. от ограничений измерительной системы.

[0064] При употреблении в контексте данного документа формы единственного числа (особенно в контексте пунктов формулы данного изобретения, указанных ниже) включают в себя ссылку как на единственное число, так и на множественное число, если контекст явно не указывает на иное или это явно не противоречит контексту.

[0065] При употреблении в контексте данного документа термин «или» следует понимать как означающий «и (или)», если контекст явно не указывает на иное.

[0066] Любой (-ые) пример (-ы), следующий (-е) за термином «например» или «в качестве примера», не предназначен быть исчерпывающим или ограничивающим.

[0067] Приведенные в данном документе диапазоны значений предназначены только для того, чтобы служить сокращенным способом индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в данный диапазон, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение включено в данный документ, как если бы оно было указано в данном документе индивидуально. Все способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если в данном документе не указано иное или иное явно не противоречит контексту. Употребление в контексте данного документа любых без исключения примеров или иллюстративных формулировок (например, «такой, как») предназначено только для лучшего освещения вариантов осуществления данного изобретения и не налагает ограничения на объем формулы данного изобретения, если не указано иное. Ни одна из языковых формулировок в данном документе не должна истолковываться как указывающая на какой-либо не заявленный элемент как на существенный.

[0068] При употреблении в контексте данного документа термин «конформное покрытие» или его вариации, такие как «с нанесенным конформным покрытием» и «покрытые конформным покрытием» относится к равномерному слою материала покрытия (например, как правило, толщиной вплоть до около 100 микрон), который окружает внешнюю поверхность биоматериала и соответствует его форме и размеру. Конформное покрытие является относительно монодисперсным и не зависит от размера биоматериала. Конформное покрытие имеет фиксированную и постоянную толщину. Это не похоже на традиционное микроинкапсулировние, выполняемое способом генерации капель, при котором размер капсул фиксирован и толщина зависит от размера инкапсулированных биоматериалов.

[0069] Термины «водная фаза» и «водяная фаза» употребляются в данном документе взаимозаменяемо и относятся к жидкой фазе, которая содержит воду и может дополнительно содержать гидрофильные ко-растворители и водорастворимые вещества. Примеры водной фазы включают в себя, но не ограничиваются ими, воду как таковую, водные буферы, среды для культивирования клеток, растворы пептидов, белков и углеводов в воде, растворы для консервирования органов.

[0070] При употреблении в контексте данного документа термин «масляная фаза» означает жидкую фазу, которая не смешивается с водной фазой или водяной фазой. Примеры масляной фазы включают в себя, но не ограничиваются ими, полипропиленгликоль (ППГ), минеральные масла (например, минеральное масло, имеющее вязкость, которая по меньшей мере в 2,5 раза превышает вязкость водной фазы), любую высоковязкую (например, 1300 кП) жидкость, которая не смешивается с водой.

[0071] При употреблении в контексте данного документа «капельное распыление» применительно к водной фазе относится к процессу, посредством которого водной фазе позволяют проходить через отверстие, проем или апертуру так, что образуются капли. Данный термин также включает в себя процесс, посредством которого непрерывный поток водной фазы преобразуется в капли с помощью механических, ультразвуковых или

других сопоставимых средств.

[0072] При употреблении в контексте данного документа термин «струйное распыление» применительно к водной фазе относится к процессу, посредством которого поток жидкости (например, водной фазы) вытесняется с высокой скоростью из отверстия, проема или апертуры. Высокая скорость позволяет нейтрализовать разницу поверхностного натяжения. «Струйное распыление» относится к удлинению потока так, что диаметр потока водной фазы уменьшается при выходе из инжекционного отверстия по меньшей мере на один порядок величины.

[0073] При употреблении в контексте данного документа термин «удлинение» применительно к водной фазе относится к процессу, посредством которого длина потока жидкости (например, водной) увеличивается или удлиняется, в то время как диаметр ее поперечного сечения уменьшается. Удлинение позволяет перейти от капельного распыления к струйному распылению.

[0074] В данном изобретении представлены реактивы, устройство и способы для иммуноизоляции биоматериалов, например, клеток и кластеров клеток, для предотвращения иммунного отторжения, воспаления и (или) аутоиммунного разрушения при сохранении функциональности клеток, когда указанные биоматериалы имплантируются субъекту.

[0075] Технология нанесения конформного покрытия, представленная в данном документе, позволяет покрывать кластеры клеток, имеющие переменные размеры (диаметр 50-350 мкм, включительно с клетками, продуцирующими инсулин, и первичными островками), гидрогелем толщиной от нескольких микрон до десятков микрон, при этом толщина данного покрытия была относительно монодисперсной и не зависела от диаметра кластеров клеток (Tomei et al., 2014, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 111: 10514-19). Значительные достижения в данной технологии включают в себя (i) минимизацию толщины капсулы, что максимизирует транспортировку питательных веществ/глюкозы/инсулина к клеткам, покрытым данным покрытием, максимизируя жизнеспособность клеток и минимизируя задержки стимулированной глюкозой секреции инсулина (Buchwald et al., 2018, Biotechnol. Bioeng. 115: 232-245), и (ii) минимизацию объема инкапсулированного клеточного трансплантата, что позволяет проводить трансплантацию в ограниченных участках тела, которые могут вместить только ограниченные объемы, включительно с предварительно васкуляризованными участками и устройствами для местной иммуномодуляции. См. работу Tomei et al., 2015, Expert. Opin. Biol. Ther. 15: 1321-1326.

[0076] Конформное покрытие достигается путем впрыскивания водной фазы, содержащей раствор для нанесения покрытия и кластеры клеток, коаксиально в камеру большего размера (в ~ 10 раз больше по диаметру поперечного сечения), содержащую текучую, несмешивающуюся масляную смесь (изготовленную, среди прочего, из высоковязкого полипропиленгликоля (ППГ) и Span80 - коммерчески доступного (Sigma Aldrich) неионогенного поверхностно-активного вещества, содержащего олеиновую

кислоту (C18:1) ≤ 60%; баланс преимущественно линолевой (C18:2), линоленовой (C18:3) и пальмитиновой (C16:0) кислот) в устройстве для инкапсулирования, имеющем геометрию фокусировки потока после введения водной фазы в масляную фазу. Такая геометрия позволяет удлинить двухфазный поток и, если вязкость водной фазы достаточно высока (Tomei et al., 2014, Proc. Nat. Acad. Sci. USA.111: 10514-10519), происходит струйное распыление водной фазы внутри масляной фазы, как указано в патенте США № 10653816, патенте США № 10660987 и в международной заявке на патент № PCT/US2012/035696, содержание каждого из данных патентных документов настоящим включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте (здесь и далее по тексту - «заявки предшествующего уровня техники»).

[0077] При употреблении в контексте данного документа термин «струйное распыление» относится к удлинению потока так, что диаметр потока водной фазы уменьшается при выходе из инжекционного отверстия по меньшей мере на один порядок величины. После струйного распыления водной фазы явление нестабильности Плато - Рэлея приводит к распаду указанной водной фазы на капли размером в нанолитр и, следовательно, к покрытию кластеров клеток, содержащихся в указанной водной фазе. В указанном устройстве камера для инкапсулирования соединена со стеклянным капилляром длиной 10 см с отверстием диаметром 1 мм, по которому продолжают течь двухфазные жидкости; под наконечником стеклянной трубки расположен коллекторный сосуд для сбора выходного потока.

[0078] Как указано в примерах из заявок предшествующего уровня техники, водная фаза состояла из: многоплечевого ПЭГ (10 кДа, 8 плеч, 75-90% функционализированного ПЭГ-малеимида (ПЭГ-МАЛ) или ПЭГ-винилсульфона (ПЭГ-ВС)), избыточного количества сшивающего агента (дитиотреитола и 2 кДа ПЭГ-дитиола при молярном соотношении 3-4 к 1) 1, 8-плечевого ПЭГ-МАЛ или ПЭГ-ВС) для достижения полного гелеобразования ПЭГ; данная водная фаза также включала в себя добавки для достижения достаточно высокой вязкости данной водной фазы (включая, но не ограничиваясь ими, альгинат, амфифильные самособирающиеся полимеры или пептиды и т. д.). Как представлено в заявках предшествующего уровня техники, необходимо, чтобы pH водной фазы в приведенном примере поддерживался на уровне 3,5-6 (в зависимости от конкретной композиции гидрогеля), чтобы предотвратить преждевременное гелеобразование водной фазы перед нанесением покрытия, которое происходит после струйного распыления и распада водной фазы в камере инкапсулирования из-за высокой реакционной способности реакции типа Михаэля, происходящей между многоплечевым ПЭГ и тиолированными сшивающими веществами. Для сбора выходного потока под стеклянной трубкой размещали коническую пробирку на 50 мл и заполняли ее ППГ и основой (триэтаноламином) для повышения pH водной фазы и ускорения гелеобразования водной фазы после сбора и перед очисткой. Очистку выполняли путем экстрагирования гелеобразной водной фазы (кластеров клеток, покрытых ПЭГ-гидрогелем, и пустого ПЭГ-геля) с использованием гексана. При использовании данного способа, как представлено в

заявках предшествующего уровня техники, была показана функциональность in vitro и in vivo первичных островков с конформным покрытием, клеток с конформным покрытием, секретирующих инсулин, полученных из стволовых клеток, и эпителиальных клеток почки человека с конформным покрытием, как представлено в данном документе. Было обнаружено, что указанные клетки с конформным покрытием способны обратить вспять сахарный диабет у мышей без необходимости иммуносупрессии. См. работу Tomei et al., 2014, Ibid.; Manzoli et al., 2018, Ibid; Stock et al., 2020, Stem Cell Reports 14: 91-104.

[0079] Однако, было обнаружено, что низкий pH водной фазы во время инкапсулирования снижает функциональность первичных островков, покрытых оболочкой (например, их жизнеспособность), особенно для островков нечеловекообразных приматов (как показано в представленных в данном документе примерах). Также, водная фаза, используемая в способах с низким pH, должна содержать как ПЭГ, сшивающий агент, так и добавку, повышающую вязкость (альгинат, амфифильные самособирающиеся полимеры или пептиды и т. д.) для достижения необходимой вязкости, обеспечивающей струйное распыление водной фазы и ее распад. Некоторые из этих добавок снижают биосовместимость (как показано в данном документе) и иммуноизоляцию гидрогелевых покрытий в животных моделях, как показано в работе Manzoli et al., 2018, Am. J. Transplant. 18: 590-603.

[0080] Модифицированная процедура нанесения конформного покрытия, представленная в данном документе, позволяет разобщить основной полимер (10 кДа 8-плечевой 75% функционализированный ПЭГ-малеимид или ПЭГ-винилсульфон) и общее количество сшивающего вещества (дитиотреитол и 2 кДа ПЭГ-дитиол), необходимое для достижения гелеобразования ПЭГ (молярное отношение сшивающего вещества к многоплечевому ПЭГ составляет 3 к 1) в гидрогели из водной фазы, содержащей кластеры клеток, и далее устраняет любую необходимость в добавках, повышающих вязкость в водной фазе (как проиллюстрировано в данном документе на фиг. 1 - «Способ при физиологическом pH»). Как описано в данном документе, нанесение функционального конформного покрытия достигалось с использованием водной фазы, состоящей из многоплечевого ПЭГ, минимально сшитого путем добавления 20% моль/моль необходимого количества сшивающего вещества, что обеспечивало гелеобразование ПЭГ в гидрогели. Минимально сшитый ПЭГ (например, 1-30% сшивания) имеет достаточную вязкость, позволяющую водной фазе струйно распыляться из коаксиальной масляной фазы (изготовленной из полипропиленгликоля (Mn ~ 4000), ППГ с 10% Span80 или поверхностно-активного вещества, имеющего эквивалентные свойства, особенно в отношении снижения межфазного напряжения) и распадаться, приводя к образованию конформного покрытия вокруг клеток и (или) кластеров клеток. Полное сшивание ПЭГ достигается после нанесения покрытия на клетки и (или) кластеры клеток после струйного распыления и распада водной фазы в камере для инкапсулирования. Теперь это достигается путем пропускания гелеобразующей эмульсии из смеси 1:15 (об.:об.) 25 мг/мл ДТТ (дитиотреитола) в HBSS-/- : ППГ/10% Span80 ниже по потоку от той части камеры

для инкапсулирования, где происходит распад струи, с использованием устройства, как показано на фиг. 1, 1A и 1B. Как указано в примерах из заявок предшествующего уровня техники, pH водной фазы необходимо поддерживать на кислых значениях, чтобы предотвратить преждевременное гелеобразование водной фазы перед нанесением покрытия, которое происходит после струйного распыления и распада водной фазы в камере для инкапсулирования. Однако водная фаза с низким pH во время инкапсулирования снижала функциональность первичных островков с покрытием (как проиллюстрировано в данном документе в примерах и, в частности, на фиг. 2). Более того, водная фаза, как указано в примерах из заявок предшествующего уровня техники, должна была содержать ПЭГ, сшивающий агент и добавку (т. е. агент, повышающий вязкость; альгинат, амфифильные самособирающиеся полимеры или пептиды и т. д.) для достижения необходимой вязкости, чтобы обеспечить струйное распыление водной фазы и ее распад. Указанные добавки снижали биосовместимость и иммуноизоляцию гидрогелей покрытия в животных моделях, как показано в представленных в данном документе примерах и фиг. 2 и 3. Повышение pH водной фазы до почти физиологических значений (~6-7,4) и устранение любых усилителей вязкости улучшило функциональность инкапсулированных островков и биосовместимость покрытия, как показано в представленных в данном документе примерах и фиг. 4-8.

[0081] Следовательно, в некоторых вариантах осуществления данного изобретения представлен способ конформного покрытия биоматериалов материалом покрытия, включающий в себя следующие этапы: (a) впрыскивание водной фазы в коаксиальную масляную фазу в устройстве для нанесения покрытия, сконфигурированном так, чтобы обеспечить переход от капельного распыления к струйному распылению и удлинению потока указанной водной фазы в указанной масляной фазе; (b) добавление указанного биоматериала и указанного материала покрытия к указанной водной фазе, при этом материал покрытия из указанного этапа (b) не содержит агент, повышающий вязкость; и при этом указанная водная фаза имеет pH от около 6 до около 7,4; (c) предоставление струе указанной водной фазы возможности распадаться на частицы; и (d) добавление компонента указанного материала покрытия после распада струи указанной водной фазы на частицы, при этом указанный компонент представляет собой гелеобразующую эмульсию, которая способствует или катализирует полимеризацию указанного материала покрытия; вследствие этого получается биоматериал с конформным покрытием. Примеры агентов, повышающих вязкость, включают в себя, но не ограничиваются ими, альгинат, амфифильные самособирающиеся полимеры или пептиды и т. д.) В некоторых вариантах осуществления данного изобретения агент, повышающий вязкость, который исключен из способов, описанных в данном документе, выбирают из полисахаридов, таких как альгинат, децеллюляризованных тканей, сборок наноматериалов на основе ПЭГ, гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата, декстрана, декстрансульфата, гепарина, гепаринсульфата, гепарансульфата, хитозана, геллановой камеди, ксантановой камеди, гуаровой камеди, водорастворимых производных целлюлозы, желатина, коллагена и

альбумина.

[0082] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает в себя этап сбора материала, вытекающего из указанного устройства для нанесения покрытия (т. е. биоматериала с конформным покрытием и любого материала покрытия, не содержащего биоматериал).

[0083] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает в себя этап очистки указанного биоматериала с конформным покрытием и указанного материала покрытия, не содержащего биоматериал, от указанной масляной фазы.

[0084] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный способ дополнительно включает в себя этап отделения указанного биоматериала с конформным покрытием от указанного материала покрытия, не содержащего биоматериал.

[0085] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения очистка биоматериала с конформным покрытием и любого материала покрытия, не содержащего биоматериал, от масляной фазы включает в себя этап (e) заливка продукта с этапа (d), изложенного в способе выше, в минеральное масло при перемешивании полученной смеси (т. е. биоматериала с конформным покрытием и любого материала покрытия, не содержащего биоматериал, масляной фазы и гелеобразующей эмульсии (содержащей раствор дитиотреитола (ДТТ), растворенный в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) и эмульгированный в полипропиленгликоле (ППГ) с 10% сорбитанмоноолеата (Span80) в минеральном масле)).

[0086] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения очистка биоматериала с конформным покрытием и материала покрытия, не содержащего биоматериал, от масляной фазы включает в себя этап (f) добавление сбалансированного солевого раствора Хэнкса (HBSS) к продукту, полученному на этапе (e) (т. е. биоматериалу с конформным покрытием и любому материалу покрытия, не содержащему биоматериал, масляное фазе и гелеобразующей эмульсии (содержащей раствор дитиотреитола (ДТТ), растворенный в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) и эмульгированный в полипропиленгликоле (ППГ) с 10% сорбитанмоноолеата (Span80) в минеральном масле), выходящим из указанного устройства, и минеральному маслу).

[0087] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, продукт с этапа (f) центрифугируют и промывают в HBSS.

[0088] В некоторых вариантах осуществления способов, описанных в данном документе, после центрифугирования и промывки сбалансированным солевым раствором Хэнкса (HBSS) биоматериал с покрытием и любой материал, не содержащий биоматериал, инкубируют с раствором ПЭГ-дитиола.

[0089] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения агент, повышающий вязкость, который исключен из способов, описанных в данном документе,

выбирают из полисахаридов, таких как альгинат, децеллюляризованных тканей, сборок наноматериалов на основе ПЭГ, гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата, декстрана, декстрансульфата, гепарина, гепаринсульфата, гепарансульфата, хитозана, геллановой камеди, ксантановой камеди, гуаровой камеди, водорастворимых производных целлюлозы, желатина, коллагена и альбумина.

[0090] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения размер указанного биоматериала является меньшим, чем размер указанного отверстия, где указанная водная фаза впрыскивается в указанную масляную фазу.

[0091] Способы согласно данному изобретению можно применять для инкапсулирования любого материала, для которого может быть полезна иммуноизоляция при имплантации субъекту. Указанный материал может быть неоднородным по форме. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал, для которого может быть полезна иммуноизоляция, представляет собой биоматериал. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биоматериал содержит клетки, кластеры клеток, покрытые биоматериалом клетки или кластеры клеток, субклеточные органеллы, биологические молекулы, небиологические лекарственные препараты или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления способы согласно данному изобретению применяют для инкапсулирования одного или большего числа из следующего: клеток, кластеров клеток, субклеточных органелл, биологических агентов, таких как белки, нуклеиновые кислоты и антитела, и небиологических агентов (например, малых молекул), таких как лекарственные препараты. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биоматериал представляет собой клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биоматериал представляет собой кластеры клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биоматериал представляет собой клетки и кластеры клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биоматериал представляет собой субклеточные органеллы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биоматериал представляет собой белок. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биоматериал представляет собой нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биоматериал представляет собой антитела. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения способы согласно данному изобретению применяют для инкапсулирования клеток и (или) кластеров клеток. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения способы согласно данному изобретению применяют для инкапсулирования островковых клеток поджелудочной железы и кластеров островковых клеток поджелудочной железы.

[0092] В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанные клетки с конформным покрытием или кластеры клеток с конформным покрытием могут включать в себя одно или большее число из следующего: аутологичные, гетерологичные, сингенные, аллогенные или ксеногенные островки поджелудочной железы, отдельно или

в комбинации с другими типами клеток (например, клетками Сертоли, мезенхимальными клетками и клетками, полученными из костного мозга, эндотелиальными клетками-предшественниками, стволовыми клетками, регуляторными Т-клетками Treg и т. д., каждые из которых указаны в общем как имплантируемые «вспомогательные клетки»), которые предоставляют факторы роста и (или) другие полезные агенты для образования, поддержания или увеличения числа указанных клеток с конформным покрытием, или иным образом помогают указанным клеткам с конформным покрытием оказывать терапевтический эффект при имплантации в организм хозяина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные вспомогательные клетки представляют собой мезенхимальные стволовые клетки.

[0093] При употреблении в контексте данного документа термин «организм-хозяин» относится к реципиенту имплантированного биоматериала и включает в себя всех животных. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный организм-хозяин представляет собой млекопитающее. В иллюстративном варианте осуществления данного изобретения указанный организм-хозяин представляет собой человека.

[0094] Способы согласно данному изобретению можно с преимуществом применять для конформного покрытия в модельных системах клеточной терапии. Клетки с конформным покрытием могут оказывать терапевтическое действие, например, путем экспрессии терапевтического фактора in vivo после имплантации. Примеры таких клеток включают в себя, но не ограничиваются ими, клетки, которые продуцируют: инсулин для лечения сахарного диабета; дофамин для лечения болезни Паркинсона (Minquez-Castellanos et al., 2007, J Neurol Neurosurg Psychiatry 78: 825- 831); гормон роста для лечения карликовости (Chang et al., 1999, Trends Biotechnol 17: 78-83); фактор VIII и фактор IX (Chang et al., 1999, Trends Biotechnol 17, 78-83) для лечения гемофилии; и эритропоэтин для лечения анемии (Rinsch et al., 2002, Kidney Intern 62: 1395-1401). Можно представить себе гораздо больше полезных факторов, продуцируемых клетками, или клеточных/тканевых функций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки с конформным покрытием могут экспрессировать и (или) доставлять больше чем один терапевтический фактор, или могут включать в себя два или большее число типов клеток, доставляющих один или большее число терапевтических факторов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки с конформным покрытием также или в качестве альтернативы экспрессируют и (или) доставляют антагонист, агонист, аналог, производное, химеру, слитую молекулу или фрагмент терапевтического фактора для обеспечения терапевтического эффекта при имплантации в организм хозяина.

[0095] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения по меньшей мере некоторые клетки с конформным покрытием также или в качестве альтернативы обеспечивают терапевтический эффект без выделения фактора, способного к диффузии. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанные клетки с

конформным покрытием обеспечивают ферментативную активность, которая, например, превращает субстрат в продукт, обладающий полезным действием, и (или) метаболизирует, связывает или поглощает вредное вещество. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанные клетки с конформным покрытием оказывают терапевтический эффект посредством фактора, связанного с биологическим материалом, такого как фактор, связанный с поверхностью клетки.

[0096] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные клетки с конформным покрытием естественным образом оказывают терапевтический эффект, без генетических модификаций, при имплантации в организм хозяина. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные клетки с конформным покрытием являются генетически сконструированными для оказания терапевтического эффекта. В качестве неограничивающих примеров, указанные клетки могут быть трансфицированы векторами экспрессии или трансдуцированы лентивирусными векторами, которые делают указанные клетки способными экспрессировать один или большее число терапевтических и (или) вспомогательных клеточных факторов. В другом варианте осуществления данного изобретения указанные клетки могут включать в себя, состоять из или состоять по существу из клеток, трансфицированных векторами экспрессии, которые делают указанные клетки способными экспрессировать один или большее число терапевтических и (или) вспомогательных клеточных факторов. Такая экспрессия может быть конститутивной или регулируемой, например, в ответ на биологические модуляторы в кровотоке или тканях, воздействию которых подвергаются данные клетки.

[0097] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки, на которые будет наноситься конформное покрытие, получены из ткани трупа или из живой ткани. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные клетки происходят из млекопитающего или не из млекопитающего, происходят из человека или не из человека, являются аутологичными или аллогенными. Указанные клетки могут быть плюрипотентными, мультипотентными, тотипотентными или дифференцированными эмбриональными или взрослыми стволовыми клетками; первичными дифференцированными клетками; или иммортализованными клетками, среди других типов клеток. В определенных вариантах осуществления данного изобретения стволовые клетки включают в себя, например, клетки, полученные из пуповинной крови, амниотической жидкости, менструальной крови, плаценты, Вартонова студня, цитотрофобластов и т. п. Указанные клетки могут также включать в себя любую комбинацию перечисленных выше типов клеток.

[0098] Иллюстративные терапевтические факторы, которые могут обеспечиваться клетками с конформным покрытием, включают в себя, но не ограничиваются ими, один или большее число из следующего: инсулин, глюкагон, эритропоэтин; фактор VIII; фактор IX; гемоглобин; альбумин; нейромедиаторы, такие как дофамин, гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), глутаминовая кислота, серотонин, норадреналин, адреналин и

ацетилхолин; факторы роста, такие как фактор роста нервов (ФРН, англ. «NGF»), нейротрофический фактор головного мозга (НФГМ, англ. «BDNF»), нейротрофин-3 (НТ-3), нейротрофин 4/5 (НТ-4/5), цилиарный нейротрофический фактор (ЦНТФ, англ. «CNTF»), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (НФГК, англ. «GDNF»), холинергический фактор дифференцировки/лейкоз-ингибирующий фактор (ХФЛ, англ. «CDF» / ЛИФ, англ. «LIF»), эпидермальный фактор роста (ЭФР, англ. «EGF»), инсулиноподобный фактор роста (ИФР, англ. «IGF»), фактор роста фибробластов (ФРФ, англ. «FGF») и тромбоцитарный фактор роста (ТФР, англ. «PDGF»); ингибиторы боли, такие как вещество Р, катехоламины, динорфины, эндорфины или энкефалины; гормоны, такие как паратиреоидный гормон или гормон роста; иммуномодуляторы, такие как гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ, англ. «GM-CSF»); нейромодуляторы; лимфокины; цитокины; кофакторы; антитела; аптамеры; и ферменты. Выбор одного или большего числа терапевтических факторов и концентраций, при которых они вырабатываются и высвобождаются из клеток, диктуется потребностями пациента, проходящего лечение, и может быть легко определен опытным путем квалифицированным практиком.

[0099] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки с конформным покрытием продуцируют терапевтический фактор, обладающий инсулиноподобной или инсулинрегуляторной активностью. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный терапевтический фактор представляет собой инсулин. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный терапевтический фактор представляет собой прекурсорную форму инсулина, такую как препроинсулин или проинсулин. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный терапевтический фактор представляет собой химерный или слитый белок инсулина.

[0100] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения терапевтический эффект, предоставляемый клетками с конформным покрытием, включает в себя регуляцию уровня инсулина в крови. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный терапевтический эффект включает в себя регуляцию уровня глюкозы в крови. В других вариантах осуществления данного изобретения указанный терапевтический эффект включает в себя регуляцию уровней одного или большего числа других регуляторов биологического ответа в крови пациента.

[0101] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения терапевтический (-е) фактор (-ы) высвобождается (высвобождаются) из клеток с конформным покрытием вследствие получения стимула или сигнала. Для имплантированных клеток указанные стимул или сигнал могут быть получены от хозяина (например, изменения уровня глюкозы в крови, гормоны, метаболические сигнальные агенты, химические сигнальные молекулы и т. д.).

[0102] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки и (или) кластеры клеток согласно данному изобретению являются, в общем, однородными по

размеру. В других вариантах осуществления данного изобретения клетки и (или) кластеры клеток согласно данному изобретению не являются однородными по размеру. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток варьирует от около 10 мкм до около 10000 мкм; от около 25 мкм до около 500 мкм; или от около 40 мкм до около 400 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток варьирует от 10 мкм до 10000 мкм; от 25 мкм до 500 мкм; или от 40 мкм до 400 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток варьирует от около 10 мкм до около 10000 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток варьирует от 10 мкм до 10000 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток варьирует от около 25 мкм до около 500 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток варьирует от 25 мкм до 500 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток варьирует от около 40 мкм до около 400 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток варьирует от 40 мкм до 400 мкм. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток варьирует от около 50 до около 300 мкм. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток варьирует от 50 до 300 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр островковых клеток и (или) кластеров островковых клеток варьирует от около 10 мкм до около 10000 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр островковых клеток и (или) кластеров островковых клеток варьирует от 10 мкм до 10000 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр островковых клеток и (или) кластеров островковых клеток варьирует от около 25 мкм до около 500 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр островковых клеток и (или) кластеров островковых клеток варьирует от 25 мкм до 500 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр островковых клеток и (или) кластеров островковых клеток варьирует или составляет от около 40 мкм до около 400 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр островковых клеток и (или) кластеров островковых клеток варьирует или составляет от 40 мкм до 400 мкм. В конкретном варианте осуществления данного изобретения диаметр островковых клеток и (или) кластеров островковых клеток варьирует от около 50 до около 300 мкм. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения островковые клетки и (или) кластеры островковых клеток, диаметр которых варьирует от около 50 до около 300 мкм, содержат островковые клетки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетки и (или) кластеры клеток, диаметр которых варьирует от 50 до 300 мкм, содержат островковые клетки.

[0103] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 40 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 50 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 60 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 70 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 80 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 90 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 100 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 150 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 200 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 250 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 300 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 350 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 400 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 450 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 500 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 550 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 600 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 650 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 700 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 750 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или)

кластеров клеток составляет больше чем около 800 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 850 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем около 900 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 950 мкм. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет вплоть до около 1000 мкм.

[0104] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 мкм. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 40 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 50 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 60 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 70 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 80 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 90 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 100 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 150 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 200 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 250 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 300 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 350 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 400 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 450 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 500 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 550 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр

указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 600 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 650 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 700 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 750 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 800 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 850 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 900 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет больше чем 950 мкм. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет вплоть до 1000 мкм.

[0105] В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 40 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 50 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 60 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 70 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 80 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 90 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 100 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 150 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 200 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 250 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 300 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 350 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 400 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 450 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет

около 500 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 550 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 600 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 650 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 700 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 750 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 800 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 850 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 900 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 950 мкм. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения диаметр указанных клеток и (или) кластеров клеток составляет около 1000 мкм.

[0106] Материалы покрытия, используемые в способах нанесения конформного покрытия согласно данному изобретению, являются биосовместимыми и механически и химически стабильными. Кроме того, материалы, пригодные для конформного покрытия, не создают помехи или не оказывают существенного влияния на функцию инкапсулированного биоматериала и снижают, минимизируют или устраняют иммунный ответ, когда указанный инкапсулированный биоматериал имплантирован в организм хозяина. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия может быть полимеризован путем внутреннего гелеобразования. В определенных вариантах осуществления данного изобретения материал, используемый в способах нанесения конформного покрытия согласно данному изобретению, является биоразлагаемым.

[0107] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиэтиленоксид (ПЭО), поли(N-винилпирролидинон) (ПВП), полиэтилоксазолин, поливиниловый спирт (ПВС), полиэтилоксазолин (ПЭОК), поли(аминокислоты), их производные или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), ПЭГ-малеимид, ПЭГ-акрилат, ПЭГ-винилсульфон или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), ПЭГ-малеимид, ПЭГ-акрилат или ПЭГ-винилсульфон. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит ПЭГ-малеимид. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения

указанный материал покрытия содержит ПЭГ-акрилат. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит ПЭГ-винилсульфон.

[0108] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия выбран из полиэтиленгликоля (ПЭГ), полиэтиленоксида (ПЭО), поли(N-винилпирролидинона) (ПВП), полиэтилоксазолина, поливинилового спирта (ПВС), полиэтилоксазолина (ПЭОК), поли(аминокислот), их производных и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ), ПЭГ-малеимид, ПЭГ-акрилат, ПЭГ-винилсульфон или их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ), ПЭГ-малеимид, ПЭГ-акрилат или ПЭГ-винилсульфон. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия представляет собой полиэтиленгликоль (ПЭГ). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия представляет собой ПЭГ-малеимид. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия представляет собой ПЭГ-акрилат. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия представляет собой ПЭГ-винилсульфон.

[0109] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит одно или большее число из следующего: полиэтиленгликоль (ПЭГ), полиэтиленоксид (ПЭО), поли(N-винилпирролидинон) (ПВП), полиэтилоксазолин, поливиниловый спирт (ПВС), полиэтилоксазолин (ПЭОК) и (или) поли(аминокислоты).

[0110] В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия является одноплечевым. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия является многоплечевым. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия представляет собой смесь одноплечевого материала и многоплечевого материала. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит многоплечевой полиэтиленгликоль (ПЭГ), минимально сшитый (5-50%) с ПЭГ-дитиолом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит многоплечевой полиэтиленгликоль (ПЭГ), минимально сшитый (1-30%) с ПЭГ-дитиолом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит 5-10% ПЭГ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза содержит среду без сыворотки, имеющую pH 6-7,4; или сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS), имеющий pH 6-7,4; в частности, представлен pH водной фазы, составляющий pH 6-7,4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза имеет pH, составляющий от около 6 до около 7,4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза имеет pH, составляющий от 6 до 7,4.

