

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037915**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.06.07

(21) Номер заявки
201890516

(22) Дата подачи заявки
2016.08.18

(51) Int. Cl. *A61K 9/08* (2006.01)
A61K 31/00 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)

(54) **КЛИНИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ**

(31) **62/206,821**

(32) **2015.08.18**

(33) **US**

(43) **2018.09.28**

(86) **PCT/US2016/047545**

(87) **WO 2017/031312 2017.02.23**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**АСТЕЛЛАС ИНСТИТЮТ ФОР
РИДЖЕНЕРЭЙТИВ МЕДСИН (US)**

(72) Изобретатель:
**Гэй Роджер, Саутвик Ромма Е.,
Ратлифф Джадсон (US)**

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

(56) **WO-A1-2014095953
EP-A1-0781547
EP-A1-0562188**

(57) В некоторых аспектах изобретение относится к медицинским средам, которые поддерживают жизнеспособность, эффективность повторного культивирования и репопуляционную способность клеток и тканей во время хранения в течение 48 ч или дольше. Медицинские среды, представленные в изобретении, также применяются для клинического орошения. Также рассмотрены клеточные или тканевые композиции, содержащие клеточную популяцию или ткань и медицинскую среду по изобретению, и способы получения таких композиций. Также раскрыты способы использования медицинских сред и клеточных и тканевых композиций по изобретению, например, для введения эффективного количества клеток или ткани субъекту, нуждающемуся в таком введении.

037915

B1

037915
B1

Родственные заявки

Для настоящей заявки испрашивается приоритет согласно 35 U.S.C. 119(e) по предварительной заявке на патент США номер 62/206821, поданной 18 августа 2015 года под названием "CLINICAL FORMULATIONS" (Клинические композиции), полное содержание которой включено в данный документ в качестве ссылки.

Уровень изобретения

Существующие в настоящее время медицинские среды, используемые для хранения и транспортировки клеток и тканей для трансплантации, сохраняют жизнеспособность и функции клеток не более сравнительно короткого периода времени (например, максимум 4-6 ч), и даже в течение такого короткого срока хранения обычно наблюдаются значительные потери клеток и клеточных функций. Дополнительно современные медицинские среды, содержащие анионы бикарбоната, не выдерживают термическую стерилизацию, и часто при хранении даже при температуре окружающей среды в них образуется осадок углеродной соли, что является причиной короткого срока годности таких сред.

Сущность изобретения

Широкий спектр медицинских манипуляций основан на применении медицинских растворов, например, для орошения операционного поля, очищения раны, предотвращения послеоперационных спаек и удаления дебриса из области операционного поля. Медицинские растворы используются при имплантации или трансплантации клеток или тканей для создания композиции для клеток или тканей, хранения клеток или тканей после их помещения в композицию и до введения субъекту, и в качестве среды - носителя клеточных или тканевых элементов в ходе введения, например, при инъекции клеток или тканей. Растворы, которые контактируют с клетками или тканями в клинических условиях, например, во время орошения, очистки раны, инъекции и т.д., обычно являются стерильными, апиrogenными, буферными при физиологическом уровне pH и имеют физиологическую осмолярность.

Конкретной проблемой, связанной с существующими хирургическими ирригационными растворами, предназначенными к применению во время операции для предотвращения повреждения чувствительных клеток или тканей, является использование анионов бикарбоната в качестве буферных веществ вместе с солями, склонными к преципитации с анионами бикарбоната, например, практически со всеми ионными солями кальция и магния, которые обычно используются в качестве фармацевтических наполнителей. Образование карбонатов и последующая преципитация может происходить быстро в случае термической стерилизации раствора, содержащего бикарбонат и кальций и/или магний, а также часто происходит с течением времени при хранении при условиях окружающей среды.

Одним из возможных решений проблемы преципитации является поставка хирургических ирригационных растворов в виде набора из двух частей, в котором одна часть содержит бикарбонатный буфер, и другая часть содержит соли кальция и/или магния. Обычно эти части смешивают друг с другом для получения единого раствора непосредственно перед использованием. Использование таких двухкомпонентных растворов имеет ряд недостатков, включающих необходимость производства двух отдельных растворов, неудобный этап смешивания, при котором существует риск ошибок при изготовлении смеси, и обычно короткий период полужизни смешанного раствора. Таким образом, однокомпонентный ирригационный раствор будет иметь преимущество и является весьма желательным.

Ранее предпринимались попытки получения однокомпонентного ирригационного раствора. См., например, Европейскую заявку на патент EP 1067907 B1 (Armitage). В этих попытках для предотвращения описанных выше проблем преципитации карбонатов обычно подразумевалось использование цвиттерионных органических буферов, таких как N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-(2-этансульфоновая кислота), общепринято называемая HEPES. Вместе с тем, используемые в таких однокомпонентных ирригационных растворах цвиттерионные органические буферы обычно не совместимы со средами для культивирования клеток или тканей, и, таким образом, в этом случае невозможно получить раствор широкого применения из-за нежелательной преципитации при хранении клеток.

В дополнение к проблеме образования осадка и несовместимости с общепринятыми компонентами среды для культивирования клеток, как отмечено выше, широко используемые хирургические ирригационные растворы также обычно включают комбинацию компонентов, которые не выдерживают стерилизацию паром, например, некоторые углеводы или дисульфид глутатиона (GSSG).

В отличие от ранее разработанных однокомпонентных ирригационных растворов, в настоящем изобретении рассмотрены однокомпонентные растворы, в которых не требуется наличия цвиттерионных органических буферов. В стабилизированных ирригационных растворах настоящего изобретения решена проблема преципитации и связанного с ней короткого срока годности существующих ирригационных растворов. Растворы по изобретению имеют значительно увеличенный срок годности при хранении по сравнению с имеющимися в настоящее время растворами.

Представленные в изобретении растворы применяются для орошения, разведения клеток (например, криоконсервированных или осажденных клеток), для хранения клеток (например, после их включения в состав композиций для перевозки или трансплантации), для транспортировки и/или введения клеток субъекту (например, при имплантации или трансплантации клеток). Представленные в изобретении растворы могут быть использованы для разных типов клеток и в разных местах введения. Предпочти-

тельным является их применение в офтальмологии, но, вместе с тем, также рассмотрены другие применения, которые входят в объем настоящего изобретения.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к растворам для разведения клеток, хранения, транспортировки и/или введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит следующее: (а) буфер, поддерживающий физиологический уровень pH раствора; (б) по меньшей мере 2 мМ глюкозы и (с) осмотически активное вещество, поддерживающее физиологическую осмолярность раствора. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит от 2 до 150 мМ глюкозы, например от 5 до 150 мМ, от 10 до 150 мМ, от 15 до 150 мМ, от 2 до 100 мМ, от 2 до 50 мМ, от 5 до 30 мМ, от 10 до 100 мМ, от 10 до 50 мМ, от 10 до 30 мМ, от 10 до 20 мМ, от 12 до 18 мМ, от 14 до 17 мМ, от 15 до 17 или от 16 до 17 мМ. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит глюкозу в количестве по меньшей мере 2,5 мМ, по меньшей мере 3 мМ, по меньшей мере 5 мМ, по меньшей мере 7,5 мМ, по меньшей мере 10 мМ, по меньшей мере 15 мМ, по меньшей мере 20 мМ, по меньшей мере 25 мМ или по меньшей мере 30 мМ. В некоторых вариантах осуществления глюкоза состоит из декстрозы или включает декстрозу. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит глюкозу в количестве по меньшей мере 2,5 мМ, по меньшей мере 3 мМ, по меньшей мере 5 мМ, по меньшей мере 6 мМ, по меньшей мере 7,5 мМ, по меньшей мере 10 мМ, по меньшей мере 15 мМ, по меньшей мере 20 мМ, по меньшей мере 25 мМ или по меньшей мере 30 мМ декстрозы. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит по меньшей мере 0,03% (вес/объем), по меньшей мере 0,05% (вес/объем), по меньшей мере 0,1% (вес/объем), по меньшей мере 0,125% (вес/объем), по меньшей мере 0,15% (вес/объем), по меньшей мере 0,175% (вес/объем), по меньшей мере 0,2% (вес/объем), по меньшей мере 0,225% (вес/объем), по меньшей мере 0,25% (вес/объем), по меньшей мере 0,275% (вес/объем), по меньшей мере 0,28% (вес/объем), по меньшей мере 0,29% (вес/объем), по меньшей мере 0,3% (вес/объем), по меньшей мере 0,35% (вес/объем), по меньшей мере 0,4% (вес/объем), по меньшей мере 0,45% (вес/объем), по меньшей мере 0,5% (вес/объем), по меньшей мере 0,55% (вес/объем), по меньшей мере 0,6% (вес/объем), по меньшей мере 0,65% (вес/объем), по меньшей мере 0,7% (вес/объем), по меньшей мере 0,75% (вес/объем), по меньшей мере 0,8% (вес/объем), по меньшей мере 0,9% (вес/объем), по меньшей мере 1% (вес/объем), по меньшей мере 1,25% (вес/объем), по меньшей мере 1,5% (вес/объем), по меньшей мере 1,75% (вес/объем), по меньшей мере 2% (вес/объем), по меньшей мере 2,125% (вес/объем), по меньшей мере 2,5% (вес/объем), по меньшей мере 2,75% (вес/объем) или по меньшей мере 3% (вес/объем). В некоторых вариантах осуществления раствор дополнительно включает источник двухвалентных катионов. В некоторых вариантах осуществления двухвалентные катионы включают катионы кальция и/или магния. В некоторых вариантах осуществления источник двухвалентных катионов включает источник кальция и/или источник магния. В некоторых вариантах осуществления раствор включает источник кальция. В некоторых вариантах осуществления раствор включает источник магния. В некоторых вариантах осуществления буфер включает ацетатный буфер и/или цитратный буфер.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к растворам для разведения клеток, хранения, транспортировки и/или введения клеток субъекту, при этом раствор содержит следующее: (а) буфер, поддерживающий физиологический уровень pH раствора; (б) глюкозу; (с) осмотически активное вещество, поддерживающее физиологическую осмолярность раствора; и (д) источник двухвалентных катионов. В некоторых вариантах осуществления источник двухвалентных катионов включает источник кальция и/или источник магния. В некоторых вариантах осуществления буфер включает ацетатный и/или цитратный буфер.

В некоторых вариантах осуществления представленных в изобретении растворов глюкоза представляет собой D-глюкозу (декстрозу). В некоторых вариантах осуществления концентрация глюкозы составляет от 5 до 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация глюкозы составляет от 10 до 25 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация глюкозы составляет от 10 до 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация глюкозы составляет приблизительно 10 мМ, приблизительно 11 мМ, приблизительно 12 мМ, приблизительно 13 мМ, приблизительно 14 мМ, приблизительно 15 мМ, приблизительно 16 мМ, приблизительно 17 мМ, приблизительно 18 мМ, приблизительно 19 мМ или приблизительно 20 мМ.

В некоторых вариантах осуществления представленных в изобретении растворов источник двухвалентных катионов включает фармацевтически приемлемую соль двухвалентного катиона. В некоторых вариантах осуществления источник двухвалентных катионов включает фармацевтически приемлемую соль кальция. В некоторых вариантах осуществления источник двухвалентных катионов включает фармацевтически приемлемую соль магния. В некоторых вариантах осуществления источник двухвалентных катионов включает фармацевтически приемлемую кальциевую и/или фармацевтически приемлемую магниевую соль, выбранную из группы, состоящей из солей кальция и/или магния, образованных с кислотой, выбранной из группы, включающей уксусную кислоту, аскорбиновую кислоту, лимонную кислоту, соляную кислоту, малеиновую кислоту, щавелевую кислоту, фосфорную кислоту, стеариновую кислоту, янтарную кислоту и серную кислоту. В некоторых вариантах осуществления источник двухвалентных катионов включает источник кальция. В некоторых вариантах осуществления источник кальция включает хлорид кальция. В некоторых вариантах осуществления источник кальция включает дигидрат

хлорида кальция. В некоторых вариантах осуществления источник двухвалентных катионов включает источник магния. В некоторых вариантах осуществления источник магния включает хлорид магния. В некоторых вариантах осуществления источник магния включает гексагидрат хлорида магния. В некоторых вариантах осуществления представленных в изобретении растворов концентрация источника кальция составляет от 0,25 до 0,75 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация источника кальция составляет от 0,4 до 0,65 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация источника кальция составляет от 0,5 до 0,6 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация источника кальция составляет приблизительно 0,6 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация источника кальция составляет от 0,5 до 0,9 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация источника кальция составляет от 0,6 до 0,8 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация источника кальция составляет приблизительно 0,7 мМ.

В некоторых вариантах осуществления представленных в изобретении растворов концентрация источника магния составляет от 0,05 до 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация источника магния составляет от 0,1 до 0,3 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация источника магния составляет приблизительно 0,3 мМ.

В некоторых вариантах осуществления представленных в изобретении растворов цитратный или ацетатный буфер представляет собой соль цитрата или ацетата. В некоторых вариантах осуществления представленных в изобретении растворов цитратный буфер представляет собой цитрат натрия. В некоторых вариантах осуществления концентрация цитрата или ацетата составляет от 0,1 до 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация цитрата или ацетата составляет от 0,5 до 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация цитрата или ацетата составляет приблизительно 1 мМ.

В некоторых вариантах осуществления представленных в изобретении растворов уровень pH раствора составляет от 6,8 до 7,8. В некоторых вариантах осуществления представленных в изобретении растворов уровень pH раствора составляет от 7,2 до 7,6. В некоторых вариантах осуществления уровень pH раствора составляет 7,4-7,5. В некоторых вариантах осуществления уровень pH раствора составляет приблизительно 7,5.

В некоторых вариантах осуществления представленных в изобретении растворов осмотически активное вещество представляет собой соль. В некоторых вариантах осуществления осмотически активное вещество представляет собой натриевую соль. В некоторых вариантах осуществления осмотически активное вещество представляет собой хлорид натрия. В некоторых вариантах осуществления концентрация осмотически активного вещества составляет приблизительно от 100 до 250 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация осмотически активного вещества составляет приблизительно от 125 до 175 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация осмотически активного вещества составляет приблизительно 150 мМ.

В некоторых вариантах осуществления представленных в изобретении растворов такой раствор является изотоническим. В некоторых вариантах осуществления раствор является гипертоническим. В некоторых вариантах осуществления осмолярность раствора составляет приблизительно от 270 до 345 мОсм/л. В некоторых вариантах осуществления осмолярность раствора составляет приблизительно от 300 до 330 мОсм/л. В некоторых вариантах осуществления осмолярность раствора составляет приблизительно 315 мОсм/л.

В некоторых вариантах осуществления раствор дополнительно включает калиевую соль. В некоторых вариантах осуществления соль калия представляет собой хлорид калия. В некоторых вариантах осуществления концентрация KCl составляет от 0,2 до 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация KCl составляет от 1 до 2,5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация KCl составляет приблизительно 2 мМ.

В некоторых вариантах осуществления раствор дополнительно включает вязкоупругий полимер. В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой синтетический полимер. В некоторых вариантах полимер присутствует в концентрации, эффективной для уменьшения воздействия напряжения сдвига на клетки в растворе. В некоторых вариантах осуществления концентрация полимера составляет от 0,001 до 5% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления концентрация полимера составляет приблизительно 0,05% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой гиалуроновую кислоту, или ее соль или сольват. В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой гиалуронат натрия. В некоторых вариантах осуществления гиалуроновая кислота, или ее соль или сольват представляет собой Healon Endocoat® (Abbott), Hyasis® (Novozymes) или Pro-Visc® (Alcon). В некоторых вариантах осуществления концентрация гиалуроновой кислоты, или ее соли или сольвата составляет приблизительно от 0,001 до 0,05% вес/объем, например, от 0,01 до 0,05% вес/объем, приблизительно от 0,02 до 0,05% вес/объем, приблизительно 0,01%, приблизительно 0,02%, приблизительно 0,03%, приблизительно 0,04% или приблизительно 0,05% вес/объем.

В некоторых вариантах осуществления представленных в изобретении растворов раствор содержит или состоит по существу из хлорида кальция, хлорида магния, цитрата натрия, хлорида натрия, глюкозы и, например, D-глюкозы в водном растворе. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит или состоит по существу из хлорида кальция, хлорида магния, цитрата натрия, хлорида натрия, глюкозы,

например, D-глюкозы и хлорида калия, в водном растворе. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит приблизительно 0,7 мМ CaCl (хлорид кальция), приблизительно 0,3 мМ MgCl (хлорид магния), приблизительно 1 мМ цитрата натрия, приблизительно 16 мМ декстрозы и приблизительно 145 мМ NaCl, в водном растворе, или по существу состоит из вышеперечисленного. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит CaCl (хлорид кальция) в количестве приблизительно от 0,5 до 0,9 мМ, MgCl (хлорид магния) в количестве приблизительно от 0,2 до 0,4 мМ, цитрат натрия в количестве приблизительно от 0,8 до 1,2 мМ, декстрозу в количестве приблизительно от 13 до 19 мМ и NaCl в количестве приблизительно от 116 до 174 мМ, в водном растворе, или по существу состоит из вышеперечисленного.

В некоторых вариантах осуществления раствор дополнительно содержит приблизительно 2 мМ KCl. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит приблизительно 0,7 мМ CaCl (хлорид кальция), приблизительно 0,3 мМ MgCl (хлорид магния), приблизительно 1 мМ цитрата натрия, приблизительно 16 мМ декстрозы, приблизительно 145 мМ NaCl и приблизительно 2 мМ KCl, в водном растворе, или по существу состоит из вышеперечисленного. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит CaCl (хлорид кальция) в количестве приблизительно от 0,5 до 0,9 мМ, MgCl (хлорид магния) в количестве приблизительно от 0,2 до 0,4 мМ, цитрат натрия в количестве приблизительно от 0,8 до 1,2 мМ, декстрозу в количестве приблизительно от 13 до 19 мМ, NaCl в количестве приблизительно от 116 до 174 мМ, и KCl в количестве приблизительно от 1,6 до 2,4 мМ, в водном растворе, или по существу состоит из вышеперечисленного.

