

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **033999**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.12.18

(51) Int. Cl. *C12N 5/0775* (2010.01)

(21) Номер заявки
201590188

(22) Дата подачи заявки
2013.02.09

(54) СИСТЕМА И МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ

(31) **13/544,909**

(56) EP-A2-1921133
US-A1-20100317099

(32) **2012.07.09**

(33) **US**

(43) **2015.10.30**

(86) **PCT/US2013/025465**

(87) **WO 2014/011213 2014.01.16**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДЖОЙНТЕКЛАБЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Пастильник Феликс, Катц Натан (US)

(74) Представитель:
Можайский М.А. (RU)

(57) Система для забора и обработки жировой ткани с целью получения терапевтически эффективного количества стволовых клеток жировой ткани, включающая устройство для забора жировой ткани и модифицированную центрифужную пробирку, имеющую несколько входных штуцеров для липоасpirата, несколько входных штуцеров для обрабатываемой жидкости и несколько трубок для извлечения осадка после центрифугирования. Устройство для забора жировой ткани используется для извлечения определенного количества жировой ткани из организма человека, полученный липоасpirат поступает в первую модифицированную центрифужную пробирку по стерильному каналу, проводят несколько этапов обработки для очистки и разделения липоасpirата, путем центрифугирования в модифицированной центрифужной пробирке получают осадок, содержащий обогащенную фракцию стволовых клеток. Осадок после центрифугирования ресуспендируют в жидкости и вводят в организм человека для достижения терапевтического или косметического эффекта.

B1**033999****033999****B1**

Сходные заявки

Настоящая заявка заявляет приоритет согласно предварительной заявке на патент США № 61/505936, озаглавленной "Комплект для получения стволовых клеток жировой ткани", поданной 8 июля 2011 года, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Предпосылки к созданию изобретения

1. Область техники, к которой относится изобретение.

Изобретение относится к системам для получения и использования стволовых клеток жировой ткани, стволовым клеткам жировой ткани, полученным с применением такого комплекта, способам использования таких стволовых клеток жировой ткани, композициям, содержащим такие стволовые клетки жировой ткани.

2. Обсуждение существующего уровня техники.

Регенеративная медицина может быть определена как использование регенеративных механизмов организма для решения клинических задач, при задействовании их такими способами, которые не являются частью нормальных механизмов заживления, либо за счет искусственного усиления действия нормальных механизмов. Одним из классических примеров такого процесса является трансплантация костного мозга, при которой гемопоэтические стволовые клетки и клетки-предшественники забирают у донора и внедряют в организм реципиента, у которого нормальные гемопоэтические регенерационные механизмы были разрушены либо существенно истощены или ослаблены, в результате этой процедуры происходит замещение или восстановление кроветворной функции у реципиента. Такой подход был распространен и на негемопоэтические стволовые клетки, получаемые из различных источников и используемых для решения различных терапевтических или профилактических задач. В частности, было показано, что жировую ткань можно легко использовать в качестве источника мультипотентных мезенхимных стволовых клеток, пригодных для терапевтического и профилактического применения.

Мезенхимные стволовые клетки ("МСК") представляют собой плюрипотентные стволовые клетки, которые могут легко дифференцироваться в различные линии клеток, включая остеобласты, миоциты, хондроциты, адипоциты, эндотелиальные клетки и бета-клетки островков Лангерганса поджелудочной железы (Pittenger et al., *Science*, Vol. 284, pg. 143 (1999); Haynesworth et al., *Bone*, Vol. 13, pg. 69 (1992); Prockop, *Science*, Vol. 276, pg. 71 (1997)). МСК, также известные в литературе как стволовые клетки костного мозга, скелетные стволовые клетки и мультипотентные мезенхимные стромальные клетки, являются негемопоэтическими клетками-предшественниками, выделяемыми из зрелых тканей, и характеризуются выраженной способностью к пролиферации *in vitro* в некоммитированном состоянии, при сохранении потенциала к дифференцировке в различные клеточные линии мезенхимного происхождения, включая линии хондроцитов, остеобластов и адипоцитов, в ответ на соответствующие стимулы. Исследования, проведенные *in vitro*, продемонстрировали способность МСК дифференцироваться в мышечные клетки (Wakitani et al., *Muscle Nerve*, Vol. 18, pg. 1417 (1995)), нейроноподобные предшественники (Woodbury et al., *J. Neurosci. Res.*, Vol. 69, pg. 908 (2002); Sanchez-Ramos et al., *Exp. Neurol.*, Vol. 171, pg. 109 (2001)), кардиомиоциты (Toma et al., *Circulation*, Vol. 105, pg. 93 (2002); Fakuda, *Artif. Organs*, Vol. 25, pg. 187 (2001)) и, возможно, другие типы клеток. МСК присутствуют в различных тканях организма, развивающихся из эмбриональной мезодермы (например, гемопоэтические клетки и соединительные ткани). Таким образом, плюрипотентные клетки могут быть выделены из любых таких тканей, также возможна индукция их дифференцировки в любой из этих типов клеток.

Традиционным источником для получения жировой ткани является хирургическая липосакция. Фактически, большие количества плюрипотентных клеток могут быть получены путем простой аспирации из жировой ткани, например из липоаспирационных образцов, получаемых во время операций пластической хирургии. Настоящее изобретение относится, в частности, к системе для выделения МСК из жировой ткани. В настоящем документе термином "жировая ткань" обозначается ткань, содержащая различные типы клеток, включая адипоциты и клетки микрососудов. Жировая ткань содержит стволовые клетки и клетки-предшественники эндотелиальных клеток. Соответственно, под жировой тканью понимается жир, включая соединительную ткань, осуществляющую хранение запасов жира.

Было установлено, что жировая ткань является особенно богатым источником стволовых клеток. Это может быть обусловлено, по меньшей мере, частично, простотой удаления основного компонента жировой ткани, не относящегося к стволовым клеткам, адипоцитам. Однако обработка жировой ткани для отделения плюрипотентных клеток, а также размножения и (дополнительно) дифференцировки полученной популяции стволовых клеток в соответствии с системами и способами, известными специалистам в соответствующей области, как правило, требует применения дорогостоящего специализированного оборудования, а также дорогостоящих специализированных процедур обработки. Затраты, связанные с использованием специально сконструированных устройств, предназначенных для многократного выделения стволовых клеток из жировой ткани полученной, например, путем липосакции от живого донора-человека, ограничивают применение обогащенной стволовыми клетками среды для терапевтических целей только крупными больницами и исследовательскими учреждениями. В результате проведение терапии на основе стволовых клеток жировой ткани в практике небольших медицинских или иных организаций является невозможным или экономически нецелесообразным. Кроме того, применение косметиче-

ских оздоровительных методик на основе стволовых клеток затруднено в связи с высокими затратами и низкой доступностью существующих в настоящее время систем и способов выделения и культивирования стволовых клеток жировой ткани.

Существует потребность в методиках и системах, обеспечивающих экономичное и безопасное выделение стволовых клеток жировой ткани в количествах, пригодных для применения в терапевтических или косметических целях, в чистом виде или в качестве составной части среды, обогащенной стволовыми клетками, и, в частности, методик и систем, пригодных для использования в профессиональной практике малых масштабов, не требующих крупных капиталовложений или специализированных помещений.

Краткое изложение сущности изобретения

Изобретателем были разработаны и практически воплощены система и различные способы получения стволовых клеток жировой ткани, направленные на решение задач и устранение проблем, описанных выше. Популяция клеток, полученных из жировой ткани человека, может быть использована в качестве источника клеток для терапевтического и косметического применения. Среди прочего, стволовые клетки жировой ткани как в чистой форме (только стволовые клетки), так и в обогащенной форме (культуры клеток с долей стволовых клеток, увеличенной относительно доли, встречающейся *in vivo* в жировых тканях) могут быть использованы в регенеративной медицине, в частности для лечения заболеваний, при которых может быть достигнуто улучшение или выздоровление за счет применения регенерирующих клеток. Клетки полученной популяции могут вводиться пациенту без других адипоцитов или соединительной ткани, либо они могут быть введены после смешивания с жировой тканью в высокой концентрации, как описано ниже. Настоящее изобретение относится к системе для получения очищенной фракции мезенхимных стволовых клеток жирового происхождения из жировой ткани и введению очищенной фракции обратно в организм человека или животного. Настоящее изобретение описывает систему для выделения жировой ткани (липоаспирата) и ее обработки для получения обработанного липоаспирата (ОЛА), содержащего стволовые клетки с частотой не менее 0,1%, а, как правило, более 0,5%. В некоторых вариантах осуществления изобретения может быть получен ОЛА, содержащий около 2-12% стволовых клеток в соответствии с настоящим изобретением возможно получение ОЛА, в котором до 100% популяции представлены стволовыми клетками.