[0111] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит минимально сшитый ПЭГ-МАЛ. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит ПЭГ-МАЛ (10 кДа, 8 плеч, функционализация 75%), смешанный с ПЭГ-SH. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит ПЭГ-МАЛ (10 кДа, 8 плеч, функционализация 75%) и ПЭГ-SH. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит ПЭГ-МАЛ (10 кДа, 8 плеч, функционализация 75%), ПЭГ-SH и HBSS. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит 12,5% мас./об. ПЭГ-МАЛ (10 кДа, 8 плеч, функционализация 75%), смешанный с 10X ПЭГ-SH. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит 12,5% мас./об. ПЭГ-МАЛ (10 кДа, 8 плеч, функционализация 75%) и ПЭГ-SH. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит 12,5% мас./об. ПЭГ-МАЛ (10 кДа, 8 плеч, функционализация 75%), ПЭГ-SH и HBSS.

[0112] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза содержит тиолированный реактив, восстанавливающий реактив, поверхностно-активное вещество или их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения водная фаза, используемая при реализации на практике способов данного изобретения, может необязательно содержать один или большее число тиолированных реактивов, восстанавливающий реактив и (или) поверхностно-активное вещество. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное поверхностно-активное вещество представляет собой блок-сополимер полиоксиэтилен-полиоксипропилен или поли(этиленгликоль-bl-пропиленсульфид), более конкретно - 2% блок-сополимер полиоксиэтилен-полиоксипропилен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный тиолированный или восстанавливающий реактив представляет собой дитиотреитол (ДТТ) или ПЭГ-дитиол. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный тиолированный или восстанавливающий реактив в указанной водной фазе представляет собой 0,01-0,62% дитиотреитол (ДТТ).

[0113] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная гелеобразующая эмульсия содержит сшивающее вещество, растворенное в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) и эмульгированное в масле, имеющем вязкость 1300 кП. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная гелеобразующая эмульсия содержит ДТТ, сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS) и полипропиленгликоль (ППГ). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная гелеобразующая эмульсия содержит дитиотреитол (ДТТ), сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS), полипропиленгликоль (ППГ) и сорбитанмоноолеат (Span80). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная гелеобразующая эмульсия содержит дитиотреитол (ДТТ), растворенный в

сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) и эмульгированный в полипропиленгликоле (ППГ) с сорбитанмоноолеатом (Span80). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная гелеобразующая эмульсия содержит дитиотреитол (ДТТ), растворенный в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) и эмульгированный в полипропиленгликоле (ППГ) с 10% сорбитанмоноолеата (Span80).

[0114] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное конформное покрытие обладает характеристиками проницаемости, которые обеспечивают обмен питательными веществами и клеточными побочными продуктами, и высвобождение терапевтических факторов, но которые также могут препятствовать проникновению в капсулы молекул - эффекторов иммунитета организма-хозяина и (или) других нежелательных элементов. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное конформное покрытие содержит поры, имеющие отсечение по размеру в 100, 110, 120, 130, 140, 145, 150, 155, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 или 500 кДа. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное конформное покрытие содержит поры, имеющие отсечение по размеру в 150 кДа. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное конформное покрытие содержит поры, имеющие отсечение по размеру вплоть до 500 кДа.

[0115] Толщина конформного покрытия не зависит от размера/диаметра покрытого материала. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения толщина указанного покрытия варьирует от 1 мкм до 100 мкм, от 5 мкм до 50 мкм или от 8 мкм до 25 мкм. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения толщина указанного покрытия варьирует от 25-50 мкм. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения толщина указанного покрытия варьирует от 10-20 мкм.

[0116] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения покрытие визуализируют с помощью мечения материала покрытия обнаруживаемым маркером. Указанный маркер может представлять собой, например, флуоресцентную, ферментативную, хемилюминесцентную или эпитопную метку. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное покрытие можно визуализировать путем захвата высокомолекулярного декстрана-FITC в указанном материале покрытия. В конкретном варианте осуществления данного изобретения указанный меченый материал покрытия представляет собой ПЭГ-FITC.

[0117] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения материал покрытия может быть химически изменен, чтобы содержать функциональные группы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные функциональные группы помогают стабилизировать указанное покрытие. В дополнение к этому, указанный материал покрытия может содержать терапевтические факторы или другие молекулы, которые ассоциируются с такими терапевтическими факторами, как рецепторы или аффинные агенты (см., например, работу Kim et al., 2003, Biomacromolecules 4: 1214-1223). Терапевтические факторы могут быть включены в материал покрытия посредством ковалентного сшивания, эмульгирования, ионных взаимодействий, специфических

аффинных взаимодействий, простого захвата или любой их комбинации.

[0118] В определенных вариантах осуществления данного изобретения материал покрытия содержит противовоспалительные молекулы для уменьшения воспалительной реакции хозяина после имплантации клеток с конформным покрытием. Иллюстративные противовоспалительные агенты включают в себя кортикостероиды (дексаметазон, кортизол, преднизолон, лотепреднола этабонат, флуоцинолона ацетонид и другие), ингибиторы кальцинейрина (циклоспорин А), интерлейкин-1 (ИЛ-1), интерлейкин-10 (ИЛ-10), альфа-1-антитрипсин (ААТ), лизофиллин, пентоксифиллин, ингибиторы ЦОГ-2, пептид - антагонист рецептора интерлейкина-1 (ПАРИ, англ. «IRAP»), интерлейкин-10 (ИЛ-10), альфа-1-антитрипсин (ААТ), ТФР-бета; антитела против ИЛ-1, интерферона-гамма и ФНО-альфа; антитела против тканевого фактора и ингибиторы комплемента; антитела против лейкоцитарных интегринов (LFA-1 и ICAM-1). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный материал покрытия содержит молекулы внеклеточного матрикса (ВКМ), такие как коллаген типа I или типа IV, ламинин, фибронектин, гиалуроновая кислота или пептиды аргинин-глицин-аспартат (Beck et al., 2007, Tissue Eng 13 (3): 1-11). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения противовоспалительные молекулы и (или) молекулы ВКМ прикреплены к поверхности указанного материала покрытия. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанные молекулы покрыты оболочкой или инкапсулированы для медленного высвобождения.

[0119] Нанесение конформного покрытия на биоматериал происходит в устройстве для нанесения покрытия. При употреблении в контексте данного документа термин «устройство для нанесения покрытия» относится к любому устройству, которое способно наносить конформное покрытие на биоматериал. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство для нанесения покрытия представляет собой устройство, которое обеспечивает переход от капельного распыления к струйному распылению и удлинение водной фазы в несмешивающейся (например, масляной) фазе, при этом указанная водная фаза подвергается струйному распаду на частицы. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство для нанесения покрытия представляет собой проточную камеру, содержащую одно или большее число входных отверстий для масляной фазы, одно или большее число входных отверстий для водной фазы (которые могут быть такими же, как впускные отверстия для масляной фазы, или отличаться от них) и одну или большее число областей фокусировки потока ниже по потоку от указанных входных отверстий, где совместно текущие струи масляной фазы фокусируют водную фазу. Указанная проточная камера может дополнительно содержать один или большее число каналов ниже по потоку от области (-ей) фокусировки потока. Диаметр канала (-ов) водной фазы может составлять, например, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9 или 4 мм в диаметре. Диаметр канала (-ов) масляной фазы может составлять, например, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10, 10,5, 11,

11,5, 12, 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 15, 15,5, 16, 16,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 19,5 или 20 мм в диаметре. В определенных вариантах осуществления данного изобретения диаметр канала (-ов) масляной фазы может составлять вплоть до 100 мм. Длина канала (-ов) может составлять, например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или 30 мм. Каналы могут вести к одному или большему числу выходных отверстий из указанной проточной камеры. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения указанные устройство или установка сконфигурированы так, как указано в примерах и проиллюстрировано на фиг. 1, 1A или 1B.

[0120] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения представлена система для нанесения покрытия, включающая в себя первый насос 102, устройство для нанесения конформного покрытия 104, соединенное с первым насосом 102, катетер 106, расположенный внутри устройства для нанесения конформного покрытия 104, второй насос 108, сконфигурированный для контакта с резервуаром масляной фазы 110 (например, ППГ) со стороны входного потока и соединенный с устройством для нанесения конформного покрытия 104 со стороны выходного потока, третий насос 112, сконфигурированный для контакта с резервуаром эмульсии 114 со стороны засасывания и соединенный с устройством для нанесения конформного покрытия 104 со стороны выходного потока, капилляр 116 ниже по потоку со стороны устройства для нанесения конформного покрытия 104 и сосуд для сбора 118, как показано на фиг. 1A.

[0121] Первый насос 102 может быть сконфигурирован для впрыскивания материала покрытия и биоматериала, на который следует нанести указанное покрытие, в водной фазе в указанное первое впускное отверстие внутреннего участка указанной корпусной части. В некоторых аспектах данного изобретения первый насос 102 выбран из стеклянного шприцевого насоса, перистальтического насоса или любого другого насоса, сконфигурированного для впрыскивания указанного материала. Устройство для нанесения конформного покрытия 104 соединено с первым насосом 102 на стороне выше по потоку и соединено с капилляром 116 на стороне ниже по потоку, и может быть сконфигурировано для нанесения конформного покрытия из указанного материала покрытия на указанный биоматериал.

[0122] Катетер 106 может быть расположен внутри устройства для нанесения конформного покрытия 104 и соединяться с прецизионным проточным шприцевым насосом 102. Катетер 106 может быть сконфигурирован для впрыскивания материала покрытия и биоматериала, на который следует нанести указанное покрытие, в первое впускное отверстие 160 корпусной части 152 камеры для инкапсулирования (внутренняя фаза), как показано на фиг. 1A (v). Корпусная часть 152 может быть соединена с крепежной частью 154 на втором конце 162 корпусной части 152, которая далее соединена с частью для нанесения покрытия 156 на втором конце крепежной части 154, как показано на фиг. 1A (v). В некоторых аспектах данного изобретения второй конец 162 корпусной части 152 расположен напротив первого конца 160 корпусной части 152, как показано на фиг. 1A (v). В некоторых аспектах данного изобретения части для нанесения покрытия

156 сконфигурирован для взаимодействия с внешней поверхностью второго конца 164 крепежной части 154, как показано на фиг. 1A (v).

[0123] Второй насос 108 соединен с резервуаром ППГ 110 со стороны входного потока и соединен со стороны выходного потока со вторым входным отверстием 158 части для нанесения покрытия 156 устройства для нанесения конформного покрытия 104, и сконфигурирован для впрыскивания масляной фазы, содержащей поверхностно-активное вещество, во второе входное отверстие 158, как показано на фиг. 1A. Указанное впрыскивание масляной фазы (внешняя фаза) может быть сконфигурировано для протекания коаксиально к внутренней водной фазе. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второй насос 108 представляет собой перистальтический насос, катковый насос, стеклянный шприцевой насос или любой другой насос, сконфигурированный для впрыскивания материала указанной масляной фазы.

[0124] Камера для инкапсулирования включает в себя корпусную часть 152, соединенную с крепежной частью 154, которая соединена с частью для нанесения покрытия 156, как показано на фиг. 1A, панель (v).

[0125] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство для нанесения конформного покрытия дополнительно содержит выпускное отверстие для выпуска воздуха из указанного устройства. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство для нанесения конформного покрытия может дополнительно содержать выпускное отверстие для выпуска воздуха из указанного устройства. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное выпускное отверстие для выпуска воздуха расположено до входа для водной фазы в указанное устройство. Указанное выпускное отверстие для выпуска воздуха закрыто во время процесса нанесения покрытия.

[0126] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство обеспечивает фокусировку потока от канала с 10d к каналу с d (сокращение диаметра в 1/10 для обеспечения перехода от капельного распыления к струйному распылению). В определенных вариантах осуществления данного изобретения d варьирует от 0,5-10 мм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения d варьирует от 1-4 мм. В конкретном варианте осуществления данного изобретения d составляет около 1 мм. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения угол фокусировки указанного устройства варьирует от 100 до 5 градусов (от большей фокусировки к меньшей фокусировке). В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный угол фокусировки варьирует от 90 до 10 градусов. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный угол фокусировки составляет больше чем 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 80 или 90 градусов. В определенных вариантах осуществления данного изобретения угол фокусировки указанного устройства составляет больше чем 60 градусов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения область фокусировки потока имеет длину 50, 60, 70,

80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 или 150 мм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения область фокусировки потока имеет длину 100 мм.

[0127] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения диаметр камеры внешней масляной фазы (цилиндра) составляет 1-20 мм. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения диаметр камеры внешней масляной фазы составляет 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 мм. В конкретном варианте осуществления данного изобретения диаметр камеры внешней масляной фазы составляет 10 мм. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения камера внешней масляной фазы наполняется через боковой порт на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мм выше по потоку (аксиальное расстояние цилиндра) от коаксиального порта впрыскивания водной фазы. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанный боковой порт расположен на 5 мм выше по потоку от указанного порта впрыскивания водной фазы. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанная камера внешней масляной фазы наполняется через больше чем один боковой порт на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мм выше по потоку (аксиальное расстояние цилиндра) от указанного коаксиального порта впрыскивания водной фазы.

[0128] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения положение конца иглы для впрыскивания воды совмещается с основанием области фокусировки указанного устройства. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения конец иглы для впрыскивания воды расположен на около 0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4 или 5 мм выше или ниже по потоку (аксиальное расстояние цилиндра) от основания области фокусировки указанного устройства. В конкретном варианте осуществления данного изобретения конец иглы для впрыскивания воды расположен на около 0,5 мм выше по потоку от указанной области фокусировки.

[0129] В конкретном варианте осуществления данного изобретения указанное устройство характеризуется камерой внешней масляной фазы диаметром 10 мм, которая наполняется через боковой порт на 5 мм выше по потоку от коаксиального порта впрыскивания водной фазы, который находится на 0,5 мм выше по потоку от области фокусировки потока, и фокусировка потока происходит в канале, который сужается от 10 мм до 1 мм в диаметре и составляет 100 мм в длину, с углом фокусировки, составляющим 60 градусов.

[0130] В конкретных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство сконфигурировано для обеспечения коаксиального потока раствора, содержащего гелеобразующий агент, в частности - раствора дитиотреитола в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) (10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг/мл дитиотреитола), эмульгированного в полипропиленгликоле (ППГ), в соотношении объем к объему, которое составляет 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:50 или 1:100, локализованного в положении после образования покрытых биоматериалов.

[0131] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное

устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 или 1000 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 40 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 50 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 60 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 70 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 80 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 90 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 100 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 150 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 200 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 250 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 300 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 350 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 400 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 450 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 500 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 550 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие

на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 600 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 650 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 700 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 750 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 800 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 850 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 900 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр больше чем 950 мкм. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр вплоть до 1000 мкм.

[0132] В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 40 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 50 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 60 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 70 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 80 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 90 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 100 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 150 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 200 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие

на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 250 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 300 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 350 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 400 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 450 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 500 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 550 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 600 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 650 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 700 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 750 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 800 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 850 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 900 мкм. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр около 950 мкм. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное устройство способно наносить покрытие на клетки и (или) кластеры клеток, имеющие диаметр вплоть до 1000 мкм.

[0133] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поток водной фазы, поток масляной фазы или и тот, и другой, поддерживаются перистальтическим насосом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поток водной фазы, поток масляной фазы или и тот, и другой, поддерживаются шприцевым насосом. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения поток водной фазы поддерживается шприцевым насосом, а поток масляной фазы поддерживается

перистальтическим насосом. В определенных вариантах осуществления данного изобретения раствор дитиотреитола внесен коаксиально к биоматериалам с конформным покрытием с помощью шприцевого насоса или перистальтического насоса.

[0134] В то время как в данном документе приведены показатели для конкретного устройства, в котором используется внутривенный катетер 16G, для нанесения покрытия на кластеры клеток 50-250 мкм, следует понимать, что также рассматриваются другие устройства, имеющие различные конфигурации и размеры, в той мере, в которой сохраняются относительные показатели, изложенные на фиг. 1A, панель (v).

[0135] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, в которых клетки и (или) кластеры клеток представляют собой указанный биоматериал, на который следует нанести конформное покрытие, концентрация клеток, добавляемых к указанной водной фазе, может варьировать от 100-500000000 клеток/мл, 100-200000000 клеток/мл, 1000000-200000000 клеток/мл, 5000000-200000000 клеток/мл, 10000000-200000000 клеток/мл, 15000000-200000000 клеток/мл, 20000000-200000000 клеток/мл, 25000000-200000000 клеток/мл, 30000000-200000000 клеток/мл, 35000000-200000000 клеток/мл, 40000000-200000000 клеток/мл, 45000000-200000000 клеток/мл, 50000000-200000000 клеток/мл, 55000000-200000000 клеток/мл, 60000000-200000000 клеток/мл, 65000000-200000000 клеток/мл, 70000000-200000000 клеток/мл, 75000000-200000000 клеток/мл, 80000000-200000000 клеток/мл, 85000000-200000000 клеток/мл, 90000000-200000000 клеток/мл, 95000000-200000000 клеток/мл, 100000000-200000000 клеток/мл, 105000000-200000000 клеток/мл, 110000000-200000000 клеток/мл, 115000000-200000000 клеток/мл, 120000000-200000000 клеток/мл, 125000000-200000000 клеток/мл, 130000000-200000000 клеток/мл, 135000000-200000000 клеток/мл, 140000000-200000000 клеток/мл, 145000000-200000000 клеток/мл, 150000000-200000000 клеток/мл, 155000000-200000000 клеток/мл, 160000000-200000000 клеток/мл, 165000000-200000000 клеток/мл, 170000000-200000000 клеток/мл, 175000000-200000000 клеток/мл, 180000000-200000000 клеток/мл, 185000000-200000000 клеток/мл, 190000000-200000000 клеток/мл, 195000000-200000000 клеток/мл, 100-1000000 клеток/мл, 500-750000 клеток/мл, 1000-500000 клеток/мл или 2500-250000 клеток/мл.

[0136] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, в которых клетки и (или) кластеры клеток представляют собой указанный биоматериал, на который следует нанести конформное покрытие, концентрация клеток/кластеров клеток, добавляемых к указанной водной фазе, может варьировать от около 100 - около 500000000 клеток/мл, около 100 - около 200000000 клеток/мл, около 1000000 - около 200000000 клеток/мл, около 5000000 - около 200000000 клеток/мл, около 10000000 - около 200000000 клеток/мл, около 15000000 - около 200000000 клеток/мл, около 20000000 - около 200000000 клеток/мл, около 25000000 - около 200000000 клеток/мл, около 30000000 - около 200000000 клеток/мл, около 35000000 - около 200000000 клеток/мл, около 40000000 - около 200000000 клеток/мл, около 45000000 - около 200000000 клеток/мл, около 50000000 - около 200000000 клеток/мл, около 55000000 - около 200000000 клеток/мл,

около 60000000 - около 200000000 клеток/мл, около 65000000 - около 200000000 клеток/мл, около 70000000 - около 200000000 клеток/мл, около 75000000 - около 200000000 клеток/мл, около 80000000 - около 200000000 клеток/мл, около 85000000 - около 200000000 клеток/мл, около 90000000 - около 200000000 клеток/мл, около 95000000 - около 200000000 клеток/мл, около 100000000 - около 200000000 клеток/мл, около 105000000 - около 200000000 клеток/мл, около 110000000 - около 200000000 клеток/мл, около 115000000 - около 200000000 клеток/мл, около 120000000 - около 200000000 клеток/мл, около 125000000 - около 200000000 клеток/мл, около 130000000 - около 200000000 клеток/мл, около 135000000 - около 200000000 клеток/мл, около 140000000 - около 200000000 клеток/мл, около 145000000 - около 200000000 клеток/мл, около 150000000 - около 200000000 клеток/мл, около 155000000 - около 200000000 клеток/мл, около 160000000 - около 200000000 клеток/мл, около 165000000 - около 200000000 клеток/мл, около 170000000 - около 200000000 клеток/мл, около 175000000 - около 200000000 клеток/мл, около 180000000 - около 200000000 клеток/мл, около 185000000 - около 200000000 клеток/мл, около 190000000 - около 200000000 клеток/мл, около 195000000 - около 200000000 клеток/мл, около 100 - около 1000000 клеток/мл, около 500 - около 750000 клеток/мл, около 1000 - около 500000 клеток/мл или около 2500 - около 250000 клеток/мл.

[0137] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация клеток, добавляемых к указанной водной фазе, составляет около 100 клеток/мл, около 500 клеток/мл, около 1000 клеток/мл, около 2500 клеток/мл, около 5000 клеток/мл, около 7500 клеток/мл, около 10000 клеток/мл, около 25000 клеток/мл, около 50000 клеток/мл, около 75000 клеток/мл, около 100000 клеток/мл, около 250000 клеток/мл, около 500000 клеток/мл, около 750000 клеток/мл, около 1000000 клеток/мл, около 2500000 клеток/мл, около 5000000 клеток/мл, около 7500000 клеток/мл, около 10000000 клеток/мл, около 20000000 клеток/мл, около 25000000 клеток/мл, около 30000000 клеток/мл, около 40000000 клеток/мл, около 50000000 клеток/мл, около 60000000 клеток/мл, около 70000000 клеток/мл, около 80000000 клеток/мл, около 90000000 клеток/мл, около 100000000 клеток/мл, около 105000000 клеток/мл, около 110000000 клеток/мл, около 115000000 клеток/мл, около 120000000 клеток/мл, около 125000000 клеток/мл, около 130000000 клеток/мл, около 135000000 клеток/мл, около 140000000 клеток/мл, около 145000000 клеток/мл, около 150000000 клеток/мл, около 155000000 клеток/мл, около 160000000 клеток/мл, около 165000000 клеток/мл, около 170000000 клеток/мл, около 175000000 клеток/мл, около 180000000 клеток/мл, около 185000000 клеток/мл, около 190000000 клеток/мл, около 195000000 клеток/мл, около 200000000 клеток/мл.

[0138] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация клеток, добавляемых к указанной водной фазе, составляет 100 клеток/мл, 500 клеток/мл, 1000 клеток/мл, 2500 клеток/мл, 5000 клеток/мл, 7500 клеток/мл, 10000 клеток/мл, 25000 клеток/мл, 50000 клеток/мл, 75000 клеток/мл, 100000 клеток/мл, 250000 клеток/мл, 500000 клеток/мл, 750000 клеток/мл, 1000000 клеток/мл, 2500000 клеток/мл, 5000000 клеток/мл,

7500000 клеток/мл, 10000000 клеток/мл, 20000000 клеток/мл, 25000000 клеток/мл, 30000000 клеток/мл, 40000000 клеток/мл, 50000000 клеток/мл, 60000000 клеток/мл, 70000000 клеток/мл, 80000000 клеток/мл, 90000000 клеток/мл, 100000000 клеток/мл, 105000000 клеток/мл, 110000000 клеток/мл, 115000000 клеток/мл, 120000000 клеток/мл, 125000000 клеток/мл, 130000000 клеток/мл, 135000000 клеток/мл, 140000000 клеток/мл, 145000000 клеток/мл, 150000000 клеток/мл, 155000000 клеток/мл, 160000000 клеток/мл, 165000000 клеток/мл, 170000000 клеток/мл, 175000000 клеток/мл, 180000000 клеток/мл, 185000000 клеток/мл, 190000000 клеток/мл, 195000000 клеток/мл, 200000000 клеток/мл.

[0139] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, в которых кластеры клеток представляют собой указанный биоматериал, на который следует нанести конформное покрытие, концентрация кластеров клеток, добавляемых к указанной водной фазе, может варьировать от 100-200000 кластеров клеток/мл, 100-100000 кластеров клеток/мл, 500-100000 кластеров клеток/мл, 1000-100000 кластеров клеток/мл, 2000-100000 кластеров клеток/мл, 3000-100000 кластеров клеток/мл, 4000-100000 кластеров клеток/мл, 5000-100000 кластеров клеток/мл, 6000-100000 кластеров клеток/мл, 7000-100000 кластеров клеток/мл, 8000-100000 кластеров клеток/мл, 9000-100000 кластеров клеток/мл, 10000-100000 кластеров клеток/мл, 15000-100000 кластеров клеток/мл, 20000-100000 кластеров клеток/мл, 25000-100000 кластеров клеток/мл, 30000-100000 кластеров клеток/мл, 35000-100000 кластеров клеток/мл, 40000-100000 кластеров клеток/мл, 45000-100000 кластеров клеток/мл, 50000-100000 кластеров клеток/мл, 55000-100000 кластеров клеток/мл, 60000-100000 кластеров клеток/мл, 65000-100000 кластеров клеток/мл, 70000-100000 кластеров клеток/мл, 75000-100000 кластеров клеток/мл, 80000-100000 кластеров клеток/мл, 85000-100000 кластеров клеток/мл, 900000-100000 кластеров клеток/мл, 95000-100000 кластеров клеток/мл.

[0140] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, в которых кластеры клеток представляют собой указанный биоматериал, на который следует нанести конформное покрытие, концентрация кластеров клеток, добавляемых к указанной водной фазе, может варьировать от около 100 - около 200000 кластеров клеток/мл, около 100 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 500 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 1000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 2000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 3000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 4000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 5000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 6000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 7000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 8000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 9000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 10000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 15000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 20000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 25000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 30000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 35000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 40000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 45000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 50000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 55000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 60000 - около 100000 кластеров

клеток/мл, около 65000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 70000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 75000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 80000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 85000 -100000 кластеров клеток/мл, около 90000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 95000 - около 100000 кластеров клеток/мл.

[0141] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация кластеров клеток, добавляемых к указанной водной фазе, составляет около 100 кластеров клеток/мл, около 500 кластеров клеток/мл, около 1000 кластеров клеток/мл, около 2000 кластеров клеток/мл, около 3000 кластеров клеток/мл, около 4000 кластеров клеток/мл, около 5000 кластеров клеток/мл, около 6000 кластеров клеток/мл, около 7000 кластеров клеток/мл, около 8000 кластеров клеток/мл, около 9000 кластеров клеток/мл, около 10000 кластеров клеток/мл, около 15000 кластеров клеток/мл, около 20000 кластеров клеток/мл, около 25000 кластеров клеток/мл, около 30000 кластеров клеток/мл, около 35000 кластеров клеток/мл, около 40000 кластеров клеток/мл, около 45000 кластеров клеток/мл, около 50000 кластеров клеток/мл, около 55000 кластеров клеток/мл, около 60000 кластеров клеток/мл, около 65000 кластеров клеток/мл, около 70000 кластеров клеток/мл, около 75000 кластеров клеток/мл, около 80000 кластеров клеток/мл, около 85000 кластеров клеток/мл, около 90000 кластеров клеток/мл, около 95000 кластеров клеток/мл, около 100000 кластеров клеток/мл.

[0142] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация кластеров клеток, добавляемых к указанной водной фазе, составляет 100 кластеров клеток/мл, 500 кластеров клеток/мл, 1000 кластеров клеток/мл, 2000 кластеров клеток/мл, 3000 кластеров клеток/мл, 4000 кластеров клеток/мл, 5000 кластеров клеток/мл, 6000 кластеров клеток/мл, 7000 кластеров клеток/мл, 8000 кластеров клеток/мл, 9000 кластеров клеток/мл, 10000 кластеров клеток/мл, 15000 кластеров клеток/мл, 20000 кластеров клеток/мл, 25000 кластеров клеток/мл, 30000 кластеров клеток/мл, 35000 кластеров клеток/мл, 40000 кластеров клеток/мл, 45000 кластеров клеток/мл, 50000 кластеров клеток/мл, 55000 кластеров клеток/мл, 60000 кластеров клеток/мл, 65000 кластеров клеток/мл, 70000 кластеров клеток/мл, 75000 кластеров клеток/мл, 80000 кластеров клеток/мл, 85000 кластеров клеток/мл, 90000 кластеров клеток/мл, 95000 кластеров клеток/мл, 100000 кластеров клеток/мл.

[0143] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация островковых клеток, добавляемых к указанной водной фазе, может варьировать от 100-500000000 клеток/мл, 100-200000000 клеток/мл, 1000000-200000000 клеток/мл, 5000000-200000000 клеток/мл, 10000000-200000000 клеток/мл, 15000000-200000000 клеток/мл, 20000000-200000000 клеток/мл, 25000000-200000000 клеток/мл, 30000000-200000000 клеток/мл, 35000000-200000000 клеток/мл, 40000000-200000000 клеток/мл, 45000000-200000000 клеток/мл, 50000000-200000000 клеток/мл, 55000000-200000000 клеток/мл, 60000000-200000000 клеток/мл, 65000000-200000000 клеток/мл, 70000000-200000000 клеток/мл, 75000000-200000000 клеток/мл, 80000000-200000000 клеток/мл, 85000000-200000000 клеток/мл, 90000000-200000000 клеток/мл, 95000000-200000000 клеток/мл,

100000000-200000000 клеток/мл, 105000000-200000000 клеток/мл, 110000000-200000000 клеток/мл, 115000000-200000000 клеток/мл, 120000000-200000000 клеток/мл, 125000000-200000000 клеток/мл, 130000000-200000000 клеток/мл, 135000000-200000000 клеток/мл, 140000000-200000000 клеток/мл, 145000000-200000000 клеток/мл, 150000000-200000000 клеток/мл, 155000000-200000000 клеток/мл, 160000000-200000000 клеток/мл, 165000000-200000000 клеток/мл, 170000000-200000000 клеток/мл, 175000000-200000000 клеток/мл, 180000000-200000000 клеток/мл, 185000000-200000000 клеток/мл, 190000000-200000000 клеток/мл, 195000000-200000000 клеток/мл, 100-1000000 клеток/мл, 500-750000 клеток/мл, 1000-500000 клеток/мл или 2500-250000 клеток/мл.

[0144] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация островковых клеток, добавляемых к указанной водной фазе, может варьировать от около 100 - около 500000000 клеток/мл, около 100 - около 200000000 клеток/мл, около 1000000 - около 200000000 клеток/мл, около 5000000 - около 200000000 клеток/мл, около 10000000 - около 200000000 клеток/мл, около 15000000 - около 200000000 клеток/мл, около 20000000 - около 200000000 клеток/мл, около 25000000 - около 200000000 клеток/мл, около 30000000 - около 200000000 клеток/мл, около 35000000 - около 200000000 клеток/мл, около 40000000 - около 200000000 клеток/мл, около 45000000 - около 200000000 клеток/мл, около 50000000 - около 200000000 клеток/мл, около 55000000 - около 200000000 клеток/мл, около 60000000 - около 200000000 клеток/мл, около 65000000 - около 200000000 клеток/мл, около 70000000 - около 200000000 клеток/мл, около 75000000 - около 200000000 клеток/мл, около 80000000 - около 200000000 клеток/мл, около 85000000 - около 200000000 клеток/мл, около 90000000 - около 200000000 клеток/мл, около 95000000 - около 200000000 клеток/мл, около 100000000 - около 200000000 клеток/мл, около 105000000 - около 200000000 клеток/мл, около 110000000 - около 200000000 клеток/мл, около 115000000 - около 200000000 клеток/мл, около 120000000 - около 200000000 клеток/мл, около 125000000 - около 200000000 клеток/мл, около 130000000 - около 200000000 клеток/мл, около 135000000 - около 200000000 клеток/мл, около 140000000 - около 200000000 клеток/мл, около 145000000 - около 200000000 клеток/мл, около 150000000 - около 200000000 клеток/мл, около 155000000 - около 200000000 клеток/мл, около 160000000 - около 200000000 клеток/мл, около 165000000 - около 200000000 клеток/мл, около 170000000 - около 200000000 клеток/мл, около 175000000 - около 200000000 клеток/мл, около 180000000 - около 200000000 клеток/мл, около 185000000 - около 200000000 клеток/мл, около 190000000 - около 200000000 клеток/мл, около 195000000 - около 200000000 клеток/мл, около 100 - около 1000000 клеток/мл, около 500 - около 750000 клеток/мл, около 1000 - около 500000 клеток/мл или около 2500 - около 250000 клеток/мл.