В некоторых вариантах осуществления представленных в изобретении растворов такой раствор содержит или состоит по существу из хлорида кальция, хлорида магния, цитрата натрия, хлорида натрия, глюкозы, например, D-глюкозы, и вязкоупругого полимера, например гиалуроновой кислоты, или ее соли или сольвата, в водном растворе. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит или состоит по существу из хлорида кальция, хлорида магния, цитрата натрия, хлорида натрия, глюкозы, например, D-глюкозы, хлорида калия, и вязкоупругого полимера, например, гиалуроновой кислоты, или ее соли или сольвата, в водном растворе. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит приблизительно 0,7 мМ CaCl (хлорид кальция), приблизительно 0,3 мМ MgCl (хлорид магния), приблизительно 1 мМ цитрата натрия, приблизительно 16 мМ декстрозы, приблизительно 145 мМ NaCl, и вязкоупругий полимер, такой как гиалуроновая кислота, или ее соль или сольват, в количестве приблизительно от 1 до 5% вес/объем, в водном растворе, или по существу состоит из вышеперечисленного. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит приблизительно 0,7 мМ CaCl (хлорид кальция), приблизительно 0,3 мМ MgCl (хлорид магния), приблизительно 1 мМ цитрата натрия, приблизительно 16 мМ декстрозы, приблизительно 145 мМ NaCl, приблизительно 2 мМ KCl и вязкоупругий полимер в количестве приблизительно от 0,01 до 5% вес/объем, например, приблизительно от 0,01 до 0,05% вес/объем гиалуроновой кислоты, или ее соли или сольвата, в водном растворе, или по существу состоит из вышеперечисленного. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит приблизительно 0,7 мМ CaCl (хлорид кальция), приблизительно 0,3 мМ MgCl (хлорид магния), приблизительно 2 мМ KCl, приблизительно 1 мМ цитрата натрия, приблизительно 16 мМ декстрозы, приблизительно 145 мМ NaCl и приблизительно 0,05% гиалуроновой кислоты, или по существу состоит из вышеперечисленного. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит CaCl (хлорид кальция) в количестве приблизительно от 0,5 до 0,8 мМ, MgCl (хлорид магния) в количестве приблизительно от 0,2 до 0,4 мМ, KCl в количестве приблизительно от 1,6 до 2,4 мМ, цитрат натрия в количестве приблизительно от 0,8 до 1,2 мМ, декстрозу в количестве приблизительно от 13 до 19 мМ, NaCl в количестве приблизительно от 116 до 174 мМ и гиалуроновую кислоту в количестве приблизительно от 0,04 до 0,06%, или по существу состоит из вышеперечисленного.

В некоторых вариантах осуществления раствор является стерильным. В некоторых вариантах осуществления раствор по существу является апиrogenным.

В некоторых вариантах осуществления раствор не содержит карбонатный буфер. В некоторых вариантах осуществления раствор не содержит глутатион или дисульфид глутатиона (GSSG). В некоторых вариантах осуществления раствор не содержит органический цвиттерионный буфер.

В некоторых вариантах осуществления представленные в изобретении растворы могут храниться в течение по меньшей мере 4 ч, по меньшей мере 6 ч, по меньшей мере 8 ч, по меньшей мере 12 ч, по меньшей мере 18 ч, по меньшей мере 24 ч, по меньшей мере 36 ч, по меньшей мере 48 ч, по меньшей мере 72 ч, по меньшей мере 96 ч, по меньшей мере 120 ч, по меньшей мере 144 ч, по меньшей мере в течение одной недели, по меньшей мере двух недель, по меньшей мере трех недель или по меньшей мере в течение одного месяца при 25°C без измеримой преципитации растворенных веществ и/или измеримой потери способности раствора сохранять выживаемость и жизнеспособность клеток, находящихся в растворе. В некоторых вариантах осуществления представленные в изобретении растворы могут храниться в течение по меньшей мере 4 ч, по меньшей мере 6 ч, по меньшей мере 8 ч, по меньшей мере 12 ч, по меньшей мере 18 ч, по меньшей мере 24 ч, по меньшей мере 36 ч, по меньшей мере 48 ч, по меньшей мере 72 ч, по меньшей мере 96 ч, по меньшей мере 120 ч, по меньшей мере 144 ч, по меньшей мере в течение одной недели, по меньшей мере двух недель, по меньшей мере трех недель или по меньшей мере в течение одного месяца при температуре от 2 до 8°C без измеримой преципитации растворенных веществ

и/или измеримой потери способности раствора сохранять выживаемость и жизнеспособность клеток, находящихся в растворе.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к композициям, содержащим популяции клеток в растворе согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления клеточная популяция подходит для трансплантации субъекту. В некоторых вариантах осуществления клеточная популяция подходит для трансплантации в глаз субъекта. В некоторых вариантах осуществления клеточная популяция включает клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС). В некоторых вариантах осуществления клеточная популяция включает фоторецепторные клетки. В некоторых вариантах осуществления клеточная популяция включает мезенхимные клетки. В некоторых вариантах осуществления клеточная популяция включает ганглиозные клетки сетчатки. В некоторых вариантах осуществления клеточная популяция включает клетки-предшественники сетчатки. В некоторых вариантах осуществления клеточная популяция включает гемопоэтические стволовые клетки или клетки-предшественники, нервные стволовые клетки или клетки-предшественники, нервные клетки, астроциты или клетки-предшественники астроцитов, глиальные клетки или клетки-предшественники глиальных клеток и/или клетки поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления композиции хранятся в холодильнике. В некоторых вариантах осуществления композиции хранятся в холодильнике при температуре приблизительно от 2 до 8°C. В некоторых вариантах осуществления композиции сохраняет выживаемость клеток в клеточной популяции при хранении композиции. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70% клеток в клеточной популяции остаются жизнеспособными после хранения композиции при температуре от 2 до 8°C в течение 24, 48, 72, 96, 120 или 144 ч. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80% клеток в клеточной популяции остаются жизнеспособными после хранения композиции при температуре от 2 до 8°C в течение 24, 48, 72, 96, 120 или 144 ч. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% клеток в клеточной популяции остаются жизнеспособными после хранения композиции при температуре от 2 до 8°C в течение 24, 48, 72, 96, 120 или 144 ч. В некоторых вариантах осуществления композиции способствует сохранению эффективности культивирования клеточной популяции при хранении композиции. В некоторых вариантах осуществления после хранения композиции при температуре от 2 до 8°C в течение 24, 48, 72, 96, 120 или 144 ч в клеточной популяции выявляют эффективность культивирования на уровне по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% от ее исходной эффективности культивирования, при этом исходная эффективность культивирования означает эффективность культивирования клеточной популяции в начале периода хранения. В некоторых вариантах осуществления композицию помещают внутри контейнера для хранения. В некоторых вариантах осуществления композицию помещают в шприц.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам получения описанных композиций, например, композиций, которые содержат популяцию клеток в растворе согласно изобретению, при этом способ включает контактирование популяции клеток с раствором. В некоторых вариантах осуществления способ включает контактирование популяции криоконсервированных клеток или осажденных клеток с раствором, при этом осуществляется разведение клеток.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, подходящим для введения субъекту, при этом фармацевтические композиции содержат описанный в изобретении раствор или композицию, содержащую популяцию клеток в растворе по изобретению.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам, включающим введение раствора или композиции по изобретению субъекту, нуждающемуся в таком введении. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение раствора или композиции в глаз пациента. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение композиции субъекту после хранения композиции в течение по меньшей мере 4, по меньшей мере 6, по меньшей мере 12, по меньшей мере 24, по меньшей мере 36, по меньшей мере 48, по меньшей мере 60, по меньшей мере 72, по меньшей мере 96, по меньшей мере 120, или по меньшей мере 144 ч. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет заболевание сетчатки или у него диагностировано такое заболевание. В некоторых вариантах осуществления заболевание сетчатки представляет собой палочковую или колбочковую дистрофию, дегенерацию сетчатки, пигментный ретинит, диабетическую ретинопатию, макулярную дегенерацию, врожденный амавроз Лебера, заболевание, связанное с ганглиозными клетками сетчатки, глаукому или болезнь Штаргардта. В некоторых вариантах осуществления композиция включает популяцию клеток, размер которой эффективен для улучшения по меньшей мере одного симптома заболевания сетчатки у субъекта. В некоторых вариантах осуществления клеточная популяция содержит клетки ПЭС, фоторецепторные клетки или мезенхимальные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает контроль по меньшей мере одного симптома заболевания сетчатки у субъекта.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам, включающим: (а) контактирование клеточной популяции с раствором по изобретению, в результате чего создается клеточная композиция. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает (б) хранение клеточной композиции (а) приблизительно в течение по меньшей мере 4 ч, по меньшей мере 6, по меньшей мере 12, по меньшей мере 18, по меньшей мере 24, по меньшей мере 36, по меньшей мере 48, по меньшей мере

60, по меньшей мере 72, по меньшей мере 96, по меньшей мере 120, или по меньшей мере 144 ч. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает (с) введение клеточной композиции (а) субъекту после периода хранения (b). В некоторых вариантах осуществления введение (с) включает инъекцию клеток в глаз субъекта. В некоторых вариантах осуществления указанный способ дополнительно содержит определение жизнеспособности клеток в клеточной композиции (а) после периода хранения (b). В некоторых вариантах осуществления способ включает помещение клеточной композиции (а) в холодильник в течение периода хранения на этапе (b). В некоторых вариантах осуществления хранение в холодильнике включает нахождение клеточной композиции при температуре от 2 до 8°C. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает транспортировку созданной на этапе (а) композиции в место, отличное от места создания композиции, в течение периода хранения (b). В некоторых вариантах осуществления транспортировка включает транспортировку композиции в клинику или операционную, где происходит введение (с).

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения заболевания сетчатки, и указанные способы включают введение эффективного количества клеточной композиции по изобретению в глаз пациента с заболеванием сетчатки. В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется или диагностировано заболевание сетчатки. В некоторых вариантах осуществления заболевание сетчатки представляет собой палочковую или колбочковую дистрофию, дегенерацию сетчатки, пигментный ретинит, диабетическую ретинопатию, макулярную дегенерацию, патологическую миопию, врожденный амавроз Лебера, глаукому или болезнь Штаргардта. В некоторых вариантах осуществления композиция включает клеточную популяцию, размер которой эффективен для улучшения по меньшей мере одного симптома заболевания сетчатки у субъекта. В некоторых вариантах осуществления клеточная популяция содержит клетки ПЭС, фоторецепторные клетки сетчатки, ганглиозные или мезенхимальные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает контроль по меньшей мере одного симптома заболевания сетчатки у пациента.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к наборам, включающим: (а) раствор по изобретению; и (b) инструкцию для контактирования клеточной популяции с раствором (а) для создания клеточной композиции; и (с) контейнер для контактирования (b) и/или для хранения клеточной композиции (b). В некоторых вариантах осуществления раствор (а) и контейнер (с) подходят для использования для клеточной композиции (b), предназначенной для трансплантации субъекту.

Изложенная выше сущность изобретения неограничивающим образом иллюстрирует некоторые из вариантов осуществления, преимущества, признаки и применения технологий, раскрытых в настоящем изобретении. Другие варианты, преимущества, признаки и применения раскрытых в настоящем изобретении технологий будут очевидны из подробного описания, чертежей, примеров и формулы изобретения.

Краткое описание фигур

Фиг. 1. Клетки ПЭС могут сохраняться в среде NuroThermosol в течение 24 ч (но не 48 ч) без видимой потери с последующей способностью к культивированию и росту в культуре.

Фиг. 2. Стабильность клеток ПЭС в среде GS2 (от 2 до 8°C). Клетки ПЭС могут сохраняться в GS2 в течение по меньшей мере 48 ч без видимой потери в отношении количества жизнеспособных клеток или последующей способности к культивированию и росту в культуре.

Фиг. 3. Стабильность клеток ПЭС в среде GS2 (от 2 до 8°C). Клетки ПЭС могут сохраняться в GS2 в течение 4-5 дней, при этом происходит только номинальная потеря жизнеспособности клеток и нет значительного снижения плотности жизнеспособных клеток.

Фиг. 4. Стабильность клеток ПЭС в среде GS2 (от 2 до 8°C). Способность клеток ПЭС к культивированию и росту в культуре начинает уменьшаться после 5 дней хранения в GS2 с охлаждением.

Фиг. 5. Стабильность клеток ПЭС в среде GS2 (от 2 до 8°C). Среда GS2 совместима с современной инъекционной системой.

Фиг. 6. Показана средняя плотность жизнеспособных клеток из трижды исследованных пробирок+стандартные отклонения. Плотность человеческих клеток ПЭС определяли с помощью гемоцитометра. Жизнеспособность клеток оценивали в тесте на исключение с трипановым синим. Средние значения были рассчитаны по трижды проведенным для каждого условия анализам пробирок с клетками, при этом показатели концентрации жизнеспособных клеток для каждой пробирки рассчитывали в трех повторях. Процентное изменение (дельта) количества клеток, наблюдаемое после экструзии клеток через канюлю MedOne # 3233, показано над каждым набором значений для каждого условия.

Фиг. 7. Показаны среднее количество человеческих клеток ПЭС на лунку в шести лунках и стандартные отклонения (\pm SD) для каждого условия анализа. Для каждого условия приблизительно 20000 клеток на лунку высевали на 96-луночные планшеты с желатиновым покрытием и культивировали в среде для роста клеток ПЭС (RPE Growth Media EBM-2+EGM2 Single Quots, Stem Cell, Inc.) в течение 3 дней в условиях 5% CO₂, 37°C, в инкубаторе с контролируемой влажностью. После роста клеток в течение трех дней эти клетки снимали с подложки с помощью 1:1 смеси трипсина (Sigma) и среды для диссоциации на основе NEPES (Gibco) для определения количества клеток. После снятия клеток трипсин нейтрализовали средой, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (FCS), и подсчитывали количество клеток с помощью гемоцитометра.

Фиг. 8. Сравнение разных сред для хранения мезенхимальных стволовых клеток (MSC). Человеческие MSC, полученные из эмбриональных стволовых клеток, выращивали до 70% конfluence, собирали с добавлением 0,05% трипсина, ресуспендировали в среде aMEM+15% FCS (среда MSC) и центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в небольшом объеме среды для MSC и подсчитывали на жизнеспособность в тесте на исключение с трипановым синим. Затем в каждую из 4 пробирок типа Эппендорф вводили 5 млн MSC, центрифугировали и ресуспендировали в 1 мл каждого из указанных буферов. Пробирки помещали в холодной комнате с температурой 4°C в течение указанного промежутка времени. CS=собачья сыворотка; FBS=фетальная бычья сыворотка.

Фиг. 9. Жизнеспособность MSC в GS2 повышается в условиях хранения при более высокой плотности, тогда как присутствие FBS имеет незначительный эффект для повышения жизнеспособности в GS2 в течение 24 ч.

Фиг. 10. Жизнеспособность MSC сохраняется при хранении и выдавливании через иглу/шприц 26G (в GS2 при 4°C).

Фиг. 11. Показаны электроретинограммы (ЭРГ) на 60 день после введения в глаза группе из 16 крыс, при введении или клеток ПЭС, суспендированных в BSS-Plus, или транспортной среды GS2, по сравнению с показателями от животных, в глаза которых вводили или BSS-Plus или транспортную среду GS2 в качестве единственных препаратов (без клеток), или подвергали мнимому лечению или оставляли без лечения.

Подробное описание

Введение

Многие современные передовые хирургические манипуляции отличаются минимальным повреждением клеток и тканей по сравнению с более старыми методиками, но некоторые тонкие процедуры остаются очень чувствительными к технике и используемым материалам. Так, в глазной хирургии, например, при хирургическом лечении катаракты и операции витрэктомии, в манипуляции вовлечены легко ранимые клетки и ткани (например, эндотелиальный слой роговицы). В этой связи диапазон для ошибок является минимальным, и при этом существует большая вероятность повреждения тканей глаза и зрения пациента. Дополнительно, при трансплантации клеток, например, в методиках регенеративной медицины, часто требуется создание композиции, хранение, транспортировка и/или инъекция нежных или легко ранимых клеток, которые могут быть повреждены или потерять репопулирующую способность при неправильном обращении или воздействии нефизиологических условий.

Настоящее изобретение относится к раствору для орошения, разведения клеток, хранения клеток, транспортировки клеток и/или введения клеток субъекту. Представленные в изобретении растворы имеют ряд преимуществ по сравнению с имеющимися в настоящее время растворами для орошения, разведения клеток, создания композиций, хранения и/или трансплантации. Например, в отличие от существующих доступных сред, представленные в изобретении растворы способствуют выживанию клеток и тканей разных типов, в том числе легко повреждаемых клеток и тканей, и сохраняют высокую жизнеспособность клеток и тканей, эффективность повторного культивирования и репопулирующую способность даже при длительных сроках хранения. В других разделах настоящего изобретения описано более подробно, что имеющиеся в настоящее время среды для орошения или для получения клеточной композиции перед операцией имеют короткий период полужизни (например, по причине преципитации солей углерода), и/или не способствуют выживанию, эффективности повторного культивирования и репопулирующей способности сохраняемых клеток в течение длительного периода времени (например, в течение более 4-6 ч). По причине короткого периода полужизни и отсутствия поддержки жизнеспособности и функции клеток в течение относительно короткого периода времени использование имеющихся в настоящее время сред требует создания композиций среды и/или клеток и тканей в соответствующих средах в непосредственной близости от лечебного учреждения, в котором применяются эти среды или клеточные композиции (например, осуществляется трансплантация), или непосредственно в здании клиники или расположенной вблизи лаборатории. Таким образом, имеющееся в настоящее время растворы ограничивают клиническое применение композиций клеток или тканей только таким применением, когда введение можно осуществлять за короткий промежуток времени, в течение которого жизнеспособность клеток, эффективность повторного культивирования и/или репопулирующая способность являются приемлемыми. Требование к изготовлению композиции в непосредственной близости от лечебного учреждения приводит к дополнительным затратам, рискам и дополнительным ограничениям для обработки вне места изготовления.

В противоположность этому, представленные в изобретении растворы имеют длительный срок годности при хранении по сравнению с существующими растворами, и также способствуют сохранению функций и жизнеспособности клеток, эффективности повторного культивирования и репопулирующей способности у клеток разных типов, в том числе легко повреждаемых клеток, таких как клетки ПЭС, фоторецепторные клетки и мезенхимальные стволовые клетки, даже во время длительных периодов хранения (например, период хранения до 24, до 48 ч или дольше). Дополнительно, представленные в изобретении растворы являются биологически совместимыми и, таким образом, подходят для введения субъекту. Таким образом, клетки и ткани, представленные в виде композиции в растворе по изобретению, мож-

но непосредственно вводить субъекту без необходимости замены среды.

Улучшенные характеристики растворов по изобретению позволяют транспортировать полученные растворы, клетки и ткани в лечебные учреждения, находящиеся далеко от места создания композиции, что позволяет централизовать обработку и получение конечного продукта и устраняет необходимость изготовления композиции в непосредственной близости от лечебного учреждения. Расширение возможностей для хранения и транспортировки растворов по изобретению дополнительно позволяет задействовать лечебные учреждения, более удаленные от места изготовления конечного продукта, а также сделать более гибкими схемы клинического применения, например, при планировании операций по введению клеток или тканей в композиции с растворами по изобретению. Расширение окна времени в отношении хранения также дает дополнительные возможности для контроля качества полученного продукта, например, для тестирования на наличие патогенов в конечной рецептуре продукта, перед началом клинических манипуляций, например перед началом подготовки хирургической бригады к операции, или перед подготовкой пациента к операции.

Клинические растворы

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к медицинским ирригационным растворам для орошения и для создания композиций, хранения, транспортировки и введения клеток и тканей.

В отличие от имеющихся в настоящее время сред для орошения и создания клеточных композиций, таких как сбалансированные солевые растворы или физиологический раствор, медицинские растворы по изобретению способствуют длительному выживанию и функционированию чувствительных клеток или тканей, отличаются простотой приготовления и стерилизации, и имеют длительный срок годности при хранении.

Для кратковременного хранения клеток можно использовать простые солевые растворы, такие как фосфатно-буферный раствор или 0,9% раствор хлорида натрия, но эти растворы не поддерживают в достаточной степени жизнеспособность клеток или клеточные функции в течение более длительного хранения, в результате чего происходит значительное и часто неприемлемое уменьшение жизнеспособности клеток, эффективности повторного культивирования и репопулирующей способности даже после короткого периода хранения.