Настоящее изобретение относится к системе для получения очищенной или обогащенной фракции мезенхимных стволовых клеток жировой ткани в клинических условиях, а также к композициям, способам и системам для использования стволовых клеток, полученных из жировой ткани, которые вводят непосредственно реципиенту наряду с добавками, которые могут быть необходимы для стимуляции, инициации или поддержания терапевтического, структурного или косметического полезного эффекта. Варианты осуществления настоящего изобретения представляют многокомпонентную систему для выделения и обработки жировой ткани с целью получения терапевтически эффективных количеств стволовых клеток жировой ткани, предназначенных для введения в организм пациента. Предпочтительно, система не требует применения в условиях операционной или проведения полномасштабной липоаспирации, и поэтому ее можно использовать вне больничных или лабораторных условий. Поэтому система является пригодной для применения в небольших и средних медицинских клиниках, амбулаторных хирургических центрах и кабинетах врачей многопрофильной специализации.

В одном из вариантов осуществления изобретения система, называемая системой Мини-Стем™, позволяет частнопрактикующим врачам, а также хирургическим центрам использовать доступные способы безопасного выделения МСК из жировой ткани любого пациента для применения в терапевтических целях или для криосохранения (создания банка стволовых клеток). Эта система включает в себя средства для проведения безопасной, стерильной и замкнутой процедуры, в ходе которой производится забор небольшого образца жировой ткани (например, путем липосакции) в качестве липоаспирата; материалы для обработки и очистки фракций МСК на месте забора; и, дополнительно, инструменты, предназначенные для использования при оценке качества полученного обработанного липоаспирата. Эта систему может использовать лаборант после освоения простых методов обращения с ней в ходе соответствующего обучения.

В одном из вариантов осуществления изобретения обработка жировой ткани производится в системе, обеспечивающей замкнутый, стерильный поток жидкостей/тканей. Это достигается путем использования комплекта стерильных контейнеров и трубок, обеспечивающих перенос тканей и жидкостей по замкнутому пути. Также предоставляется ряд предварительно упакованных реактивов для обработки (например, физиологический раствор, ферменты и т.д.), предназначенных для введения в стерильные контейнеры, с целью обеспечения простого контроля добавления реактивов, температуры и продолжительности обработки, что упрощает процесс ручной обработки материала операторами. В предпочтительном варианте осуществления изобретения вся процедура, от забора ткани до обработки и введения в организм реципиента, может быть проведена в одном и том же учреждении, а в действительности, даже в одном и том же помещении, в котором пациент проходит процедуру, установленную в соответствии с настоящим изобретением.

В соответствии с одним из вариантов настоящего изобретения производится забор небольшого количества исходной жировой ткани из организма пациента в стерильный контейнер, входящий в ком-

плект. Исходную жировую ткань обрабатывают в одном или нескольких стерильных контейнерах, входящих в комплект, с целью удаления большей части зрелых адипоцитов и соединительной ткани, что приводит к получению гетерогенного множества стволовых клеток жировой ткани, пригодных для введения в организм реципиента. Реактивы, необходимые для обработки жировой ткани, предоставляются в качестве части комплекта и вводятся в один или несколько стерильных контейнеров в соответствии с заранее определенным графиком, с целью получения обработанного липоасpirата, содержащего стволовые клетки жировой ткани в желаемой концентрации. Стволовые клетки жировой ткани, или модифицированный липоасpirат, обогащенный долей стволовых клеток, увеличенной относительно доли, встречающейся *in vivo*, могут быть введены в организм реципиента в сочетании с другими клетками, тканями, фрагментами тканей или другими стимуляторами клеточного роста и/или дифференцировки. В предпочтительном варианте осуществления изобретения стволовые клетки с любыми из перечисленных выше добавок вводят в организм человека, из которого они были получены, в рамках одной оперативной процедуры, с целью достижения терапевтического, структурного или косметического полезного эффекта для реципиента.

В одном из вариантов осуществления изобретения способ лечения пациента включает следующие этапы: а) предоставление одноразовой системы забора ткани в качестве компонента комплекта; б) забор жировой ткани, содержащей стволовые клетки в определенной концентрации, из организма пациента с использованием одноразовой системы забора ткани; с) обработка в одном или нескольких стерильных контейнерах, входящих в набор как минимум части извлеченной жировой ткани с целью достижения концентрации стволовых клеток, превышающей концентрацию стволовых клеток в жировой ткани до обработки; и d) введение стволовых клеток в организм пациента из стерильного контейнера, входящего в состав комплекта.

В предпочтительном варианте осуществления изобретения система для забора и обработки жировой ткани с целью получения терапевтически эффективного количества стволовых клеток жировой ткани включает в себя устройство для забора жировой ткани и модифицированную центрифужную пробирку, имеющую несколько входных штуцеров для липоасpirата, несколько входных штуцеров для обрабатываемой жидкости и несколько трубок для извлечения осадка после центрифугирования. Устройство для забора жировой ткани используется для извлечения определенного количества жировой ткани из организма человека, полученный липоасpirат поступает в первую модифицированную центрифужную пробирку по стерильному каналу, проводят несколько этапов обработки для очистки и разделения липоасpirата, путем центрифугирования в модифицированной центрифужной пробирке получают осадок, содержащий обогащенную фракцию стволовых клеток. Осадок после центрифугирования ресуспендируют в жидкости и вводят в организм человека для достижения терапевтического или косметического эффекта. В соответствии с другим вариантом осуществления изобретения система дополнительно включает в себя вторую модифицированную центрифужную пробирку, имеющую конструкцию, по существу, сходную с конструкцией первой модифицированной центрифужной пробирки, при этом вторую модифицированную центрифужную пробирку используют для дальнейшей обработки ресуспендированного осадка после центрифугирования с целью достижения более высокой концентрации стволовых клеток.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления изобретения предлагается способ получения стволовых клеток жировой ткани, включающий следующие этапы: (а) извлечение жировой ткани из организма человека с использованием устройства для забора жировой ткани; (b) осуществление стерильного переноса липоасpirата в модифицированную центрифужную пробирку, имеющую несколько входных штуцеров для липоасpirата, несколько входных штуцеров для обрабатываемой жидкости и несколько трубок для извлечения осадка после центрифугирования; (с) обработка липоасpirата в модифицированной центрифужной пробирке путем добавления одной или нескольких жидкостей через несколько штуцеров для обрабатываемой жидкости, обработка включает в себя одну или несколько процедур очистки и разделения липоасpirата; (d) центрифугирование модифицированной центрифужной пробирки, содержащей обработанный липоасpirат, с целью повышения концентрации осадка после центрифугирования, содержащего фракцию, обогащенную стволовыми клетками; (е) ресуспендирование осадка после центрифугирования в жидкости для получения клеточной смеси, в существенной степени обогащенной стволовыми клетками относительно концентрации стволовых клеток, присутствовавших в исходном липоасpirате; и (f) введение ресуспендированной клеточной смеси в организм человека для достижения терапевтического или косметического эффекта.

Эти и другие объекты, свойства и преимущества настоящего изобретения будут ясны из подробного описания изобретения, приведенного ниже.

Краткое описание чертежей

Прилагаемые чертежи иллюстрируют некоторые варианты осуществления изобретения и в сочетании с описанием служат для пояснения принципов изобретения в соответствии с вариантами его осуществления. Специалистам в соответствующей области будет понятно, что конкретные варианты осуществления изобретения, показанные на чертежах, являются лишь примерами и не служат цели ограничения объема изобретения.

Фиг. 1 представляет собой диаграмму, показывающую модифицированную центрифужную пробирку

ку для извлечения стволовых клеток из жировой ткани в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения;

фиг. 2 - диаграмму, показывающую модифицированную центрифужную пробирку для извлечения стволовых клеток из жировой ткани, которая включает новые средства атомизации, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения;

фиг. 3 - диаграмму, показывающую систему для подготовки мезенхимных стволовых клеток, полученных из жировой ткани, к клиническому применению, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения;

фиг. 4 - диаграмму, иллюстрирующую способ высокоуровневой обработки для подготовки мезенхимных стволовых клеток, полученных из жировой ткани, к клиническому применению, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения;

фиг. 5 - диаграмму, подробно иллюстрирующую процесс подготовки и применения мезенхимных стволовых клеток, в клинических целях, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения.

Подробное описание изобретения

Изобретателем были разработаны и введены в практику система и различные способы получения стволовых клеток жировой ткани, направленные на решение задач и проблем, описанных выше. Ниже приведено подробное описание различных техник на примере нескольких вариантов осуществления изобретения, показанных на прилагаемых чертежах. В приведенное ниже описание включено описание многочисленных специфических элементов, которые служат для обеспечения полного понимания одного или нескольких вариантов и/или свойств, описание или ссылка на которые приводится в настоящем документе. Однако специалистам в соответствующей области будет понятно, что один или несколько вариантов и/или свойств, описание или ссылка на которые приводится в настоящем документе, могут быть использованы и без некоторых или всех указанных специфических элементов. В других случаях хорошо известные этапы обработки и/или конструкции не описаны подробно для того, чтобы не усложнять описание вариантов и/или свойств, описание или ссылка на которые приводится в настоящем документе.