[0145] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация клеток, добавляемых к указанной водной фазе, составляет около 100 клеток/мл, около 500 клеток/мл, около 1000 клеток/мл, около 2500 клеток/мл, около 5000 клеток/мл, около 7500 клеток/мл, около 10000 клеток/мл, около 25000 клеток/мл, около 50000 клеток/мл, около

75000 клеток/мл, около 100000 клеток/мл, около 250000 клеток/мл, около 500000 клеток/мл, около 750000 клеток/мл, около 1000000 клеток/мл, около 2500000 клеток/мл, около 5000000 клеток/мл, около 7500000 клеток/мл, около 10000000 клеток/мл, около 20000000 клеток/мл, около 25000000 клеток/мл, около 30000000 клеток/мл, около 40000000 клеток/мл, около 50000000 клеток/мл, около 60000000 клеток/мл, около 70000000 клеток/мл, около 80000000 клеток/мл, около 90000000 клеток/мл, около 100000000 клеток/мл, около 105000000 клеток/мл, около 110000000 клеток/мл, около 115000000 клеток/мл, около 120000000 клеток/мл, около 125000000 клеток/мл, около 130000000 клеток/мл, около 135000000 клеток/мл, около 140000000 клеток/мл, около 145000000 клеток/мл, около 150000000 клеток/мл, около 155000000 клеток/мл, около 160000000 клеток/мл, около 165000000 клеток/мл, около 170000000 клеток/мл, около 175000000 клеток/мл, около 180000000 клеток/мл, около 185000000 клеток/мл, около 190000000 клеток/мл, около 195000000 клеток/мл, около 200000000 клеток/мл.

[0146] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация островковых клеток, добавляемых к указанной водной фазе, составляет 100 клеток/мл, 500 клеток/мл, 1000 клеток/мл, 2500 клеток/мл, 5000 клеток/мл, 7500 клеток/мл, 10000 клеток/мл, 25000 клеток/мл, 50000 клеток/мл, 75000 клеток/мл, 100000 клеток/мл, 250000 клеток/мл, 500000 клеток/мл, 750000 клеток/мл, 1000000 клеток/мл, 2500000 клеток/мл, 5000000 клеток/мл, 7500000 клеток/мл, 10000000 клеток/мл, 20000000 клеток/мл, 25000000 клеток/мл, 30000000 клеток/мл, 40000000 клеток/мл, 50000000 клеток/мл, 60000000 клеток/мл, 70000000 клеток/мл, 80000000 клеток/мл, 90000000 клеток/мл, 100000000 клеток/мл, 105000000 клеток/мл, 110000000 клеток/мл, 115000000 клеток/мл, 120000000 клеток/мл, 125000000 клеток/мл, 130000000 клеток/мл, 135000000 клеток/мл, 140000000 клеток/мл, 145000000 клеток/мл, 150000000 клеток/мл, 155000000 клеток/мл, 160000000 клеток/мл, 165000000 клеток/мл, 170000000 клеток/мл, 175000000 клеток/мл, 180000000 клеток/мл, 185000000 клеток/мл, 190000000 клеток/мл, 195000000 клеток/мл, 200000000 клеток/мл.

[0147] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация кластеров островковых клеток, добавляемых к указанной водной фазе, может варьировать от 100-200000 кластеров клеток/мл, 100-100000 кластеров клеток/мл, 500-100000 кластеров клеток/мл, 1000-100000 кластеров клеток/мл, 2000-100000 кластеров клеток/мл, 3000-100000 кластеров клеток/мл, 4000-100000 кластеров клеток/мл, 5000-100000 кластеров клеток/мл, 6000-100000 кластеров клеток/мл, 7000-100000 кластеров клеток/мл, 8000-100000 кластеров клеток/мл, 9000-100000 кластеров клеток/мл, 10000-100000 кластеров клеток/мл, 15000-100000 кластеров клеток/мл, 20000-100000 кластеров клеток/мл, 25000-100000 кластеров клеток/мл, 30000-100000 кластеров клеток/мл, 35000-100000 кластеров клеток/мл, 40000-100000 кластеров клеток/мл, 45000-100000 кластеров клеток/мл, 50000-100000 кластеров клеток/мл, 55000-100000 кластеров клеток/мл, 60000-100000 кластеров клеток/мл, 65000-100000 кластеров клеток/мл, 70000-100000 кластеров клеток/мл, 75000-100000 кластеров клеток/мл, 80000-100000 кластеров клеток/мл, 85000-

100000 кластеров клеток/мл, 900000-100000 кластеров клеток/мл, 95000-100000 кластеров клеток/мл.

[0148] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация кластеров островковых клеток, добавляемых к указанной водной фазе, может варьировать от около 100 - около 200000 кластеров клеток/мл, около 100 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 500 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 1000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 2000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 3000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 4000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 5000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 6000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 7000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 8000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 9000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 10000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 15000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 20000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 25000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 30000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 35000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 40000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 45000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 50000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 55000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 60000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 65000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 70000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 75000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 80000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 85000 -100000 кластеров клеток/мл, около 90000 - около 100000 кластеров клеток/мл, около 95000 - около 100000 кластеров клеток/мл.

[0149] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация кластеров островковых клеток, добавляемых к указанной водной фазе, составляет около 100 кластеров клеток/мл, около 500 кластеров клеток/мл, около 1000 кластеров клеток/мл, около 2000 кластеров клеток/мл, около 3000 кластеров клеток/мл, около 4000 кластеров клеток/мл, около 5000 кластеров клеток/мл, около 6000 кластеров клеток/мл, около 7000 кластеров клеток/мл, около 8000 кластеров клеток/мл, около 9000 кластеров клеток/мл, около 10000 кластеров клеток/мл, около 15000 кластеров клеток/мл, около 20000 кластеров клеток/мл, около 25000 кластеров клеток/мл, около 30000 кластеров клеток/мл, около 35000 кластеров клеток/мл, около 40000 кластеров клеток/мл, около 45000 кластеров клеток/мл, около 50000 кластеров клеток/мл, около 55000 кластеров клеток/мл, около 60000 кластеров клеток/мл, около 65000 кластеров клеток/мл, около 70000 кластеров клеток/мл, около 75000 кластеров клеток/мл, около 80000 кластеров клеток/мл, около 85000 кластеров клеток/мл, около 90000 кластеров клеток/мл, около 95000 кластеров клеток/мл, около 100000 кластеров клеток/мл.

[0150] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения концентрация кластеров островковых клеток, добавляемых к указанной водной фазе, составляет 100 кластеров клеток/мл, 500 кластеров клеток/мл, 1000 кластеров клеток/мл, 2000 кластеров клеток/мл, 3000 кластеров клеток/мл, 4000 кластеров клеток/мл, 5000 кластеров клеток/мл, 6000 кластеров клеток/мл, 7000 кластеров клеток/мл, 8000 кластеров клеток/мл, 9000

кластеров клеток/мл, 10000 кластеров клеток/мл, 15000 кластеров клеток/мл, 20000 кластеров клеток/мл, 25000 кластеров клеток/мл, 30000 кластеров клеток/мл, 35000 кластеров клеток/мл, 40000 кластеров клеток/мл, 45000 кластеров клеток/мл, 50000 кластеров клеток/мл, 55000 кластеров клеток/мл, 60000 кластеров клеток/мл, 65000 кластеров клеток/мл, 70000 кластеров клеток/мл, 75000 кластеров клеток/мл, 80000 кластеров клеток/мл, 85000 кластеров клеток/мл, 90000 кластеров клеток/мл, 95000 кластеров клеток/мл, 100000 кластеров клеток/мл.

[0151] В определенных вариантах осуществления данного изобретения концентрация клеток/кластеров клеток, добавляемых к указанной водной фазе, варьирует от 5000 до 100000 клеток/мл. В конкретном варианте осуществления данного изобретения от 5000 до 250000 клеток/мл, добавляемых к водной фазе, представляют собой островковые клетки поджелудочной железы, которые необязательно могут быть обогащены секретирующими инсулин бета-клетками или их кластерами.

[0152] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет около 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,1, 7,2, 7,3 или 7,4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет около 6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет около 6,1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет около 6,2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет около 6,3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет около 6,4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет около 6,5. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет около 6,6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет около 6,7. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет около 6,8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет около 6,9. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет около 7,0. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет около 7,1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет около 7,2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет около 7,3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет около 7,4. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет около 6-7,4.

[0153] Как указано в данном документе, pH указанной водной фазы составляет 6, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7, 7,4, 7,5 или 8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет 6,0. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы

составляет 6,1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет 6,2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет 6,3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет 6,4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет 6,5. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет 6,6. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет 6,7. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет 6,8. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет 6,9. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет 7,0. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет 7,1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет 7,2. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет 7,3. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет 7,4. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения pH указанной водной фазы составляет 6-7,4.

[0154] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза содержит клетки и (или) кластеры клеток в среде, поверхностно-активное вещество и один или большее число тиолированных или восстанавливающих реактивов (которые могут быть, например, моно- или мультифункциональными агентами, которые являются линейными или многоплечевыми). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные клетки/кластеры клеток включают в себя островковые клетки, указанная среда не содержит сыворотку или представляет собой сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS) и (или) указанный тиолированный или восстанавливающий реактив представляет собой ДТТ или линейный бифункциональный ПЭГ-дитиол. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза содержит 5-10% ПЭГ (например, 5% или 10% ПЭГ) и 50000-250000 островковых клеток или кластеров островковых клеток /мл при pH 7,4. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза содержит 1-30% ПЭГ (например, 1% или 30% ПЭГ) и 50000-250000 островковых клеток или кластеров островковых клеток /мл при pH от 6 до 7,4. Способы нанесения конформного покрытия согласно данному изобретению охватывают собой любые комбинации данных значений.

[0155] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная масляная фаза содержит полипропиленгликоль (ППГ), минеральное масло с вязкостью, которая по меньшей мере в 2,5 раза превышает вязкость указанной водной фазы, полипропиленгликоль (ППГ) с 10% сорбитанмоноолеата. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная масляная фаза содержит полипропиленгликоль (ППГ) с 10% сорбитанмоноолеата, при этом указанная масляная фаза необязательно содержит триэтаноламин. В вариантах осуществления данного

изобретения, которые включают в себя триэтаноламин, указанная масляная фаза 0,01-0,2% триэтаноламина. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанная масляная фаза содержит одно или большее число из, например, полипропиленгликоля (ППГ) и минерального масла с вязкостью, которая по меньшей мере в 2,5 раза превышает вязкость указанной водной фазы. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанная масляная фаза содержит полипропиленгликоль (ППГ). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная масляная фаза содержит минеральное масло с вязкостью, которая по меньшей мере в 2,5 раза превышает вязкость указанной водной фазы.

[0156] Указанная масляная фаза может дополнительно содержать один или большее число агентов, например, Span80.

[0157] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная масляная фаза содержит ППГ. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанная масляная фаза содержит ППГ с 1-20%, 5-15%, 6-14%, 7-13%, 8-12%, 9-11% или 10% Span80. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная масляная фаза содержит ППГ с 1-20% Span80. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная масляная фаза содержит ППГ с 5-15% Span80. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная масляная фаза содержит ППГ с 6-14% Span80. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная масляная фаза содержит ППГ с 7-13% Span80. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная масляная фаза содержит ППГ с 8-12% Span80. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная масляная фаза содержит ППГ с 9-11% Span80. В конкретном варианте осуществления данного изобретения указанная масляная фаза содержит ППГ с 10% Span80.

[0158] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения скорости потока указанной водной фазы (Qw) и указанной масляной фазы (Qo), соответственно, выбраны из: 10 мкл/мин и 3,5 мл/мин; 15 мкл/мин и 3,5 мл/мин; 20 мкл/мин и 3,5 мл/мин; 1 мкл/мин и 3,5 мл/мин; 10 мкл/мин и 7 мл/мин; 50 мкл/мин и 0,5 мл/мин; 50 мкл/мин и 2,5 мл/мин; 150 мкл/мин и 0,5 мл/мин; и 150 мкл/мин и 2,5 мл/мин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения перед впрыскиванием указанной водной фазы вводится воздух, чтобы обеспечить стабилизацию струи воды в струе масла. В определенных вариантах осуществления данного изобретения воздух вводится в катетер для впрыскивания, содержащий водную фазу, так, что пузырек воздуха может быть введен в указанную масляную фазу до впрыскивания указанной водной фазы в указанную масляную фазу, чтобы способствовать визуализации начала указанной водной фазы.

[0159] Скорости потока указанной водной фазы и указанной масляной фазы необходимо корректировать с течением времени. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанная водная фаза сокращается с течением времени, в то время как указанная масляная фаза увеличивается. В конкретном варианте осуществления данного изобретения указанная водная фаза входит в указанную масляную фазу сначала

со скоростью 50 мкл/мин, а затем скорость снижают до 10 мкл/мин. В определенных вариантах осуществления данного изобретения скорость указанной масляной фазы постепенно увеличивают с 0,5 до 3,5 мл/мин, в то время как указанную водную фазу сокращают, а затем поддерживают постоянной на протяжении всего процесса инкапсулирования, или скорость указанной масляной фазы поддерживают постоянной на уровне 3,5 мл/мин на протяжении всего процесса инкапсулирования.

[0160] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение скорости указанной масляной фазы и скорости указанной водной фазы составляет от 70 до 500. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное соотношение составляет 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 450 или 500. В конкретном варианте осуществления данного изобретения указанное соотношение составляет 350.

[0161] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения соотношение вязкости указанной масляной фазы и вязкости указанной водной фазы составляет от 2,5 до 100. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное соотношение составляет 2,5, 3, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100. В конкретном варианте осуществления данного изобретения указанное соотношение составляет 3,5.

[0162] После распада водной струи материал, который необходимо инкапсулировать (например, клетки и (или) кластеры клеток) покрывают тонким слоем воды, содержащим материал покрытия, пропорциональным размеру струи, что позволяет нанести конформное покрытие. Затем, как описано в данном документе, указанное покрытие превращается в полимер путем коаксиального контакта с гелеобразующей эмульсией, что способствует полимеризации. В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанная гелеобразующая эмульсия содержит дитиотреитол и сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS) в полипропиленгликоле (ППГ).

[0163] Затем клетки с покрытием/кластеры клеток с покрытием собирают из выходящего потока из устройства для нанесения покрытия. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения после сбора указанные клетки с покрытием и (или) кластеры клеток с покрытием продолжают перемешиваться в течение, например, 1-30, 5-20 или 8-12 минут, чтобы избежать коалесценцию до того, как завершится полимеризация указанного покрытия. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения перемешивание происходит при температуре от 4 до 25°C. В конкретных вариантах осуществления данного изобретения перемешивание происходит при температуре 25°C. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения скорость перемешивания составляет от 50-500 об/мин до 100-300 об/мин. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные клетки с покрытием и (или) кластеры клеток с покрытием продолжают перемешиваться в течение около 7 минут. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные клетки с покрытием и (или) кластеры клеток с покрытием собирают в сосуд и позволяют им осаждаться под действием силы

тяжести. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные клетки с покрытием и (или) кластеры клеток с покрытием выдерживают без перемешивания во внешней ванне, например, 1-30, 5-20 или 8-12 минут, чтобы дать возможность завершиться полимеризации указанного покрытия. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные клетки с покрытием и (или) кластеры клеток с покрытием собирают в сосуде, содержащем минеральное масло и 0,01-0,1% триэтаноламина.

[0164] Может быть желательно отделить указанные клетки с покрытием и (или) кластеры клеток с покрытием от материала покрытия, не содержащего биоматериал. Данное разделение может быть достигнуто любой из ряда методик разделения, основанных на размере или плотности, хорошо известных в данной области техники, например, с помощью градиентного центрифугирования. В определенных вариантах осуществления данного изобретения клетки с конформным покрытием и (или) кластеры клеток с конформным покрытием дополнительно очищают от материала покрытия путем градиентного центрифугирования, включающего в себя следующие этапы:

(a) наслаивание растворов для образования градиента плотности, способного отделить указанный биоматериал с конформным покрытием от указанного материала покрытия, не содержащего биоматериал; (b) внесение указанного биоматериала с конформным покрытием и указанного материала покрытия, не содержащего биоматериал, в указанный градиент плотности; (c) центрифугирование указанного градиента плотности для отделения указанного биоматериала с конформным покрытием от указанного материала покрытия, не содержащего биоматериал; и (d) удаление части указанного градиента, содержащей указанный материал покрытия, не содержащий биоматериал.

[0165] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные растворы, наслоенные для образования указанного градиента, имеют плотность (1) 1-1,1 г/мл, например, 1,042 г/мл, и (2) среды. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения от указанного материала покрытия, не содержащего биоматериал, очищают больше чем 50, 60, 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% указанного биоматериала с покрытием. В определенных вариантах осуществления данного изобретения от указанного материала покрытия, не содержащего биоматериал, очищают больше чем 95% указанного биоматериала с покрытием.

[0166] В определенных вариантах осуществления данного изобретения указанные биоматериалы с конформным покрытием, в частности - клетки, многократно промываю, в определенных вариантах осуществления данного изобретения - в HBSS. После очистки, указанный содержащий клетки биоматериал с конформным покрытием можно культивировать in vitro при соответствующих условиях культивирования.

[0167] Если указанный материал покрытия содержит флуоресцентную метку, указанные клетки с покрытием и (или) кластеры клеток с покрытием можно визуализировать, например, с помощью флуоресцентной микроскопии, флуороцитометрии, технологии проточной цитометрической сортировки клеток или с помощью считывателя флуоресценции планшетов. В некоторых вариантах осуществления

данного изобретения флуоресцентно меченые клетки с конформным покрытием можно обнаруживать и (или) выделять с помощью, например, проточной цитометрии или сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS).

[0168] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения способы согласно данному изобретению увеличены в масштабе, чтобы наносить конформное покрытие на по меньшей мере 50000; 100000; 150000; 200000; 300000; 400000; 500000; 600000; 700000; 800000; 900000; или 1000000 клеток и (или) кластеров клеток одновременно. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанное увеличение в масштабе достигается путем выполнения способов согласно данному изобретению в серии камер. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения способы согласно данному изобретению могут быть увеличены в масштабе путем сборки серии параллельных вертикальных камер, например, в радиальной конфигурации, в которой радиальный поток в каждую камеру подает водную фазу в каждую из отдельных камер с сопоставимыми гидродинамическими характеристиками потока. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные клетки с покрытием и (или) кластеры клеток с покрытием и материал покрытия, не содержащий биоматериал, из каждой камеры собирают в отдельные контейнеры. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанные клетки с покрытием и (или) кластеры клеток с покрытием и материал покрытия, не содержащий биоматериал, из каждой камеры собирают в один контейнер и одновременно очищают.

[0169] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения способы согласно данному изобретению обеспечивают нанесение конформного покрытия на больше чем 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% биоматериала, внесенного в указанное устройство для нанесения покрытия. В определенных вариантах осуществления данного изобретения представленные способы обеспечивают нанесение конформного покрытия на больше чем 95% внесенного биоматериала.

[0170] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения жизнеспособность и функцию клеток с покрытием и (или) кластеров клеток с покрытием оценивают любым из ряда способов, хорошо известных в данной области техники, например, анализом MTT, окрашиванием в отношении живых/мертвых клеток и (или) (для островков) на основании статической стимулированной глюкозой секреции инсулина, или перифузией. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанную оценку выполняют до имплантации указанных клеток. В тех случаях, в которых клетки с покрытием представляют собой островки, защиту от иммунной системы для трансплантированных островков с конформным покрытием можно оценить, например, путем мониторинга уровня глюкозы и (или) массы тела пациента с трансплантатом, уровней С-пептида в сыворотке крови, гемоглобина A1c и (или) путем гистологической оценки.

[[0171] В данном изобретении дополнительно представлены способы лечения

нарушения у пациента, включающие в себя этап имплантации указанному пациенту биоматериала с конформным покрытием, изолированного с помощью способов, указанных в данном документе. Такие нарушения включают в себя следующие, но не ограничиваются ими: сахарный диабет, гемофилию, почечную недостаточность, амилоидоз, нарушения иммунной системы, воспаления, хроническую боль, артрит, гипертензию, нарушения нервной системы, нарушения обмена веществ, эндокринные нарушения, лимфопролиферативные нарушения, миелопролиферативные нарушения, миелодиспластические синдромы, нарушения стволовых клеток, нарушения фагоцитов, гистиоцитарные нарушения, аномалии эритроцитов или тромбоцитов, нарушения плазматических клеток, острые лейкозы, хронические лейкозы, злокачественные новообразования (карциному молочной железы, саркому Юинга, нейробластому, почечно-клеточную карциному и т. д.), гипотиреоз, гипопитуитаризм, гипогонадизм, недостаточность трансплантата, реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ), веноокклюзионную болезнь, побочные эффекты предтрансплантационной химиотерапии (такие как чрезмерное кровотечение, бесплодие и почечные, а также легочные и сердечные осложнения) и другие нарушения и заболевания, которые будут распознаны квалифицированным практиком.

[0172] При употреблении в контексте данного документа термин «пациент» относится к реципиенту терапевтического лечения и включает в себя всех животных. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный пациент представляет собой млекопитающее. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный пациент представляет собой примата. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный пациент представляет собой человека.

[0173] Биоматериал с конформным покрытием, полученный с помощью способов, представленных в данном документе, моно имплантировать в любое подходящее место внутри пациента. Указанный биоматериал может быть имплантирован в живые или предварительно васкуляризованные участки; в физиологические или трансформированные участки; и в ткани, и органы, или рядом с ними. В определенных вариантах осуществления данного изобретения расположение указанного имплантата может быть, например, внутрисальниковым (в сальниковом мешке), подкожным, внутрибрюшинным, предбрюшинным, внутримышечным, внутрилимфоузловым или почечно-субкапсулярным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения расположение указанного имплантата является подкожным. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный имплантат располагается не в брюшной полости.

[0174] В некоторых вариантах осуществления данного изобретения биоматериал с конформным покрытием, полученный с помощью способов, представленных в данном документе, помещают в устройство до имплантации пациенту, чтобы уменьшить иммунный ответ указанного пациента и (или) продлить выживание клеток. Указанное устройство может представлять собой любое устройство, подходящее для имплантации

биологического материала пациенту, например, устройство, описанное в патентном документе США № 2006/0024276 или в патенте США № 6716246, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения указанный биоматериал с конформным покрытием имплантируют внутри натурального или синтетического, биоразлагаемого или не биоразлагаемого каркасного субстрата, или смежно с ним.

[0175] Следующие ниже примеры являются иллюстрацией конкретных вариантов осуществления данного изобретения и их различных применений. Они представлены только с целью пояснения и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие объем или содержание данного изобретения.

ПРИМЕРЫ

[0176] Процедуры конформного покрытия, представленные в данном документе, являются улучшениями относительно процедур, описанных в заявке на патент США № 15/478320, поданной 4 апреля 2017 года, заявке на патент США № 14/114690, международной заявке на патент № PCT/US2012/035696 и предварительной заявке на патент США № 61/480513, содержание каждой из которых явным образом включено в данный документ посредством ссылки. Указанные улучшения включают в себя, среди прочего, отсутствие воздействия на биоматериалы, в частности на клетки и, в особенности, на островковые клетки, условий низкого pH (т. е. меньше чем около pH 5) и устранение усилителей вязкости в водных фазах, содержащих указанные биоматериалы, что приводит к улучшению функционирования инкапсулированных островков и биосовместимости покрытия.

[0177] **Материалы, используемые в улучшенных процедурах нанесения конформного покрытия:**

Перечень единиц
10 кДа 8-плечевой 75% функционализированный ПЭГ-малеимид (концентрация 12,5% мас./об.) в HBSS-/-
25 мг/мл дитиотреитол в HBSS-/-
10X раствор 2 кДа ПЭГ-дитиола (ПЭГ-SH) (42,9% мас./об.)
1X ПЭГ-SH (4,29% мас./об.)
Полипропиленгликоль (Mn ~4000) с 10% Span80
Легкое минеральное масло
Выделенные островки Лангерганса
Лабораторные стаканы (150 мл, 1 л)
Устройство для нанесения конформного покрытия

Шприцевой насос
Перистальтический насос
Трубки Tygon для перистальтического насоса
Жесткие трубки для шприцевого насоса
Шприц Гамильтона
Катетер 16G (SurFlash®)
Раствор 1H HCl
Раствор 1H NaOH

Реактивы, использованные в улучшенных процедурах нанесения конформного покрытия:

[0178] Гелеобразующая эмульсия: раствор дитиотреитола в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) (25 мг/мл дитиотреитола) медленно добавляли путем перемешивания к 500 мл полипропиленгликоля (ППГ) до образования эмульсии (молочно-белого цвета) и равномерно перемешивали.

[0179] Раствор минимально сшитого ПЭГ-МАЛ: к 400 мкл 12,5% мас./об. ПЭГ-МАЛ (10 кДа, 8 плеч, функционализация 75%) добавляли 2,6 мкл 1H HCl и затем перемешивали вихревым способом (что предотвращало мгновенное гелеобразование из-за неоднородного перемешивания), затем добавляли 22,22 мкл 10X раствора ПЭГ-SH путем перемешивания. Это обеспечило получение раствора минимально сшитого ПЭГ-МАЛ.

Отдельно добавляли 1 мкл 1H NaOH к 400 мкл HBSS, что затем добавляли к 401 мкл указанного раствора минимально сшитого ПЭГ-МАЛ, а затем полностью перемешивали вихревым способом. Затем данную смесь оставляли для частичного гелеобразования, в ходе чего она превращалась в вязкую жидкость, в течение 30 минут. Данную стадию гелеобразования можно выполнять на протяжении 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 или 45 минут.

Настройка устройства

[0180] Компоненты устройства для нанесения покрытия, как проиллюстрировано на фиг. 1 и фиг. 1A, очищали и высушивали, а затем повторно собирали и стерилизовали (как правило, в автоклаве), за исключением капилляра, винта капилляра и ловушки для пузырьков. В частности, три указанные детали, показанные на фиг. 1A, панели (ii), (iii) и (iv), привинчивали друг к другу. Перед привинчиванием поверх детали, показанной на фиг. 1A (iii), устанавливали пару резиновых клапанов. Стеклянный капилляр вставляли в нижнее отверстие детали, показанной на фиг. 1A, панель (iv), и закрепляли на месте. Для каждого препарата промывали и стерилизовали новые, неиспользованные трубки Tygon для насоса и жесткие трубки (для использования со шприцевым насосом). Аналогичные процедуры промывки и стерилизации выполняли для шприца Гамильтона. Все остальные

этапы данной процедуры выполняли в ламинарном боксе для культивирования клеток, в котором указанное устройство собирали так, как показано на фиг. 1 и 1А. Затем трубку капилляра монтировали и закрепляли на месте с помощью винта капилляра, а под капилляр помещали 1 емкость для отходов, как правило, коническую трубку объемом 50 мл. Ловушку для пузырьков также устанавливали на данном устройстве, как показано на фиг. 1 и 1А.

[0181] Затем стеклянный шприц Гамильтона заполняли минеральным маслом без создания пузырьков газа, а жесткую трубку подготавливали путем заполнения минеральным маслом, удобно используя шприц luer lock объемом 5 мл, а затем указанную заправленную трубку подсоединяли к указанному шприцу Гамильтона. Затем указанный шприц закрепляли на указанном шприцевом насосе, как показано на фиг. 1 и 1А, следя за тем, чтобы в шприце оставалось не меньше чем 2 мл минерального масла для обеспечения надлежащего заполнения катетера. Дистальный конец указанной жесткой трубки удобно закреплен на стальной подставке, как показано на фиг. 1А.

[0182] Затем трубку Tygon присоединяли к перистальтическому насосу и приводили в контакт с конической пробиркой объемом 50 мл (или другим сосудом), содержащей раствор ППГ и 10% Span 80. Затем дистальный конец указанной трубки Tygon присоединяли к указанному устройству для нанесения покрытия, как показано на фиг. 1 и 1А, и заполняли указанный насос. Затем указанный насос доводили до скорости потока 3,5 мл/мин путем калибровки количества, подаваемого, например, в конические пробирки объемом 50 мл, которое должно составлять 3,5 г.

[0183] Затем стерильный катетер присоединяли к концу указанной жесткой трубки, и устанавливали скорость потока указанного шприцевого насоса на 2 мл/мл. Указанный катетер заполняли, чтобы убедиться, что все пузырьки воздуха удалены и в шприце осталось не меньше чем 1 мл минерального масла.

[0184] Наконец, два наконечника микропипетки с широким отверстием объемом 200 мкл прикрепляли к указанному стеклянному капилляру, удобно используя застежки-молнии на противоположных концах указанного капилляра, и две перистальтические трубки, прикрепленные прикрепляли к указанным наконечникам с широким отверстием, прикрепленным к указанному стеклянному капилляру. Затем собранный узел трубка/капилляр монтировали на указанный перистальтический насос, как показано на фиг. 1 и 1А, и концы указанных перистальтических трубок погружали в указанную гелеобразующую эмульсию. Фотография полностью собранного устройства показана на фиг. 1В. В дополнение к этому, было разработано приспособление, изготовленное на заказ посредством 3D-печати, для замены узла, описанного ранее в данном параграфе (фиг. 1С). Кратко, данное приспособление предназначено для скольжения по указанному стеклянному капилляру и прикрепляться к нему снизу, и имеет два зазубренных входа, к которым можно напрямую прикрепить указанную перистальтическую трубку.

Процесс конформного покрытия:

[0185] На островковые клетки поджелудочной железы наносили покрытие в

соответствии со следующим протоколом. Около 10000 эквивалентов островковых клеток (ЭОК) в среде для культивирования клеток вводили в стерильные пробирки Эппендорф с низкой связываемостью объемом 1,5 мл и центрифугировали их при 150 единицах относительной центрифужной силы в течение 1 минуты для осаждения клеток. После удаления надосадочной среды для культивирования клеток островковые клетки ресуспендировали в 100 мкл минимально сшитого ПЖГ-МАЛ (при нейтральном pH), удобно используя наконечник 200 мкл с широким отверстием, прикрепленный к пипетке P100. Затем клетки извлекали в катетер 16G (Surflash®) со скоростью извлечения 100 мкл в минуту с помощью прецизионного шприцевого насоса. Затем в капилляр вводили гелеобразующую эмульсию и обеспечивали ее поток в стакан для сбора объемом 150 мл со скоростью потока 4 мл/мин. Ловушку для пузырьков открывали, чтобы обеспечить удаление пузырьков, и смесь ППГ/Span 80 вводили в данное устройство с откалиброванной скоростью 3,5 мл/мин. (Ловушку для пузырьков закрывали, как только пузырьки, образовавшиеся в результате введения различных жидких компонентов, удалялись из данного устройства.)

[0186] Катетер 16G (Surflash®), содержащий островковые клетки, затем вставляли в верхнюю часть данного устройства, и содержащую островки суспензию ПЭГ-МАЛ вводили в капилляр с помощью шприцевого насоса Harvard со скоростью 15 мкл в минуту. Процедуре покрытия давали продолжаться около 7 минут, наблюдая за переходом от капельного распыления к струйному распылению на протяжении всей процедуры, чтобы обеспечить стабильный переход. После этого указанные 2 перистальтических насоса и шприцевой насос Harvard отключали, и островкам с конформным покрытием, собранным в стакан для сбора объемом 150 мл, давали возможность желироваться в течение 12 минут.

Процесс очистки

[0187] Собранный сток от указанной процедуры нанесения конформного покрытия медленно вливали в 200 мл минерального масла, как правило содержащегося в лабораторном стакане объемом 1 л, при скорости перемешивания 240 об/мин. Затем указанный сосуд, содержащий островки, промывали HBSS-/- и объем емкости, содержащей островковые клетки и минеральное масло, доводили до общего объема 500 мл с помощью HBSS-/-, и продолжали перемешивание с той же скоростью в течение двух минут. После этого данную смесь разделяли на две порции объемом по 250 мл в конические пробирки и подвергали центрифугированию в течение 5 мин при 1500 об/мин, оставляя содержащий клетки осадок объемом ~5 мл.

[0188] Данный осадок клеток переносили в коническую пробирку объемом 50 мл, пробирки, в которых осуществили осаждение, промывали HBSS-/- и полученный смыв добавляли в каждую коническую пробирку объемом 50 мл. Объем указанных содержащих островковые клетки конических пробирок на 50 мл доводили до 50 мл с помощью HBSS-/- и подвергали центрифугированию в течение 5 мин при 1000 об/мин. Осажденные клетки, полученные в результате данного центрифугирования, переносили в пробирки объемом 15

мл, пробирки объемом 50 мл, в которых осуществили осаждение, промывали HBSS-/- и полученный смыв добавляли в указанные пробирки объемом 15 мл. Объем каждой из указанных содержащих островковые клетки конических пробирок на 15 мл доводили до 15 мл с помощью HBSS-/- и подвергали центрифугированию в течение 5 мин при 1000 об/мин. Затем надосадочную жидкость удаляли, и клетки инкубировали с 250 мкл 1X ПЭГ-SH в течение 1 минуты, и через 1 минуту объем каждой из данных конических пробирок на 15 мл доводили до объема 15 мл с помощью HBSS-/- и подвергали центрифугированию при 1000 об/мин в течение 1 минуты. Затем клеточный осадок, содержащий островковые клетки, покрытые конформным покрытием, трижды промывали в 1 мл среды для культивирования клеток и каждый раз осаждали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 1 минуты. Затем промытые островковые клетки, покрытые конформным покрытием, высевали в 10 мл среды для культивирования клеток в 10-сантиметровую чашку Петри.