Существуют более сложные сбалансированные солевые растворы для медицинского применения, например для орошения или хранения клеток и тканей, и такие растворы обычно включают вещество для поддержания осмолярности, источник кальция, источник магния и буферное вещество.

Для поддержания осмолярности раствора обычно используется хлорид натрия. Ионы кальция играют важную роль в поддержании межклеточных соединений, например, в эндотелии роговицы. Ионы магния, как и ионы кальция, присутствуют в водянистой влаге и необходимы для ряда клеточных функций.

Анионы бикарбоната обычно используются в качестве буферного вещества, поскольку являются физиологическим буфером для многих тканей и широко совместимы с другими растворенными веществами. Вместе с тем, некоторые формы кальция и магния могут вступать в реакцию с бикарбонатом с образованием карбонатов кальция или магния, которые при определенных обстоятельствах могут выпадать в осадок из раствора. Реакция и преципитация могут происходить быстро, если содержащий бикарбонаты и кальций и/или магний раствор подвергнется термической стерилизации, и могут происходить в течение долгого времени при хранении в условиях окружающей среды. Предполагается, что реакция между кальцием или магнием и бикарбонатом происходит практически со всеми ионными солями кальция и магния, которые обычно используются в качестве фармацевтических наполнителей.

Чтобы избежать преципитации, применяется такой подход, как изготовление медицинского раствора с использованием бикарбонатного буфера в виде двух отдельных стоковых растворов, которые смешивают непосредственно перед применением. Например, одна из широко используемых медицинских сред представляет собой стерильный ирригационный раствор для внутриглазного применения BSS PLUS® (Alcon Laboratories, Inc.). Стерильный ирригационный раствор для внутриглазного применения BSS PLUS® представляет собой двухкомпонентный раствор. Две его части смешивают вместе для получения единого раствора непосредственно перед хирургическим вмешательством. Этот этап смешивания может быть неудобным и несет риск ошибок при изготовлении смеси в напряженной обстановке операционной. Дополнительно, производство двух отдельных растворов является более сложным и дорогостоящим, чем производство однокомпонентной лекарственной формы. Таким образом, однокомпонентный медицинский раствор будет иметь преимущество и является весьма желательным.

Часть I в стерильном ирригационном растворе для внутриглазного применения BSS PLUS® содержит хлорид натрия, хлорид калия, бикарбонат натрия и двухосновный фосфат натрия, растворенные в воде для инъекций. Уровень pH части I близок к нейтральному, и уровень ее осмолярности является почти изотоническим по отношению к физиологическим жидкостям. Часть II в стерильном ирригационном растворе для внутриглазного применения BSS PLUS® содержит хлорид кальция, хлорид магния, декстрозу и дисульфид глутатиона (GSSG), растворенные в воде для инъекций. Уровень pH части II доведен до диапазона от 3 до 5, и этот раствор имеет гипотоническую осмолярность.

После разведения стерильный ирригационный раствор для внутриглазного применения BSS PLUS® имеет нейтральный уровень pH и изотоническую осмолярность. При объединении этих двух частей стерильного ирригационного раствора для внутриглазного применения BSS PLUS® двухвалентные катионы, такие как кальций и магний из части II, реагируют с бикарбонатом и фосфатом из части I с образованием осадка. Эта реакция протекает почти мгновенно, если объединенный раствор подвергается стерилизации паром, и более медленно при комнатной температуре, обычно в течение периода от нескольких часов до нескольких дней. Во избежание преципитации срок годности стерильного ирригационного раствора для внутриглазного применения BSS PLUS®, указанный в инструкции, составляет шесть часов, и в течение этого срока раствор должен быть использован.

Ранее осуществлялись попытки создания однокомпонентного медицинского раствора, сравнимого по эффекту с двухкомпонентным стерильным ирригационным раствором для внутриглазного применения BSS PLUS®. В Европейской заявке на патент EP 1067907 B1 (Armitage) описано применение цвиттерионных органических буферов, таких как N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N¹-(2-этансульфоновая кислота), обычно называемая HEPES, с целью предотвращения преципитации, как указано выше. В раскрытых автором Armitage композициях отсутствуют такие компоненты, как декстроза и GSSG, которые отличаются нестабильностью в композиции растворов с физиологическим уровнем pH или при автоклавировании. В композициях согласно Armitage также отсутствует такой тип компонентов, как аминокислоты, обычно добавляемые в среды для культивирования тканей. Таким образом, изобретение Armitage не решает задачу получения раствора без недостатка преципитации.

В отличие от ранее разработанных однокомпонентных растворов, в некоторых аспектах настоящего изобретения рассмотрены однокомпонентные медицинские растворы, для которых не требуются цвиттерионные органические буферы, такие как HEPES, BES, MOPS, TES, EPPS и TRICINE (Трицин), чтобы поддерживать уровень pH раствора в физиологическом диапазоне. В медицинских растворах настоящего изобретения решена проблема короткого срока годности. Представленные в изобретении медицинские растворы имеют значительно увеличенный срок годности при хранении по сравнению с имеющимися в настоящее время клиническими средами, и сохраняют жизнеспособность клеток, эффективность повторного культивирования и репулационную способность клеток даже после длительного хранения в течение 24, 48, 60, 72, 96, 120, 144 или 168 ч или более.

Термин "раствор", используемый в данном описании, относится к водной среде, содержащей воду в качестве основного растворителя, и одно или несколько растворенных веществ, присутствующих в растворе, например, буферное вещество, осмотически активное вещество, глюкозу, соль, полимер и т.д. В некоторых вариантах осуществления представленные в изобретении растворы предназначены для медицинского применения, и, следовательно, являются нетоксичными, апирогенными и стерильными.

В некоторых вариантах осуществления представленные в изобретении растворы имеют физиологический уровень pH и физиологическое осмотическое давление, также называемое физиологической осмолярностью. Физиологический уровень pH относится к показателю pH, который не является цитотоксическим и сходен с уровнем pH клетки или ткани, в которые вводится раствор, или условия для клетки или ткани в композиции с раствором сходны с естественной средой для этой клетки или ткани. Для большинства клеток и тканей физиологический уровень pH составляет приблизительно от 6,8 до 7,8, например, pH от 7 до 7,7, pH от 7,2 до 7,6, pH от 7,2 до 7,4 или pH от 7,4 до 7,5. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления представленные в изобретении растворы имеют уровень pH приблизительно 7,0, приблизительно 7,1, приблизительно 7,2, приблизительно 7,3, приблизительно 7,4, приблизительно 7,5, приблизительно 7,6, приблизительно 7,7 или приблизительно 7,8. Физиологическое осмотическое давление относится к осмотическому давлению, которое не является цитотоксическим и сходно с осмотическим давлением клетки или ткани, в которые вводится раствор, или условия для клетки или ткани в композиции с раствором сходны с естественной средой для этой клетки или ткани. Для большинства клеток и тканей физиологическое осмотическое давление составляет приблизительно от 270 до 345 мОсм/л, например, от 280 до 330 мОсм/л, от 290 до 325 мОсм/л, от 300 до 315 мОсм/л. В некоторых вариантах осуществления физиологическое осмотическое давление составляет приблизительно 300 мОсм/л, приблизительно 305, приблизительно 310, приблизительно 315, приблизительно 320 или приблизительно 325 мОсм/л.

Термин "осмотическое давление" или "осмолярность" раствора означает давление, необходимое для остановки потока растворителя в раствор через полупроницаемую мембрану, разделяющую чистый растворитель с одной стороны, и раствор с другой стороны, при этом полупроницаемая мембрана является проницаемой для молекул растворителя, но непроницаемой для молекул растворенного вещества. Осмотическое давление раствора пропорционально молярной концентрации растворенных частиц в растворе, и измеряется в мОсм/л или мОсм/кг. В некоторых вариантах осуществления раствор по изобретению имеет осмолярность приблизительно от 290 мОсм/л приблизительно до 320 мОсм/л, или приблизительно от 300 мОсм/л приблизительно до 310 мОсм/л или приблизительно 305 мОсм/л. В некоторых вариантах осуществления раствор имеет осмолярность приблизительно от 300 до 330 мОсм/л. В некоторых вариантах осуществления осмолярность раствора составляет приблизительно 300 мОсм/л, приблизительно 305,

приблизительно 310, приблизительно 315, приблизительно 320 или приблизительно 325 мОсм/л.

В некоторых вариантах осуществления осмолярность раствора по изобретению относится к его тоничности, при этом гипертонический раствор вызывает сокращение клетки, гипотонический раствор вызывает набухание клетки и изотонический раствор не вызывает каких-либо изменений в объеме клетки. Термины "гипертонический", "гипотонический" и "изотонический" обычно используются по отношению к клетке, клеточной популяции или ткани, которые контактируют с раствором. Например, в вариантах осуществления, относящихся к ирригационному раствору, термин "изотонический" относится к осмотическому давлению, которое не вызывает изменение объема клеток или тканей, контактирующих с раствором при орошении. Аналогичным образом, в вариантах осуществления, относящихся к использованию раствора для изготовления композиции с клеткой, клеточной популяцией или тканью для медицинского применения, например, для трансплантации субъекту, термин "изотонический" относится к осмотическому давлению, которое не вызывает изменение объема клетки, клеток в клеточной популяции, или клеток ткани, когда они находятся в этом растворе. В некоторых вариантах осуществления растворы по изобретению являются изотоническими. В некоторых вариантах осуществления раствор является гипертоническим.

В некоторых вариантах осуществления в растворах по изобретению осмотически активное вещество представляет собой соль. В некоторых вариантах осуществления соль представляет собой фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления осмотически активное вещество представляет собой натриевую соль. В некоторых вариантах осуществления осмотически активное вещество представляет собой хлорид натрия. В некоторых вариантах осуществления концентрация осмотически активного вещества составляет приблизительно от 100 до 200 мМ, от 125 до 175 мМ или от 140 до 160 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация осмотически активного вещества составляет приблизительно 100 мМ, приблизительно 105, приблизительно 110, приблизительно 115, приблизительно 120, приблизительно 125, приблизительно 130, приблизительно 135, приблизительно 140, приблизительно 145, приблизительно 150, приблизительно 155, приблизительно 160, приблизительно 165, приблизительно 170, приблизительно 175, приблизительно 180, приблизительно 185, приблизительно 190, приблизительно 195 или приблизительно 200 мМ.

Термин "физиологическая осмолярность", используемый в изобретении, относится к осмотическому давлению, которое не является цитотоксическим (например, не разрушает данную клетку или тип клеток или не вызывает иного повреждения клетки), и сходно с осмотическим давлением ткани, в которую вводится раствор, или условия для клетки или ткани в композиции с раствором сходны с естественной средой для этой клетки или ткани. Диапазон физиологической осмолярности для большинства применений составляет приблизительно от 280 приблизительно до 325 мОсм/л, приблизительно от 290 приблизительно до 320 мОсм/л, или приблизительно от 300 до 310 мОсм/л, или приблизительно 305 мОсм/л.

В некоторых вариантах осуществления представленные в изобретении растворы для разведения клеток, их хранения, транспортировки и/или введения субъекту включают: (а) буфер, поддерживающий физиологический уровень рН раствора; (b) по меньшей мере 2 мМ глюкозы и (с) осмотически активное вещество, поддерживающее физиологическую осмолярность раствора. В некоторых вариантах осуществления раствор дополнительно включает источник двухвалентных катионов. В некоторых вариантах осуществления источник двухвалентных катионов включает источник кальция и/или источник магния. В некоторых вариантах осуществления раствор включает источник кальция. В некоторых вариантах осуществления раствор дополнительно включает источник магния. В некоторых вариантах осуществления буфер включает ацетатный буфер и/или цитратный буфер. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит глюкозу в количестве по меньшей мере 4 мМ, по меньшей мере 5 мМ, по меньшей мере 6 мМ, по меньшей мере 7 мМ, по меньшей мере 7,5 мМ, по меньшей мере 8 мМ, по меньшей мере 9 мМ, по меньшей мере 10 мМ, по меньшей мере 15 мМ, по меньшей мере 20 мМ, по меньшей мере 25 мМ, по меньшей мере 30 мМ, по меньшей мере 40 мМ, или по меньшей мере 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит декстрозу в количестве по меньшей мере 0,5 мМ, по меньшей мере 1 мМ, по меньшей мере 2 мМ, по меньшей мере 2,5 мМ, по меньшей мере 3 мМ, по меньшей мере 5 мМ, по меньшей мере 6 мМ, по меньшей мере 7 мМ, по меньшей мере 7,5 мМ, по меньшей мере 8 мМ, по меньшей мере 9 мМ, по меньшей мере 10 мМ, по меньшей мере 15 мМ, по меньшей мере 16 мМ, по меньшей мере 20 мМ, по меньшей мере 25 мМ, по меньшей мере 30 мМ, по меньшей мере 40 мМ или по меньшей мере 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит не более 3 мМ глюкозы, не более 4 мМ, не более 5 мМ, не более 6 мМ, не более 7 мМ, не более 7,5 мМ, не более 8 мМ, не более 9 мМ, не более 10 мМ, не более 15 мМ, не более 17 мМ, не более 20 мМ, не более 25 мМ, не более 30 мМ, не более 40 мМ или не более 50 мМ глюкозы. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит не более 0,5 мМ декстрозы, не более 1 мМ, не более 2 мМ, не более 2,5 мМ, не более 3 мМ, не более 4 мМ, не более 5 мМ, не более 6 мМ, не более 7 мМ, не более 7,5 мМ, не более 8 мМ, не более 9 мМ, не более 10 мМ, не более 15 мМ, не более 20 мМ, не более 25 мМ, не более 30 мМ, не более 40 мМ или не более 50 мМ декстрозы.

В некоторых вариантах осуществления представленные в изобретении растворы для разведения клеток, их хранения, транспортировки и/или введения субъекту включают: (а) буфер, поддерживающий

физиологический уровень рН раствора; (b) глюкозу; (c) осмотически активное вещество, поддерживающее физиологическую осмолярность раствора; (d) источник кальция и (e) источник магния. В некоторых вариантах осуществления буфер включает ацетатный и/или цитратный буфер. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит глюкозу в количестве по меньшей мере 0,5 мМ, по меньшей мере 1 мМ, по меньшей мере 2 мМ, по меньшей мере 2,5 мМ, по меньшей мере 3 мМ, по меньшей мере 4 мМ, по меньшей мере 5 мМ, по меньшей мере 6 мМ, по меньшей мере 7 мМ, по меньшей мере 7,5 мМ, по меньшей мере 8 мМ, по меньшей мере 9 мМ, по меньшей мере 10 мМ, по меньшей мере 15 мМ, по меньшей мере 16 мМ, по меньшей мере 20 мМ, по меньшей мере 25 мМ, по меньшей мере 30 мМ, по меньшей мере 40 мМ или по меньшей мере 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит декстрозу в количестве по меньшей мере 0,5 мМ, по меньшей мере 1 мМ, по меньшей мере 2 мМ, по меньшей мере 2,5 мМ, по меньшей мере 3 мМ, по меньшей мере 5 мМ, по меньшей мере 6 мМ, по меньшей мере 7 мМ, по меньшей мере 7,5 мМ, по меньшей мере 8 мМ, по меньшей мере 9 мМ, по меньшей мере 10 мМ, по меньшей мере 15 мМ, по меньшей мере 16 мМ, по меньшей мере 20 мМ, по меньшей мере 25 мМ, по меньшей мере 30 мМ, по меньшей мере 40 мМ или по меньшей мере 50 мМ. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит не более 0,5 мМ глюкозы, не более 1 мМ, не более 2 мМ, не более 2,5 мМ, не более 3 мМ, не более 4 мМ, не более 5 мМ, не более 6 мМ, не более 7 мМ, не более 7,5 мМ, не более 8 мМ, не более 9 мМ, не более 10 мМ, не более 15 мМ, не более 17 мМ, не более 20 мМ, не более 25 мМ, не более 30 мМ, не более 40 мМ, или не более 50 мМ глюкозы. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит не более 0,5 мМ декстрозы, не более 1 мМ, не более 2 мМ, не более 2,5 мМ, не более 3 мМ, не более 4 мМ, не более 5 мМ, не более 6 мМ, не более 7 мМ, не более 7,5 мМ, не более 8 мМ, не более 9 мМ, не более 10 мМ, не более 15 мМ, не более 17 мМ, не более 20 мМ, не более 25 мМ, не более 30 мМ, не более 40 мМ или не более 50 мМ декстрозы.

В некоторых вариантах осуществления в растворах по изобретению концентрация глюкозы или декстрозы составляет от 0,5 до 150 мМ, от 0,5 до 50 мМ, от 2,5 до 50 мМ, от 5 до 50 мМ, от 10 до 50 мМ, от 0,5 до 25 мМ, от 2,5 до 25 мМ, от 5 до 25 мМ, от 10 до 25 мМ или от 10 до 20 мМ. В некоторых вариантах осуществления в растворах по изобретению концентрация глюкозы или декстрозы составляет приблизительно 0,5 мМ, приблизительно 1 мМ, приблизительно 2 мМ, приблизительно 2,5 мМ, приблизительно 3 мМ, приблизительно 4 мМ, приблизительно 5 мМ, приблизительно 6 мМ, приблизительно 7 мМ, 7,5 мМ, приблизительно 8 мМ, приблизительно 9 мМ, приблизительно 10 мМ, приблизительно 11 мМ, приблизительно 12 мМ, приблизительно 12,5 мМ, приблизительно 13 мМ, приблизительно 14 мМ, приблизительно 15 мМ, приблизительно 16 мМ, приблизительно 17 мМ, приблизительно 18 мМ, приблизительно 19 мМ, приблизительно 20 мМ, приблизительно 22,5 мМ, приблизительно 25 мМ, приблизительно 30 мМ, приблизительно 35 мМ, приблизительно 40 мМ, приблизительно 45 мМ или приблизительно 50 мМ.

В некоторых вариантах осуществления представленные в изобретении растворы включают источник двухвалентных катионов. Подходящие двухвалентные катионы включают без ограничения, например, катионы Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cr^{2+} , Cu^{2+} , Ba^{2+} и Sr^{2+} . В некоторых вариантах осуществления источник двухвалентных катионов включает источник кальция. В некоторых вариантах осуществления источник двухвалентных катионов включает источник магния. В некоторых вариантах осуществления источник двухвалентных катионов включает источник двух или нескольких разных двухвалентных катионов, например, источник кальция и источник магния.

В некоторых вариантах осуществления растворы по изобретению представляют собой раствор, содержащий источник кальция, например, источник ионов кальция. В некоторых вариантах осуществления источник кальция включает фармацевтически приемлемую соль кальция. В некоторых вариантах осуществления растворы по изобретению представляют собой раствор, содержащий источник магния, например, источник ионов магния. В некоторых вариантах осуществления источник магния включает фармацевтически приемлемую соль магния.