В настоящей заявке могут быть описаны одно или несколько различных изобретений. Помимо этого, для одного или нескольких изобретений, описанных в настоящей заявке, могут быть описаны несколько альтернативных вариантов осуществления; необходимо понимать, что они представлены только в качестве иллюстрации. Описанные варианты осуществления изобретения не являются ограничивающими в каком-либо смысле. Одно или несколько изобретений могут быть широко применимы в отношении многих вариантов осуществления изобретения, как хорошо видно из раскрытия изобретения. В целом, варианты осуществления изобретения описаны достаточно подробно, чтобы дать возможность специалистам в соответствующей области использовать на практике одно или несколько изобретений, и понять, что возможно использование других вариантов осуществления изобретения и что возможно внесение структурных, логических, программных, электрических и других изменений без выхода за границы объема конкретного изобретения. Соответственно, специалистам в данной области будет понятно, что одно или несколько изобретений могут быть реализованы на практике с различными модификациями и изменениями. Конкретные особенности одного или нескольких изобретений могут быть описаны путем ссылки на один или несколько вариантов осуществления изобретения или чертежей, являющихся частью настоящего раскрытия сущности изобретения, и демонстрирующих, путем иллюстрирования, конкретные варианты осуществления одного или нескольких изобретений. Следует понимать, однако, что такие особенности не ограничены использованием в одном или нескольких конкретных вариантах осуществления изобретения или чертежах, посредством ссылки на которые они описаны. Настоящее раскрытие изобретения не является ни буквальным описанием всех вариантов осуществления одного или нескольких изобретений, ни списком особенностей одного или нескольких изобретений, которые должны присутствовать во всех вариантах их осуществления.

Заголовки разделов, представленных в настоящей заявке на получение патента, а также название настоящей заявки сформулированы только для удобства, их в любом случае не следует рассматривать как ограничения раскрытия настоящего изобретения.

Описание варианта осуществления изобретения, включающего несколько компонентов, объединенных друг с другом, не подразумевает, что все эти компоненты являются необходимыми. Наоборот, возможно описание разнообразных дополнительных компонентов для иллюстрации широкого разнообразия возможных вариантов осуществления одного или нескольких изобретений, а также для более полной иллюстрации одного или нескольких аспектов изобретений. Аналогично, хотя этапы процесса, шаги реализации способа, элементы алгоритма и тому подобное могут быть описаны в последовательном порядке, такие процессы, способы и алгоритмы могут, как правило, быть сконфигурированы и в другом порядке, если специально не указано иное. Другими словами, любая последовательность или порядок этапов, которые могут быть описаны в настоящей заявке на получение патента, сами по себе не указывают на требование осуществления этих этапов именно в таком порядке. Этапы описанного процесса могут осуществляться в любом целесообразном с практической точки зрения порядке. Кроме того, некоторые этапы могут осуществляться одновременно, несмотря на то что в описании указано или подразумевается их

неодновременное осуществление (например, в силу того, что один этап описан после другого этапа). Кроме того, иллюстрация процесса путем его изображения в виде чертежа не подразумевает, что проиллюстрированный процесс исключает другие вариации или модификации, не подразумевает, что проиллюстрированный процесс или любые его этапы являются необходимыми для одного или нескольких изобретений, а также не подразумевает, что проиллюстрированный процесс является предпочтительным. Кроме того, этапы, как правило, описаны по одному разу в каждом варианте осуществления изобретения, однако это не означает, что они обязательно должны повторяться один раз, или что они могут осуществляться только один раз при каждой реализации процесса, метода или алгоритма. Некоторые этапы в некоторых вариантах осуществления изобретения могут быть выпущены, либо некоторые этапы в данном варианте осуществления изобретения или при данной реализации варианта осуществления изобретения могут быть выполнены более одного раза.

В тех случаях, когда приведено описание отдельного устройства или изделия, легко понять, что возможно использование более одного устройства или изделия вместо единственного устройства или изделия. Аналогично, в тех случаях, когда приведено описание более одного устройства или изделия, легко понять, что возможно использование единственного устройства или изделия вместо нескольких.

Функциональность или свойства устройства могут быть реализованы альтернативным способом за счет одного или нескольких других устройств, которые не описаны в явной форме как имеющие такую функциональность или свойства. Таким образом, не требуется включение самого устройства в другие варианты осуществления одного или нескольких изобретений.

Методики и механизмы, описанные в настоящем документе или включенные в настоящий документ в виде ссылки, иногда описаны в единственном числе для ясности. Однако следует отметить, что конкретные варианты осуществления изобретения включают в себя несколько итераций методики или несколько реализаций механизма, если не указано иное. Описания процесса или блоки на чертежах следует понимать как представляющие модули, сегменты или части кода, которые включают одну или несколько выполнимых инструкций по включению определенных логических функций или этапов в процесс. В пределы вариантов осуществления настоящего изобретения включены альтернативные реализации, в которых, например, функции могут выполняться в другом порядке, отличающемся от показанного или обсужденного, в том числе, по существу, одновременно или в обратном порядке, в зависимости от включенной функциональности, как должно быть понятно всем специалистам в соответствующей области.

Любой признак или комбинация признаков, описанные в настоящем документе, находятся в пределах объема настоящего изобретения при условии, что включенные признаки в любой такой комбинации не являются взаимоисключающими, исходя из контекста, настоящей спецификации и знаний, имеющих у любого специалиста в соответствующей области. Для целей обобщенного изложения настоящего изобретения в настоящем документе описаны конкретные особенности, преимущества и новые признаки настоящего изобретения. Конечно, следует понимать, что не обязательно все эти особенности, преимущества или признаки будут реализованы в любом конкретном варианте осуществления настоящего изобретения. Дополнительные преимущества и особенности настоящего изобретения раскрываются в приведенном ниже подробном описании и формуле изобретения.

В настоящем документе приведены ссылки на несколько публикаций и патентов. Все упомянутые публикации и патенты считаются полностью включенными в настоящий документ посредством ссылки. Все упомянутые в настоящем документе публикации, патенты и патентные заявки, считаются полностью включенными в настоящий документ посредством ссылки в такой же степени, как если бы для каждой отдельной публикации, патента или патентной заявки было отдельно указано, что она полностью включена в настоящий документ посредством ссылки.

Определения.

В рамках настоящего документа под "единицей жировой ткани" понимается дискретное или измеримое количество жировой ткани. Измерение единицы жировой ткани возможно путем определения массы и/или объема единицы. На основании данных, указанных выше, в состав единицы обработанного липоаспирата, извлеченного из организма пациента, входит клеточный компонент, как минимум 0,1% которого представлен стволовыми клетками. В материалах, включенных в настоящий документ в виде ссылки, под единицей жировой ткани может пониматься все количество жировой ткани, взятой из организма пациента, либо количество, меньшее всего количества жировой ткани, взятой из организма пациента. Так, единица жировой ткани может быть объединена с другой единицей жировой ткани с образованием единицы жировой ткани, масса или объем которой равен сумме масс или объемов индивидуальных единиц.

В рамках настоящего документа под "частью" понимается количество материала, меньшее целого. Под меньшей частью понимается количество, меньшее 50%, а под большей частью понимается количество большее 50%. Так, единица жировой ткани, которая меньше всего количества жировой ткани, извлеченной из организма пациента, представляет собой часть извлеченной жировой ткани.

В рамках настоящего документа под "стволовой клеткой" понимается мультипотентная клетка, обладающая потенциалом к дифференцировке в различные другие типы клеток, которая выполняет одну или несколько специализированных функций и обладает способностью к самообновлению. Некоторые из

стволовых клеток, описываемые в настоящем документе, могут быть плюрипотентными.

В рамках настоящего документа под "обработанным липоаспиратом" (ОЛА) понимается жировая ткань, которая была обработана для отделения активного клеточного компонента (например, компонента, содержащего стволовые клетки) от зрелых адипоцитов и соединительной ткани. Как правило, под ОЛА понимается осадок клеток, полученный путем промывания и отделения клеток из жировой ткани. Осадок, как правило, получен путем центрифугирования суспензии клеток, при котором клетки скапливаются в нижней части контейнера для центрифугирования.

В рамках настоящего документа под "профилактически или терапевтически эффективным количеством" понимается количество клеток, описываемых в настоящем изобретении, содержащееся в фармацевтической композиции, которое способно оказывать желаемое терапевтическое действие. Специалистам в соответствующей области будет понятно, что количество клеток (например, содержание клеток в дозе) может различаться в зависимости от многих факторов, включая, помимо прочего, место введения, степень заболевания и способ введения. Опыт трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (стволовые клетки, полученные из костного мозга или из пуповинной крови, используемые для восстановления кроветворной функции организма реципиента) показывает, что приживление трансплантатов зависит от дозы вводимых клеток и характеризуется пороговыми эффектами. Так, вероятно, что в пределах, устанавливаемых другими переменными, будет применим общий принцип "чем больше, тем лучше", и что в тех случаях, когда это возможно, целесообразно будет осуществлять забор как можно большего количества ткани. Введение дозы клеток, описываемой в настоящем документе, может быть повторено в зависимости от состояния и реакции пациента, по прошествии дней, недель или месяцев, по решению лечащего врача или другого медицинского работника.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" обозначает состав, зарегистрированный регуляторным органом на уровне государства или штата, либо внесенный в Фармакопею США, или Европейскую фармакопею, или другую общепризнанную фармакопею, в качестве состава, пригодного для использования у животных, включая человека. Термин "носитель" обозначает растворитель, адъювант, вспомогательное вещество или вещество-основу, в котором осуществляется введение клеток, описываемых в настоящем изобретении, таким образом, носитель должен быть совместим с клетками. Фармацевтические составы, описываемые в настоящем изобретении, при необходимости, могут также содержать добавки, предназначенные для усиления, контроля или другого воздействия на запланированный терапевтический эффект клеток в указанных фармацевтических составах, и/или вспомогательные вещества или приемлемые с фармацевтической точки зрения вещества, такие как небольшие количества буферных агентов для контроля pH, поверхностно-активных веществ, дополнительных растворителей, консервантов и т.д. Также для стабилизации клеточной суспензии возможно добавление хелатирующих металлы веществ. Стабильность клеток в жидкой среде фармацевтического состава, описываемой в настоящем изобретении, может быть повышена путем добавления дополнительных веществ, таких как, например, аминокислоты, такие как аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и т.д. Приемлемые с фармацевтической точки зрения вещества, которые могут быть использованы в фармацевтическом составе, описываемом в настоящем изобретении, в целом известны специалистам в соответствующей области и используются в обычной практике при изготовлении композиций на основе клеток. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в следующем издании: E.W. Martin "Remington's Pharmaceutical Sciences".