Сравнения жизнеспособности и функциональности клеток:

Влияние способов предшествующего уровня техники на жизнеспособность и функциональность клеток

[0189] Применяя способы нанесения конформного покрытия, указанные в заявке на патент США № 15/478320, поданной 4 апреля 2017 года, заявке на патент США № 14/114690, международной заявке на патент № PCT/US2012/035696 и предварительной заявке на патент США № 61/480513, содержание каждой из которых явным образом включено в данный документ посредством ссылки, на островки от нечеловекообразных приматов (НЧП) нанесли конформное покрытие из ПЭГ и самособирающегося амфифильного пептида при низком pH (показано на фиг. 2, панель A) и выявили, что данные островки имеют слабый ответ в анализах статической (СГСИ) и динамической (перифузия) стимулированной глюкозой секреции инсулина in vitro (фиг. 2, панели B и C). Абсолютные показатели секреции инсулина и соотношения стимуляции островков КП НЧП были ниже, чем таковые у островков без покрытия. Соответственно, островки КП НЧП не смогли обратить сахарный диабет вспять после трансплантации в жировую подушку или капсулу почки мышей NSG (показано на фиг. 2, панель D), хотя обнаруживаемый C-пептид человека был выявлен у всех мышей-реципиентов (фиг. 2, панель E). Дальнейшие сравнительные исследования показали, что жизнеспособность островковых клеток снижалась при pH, как показано на фиг. 3.

Влияние способов предшествующего уровня техники на биосовместимость у крупных животных

[0190] У НЧП с сахарным диабетом была продемонстрирована лапароскопическая имплантация островков КП НЧП в сальниковую сумку с использованием биологических каркасов (фиг. 4, панель A) с использованием предельной дозы (5 тыс. ЭОК/кг) полностью аллогенных островков КП НЧП и иммуносупрессии без стероидов. Тем не менее, наблюдалась лишь минимальная функция островков КП НЧП в виде снижения потребности в инсулине и обнаруживаемого C-пептида после трансплантации (фиг. 4,

панель B). Гистологическое исследование трансплантатов, эксплантированных через 21 сутки после трансплантации, выявило наличие инсулин-положительных островков КП НЧП в трансплантате и отсутствие инфильтрации Т-клетками (фиг. 4, панель D). Однако биосовместимость ПЭГ/ПЭГ-SH/пептида, полученного с использованием способа предшествующего уровня техники «с низким pH», в сальниковом мешке была низкой. Патологоанатомическое исследование выявило обширную, хроническую, активную, тяжелую воспалительную реакцию, характеризующуюся большим числом многоядерных гигантоцитов и фиброплазией (фиг. 4, панель C).

Тестирование нового способа нанесения конформного покрытия: улучшенные жизнеспособность и функциональность клеток

[0191] Способы нанесения конформного покрытия, представленные в данном документе: (i) улучшают биосовместимость покрытий путем устранения компонента, повышающего вязкость, и получения чистого ПЭГ-покрытия, и (ii) позволяют наносить покрытие при физиологическом pH для максимизации жизнеспособности и функциональности островков, на которые нанесено покрытие (включительно с островками от НЧП). Изменения относительно способов, представленных в заявках предшествующего уровня техники, включают в себя повышение вязкости водной фазы, которая может включать в себя, среди прочего, островковые клетки, на которые необходимо нанести покрытие, путем минимального сшивания 20% сшиваемых плеч сшивающего агента ПЭГ-МАЛ-ПЭГ-SH, что обеспечивает вязкость, необходимую для струйного распыления данной водной фазы в масляной фазе для образования конформного покрытия. В представленных в данном документе способах полное гелеобразование ПЭГ-МАЛ вокруг островков происходит ниже по потоку, после распада струи, когда происходит образование капсулы, путем подачи эмульсии раствора дитиотреитола (ДТТ) в полипропиленгликоле и поверхностно-активного вещества Span80 коаксиально к водной фазе, но ниже по потоку от части устройства, где происходит распад струи водной фазы.

[0192] Способ нанесения покрытия, переработанный, чтобы обеспечить КП с чистым ПЭГ (для улучшения биосовместимости) и при физиологическом pH (для улучшения функциональности островков НЧП), тестировали как с островками человека, так и с островками НЧП, и обнаружили повышенный сигнал в анализе стимулированной глюкозой секреции инсулина in vitro как для островков НЧП, так и для островков человека. Результаты показаны на фиг. 5, на которой видно, что на островковые клетки человека было эффективно нанесено покрытие способами, представленными в данном документе (фиг. 5, панель A), они были жизнеспособными (фиг. 5, панель B) и демонстрировали функциональность in vitro (фиг. 5, панели C-F) и in vivo (фиг. 5, панели G-I), которая была сопоставима с таковой у островков без покрытия, а часто - выше, чем у островков без покрытия. При данном способе абсолютная секреция инсулина КП-островками не была сниженной по сравнению с островками без покрытия, а толерантность к глюкозе у животных с сахарным диабетом улучшалась.

Трансплантация островков человека, на которые нанесли конформное покрытие при физиологическом pH, в НЧП

[0193] Применяя способ, представленный в данном документе, в сальниковую сумку НЧП с сахарным диабетом трансплантировали КП-островки человека с ко-стимуляторной блокадой. Orencia® (20 мг/кг в/в) вводили в послеоперационные сутки (ПОС) -1, 0, 3, 7, 14, 21 и 28, и еженедельно после этого, и вводили антитело против CD154 (20 мг/кг в/в) в ПОС -1, 0, 3, 7, 14, 21 и 28, и каждые 10 суток после этого. В ПОС 0, используя процедуру лапаротомии, в сальниковую сумку животного ввели 20358 эквивалентов островковых клеток (ЭОК)/кг. Плановое вскрытие провели в ПОС 55. Оценивали осуществимость процедуры лапаротомии для имплантации островков КП НЧП в сальниковую сумку яванской макаки с сахарным диабетом (фиг. 6, панель A). Анализ потребности в экзогенном инсулине (ПЭИ, сплошная линия), уровня глюкозы в крови (точки) и С-пептида у реципиента островков КП НЧП продемонстрировал минимальную функцию трансплантированных КП-островков человека при снижении уровней глюкозы в крови (фиг. 6, панели B и C). Проводили гистологическую оценку эксплантированных трансплантатов КП НЧП и оценку реваскуляризации трансплантата (фиг. 6, панели D и E).

Трансплантация сингенных островков от крысы линии Льюис в сальник иммунокомпетентной крысы линии Льюис с сахарным диабетом

[0194] У крыс линии Льюис индуцировали сахарный диабет (уровень глюкозы в крови > 250 мг/дл) путем инъекции стрептозотоцина. 2500 островков крысы линии Льюис, не покрытых оболочкой или покрытых конформной оболочкой, трансплантировали в сальниковую сумку крыс линии Льюис с сахарным диабетом. Сахарный диабет мониторировали путем измерения уровня глюкозы в крови вплоть до послеоперационных суток (ПОС) 36 и с помощью внутрибрюшинного теста на глюкозотолерантность в ПОС 30. Панель A: Оценивали уровень глюкозы в крови реципиентов островков крысы линии Льюис, не покрытых оболочкой и покрытых конформной оболочкой (фиг. 7, панель A). В послеоперационные сутки (ПОС) 30 выполняли внутрибрюшинный тест на глюкозотолерантность (ВБТГТ) у реципиентов островков крысы линии Льюис, не покрытых оболочкой и покрытых конформной оболочкой, и анализировали соответствующие площади под кривыми (фиг. 7, панели B и C). Также анализировали уровни С-пептида натощак и после стимуляции при ВБТГТ у реципиентов островков крысы линии Льюис, не покрытых оболочкой (сплошная линия, точечные маркеры) и покрытых конформной оболочкой (пунктирная линия, квадратные маркеры) (фиг. 7, панель D).

Воздействие in vivo аллогенных кластеров клеток инсулиномы MIN6, трансплантированных мышам NOD со спонтанным сахарным диабетом

[0195] Клетки MIN6 собирали в кластеры посредством суспензионной культуры в течение 4 суток, а затем наносил на них конформное покрытие. Мышам с сахарным диабетом без ожирения (мышам NOD), у которых спонтанно развился сахарный диабет с уровнем глюкозы в крови > 250 мг/дл, трансплантировали кластеры клеток инсулиномы

MIN6 либо без покрытия, либо с конформным покрытием (КП), в дозе 4000 ЭОК/мышь. Функциональность и выживаемость трансплантата мониторировали путем оценки смертности мышей и измерения уровней С-пептида в крови мышей - реципиентов островков без покрытия или КП-островков, а также путем гистологической оценки трансплантата. На фиг. 8, панель А, показаны полученные способом фазово-контрастной микроскопии изображения кластеров MIN6 без покрытия (и с конформным покрытием). На фиг. 8, панель В, показаны полученные способом конфокальной микроскопии изображения кластеров MIN6 с конформным покрытием с окрашиванием против ПЭГ и со смежными ортогональными проекциями, показывающими полноту капсулы в трех измерениях. Оценивали смертность реципиентов кластеров MIN6 без покрытия и с конформным покрытием, показывающую улучшенную выживаемость кластеров КП (фиг. 8, панель С). (Панель D) Также оценивали уровни случайного С-пептида не натощак у реципиентов кластеров MIN6 без покрытия и с конформным покрытием (фиг. 8, панель D). Проводили гистологическую оценку эксплантированных трансплантатов КП-кластеров MIN6 и анализ выживаемости кластеров клеток внутри КП-капсул (фиг. 8, панель Е).

Оценка аутотрансплантата островков с конформным покрытием в модели сахарного диабета у свиней

[0196] Поросятам породы йоркшир-ландрас (Yorkshire-Landrace) возрастом около 8 недель имплантируют по 2-4 клеточных мешка (8-камерных или 10-камерных) (Cell Pouch™, Sernova Corp, Лондон, провинция Онтарио, Канада) в глубокое подкожное пространство за 4-8 недель до 90% панкреатэктомии и выделения островков (выполняли с помощью стандартных процедур). Для обеспечения строгого гипергликемического состояния свиньям можно внутривенно вводить стрептозотоцин в дозе 150 мг/кг после панкреатэктомии. Выделенные островки подвергают процессу нанесения конформного покрытия с последующим анализом по критериям выпуска. После подтверждения того, что островки с конформным покрытием соответствуют критериям выпуска, указанные островки трансплантируют в камеры предварительно васкуляризованного клеточного мешка приблизительно через пять суток после их выделения, что обеспечивает время для восстановления после панкреатэктомии и подтверждения диабетического состояния. Функцию трансплантата оценивают с помощью двухнедельных измерений уровня глюкозы в крови и массы тела, а также ежемесячных внутривенных тестов на глюкозотолерантность (ВВТГТ) по мере необходимости. Измеряют значения С-пептида в крови натощак и при ВВТГТ, и сравнивают их с контролем, измеренным до трансплантации. В конце исследования клеточные мешки эксплантируют и препарируют с помощью стандартных гистологических методик для оценки окрашивания островков на предмет инсулина, оценки развития микрососудов в камерах клеточных мешков и жизнеспособности островковых клеток. После эксплантации клеточных мешков проводят измерения вышеуказанных параметров эффективности для подтверждения потери контроля уровня глюкозы в крови. Можно оценивать скорость исчезновения глюкозы,

анализировать площадь под кривой уровня глюкозы в крови и уровни С-пептида.

Оценка донорских островков с конформным покрытием в модели сахарного диабета у свиней с аллотрансплантатом

[0197] Самкам карликовых свиней породы геттинген (Gottingen) возрастом около одного года имплантируют по два клеточных мешка (8-камерных или 10-камерных) Cell Pouch™ (Sernova Corp, Лондон, провинция Онтарио, Канада) в глубокое подкожное пространство за шесть-восемь недель до введения им аллотрансплантата островков. Донорские островки получают и выделяют стандартными процедурами из самцов - бывших осеменителей свиней породы йоркшир-ландрас возрастом > 2 лет. Выделенные островки подвергают процессу нанесения конформного покрытия и подтверждают их соответствие критериям выпуска. За одну-три недели до трансплантации индуцируют сахарный диабет химическим путем, вводя животным внутривенно по 150 мг/кг стрептозотоцина. Чтобы удостовериться в строгом гипергликемическом состоянии, перед трансплантацией конформных островков проводят диабетические внутривенные тесты на глюкозотолерантность (ВВТГТ). Карликовым свиньям-реципиентам трансплантируют аллогенные островки с конформным покрытием в дозе, варьирующей от 2500-10000 ЭОК/кг, в предварительно васкуляризованный подкожный клеточный мешок Cell Pouch™ после хирургического вскрытия клеточного мешка и последовательного удаления пробок. Функцию трансплантата оценивают с помощью двухнедельных измерений уровня глюкозы в крови и массы тела, а также ежемесячных внутривенных тестов на глюкозотолерантность (ВВТГТ) по мере необходимости. Измеряют значения С-пептида в крови натощак и при ВВТГТ, и сравнивают их с контролем, измеренным до трансплантации. В конце исследования клеточные мешки эксплантируют и препарируют с помощью стандартных гистологических методик для оценки окрашивания островков на предмет инсулина и других гормонов, важных для контроля уровня глюкозы в крови (например, глюкагона, соматостатина), и оценки развития микрососудов внутри камер клеточных мешков. После эксплантации клеточных мешков проводят измерения вышеуказанных параметров для подтверждения потери контроля уровня глюкозы в крови. Также можно измерять скорость исчезновения глюкозы, анализировать площадь под кривой уровня глюкозы в крови и уровни С-пептида.

Оценка имеющих конформное покрытие глюкозо-чувствительных островков человека, полученных из стволовых клеток, в модели сахарного диабета у свиней с ксенотрансплантатом

[0198] Самкам карликовых свиней породы геттинген возрастом около одного года имплантируют по два клеточных мешка (8-камерных или 10-камерных) Cell Pouch™ (Sernova Corp, Лондон, провинция Онтарио, Канада) в глубокое подкожное пространство за шесть-восемь недель до введения им имеющих конформное покрытие глюкозо-чувствительных островков человека, полученных технологией стволовых клеток (iPSC или ESC). Перед их трансплантацией продуцирующие инсулин клетки, полученные из стволовых клеток, или их кластеры, подготавливают и подвергают процессу конформного

покрытия с последующим подтверждением того, что клетки соответствуют стандартным критериям выпуска. За одну-три недели до трансплантации клеток с конформным покрытием, полученных из стволовых клеток, индуцируют сахарный диабет химическим путем, вводя животным внутривенно по 150 мг/кг стрептозотоцина. Чтобы удостовериться в строгом гипергликемическом состоянии, перед трансплантацией клеток с конформным покрытием, полученных из стволовых клеток, проводят диабетические внутривенные тесты на глюкозотолерантность (ВВТГТ). Карликовым свиньям-реципиентам трансплантируют аллогенные островки с конформным покрытием или их кластеры в дозе, варьирующей от 2500-10000 ЭОК/кг (или эквивалентной), в камеры предварительно васкуляризованного подкожного клеточного мешка Cell Pouch™ после хирургического вскрытия камер клеточного мешка и последовательного удаления пробок. Функцию трансплантата оценивают с помощью двухнедельных измерений уровня глюкозы в крови и массы тела, а также ежемесячных внутривенных тестов на глюкозотолерантность (ВВТГТ) по мере необходимости. Измеряют значения С-пептида в крови натощак и при ВВТГТ, и сравнивают их с контролем, измеренным до трансплантации. В конце исследования клеточные мешки эксплантируют и препарируют с помощью стандартных гистологических методик для оценки окрашивания островков на предмет инсулина и других гормонов, важных для контроля уровня глюкозы в крови (например, глюкагона, соматостатина), и оценки развития микрососудов внутри камер клеточных мешков, а также для подтверждения выживания клеток человека, полученных из стволовых клеток. После эксплантации клеточных мешков проводят измерения вышеуказанных параметров для подтверждения потери контроля уровня глюкозы в крови. Также в данной модели сахарного диабета с ксенотрансплантатом можно измерять скорости исчезновения глюкозы, анализировать площадь под кривой уровня глюкозы в крови и уровни С-пептида, используя модель ксенотрансплантата клеток человека с конформным покрытием для анализа технологии защиты стволовых клеток человека с конформным покрытием от атаки иммунной системы.

Оценка донорских островков с конформным покрытием в модели сахарного диабета у сингенных мышей

[0199] За четыре-пять недель до трансплантации клеток, чтобы индуцировать неоваскуляризацию, имплантируют однокамерный мини-КМ (Sernova Corp, Лондон, провинция Онтарио, Канада) подкожно в нижний брюшной квадрант самцам мышей BALB/c массой около 25 г. Кратко, для размещения КМ делают небольшой поперечный разрез, позволяющий создать небольшой карман ниже линии разреза. Как только создается достаточное пространство, КМ имплантируют в это пространство так, чтобы отверстие находилось в краниальном положении. Затем разрез закрывают хирургической скобой (Autoclip; Becton Dickinson, г. Спаркс, штат Мэриленд, США). Островки поджелудочной железы выделяют у самцов мышей BALB/c в возрасте от 8 до 12 недель. Животные содержатся в обычных условиях, имея свободный доступ к пище и воде. Перед панкреатэктомией общий желчный проток канюлируют иглой 27G и в поджелудочную

железу вводят 0,125 мг/мл холодного фермента либераза Liberase TL Research Grade в сбалансированном солевом растворе Хэнкса. Островки выделяют путем переваривания поджелудочной железы в пробирке Falcon объемом 50 мл, помещенной на водяную баню при температуре 37°C на 14 минут при легком встряхивании. После фазы переваривания островки очищают от продуктов переваривания поджелудочной железы путем центрифугирования в градиенте плотности Histopaque (1,108, 1,083 и 1,069 г/мл). После выделения островки подвергают процессу конформного покрытия при подготовке к трансплантации в клеточный мешок и подтверждают их соответствие критериям выпуска.

[0200] От трех до 5 суток до трансплантации у мышей, которым будут имплантировать клеточный мешок (КМ), вызывают сахарный диабет путем химической индукции - внутрибрюшинным введением стрептозотоцина в дозе 185 мг/кг в ацетат-фосфатном буфере, pH 4,5. Животные считаются имеющими сахарный диабет, если уровень глюкозы в их крови превышает 15 ммоль/л в 2 последовательных ежедневных анализах.

[0201] Полную массу островков (500 островков с конформным покрытием ± 10% на каждую мышь-реципиента с сахарным диабетом) или массу пограничных островков (200 островков с конформным покрытием ± 10% на каждого реципиента с сахарным диабетом) с чистотой 90% ± 5% аспирируют в пробирку из полиэтилена-50 с помощью микрошприца и центрифугируют для получения клеточного осадка, пригодного для трансплантации.

[0202] Могут быть проведены исследование уровней доз для изучения эффективности полной дозы островков (500 островков с конформным покрытием) в обращении сахарного диабета вспять при трансплантации в КМ и исследование массы пограничных островков (200 островков с конформным покрытием), трансплантированных в КМ.

[0203] Для трансплантации островков в КМ на коже делается небольшой разрез, чтобы получить доступ к краниальной части устройства. Затем удаляют пробку, открывая васкуляризованную тканевую камеру, в которую вводят препарат островков. КМ закрывают путем аппроксимации 2 слоев краниальных частей КМ 4-0 викриловым швом. Затем кожный разрез закрывают хирургической скобой (Autoclip; Becton Dickinson).

[0204] Функцию трансплантата островков у реципиентов оценивают дважды в неделю путем измерения уровня глюкозы в крови (ммоль/л) не натощак с помощью портативного глюкометра во всех исследуемых группах. Функцию трансплантата и обращение сахарного диабета вспять определяют как 2 последовательных показателя уровня глюкозы в крови меньше чем 11,1 ммоль/л с сохранением до завершения исследования. В дополнение к этому, проводят тесты на глюкозотолерантность у мышей с эугликемией вплоть до 100 суток после трансплантации, чтобы дополнительно оценить метаболическую способность. Реципиенты голодают в течение ночи, прежде чем получить внутрибрюшинный болюс глюкозы (3 г/кг). Уровни глюкозы в крови измеряют на базовом уровне (время 0) и через 15, 30, 60, 90 и 120 минут после инъекции, что

позволяет рассчитать площадь под кривой (ППК уровня глюкозы в крови) и проанализировать ее между группами трансплантатов.

[0205] Чтобы подтвердить эугликемию, зависящую от трансплантата, у животных с функциональными трансплантатами проводят эксплантацию их трансплантатов островков путем удаления КМ. Эксплантацию КМ начинают путем небольшого разреза кожи. Вентральную поверхность КМ отсекают от дермы, сохраняя целостность окружающей неоваскуляризованной ткани. Дорсальную сторону приживленного островкового устройства рассекают, чтобы обеспечить его полное удаление. Постэксплантационные КМ помещают в 10% забуференный формалин для гистологического анализа, и животных мониторируют на предмет гипергликемии.

[0206] Применяют иммуногистохимию для определения подробностей общей структуры с использованием гематоксилина-эозина, эндотелиальные клетки - для оценки васкуляризации с использованием антител против фактора фон Виллебранда, антитела против инсулина и глюкагона - для выявления присутствия островков внутри КМ. Сразу после эксплантации ткани КМ фиксируют в 10% забуференном формалине на 48 часов, а затем промывают в фосфатно-солевом буфере с окончательной промывкой в 70% этаноле. Ткань рассекают, заливают в парафин и делают срезы толщиной 5 мкм. Репрезентативные срезы тканей окрашивают гематоксилином-эозином. Дополнительно срезы тканей окрашивают иммунофлуоресцентным способом. Срезы депарафинизируют и обрабатывают термическим извлечением антигена (Target Retrieval Solution, Dako) с последующей промывкой трис-буферным солевым раствором (ТБС) с добавлением твина-20 (ТБС-Т). Срезы блокируют 10% сывороткой козы в ТБС-Т в течение 1 часа при комнатной температуре. Срезы обрабатывают первичным антителом - либо антителом кролика против фактора фон Виллебранда (Millipore AB7356), разведенным 1:100 (ТБС с 1% сыворотки козы), либо антителом морской свинки против инсулина (Dako A0564), разведенным 1:1000 (ТБС с 1% сыворотки козы), либо антителом кролика против глюкагона (AbD Serotec AHP534), разведенным 1:100 (ТБС с 1% сыворотки козы) - в течение 15 часов при температуре 4°C. Срезы промывают в ТБС-Т с последующей обработкой вторичным антителом - либо антителом козы против кролика (Molecular Probes A-11034; Alexa Fluor 488), разведенным 1:1000 (ТБС-Т с 1% сыворотки козы), либо антителом козы против морской свинки (Molecular Probes A-11075; Alexa Fluor 568), разведенным 1:1000 (ТБС-Т с 1% сыворотки козы) - в течение 1 часа при комнатной температуре. Образцы промывают в ТБС-Т, окрашивают с помощью DAPI (1:1000). Для снижения фона аутофлуоресценции срезы обрабатывают 0,3% раствором судана черного (в 70% этаноле) в течение 2 минут, промывают в ТБС и накрывают покровным стеклом с заливочной средой, препятствующей выгоранию флуорофоров. Микроскопию и анализ изображений выполняют с помощью Aperio-Scan Scope Console для световой микроскопии и Zeiss Axio Imager Z1 для флуоресцентной микроскопии, или с помощью аналогичных устройств.

Оценка островков с конформным покрытием, трансплантированных в

имплантированное подкожно преваскуляризованное устройство (Cell Pouch™), для обращения сахарного диабета вспять в модели сингенной крысы

[0207] Самцов крыс линии Льюис (250 г) используют в качестве доноров островков, а самок крыс линии Льюис (вплоть до 200 г) используют в качестве реципиентов трансплантата. Клеточный мешок (1-камерный или 2-камерный; (Sernova Corp, Лондон, провинция Онтарио, Канада) имплантируют подкожно крысам линии Льюис на вентральной стороне в соответствии со спецификациями Sernova Corp. и оставляют минимум на 4 недели для формирования васкуляризованных тканевых камер, подходящих для трансплантации клеток. Через 4 недели после имплантации у крыс-реципиентов индуцируют сахарный диабет введением стрептозотоцина. Крысы с двумя значениями гликемии не натощак > 300 мг/дл в образцах крови, полученных при прокалывании хвоста (глюкометры OneTouch Ultra), считаются имеющими сахарный диабет. Островки от крыс-доноров линии Льюис выделяют путем ферментативного расщепления с последующей очисткой в градиентах плотности с использованием стандартных протоколов. Затем на островки от крыс линии Льюис наносят конформное покрытие. Приблизительно через четверо суток после нанесения покрытия выделенные островки от крыс линии Льюис без покрытия или с конформным покрытием трансплантируют в васкуляризованный клеточный мешок. Для трансплантации островков к клеточному мешку открывают доступ хирургическим путем и удаляют пробку (-и), чтобы обнажить васкуляризованное тканевое пустое пространство, и трансплантируют островки с конформным покрытием или островки без покрытия в камеры клеточного мешка с помощью микропипетки в дозе около 3000-5000 ЭОК на реципиента с сахарным диабетом. Ожидается, что будет оценено несколько доз в разных группах. Уровень глюкозы в крови крыс-реципиентов островков мониторируют не меньше чем три раза в неделю путем прокалывания хвоста и измерения с помощью портативных глюкометров. Функция трансплантата будет определяться как уровень глюкозы натощак < 200 мг/дл и положительный С-пептид крысы, измеренный стандартными методиками. В выбранные моменты времени после трансплантации крысам-реципиентам островковых клеток проводят тест на глюкозотолерантность для оценки эффективности трансплантата. После ночного голодания вводят болюс глюкозы перорально (пероральный тест на глюкозотолерантность [ПТГТ]; 2,5 г/кг) или внутривенно (внутривенный тест на глюкозотолерантность [ВВТГТ]; 0,5 г/кг). Мониторируют значения гликемии и рассчитывают площадь под кривой (ППК) глюкозы крови. Образцы крови крыс берут до (t=0 мин) и через 30 мин после болюсного введения глюкозы и оценивают С-пептид натощак и стимулированный С-пептид. Трансплантированные клеточные мешки выделяют в разных группах введения доз с интервалами от 60 до 300 суток, чтобы подтвердить эффективность в установлении контроля над уровнем глюкозы. Эксплантированные клеточные мешки исследуют путем гистологического анализа на предмет присутствия трансплантированных островков с использованием стандартных гистологических методик для окрашивания против С-пептида, инсулина, глюкагона и т.

д., и для оценки жизнеспособности клеток, а также на предмет других показателей. Эффективность островков без покрытия и островков с конформным покрытием внутри клеточного мешка сравнивают для оценки влияния конформного покрытия на защиту островков от атаки иммунной системы. Эффективность измеряют как способность островков с конформным покрытием в клеточном мешке обращать сахарный диабет вспять (глюкоза крови < 200 мг/дл) после введения трансплантата и поддерживать функцию трансплантата на основании обнаруживаемого С-пептида, а также на основании положительной глюкозотолерантности (ППК во время ТГТ) у сингенных крыс-реципиентов с сахарным диабетом. В дополнение к этому, выжившие продуцирующие гормон трансплантаты идентифицируют путем гистологического анализа для подтверждения выживания трансплантированных в клеточный мешок клеток с конформным покрытием по сравнению с клетками без покрытия.

Оценка островков с конформным покрытием, трансплантированных в имплантированное подкожно преваскуляризованное устройство (Cell Pouch™), для обращения сахарного диабета вспять в модели сахарного диабета у крысы с аллотрансплантатом

[0208] Самок крыс линии Льюис (вплоть до 200 г) используют в качестве реципиентов островков. Самцов крыс линии Вистар Ферт (Wistar Furth, WF) (RT1u) (250 г) приобретают в качестве доноров островков. Клеточный мешок (1-камерный или 2-камерный; (Sernova Corp, Лондон, провинция Онтарио, Канада) имплантируют подкожно самкам крыс линии Льюис на вентральной стороне в соответствии со спецификациями Sernova Corp. и оставляют минимум на 4 недели для формирования васкуляризованных тканевых камер, подходящих для трансплантации клеток. Через 4 недели после имплантации у крыс-реципиентов индуцируют сахарный диабет введением стрептозотоцина. Крысы с двумя значениями гликемии не натощак > 300 мг/дл в образцах крови, полученных при прокалывании хвоста (глюкометры OneTouch Ultra), считаются имеющими сахарный диабет. Островки от самцов крыс-доноров линии Вистар Ферт выделяют путем ферментативного расщепления с последующей очисткой в градиентах плотности с использованием стандартных протоколов. Затем на островки от крыс линии Вистар Ферт наносят конформное покрытие. Приблизительно через четверо суток после нанесения покрытия выделенные островки без покрытия или с конформным покрытием от крыс линии Вистар Ферт трансплантируют в васкуляризованный клеточный мешок. Для трансплантации островков к клеточному мешку открывают доступ хирургическим путем и удаляют пробку (-и), чтобы обнажить васкуляризованное тканевое пустое пространство, и трансплантируют островки с конформным покрытием или островки без покрытия в камеры клеточного мешка с помощью микропипетки в дозе около 3000-5000 ЭОК на реципиента с сахарным диабетом. Ожидается, что будет оценено несколько доз в разных группах. Уровень глюкозы в крови крыс-реципиентов островков мониторируют не меньше чем три раза в неделю путем прокалывания хвоста и измерения с помощью портативных глюкометров. Функция трансплантата будет определяться как уровень

глюкозы натощак < 200 мг/дл и положительный С-пептид крысы, измеренный стандартными методиками. В выбранные моменты времени после трансплантации крысам-реципиентам островковых клеток проводят тест на глюкозотолерантность для оценки эффективности трансплантата. После ночного голодания вводят болюс глюкозы перорально (пероральный тест на глюкозотолерантность [ПТГТ]; 2,5 г/кг) или внутривенно (внутривенный тест на глюкозотолерантность [ВВТГТ]; 0,5 г/кг). Мониторируют значения гликемии и рассчитывают площадь под кривой (ППК) глюкозы крови. Образцы крови крыс берут до (t=0 мин) и через 30 мин после болюсного введения глюкозы и оценивают С-пептид натощак и стимулированный С-пептид. Трансплантированные клеточные мешки выделяют в разных группах введения доз с интервалами от 60 до 300 суток, чтобы подтвердить эффективность в установлении контроля над уровнем глюкозы. Эксплантированные клеточные мешки исследуют путем гистологического анализа на предмет присутствия трансплантированных островков с использованием стандартных гистологических методик для окрашивания против С-пептида, инсулина, глюкагона и т. д., и для оценки жизнеспособности клеток, а также на предмет других показателей. Эффективность островков без покрытия и островков с конформным покрытием внутри клеточного мешка сравнивают для оценки влияния конформного покрытия на защиту островков от атаки иммунной системы. Эффективность измеряют как способность островков с конформным покрытием в клеточном мешке обращать сахарный диабет вспять (глюкоза крови < 200 мг/дл) после введения трансплантата и поддерживать функцию трансплантата на основании обнаруживаемого С-пептида, а также на основании положительной глюкозотолерантности (ППК во время ТГТ) у крыс-реципиентов с сахарным диабетом по сравнению с островками без покрытия. В случае трансплантатов аллогенных островков отторжение трансплантата определяют просто как возврат к гипергликемическому состоянию без голодания, что ожидается в группах с островками без покрытия по сравнению с группами с островками с конформным покрытием. В дополнение к этому, выжившие продуцирующие гормон трансплантаты идентифицируют путем гистологического анализа для подтверждения выживания трансплантированных в клеточный мешок клеток с конформным покрытием по сравнению с клетками без покрытия в данной экспериментальной модели аллотрансплантата, в которой тестируются способности конформного покрытия обеспечивать защиту от иммунной системы.