Термин "фармацевтически приемлемая соль", используемый в изобретении, относится к соли, которая считается подходящей для введения субъекту-человеку. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль, образованную с кислотой, выбранной из группы, включающей уксусную кислоту, аскорбиновую кислоту, лимонную кислоту, соляную кислоту, малеиновую кислоту, щавелевую кислоту, фосфорную кислоту, стеариновую кислоту, янтарную кислоту и серную кислоту. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый источник двухвалентных катионов выбран из группы, состоящей из солей кальция и/или магния, образованных с кислотой, выбранной из группы, включающей уксусную кислоту, аскорбиновую кислоту, лимонную кислоту, соляную кислоту, малеиновую кислоту, щавелевую кислоту, фосфорную кислоту, стеариновую кислоту, янтарную кислоту и серную кислоту. Так, например, фармацевтически приемлемая соль кальция в этой группе вариантов осуществления будет включать ацетат кальция, аскорбат кальция, цитрат кальция, хлорид кальция, малеат кальция, оксалат кальция, фосфат кальция, стеарат кальция, сукцинат кальция и сульфат кальция. Специалистам в данной области будет очевидно, что в таких вариантах осуществления, где раствор включает две или несколько фармацевтически приемлемых солей (например, соли кальция, магния и калия), некоторые или все соли могут быть образованы с одной и той же кисло-

той (например, хлорид кальция, хлорид магния и хлорид калия), или две или несколько солей могут быть образованы с разными кислотами (например, хлорид кальция, хлорид магния, ацетат калия и хлорид кальция, цитрат магния и малеат калия и т.д.).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль, например фармацевтически приемлемая соль кальция или магния, представляет собой соль кислоты, выбранной из группы, состоящей из следующего: L-гидрокси-2-нафтойная кислота, 2,2-дихлоруксусная кислота, 2-гидроксиэтансульфоновая кислота, 2-оксоглутаровая кислота, 4-ацетамидбензойная кислота, 4-аминосалициловая кислота, уксусная кислота, адипиновая кислота, аскорбиновая кислота (L), аспарагиновая кислота (L), бензолсульфоновая кислота, бензойная кислота, камфорная кислота (+), камфор-10-сульфоновая кислота (+), каприновая кислота (декановая кислота), капроновая кислота (капроновая кислота), каприловая кислота (октановая кислота), угольная кислота, коричная кислота, лимонная кислота, цикламвая кислота, додецилсерная кислота, этан-1,2-дисульфокислота кислоты, этансульфоновая кислота, муравьиная кислота, фумаровая кислота, галактаровая кислота, гентизиновая кислота, глюкогептоновая кислота (D), глюконовая кислота (D), глюкоурононовая кислота (D), глутаминовая кислота, глутаровая кислота, gluceogrophosphoric кислоты, гликолевая кислота, гиппуровая кислота, бромистоводородная кислота, хлористоводородная кислота, изомасляная кислота, молочная кислота (DL), лактобионовая кислота, лауриновая кислота, малеиновая кислота, яблочная кислота (-L), малоновая кислота, миндальная кислота (DL), метансульфоновая кислота, нафталин-1,5-дисульфоновая кислота, нафталин-2-сульфоновая кислота, никотиновая кислота, азотная кислота, олеиновая кислота, щавелевая кислота, пальмитиновая кислота, палмовая кислота, фосфорная кислота, пропионовая кислота, пироглутаминовая кислота (-L), салициловая кислота, себациновая кислота, стеариновая кислота, янтарная кислота, серная кислота, винная кислота (+L), тиоциановая кислота, толуолсульфоновая кислота (p) и ундециленовая кислота. Дополнительные подходящие фармацевтически приемлемые соли будут очевидны специалистам в данной области, и следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено в отношении этого перечня.

В некоторых вариантах осуществления общая концентрация двухвалентных катионов в источнике двухвалентных катионов составляет от 0,1 до 20 мМ, например, приблизительно от 0,5 до 10 мМ, от 0,5 до 5 мМ, от 1 до 10 мМ или от 2 до 10 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация источника двухвалентных катионов составляет приблизительно 0,2 мМ, приблизительно 0,3 мМ, приблизительно 0,4 мМ, приблизительно 0,5 мМ, приблизительно 0,6 мМ, приблизительно 0,7 мМ, приблизительно 0,8 мМ, приблизительно 0,9 мМ, приблизительно 1 мМ, приблизительно 2 мМ, приблизительно 3 мМ, приблизительно 4 мМ или приблизительно 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления источник двухвалентных катионов включает источник кальция и/или магния.

В некоторых вариантах осуществления растворов по изобретению источник кальция включает хлорид кальция. В некоторых вариантах осуществления источник кальция включает дигидрат хлорида кальция. В некоторых вариантах осуществления источник магния включает хлорид магния. В некоторых вариантах осуществления источник магния включает гексагидрат хлорида магния. В некоторых вариантах осуществления растворов по изобретению концентрация источника кальция составляет от 0,1 до 1,2 мМ, от 0,25 до 0,75 мМ, от 0,4 до 0,65 мМ или от 0,5 до 0,7 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация источника кальция составляет приблизительно 0,2 мМ, приблизительно 0,3 мМ, приблизительно 0,4 мМ, приблизительно 0,5 мМ, приблизительно 0,6 мМ, приблизительно 0,7 мМ, приблизительно 0,8 мМ, приблизительно 0,9 мМ, приблизительно 1 мМ, приблизительно 1,1 мМ или приблизительно 1,2 мМ. В некоторых вариантах осуществления растворов по изобретению концентрация источника магния составляет от 0,05 до 5 мМ, от 0,1 до 0,5 мМ, от 0,25 до 2,5 мМ, от 0,1 до 1 мМ или от 0,1 до 0,3 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация источника магния составляет приблизительно 0,05 мМ, приблизительно 0,1 мМ, приблизительно 0,2 мМ, приблизительно 0,3 мМ, приблизительно 0,4 мМ, приблизительно 0,5 мМ, приблизительно 0,6 мМ, приблизительно 0,7 мМ, приблизительно 0,8 мМ, приблизительно 0,9 мМ, приблизительно 1 мМ, приблизительно 2 мМ, приблизительно 3 мМ, приблизительно 4 мМ или приблизительно 5 мМ.

В некоторых вариантах осуществления растворы по изобретению содержат буферное вещество. Термин "буферное вещество" используется в изобретении взаимозаменяемо с термином "буфер" и относится к веществу, которое может поддерживать относительно стабильный уровень pH раствора путем нейтрализации добавленной кислоты или основания. Обычно буфер включает пару сопряженных слабых кислот и щелочей, т.е. или слабую кислоту и ее сопряженное основание или слабое основание и его сопряженную кислоту.

В некоторых вариантах осуществления буфер в составе растворов по изобретению представляет собой цитратный или ацетатный буфер, например, представлен в виде соли цитрата или соли ацетата. В некоторых вариантах осуществления растворов по изобретению цитратный буфер представлен в виде цитрата натрия. В некоторых вариантах осуществления концентрация цитрата или ацетата составляет от 0,1 до 5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация цитрата или ацетата составляет от 0,5 до 2 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация цитрата или ацетата составляет приблизительно 0,05, 0,06, 0,07, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мМ.

В некоторых вариантах осуществления раствор дополнительно содержит калиевую соль, предпочтительно фармацевтически приемлемую соль калия. В некоторых вариантах осуществления соль калия представляет собой хлорид калия. В некоторых вариантах осуществления концентрация KCl составляет от 0,2 до 5 мМ или от 1 до 2,5 мМ. В некоторых вариантах осуществления концентрация KCl составляет приблизительно 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,9, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 4 или 5 мМ.

В некоторых вариантах осуществления раствор дополнительно содержит вязкоупругий полимер. Без связи с конкретной теорией, предполагается, что вязкоупругий полимер защищает клетки и ткани от усилия сдвига, и его добавление повышает жизнеспособность клетки и тканей, эффективность повторного культивирования и репопулирующую способность после хранения их в растворе по изобретению и/или после введения субъекту, например, способами введения, включающими катетеризацию. Вязкоэластичные полимеры хорошо известны специалистам в данной области, и примеры подходящих вязкоупругих полимеров включают без ограничения следующее: гиалуроновая кислота (например, Healon Endocoat® (Abbott), Hyasis® (Novozymes) и Pro-Vise® (Alcon)), альгинат (включая альгинат натрия), поли(этиленгликоль) (ПЭГ), также известный как поли(этиленоксид) (ПЭО), полиакриламид, поли(виниловый спирт) (ПВС), гидроксипропилцеллюлоза (ГЭЦ), поли(N-гидроксипропил-акриламид) (PHEA), гидроксипропилметилцеллюлоза (ГПМЦ), гидроксипропилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, поли(2-гидроксипропилметакрилат) (pHEMA), полиметакриловая кислота(карбомер), поли(винилпирролидон) (ПВП), поли(акриловая кислота) (ПАК), декстран, хондроитин сульфат, поли(2-метакрилоилоксиэтил фосфорилхолин) (PMPC) и триблок-сополимеры, например, поллоксамер 188 (Pluronic® F68), поллоксамер P108 (Pluronic® F38), поллоксамеры P184 (Pluronic® L64), поллоксамеры P401, P402 поллоксамер, поллоксамеры P407 (Pluronic® F127) и поллоксамеры P408 (Pluronic® F108), гидроксипропил гуар поливинилпирролидон, сополимер полиоксиэтилен-полиоксипропилен (поллоксамер), или их соли, или их смеси, включающие (без ограничения) смеси гиалуроновой кислоты и альгината, или их фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой неионогенный полимер. В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой полиэфир. В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой полиалкилэфир. В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой сополимер из полиалкилэфира и другого полимера (например, полиалкилэфир). В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой поллоксамеры (также известные как поллоксимеры). Поллоксимеры представляют собой неионные триблок-сополимеры, состоящие из центральной гидрофобной цепи полиоксипропилена (ПОП) (также называемого полипропиленгликолем) в окружении двух гидрофильных цепей полиоксиэтилена (ПОЭ) (также называемого полиэтиленгликолем (ПЭГ)). Специалистам в данной области известны дополнительные подходящие вязкоупругие полимеры для использования в описанных здесь растворах, согласно настоящему изобретению, и следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено в этом отношении. Специалистам в данной области следует понимать, что количество вязкоупругого полимера, подходящего для использования в растворах и композициях по изобретению, будет зависеть от свойств вязкоупругого полимера, например, среди прочего, от молекулярной массы полимера. В некоторых вариантах осуществления в растворах и композициях по изобретению используется вязкоупругий полимер в концентрации от 0,001 до 5% вес/объем В некоторых вариантах осуществления вязкоупругий полимер используется в концентрации, обеспечивающей вязкость растворов или композиций по изобретению, которая аналогична вязкости того же раствора или композиции, содержащей от 0,01 до 0,05% гиалуроновой кислоты, например, аналогична вязкости того же раствора или композиции, содержащей от 0,01 до 0,05% Healon Endocoat®.

В некоторых вариантах осуществления содержащая вязкоупругий полимер транспортная среда имеет вязкость при нулевом сдвиге, превышающую 1000, 10000, 50000 или даже 100000 Па·с, предпочтительно имеет вязкость при нулевом сдвиге в диапазоне от 1000 до 200000 Па·с, и более предпочтительно в диапазоне от 1000 до 20000 Па·с. В некоторых вариантах осуществления вязкоупругий полимер увеличивает вязкость при нулевом сдвиге в получаемой транспортной среде на 5, 10, 15, 25 или даже 40% по сравнению с транспортной средой без вязкоупругого полимера.

В таких вариантах осуществления, где раствор вводят субъекту, например, в виде композиции, содержащей клетки или ткань в растворе, используемый в настоящем изобретении полимер является биосовместимым и/или биологически разлагаемым.

В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой гиалуроновую кислоту, или ее соль или сольват. В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой гиалуронат натрия. В некоторых вариантах полимер присутствует в концентрации, эффективной для уменьшения воздействия усилия сдвига на клетки в растворе. В некоторых вариантах осуществления концентрация полимера составляет от 0,01 до 5% вес/объем В некоторых вариантах осуществления концентрация полимера составляет приблизительно от 0,01 до 0,05% вес/объем В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой Healon Endocoat®.

В некоторых вариантах осуществления раствор не содержит карбонатный буфер. В некоторых вариантах осуществления раствор не содержит глутатион или дисульфид глутатиона (GSSG). В некоторых вариантах осуществления раствор не содержит органический цвиттерионный буфер.

В объем настоящего изобретения входят растворы, сочетающие два, или несколько или любое количество показателей (например, уровень pH, осмолярность, растворенные вещества (буфер, глюкоза, осмотически активное вещество, магний, кальций, калий, полимер), концентрация и т.д.). Например, в объем изобретения входят растворы, содержащие буферное вещество, глюкозу и осмотически активное вещество, с добавлением или без добавления полимера, содержащие калий растворы и растворы, не содержащие калий, а также растворы, содержащие любую комбинацию из растворенных веществ в любой концентрации, предусмотренной для соответствующего растворенного вещества. Также следует понимать, что к настоящему изобретению относятся растворы, содержащие перечисленные растворенные вещества, а также растворы, по существу содержащие или состоящих из перечисленных растворенных веществ и растворителя, например, воды. Эти варианты не указаны в изобретении в целях краткости.

Например, в некоторых вариантах осуществления растворов по изобретению такой раствор содержит или состоит по существу из хлорида кальция, хлорида магния, цитрата натрия, хлорида натрия и глюкозы, например, D-глюкозы, в воде. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит или состоит по существу из хлорида кальция, хлорида магния, цитрата натрия, хлорида натрия, глюкозы, например, D-глюкозы, и хлорида калия, в воде. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит или состоит по существу приблизительно из 0,7 мМ CaCl (хлорид кальция), приблизительно 0,03 мМ MgCl (хлорид магния), приблизительно 1 мМ цитрата натрия, приблизительно 16 мМ декстрозы и приблизительно 145 мМ NaCl, в воде. В некоторых вариантах осуществления раствор дополнительно содержит приблизительно 2 мМ KCl. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит или состоит по существу приблизительно из 0,7 мМ CaCl (хлорид кальция), приблизительно 0,03 мМ MgCl (хлорид магния), приблизительно 1 мМ цитрата натрия, приблизительно 16 мМ декстрозы, приблизительно 145 мМ NaCl и приблизительно 2 мМ KCl, в воде. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит или состоит по существу приблизительно из 0,7 мМ CaCl (хлорид кальция), приблизительно 0,3 мМ MgCl (хлорид магния), приблизительно 1 мМ цитрата натрия, приблизительно 16 мМ декстрозы, приблизительно 145 мМ NaCl и приблизительно 2 мМ KCl, в воде. В некоторых вариантах осуществления раствор дополнительно включает вязкоупругий полимер. В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой гиалуроновую кислоту, или ее соль или сольват. В некоторых вариантах осуществления полимер представляет собой гиалуронат натрия. В некоторых вариантах полимер присутствует в концентрации, эффективной для уменьшения воздействия напряжения сдвига на клетки в растворе. В некоторых вариантах осуществления концентрация полимера составляет от 0,01 до 5% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления концентрация полимера составляет приблизительно от 0,01 до 0,05% вес/объем. В некоторых вариантах осуществления растворов по изобретению такой раствор содержит или состоит по существу из хлорида кальция, хлорида магния, цитрата натрия, хлорида натрия, глюкозы, например, D-глюкозы, и вязкоупругого полимера, например гиалуроновой кислоты, или ее соли или сольвата, в воде. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит или состоит по существу из хлорида кальция, хлорида магния, цитрата натрия, хлорида натрия, глюкозы, например, D-глюкозы, хлорида калия и вязкоупругого полимера, например, гиалуроновой кислоты, или ее соли или сольвата, в воде. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит или состоит по существу приблизительно из 0,7 мМ CaCl (хлорид кальция), приблизительно 0,03 мМ MgCl (хлорид магния), приблизительно 1 мМ цитрата натрия, приблизительно 16 мМ декстрозы, приблизительно 145 мМ NaCl и вязкоупругого полимера, например, гиалуроновой кислоты, или ее соли или сольвата в количестве приблизительно от 0,005 до 5% вес/объем, в воде. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит или состоит по существу приблизительно из 0,7 мМ CaCl (хлорид кальция), приблизительно 0,03 мМ MgCl (хлорид магния), приблизительно 1 мМ цитрата натрия, приблизительно 16 мМ декстрозы, приблизительно 145 мМ NaCl, приблизительно 2 мМ KCl и вязкоупругого полимера, например, из гиалуроновой кислоты, или ее соли или сольвата в количестве приблизительно от 0,005 до 5% вес/объем, в воде. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит или состоит по существу приблизительно из 0,85% NaCl, 0,015% KCl, приблизительно 0,01% дигидрата CaCl (дигидрат хлорида кальция), приблизительно 0,006% MgCl гексагидрата (гексагидрат хлорида магния), приблизительно 0,035% дигидрата цитрата натрия и приблизительно 0,29% декстрозы в воде, и необязательно содержит приблизительно от 0,01 до 5% вес/объем вязкоупругого полимера, например, гиалуроновой кислоты, или ее соли или сольвата, например, такого как Healon Endocoat® в количестве от 0,01 до 0,05%. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит или состоит по существу из NaCl в количестве приблизительно от 0,68 до 1,02%, приблизительно от 0,008 до 0,012% дигидрата CaCl (дигидрат хлорида кальция), приблизительно от 0,0048 до 0,0072% MgCl гексагидрата (гексагидрат хлорида магния), приблизительно от 0,028 до 0,042% дигидрата цитрата натрия, и приблизительно от 0,23 до 0,35% декстрозы в воде, и необязательно содержит вязкоупругий полимер в количестве приблизительно от 0,01 до 5% вес/объем, например, гиалуроновую кислоту, или ее соль или сольват, такой как Healon Endocoat® в количестве от 0,01 до 0,05%. В некоторых вариантах осуществления раствор содержит или состоит по существу приблизительно из NaCl в количестве от 0,68 до 1,02%, приблизительно от 0,012 до 0,018% KCl, приблизительно от 0,008 до 0,012% дигидрата CaCl (дигидрат хлорида кальция), приблизительно от 0,0048 до 0,0072% гексагидрата MgCl (гексагидрат хлорида маг-

ния), приблизительно от 0,028 до 0,042% дигидрата цитрата натрия и приблизительно от 0,23 до 0,35% декстрозы в воде, и необязательно содержит вязкоупругий полимер в количестве приблизительно от 0,01 до 5% вес/объем, например гиалуроновую кислоту, или ее соль или сольват, такой как Healon Endocoat® в количестве от 0,01 до 0,05%.

Клеточные и тканевые композиции

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к композициям, содержащим популяцию клеток или ткань в растворе по изобретению. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток подходит для трансплантации субъекту. В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению изготовлены для введения субъекту, например, для введения посредством инъекции или орошения. Композиции по изобретению могут содержать популяцию клеток или ткань в растворе по изобретению, например, GS2, или по отдельности, или в комбинации с одним или несколькими дополнительными соединениями или веществами, например, с антиоксидантами, бактериостатическими веществами или с фармацевтически активным веществом. Описанные в качестве примера фармацевтические композиции содержат клетки или ткани в растворе GS2, как описано в примере 1 настоящего изобретения.