В качестве примеров, иллюстрирующих, но не ограничивающих полный спектр носителей для введения клеток, содержащихся в фармацевтической композиции, описываемой в настоящем изобретении, можно назвать, например, стерильный физиологический раствор (0,9% NaCl), ФБР и др.

Подробное описание вариантов осуществления изобретения

Было разработано несколько устройств для забора и обработки клеток из жировой ткани, однако использование этих устройств характеризовалось одной или несколькими проблемами, которые препятствовали их широкому применению. В число этих проблем входят сложность использования и высокие затраты. Таким образом, существует потребность в альтернативных подходах, позволяющих быстро и надежно получать популяции активных клеток, которые обеспечивали бы достижение повышенного выхода, устойчивости и/или чистоты, и при которых была бы уменьшена или отсутствовала необходимость в манипуляциях с клетками после извлечения их из организма. В идеале такие популяции клеток желательно получать таким образом, чтобы они были пригодны к непосредственному введению в организм реципиента.

Описание ссылается на конкретные предпочтительные в настоящий момент варианты осуществления настоящего изобретения. Везде, где это возможно, на чертежах и в описании использованы одинаковые числовые обозначения для указания на одинаковые или сходные элементы. Необходимо отметить, что чертежи представлены в упрощенной форме и без соблюдения точного масштаба. При описании раскрываемого в настоящем документе изобретения исключительно для удобства и большей ясности применительно к сопроводительным чертежам использованы термины, указывающие направления, такие как: вверх, вниз, слева, справа, вверх, вниз, над, под, ниже, сзади и впереди. Такие термины, указывающие направления, не следует рассматривать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

каким-либо образом.

Хотя в настоящем документе изобретение раскрывается на примере определенных проиллюстрированных вариантов осуществления, необходимо понимать, что эти варианты осуществления изобретения представлены только в качестве примера и не являются ограничениями. Целью приведенного далее подробного описания, хотя оно и относится к конкретным примерам вариантов осуществления настоящего изобретения, является пояснение, охватывающее все модификации, альтернативы и эквиваленты вариантов осуществления изобретения, которые могут соответствовать сущности и области применения настоящего изобретения, определенным приведенной формулой изобретения. Настоящее изобретение может быть реализовано в сочетании с различными методиками разделения клеток или тканей, обычно используемыми в данной области, и в настоящий документ включены упоминания широко используемых этапов обработки, необходимых для обеспечения понимания настоящего изобретения.

Система для забора и обработки жировой ткани.

Различные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к системе (300) для получения очищенной фракции мезенхимных стволовых клеток жировой ткани в клинических условиях, а также к составам, способам и системам для использования стволовых клеток, полученных из жировой ткани, путем их введения непосредственно реципиенту наряду с добавками, которые могут быть необходимы для стимуляции, инициации или поддержания терапевтического, структурного или косметического полезного эффекта. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается система (300) для забора и обработки жировой ткани с целью получения терапевтически эффективных количеств стволовых клеток жировой ткани для введения их обратно в организм пациента, в которой система представляет собой простую в обращении, недорогую систему, подходящую для использования в медицинских многопрофильных клиниках малого и среднего размера.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, показанном на фиг. 1, модифицированная центрифужная пробирка (100), использованная в сочетании с различными аксессуарами, известными специалистам в данной области, входит в состав системы или комплекта, который позволяет частнопрактикующим врачам, а также хирургическим центрам использовать доступные способы безопасного выделения мезенхимных стволовых клеток (МСК) из жировой ткани любого пациента или донора для применения в терапевтических целях или для криосохранения (создания банка стволовых клеток). Комплект включает центрифужную пробирку (100) и различные другие компоненты, которые могут быть использованы для проведения безопасной, стерильной и замкнутой процедуры аспирации небольших образцов жировой ткани, компоненты для обработки и очистки фракций МСК на месте забора и компоненты для оценки качества. Комплект, включая центрифужную пробирку (100), в целом пригоден для использования лаборантом или лицом аналогичной квалификации, с соблюдением простой методики применения, которая подробно описана ниже и может быть освоена в ходе соответствующего обучения.

Центрифужная пробирка (100) обеспечивает замкнутый, стерильный поток жидкостей/тканей в ходе забора образцов жировой ткани и получения более или менее обогащенных, в зависимости от необходимости, образцов мезенхимных стволовых клеток. Это достигается путем использования комплекта стерильных контейнеров и трубок, обеспечивающих перенос тканей и жидкостей по замкнутому пути. Также может предоставляться ряд предварительно упакованных реактивов для обработки (например, физиологический раствор, ферменты и т.д.), предназначенных для введения в центрифужную пробирку (100), с целью обеспечения простого контроля добавления реактивов, а также температуры и продолжительности обработки, что упрощает процесс ручной обработки материала операторами. В предпочтительном варианте осуществления изобретения вся процедура, от забора ткани до обработки и введения в организм реципиента, проводится в одном и том же учреждении (в действительности, даже в одной и том же помещении, которое предпочтительно представляет собой помещение, в котором пациент проходит процедуру, в которой используются МСК, полученные в соответствии с настоящим изобретением).

Пробирка (100) состоит из основного корпуса общепринятой конструкции, который имеет внутреннюю полость (160), которая, как правило, может быть различного размера, приблизительно от 10 до 500 мл, и приспособлена для использования в стандартных центрифугах, предназначенных для работы с пробирками стандартной геометрии, показанной на фиг. 1 (хотя в соответствии с настоящим изобретением возможно использование любой подходящей геометрии центрифужной пробирки, известной специалистам в соответствующей области и совместимой с доступными центрифугами).

В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения комплект или система состоит из трех основных компонентов: (1) постоянного набора оборудования, известного специалистам в соответствующей области: аспирационный насос, встряхиватель, центрифуга и мини-инкубатор; (2) множество одноразовых элементов оборудования: аспирационная игла/канюля, пакет для сбора, шприцы, фильтры, колбы и центрифужные пробирки (100); (3) различные растворы/реактивы для обработки. Компоненты предпочтительно приспособлены для совместного использования с целью облегчения забора и обработки жировой ткани для получения МСК, при сохранении стерильности и упрощения процесса. Пробирка (100) снабжена крышкой (150), в которой имеется несколько отверстий (115), (120), (121) и (122), и отдельным штуцером (110), располагающимся, как правило, в верхней части пробирки (100) около крышки

(150) (фактически, специалистам в соответствующей области должно быть понятно, что различные штуцеры, при их расположении в верхней части пробирки (100), могут быть распределены по разному, при этом некоторые, все, или никакие штуцеры могут проходить через крышку (150), и фактически крышка (150) может отсутствовать, в таком случае пробирка (100) будет иметь конструкцию в виде единого элемента, который может быть утилизирован после использования). Через штуцер (120) проходит трубка (129), которая снабжена стерильным штуцером (125) (таким как наконечник Люэра), для обеспечения возможности введения различных реактивов или других жидкостей через трубку (129) без нарушения стерильных условий внутри пробирки (100). Как правило, для добавления жидкостей в пробирку (100) через трубку (129) используется стерильный шприц. Трубки (130) и (131) проходят сквозь крышку (150) через штуцеры (121) и (122), соответственно, и снабжены стерильными штуцерами (126) и (127), так, чтобы через них можно было извлечь клетки или другой материал, содержащийся в осадке на дне (в перевернутом конусе, который представляет собой нижнюю часть пробирки 100 после центрифугирования) (образование осадка из материала с относительно высокой удельной плотностью во время центрифугирования хорошо известно специалистам в соответствующей области). Штуцеры (126) и (127) могут быть любого типа, такого как наконечник Люэра, известного специалистам в данной области и пригодного для обеспечения стерильного соединения между трубками (130), (131) и шприцом или иным устройством, пригодным для создания высасывающего усилия для извлечения клеток из осадка на дне пробирки (100). Через штуцер (115) проходит трубка (116), которая снабжена стерильным штуцером (117) на конце и может использоваться создания высасывающего усилия с целью выкачивания содержимого из верхней части пробирки (100) для создания вакуума внутри пробирки (100) (например, для облегчения быстрого поступления липоаспирата в пробирку (100) через штуцер (110)). Штуцер (110) соединен короткой трубкой или ножкой с штуцером (111), который (как и все другие штуцеры, входящие в пробирку (100)) пригоден для поддержания стерильных условий внутри пробирки (100) на протяжении всего времени. Штуцер (110), как правило, используется для введения липоаспирата внутрь пробирки (100) на начальном этапе процесса извлечения и потенциально очистки или концентрирования МСК из липоаспирата в осадок после центрифугирования, который может быть извлечен из пробирки через трубки (130) и (131). В предпочтительном варианте осуществления изобретения имеются две трубки (131), (131) для обеспечения возможности извлечения осадка даже в случае закупорки одной из трубок.