Оценка островков человека с конформным покрытием, полученных из стволовых клеток, трансплантированных в имплантированное подкожно преваскуляризованное устройство (Cell Pouch™), для обращения сахарного диабета вспять в модели сахарного диабета у крыс с ксенотрансплантатом

[0209] Самок крыс линии Льюис (вплоть до 200 г) используют в качестве реципиентов островков. В данной модели с ксенотрансплантатом кластеры островков, полученные из стволовых клеток человека (iPSC или ESC), генерируют с помощью протокола дифференцировки для получения клеток, продуцирующих инсулин, для

трансплантации в клеточный мешок. Клеточный мешок (1-камерный или 2-камерный; (Sernova Corp, Лондон, провинция Онтарио, Канада) имплантируют подкожно самкам крыс линии Льюис на вентральной стороне в соответствии со спецификациями Sernova Corp. и оставляют минимум на 4 недели для формирования васкуляризованных тканевых камер, подходящих для трансплантации клеток. Через 4 недели после имплантации у крыс-реципиентов индуцируют сахарный диабет введением стрептозотоцина. Крысы с двумя значениями гликемии не натощак > 300 мг/дл в образцах крови, полученных при прокалывании хвоста (глюкометры OneTouch Ultra), считаются имеющими сахарный диабет. Кластеры островков, полученные из стволовых клеток человека, получают с помощью стандартных протоколов. Затем на кластеры островков человека, полученные из стволовых клеток, наносят конформное покрытие. Приблизительно через четверо суток после нанесения покрытия кластеры, полученные из стволовых клеток, без покрытия или с конформным покрытием трансплантируют в васкуляризованный клеточный мешок. Для трансплантации островков к клеточному мешку открывают доступ хирургическим путем и удаляют пробку (-и), чтобы обнажить васкуляризованное тканевое пустое пространство, и трансплантируют островки с конформным покрытием или островки без покрытия в камеры клеточного мешка с помощью микропипетки в дозе около 3000-5000 ЭОК на реципиента с сахарным диабетом (или эквивалент). Ожидается, что будет оценено несколько доз кластеров островков, полученных из стволовых клеток, в разных группах. Уровень глюкозы в крови крыс-реципиентов островков мониторируют не меньше чем три раза в неделю путем прокалывания хвоста и измерения с помощью портативных глюкометров. Функция трансплантата будет определяться как уровень глюкозы натощак < 200 мг/дл и положительный С-пептид крысы, измеренный стандартными методиками. В выбранные моменты времени после трансплантации крысам-реципиентам островковых клеток проводят тест на глюкозотолерантность для оценки эффективности трансплантата. После ночного голодания вводят болюс глюкозы перорально (пероральный тест на глюкозотолерантность [ПТГТ]; 2,5 г/кг) или внутривенно (внутривенный тест на глюкозотолерантность [ВВТГТ]; 0,5 г/кг). Мониторируют значения гликемии и рассчитывают площадь под кривой (ППК) глюкозы крови. Образцы крови крыс берут до (t=0 мин) и через 30 мин после болюсного введения глюкозы и оценивают С-пептид натощак и стимулированный С-пептид. Трансплантированные клеточные мешки выделяют в разных группах введения доз с интервалами от 60 до 300 суток, чтобы подтвердить эффективность в установлении контроля над уровнем глюкозы. Эксплантированные клеточные мешки исследуют путем гистологического анализа на предмет присутствия трансплантированных островков с использованием стандартных гистологических методик для окрашивания против С-пептида, инсулина, глюкагона и т. д., и для оценки жизнеспособности клеток, а также на предмет других показателей. Эффективность ксенотрансплантата островков без покрытия и островков с конформным покрытием внутри клеточного мешка сравнивают для оценки влияния конформного покрытия на защиту островков от атаки иммунной системы. Эффективность измеряют как

способность островков с конформным покрытием в клеточном мешке обращать сахарный диабет вспять (глюкоза крови < 200 мг/дл) после введения трансплантата и поддерживать функцию трансплантата на основании обнаруживаемого С-пептида, а также на основании положительной глюкозотолерантности (ППК во время ТГТ) у крыс-реципиентов с сахарным диабетом по сравнению с островками без покрытия. В случае трансплантатов кластеров островков, полученных из стволовых клеток, отторжение трансплантата определяют просто как возврат к гипергликемическому состоянию без голодания, что ожидается в группах с островками без покрытия по сравнению с группами с островками с конформным покрытием. В дополнение к этому, выжившие продуцирующие гормон трансплантаты идентифицируют путем гистологического анализа для подтверждения выживания трансплантированных в клеточный мешок клеток с конформным покрытием по сравнению с клетками без покрытия в данной экспериментальной модели ксенотрансплантата, в которой тестируются способности конформного покрытия обеспечивать защиту от иммунной системы с использованием продуцирующих инсулин кластеров, полученных из стволовых клеток.

Анализ клеток с конформным покрытием на предмет дополнительных типов клеток и клинические показания

[0210] Используя приведенные выше примеры, следует отметить, что клетки (донорские клетки, технологии получения стволовых клеток), подходящие для различных клинических показаний, можно анализировать на предмет лечения заболевания на моделях ксенотрансплантата, аллотрансплантата и ксеногенных животных. Применимые животные модели можно найти в научной литературе, и можно определять показатели эффективности для проверки конкретного типа клеток и клинических показаний.

ПРОНУМЕРОВАННЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0211] Конкретные варианты осуществления данного изобретения представлены в пронумерованных параграфах, приведенных ниже.

1. Способ конформного покрытия биоматериалов материалом покрытия, включающий в себя следующие этапы:

(a) впрыскивание водной фазы в коаксиальную масляную фазу в устройстве для нанесения покрытия, сконфигурированном таким образом, чтобы обеспечить переход от капельного распыления к струйному распылению и удлинению потока указанной водной фазы в указанной масляной фазе;

(b) добавление указанного биоматериала и указанного материала покрытия к указанной водной фазе, при этом полимеризация указанного материала покрытия происходит после распада струи указанной водной фазы на частицы, что приводит к конформному покрытию указанного биоматериала указанным материалом покрытия;

(c) добавление компонента указанного материала покрытия после распада струи указанной водной фазы на частицы, при этом указанный компонент представляет собой гелеобразующую эмульсию, которая способствует/катализирует полимеризацию указанного материала покрытия;

(d) необязательно - сбор материала, вытекающего из указанного устройства для нанесения покрытия;

(e) необязательно - очистка указанного биоматериала с конформным покрытием и указанного материала покрытия, не содержащего биоматериал, от указанной масляной фазы; и

(f) необязательно - отделение указанного биоматериала с конформным покрытием от указанного материала покрытия, не содержащего биоматериал.

2. Способ по параграфу 1, отличающийся тем, что указанный биоматериал содержит одно или большее число из следующего: клетки, кластеры клеток, покрытые биоматериалом клетки или кластеры клеток, субклеточные органеллы, биологические молекулы и небиологические лекарственные препараты.

3. Способ по параграфу 2, отличающийся тем, что указанный биоматериал содержит клетки или кластеры клеток.

4. Способ по параграфу 3, отличающийся тем, что указанный биоматериал содержит островковые клетки.

5. Способ по любому из параграфов 1-3, отличающийся тем, что указанный материал покрытия выбран из группы, состоящей из одного или большего числа из следующего: полиэтиленгликоля (ПЭГ), полиэтиленоксида (ПЭО), поли(N-винилпирролидинона) (ПВП), полиэтилоксазолина, поливинилового спирта (ПВС), полиэтилоксазолина (ПЭОК) и поли(аминокислот).

6. Способ по параграфу 5, отличающийся тем, что указанный материал покрытия представляет собой одно или большее числа из следующего: полиэтиленгликоль (ПЭГ), ПЭГ-малеимид, ПЭГ-акрилат, ПЭГ-винилсульфон или их модифицированные производные.

7. Способ по параграфу 6, отличающийся тем, что указанный материал покрытия представляет собой 5-10% ПЭГ.

8. Способ по любому из параграфов 1-7, отличающийся тем, что указанная водная фаза содержит:

(a) бессывороточную среду с pH 6-7,4; или

(b) сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS) с pH 6-7,4.

9. Способ по параграфу 8, отличающийся тем, что указанная водная фаза содержит 500-750000 островковых клеток или кластеров островковых клеток /мл.

10. Способ по параграфу 9, отличающийся тем, что указанная водная фаза содержит около 2500-250000 островковых клеток или кластеров островковых клеток /мл.

11. Способ по любому из параграфов 1-10, отличающийся тем, что указанная водная фаза необязательно содержит один или большее число из тиолированных или восстанавливающих реактивов, и (или) поверхностно-активное вещество.

12. Способ по параграфу 11, отличающийся тем, что указанное поверхностно-активное вещество представляет собой блок-сополимер полиоксиэтилен-полиоксипропилен или поли(этиленгликоль-bl-пропиленсульфид).

13. Способ по параграфу 12, отличающийся тем, что указанное поверхностно-активное вещество представляет собой 2% блок-сополимер полиоксиэтилен-полиоксипропилен.

14. Способ по параграфу 11, отличающийся тем, что указанный тиолированный или восстанавливающий реактив представляет собой дитиотреитол (ДТТ) или ПЭГ-дитиол.

15. Способ по параграфу 14, отличающийся тем, что указанный тиолированный или восстанавливающий реактив представляет собой 0,01-0,62% дитиотреитол (ДТТ).

16. Способ по любому из параграфов 1-15, отличающийся тем, что указанная масляная фаза содержит полипропиленгликоль (ППГ).

17. Способ по параграфу 16, отличающийся тем, что указанная масляная фаза содержит полипропиленгликоль (ППГ) с 10% сорбитанмоноолеата, при этом указанная масляная фаза необязательно содержит триэтаноламин.

18. Способ по параграфу 17, отличающийся тем, что указанная масляная фаза содержит 0-0,2% триэтаноламина.

19. Биоматериал, на который нанесено конформное покрытие способом, представленным в любом из параграфов 1-18.

20. Способ лечения нарушения у пациента, включающий в себя этап имплантации указанному пациенту биоматериала, на который нанесено конформное покрытие, представленного в параграфе 19.

21. Способ по параграфу 20, отличающийся тем, что указанное нарушение представляет собой сахарный диабет и указанный материал, на который нанесено конформное покрытие,

содержит островковые клетки и кластеры островковых клеток.

22. Способ по параграфу 11, отличающийся тем, что указанная водная фаза представляет собой многоплечевой полиэтиленгликоль (ПЭГ), минимально сшитый (5-50%) с ПЭГ-дитиолом.

23. Способ по любому из параграфов 1-18, 21 или 22, отличающийся тем, что указанную гелеобразующую эмульсию добавляют после распада струи указанной водной фазы на частицы, при этом указанная гелеобразующая эмульсия представляет собой раствор дитиотреитола (ДТТ), растворенный в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) и эмульгированный в полипропиленгликоле (ППГ) с 10% сорбитанмоноолеата (Span80).

24. Способ по любому из параграфов 1-18, 21-23, отличающийся тем, что очистку указанного биоматериала с конформным покрытием и указанного материала покрытия, не содержащего биоматериал, от указанной масляной фазы выполняют путем вливания продукта от продукта покрытия в минеральное масло при перемешивании.

25. Способ по параграфу 24, отличающийся тем, что во время очистки минеральным маслом при перемешивании добавляют сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS, продолжая перемешивание указанной гелеобразующей эмульсии,

содержащей раствор дитиотреитола (ДТТ), растворенный в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) и эмульгированный в полипропиленгликоле (ППГ) с 10% сорбитанмоноолеата (Span80) в минеральном масле.

26. Способ по параграфу 25, отличающийся тем, что после очистки минеральным маслом и сбалансированным солевым раствором Хэнкса (HBSS) указанный продукт центрифугируют и промывают HBSS.

27. Способ по параграфу 26, отличающийся тем, что после очистки минеральным маслом и промывки сбалансированным солевым раствором Хэнкса (HBSS) указанный продукт инкубируют с раствором ПЭГ-дитиола.

28. Устройство для нанесения конформного покрытия, включающее в себя:

камеру для инкапсулирования, образованную сборкой из трех частей, как проиллюстрировано на фиг. 1A, панели (ii), (iii) и (iv);

катетер, соединенный с прецизионным проточным шприцевым насосом, сконфигурирован для введения материала покрытия и биоматериала, на который наносится данное покрытие, в первое входное отверстие указанной камеры инкапсулирования (внутренняя фаза), при этом данная водная фаза имеет уровень pH, составляющий ровно или около 6-7,4;

первый перистальтический насос сконфигурирован с возможностью впрыска масляной фазы, содержащей поверхностно-активное вещество, ко второму входному отверстию указанной камеры инкапсулирования, при этом впрыск указанной масляной фазы (внешняя фаза) сконфигурирован для протекания коаксиально к указанной внутренней водной фазе;

капилляр, соединенный с концом указанной камеры для инкапсулирования, при этом указанный капилляр находится ниже по потоку от точки, где поток указанной внутренней водной фазы удлиняется внутри указанной внешней масляной фазы (двухфазная жидкость) так, что указанная двухфазная жидкость сконфигурирована для протекания в указанный капилляр из указанной камеры для инкапсулирования, и при этом указанная внутренняя водная фаза (содержащая материал покрытия и биоматериал, на который наносится покрытие) и указанная внешняя масляная фаза сконфигурированы для коаксиального протекания через указанный капилляр; и

второй перистальтический насос, сконфигурированный для впрыскивания гелеобразующей эмульсии коаксиального к указанному капилляру, при этом указанная эмульсия содержит катализатор для полимеризации указанного материала покрытия, при этом указанная эмульсия сконфигурирована для коаксиального контакта с указанным материалом покрытия и указанным биоматериалом, на который наносится покрытие.

[0212] Специалисты в данной области техники распознают или смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, множество эквивалентов конкретным вариантам осуществления данного изобретения, описанным в данном документе. Объем представленных вариантов осуществления, описанных в данном документе, не предназначен ограничиваться приведенным выше описанием, и скорее является таким,

как изложено в прилагаемой формуле данного изобретения. Рядовым специалистам в данной области техники будут понятно, что в данное описание могут быть внесены различные изменения и модификации без отступления от духа или объема данного изобретения, как определено в нижеследующей формуле данного изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ конформного покрытия биоматериалов материалом покрытия, включающий в себя следующие этапы:

(a) впрыскивание водной фазы в коаксиальную масляную фазу в устройстве для нанесения покрытия, сконфигурированном таким образом, чтобы обеспечить переход от капельного распыления к струйному распылению и удлинению потока указанной водной фазы в указанной масляной фазе;

(b) добавление указанного биоматериала и указанного материала покрытия к указанной водной фазе, при этом материал покрытия из указанного этапа (b) не включает в себя агент, повышающий вязкость; и при этом указанная водная фаза имеет pH от около 6 до около 7,4.

(c) предоставление струе указанной водной фазы возможности распадаться на частицы; и

(d) добавление компонента указанного материала покрытия после распада струи указанной водной фазы на частицы, при этом указанный компонент представляет собой гелеобразующую эмульсию, которая способствует или катализирует полимеризацию указанного материала покрытия; вследствие этого получается биоматериал с конформным покрытием.

2. Способ по п. 1, дополнительно включающий в себя этап сбора материала, вытекающего из указанного устройства для нанесения покрытия.

3. Способ по пп. 1-2, дополнительно включающий в себя этап очистки указанного биоматериала с конформным покрытием и материала покрытия, не содержащего биоматериал, от указанной масляной фазы.

4. Способ по любому из пп. 1-3, дополнительно включающий в себя этап отделения указанного биоматериала с конформным покрытием от указанного материала покрытия, не содержащего биоматериал.

5. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что указанный биоматериал включает в себя клетки, кластеры клеток, покрытые биоматериалом клетки или кластеры клеток, субклеточные органеллы, биологические молекулы, небиологические лекарственные препараты или их комбинацию.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что указанный биоматериал включает в себя клетки или кластеры клеток.

7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что указанный биоматериал включает в себя островковые клетки или кластеры клеток.

8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что указанный материал покрытия включает в себя агент, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), полиэтиленоксида (ПЭО), поли(N-винилпирролидинона) (ПВП), полиэтил оксазолина, поливинилового спирта (ПВС), полиэтилоксазолина (ПЭОК), поли(аминокислот), их производных и их комбинаций.

9. Способ по п. 8, отличающийся тем, что указанный материал покрытия включает

в себя агент, выбранный из группы, состоящей из полиэтиленгликоля (ПЭГ), ПЭГ-малеимида, ПЭГ-акрилата и ПЭГ-винилсульфона.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что указанный материал покрытия включает в себя 5-10% ПЭГ.

11. Способ по п. 8, отличающийся тем, что указанный материал покрытия включает в себя многоплечевой полиэтиленгликоль (ПЭГ), минимально сшитый (1-30%) с ПЭГ-дитиолом.

12. Способ по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что указанная водная фаза включает в себя:

(a) бессывороточную среду с pH 6-7,4; или

(b) сбалансированный солевой раствор Хэнкса (HBSS) с pH 6-7,4.

13. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанная водная фаза включает в себя около 200000000 островковых клеток/мл.

14. Способ по п. 12, отличающийся тем, что указанная водная фаза включает в себя около 100000 кластеров клеток/мл.

15. Способ по любому из пп. 1-14, отличающийся тем, что указанная водная фаза включает в себя тиолированный реактив, восстанавливающий реактив, поверхностно-активное вещество или их комбинацию.

16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что указанное поверхностно-активное вещество представляет собой блок-сополимер полиоксиэтилен-полиоксипропилен или поли(этиленгликоль-bl-пропиленсульфид).

17. Способ по п. 16, отличающийся тем, что указанное поверхностно-активное вещество представляет собой 2% блок-сополимер полиоксиэтилен-полиоксипропилен.

18. Способ по п. 15, отличающийся тем, что указанный восстанавливающий реактив представляет собой дитиотреитол (ДТТ) или ПЭГ-дитиол.

19. Способ по п. 18, отличающийся тем, что указанный восстанавливающий реактив представляет собой 0,01-0,62% дитиотреитол (ДТТ).

20. Способ по любому из пп. 1-19, отличающийся тем, что указанная гелеобразующая эмульсия включает в себя дитиотреитол (ДТТ), растворенный в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS) и эмульгированный в полипропиленгликоле (ППГ) с 10% сорбитанмоноолеата (Span80).

21. Способ по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что указанная масляная фаза включает в себя полипропиленгликоль (ППГ).

22. Способ по любому из пп. 1-21, отличающийся тем, что указанная масляная фаза включает в себя полипропиленгликоль (ППГ) и 10% сорбитанмоноолеат, и, необязательно, триэтаноламин.

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что указанная масляная фаза включает в себя 0-0,2% триэтаноламина.

24. Способ по любому из пп. 3-23, отличающийся тем, что очистка указанного биоматериала с конформным покрытием и указанного материала покрытия, не

содержащего биоматериал, от указанной масляной фазы включает в себя этап (e) вливание продукта, полученного на этапе (d), в минеральное масло при перемешивании полученной смеси.

25. Способ по п. 24, отличающийся тем, что очистка указанного биоматериала с конформным покрытием и указанного материала покрытия, не содержащего биоматериал, от указанной масляной фазы включает в себя этап (f) добавление сбалансированного солевого раствора Хэнкса (HBSS) к продукту, полученному на этапе (e).

26. Способ по п. 25, отличающийся тем, что продукт этапа (f) центрифугируют и промывают HBSS.

27. Способ по п. 26, отличающийся тем, что после центрифугирования и промывки сбалансированным солевым раствором Хэнкса (HBSS) указанный биоматериал с конформным покрытием инкубируют с раствором ПЭГ-дитиола.

28. Биоматериал, на который нанесено конформное покрытие способом по любому из пп. 1-27.

29. Способ лечения нарушения у пациента, включающий в себя этап имплантации указанному пациенту биоматериала, на который нанесено конформное покрытие, по п. 28.

30. Способ по п. 29, отличающийся тем, что указанное нарушение представляет собой сахарный диабет.

31. Устройство для нанесения конформного покрытия, включающее в себя:

(1) камеру для инкапсулирования, включающую в себя:

(a) корпусную часть, соединенную с катетером через первое входное отверстие на первом конце указанной корпусной части и соединенную с первым насосом;

(b) крепежную часть, включающую в себя первый конец, сконфигурированный для взаимодействия с внутренней поверхностью второго конца указанной корпусной части; и

(c) часть для нанесения покрытия, включающую в себя первый конец, сконфигурированный для взаимодействия с внешней поверхностью второго конца указанной крепежной части, камеру, сконфигурированную для нанесения покрытия, второй впускной канал, соединенный со вторым насосом, и второй конец указанной части для нанесения покрытия;

при этом указанный катетер, соединенный с указанным первым насосом, сконфигурирован для впрыскивания материала покрытия и биоматериала, подлежащего покрытию, в водной фазе в указанное первое входное отверстие на внутренней стороне указанной корпусной части, при этом указанная водная фаза имеет уровень pH, составляющий ровно или около 6-7,4; и при этом вводимый материал покрытия не включает в себя агент, повышающий вязкость;

при этом указанный второй насос сконфигурирован для впрыскивания масляной фазы, включающей в себя поверхностно-активное вещество, во второе входное отверстие на внешней стороне указанной части для нанесения покрытия, при этом впрыскивание указанной масляной фазы сконфигурировано для протекания коаксиально к указанной

внутренней водной фазе и снаружи от нее;

(2) капилляр, соединенный с указанным вторым концом указанной части для нанесения покрытия, при этом указанный капилляр расположен ниже по потоку от точки, где поток указанной водной фазы контактирует с указанной внешней масляной фазой и удлиняется внутри нее, образуя двухфазную текучую среду, которая сконфигурирована для коаксиального протекания через указанный капилляр из указанной части для нанесения покрытия, и

(3) третий насос, соединенный с указанным капилляром и сконфигурированный для впрыскивания гелеобразующей эмульсии коаксиально к указанному капилляру, при этом указанная эмульсия включает в себя катализатор для полимеризации указанного материала покрытия в указанной водной фазе.

32. Устройство по п. 31, отличающееся тем, что указанный первый конец указанной части для нанесения покрытия по существу окружает указанный второй конец указанной крепежной части, образуя камеру, в которой поток указанной водной фазы контактирует с указанной масляной фазой, образуя двухфазную текучую среду.

33. Устройство по п. 31 или п. 32, отличающееся тем, что указанная камера включает в себя коническое отверстие, включающее в себя угол конусности выходного сопла, сконфигурированное для подачи двухфазной жидкости в указанный капилляр, и при этом указанное второе входное отверстие соединено с указанной камерой под углом конусности.

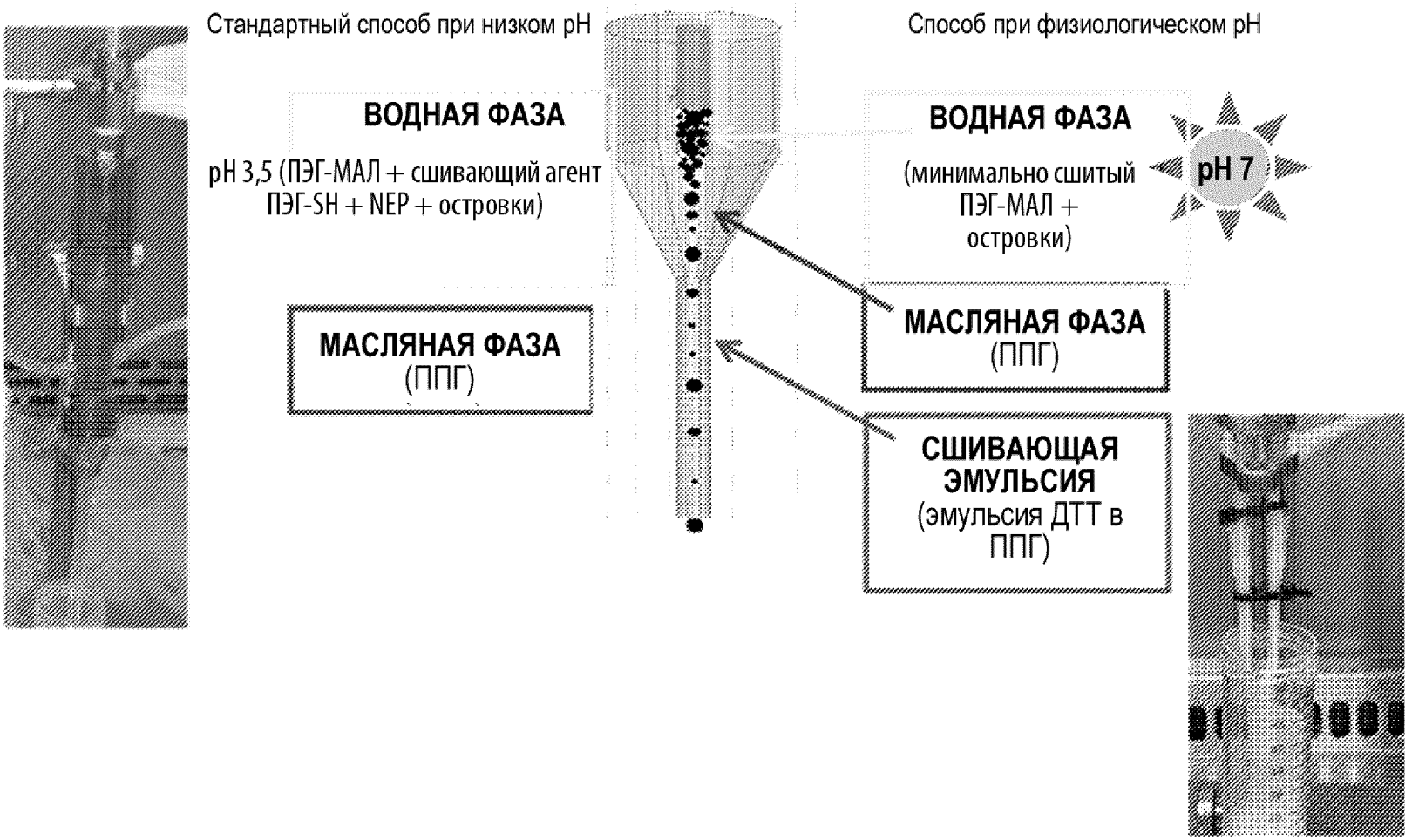
34. Устройство по любому из пп. 31-33, отличающееся тем, что указанный первый насос представляет собой прецизионный проточный шприцевой насос.

35. Устройство по любому из пп. 31-33, отличающееся тем, что указанный второй насос представляет собой первый перистальтический насос.

36. Устройство по любому из пп. 31-33, отличающееся тем, что указанный третий насос представляет собой второй перистальтический насос.

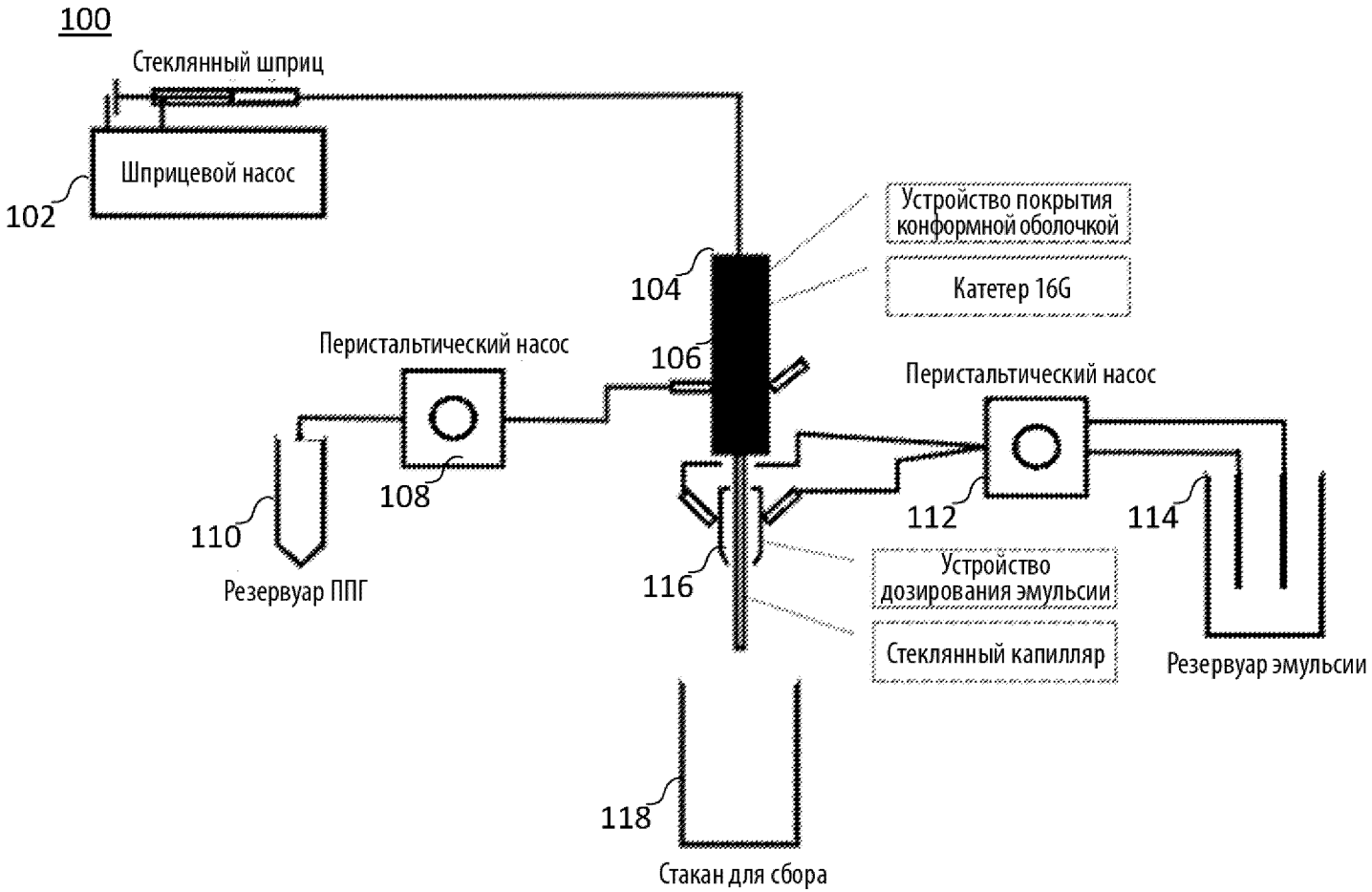
По доверенности

Фиг. 1


Стандартный способ при низком pH
ВОДНАЯ ФАЗА
pH 3,5 (ПЭГ-МАЛ + сшивающий агент ПЭГ-SH + NEP + островки)
МАСЛЯНАЯ ФАЗА (ППГ)
Способ при физиологическом pH
ВОДНАЯ ФАЗА
(минимально сшитый ПЭГ-МАЛ + островки)
pH 7
МАСЛЯНАЯ ФАЗА (ППГ)
СШИВАЮЩАЯ ЭМУЛЬСИЯ (эмульсия ДТТ в ППГ)

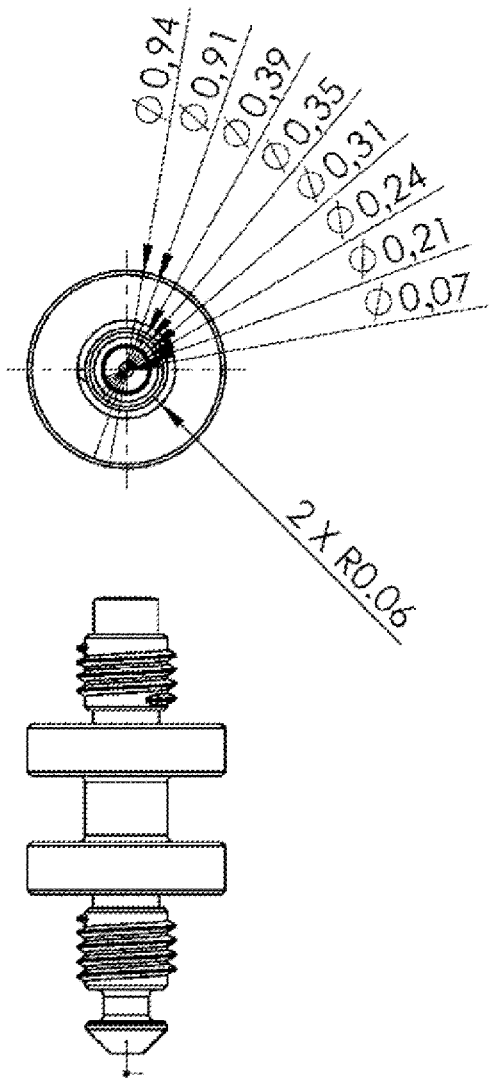
Фиг. 1A

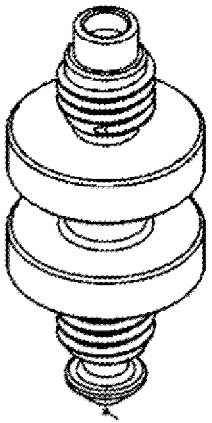
(i).