В качестве примера, клеточные или тканевые композиции в растворах по изобретению могут быть изготовлены таким образом, чтобы быть пригодными для применения в лечении пациента-человека, например, быть апиrogenными или по существу апиrogenными, стерильными, не содержать патогенов и иметь физиологический уровень pH и осмотического давления. В некоторых вариантах осуществления композиции по изобретению созданы для инъекций с определенной локализацией, например, в случае офтальмологических композиций для лечения заболеваний или нарушений сетчатки, для инъекций в стекловидное тело для доставки в область повреждения сетчатки или сосудистой оболочки глаза.

Композиции, представленные в настоящем изобретении, могут включать дополнительные терапевтические вещества, например иммунодепрессант, проангиогенное вещество, или питательные вещества или факторы роста, способствующие выживанию и/или имплантации клеток из композиции.

Объем композиции и количество клеток в композиции зависит от конкретного вида применения. Обычно для такого применения, как трансплантация клеток, желательно уменьшить вводимый объем в максимально возможной степени. Соответственно, может создаваться композиция таким образом, чтобы достичь минимального доставляемого объема. Можно использовать любую концентрацию клеток для инъекции, которая является эффективной и нетоксичной. Например, в некоторых вариантах осуществления рассмотрены композиции клеток для трансплантации, которые содержат по меньшей мере приблизительно 10^4 клеток/мл в растворе по изобретению, например, в растворе GS2. В некоторых вариантах осуществления в клеточную композицию для трансплантации входит доза клеток по меньшей мере приблизительно 10^3 клеток/мл, по меньшей мере приблизительно 10^4 , по меньшей мере приблизительно 10^5 , по меньшей мере приблизительно 10^6 , по меньшей мере приблизительно 10^7 , по меньшей мере приблизительно 10^8 , по меньшей мере приблизительно 10^9 , по меньшей мере приблизительно 10^{10} клеток/мл.

В некоторых вариантах осуществления число клеток и/или концентрацию клеток в композиции по изобретению можно определять путем подсчета жизнеспособных клеток и исключения нежизнеспособных клеток. Например, нежизнеспособные клетки можно выявлять по неспособности к витальному окрашиванию (например, красителем трипановый синий) или с помощью функционального анализа (например, по способности к адгезии с культуральным субстратом, по способности фагоцитозу и т.д.). Дополнительно, число клеток или концентрацию клеток желательного типа можно определять путем подсчета клеток, которые экспрессируют один или несколько клеточных маркеров, характерных для этого клеточного типа, и/или путем исключения клеток, которые экспрессируют один или несколько маркеров, показательных для типа клеток, который не является желательным.

В некоторых вариантах осуществления рассмотрена клеточная композиция по изобретению, которая содержит по меньшей мере приблизительно 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 или 9000 клеток. В некоторых вариантах осуществления клеточная композиция может содержать по меньшей мере приблизительно 1×10^4 клеток, 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} или 9×10^{10} клеток. В некоторых вариантах осуществления клеточная композиция может содержать по меньшей мере приблизительно от 1×10^2 до 1×10^3 , от 1×10^2 до 1×10^4 , от 1×10^4 до 1×10^5 или от 1×10^3 до 1×10^6 клеток. В некоторых вариантах осуществления клеточная композиция может содержать по меньшей мере приблизительно 10000, 20000, 25000, 50000, 75000, 100000, 125000, 150000, 175000, 180000, 185000, 190000 или 200000 клеток, например, клеточная композиция может содержать по меньшей мере приблизительно от 20000 до 200000 клеток в объеме приблизительно от 50 до 200 мкл раствора по изобретению, например в растворе GS2.

В некоторых вариантах осуществления популяция клеток подходит для трансплантации в глаз субъекта. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток, подходящих для трансплантации в глаз субъекта, включает клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), клетки-предшественники ПЭС,

пигментированные эпителиальные клетки радужной оболочки (клетки IPE) и другие связанные со зрением нервные клетки, такие как связывающие нейроны (например, нейроны "реле" внутреннего ядерного слоя (INL)) и амакринные клетки, клетки сетчатки, палочки, колбочки и клетки роговицы, нервные клетки, фоторецепторные клетки и мезенхимальные клетки, например, мезенхимальные стволовые клетки (МСК).

В некоторых вариантах осуществления композиция по изобретению содержит популяцию клеток ПЭС в растворе по изобретению, например, в среде GS2, описанной в примере 1. Подходящие клетки ПЭС могут дифференцироваться из плюрипотентных стволовых клеток, таких как эмбриональные стволовые клетки человека, или из индуцированных плюрипотентных клеток (iPS), и могут иметь молекулярные отличия от эмбриональных стволовых клеток, клеток ПЭС, полученных от взрослых и клеток ПЭС фетального происхождения. В некоторых вариантах осуществления используются клетки ПЭС, полученные от взрослых и клетки ПЭС фетального происхождения.

В некоторых вариантах осуществления, в случае использования клеток ПЭС, полученных из эмбриональных стволовых клеток (ЭС клетки) композиция не содержит обнаруживаемое количество остаточных ЭС клеток, то есть, композиции по изобретению не несут неприемлемый риск загрязнения культур и композиций клеток ПЭС.

В некоторых вариантах осуществления композиция, содержащая популяцию подходящих для трансплантации в глаз субъекта клеток, подходит для инъекции в глаз субъекта. В некоторых вариантах осуществления такую композицию можно применять для лечения дегенеративных заболеваний или патологий сетчатки, включающих без ограничения отслойку сетчатки, дисплазию сетчатки, ангиоидные полосы, миопическую макулярную дегенерацию или атрофию сетчатки, или для лечения некоторых связанных с влиянием на зрение болезней, которые приводят к повреждению фоторецепторов и слепоте, таких как хороидеремия, диабетическая ретинопатия, макулярная дегенерация (например, связанная с возрастом макулярная дегенерация), пигментный ретинит и болезнь Штаргардта (*fundus flavimaculatus*).

Клетки ПЭС могут представлять собой стабильные, терминально дифференцированные клетки ПЭС, которые не де-дифференцируются в клетки, не относящиеся к типу клеток ПЭС. Описанные в изобретении клетки ПЭС могут представлять собой функциональные клетки ПЭС, отличающиеся возможностью интеграции в сетчатку при корнеальном, субретинальном или другом пути введения в организм человека или животного.

Клетки ПЭС могут экспрессировать маркеры клеток ПЭС. Например, уровень экспрессии таких маркеров, как RPE65, Pax2, PAX6, тирозиназы, бестрофина, PEDF, CRALBP, Otx2 и/или MITF, может быть эквивалентен их уровням экспрессии в природных клетках ПЭС. Уровень зрелости клеток ПЭС можно оценивать путем измерения экспрессии по меньшей мере одного из маркеров Pax2, PAX6 и тирозиназы, или их соответствующих уровней экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления описанные в изобретении клетки ПЭС, содержащиеся в композиции по изобретению, можно идентифицировать и оценивать по степени пигментации клетки. Изменения пигментации можно контролировать по плотности, при которой клетки ПЭС культивируются и сохраняются, и продолжительности содержания клеток ПЭС в культуре. Дифференцированные клетки ПЭС, которые быстро делятся, имеют более светлую пигментацию. В противоположность этому, более медленно делящиеся или не делящиеся клетки ПЭС принимают свою характерную полигональную или шестиугольную форму и увеличивают уровень пигментации путем накопления меланина и липофусцина. Например, в культуре клеток ПЭС в состоянии покоя (например, из-за конfluence) обычно с течением времени увеличивается уровень пигментации. Таким образом, накопление пигмента служит индикатором дифференциации клеток ПЭС, и увеличенная пигментация, связанная с плотностью клеток, служит показателем зрелости ПЭС. Например, зрелые клетки ПЭС можно пересевать при более низкой плотности, таким образом пигментация уменьшается. В этом плане зрелые клетки ПЭС можно культивировать для получения менее зрелых клеток ПЭС. Такие как ПЭС с экспрессией маркеров дифференциации ПЭС.

Например, в некоторых вариантах осуществления рассмотрена композиция, которая содержит клетки ПЭС со средним содержанием меланина, составляющим менее 8 пг/ клетку, менее 7 пг/клетку, менее 6 пг/клетку или менее 5 пг/клетку, например, среднее содержание меланина находится в диапазоне от 0,1 до 8 пг/клетку, от 0,1 до 7 пг/клетку, от 0,1 до 6 пг/клетку, от 0,1 до 5 пг/клетку, от 0,1 до 4 пг/клетку, от 0,1 до 3 пг/клетку, от 0,1 до 2 пг/клетку, от 0,1 до 1 пг/клетку, от 1 до 8 пг/клетку, от 1 до 7 пг/клетку, от 1 до 6 пг/клетку, от 1 до 5 пг/клетку, от 1 до 4 пг/клетку, от 1 до 3 пг/клетку, от 1 до 2 пг/клетку, от 2 до 6 пг/клетку, от 3 до 5 пг/клетку или от 4 до 5 пг/клетку, например, от 4,2 до 4,8 пг/клетку или от 0,1 до 5 пг/клетку. В другом примере среднее содержание меланина может быть меньше, чем 5 пг/клетку, например, быть в диапазоне от 0,1 до 5 пг/клетку, от 0,2 до 5 пг/клетку, от 0,5 до 5 пг/клетку, от 1 до 5 пг/клетку, от 2 до 5 пг/клетку, от 3 до 5 пг/клетку, от 4 до 5 пг/клетку или от 4,5 до 5 пг/клетку.

В некоторых вариантах осуществления рассмотрена композиция, содержащая клетки ПЭС в растворе по изобретению, например GS2, и в указанной композиции клетки ПЭС сохраняют свой фенотип после трансплантации клеток ПЭС субъекту, например, после введения композиции в глаз субъекта.

Клетки ПЭС могут сохранять свой фенотип на протяжении всей жизни реципиента после трансплантации. Так, например, клетки ПЭС могут сохранять свой фенотип на протяжении по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дней после трансплантации. Кроме того, клетки ПЭС может сохранять свой фенотип после трансплантации на протяжении по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 недель. Клетки ПЭС могут сохранять свой фенотип после трансплантации в течение по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев. Клетки ПЭС могут сохранять свой фенотип после трансплантации на протяжении по меньшей мере приблизительно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 лет или дольше.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к композиции клеток ПЭС в растворе по изобретению, и указанная композиция предназначена для инъекции в глаз субъекта. В таком варианте осуществления композиция представляет собой фармацевтически приемлемую офтальмологическую композицию для внутриглазной инъекции. Например, если композицию вводят путем инъекции в стекловидное тело, при создании этой композиции можно предусмотреть введение минимального объема. Можно осуществлять инъекцию при любой концентрации, которая является эффективной и нетоксичной. Композиция клеток ПЭС для лечения пациента может быть изготовлена с дозой клеток по меньшей мере приблизительно 10^4 клеток/мл раствора по изобретению. Доза клеток ПЭС в композиции для лечения пациента составляет по меньшей мере приблизительно 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 или 10^{10} клеток ПЭС/мл.

Композиции клеток ПЭС, описанные в изобретении, могут содержать по меньшей мере приблизительно 1000 клеток ПЭС, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000 или 9000 клеток ПЭС в растворе по изобретению, например, в растворе GS2, как описано в примере 1. Фармацевтические композиции клеток ПЭС могут содержать по меньшей мере приблизительно 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 , 9×10^4 , 1×10^5 , 2×10^5 , 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 , 6×10^5 , 7×10^5 , 8×10^5 , 9×10^5 , 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 9×10^6 , 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 9×10^7 , 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} или 9×10^{10} клеток ПЭС. Фармацевтические композиции клеток ПЭС могут содержать по меньшей мере приблизительно от 1×10^2 до 1×10^3 , от 1×10^2 до 1×10^4 , от 1×10^4 до 1×10^5 или от 1×10^3 до 1×10^6 клеток. Фармацевтические композиции клеток ПЭС могут содержать по меньшей мере приблизительно 10000, 20000, 25000, 50000, 75000, 100000, 125000, 150000, 175000, 180000, 185000, 190000 или 200000 клеток ПЭС. Например, фармацевтическая композиция клеток ПЭС может содержать по меньшей мере приблизительно от 20000 до 200000 клеток ПЭС в объеме по меньшей мере, приблизительно от 50 до 200 мкл. Кроме того, фармацевтическая композиция клеток ПЭС может содержать приблизительно 50000 клеток ПЭС в объеме 150 мкл, приблизительно 200000 клеток ПЭС в объеме 150 мкл или по меньшей мере приблизительно 180000 клеток ПЭС в объеме по меньшей мере приблизительно 150 мкл.

Клетки ПЭС могут быть получены в виде композиции по изобретению для доставки в фармацевтически приемлемом офтальмологическом носителе таким образом, чтобы композиция сохраняла контакт с поверхностью глаза в течение достаточного периода времени, позволяющего клеткам проникнуть в пораженные участки глаза, такие как передняя камера, задняя камера, стекловидное тело, водянистая влага, стекловидная влага, роговица, радужная оболочка/цилиарное тело, хрусталик, сосудистая оболочка, сетчатка, склеры, супрахориоидальное пространство, конъюнктива, подконъюнктивальное пространство, эписклеральное пространство, интракорнеальное пространство, эпикорнеальное пространство, pars plana, послеоперационные аваскулярные области или макулы.

В некоторых вариантах осуществления представлена клеточная композиция по изобретению, в которой клетки ПЭС сгруппированы в клеточные пласты. Например, клеточный пласт, содержащий клетки ПЭС, может быть получен путем культивирования клеток ПЭС на субстрате, с которого можно, например, с помощью термочувствительного полимера, снять пласт интактных клеток. Например, на поверхности с нанесенным термочувствительным поли(Н-изопропилакриламидом) (PNIPAAm) происходит адгезия и пролиферация клеток при температуре культивирования. Затем при температуре сдвига характеристики поверхности изменяются, что позволяет отделить пласт культивируемых клеток (например, путем охлаждения до температуры ниже нижней критической температуры раствора (НКТП)) (см. публикации da Silva et al., Trends Biotechnol. 2007 Dec; 25 (12): 577-83; Hsiue et al., Transplantation. 2006 Feb 15;81(3): 473-6; Ide, T. et al. (2006); Biomaterials 27, 607-614, Sumide, T. et al. (2005), FASEB J. 20, 392-394; Nishida, K. et al. (2004), Transplantation 77, 379-385 и Nishida, K. et al. (2004), N. Engl. J. Med. 351, 1187-1196, каждая из которых включена в настоящее изобретение путем ссылки в полном объеме). Клеточный пласт посредством адгезии может прикрепляться к субстрату, подходящему для трансплантации, например, к субстрату, который может растворяться *in vivo* при пересадке в организм хозяина этого клеточного пласта, например, подготовленного путем культивирования клеток на субстрате, подходящем для трансплантации, или клетки отделяют от другого субстрата (например, термочувствительного полимера) на субстрат, подходящий для трансплантации. В качестве примера, потенциально подходящий для трансплантации субстрат может содержать желатин (см. Hsiue et al, выше). Альтернативные субстраты,

которые могут подходить для трансплантации, включают матрицы на фибриновой основе и другие. Клеточный пласт можно использовать при производстве лекарственного средства для профилактики или лечения дегенеративного заболевания сетчатки. Пласт клеток ПЭС можно сделать в виде клеточной или тканевой композиции для введения в глаз нуждающегося в этом субъекта, путем контактирования с раствором по изобретению, например, с раствором GS2. В некоторых вариантах осуществления клеточный пласт можно вводить в глаз нуждающегося в этом субъекта с помощью субфовеальной мембранэктомии с трансплантацией пласта клеток ПЭС, или клеточный пласт можно использовать для изготовления лекарственного средства для трансплантации после субфовеальной мембранэктомии.

Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения, объем композиции зависит от таких факторов, как способ введения, количество вводимых клеток, возраст и вес пациента, и тип и степень тяжесть заболевания, подлежащего лечению. Так, например, при введении путем инъекций объем фармацевтических композиций клеток ПЭС по изобретению может составлять приблизительно 1 мл, 1,5, 2, 2,5, 3, 4 или 5 мл. Объем может составлять приблизительно 1-2 мл. Так, например, при введении путем инъекций объем фармацевтической композиции клеток ПЭС по изобретению может составлять приблизительно 1 мкл, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 100, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199 или 200 (мкл). Например, объем композиции по изобретению может составлять приблизительно от 10 до 50, от 20 до 50, от 25 до 50 или от 1 до 200 мкл. Объем композиции по изобретению может составлять приблизительно 10, 20, 30, 40, 50, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, или 200 мкл или больше.

В некоторых вариантах осуществления композиция по изобретению может содержать приблизительно 1×10^3 , 2×10^3 , 3×10^3 , 4×10^3 , 5×10^3 , 6×10^3 , 7×10^3 , 8×10^3 , 9×10^3 , 1×10^4 , 2×10^4 , 3×10^4 , 4×10^4 , 5×10^4 , 6×10^4 , 7×10^4 , 8×10^4 или 9×10^4 клеток на мкл. Например, в некоторых вариантах осуществления композиция может содержать 2000 клеток ПЭС на мкл, например, 100000 клеток ПЭС на 50 мкл или 18 0000 клеток ПЭС на 90 мкл.

В некоторых вариантах осуществления композицию помещают в холодильник. В некоторых вариантах осуществления композиция хранится в холодильнике при температуре приблизительно от 2 до 8°C.

В некоторых вариантах осуществления композиция способствует выживанию клеток в клеточной популяции при хранении композиции. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 70% клеток в клеточной популяции сохраняют жизнеспособность после 48 ч хранения композиции при температуре от 2 до 8°C. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 80% клеток в клеточной популяции являются жизнеспособными после 48 ч хранения композиции при температуре от 2 до 8°C. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 90% клеток в клеточной популяции являются жизнеспособными после 48 ч хранения композиции при 2-8°C. В некоторых вариантах осуществления композиция способствует сохранению эффективности культивирования клеточной популяции при хранении композиции. В некоторых вариантах осуществления через 48 ч хранения композиции при температуре от 2 до 8°C эффективность культивирования клеточной популяции составляет по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% от ее исходной эффективности культивирования, при этом исходная эффективность культивирования означает эффективность культивирования клеточной популяции в начале периода хранения. В некоторых вариантах осуществления композиция находится внутри контейнера для хранения. В некоторых вариантах осуществления композиция находится в шприце.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям клеток и тканей в растворе по изобретению. Такие композиции подходят для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция состоит по существу из клеток, клеточной популяции или ткани, и раствора по изобретению. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит один или несколько фармацевтически активных ингредиентов, например, консервант, антиоксидант, поглотитель свободных радикалов, иммунодепрессант, проангиогенный фактор, антиангиогенный фактор, гормон роста, или питательное вещество для клетки или субстрат, способствующий росту клеток, их выживаемости и имплантации.

Также в объем настоящего изобретения входят фармацевтические упаковки и/или наборы. Фармацевтические упаковки и/или наборы по изобретению могут включать клеточную или тканевую композицию по изобретению, и контейнер (например, флакон, ампула, бутылка, шприц, и/или охлаждающий пакет или другой подходящий контейнер). В некоторых вариантах осуществления наборы по изобретению могут необязательно дополнительно включать второй контейнер, содержащий раствор, который исполь-

зуются для получения композиции для разбавления, промывки и/или разведения клеток или тканей композиции. В некоторых вариантах осуществления содержимое предназначенного для композиции контейнера по изобретению объединяют с содержимым емкости для растворителя, чтобы получить по меньшей мере одну единичную лекарственную форму.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам получения композиции по изобретению, например, композиции, содержащей популяцию клеток в растворе по изобретению, и указанный способ включает контактирование популяции клеток с раствором. В некоторых вариантах осуществления способ включает контактирование популяции криоконсервированных клеток или осажденных центрифугированием клеток с раствором, и таким образом осуществляют разведение клеток.