На фиг. 2 представлена модифицированная центрифужная пробирка (200) для извлечения стволовых клеток из жировой ткани, которая включает новые средства атомизации, в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения. Специалисту в соответствующей области будет понятно, что пробирка (200) очень похожа на пробирку (100), однако с более подробным изображением штуцеров (125)-(127). Конец трубки (116) также надежно присоединен к вакуумному насосу (220) (подробности стерильного соединения между трубкой (116) и насосом (220) не показаны, однако хорошо известны специалистам в соответствующей области). Вакуумный насос может поставляться уже стерильно присоединенным к трубке (116), в качестве компонента переносного комплекта для изоляции МСК из липоаспирата, либо, чаще, он может быть присоединен при возникновении необходимости к трубке (116) в процессе выделения МСК из липоаспирата. В целом, целью изобретения является облегчения быстрого разделения липоаспирата после его попадания в пробирку (100) на мелкие капельки таким образом, чтобы разделение жировой ткани и промывку клеток (без их повреждения) можно было бы эффективно осуществлять без применения специального оборудования. Так, в некоторых вариантах осуществления изобретения, может присутствовать турбо или экран (210), имеющий несколько отверстий (211), через которые липоаспират проходит во время проникновения в пробирку (100) через штуцер (110); наличие отверстий (211) помогает разбивать сгустки жировой ткани, которые составляют как минимум часть поступающего в пробирку липоаспирата. Необходимо отметить, что липоаспират может засасываться в пробирку (100) с использованием вакуума, обеспечиваемого насосом (220) или другим средством, отсасывающим содержимое через трубку (116), либо поступать путем прямого впрыска липоаспирата (например, с использованием шприца поршневого типа) через штуцер (110). В любом случае, когда липоаспират проходит через штуцер (110) и затем через отверстия (211), он расщепляется на маленькие капли или небольшие сгустки клеток и фрагментов ткани, которые легче поддаются промывке и иной обработке в соответствии с методами, описанными в других частях настоящего документа (например, при описании фиг. 4).

Фиг. 3 представляет собой диаграмму, показывающую систему для подготовки мезенхимных стволовых клеток, полученных из жировой ткани, к клиническому применению, в соответствии с вариантом осуществления изобретения. В соответствии с показанным вариантом осуществления изобретения комплект, включающий различные компоненты, как описано выше, используется для обеспечения забора жировой ткани из организма пациента (301) (хотя забор жировой ткани с использованием системы (300) может осуществляться также из организма донора, не являющегося пациентом). Забор жировой ткани, как было указано выше, может быть произведен различными путями, известными специалистам в соответствующей области. В соответствии с вариантом осуществления изобретения, показанным на фиг. 3, система (300) состоит из шприца (302) и стерильного, запечатанного пакета (303), предназначенных для использования при заборе жировой ткани из организма пациента (301). Шприц (302) может быть любого

общепринятого типа из числа известных специалистам в соответствующей области, подходящего для забора, посредством ручного отсасывания, различных количеств жировой ткани, как правило, от 1 до нескольких сотен миллилитров. В различные комплекты, соответствующие системе (300), могут входить одно или несколько средств для расщепления жировой ткани, такие как камера ультразвуковой обработки (305). Жировая ткань может быть помещена в камеру ультразвуковой обработки (305) в стерильном пакете (303), либо она может быть пропущена через камеру ультразвуковой обработки (305) по стерильной трубке, как показано на чертеже. Система (300), как правило, включает как минимум одну модифицированную центрифужную пробирку (310) среднего размера (около 100 миллилитров) (подобную пробиркам, описанным выше при описании фиг. 1 и 2). Жировая ткань может поступать в пробирку (310) за счет приложения вакуума (350) к внутренней зоне (340)-(341) пробирки (310), либо путем впрыска из шприца, непосредственно или через стерильную трубку. Липоаспират, как правило, поступает через турбо или экран (210), имеющий несколько отверстий (211), которые, как описано выше, способствуют расщеплению поступающих образцов жировой ткани на мелкие капли, которые легче поддаются эффективной обработке внутри пробирки (310). После поступления образца липоаспирата внутрь пробирки (310) возможно введение нескольких веществ для промывки (320) или реактивов (321) (например, реактивов, способствующих диссоциации ткани) из стерильных контейнеров, входящих в состав комплекта системы 300, через один или несколько стерильных штуцеров (таких как штуцеры, показанные на фиг. 1 и 2, например штуцер (125)). Как было описано выше, пробирка (310) приспособлена для простого использования в центрифуге (которая может предоставляться в качестве части комплекта системы (300), либо может быть стандартной настольной или иной центрифугой, имеющейся в учреждении, в котором осуществляется использование системы (300); центрифуги являются оборудованием, хорошо известным специалистам в соответствующей области, и, как правило, легко доступным в широком диапазоне медицинских учреждений), таким образом, липоаспирааты, находящиеся в пробирке (310), могут быть легко центрифугированы, например, для отделения стволовых клеток от других клеточных или тканевых фракций.

Пробирка (310), как правило, имеет один или несколько штуцеров (330), (331) для извлечения отделенных стволовых клеток или других клеток или материала, содержащегося в осадке после центрифугирования в носике конической части (340) пробирки (310). Примеры таких штуцеров (330), (331) показаны на фиг. 1 и 2 (штуцеры (126) и (127), предназначенные для извлечения материала осадка по трубкам (130) и (131), соответственно). В некоторых вариантах осуществления изобретения липоаспират, обработанный в пробирке (310) (путем промывки, диссоциации и/или центрифугирования) вводится непосредственно в организм пациента (301); в других вариантах осуществления изобретения система (300) может включать в себя вторую, как правило, меньшего объема пробирку (360), которая может быть использована для дальнейшей обработки липоаспирата после его извлечения из пробирки (310). Например, частично обогащенный липоаспират (который представляет собой обработанный липоаспират с увеличенной фракцией стволовых клеток, по сравнению с липоаспиратом, только что взятым из организма пациента или донора (301)) может быть впрыснут (или закачан с применением вакуума (350)) в пробирку (360), которая может иметь объем, например, от 10 до 20 мл (хотя могут быть использованы и другие объемы, включая такой же как у пробирки (310) или большего объема, показанные и описанные относительные размеры являются лишь примером и не должны рассматриваться как ограничивающие, в частности, учитывая, что различные протоколы терапии могут требовать использования пробирок различных специфических размеров). Так, система (300), показанная на фиг. 3, является примером, и демонстрирует разнообразие аппаратов, которые могут быть включены, наряду с различными реактивами и веществами для промывки в стерильных контейнерах для использования по мере необходимости, в комплект, подходящий для использования для проведения единой процедуры, в ходе которой происходит забор липоаспирата из организма пациента (301), его обработка в переносной, непрерывной стерильной среде, состоящей из элементов системы (300), поставляемых в виде комплекта, и введение, при отсутствии необходимости культивирования или дифференцировки стволовых клеток, в организм того же или другого пациента (301). Следует принимать во внимание, что в некоторых вариантах осуществления изобретения может быть желательно осуществление дифференцировки фракции стволовых клеток, полученной с использованием системы (300), с применением методик, известных специалистам в соответствующей области, например для получения и последующего культивирования клеток-предшественников остецитов или предшественников других типов клеток, дифференцирующихся из мезенхимных стволовых клеток, полученных в соответствии с изобретением.

Способы забора и обработки жировой ткани.

При практическом применении методов, раскрываемых в настоящем изобретении, клетки (такие как мезенхимные стволовые клетки), предназначенные для введения в организм пациента (301), могут быть получены из жировой ткани. Жировая ткань может быть получена различными способами, известными специалистам в соответствующей области. Например, жировая ткань может быть извлечена из организма пациента посредством аспирационной липопластики, ультразвуковой липопластики и эксцизионной липэктомии. Кроме того, методики могут включать в себя комбинацию таких методик, например, сочетание эксцизионной липэктомии и аспирационной липопластики. Поскольку ткань или некоторые фракции этой ткани предназначены для повторного введения в организм пациента, забор жировой ткани

должен быть осуществлен таким образом, который сохраняет жизнеспособность клеточного компонента и сводит к минимуму вероятность загрязнения ткани потенциально инфекционными микроорганизмами, такими как бактерии и/или вирусы. Так, предпочтительно проведение забора ткани в стерильных или асептических условиях для сведения к минимуму загрязнения.