100
Стеклянный шприц
Шприцевой насос
102
104
Устройство покрытия конформной оболочкой
Катетер 16G
Перистальтический насос
106
Перистальтический насос
108
110
Резервуар ППГ
112
114
116
Устройство дозирования эмульсии
Стеклянный капилляр
Резервуар эмульсии
118
Стакан для сбора

Фиг. 1A

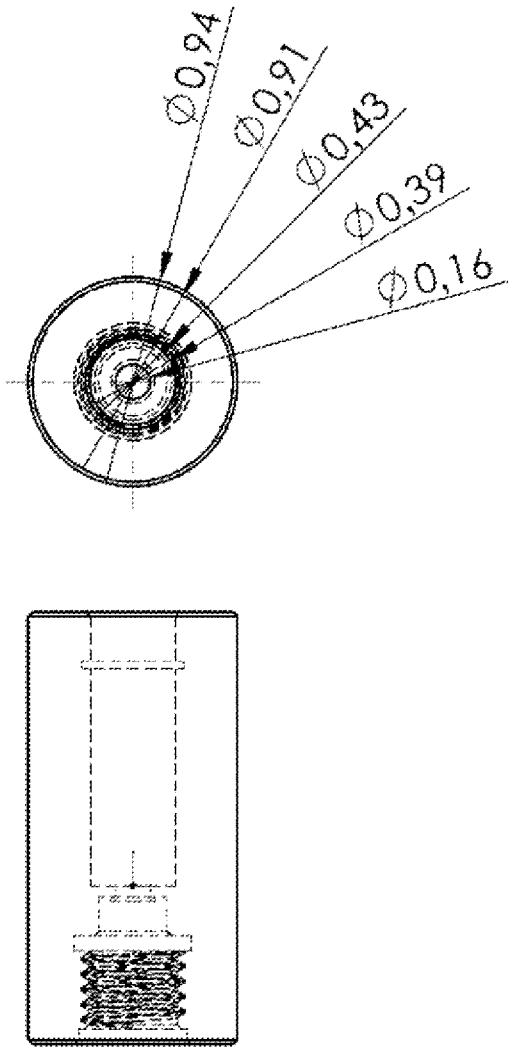
(ii).

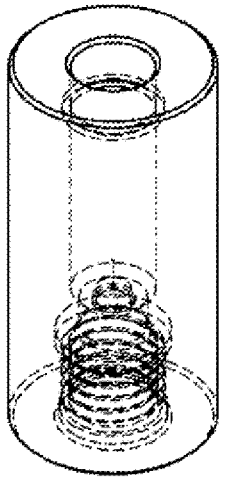




Фиг. 1A

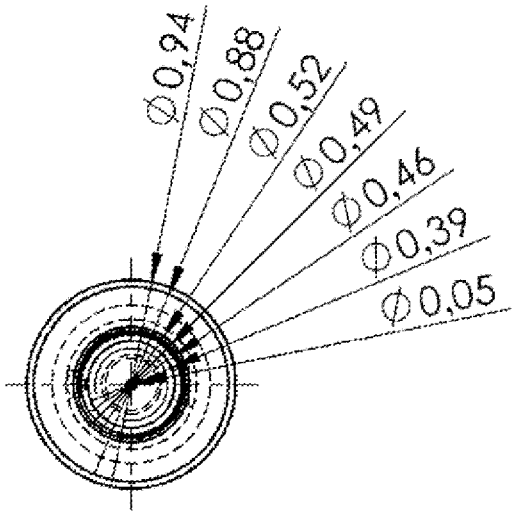
(iii).

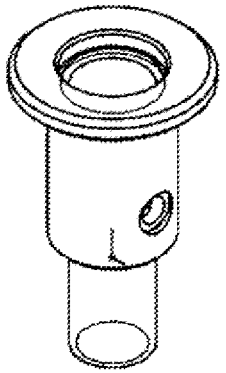


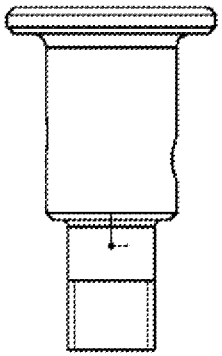


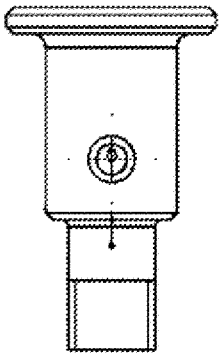
Фиг. 1A

(iv).



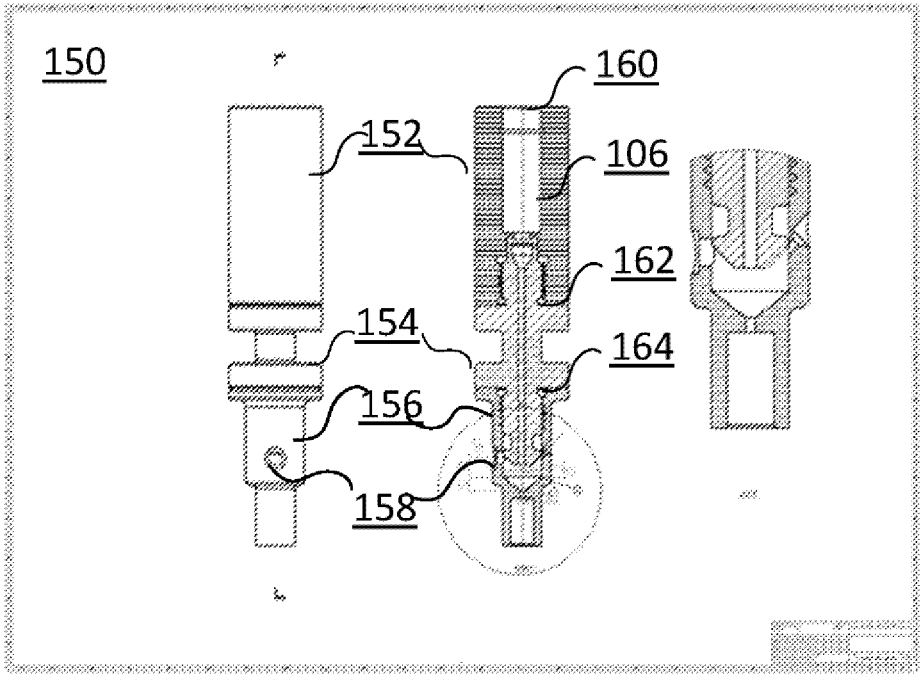


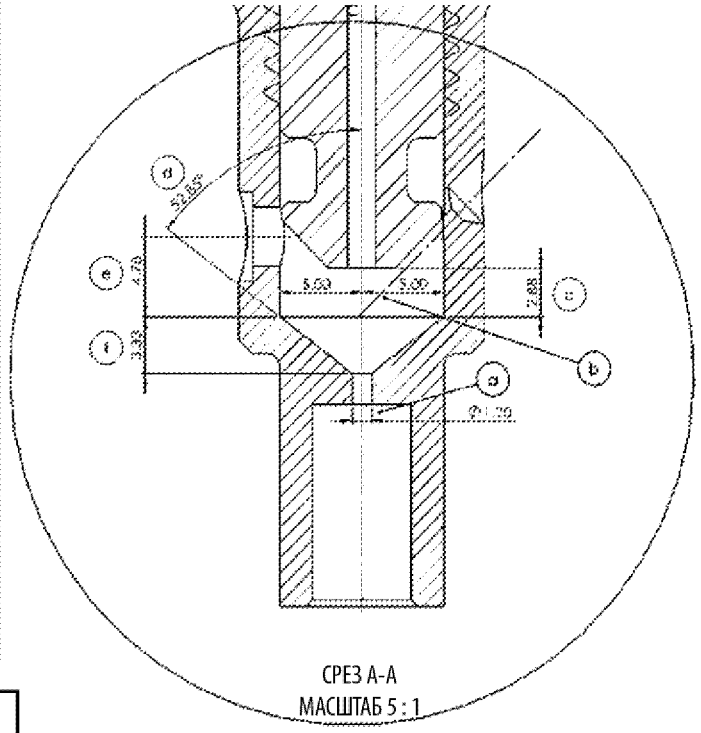




Фиг. 1A

(v).

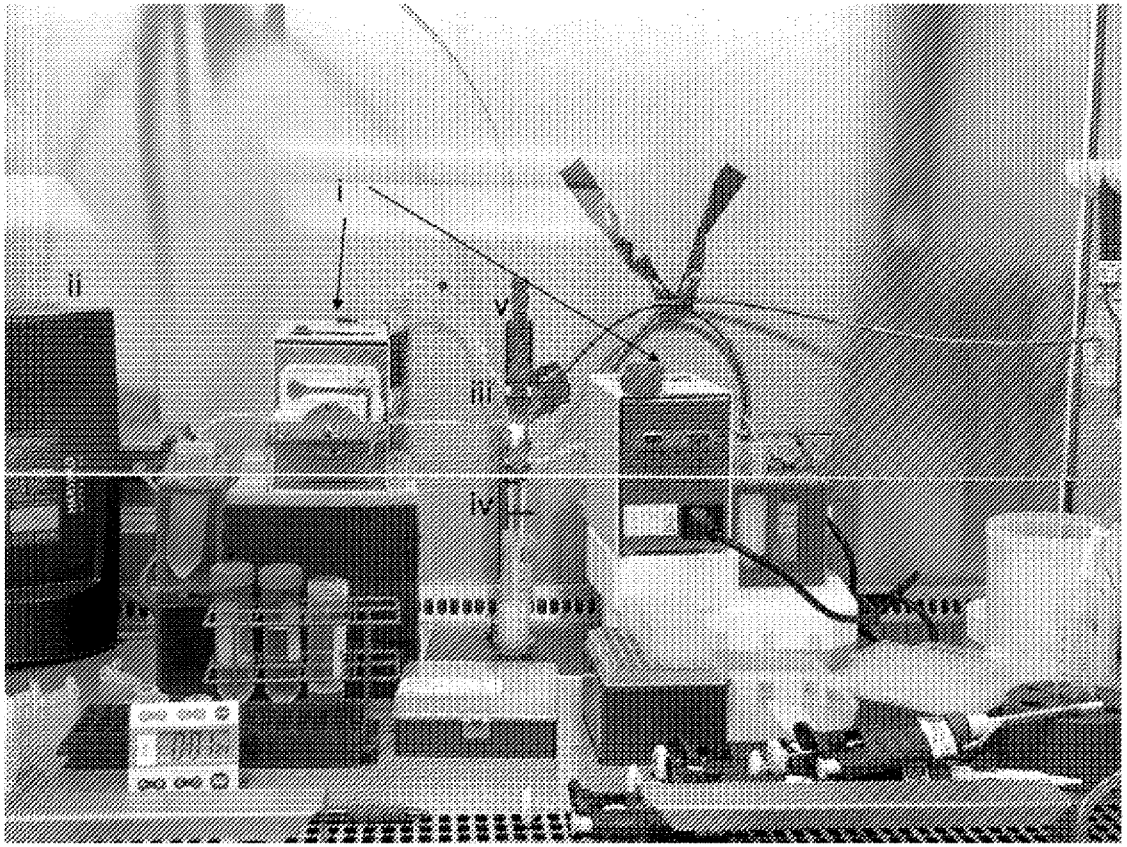




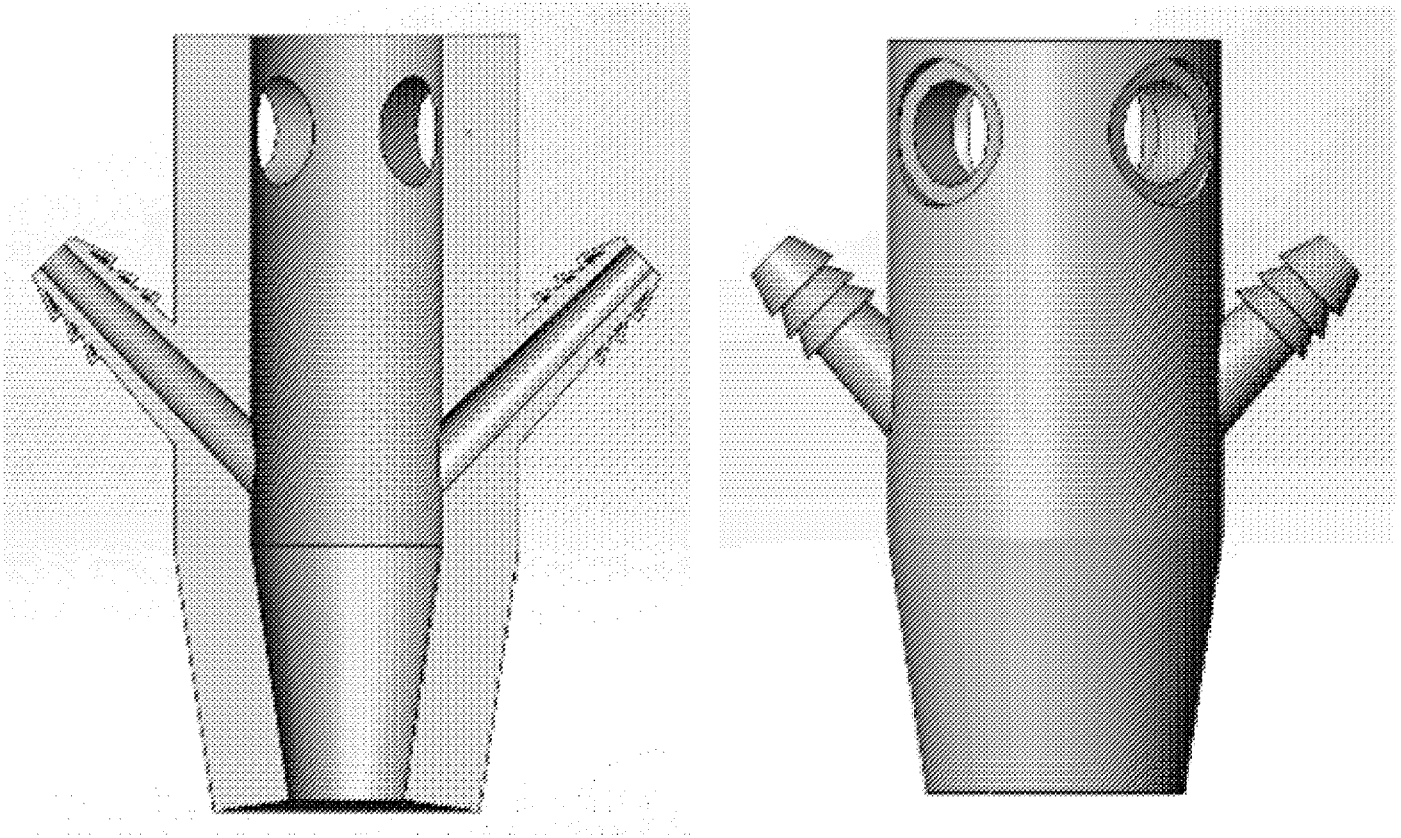
a	b	c	d	e	f
a	(a-0,2) *5	катетер установлен на (f+0,5)	арктангенс ((b-a/2)/f)	f*c/2	b/1,5
1,20	5,00	2,88	52,90°	4,78	3,33

Фиг. 1B

i) Перистальтический насос
ii) Шприцевой насос
iii) Устройство покрытия конформной оболочкой
iv) Устройство эмульгирования
v) Катетер с островками / раствором ПЭГ

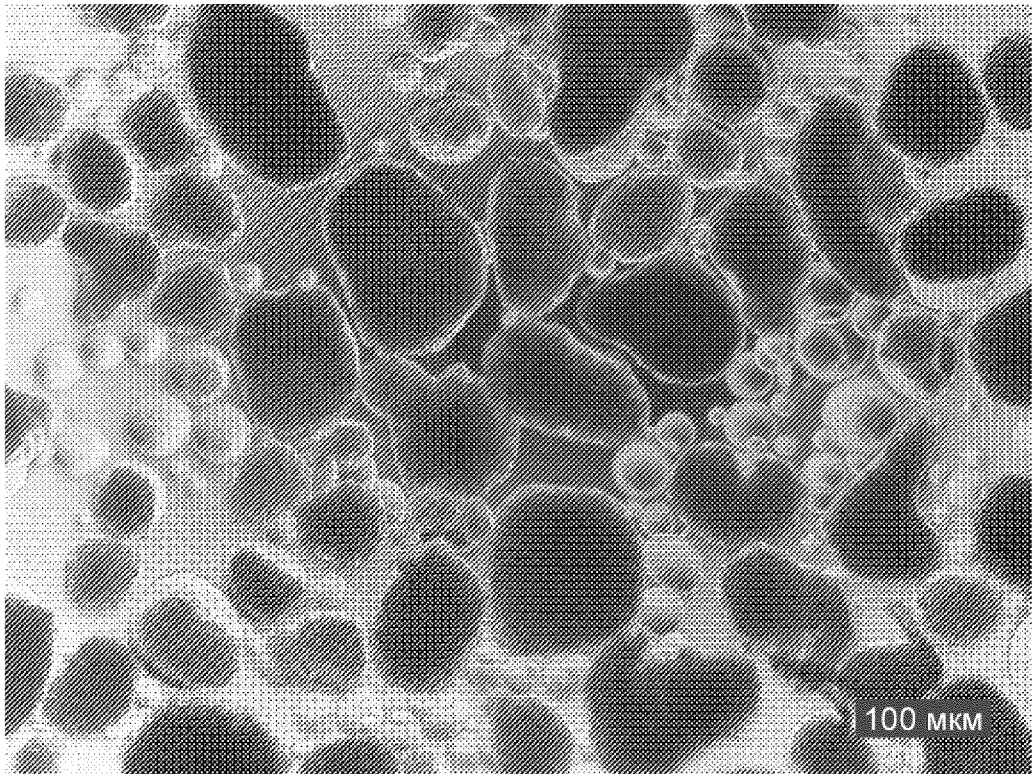


Фиг. 1C



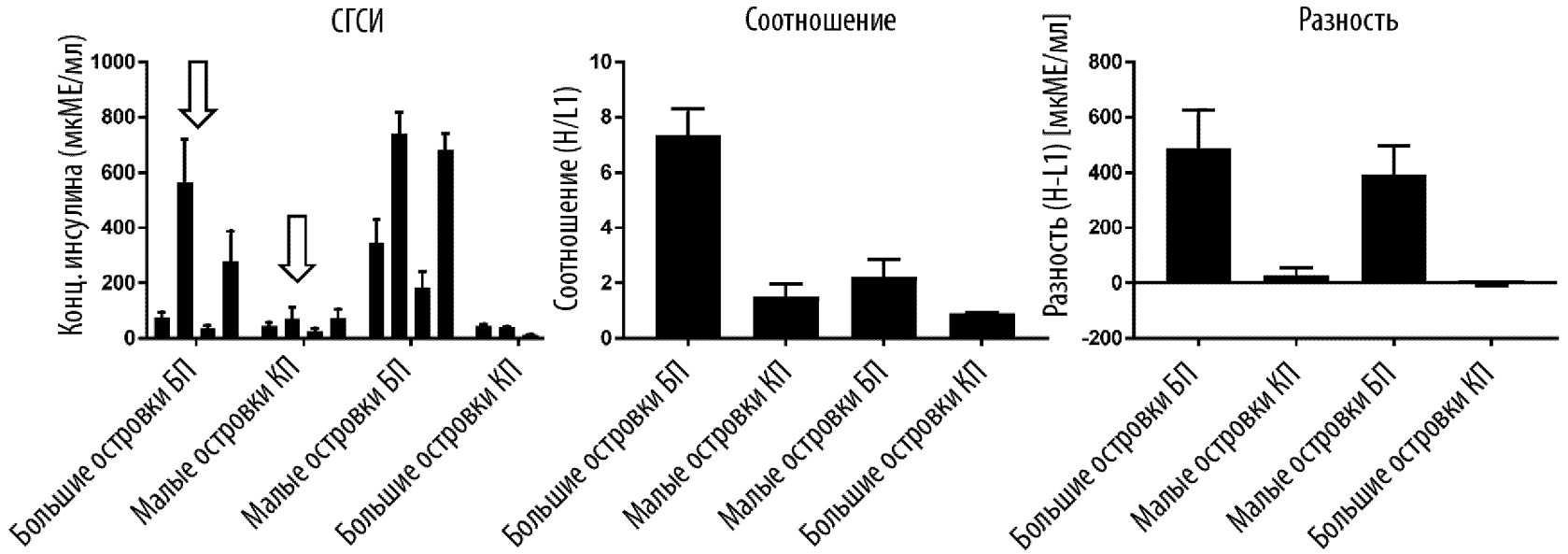
Фиг. 2

A.



Фиг. 2

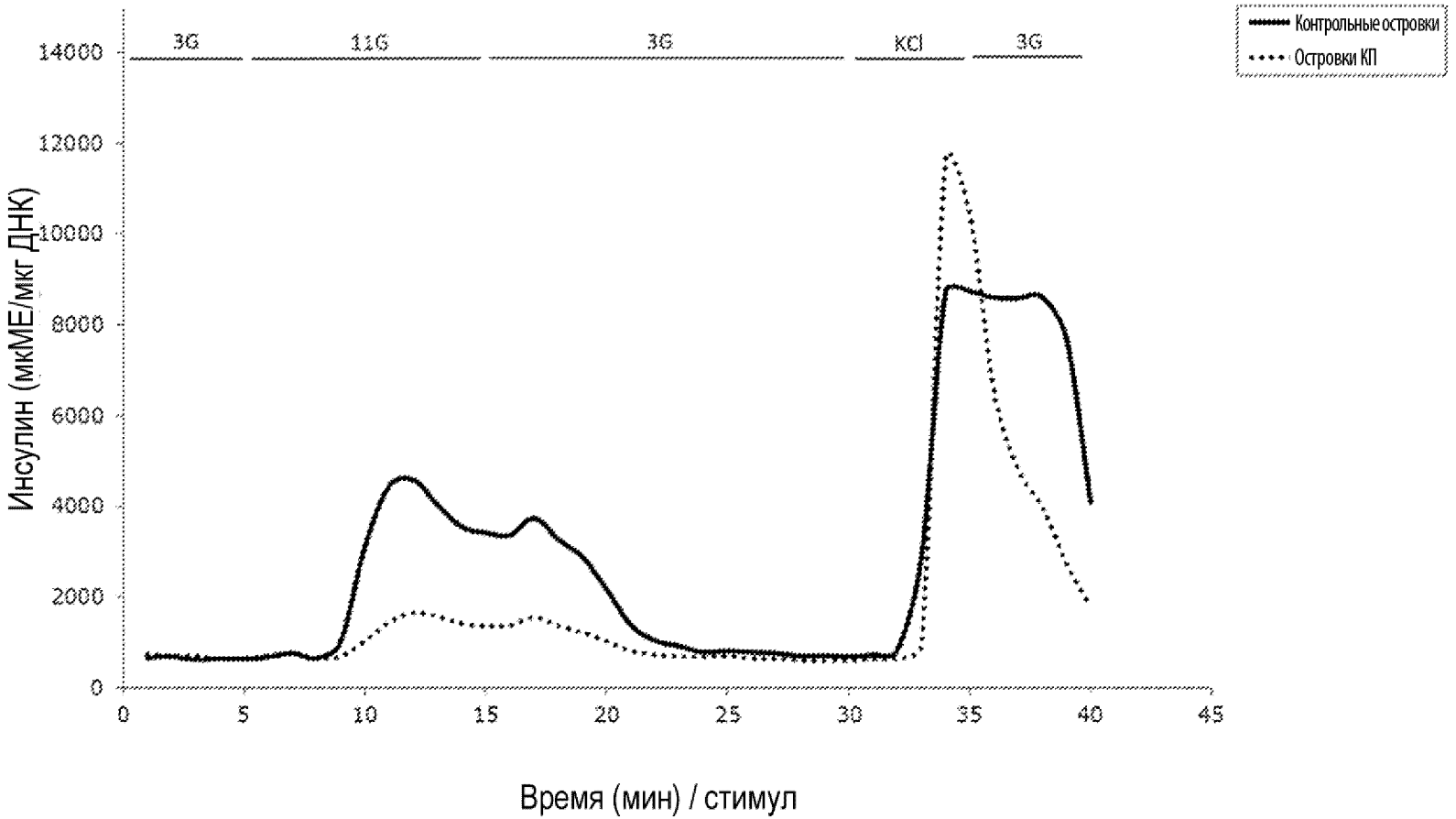
B.


СГСИ
Конц. инсулина (мкМЕ/мл)
1000
800
600
400
200
0
Большие островки БП
Малые островки КП
Малые островки БП
Большие островки КП
Соотношение
Соотношение (H/L1)
10
8
6
4
2
0
Большие островки БП
Малые островки КП
Малые островки БП
Большие островки КП
Разность
Разность (H-L1) [мкМЕ/мл]
800
600
400
200
0
-200
Большие островки БП
Малые островки КП
Малые островки БП
Большие островки КП

Фиг. 2

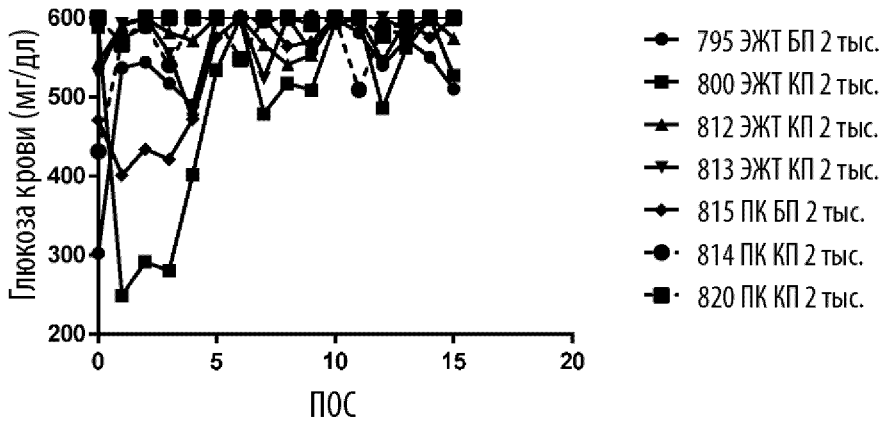
C.

Контроль по сравнению с инкапсулированными островками, выделение инсулина

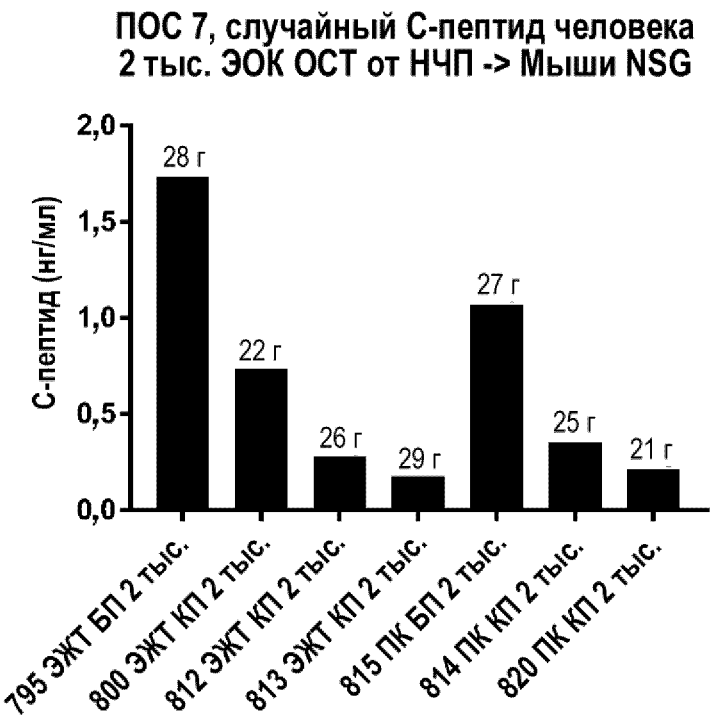


Фиг. 2

D.



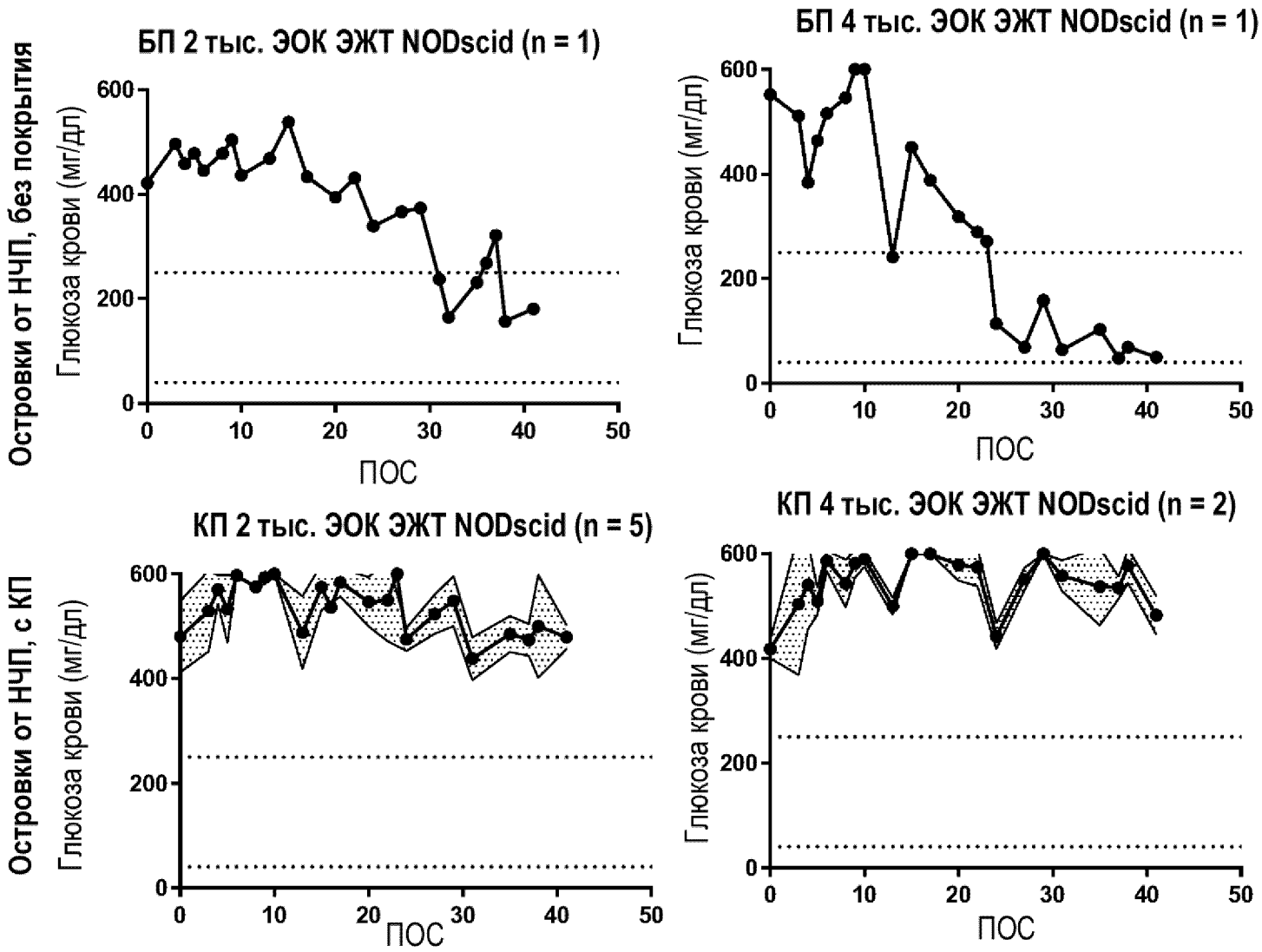
E.