Например, в некоторых аспектах настоящего изобретения рассмотрены способы, включающие (a) контактирование популяции клеток с раствором по изобретению, в результате чего создается клеточная композиция. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает (b) хранение клеточной композиции (a) по меньшей мере в течение 4, по меньшей мере 6, по меньшей мере 12, по меньшей мере 18, по меньшей мере 24, по меньшей мере 36, по меньшей мере 48, по меньшей мере 60, по меньшей мере 72 или по меньшей мере 96 ч. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает (c) введение клеточной композиции (a) субъекту после периода хранения (b). В некоторых вариантах осуществления введение (c) включает инъекцию клеток в глаз субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает определение жизнеспособности клеток в клеточной композиции (a) после периода хранения (b). В некоторых вариантах осуществления способ включает охлаждение клеточной композиции (a) в течение периода хранения на этапе (b). В некоторых вариантах осуществления охлаждение включает хранение клеточной композиции при температуре от 2 до 8°C. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно содержит транспортировку полученной на этапе (a) композиции в место, отличное от места изготовления композиции, в течение периода хранения (b). В некоторых вариантах осуществления транспортировка включает транспортировку композиции в клинику или операционную, где осуществляется введение (c).

Примеры применений и способов

Описанные в настоящем изобретении растворы можно использовать для различных медицинских применений. Такие применения включают клиническую ирригацию, разведение или создание клеточной композиции, например, после осаждения или криоконсервации клеток, а также создание клеточной композиции, например, для клинического применения, включая без ограничения хранение и транспортировку клеток перед введением субъекту, и/или применение в качестве среды-носителя для введения субъекту клеток, клеточных монослоев или ткани.

Например, в некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении раствор можно использовать в качестве раствора для разведения клеток. Используемое в изобретении понятие "разведение клеток" относится к механизму контактирования клеточной популяции с раствором, например, с раствором по изобретению, в целях получения раствора, содержащего популяцию клеток. В некоторых вариантах осуществления разведение популяции клеток включает создание раствора, содержащего популяцию клеток из клеточного осадка, например, из осадка клеток, полученных после этапа центрифугирования путем удаления супернатанта. В некоторых вариантах осуществления разведение популяции клеток раствором по изобретению включает разбавление или замену любой среды, в которой клетки были первоначально суспендированы, для получения популяции клеток в среде, которая состоит или по существу состоит из раствора по изобретению. В некоторых таких вариантах осуществления клеточную популяцию, суспендированную в отличной от раствора по изобретению среде, можно промывать один или несколько раз раствором по изобретению. В некоторых вариантах осуществления этап промывки может включать контактирование клетки с раствором по изобретению, осаждение клеток, например, путем центрифугирования, удаление супернатанта и разведение клеточного осадка с помощью раствора. В зависимости от объема используемого раствора и объема клеточного осадка, исходную среду, по существу, можно заменять раствором после однократного цикла промывки - разведения, или после 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 таких циклов.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения растворы по изобретению можно использовать для создания клеточных и тканевых композиций. Используемый в изобретении термин "композиция" применительно к клеткам и тканям относится к контактированию клетки, популяции клеток или ткани с объемом раствора по изобретению для получения клеточной или тканевой композиции, которая подходит для медицинского применения, например, для введения субъекту. Растворы по изобретению широко совместимы с разными типами клеток, клеточных популяций и тканей, включающих без ограничения взрослые стволовые клетки и клетки-предшественники, дифференцированные клетки, и содержащие такие клетки популяции и ткани. В некоторых вариантах осуществления клетка, клеточная популяция или ткань, находящаяся в композиции с раствором по изобретению, представляет собой терапевтическую клетку, клеточную популяцию или ткань, например, для применения в области регенеративной медицины. Так, например, в некоторых вариантах осуществления клетка, клеточная популяция или ткань, находящаяся в композиции с раствором по изобретению, может включать популяции клеток, которые могут заменять утраченные или дегенеративные клетки у субъекта, или восстанавливать или

заменять у субъекта ткань с повреждением или дисфункцией. Например, в некоторых вариантах осуществления клетка, клеточная популяция или ткань, находящаяся в композиции с раствором по изобретению, может включать плюрипотентную стволовую или прогениторную клетку, или функционально дифференцированную клетку или популяцию или ткань, которые содержат такие клетки или комбинацию таких клеток. В некоторых вариантах осуществления растворы по изобретению используются для создания композиций таких клеток, как клетки ПЭС, фоторецепторные клетки, мезенхимальные стволовые клетки, гемопоэтические стволовые клетки, нервные или нейрональные стволовые или прогениторные клетки, глиальные стволовые или прогениторные клетки, панкреатические стволовые или прогениторные клетки, бета-клетки, кератиноциты, хондроциты, остеобласты, остеокласты, или для создания композиций с популяцией или тканью, содержащими или состоящими по существу из таких клеток, как например, монослой клеток ПЭС, панкреатический островок или кожный трансплантат. В некоторых вариантах осуществления клеточную композицию в растворе по изобретению можно хранить до момента медицинского применения (например, до введения субъекту), и/или ее можно транспортировать в лечебное учреждение и вводить субъекту, как в соответствии с изобретением, так и только с минимальной обработкой, такой как разбавление композиции до желаемого объема или до желаемой концентрации клеток.

В некоторых вариантах осуществления растворы по изобретению являются полезными для хранения клеток или тканей. Используемый в изобретении термин "хранение" применительно к клеткам и тканям относится к периоду времени между созданием композиции клетки (клеток) или ткани (тканей) в растворе по изобретению, и к дополнительному этапу обработки или к медицинскому применению клетки (клеток) или ткани (тканей). В отличие от существующих растворов предшествующего уровня, растворы по изобретению способствуют хранению клеток и тканей разных типов, в том числе легко повреждаемых клеток и тканей, таких как клетки ПЭС, фоторецепторные клетки и мезенхимальные стволовые клетки (МСК), в течение длительного периода времени, например по меньшей мере 4 ч по меньшей мере 6, по меньшей мере 8, по меньшей мере 12, по меньшей мере 18, по меньшей мере 24, по меньшей мере 30, по меньшей мере 36, по меньшей мере 48, по меньшей мере 60 ч или по меньшей мере в течение 72 ч при минимальном снижении жизнеспособности клеток, эффективности повторного культивирования или репопуляционной способности. Например, в некоторых вариантах осуществления хранение клетки, клеточной популяции или ткани, например клеток ПЭС, фоторецепторных клеток или МСК в растворе по изобретению в течение периода по меньшей мере 4, по меньшей мере 6, по меньшей мере 8, по меньшей мере 12, по меньшей мере 18, по меньшей мере 24, по меньшей мере 30, по меньшей мере 36, по меньшей мере 48, по меньшей мере 60 или по меньшей мере в течение 72 ч приводит к тому, что показатели жизнеспособности клеток, эффективности повторного культивирования или репопуляционной способности составляют по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% от исходных показателей жизнеспособности клеток, эффективности повторного культивирования или репопуляционной способности в начале периода хранения. В некоторых вариантах осуществления период времени хранения, например период времени между созданием клеточной или тканевой композиции и ее медицинским применением, не превышает 4, 6, 8, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60 или 72 ч. Обычно клеточную или тканевую композицию в растворе по изобретению помещают в холодильник для хранения, например, при температуре в диапазоне от 2 до 8°C. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления клетки и ткани сохраняются в растворе по изобретению при температурах ниже температуры окружающей среды, например, при температуре от 2 до 8°C. Вместе с тем, в некоторых вариантах осуществления рассматривается хранение при более высоких температурах, например при температуре от 8 до 16°C, от 16 до 22°C или при температуре окружающей среды (обычно приблизительно 25°C).

Растворы по изобретению также могут быть использованы для транспортировки клеток, клеточных популяций и тканей после изготовления композиций этих клеток, клеточных популяций и тканей в лечебном учреждении. Растворы по изобретению способствуют выживаемости клеток и во время транспортировки минимизируют метаболический и физический стресс, в том числе усилие сдвига. Транспортировка клеток или тканей обычно осуществляется в пределах срока хранения клеток или тканей, и также в подходящих условиях для хранения, как описано выше. В вариантах осуществления, в которых композиции клеток или тканей в растворе по изобретению перевозятся в условиях охлаждения, например, при температуре ниже температуры окружающей среды, использование мобильного холодильного оборудования является предпочтительным для транспортировки. Такое оборудование включает без ограничения изотермические транспортные или грузовые контейнеры, пакеты с жидким льдом, охлаждающие гели, охлаждающие контейнеры и мобильные устройства для охлаждения. Некоторые примеры подходящих способов транспортировки, контейнеров и устройств для транспортировки с охлаждением описаны более подробно в другом разделе настоящего изобретения, и специалистам в данной области известно о дополнительных подходящих способах, контейнерах и устройствах, относящихся к настоящему изобретению.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения нуждающегося в этом субъекта путем введения субъекту эффективного количества медицинского раствора или клеточной или тканевой композиции по изобретению. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется или

диагностировано заболевание или расстройство, которое можно лечить путем введения клеток, клеточной популяции или ткани, например, в виде клеточной или тканевой композиции по изобретению. В некоторых вариантах осуществления вводимая субъекту композиция включает популяцию клеток, и размер этой популяции эффективен для улучшения по меньшей мере одного симптома заболевания или расстройства у субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект подвергается хирургической операции, и раствор или композиция по изобретению применяется для орошения операционного поля. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает контроль по меньшей мере одного симптома заболевания у субъекта.

Согласно настоящему изобретению понятия "лечение", "лечить" и "подвергаться лечению" относятся к медицинскому вмешательству, направленному на возвращение в прежнее состояние, облегчение, задержку возникновения или прекращение заболевания или расстройства, или одного или нескольких симптомов этого заболевания или расстройства. В некоторых вариантах осуществления лечение можно проводить после развития одного или нескольких симптомов и/или после диагностики заболевания. В других вариантах осуществления лечение можно проводить при отсутствии симптомов, например, для предотвращения или задержки возникновения симптома, или торможения возникновения или прогрессирования заболевания. Например, можно подвергать восприимчивого человека лечению до появления симптомов (например, с учетом симптомов в анамнезе и/или с учетом генетических или других факторов восприимчивости). Лечение также можно продолжать после купирования симптомов, например, для профилактики или задержки их повторения.

Используемое в изобретении понятие "субъект" относится к отдельному организму, например к отдельному млекопитающему. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, не являющееся человеком. В некоторых вариантах осуществления субъектом является примат нечеловеческого происхождения. В некоторых вариантах осуществления субъектом является грызун. В некоторых вариантах осуществления субъектом является овца, коза, крупный рогатый скот, кошка или собака. В некоторых вариантах осуществления субъектом является лабораторное животное. В некоторых вариантах осуществления субъектом является генноинженерный субъект, например, генноинженерный субъект нечеловеческого происхождения. Субъект может быть любого пола и на любой стадии развития.

Используемое в изобретении понятие "эффективное количество" относится к количеству биологически активного вещества, которое является достаточным для индукции желаемой биологической реакции. Например, в некоторых вариантах осуществления эффективное количество клеточной или тканевой композиции по изобретению может относиться к такому количеству композиции, которое включает определенное количество клеток или количество ткани, являющееся достаточным для улучшения связанных с заболеванием или расстройством симптомов, например, достаточным для улучшения зрения у субъекта с заболеванием или патологией сетчатки. Специалисту в данной области будет очевидно, что эффективное количество раствора или композиции по изобретению может варьироваться в зависимости от различных факторов, таких как желаемая биологическая реакция, подлежащее лечению конкретное заболевание, подлежащий облегчению конкретный симптом, тип целевой клетки или ткани и возраст, пол и общее состояние здоровья субъекта.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам, включающим введение нуждающемуся в этом субъекту раствора или композиции по изобретению. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение раствора или композиции в глаз пациента. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение композиции субъекту после хранения этой композиции в течение по меньшей мере 4 ч, по меньшей мере 6, по меньшей мере 12, по меньшей мере 24, по меньшей мере 36 или по меньшей мере 48 ч. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется или диагностировано заболевание сетчатки. В некоторых вариантах осуществления заболевание сетчатки представляет собой палочковую или колбочковую дистрофию, дегенерацию сетчатки, пигментный ретинит, диабетическую ретинопатию, макулярную дегенерацию, амавроз Лебера или болезнь Штаргардта. В некоторых вариантах осуществления композиция включает популяцию клеток, и размер этой популяции эффективен для улучшения по меньшей мере одного симптома заболевания сетчатки у субъекта. В некоторых вариантах осуществления популяция клеток включает клетки ПЭС, фоторецепторные клетки или мезенхимальные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает контроль по меньшей мере одного симптома заболевания сетчатки у субъекта.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способам лечения заболевания сетчатки, и указанные способы включают введение эффективного количества клеточной композиции по изобретению в глаз субъекта с заболеванием сетчатки. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется или диагностировано заболевание сетчатки. В некоторых вариантах осуществления заболевание сетчатки представляет собой палочковую или колбочковую дистрофию, дегенерацию сетчатки, пигментный ретинит, диабетическую ретинопатию, макулярную дегенерацию, врожденный амавроз Лебера или болезнь Штаргардта. В некоторых вариантах осуществления композиция включает популяцию клеток, и размер этой популяции эффективен для улучшения по меньшей мере одного симптома заболевания сетчатки у субъекта. В некоторых вариантах осуществления клеточная популяция включает клетки ПЭС, фоторе-

цепторные клетки или мезенхимальные стволовые клетки. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает мониторинг по меньшей мере одного симптома заболевания сетчатки у субъекта.

Используемое понятие "мониторинг симптома заболевания" относится к оценке степени тяжести симптома заболевания в нескольких точках времени в течение определенного периода. Например, степень тяжести симптома у субъекта можно оценивать до начала лечения субъекта, и затем повторно после лечения по истечении определенного периода времени. В некоторых вариантах осуществления мониторинг может включать оценку тяжести симптомов по истечении периода времени, которое является или предполагается достаточным для достижения результатов лечения в виде измеримого улучшения симптомов у аналогичного субъекта (например, у субъекта того же вида, пола, возраста, имеющего сходное общее состояние здоровья и т.д.). В некоторых вариантах осуществления мониторинг может включать оценку тяжести симптома через регулярные промежутки времени. Например, можно проводить оценку исходного состояния зрения у пациентов, проходящих лечение заболеваний сетчатки. Специалисту в данной области будет очевидно, что эта оценка является иллюстративной, и что можно проводить другие исследования вместо или в дополнение к оценке зрения субъекта. Такие оценки могут включать определение уровня дегенерации сетчатки, абляции сетчатки, дегенерации желтого пятна и так далее. После лечения субъекта путем введения клеточной композиции по изобретению, например, композиции, содержащей эффективное количество клеток ПЭС в среде GS2 по изобретению, зрение субъекта можно оценивать повторно, в идеале по истечении некоторого периода времени после операции, чтобы дать возможность введенным клеткам имплантироваться и начать функционировать, например, приблизительно через неделю, две недели, три недели, приблизительно через месяц, приблизительно два месяца, приблизительно три месяца, приблизительно четыре месяца, приблизительно пять месяцев, приблизительно шесть месяцев или приблизительно через год. Результат послеоперационной оценки можно регистрировать и сравнивать с предоперационной оценкой, чтобы установить наличие улучшения симптома, например, восстановление уровня зрения у субъекта. Оценка может проводиться однократно или повторять несколько раз, чтобы определить динамику облегчения симптомов или факт достижения конечного результата. В зависимости от результатов послеоперационного мониторинга, можно планировать дополнительные хирургические манипуляции для (дополнительного) улучшения оцениваемого симптома. Если улучшений после первоначальной операции не наблюдается, дозу клеточной или тканевой композиции можно увеличивать для более эффективного облегчения симптома.

Способ лечения заболевания сетчатки может включать введение единственной дозы эффективного количества композиции клеток ПЭС по изобретению, например, композиции, содержащей эффективное количество клеток ПЭС в среде GS2 по изобретению. Также способы лечения по изобретению могут включать курс лечения с многократным введением клеток ПЭС в течение определенного периода, при этом каждая доза клеток является эффективной для облегчения симптомов заболевания, или эффективное количество достигается с помощью кумулятивного эффекта от многократного введения дозы. Примерные курсы лечения могут включать введение один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в три месяца, один раз в полгода или один раз в год. В качестве альтернативы, лечение может протекать по фазам, когда вначале применяют многократное введение дозы (например, ежедневное введение в течение первой недели), а затем требуются меньшие дозы и менее частое введение.

Если композицию клеток ПЭС по изобретению, например, композицию, содержащую клетки ПЭС в растворе GS2, вводят путем внутриглазной инъекции, композицию клеток ПЭС можно вводить один раз или несколько раз периодически в течение всей жизни пациента. Например, композицию клеток ПЭС можно вводить один раз в год, один раз каждые 6-12 месяцев, один раз каждые 3-6 месяцев, один раз каждые 1-3 месяца или один раз каждые 1-4 недели. В качестве альтернативы, при определенных состояниях или расстройствах может быть желательным более частое введение. Если введение осуществляют с помощью имплантата или устройства, клетки ПЭС можно вводить однократно, или один или несколько раз периодически в течение жизни пациента, когда это необходимо для конкретного пациента и при конкретном расстройстве или состоянии, подлежащем лечению. Аналогично предполагается, что режим лечения можно менять с течением времени. Например, более частое введение может потребоваться в начале лечения (например, ежедневное или еженедельное введение). Со временем, при улучшении состояния пациента может потребоваться более редкое введение или дальнейшее лечение может даже не требоваться.

Способы по изобретению могут дополнительно включать этап мониторинга эффективности лечения или профилактики путем измерения у субъекта показателей электроретинограммы, оптометрической оценки порога остроты зрения или порога яркости. Способ может также включать контроль эффективности лечения или профилактики путем мониторинга иммуногенности клеток или клеточной миграции в глазе.

Клетки ПЭС или содержащие клетки ПЭС композиции, и медицинский раствор по изобретению, например, раствор GS2, можно использовать в производстве лекарственного средства для лечения дегенеративных заболеваний сетчатки. Изобретение также относится к применению содержащих клетки ПЭС композиций по изобретению для лечения слепоты. Например, содержащие человеческие клетки ПЭС

композиции можно применять для лечения дегенеративных заболеваний сетчатки, обусловленных некоторыми влияющими на зрение заболеваниями, которые приводят к повреждению фоторецепторов и слепоте, такими, как диабетическая ретинопатия, макулярная дегенерация (в том числе возрастная макулярная дегенерация, например, влажная возрастная макулярная дегенерация и сухая возрастная макулярная дегенерация), пигментный ретинит и болезнь Штаргардта (*fundus flavimaculatus*). Композиция может содержать по меньшей мере приблизительно от 5000 до 500000 клеток ПЭС (например, 10000 клеток ПЭС), которые могут быть введены в сетчатку для лечения дегенеративных заболеваний сетчатки, обусловленных некоторыми влияющими на зрение заболеваниями, которые приводят к повреждению фоторецепторов и слепоте, такими как диабетическая ретинопатия, макулярная дегенерация (в том числе возрастная макулярная дегенерация), пигментный ретинит и болезнь Штаргардта (*fundus flavimaculatus*).