Фиг. 4 представляет собой диаграмму, иллюстрирующую способ высокоуровневой обработки (400) для подготовки мезенхимных стволовых клеток, полученных из жировой ткани, к клиническому применению, в соответствии с вариантом осуществления изобретения. В соответствии с одним из вариантов осуществления изобретения на этапе (401) предоставляется одноразовая система для забора ткани, являющаяся компонентом стерильного комплекта, предназначенного для получения обработанных липоаспиратов, обогащенных стволовыми клетками (например, шприц (302)). Затем, на этапе (402), лаборант, врач или другой специалист осуществляют забор жировой ткани из организма пациента (или донора), при этом жировая ткань характеризуется начальной концентрацией стволовых клеток (в частности, МСК). При проведении липопластики путем отсасывания забор жировой ткани может быть осуществлен путем введения канюли внутрь отложения жировой ткани в организме пациента (301) или вблизи от такого отложения с последующей аспирацией жировой ткани внутрь устройства для отсасывания. В одном из вариантов осуществления изобретения небольшая канюля может быть присоединена к шприцу (302), и жировая ткань может быть отсосана с использованием ручного усилия. Использование шприца (302) или другого сходного устройства может быть желательным при заборе относительно небольших или средних количеств жировой ткани (например, от 0,1 мл до нескольких сотен миллилитров жировой ткани).

Аспирационная липопластика может быть подходящей для извлечения жировой ткани из организма пациента (301), поскольку она представляет собой минимально инвазивный метод забора ткани, характеризующийся соответственно минимальным потенциалом повреждения стволовых клеток. Кроме того, широкое распространение процедур липосакции привело к разработке признанных и безопасных методик извлечения значительных количеств жировой ткани из организма доноров или пациентов. В предпочтительном варианте осуществления изобретения система включает одноразовую аспирационную систему, которая позволяет осуществить забор жировой ткани в стерильный запечатанный пакет для дальнейшей обработки. Предпочтительно в системе используется относительно небольшое устройство, такое как небольшой шприц (302), преимуществом которого является возможность проведения липоаспирации под местной анестезией (или даже без анестезии), в отличие от общей анестезии.

Жировая ткань, извлеченная из организма пациента, может быть собрана в стерильный контейнер (такой как стерильный запечатанный пакет (303)) для дальнейшей обработки. Как указано в настоящем документе и в одном из вариантов осуществления изобретения, устройство разработано для и направлено на достижение цели сбора ткани для получения обработанной популяции клеток жировой ткани, в которую входят стволовые клетки и/или клетки-предшественники эндотелиальных клеток. В предпочтительном варианте осуществления изобретения устройство представляет собой одноразовую аспирационную систему, которая обеспечивает забор жировой ткани из организма пациента в стерильный запечатанный пакет (303). В альтернативных вариантах осуществления изобретения устройство может представлять собой любое стандартное устройство, которое обычно используют врачи для забора тканей.

Поскольку обычно требуется лишь небольшое количество жировой ткани, применимость настоящего изобретения не ограничивается людьми с большим количеством жировой ткани. Количество забираемой ткани зависит от нескольких переменных, включая, но не ограничиваясь приведенным списком, индекс массы тела донора, наличие доступных места забора жировой ткани, сопутствующий и предшествовавший прием лекарственных средств и состояния (такие как терапия антикоагулянтами), а также клиническая задача, для решения которой осуществляется забор жировой ткани. Кроме того, концентрации стволовых клеток, присутствующих в липоаспиратах, варьируют в широком диапазоне от одного человека к другому, таким образом, в случае необходимости получения определенного количества стволовых клеток, для получения такого количества может потребоваться больший или меньший объем жировой ткани. Например, концентрация стволовых клеток в ткани, получаемой из организма худого человека, как правило, выше, чем в ткани, получаемой у донора, страдающего ожирением (это отражает типичный эффект разведения, связанный с повышенным содержанием жира в жировой ткани у людей, страдающих ожирением).

Предпочтительным способом получения жировой ткани человека являются процедуры эксцизии или липосакции, хорошо известные специалистам в соответствующей области. Плюрипотентные клетки, описываемые в настоящем изобретении, присутствуют в первоначальной жировой ткани, извлеченной из организма путем эксцизии или отсасывания, независимо от способа извлечения ткани. Жировая ткань может быть обработана для облегчения отделения/концентрирования стволовых клеток. Например, плюрипотентные клетки могут быть получены путем промывания извлеченной из организма жировой ткани физиологически совместимым раствором, таким как фосфатный буферный раствор (ФБР). Как правило, этап промывки состоит в заливании образцов жировой ткани ФБР и встряхивании образца с последующим отстаиванием для осаждения. Помимо промывания жировая ткань может быть подвергнута диссоциации. Диссоциация может быть проведена путем ферментативного расщепления (например, обработки трипсином). Альтернативно, либо в сочетании с такой ферментативной обработкой, могут быть исполь-

зованы другие методы диссоциации, такие как механическое встряхивание, звуковая или ультразвуковая обработка или термическая обработка. Затем клетки могут быть центрифугированы, полученный осадок (содержащий плюрипотентные клетки) может быть дополнительно обработан после ресуспендирования в соответствующем растворе (например, ФБР).

На этапе (403) как минимум часть жировой ткани, полученной на этапе (402), обрабатывают (например, как описано выше) для получения более высокой концентрации стволовых клеток, а на этапе (404) обработанные стволовые клетки вводят в организм пациента (301) из стерильного контейнера, который может поставляться в виде части комплекта системы (300) либо может иметься в наличии в медицинском учреждении. Плюрипотентные клетки, содержащиеся в ресуспендированном осадке после центрифугирования, могут быть отделены от других клеток ресуспендированного осадка с помощью способов, включающих, помимо прочего, сортировку клеток, фракционирование по размеру, разделение по гранулометрическому составу, по плотности, по молекулярной массе, морфологическое и иммуногисто-логическое разделение (например, пэннинг, с использованием магнитных микроносителей, флуорес-центно-активированная сортировка клеток/FACS, магнитно-активированная сортировка клеток/MACS или аффинная хроматография). В некоторых иммунологических методах выделения клеток возможно получение плюрипотентных клеток путем положительной селекции, за счет использования антител или других белков, характеризующихся специфическим связыванием, которые связываются с эпитопом на поверхности клеток. В таких методах отделение клеток от антител, с которыми они соединены, может быть проведено путем одной или нескольких промывок соответствующими буферами, известными специалистами в данной области. Либо плюрипотентные клетки могут быть выделены путем отрицательной селекции. В соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения комплект для сбора стволовых клеток может включать стерильные контейнеры и/или реактивы для облегчения разделения или концентрирования стволовых клеток в образцах липоаспирата. Присутствие плюрипо-тентных клеток предпочтительно оценивают до повторного введения в организм пациента, например, с использованием специфичных маркеров клеточной поверхности и/или методик подсчета, известных специалистами в соответствующей области.

Плюрипотентные клетки, полученные с использованием системы (300), раскрываемой в настоящем изобретении, как правило, вводятся (или возвращаются) в организм пациента без размножения или диф-ференцировки. Однако в некоторых вариантах осуществления изобретения плюрипотентные клетки мо-гут быть подвергнуты размножению и/или дифференцировке *in vitro*. Это означает, что после выделения плюрипотентные клетки могут содержать в культуральной среде для их размножения. Возможна индук-ция дифференцировки (или фенотипического изменения) плюрипотентных клеток в клетки желаемого типа с использованием методик, известных специалистам в соответствующей области. Специалистам в соответствующей области известны методы модификации или изменения концентраций сред и/или доба-вок к средам в соответствии с потребностями используемых клеток. В другом варианте осуществления изобретения плюрипотентные клетки, описываемые в настоящем изобретении, могут быть подвергнуты размножению в культуральной среде определенного состава, в которой сыворотка заменена на комбина-цию сывороточного альбумина, сывороточного трансферрина, селена и рекомбинантных белков, вклю-чая, помимо прочего, инсулин, тромбоцитарный фактор роста (PDGF) и основной фактор роста фиброб-ластов (bFGF), как известно специалистам в данной области. Поддерживающие условия для существова-ния популяции (популяций) плюрипотентных клеток, описываемых в настоящем изобретении, также могут включать присутствие одного или нескольких клеточных факторов, которые способствуют пребы-ванию клеток в недифференцированной форме.

Если желательна дифференцировка плюрипотентных клеток, в культуру могут быть добавлены од-но или несколько дополнительных веществ для индукции определенных желаемых фенотипических из-менений. В число таких веществ могут входить: один или несколько активаторов внутриклеточных сиг-нальных путей (например, митоген-активированные протеинкиназы и SMAD), активаторы факторов транскрипции (например, sox9, L-sox5 и L-sox6), активаторы синтеза и взаимодействия с белками вне-клеточного матрикса (например, коллаген II, агрекан и олигомерный матриксный белок хряща), факто-ры роста, цитокины, хемокины, гормоны и факторы среды (например, давление кислорода).