Массы тела в ПОС 7 указаны над столбцами

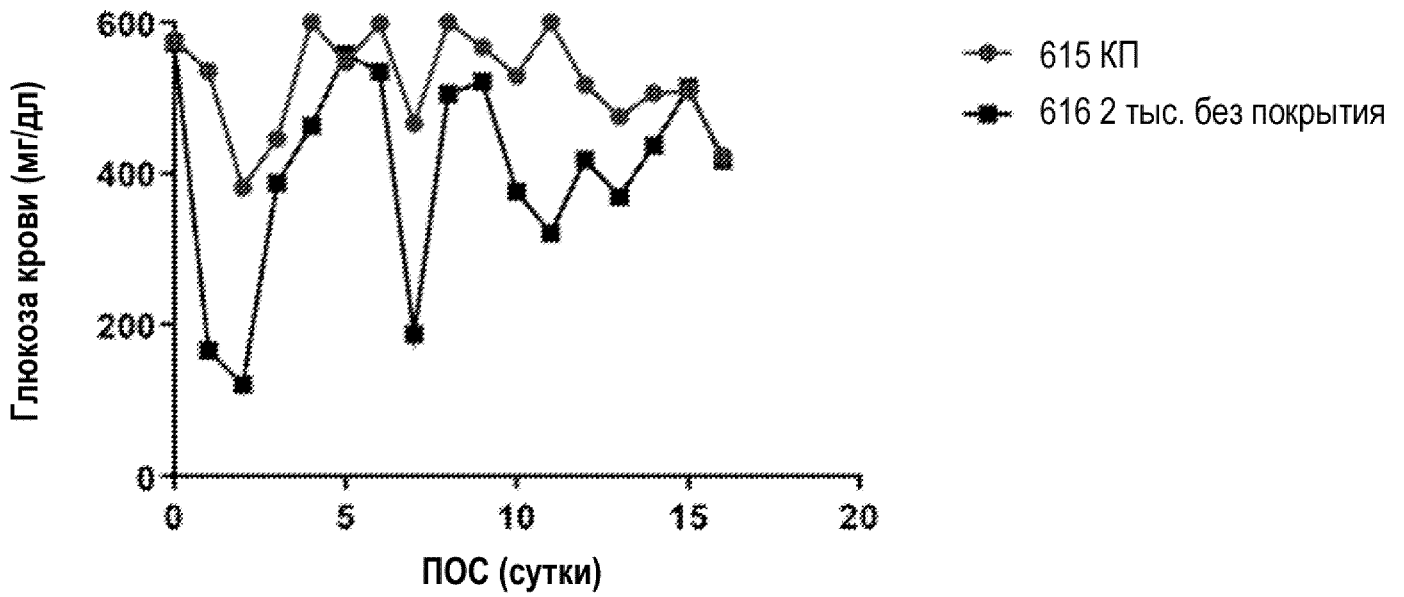
Фиг. 2

F. ***Эксперимент № 1***

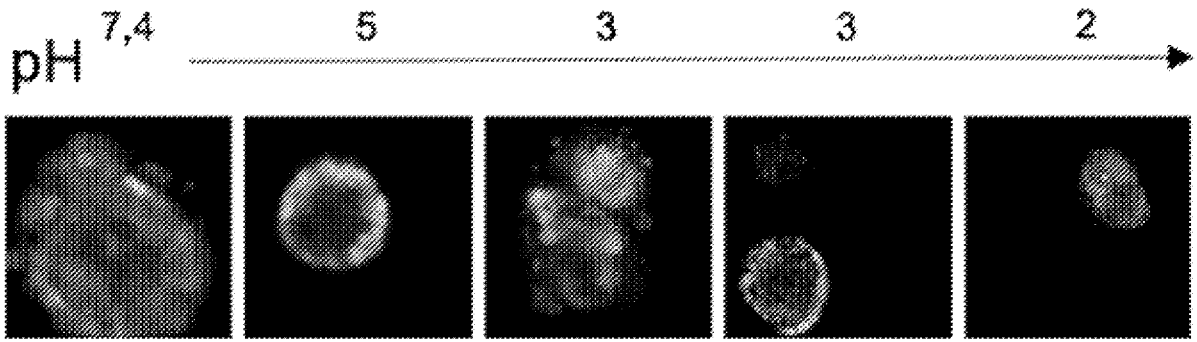


Фиг. 2

G. ***Эксперимент № 2***

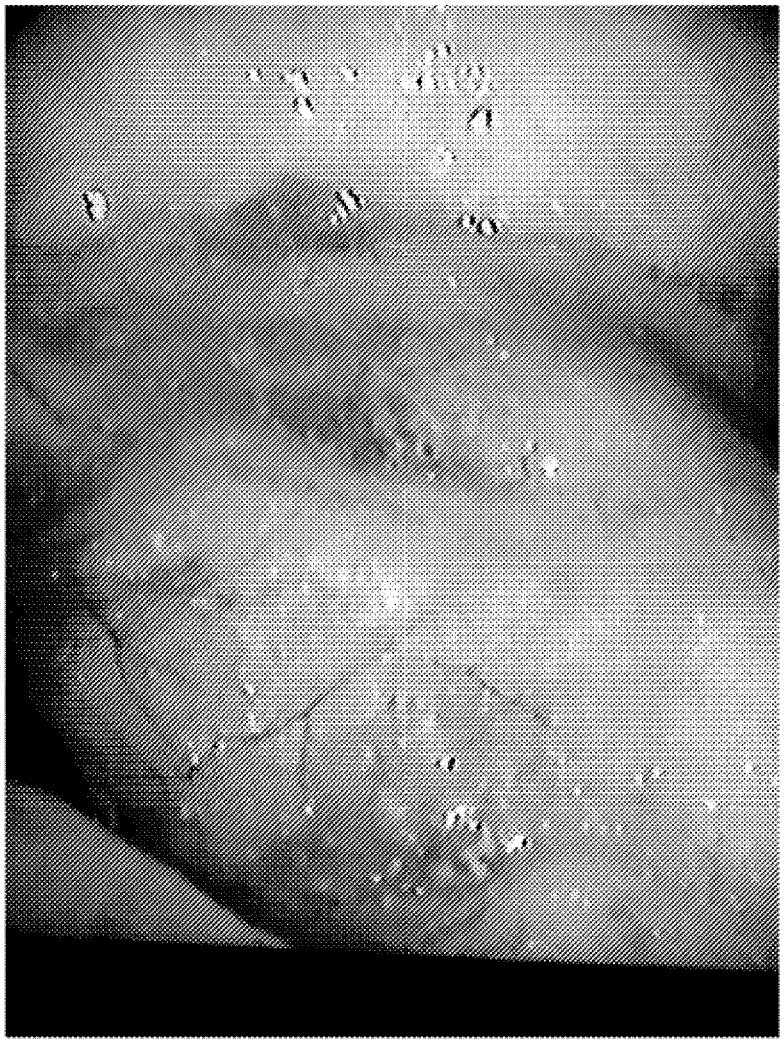


Фиг. 3



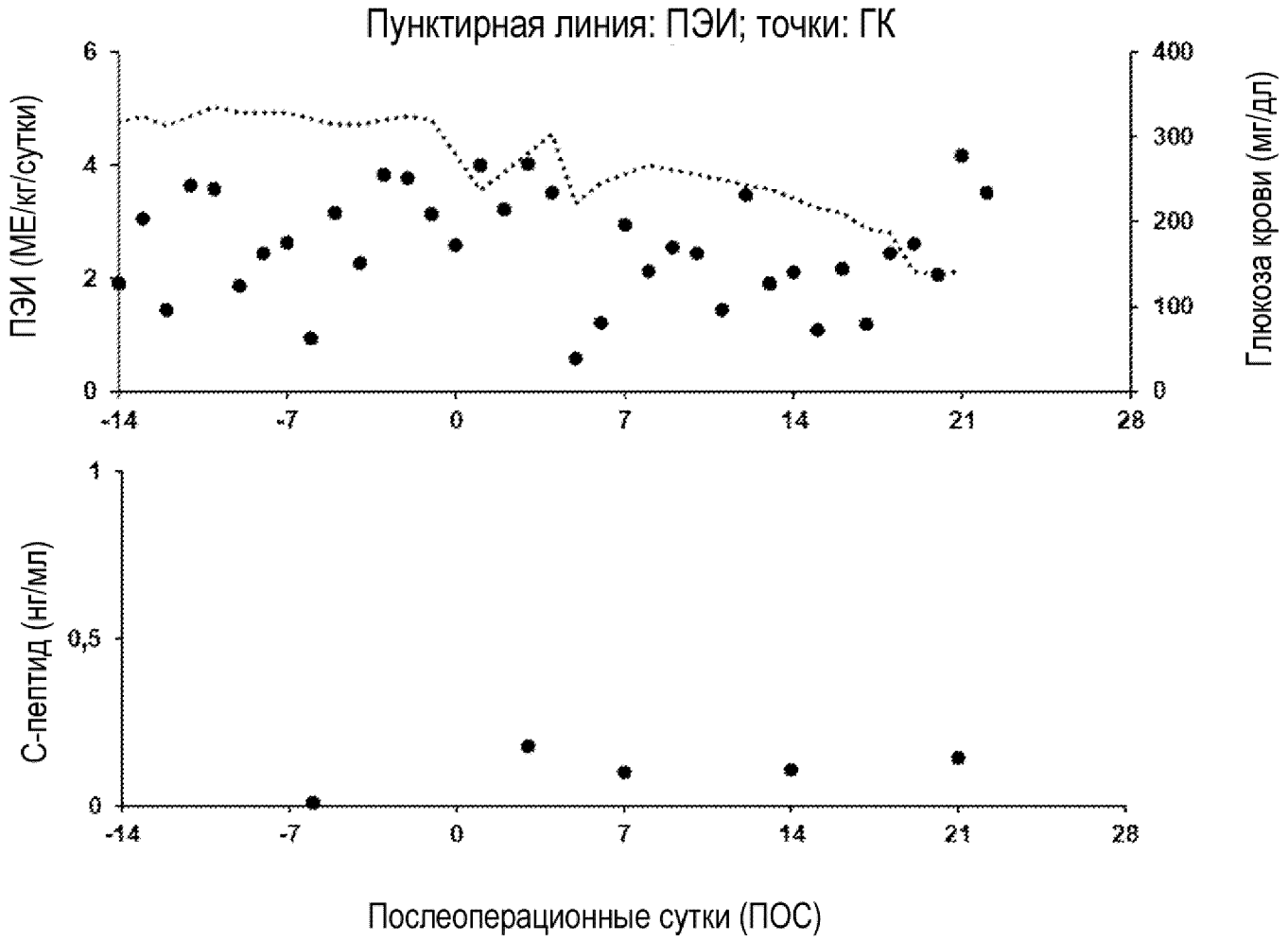
Фиг. 4

A.



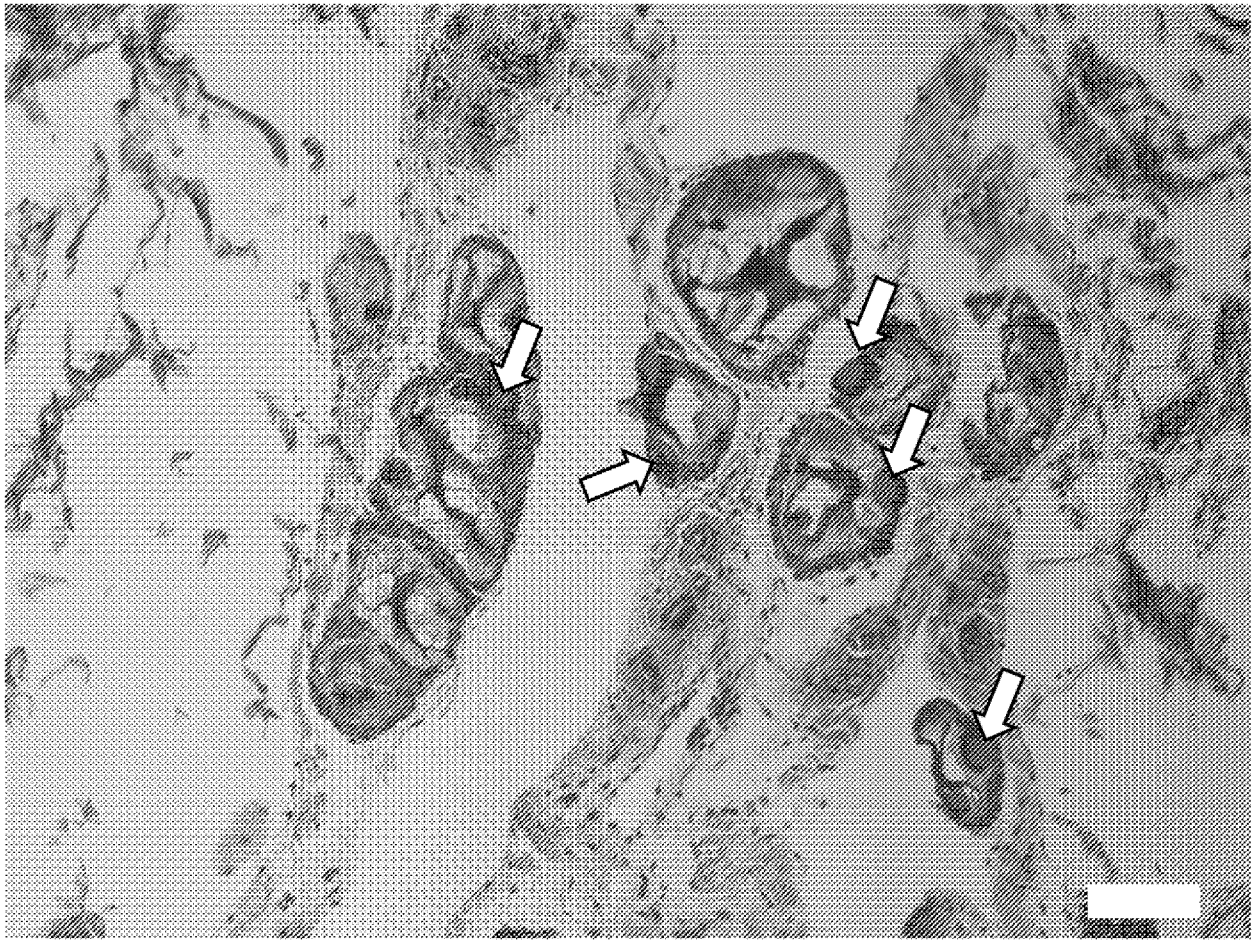
Фиг. 4

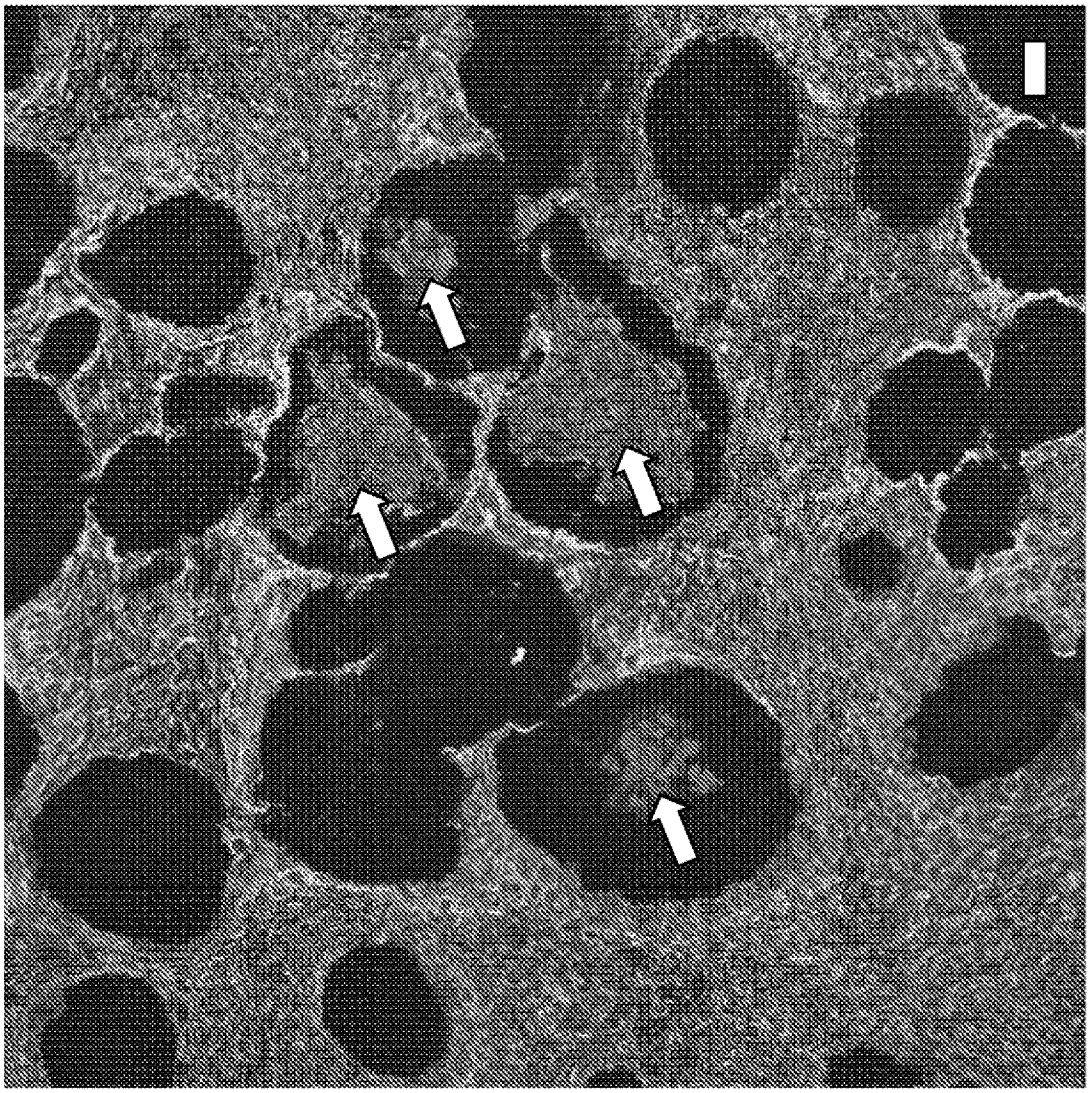
B.


Пунктирная линия: ПЭИ; точки: ГК
ПЭИ (МЕ/кг/сутки)
Глюкоза крови (мг/дл)
6
4
2
0
400
300
200
100
0
-14
-7
0
7
14
21
28
С-пептид (нг/мл)
1
0,5
0
Послеоперационные сутки (ПОС)

Фиг. 4

C.



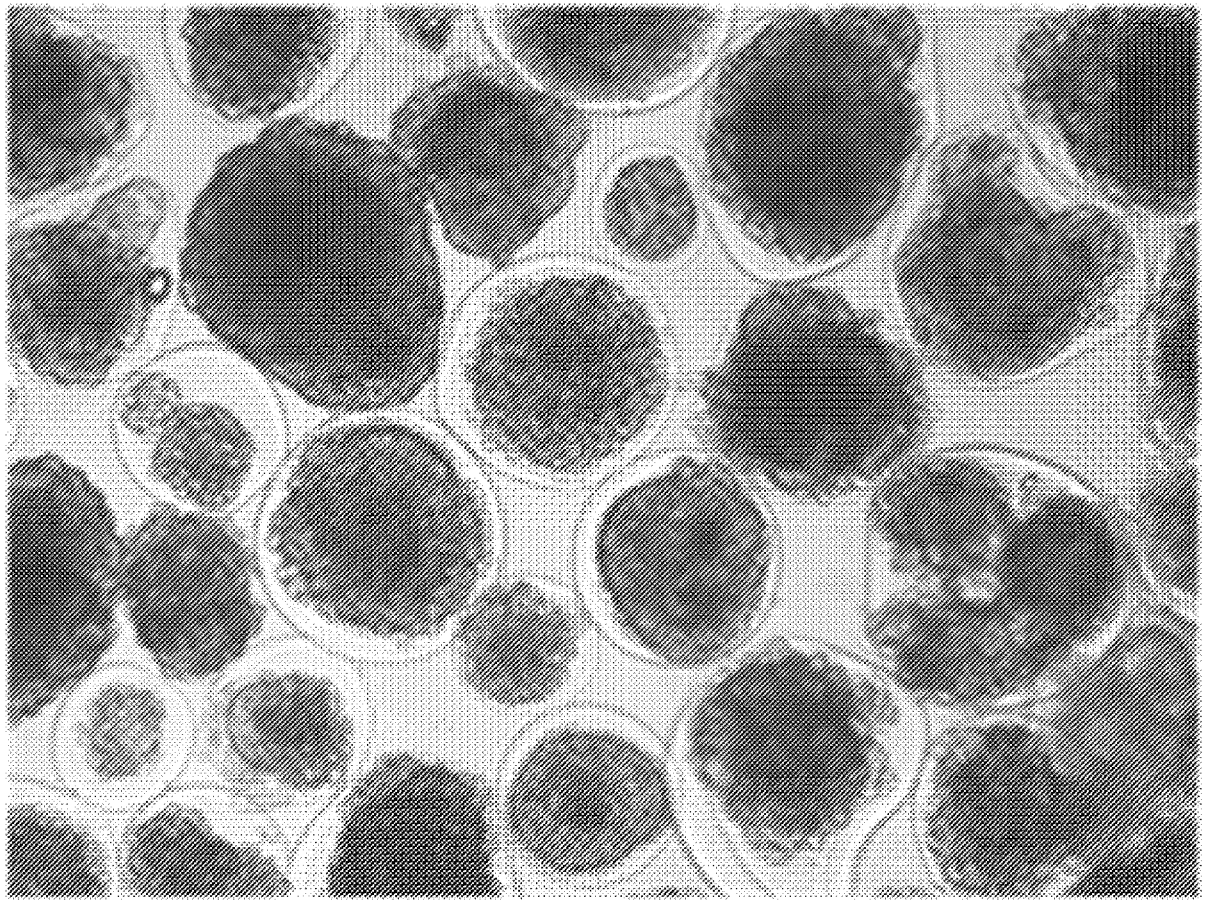


D.

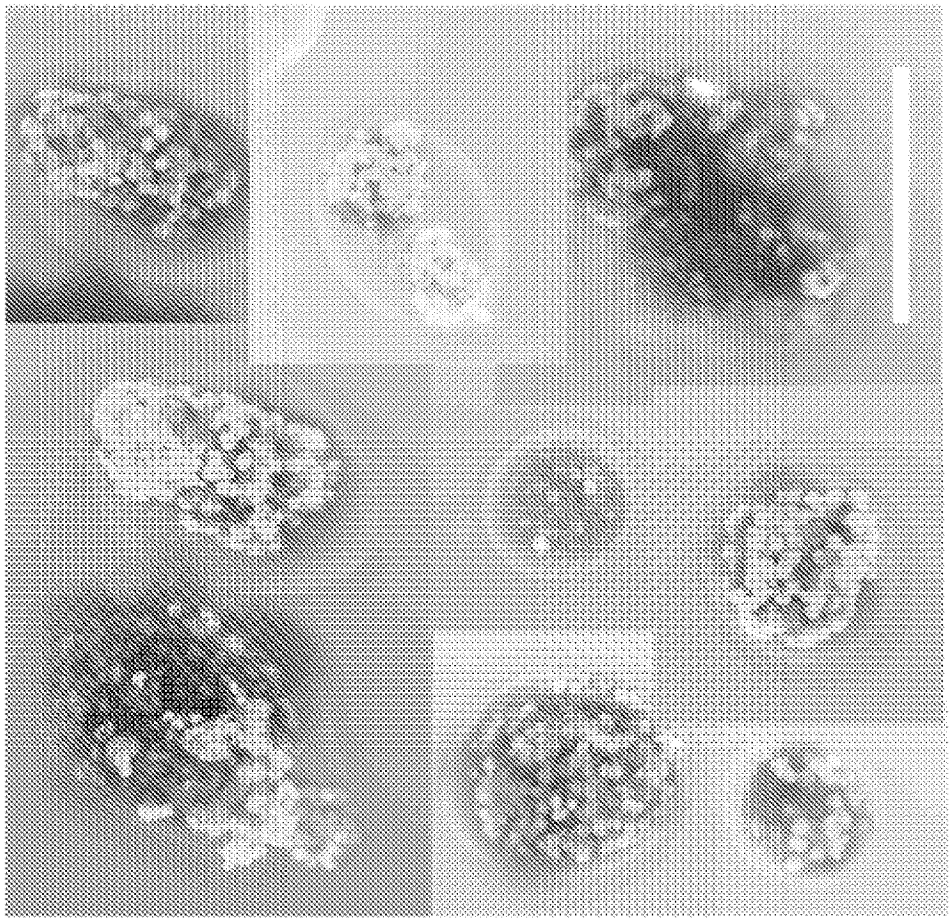
Фиг. 4

Фиг. 5

A.

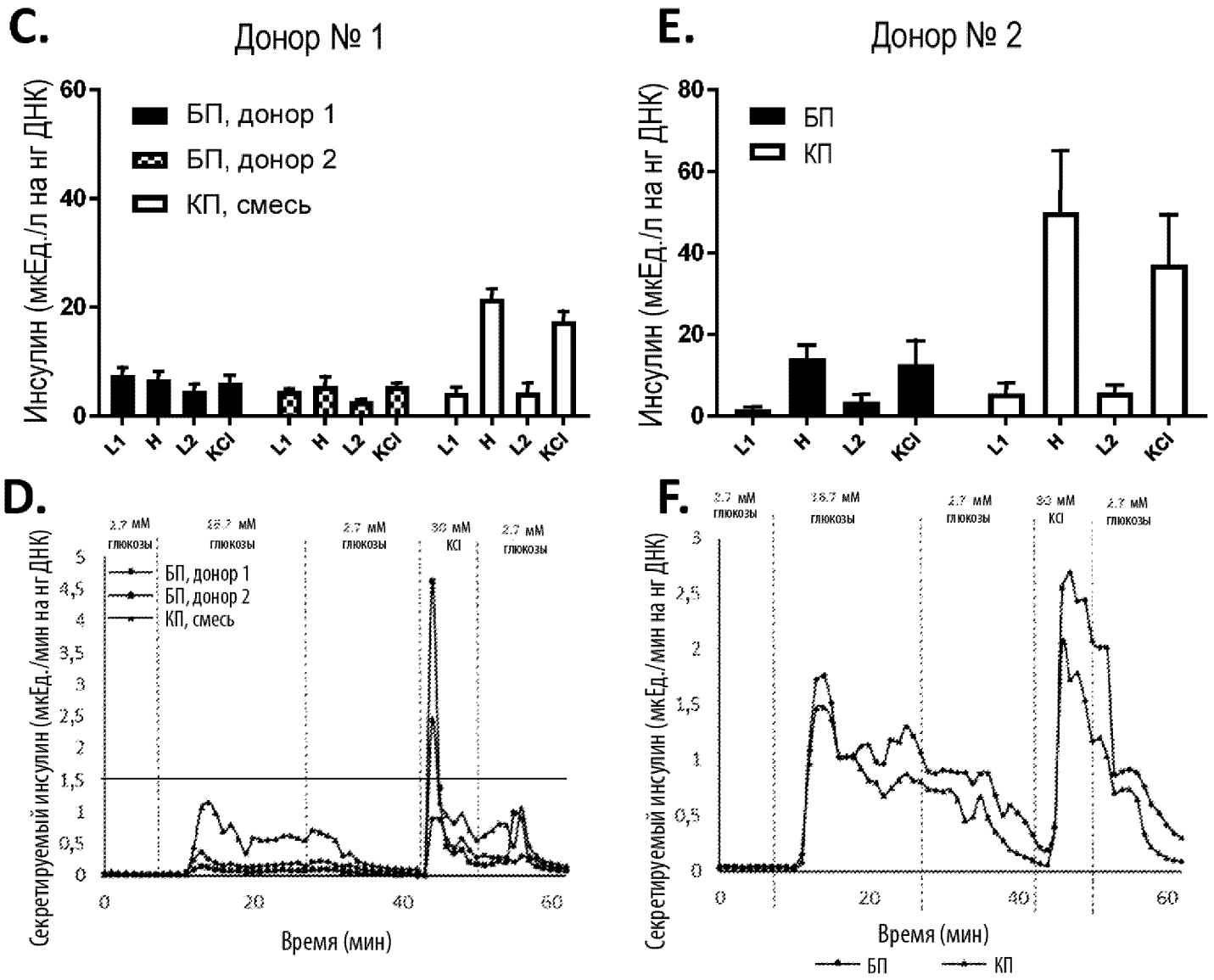


Фиг. 5

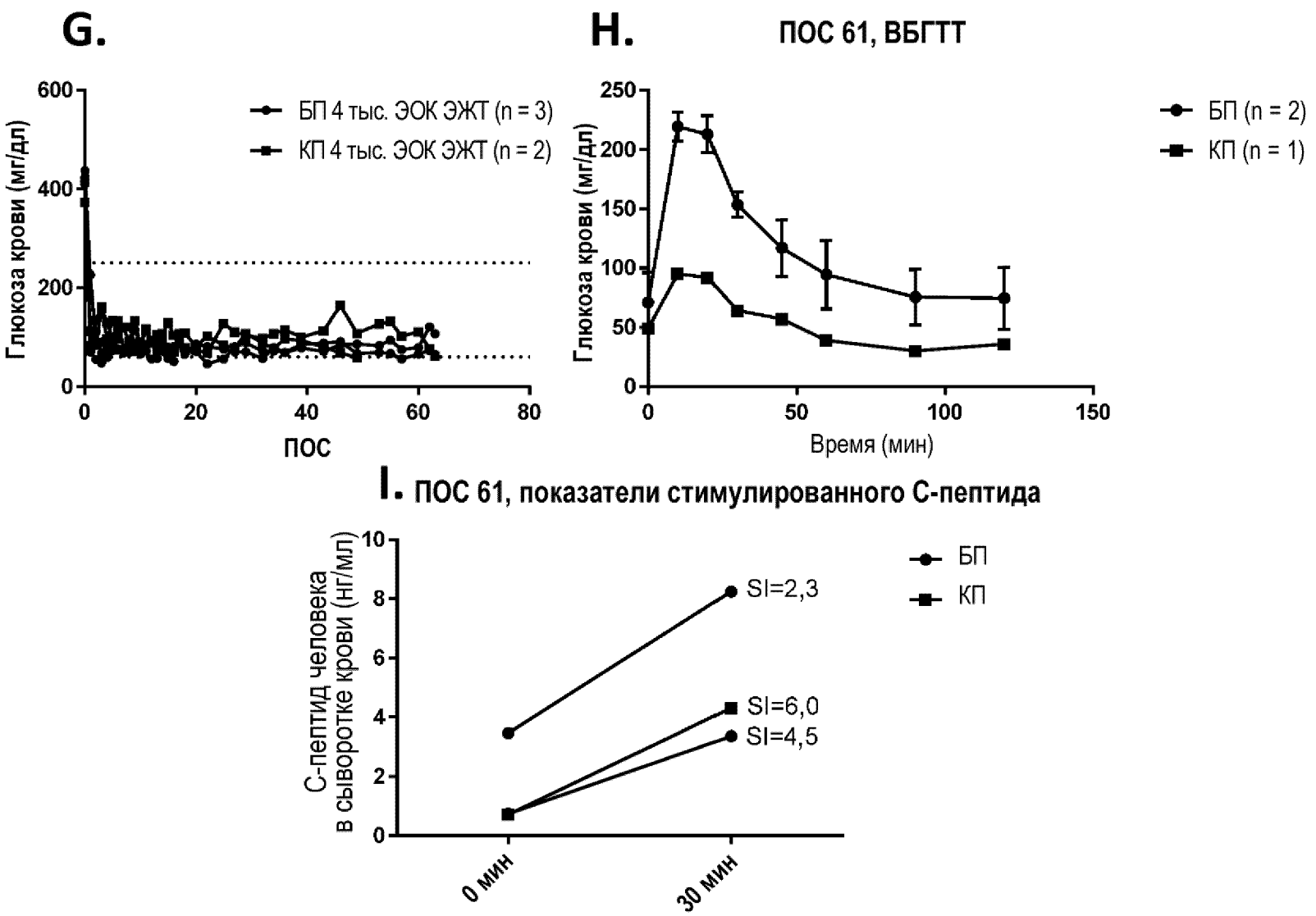


B.