Используемые в композициях для лечения субъектов клетки, например, клетки ПЭС, которые используются в композициях клеток ПЭС по изобретению, могут быть человеческими клетками. Человеческие клетки могут быть использованы у больных людей, а также у больных животных или на животных моделях. Например, можно проводить испытания человеческих клеток на моделях дегенеративной патологии сетчатки у мышей, крыс, кошек, собак или приматов, отличных от человека. Дополнительно, человеческие клетки могут быть использованы с терапевтической целью для лечения нуждающихся в этом животных, например, в ветеринарной медицине.

В некоторых вариантах осуществления способ лечения заболевания сетчатки может дополнительно включать введение иммуносупрессивного препарата близко по времени к введению медицинской композиции по изобретению. Возможные для использования иммуносупрессивные препараты включают без ограничения поликлональные антитела против лимфоцитарного глобулина (ALG), поликлональные антитела против тимоцитарного глобулина (ATG), азатиоприн, Бализксимаб® (антитело антагонист рецептора IL-2R α), циклоспорин (циклоспорин А), Даклизумаб® (антитело - антагонист рецептора IL-2RIL-2R α), эверолимус, микофеноловую кислоту, Ритуксимаб® (антитело против CD20), сиролимус и циклоспорин. Эти иммуносупрессоры можно применять в дозе по меньшей мере приблизительно 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг. В случае применения иммуносупрессоров их можно вводить системно или локально, и можно их вводить перед введением клеток ПЭС, одновременно или после введения клеток ПЭС. Иммуносупрессивная терапия может продолжаться в течение нескольких недель, месяцев, лет или в течение неопределенного срока времени после введения клеток ПЭС. Например, пациенту можно вводить циклоспорин в дозе 5 мг/кг в течение 6 недель после введения клеток ПЭС.

В некоторых аспектах растворы по изобретению можно использовать в качестве медицинских ирригационных растворов. Такие растворы подходят для клинического орошения, например, для орошения ран или операционного поля. Используемое в изобретение понятие "медицинское орошение" взаимозаменяемо с понятием "орошение", которое обычно относится к введению раствора, обычно водного раствора, в рану или область хирургического вмешательства. Ирригационный раствор по изобретению можно вводить в различных целях, например, для гидратации тканей, очищения, удаления дебриса или поверхностных патогенных микроорганизмов, для смазки, предотвращения адгезии тканей или облегчения визуального осмотра. В некоторых вариантах осуществления орошение включает постоянное введение потока ирригационного раствора через открытую рану или область хирургического вмешательства. В некоторых вариантах осуществления ирригационный раствор вводят с перерывами. Способ введения, а также объем и скорость потока ирригационного раствора зависят от конкретных обстоятельств, например, от размера раны, типа орошаемой ткани и от состояния раны или области хирургического вмешательства (например, наличие дебриса, воздействие поверхностных патогенных микроорганизмов).

Специалисты в данной области смогут определить надлежащие способы и устройства, подходящие для введения, а также подходящие значения объема и скорости потока.

Вместе с тем, если при некоторых обстоятельствах простой ирригационный раствор может быть достаточным для достижения некоторых задач орошения, то в некоторых хирургических условиях общепринятые ирригационные растворы, такие как физиологический раствор, фосфатно-буферный солевой раствор (ФБР), антисептики или антибиотики, могут не способствовать выживанию или могут быть цитотоксичными в отношении чувствительных клеток или тканей, и тем самым отрицательно влиять на исход хирургического вмешательства.

Один из обычно используемых клинических ирригационных растворов, а именно нормальный физиологический раствор (0,9% NaCl в воде), является изотоническим и часто применяется для орошения ран благодаря своей низкой токсичности, физиологическим свойствам (уровень pH и осмолярность), простоте подготовки и стерилизации (в том числе стерилизации паром) и длительному сроку хранения при температуре окружающей среды. При этом нормальный физиологический раствор имеет ряд недостатков по сравнению с другими ирригационными растворами, таких как неспособность поддерживать длительное выживание чувствительных клеток или тканей, и наличие относительно высоких показателей раневой инфекции после орошения нормальным физиологическим раствором.

Был разработан ряд коммерчески доступных хирургических ирригационных растворов для орошения чувствительных областей операционного поля или раны, например, для областей или ран, на кото-

рые может оказать негативное действие орошение нормальным физиологическим раствором или другими простыми ирригационными растворами, например, во время хирургического вмешательства в офтальмологии. Имеющиеся в настоящее время хирургические ирригационные растворы для применения во время операции с целью предотвращения повреждения чувствительных клеток или тканей, например, во время хирургического вмешательства в офтальмологии, обычно включают четыре ключевых ингредиента: вещество для поддержания осмолярности, источник кальция, источник магния и буферное вещество.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам орошения операционного поля раствором по изобретению, например, раствором GS2. В некоторых вариантах осуществления областью хирургического вмешательства является глаз субъекта.

Способы и устройство для орошения операционного поля хорошо известны рядовым специалистам в данной области. Специалистам в данной области будет очевидно, что используемые способ доставки, объем и давление будут зависеть от характера и состояния операционного поля. Подходящие устройства для медицинского орошения включают без ограничения шприцы с баллончиком, поршневые шприцы, емкости под давлением, вихревые мешалки, вихревые шланговые распылители, ирригационные жидкости в пластиковых контейнерах с разливочной крышкой или наконечником, и устройства для импульсного лаважа (такого как струйное промывание, механическое промывание, пульсирующий лаваж, механическая ирригация, устройства для ирригации под высоким давлением).

В некоторых вариантах осуществления орошение проводят непрерывно, при этом постоянный поток ирригационного раствора направляют в область операционного поля. В других вариантах осуществления применяют импульсное или прерывистое орошение, при этом осуществляется периодическая или прерывистая доставка ирригационного раствора. Объем орошения зависит от характеристик области хирургического вмешательства и цели орошения (очистка раны, увлажнение и т.д.).

Наборы

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к наборам, которые включают: (a) раствор по изобретению; (b) инструкцию для контактирования клеточной популяции с раствором (a) для получения клеточной композиции; и (c) контейнер для контактирования (b) и/или для хранения клеточной композиции (b). В некоторых вариантах осуществления раствор (a) и контейнер (c) подходят для использования клеточной композиции (b) для трансплантации субъекту.

Таким образом, настоящее изобретение, среди прочего, относится к следующему:

Пункт 1. Раствор, содержащий:

- (a) буфер, поддерживающий физиологический уровень pH раствора;
- (b) глюкозу в количестве по меньшей мере 2 мМ или по меньшей мере 0,05% (вес/объем) и
- (c) осмотически активное вещество, поддерживающее физиологическую осмолярность раствора.

Пункт 2. Раствор по п.1, при этом раствор содержит глюкозу в количестве по меньшей мере 5 мМ или по меньшей мере 0,1% (вес/объем).

Пункт 3. Раствор по п.1, при этом раствор содержит глюкозу в количестве по меньшей мере 7,5 мМ или по меньшей мере 0,14% (вес/объем).

Пункт 4. Раствор по п.1, при этом раствор содержит глюкозу в количестве по меньшей мере 10 мМ или по меньшей мере 0,2% (вес/объем).

Пункт 5. Раствор по п.1, при этом раствор содержит глюкозу в количестве по меньшей мере 15 мМ или по меньшей мере 0,25% (вес/объем).

Пункт 6. Раствор по п.1, при этом раствор содержит глюкозу в количестве по меньшей мере 20 мМ или по меньшей мере 0,4% (вес/объем).

Пункт 7. Раствор по п.1, при этом раствор содержит глюкозу в количестве по меньшей мере 25 мМ или по меньшей мере 0,5% (вес/объем).

Пункт 8. Раствор согласно любому из пп.1-7, при этом раствор дополнительно содержит источник двухвалентных катионов.

Пункт 9. Раствор по п.8, в котором источник двухвалентных катионов включает источник кальция и/или магния.

Пункт 10. Раствор согласно любому из пп.1-9, в котором буфер включает ацетатный буфер и/или цитратный буфер.

Пункт 11. Раствор, содержащий:

- (a) буфер, поддерживающий физиологический уровень pH раствора, при этом буфер не является бутилдикарбонатным буфером;
- (b) глюкозу;
- (c) осмотически активное вещество, поддерживающее физиологическую осмолярность раствора; и
- (d) источник двухвалентных катионов.

Пункт 12. Раствор по п.11, в котором источник двухвалентных катионов (d) включает источник кальция и/или источник магния.

Пункт 13. Раствор согласно любому из пп.11-12, в котором буфер включает ацетатный буфер и/или цитратный буфер.

Пункт 14. Раствор согласно любому из пп.9-10 или 12-13, в котором источник кальция содержит фармацевтически приемлемую соль кальция.

Пункт 15. Раствор согласно любому из пп.9-10 или 12-14, в котором источник магния содержит фармацевтически приемлемую соль магния.

Пункт 16. Раствор согласно любому из пп.14-15, в котором фармацевтически приемлемую соль кальция и/или фармацевтически приемлемую соль магния выбирают из группы, состоящей из солей кальция и/или солей магния, образованных с кислотой, выбранной из группы, включающей уксусную кислоту, аскорбиновую кислоту, лимонную кислоту, соляную кислоту, малеиновую кислоту, шавелевую кислоту, фосфорную кислоту, стеариновую кислоту, янтарную кислоту и серную кислоту.

Пункт 17. Раствор согласно любому из пп.9-10 или 12-16, в котором источник кальция содержит хлорид кальция.

Пункт 18. Раствор согласно любому из пп.9-10 или 12-17, в котором источник кальция включает дигидрат хлорида кальция.

Пункт 19. Раствор согласно любому из пп.9-10 или 12-18, в котором источник магния включает хлорид магния.

Пункт 20. Раствор согласно любому из пп.9-10 или 12-18, в котором источник магния включает гексагидрат хлорида магния.

Пункт 21. Раствор согласно любому из пп.10 или 13-20, в котором цитратный буфер представлен в виде цитрата натрия.

Пункт 22. Раствор согласно любому из пп.1-21, в котором глюкоза представляет собой D-глюкозу (декстрозу).

Пункт 23. Раствор согласно любому из пп.1-22, в котором осмотически активное вещество представляет собой соль.

Пункт 24. Раствор согласно любому из пп.1-23, в котором осмотически активное вещество представляет собой натриевую соль.

Пункт 25. Раствор согласно любому из пп.1-24, в котором осмотически активное вещество представляет собой хлорид натрия.

Пункт 26. Раствор согласно любому из пп.1-25, в котором раствор содержит хлорид кальция, хлорид магния, цитрат натрия, хлорид натрия и глюкозу.

Пункт 27. Раствор согласно любому из пп.1-26, в котором уровень pH раствора составляет от 6,8 до 7,8.

Пункт 28. Раствор согласно любому из пп.1-27, в котором уровень pH раствора составляет 7,4-7,5.

Пункт 29. Раствор согласно любому из пп.1-28, в котором уровень pH раствора составляет приблизительно 7,5.

Пункт 30. Раствор согласно любому из пп.1-29, в котором раствор является изотоническим.

Пункт 31. Раствор согласно любому из пп.1-29, в котором раствор является гипертоническим.

Пункт 32. Раствор согласно любому из пп.1-31, в котором осмолярность раствора составляет приблизительно от 270 до 345 мОсм/л.

Пункт 33. Раствор согласно любому из п.1-32, в котором осмолярность раствора составляет приблизительно 315 мОсм/л.

Пункт 34. Раствор согласно любому из пп.9-10 или 12-33, в котором концентрация источника кальция составляет от 0,25 до 0,75 мМ.

Пункт 35. Раствор согласно любому из пп.9-10 или 12-34, в котором концентрация источника кальция составляет от 0,4 до 0,65 мМ.

Пункт 36. Раствор согласно любому из пп.9-10 или 12-35, в котором концентрация источника кальция составляет от 0,5 до 0,6 мМ, или раствор согласно любому из пп.9-10 или 12-35, в котором концентрация источника кальция составляет от 0,5 до 0,9 мМ, или в котором концентрация источника кальция составляет от 0,6 до 0,8 мМ.

Пункт 37. Раствор согласно любому из пп.9-10 или 12-36, в котором концентрация источника кальция составляет приблизительно 0,6 мМ, или раствор согласно любому из пп.9-10 или 12-36, в котором концентрация источника кальция составляет приблизительно 0,7 мМ.

Пункт 38. Раствор согласно любому из пп.9-10 или 12-37, в котором концентрация источника магния составляет от 0,05 до 5 мМ.

Пункт 39. Раствор согласно любому из пп.9-10 или 12-38, в котором концентрация источника магния составляет от 0,1 до 0,3 мМ.

Пункт 40. Раствор согласно любому из пп.9-10 или 12-39, в котором концентрация источника магния составляет приблизительно 0,3 мМ.

Пункт 41. Раствор согласно любому из пп.1-40, в котором концентрация глюкозы составляет от 5 до 50 мМ.

Пункт 42. Раствор согласно любому из пп.1-41, в котором концентрация глюкозы составляет от 10 до 25 мМ.

Пункт 43. Раствор согласно любому из пп.1-42, в котором концентрация глюкозы составляет от 10

до 20 мМ.

Пункт 44. Раствор согласно любому из пп.1-43, в котором концентрация глюкозы составляет приблизительно 16 мМ.

Пункт 45. Раствор согласно любому из пп.1-44, в котором концентрация осмотически активного вещества составляет приблизительно от 100 до 200 мМ.

Пункт 46. Раствор согласно любому из пп.1-45, в котором концентрация осмотически активного вещества составляет приблизительно от 125 до 175 мМ.

Пункт 47. Раствор согласно любому из пп.1-46, в котором концентрация осмотически активного вещества составляет приблизительно 150 мМ.

Пункт 48. Раствор согласно любому из пп.10 или 13-47, в котором концентрация цитрата или ацетата составляет от 0,1 до 5 мМ.

Пункт 49. Раствор согласно любому из пп.10 или 13-48, в котором концентрация цитрата или ацетата составляет от 0,5 до 2 мМ.

Пункт 50. Раствор согласно любому из пп.10 или 13-39, в котором концентрация цитрата или ацетата составляет приблизительно 1 мМ.

Пункт 51. Раствор согласно любому из пп.1-51, в котором раствор дополнительно содержит калиевую соль.

Пункт 52. Раствор по п.51, в котором соль калия представляет собой хлорид калия.

Пункт 53. Раствор по п.51 или 52, в котором концентрация KCl составляет от 0,2 до 5 мМ.

Пункт 54. Раствор по п.53, в котором концентрация KCl составляет от 1 до 2,5 мМ.

Пункт 55. Раствор по п.54, в котором концентрация KCl составляет приблизительно 2 мМ.

Пункт 56. Раствор согласно любому из пп.1-55, при этом раствор содержит приблизительно 0,7 мМ CaCl (хлорид кальция), приблизительно 0,03 мМ MgCl (хлорид магния), приблизительно 1 мМ цитрата натрия, приблизительно 16 мМ декстрозы и приблизительно 145 мМ NaCl, или раствор согласно любому из пп.1-55, при этом раствор содержит приблизительно 0,7 мМ CaCl (хлорид кальция), приблизительно 0,3 мМ MgCl (хлорид магния), приблизительно 1 мМ цитрата натрия, приблизительно 16 мМ декстрозы и приблизительно 145 мМ NaCl, или раствор согласно любому из пп.1-55, при этом раствор содержит приблизительно от 0,5 до 0,9 мМ CaCl (хлорид кальция), приблизительно от 0,2 до 0,4 мМ MgCl (хлорид магния), приблизительно от 0,8 до 1,2 мМ цитрата натрия, приблизительно от 13 до 19 мМ декстрозы и приблизительно от 116 до 174 мМ NaCl.

Пункт 57. Раствор согласно любому из пп.1-55, при этом раствор содержит приблизительно 0,85% NaCl, приблизительно 0,01% дигидрата CaCl (дигидрат хлорида кальция), приблизительно 0,006% гексагидрата MgCl (гексагидрат хлорида магния), приблизительно 0,035% дигидрата цитрата натрия и приблизительно 0,29% декстрозы, или раствор согласно любому из пп.1-55, при этом раствор содержит приблизительно от 0,68 до 1,02% NaCl, приблизительно от 0,008 до 0,012% дигидрата CaCl (дигидрат хлорида кальция), приблизительно от 0,0048 до 0,0072% гексагидрата MgCl (гексагидрат хлорида магния), приблизительно от 0,028 до 0,042% дигидрата цитрата натрия и приблизительно от 0,23 до 0,35% декстрозы.

Пункт 58. Раствор согласно любому из пп.1-57, при этом раствор дополнительно содержит приблизительно 2 мМ KCl.

Пункт 59. Раствор согласно любому из пп.1-58, при этом раствор дополнительно содержит вязкоупругий полимер.

Пункт 60. Раствор по п.59, в котором полимер представляет собой гиалуроновую кислоту, или ее соль или сольват.

Пункт 61. Раствор по п.59 или 60, в котором полимер представляет собой гиалуронат натрия.

Пункт 62. Раствор согласно любому из пп.59-61, в котором полимер присутствует в концентрации, эффективной для уменьшения воздействия усилия сдвига на клетки в растворе.

Пункт 63. Раствор согласно любому из пп.59-62, в котором концентрация полимера составляет от 0,005 до 5% вес/объем

Пункт 64. Раствор по п.63, в котором концентрация полимера составляет приблизительно 0,05% вес/объем

Пункт 65. Раствор согласно любому из пп.1-64, при этом раствор содержит приблизительно 0,7 мМ CaCl (хлорид кальция), приблизительно 0,03 мМ MgCl (хлорид магния), приблизительно 2 мМ KCl, приблизительно 1 мМ цитрата натрия, приблизительно 16 мМ декстрозы, приблизительно 145 мМ NaCl и приблизительно 0,05% гиалуроновой кислоты, или раствор согласно любому из п.1-64, при этом раствор содержит приблизительно 0,7 мМ CaCl (хлорид кальция), приблизительно 0,3 мМ MgCl (хлорид магния), приблизительно 2 мМ KCl, приблизительно 1 мМ цитрата натрия, приблизительно 16 мМ декстрозы, приблизительно 145 мМ NaCl и приблизительно 0,05% гиалуроновой кислоты, или раствор согласно любому из пп.1-64, при этом раствор содержит приблизительно от 0,5 до 0,8 мМ CaCl (кальций хлорид), приблизительно от 0,2 до 0,4 мМ MgCl (хлорид магния), приблизительно от 1,6 до 2,4 мМ KCl, приблизительно от 0,8 до 1,2 мМ цитрата натрия, приблизительно от 13 до 19 мМ декстрозы, приблизительно от 116 до 174 мМ NaCl и приблизительно от 0,04 до 0,06% гиалуроновой кислоты.

Пункт 66. Раствор согласно любому из пп.1-65, при этом раствор не содержит карбонатный буфер.

Пункт 67. Раствор согласно любому из пп.1-66, при этом раствор не содержит глутатион или дисульфид глутатиона (GSSG).