Фиг. 5 представляет собой диаграмму, подробно иллюстрирующую процесс (500) подготовки и применения мезенхимных стволовых клеток в клинических целях в соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения. В соответствии с одним из вариантов осуществления изобрете-ния на этапе (501) извлекают из организма донора или пациента (301). На этапе (502) осуществляется впрыск или засасывание липоаспирата (350) в модифицированную центрифужную пробирку (310). До-полнительно на этапе (503) извлеченный липоаспират может быть промыт с использованием веществ для промывки, известных специалистам в соответствующей области, таких как ФБР. На этапе (504) липоас-пират может быть дополнительно подвергнут диссоциации для разрушения жировой ткани и клеточных сгустков с целью облегчения дальнейшей обработки. На этапе (505) клетки или липоаспират могут быть центрифугированы для разделения фракций клеток и тканей с различной удельной плотностью. Напри-мер, в соответствующем образом подготовленном липоаспирате МСК могут образовать осадок в кончи-ке конической емкости (340) пробирки (310) и, таким образом, достаточно хорошо отделяться от более

легких клеток или фрагментов ткани. Во многих случаях осадок, образованный в результате этапа (505), может характеризоваться немного повышенной концентрацией стволовых клеток (относительно концентрации стволовых клеток в липоаспирате на момент его забора из организма донора или пациента на этапе (501)), и может быть необходимо его дальнейшее обогащение. На этапе (506) осадок, богатый стволовыми клетками, может быть ресуспендирован в соответствующем растворе для дальнейшей обработки (возможно включая повтор этапов с (502) по (505)). На этапе (507) стволовые клетки могут быть дополнительно отделены от других клеточных фракций с использованием методик, известных специалистам в соответствующей области. Плюрипотентные клетки, содержащиеся в ресуспендированном осадке после центрифугирования, могут быть отделены от других клеток ресуспендированного осадка с помощью способов, включающих, помимо прочего, сортировку клеток, фракционирование по размеру, разделение по гранулометрическому составу, по плотности, по молекулярной массе, морфологическое и иммуногистохимическое разделение (например, пэннинг, с использованием магнитных микроносителей, флуоресцентно-активированная сортировка клеток/FACS, магнитно-активированная сортировка клеток/MACS или аффинная хроматография). В некоторых иммунологических методах выделения клеток возможно получение плюрипотентных клеток путем положительной селекции, за счет использования антител или других белков, характеризующихся специфическим связыванием, которые связываются с эпитопом на поверхности клеток. В таких методах отделение клеток от антител, с которыми они соединены, может быть проведено путем одной или нескольких промывок соответствующими буферами, известными специалистам в данной области. Альтернативно, плюрипотентные клетки могут быть выделены путем отрицательной селекции. На этапе (508) может быть выполнено определение концентрации стволовых клеток в обработанном образце липоаспирата, с использованием различных средств, известных специалистам в данной области. Присутствие плюрипотентных клеток предпочтительно оценивают до повторного введения в организм пациента, например, с использованием специфичных маркеров клеточной поверхности и/или методик подсчета, известных специалистам в соответствующей области. На этапе (509) может быть принято решение, основанное как минимум частично на концентрации, определенной на этапе (508), о проведении дальнейшей обработки липоаспирата для дополнительного повышения его концентрации (т.е. для повышения концентрации стволовых клеток) и о том, следует ли проводить такую дополнительную обработку путем повторения одного или нескольких этапов с (502) по (508). На этапе (510) стволовые клетки могут дополнительно быть культивированы для получения большего количества стволовых клеток, с применением стандартных методик, известных специалистам в соответствующей области. Аналогично, на этапе (511) (который может быть проведен до или после, или одновременно с этапом (510)) плюрипотентные стволовые клетки могут быть дифференцированы в клетки-предшественники одного или нескольких типов с использованием методик, известных специалистам в соответствующей области. Наконец, на этапе (512) стволовые клетки или клетки-предшественники, выделенные и обработанные, как описано выше, на этапах с (501) по (511), могут быть введены в организм одного или нескольких пациентов (301), либо сохранены в банке клеток для дальнейшего использования в терапевтических, косметических или иных целях.

Средства для повторного введения стволовых клеток, полученных из жировой ткани, в организм пациента.

Комплект в соответствии с системой (300), описываемой в настоящем изобретении, может быть использован для создания фармацевтического состава, содержащего профилактически или терапевтически эффективное количество мезенхимных стволовых клеток, описываемых в настоящем изобретении, предпочтительно в очищенной форме, в сочетании с подходящим носителем в соответствующих количествах, с целью получения стволовых клеток в форме, пригодной для безопасного и эффективного введения в организм пациента.

Пациенты, проходящие терапию в соответствии с различными вариантами осуществления настоящего изобретения, могут получать стволовые клетки в концентрациях, отличающихся от концентраций, используемых в других методиках терапии с применением жировой ткани или стволовых клеток, полученных из жировой ткани. Так, жировая ткань, полученная из организма пациента, может быть обработана для изменения концентрации стволовых клеток, вводимых пациенту. В предпочтительном варианте осуществления изобретения пациенты получают стволовые клетки в концентрациях, превышающих концентрации стволовых клеток, обычно присутствующих в трансплантатах жировой ткани и других сходных терапевтических средствах на основе стволовых клеток. Концентрированные стволовые клетки можно вводить в организм пациента в составе композиций, включающих стволовые клетки, полученные из жировой ткани, и/или клетки-предшественники эндотелиальных клеток, практически не содержащих зрелых адипоцитов и соединительной ткани или, в качестве другого примера, концентрированные стволовые клетки можно вводить в организм пациента в составе композиции, включающей единицу жировой ткани с повышенным содержанием стволовых клеток.

Фармацевтический состав, раскрываемый в настоящем изобретении, может быть приготовлен в соответствии с конкретной выбранной формой введения. Например, фармацевтический состав может быть приготовлен в жидкой форме, в частности в виде суспензии, для введения пациенту, которому требуется лечение. В качестве примеров, иллюстрирующих, но не ограничивающих полный спектр возможных

фармацевтических составов, можно назвать фармацевтические составы в соответствии с изобретением в виде стерильной суспензии в приемлемом с фармацевтической точки зрения носителе, таком как физиологический раствор, фосфатный буферный раствор (ФБР) или любой другой подходящий приемлемый с фармацевтической точки зрения носитель, предназначенный для введения пациенту, например, человеку, предпочтительно внутривенно, внутривенно, подкожно и т.д., хотя могут быть возможны и другие пути введения.

Введение фармацевтического состава пациенту, которому оно требуется, может быть проведено с использованием обычных средств в соответствии с настоящим изобретением. В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтический состав может быть введен пациенту, которому это требуется, внутривенно с применением таких устройств как шприцы, катетеры, троакары, канюли и т.д. В любом случае фармацевтический состав в соответствии с настоящим изобретением может быть введен с использованием любого подходящего оборудования, приборов и устройств, известных любому специалисту в соответствующей области. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения устройство для введения фармацевтического состава представляет собой часть комплекта, описанного выше, или приспособлено для использования в сочетании с комплектом, описанным выше, для обеспечения переноса фармацевтического состава в организм человека без загрязнения.

Приведенные выше описания предпочтительных вариантов осуществления изобретения представлены в иллюстративных и описательных целях. Они не являются исчерпывающими или ограничивающими объем изобретения конкретными раскрываемыми формами. Многие варианты осуществления изобретения были выбраны и описаны с целью наилучшей иллюстрации принципов изобретения и его практического применения и, таким образом, для предоставления возможности всем специалистам в данной области понять изобретение в различных вариантах его осуществления и с различными модификациями, подходящими для конкретного предполагаемого использования. Предполагается, что объем изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

Специалисты в соответствующей области могут представить диапазон возможных модификаций различных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных выше. Соответственно, настоящее изобретение определяется прилагаемыми пунктами формулы изобретения и их эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система для забора и обработки жировой ткани в стерильной среде с целью получения терапевтически эффективных количеств стволовых клеток жировой ткани, включающая устройство для забора жировой ткани организма человека, содержащее первую модифицированную центрифужную пробирку (100, 200), имеющую стерильный входной штуцер для липоасpirата (110, 111), по меньшей мере один стерильный входной штуцер для обрабатываемой жидкости (120, 125, 129), стерильный аспирационный штуцер (115, 116, 117) и по меньшей мере один штуцер для извлечения (121, 122, 126, 127), функционально связанный с трубкой для извлечения (130, 131), и экран (210), имеющий несколько отверстий (211), расположенный в первой модифицированной центрифужной пробирке, разделяющий внутренний объем на верхнюю часть и нижнюю часть, и при этом экран выполнен с возможностью разделения жировой ткани с получением смеси клеток, обогащенной стволовыми клетками, в указанной нижней части, предназначенной для поступления липоасpirата в первую модифицированную центрифужную пробирку по стерильному штуцеру для очистки и разделения путем его центрифугирования в модифицированной центрифужной пробирке с получением осадка, содержащего обогащенную фракцию стволовых клеток и извлечением осадка через указанный по меньшей мере один штуцер для извлечения (126, 127).