Фиг. 5


C.
Донор № 1
Инсулин (мкЕд./л на нг ДНК)
БП, донор 1
БП, донор 2
КП, смесь
L1
H
L2
KCl
E.
Донор № 2
БП
КП
D.
2,7 мМ глюкозы
16,7 мМ глюкозы
30 мМ KCl
Секретируемый инсулин (мкЕд./мин на нг ДНК)
Время (мин)
F.
Время (мин)
БП
КП

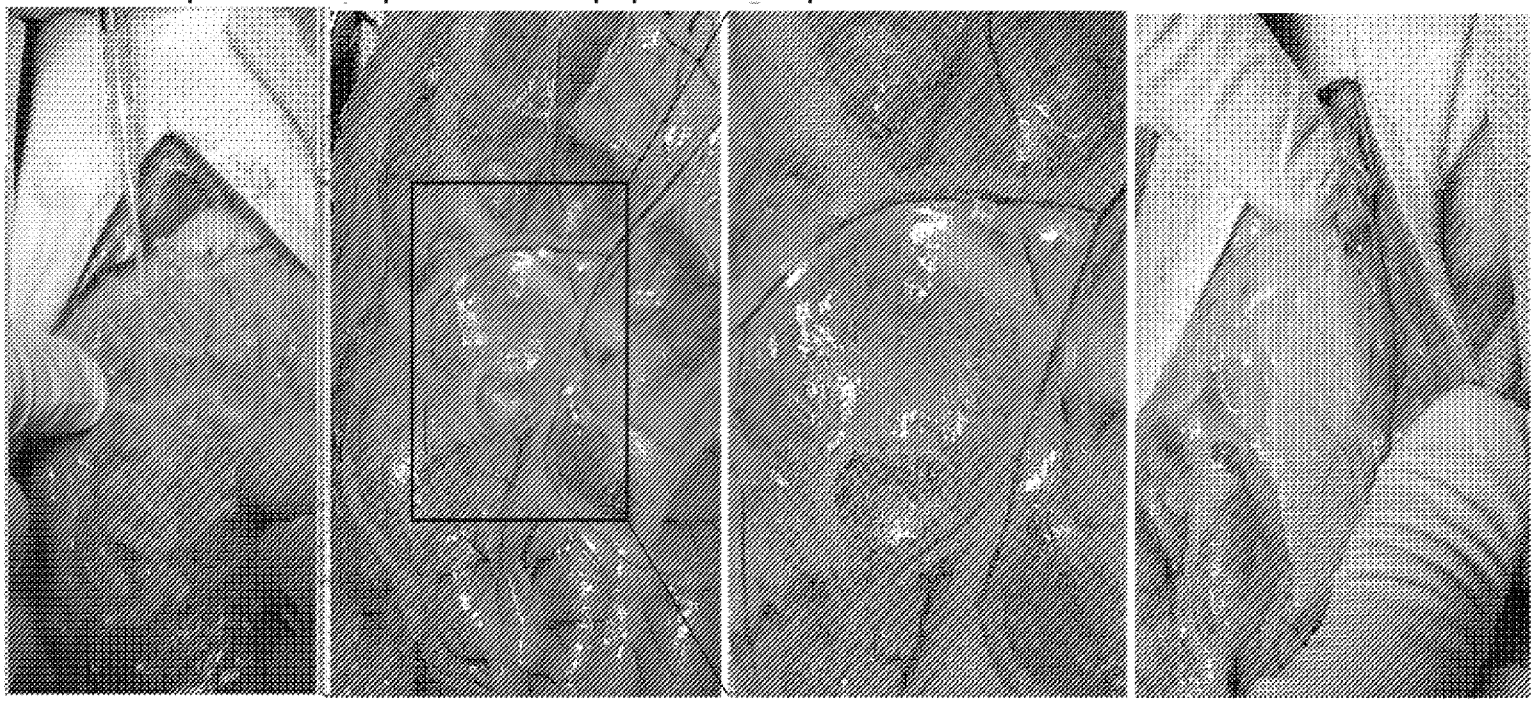
Фиг. 5


G.
БП 4 тыс. ЭОК ЭЖТ (n = 3)
КП 4 тыс. ЭОК ЭЖТ (n = 2)
Глюкоза крови (мг/дл)
600
400
200
0
0
20
40
60
80
ПОС
H.
ПОС 61, ВБГТТ
БП (n = 2)
КП (n = 1)
Глюкоза крови (мг/дл)
250
200
150
100
50
0
0
50
100
150
Время (мин)
I. ПОС 61, показатели стимулированного С-пептида
С-пептид человека в сыворотке крови (нг/мл)
10
8
6
4
2
0
SI=2,3
SI=6,0
SI=4,5
БП
КП
0 мин
30 мин

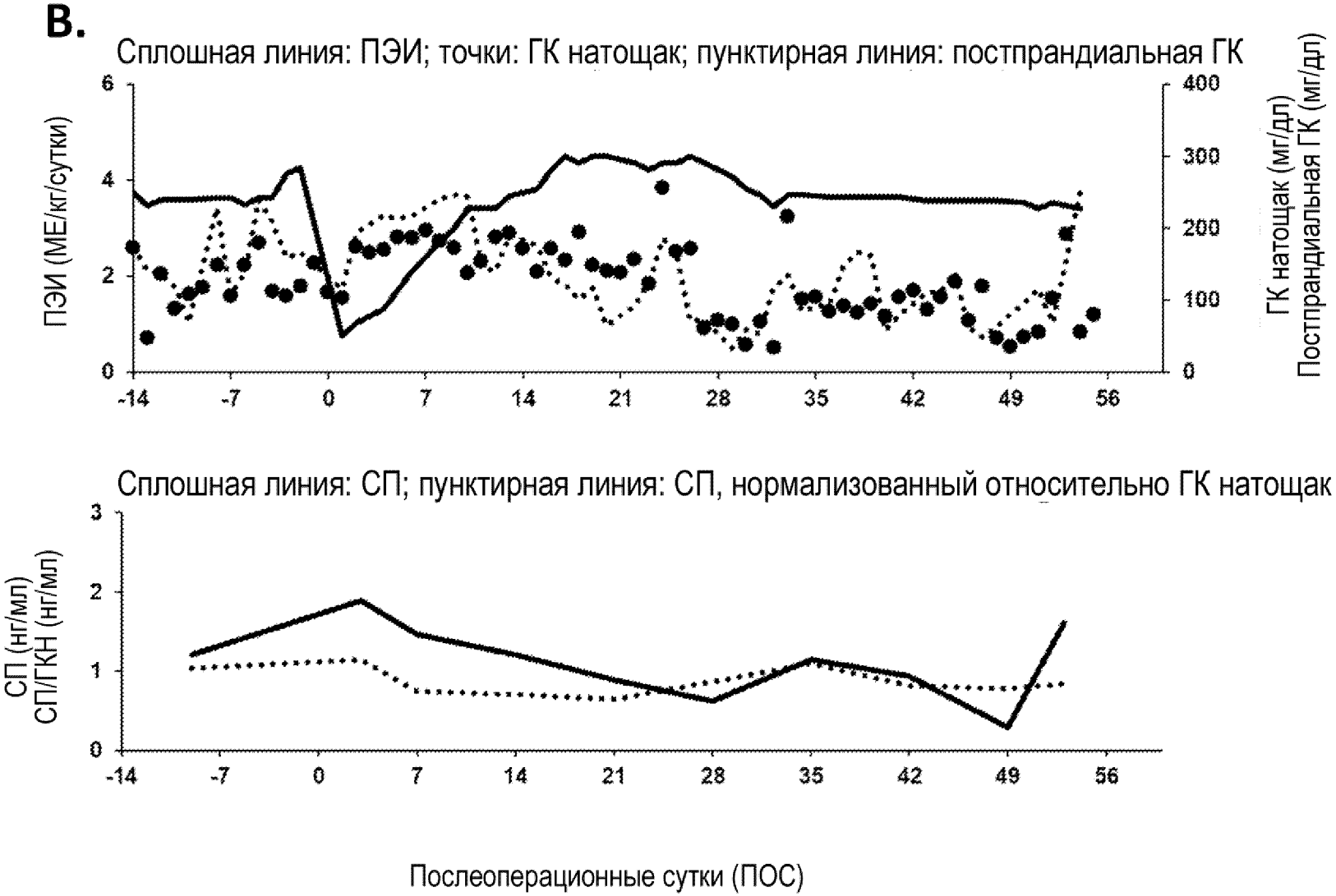
Фиг. 6

A.

Островки Лангерганса с конформным покрытием в сальнике НЧП



Фиг. 6


B.
Сплошная линия: ПЭИ; точки: ГК натощак; пунктирная линия: постпрандиальная ГК
ПЭИ (МЕ/кг/сутки)
ГК натощак (мг/дл)
Постпрандиальная ГК (мг/дл)
0
2
4
6
0
100
200
300
400
-14
-7
0
7
14
21
28
35
42
49
56
Сплошная линия: СП; пунктирная линия: СП, нормализованный относительно ГК натощак
СП (нг/мл)
СП/ГКН (нг/мл)
0
1
2
3
Послеоперационные сутки (ПОС)

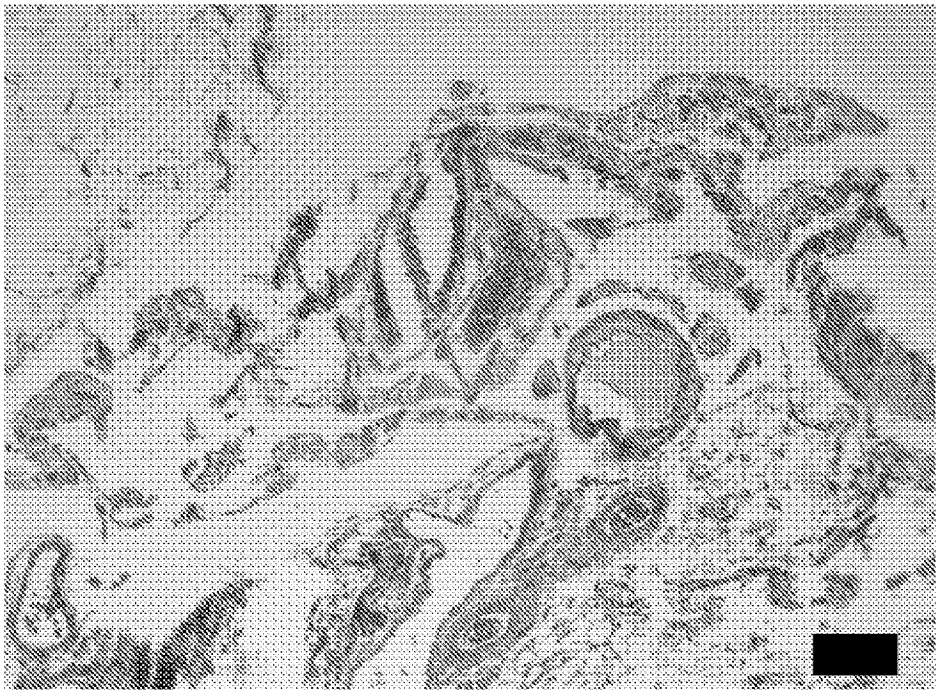
Фиг. 6

C.

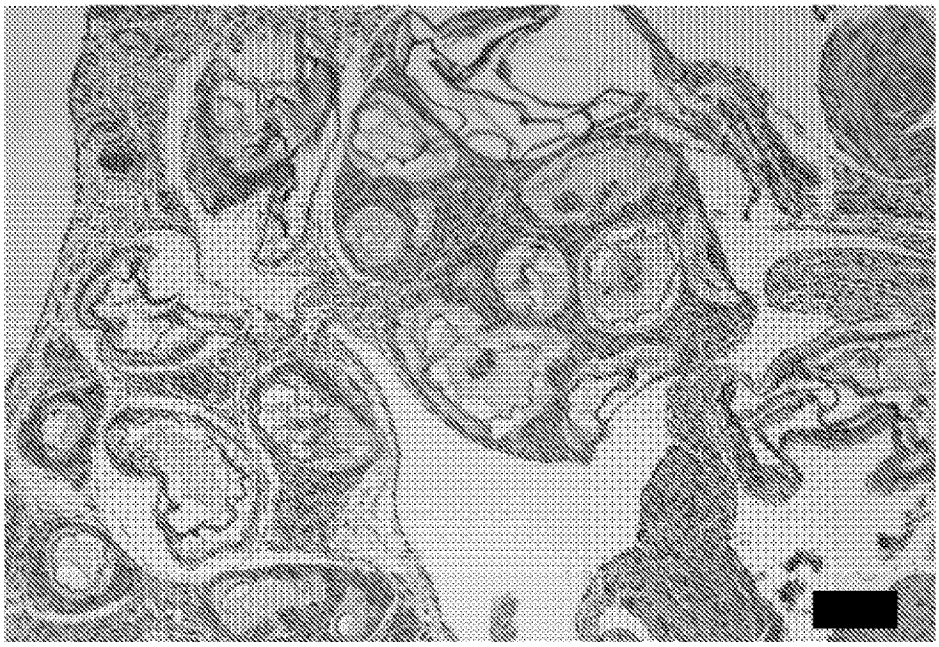
	ГКН (мг/дл)	ПГК (мг/дл)	ПЭИ (МЕ/кг/сутки)
26 суток до трансплантации	117,1 ± 38,3	139,1 ± 49,8	3,60 ± 0,22
ПОС 28-53	89,9 ± 42,5	95,3 ± 39,1	3,63 ± 0,14

Фиг. 6

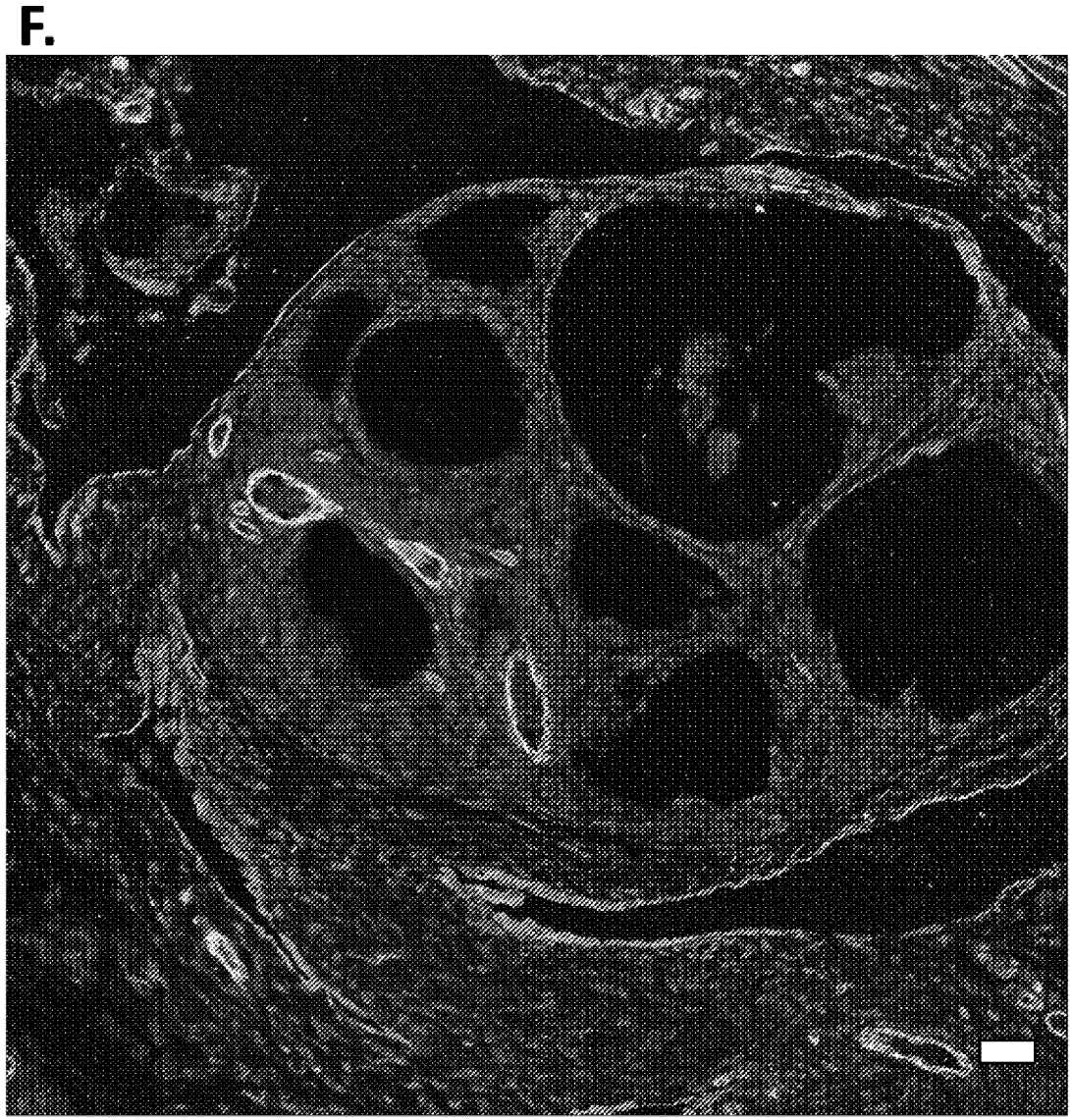
D.



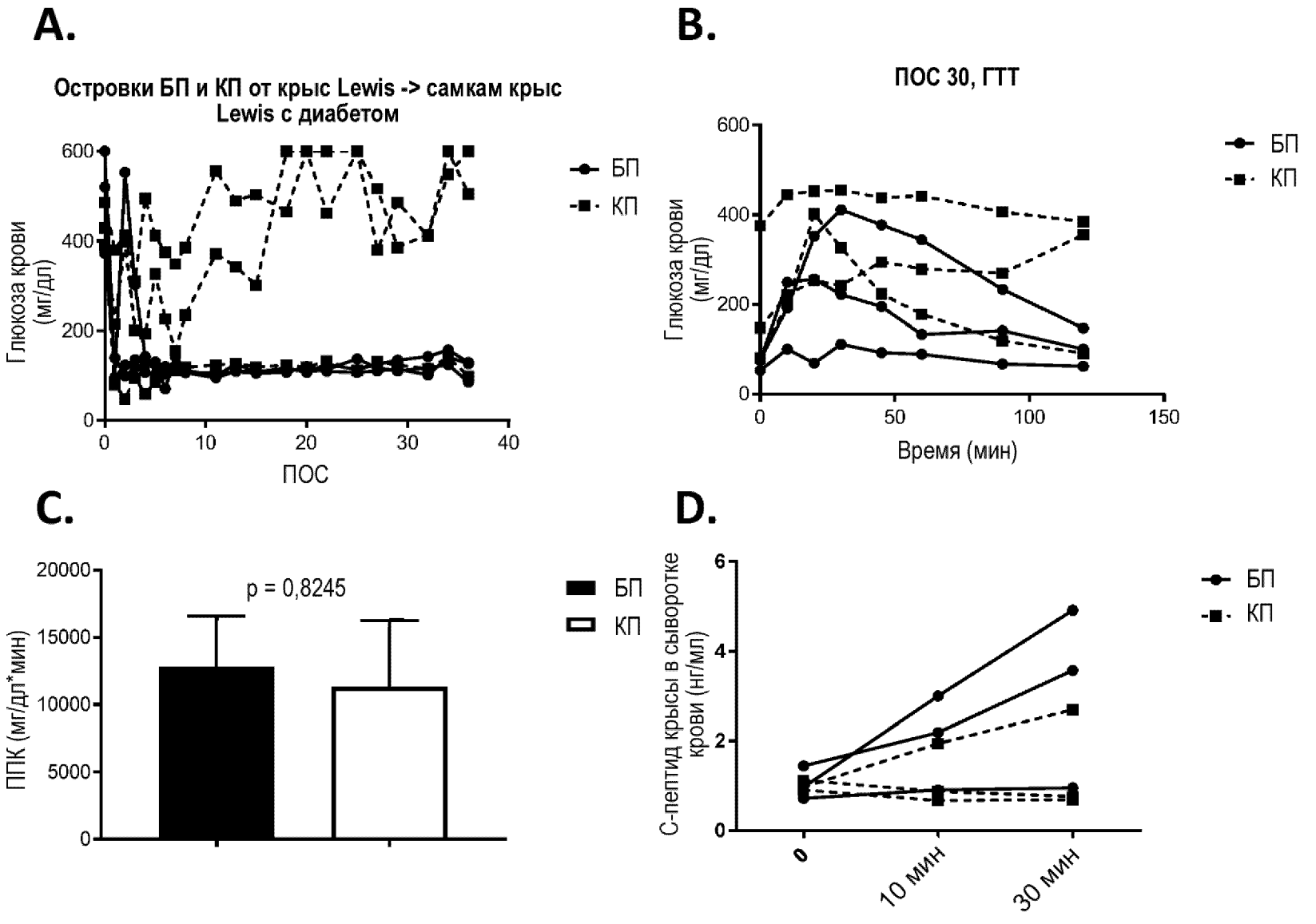
E.



Фиг. 6



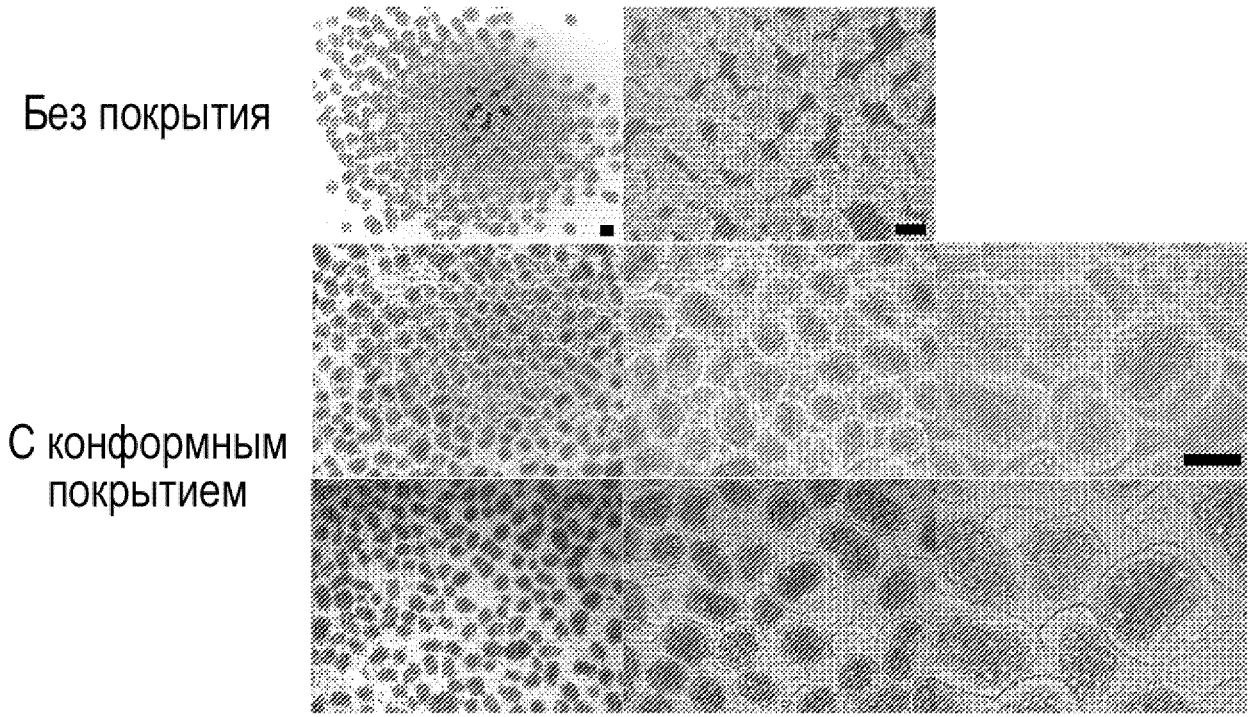
Фиг.7


A.
Островки БП и КП от крыс Lewis -> самкам крыс Lewis с диабетом
Глюкоза крови (мг/дл)
ПОС
БП
КП
B.
ПОС 30, ГТТ
Глюкоза крови (мг/дл)
Время (мин)
БП
КП
C.
ППК (мг/дл*мин)
p = 0,8245
БП
КП
D.
С-пептид крысы в сыворотке крови (нг/мл)
0
10 мин
30 мин
БП
КП

Фиг. 8

A.

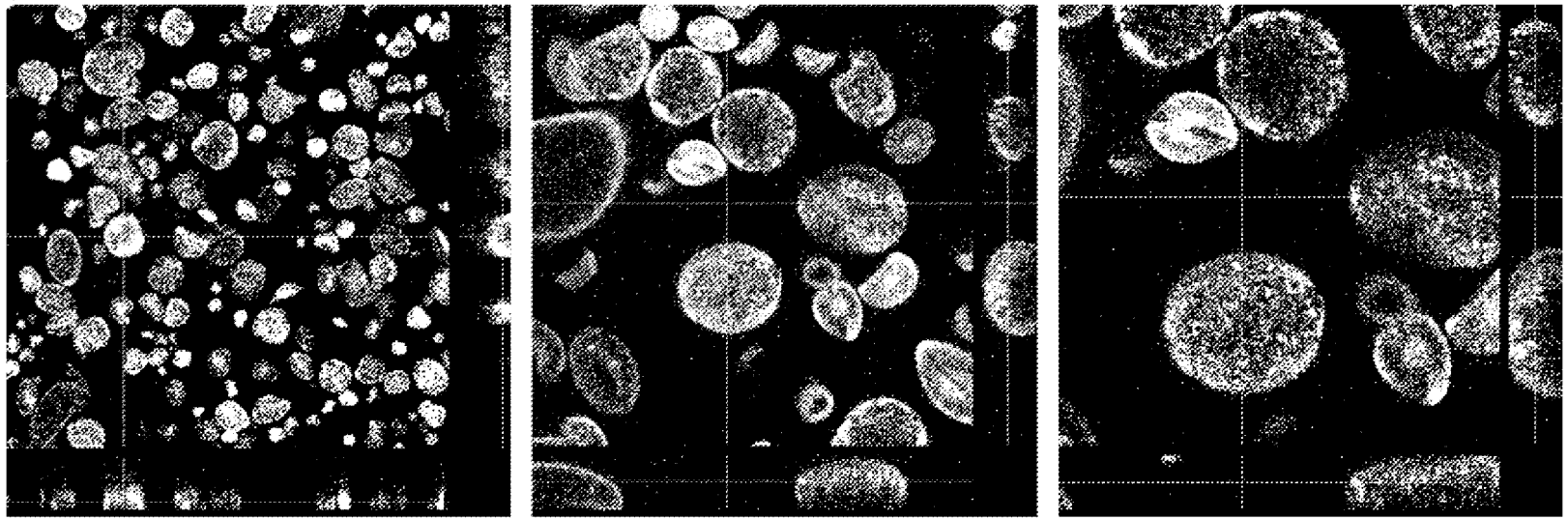
Изображения, полученные способом фазово-контрастной микроскопии: кластеры Min6 без покрытия и с конформным покрытием



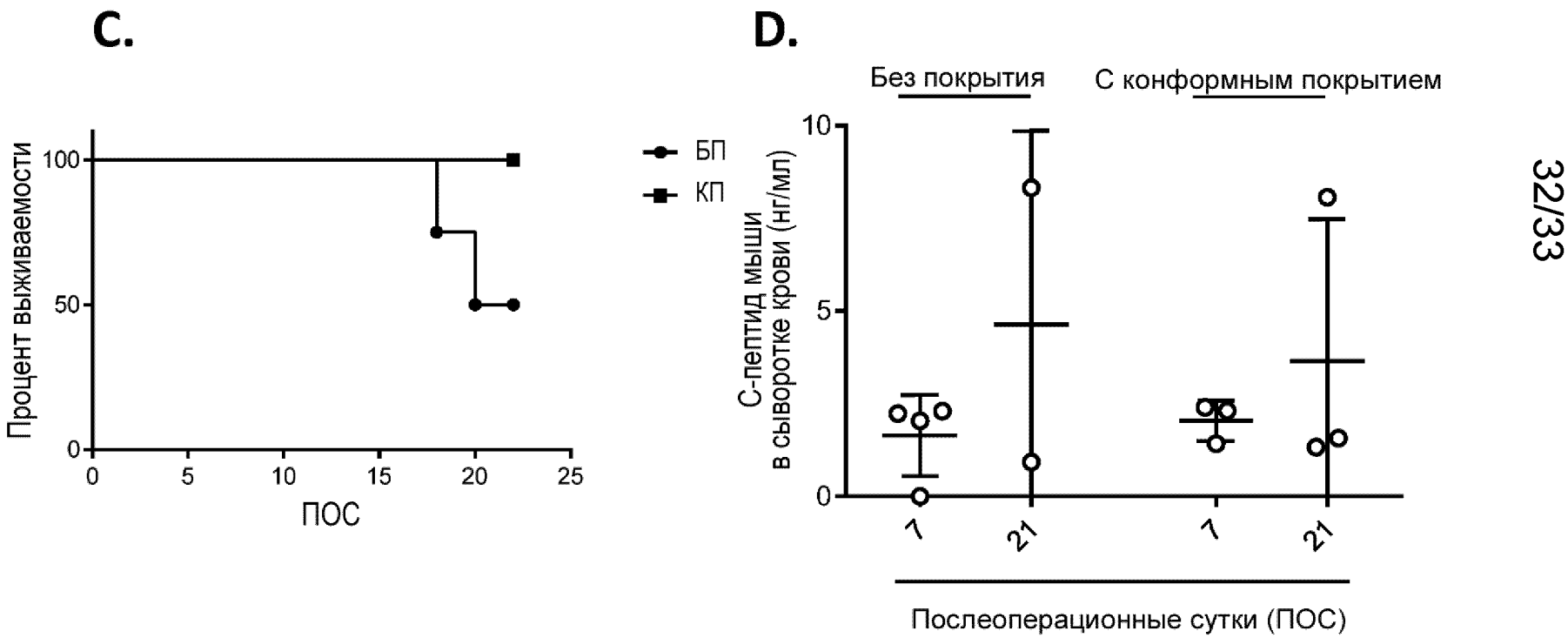
Фиг. 8

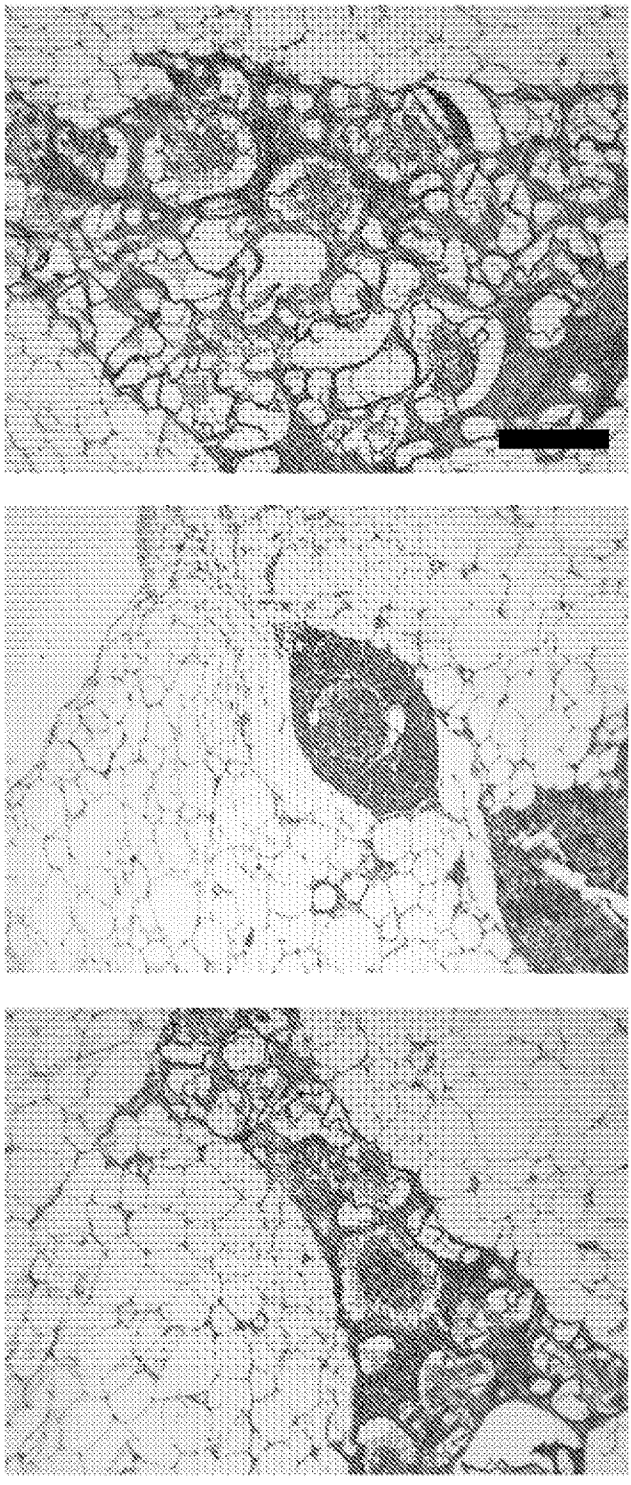
B.

Изображения, полученные способом конфокальной микроскопии, с *ортогональными проекциями* кластеров Min6 с конформным покрытием



Фиг. 8


C.
Процент выживаемости
100
50
0
0
5
10
15
20
25
ПОС
D.
Без покрытия
С конформным покрытием
БП
КП
С-пептид мыши в сыворотке крови (нг/мл)
10
5
0
7
21
7
21
Послеоперационные сутки (ПОС)

Фиг. 8

E.