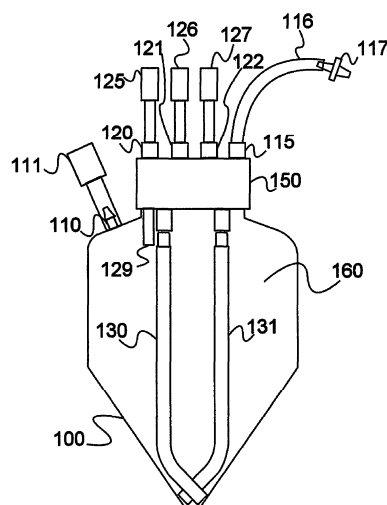
2. Система по п.1, дополнительно включающая вторую модифицированную центрифужную пробирку (310), имеющую конструкцию, сходную с конструкцией первой модифицированной центрифужной пробирки, причем вторая центрифужная пробирка конструктивно соединена через свой входной штуцер с одним из стерильных штуцеров для извлечения (126, 127) первой модифицированной пробирки, при этом вторая модифицированная центрифужная пробирка предназначена для дальнейшей обработки ре-суспендированного осадка после центрифугирования с целью достижения более высокой концентрации стволовых клеток.

3. Система по п.1, в которой первая модифицированная центрифужная пробирка также имеет верхнюю часть (341) и кончик (340), причем стерильный входной штуцер для липоасpirата (111), по меньшей мере один стерильный входной штуцер для обрабатываемой жидкости (125), стерильный аспирационный штуцер (116, 117) и по меньшей мере один стерильный штуцер для извлечения (126, 127) функционально расположены около верхней части первой модифицированной центрифужной пробирки.

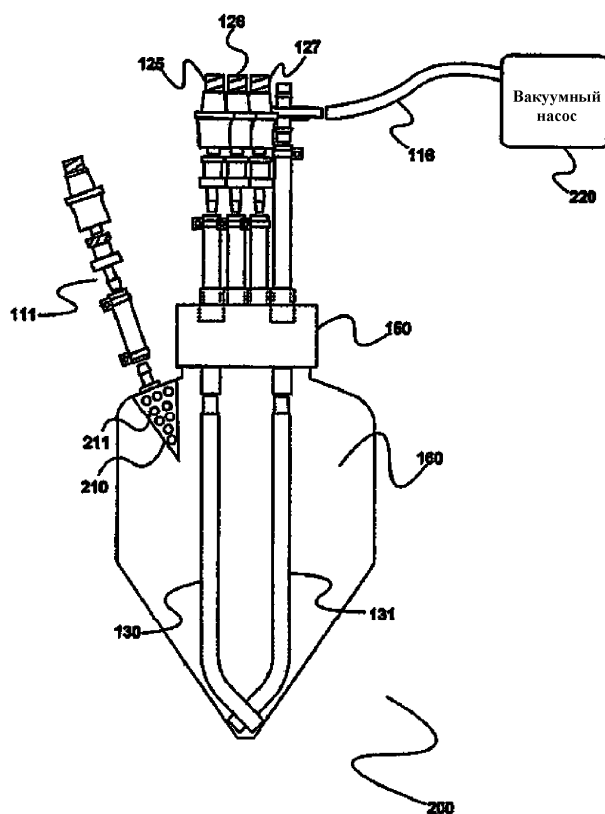
4. Система по п.1, в которой длина трубки для извлечения (130, 131) варьирует и превосходит расстояние от штуцера для извлечения (121, 122) до кончика в модифицированной центрифужной пробирке.

5. Система по п.4, в которой по меньшей мере один стерильный входной штуцер для обрабатываемой жидкости (120, 125, 129), стерильный аспирационный штуцер (115, 116, 117) и по меньшей мере один стерильный штуцер для извлечения (121, 122, 126, 127) расположены в крышке (150), которая обратимым образом закреплена в верхней части первой модифицированной центрифужной пробирки.

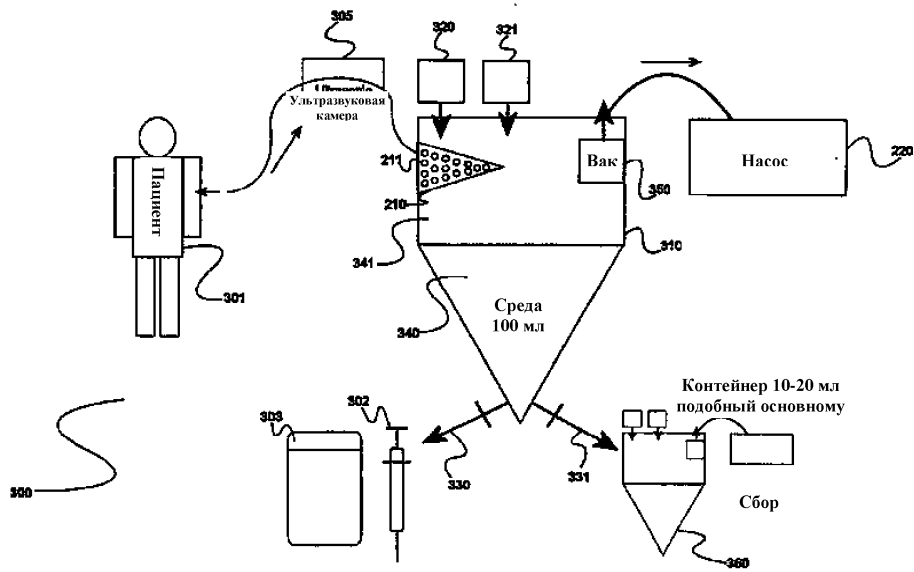
6. Система по п.1, дополнительно содержащая вакуумное устройство (220), присоединённое к аспирационному штуцеру (116).



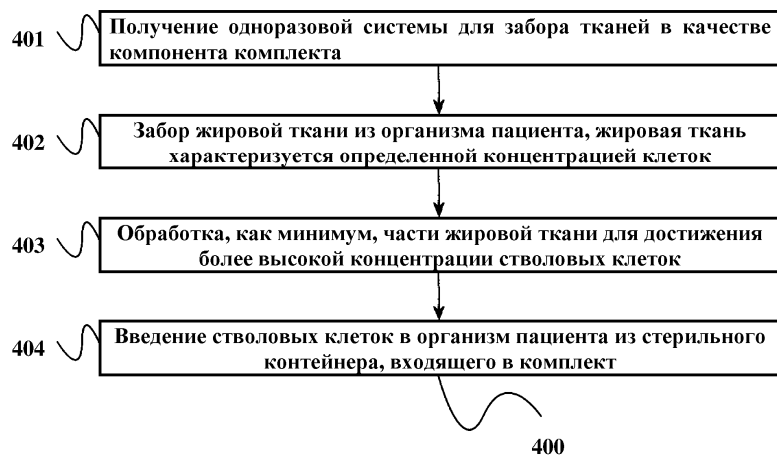
Фиг. 1



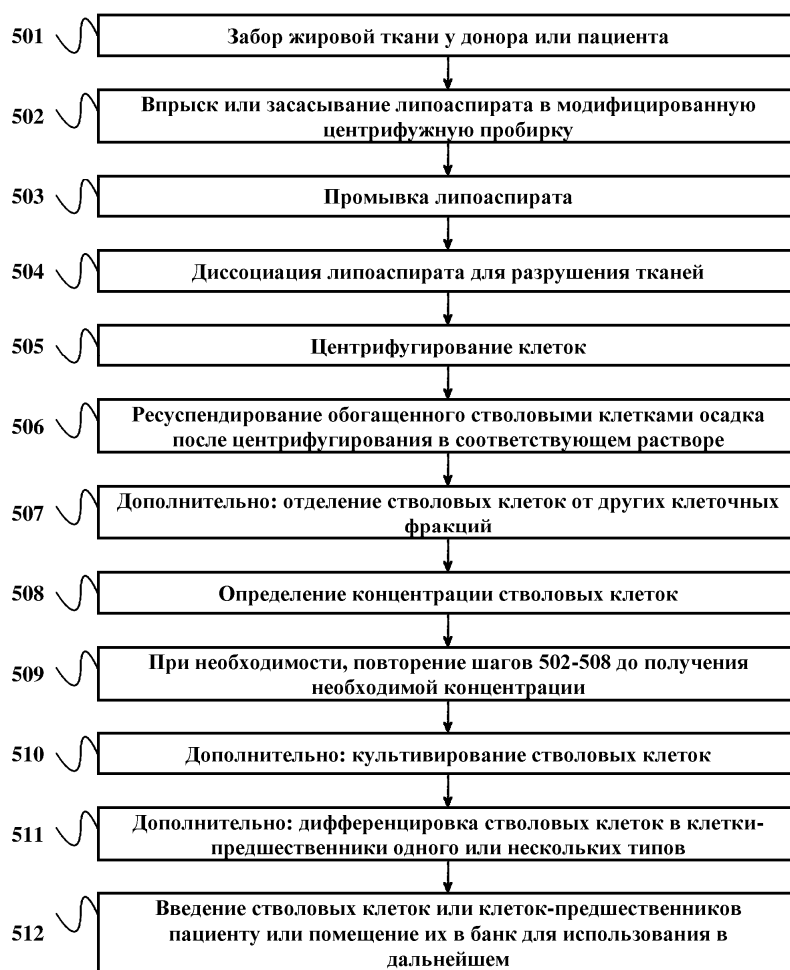
Фиг. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4



500

Фиг. 5