Пункт 68. Раствор согласно любому из пп.1-67, при этом раствор не содержит цвиттерионный органический буфер.

Пункт 69. Раствор согласно любому из пп.1-68, при этом раствор можно хранить в течение по меньшей мере 48, по меньшей мере 72, по меньшей мере 96, по меньшей мере 120, по меньшей мере 144 ч, по меньшей мере в течение одной недели, по меньшей мере двух недель, по меньшей мере трех недель или по меньшей мере в течение одного месяца при температуре 25°C без измеримой преципитации растворенных веществ и/или измеримой потери способности раствора поддерживать выживание и жизнеспособность хранящихся в растворе клеток.

Пункт 70. Раствор согласно любому из пп.1-69, при этом раствор можно хранить в течение по меньшей мере 48, по меньшей мере 72, по меньшей мере 96, по меньшей мере 120, по меньшей мере 144 ч, по меньшей мере в течение одной недели, по меньшей мере двух недель, по меньшей мере трех недель или по меньшей мере в течение одного месяца при температуре от 2 до 8°C без измеримой преципитации растворенных веществ и/или измеримой потери способности раствора поддерживать выживание и жизнеспособность хранящихся в растворе клеток.

Пункт 71. Раствор согласно любому из пп.1-70, при этом раствор подходит для введения субъекту, подходит для введения в глаз субъекта и/или подходит для трансплантации клеток в глаз субъекта.

Пункт 72. Раствор согласно любому из пп.1-71, при этом раствор по существу является апирогенным.

Пункт 73. Раствор согласно любому из пп.1-72, при этом раствор является стерильным.

Пункт 74. Раствор согласно любому из пп.1-73, при этом раствор предназначен для орошения, введения клеток, хранения клеток, транспортировки клеток и/или введения субъекту.

Пункт 75. Композиция, содержащая популяцию клеток в растворе согласно любому из пп.1-74.

Пункт 76. Композиция по п.75, в которой популяция клеток подходит для трансплантации субъекту.

Пункт 77. Композиция по п.76, в которой популяция клеток подходит для трансплантации в глаз субъекта.

Пункт 78. Композиция согласно любому из пп.75-77, в которой популяция клеток содержит клетки ПЭС.

Пункт 79. Композиция согласно любому из пп.75-78, в которой популяция клеток содержит фоторецепторные клетки.

Пункт 80. Композиция согласно любому из пп.75-79, в которой популяция клеток содержит мезенхимные клетки.

Пункт 81. Композиция согласно любому из пп.75-80, при этом композицию охлаждают в холодильнике.

Пункт 82. Композиция по п.81, при этом композиция хранится в холодильнике при температуре приблизительно от 2 до 8°C.

Пункт 83. Композиция согласно любому из пп.75-82, при этом композиция способствует выживанию клеток в клеточной популяции во время хранения композиции и при этом по меньшей мере 70% клеток в клеточной популяции сохраняют жизнеспособность после хранения композиции при температуре от 2 до 8°C в течение 48 ч.

Пункт 84. Композиция по п.83, в которой по меньшей мере 80% клеток в клеточной популяции сохраняют жизнеспособность после хранения композиции при температуре от 2 до 8°C в течение 48 ч.

Пункт 85. Композиция по п.83, в которой по меньшей мере 90% клеток в клеточной популяции сохраняют жизнеспособность после хранения композиции при температуре от 2 до 8°C в течение 48 ч.

Пункт 86. Композиция согласно любому из пп.75-85, при этом композиция способствует сохранению эффективности культивирования клеточной популяции при хранении композиции и при этом эффективность культивирования клеточной популяции остается на уровне по меньшей мере 70% от ее исходной эффективности культивирования после хранения композиции при температуре от 2 до 8°C в течение 48 ч, при этом исходная эффективность культивирования означает эффективность культивирования клеточной популяции клеток в начале периода хранения.

Пункт 87. Композиция по п.86, в которой клеточная популяция проявляет эффективность культивирования на уровне по меньшей мере 80% от своей исходной эффективности культивирования после хранения композиции при температуре от 2 до 8°C в течение 48 ч.

Пункт 88. Композиция по п.86, в которой клеточная популяция имеет по меньшей мере 90% от своей исходной эффективности культивирования.

Пункт 89. Композиция согласно любому из пп.75-88, в которой композиция находится в контейнере для хранения.

Пункт 90. Композиция согласно любому из пп.75-89, в которой композиция находится внутри шприца.

Пункт 91. Способ получения композиции согласно любому из пп.75-90, при этом способ включает

контактирование клеточной популяции с раствором согласно любому из пп.1-74.

Пункт 92. Способ по п.91, и указанный способ включает контактирование популяции криоконсервированных клеток или осажденных клеток с раствором согласно любому из пп.1-74, и таким образом осуществляют разведение клеток.

Пункт 93. Фармацевтическая композиция, содержащая раствор согласно любому из пп.1-74, или композицию согласно любому из пп.75-90, при этом фармацевтическая композиция подходит для введения субъекту.

Пункт 94. Способ, включающий введение раствора согласно любому из пп.1-74, или введение композиции согласно любому из пп.75-90, или фармацевтической композиции по п.88 нуждающемуся в этом субъекту.

Пункт 95. Способ по п.94, и указанный способ включает введение раствора или композиции в глаз пациента.

Пункт 96. Способ по п.94 или 95, и указанный способ включает введение композиции субъекту после хранения композиции в течение по меньшей мере 4, по меньшей мере 6, по меньшей мере 12, по меньшей мере 24, по меньшей мере 36 или по меньшей мере 48 ч.

Пункт 97. Способ по п.96, при этом у субъекта имеется или диагностировано заболевание сетчатки.

Пункт 98. Способ по п.97, в котором заболевание сетчатки представляет собой палочковую или колбочковую дистрофию, дегенерацию сетчатки, пигментный ретинит, диабетическую ретинопатию, макулярную дегенерацию, врожденный амавроз Лебера или болезнь Штаргардта.

Пункт 99. Способ по п.97 или 98, в котором композиция содержит клеточную популяцию и размер этой популяции эффективен для улучшения по меньшей мере одного симптома заболевания сетчатки у субъекта.

Пункт 100. Способ согласно любому из пп.97-99, и указанный способ дополнительно включает мониторинг по меньшей мере одного симптома заболевания сетчатки у субъекта.

Пункт 101. Способ, включающий:

(а) контактирование популяции клеток с раствором согласно любому из пп.1-74 и создание клеточной композиции указанным путем.

Пункт 102. Способ по п.101, дополнительно включающий:

(b) хранение клеточной композиции (а) в течение по меньшей мере 4, по меньшей мере 6, по меньшей мере 12, по меньшей мере 18, по меньшей мере 24, по меньшей мере 36, по меньшей мере 48, по меньшей мере 60 или по меньшей мере 72 ч.

Пункт 103. Способ по п.102, при этом способ дополнительно включает:

(с) введение клеточной композиции (а) субъекту после периода хранения (b).

Пункт 104. Способ по п.103, при этом введение (с) включает инъекцию клеток в глаз субъекта.

Пункт 105. Способ согласно любому из пп.101-104, и указанный способ дополнительно включает определение жизнеспособности клеток в клеточной композиции (а) после периода хранения (b).

Пункт 106. Способ согласно любому одному из пп.101-105, и указанный способ включает охлаждение клеточной композиции (а) в течение периода хранения на этапе (b).

Пункт 107. Способ по п.106, в котором охлаждение включает сохранение клеточной композиции при температуре от 2 до 8°C.

Пункт 108. Способ лечения заболевания сетчатки, при этом указанный способ включает введение эффективного количества композиции согласно любому из пп.75-90 или фармацевтической композиции по п.93 в глаз субъекта с заболеванием сетчатки.

Пункт 109. Способ по п.108, при этом заболевание сетчатки представляет собой палочковую или колбочковую дистрофию, дегенерацию сетчатки, пигментный ретинит, диабетическую ретинопатию, макулярную дегенерацию, врожденный амавроз Лебера или болезнь Штаргардта.

Пункт 110. Набор, содержащий:

(а) раствор согласно любому из пп.1-74;

(b) инструкции по контактированию клеточной популяции с раствором (а) для получения клеточной композиции и

(с) контейнер для контактирования (b) и/или для хранения клеточной композиции (b).

Пункт 111. Набор по п.110, в котором раствор (а) и контейнер (с) подходят для применения клеточной композиции (b) для трансплантации субъекту.

Примеры Введение

Клинические испытания фазы I по введению клеток ПЭС в глаз субъектов с сенильной макулярной дегенерацией (SMD) и возрастной макулярной дегенерацией (AMD) были проведены с использованием среды Alcon BSS PLUS® в качестве среды для композиции клеток ПЭМ, их хранения и трансплантации. Среда BSS PLUS® представляет собой физиологически совместимый раствор (осмолярность приблизительно 310 мОс, уровень pH приблизительно 7,4), одобренный для применения в интраокулярной хирургии. Срок хранения для композиции клеток ПЭС в среде BSS PLUS® ограничен приблизительно че-

тырьмя часами при хранении при температуре от 2 до 8°C до клинического применения (инъекции). В связи с таким ограниченным сроком годности продукта вспомогательные лаборатории для манипуляций с клетками должны находиться в непосредственной близости от каждого лечебного учреждения, участвующего в клинических испытаниях.

Создание среды со значительно увеличенным сроком годности конечного продукта при хранении (например, до 48 ч или больше) будет давать множество преимуществ. Увеличенный срок годности позволит объединять в одном месте продукцию в виде готовых композиций, которые можно отправлять во все лечебные учреждения США. Таким образом, можно расширить перечень лечебных учреждений, в настоящее время ограниченный только клиниками, расположенными в непосредственной близости к лабораториям, которые соответствуют текущей надлежащей производственной практике (cGMP). Увеличение срока годности продукта также устраняет логистические сложности, связанные с хранением многократного запаса продукта, обучением персонала и отслеживанием связей со множеством вспомогательных учреждений. Увеличение срока хранения позволит составлять более гибкий график при планировании трансплантаций, которые в настоящее время должны проводиться в строгих пределах окна времени, составляющего 4 ч.

Увеличение срока годности конечного продукта позволит иметь достаточно времени для уведомления о каких-либо задержках или отмене операции задолго до подготовки пациента к операции или входа в операционную (OR). Дополнительно, в случае, если испытания качества конечного продукта показали неудовлетворительный результат, можно приготовить дополнительную композицию конечного продукта в тот же день без задержки или отмены операции. Увеличение срока годности дает дополнительное время для дополнительного испытания качества конечного продукта, например анализа количественной ПЦР (кПЦР ДНК) с использованием пан-праймеров для выявления микробного загрязнения, что описано ниже.

Композицию ПЭС в виде конечного продукта в BSS PLUS® вводили через канюлю MedOne REF 3233 PolyTip®Cannula 23/38. При использовании композиции BSS PLUS® по изобретению было выявлено среднее снижение плотности жизнеспособных клеток приблизительно на 23%. Это снижение согласуется со всеми проанализированными значениями плотности клеток и не имеет какого-либо очевидного влияния на оставшиеся 77% клеток, экструдированных через канюлю, с точки зрения их жизнеспособности или последующей способности к высеванию, пролиферации и дифференцированию в культуре. Можно было предположить некоторую потерю клеток по причине адгезии, но вместе с тем, последующие эксперименты подтвердили, что клеточные потери и лизис клеток предположительно связаны с усилением сдвига, возникающим во время экструзии через канюлю. Для компенсации предполагаемых потерь плотность заполнения канюли соответственно увеличивают, чтобы гарантировать доставку необходимой дозы. В дополнение к увеличению срока хранения, конечная среда для композиции, обладающая подходящими вязкоупругими свойствами, минимизирует потерю клеток при доставке через канюлю. Сведение к минимуму клеточных потерь уменьшает объем вводимого клеточного дебриса, что смягчает возможные иммунные реакции на внутриклеточные компоненты.

Пример 1. Композиции среды

Среда GS2

Была получена среда для разведения, хранения, транспортировки клеток и/или введения субъекту. Эта среда под названием "GS2" была получена следующим образом:

готовили смесь из 48,75 мл 0,9% NaCl в воде; 13,10 мл сбалансированного солевого раствора Alcon (BSS®), 300 мОсм, в воде и 3,75 мл 5% раствора декстрозы в 0,9% NaCl, 560 мОсм, в воде, для получения 65,6 мл среды с конечной концентрацией декстрозы 0,29% и осмолярностью 315 мОсм.

Таким образом, основная среда GS2 содержит приблизительно 145 мМ NaCl (приблизительно 0,85% NaCl), приблизительно 2 мМ KCl (приблизительно 0,015% KCl), приблизительно 0,7 мМ CaCl (хлорид кальция), (приблизительно 0,01% дигидрата CaCl (дигидрат хлорида кальция)), приблизительно 0,3 мМ MgCl (хлорид магния) (приблизительно 0,006% MgCl гексагидрата (гексагидрат хлорида магния)), приблизительно 1 мМ цитрата натрия (приблизительно 0,035% дигидрата цитрата натрия) и приблизительно 16 мМ глюкозы (приблизительно 0,29% декстрозы), в воде.

Необязательно, среда GS2 может дополнительно содержать вязкоупругий полимер в количестве, эффективном для снижения воздействия усилия сдвига на клетки, например, в конечной концентрации приблизительно от 0,005 до 5% вес/объем В некоторых вариантах осуществления вязкоупругий полимер представляет собой гиалуроновую кислоту, или ее соль или сольват.

Сбалансированный солевой раствор Alcon (BSS®)

Сбалансированный солевой раствор Alcon (стерильный ирригационный раствор BSS®) представля-

ет собой стерильный сбалансированный солевой раствор, содержащий

0,64% хлорида натрия (NaCl),
0,075% хлорида калия (KCl),
0,048% дигидрата хлорида кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),
0,03% гексагидрата хлорида магния ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$),
0,39% тригидрата ацетата натрия ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$),
0,17% дигидрата цитрата натрия ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),
соляную кислоту и/или гидроксид натрия (для регулирования уровня pH)
и воду для инъекций.

Уровень pH BSS® составляет приблизительно 7,5, и осмоляльность составляет приблизительно 300 мОсм/кг.

Таким образом, раствор Alcon BSS содержит
приблизительно 109 мМ NaCl,
приблизительно 10 мМ KCl
приблизительно 3 мМ CaCl (хлорид кальция)
приблизительно 0,1 мМ MgCl (хлорид магния)
приблизительно 5 мМ цитрата натрия

Сбалансированный солевой раствор Alcon PLUS (BSS® PLUS) Сбалансированный солевой раствор Alcon PLUS (BSS PLUS®) представляет собой стерильный интраокулярный ирригационный раствор для применения во время внутриглазных хирургических манипуляций. Его готовят перед применением путем объединения двух частей, называемых "часть I" и "часть II".

Часть I представляет собой 480 мл стерильного раствора в бутылке однократной дозы объемом 500 мл, к которому добавляют часть II в виде концентрата. Часть I BSS PLUS® содержит

7,440 мг/мл хлорида натрия,
0,395 мг/мл хлорида калия,
0,433 мг/мл двухосновного фосфата натрия,
2,190 мг/мл бикарбоната натрия,
соляную кислоту и/или гидроксид натрия (для регулирования уровня pH) и
воду для инъекций.

Часть II представляет собой стерильный концентрат во флаконе однократной дозы объемом 20 мл, для добавления к части I.

Часть II BSS PLUS® содержит
3,85 мг/мл дигидрата хлорида кальция,
5 мг/мл гексагидрата хлорида магния,
23 мг/мл декстрозы,
4,6 мг/мл дисульфида глутатиона (окисленный глутатион) и
воду для инъекций.

После добавления части II BSS PLUS® в бутылку с частью I и разведения полученный продукт содержит

7,14 мг/мл хлорида натрия,
0,38 мг/мл хлорида калия,
0,154 мг/мл дигидрата хлорида кальция,
0,2 мг/мл гексагидрата хлорида магния,
0,42 мг/мл двухосновного фосфата натрия,
2,1 мг/мл бикарбоната натрия,
0,92 мг/мл декстрозы,
0,184 мг/мл дисульфида глутатиона (окисленный глутатион),
соляную кислоту и/или гидроксид натрия (для регулирования уровня pH)
в воде для инъекций.

Уровень pH разведенного продукта составляет приблизительно 7,4 и осмоляльность составляет приблизительно 305 мОсм.

Пример 2. Срок годности конечного продукта из клеток ПЭС в композиции с BSS-Plus®.

Конечный продукт из клеток ПЭС в композиции с BSS Plus® сохраняет свою жизнеспособность в течение 4 ч при холодном хранении (от 2 до 8°C). Была проведена более полная оценка срока годности конечного продукта. В этом исследовании нерасфасованный продукт ПЭС оттаивали и подготавливали жизнеспособные клетки в двух значениях плотности, с предельной конечной плотностью хранения на уровне 2000 жизнеспособных клеток/мл. Эта плотность хранения была постоянной для всех приготовленных доз. Конечное разведение клеток с предварительно отмеренным объемом BSS Plus® выполнялось в операционной непосредственно перед наполнением шприца. На этом этапе разбавления определялась окончательная плотность клеток (постоянная для всех доз), вводимых путем инъекции в объеме 150 мкл.

Жизнеспособность клеток, плотность жизнеспособных клеток, чистота и мощность конечного продукта из клеток ПЭС в композиции с BSS Plus®, который сохранялся на холоде, были оценены на момент изготовления композиции (0 часов) и через 4 и 6 ч при холодном хранении (от 2 до 8°C). Было показано, что плотность жизнеспособных клеток и жизнеспособность клеток остаются постоянными в течение 6 ч при холодном хранении. Дополнительно композицию из клеток ПЭС после хранения в течение 0, 4, и 6 ч высевали и культивировали для последующих анализов чистоты и активности. Для каждой точки времени культивирования (0, 4 и 6 ч) чистоту оценивали в анализе иммуноокрашивания MITF и PAX6 и мощность оценивали путем сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS анализ) по измерению фагоцитирующих частиц. Данные показывают, что все проанализированные свойства продукта оставались неизменными в течение 6-часового периода тестирования.

Жизнеспособность клеток ПЭС, сохраняемых в среде BSS Plus® в течение 12 ч, обычно составляет менее 70%, а после 24 ч содержания в среде BSS Plus® жизнеспособность клеток ПЭС обычно составляет менее 20%.

Пример 3. Создание улучшенной среды для разведения, хранения, транспортировки и/или трансплантации клеток

Была разработана улучшенная среда для разведения клеток, например, из криоконсервированного состояния, хранения клеток, например, для холодного хранения между разведением или сбором из клеточной культуры и транспортировкой до места проведения трансплантации или введения субъекту), для транспортировки клеток и клеточной трансплантации. Компоненты полученной среды (GS2) приведены в табл. 1 ниже. Фирмы-поставщики указаны в качестве примера. Специалистам в данной области будет очевидно, что существуют дополнительные источники перечисленных компонентов и можно определить подходящие источники указанных этих веществ:

Таблица 1

Компоненты GS2			
Компонент	Поставщик	NDC#	Назначение/примечание
Дектроза 5%/ NaCl 0,9% или дектроза 5%/ NaCl 0,9%	Braun или Baxter	00264-7610-00 или 0338-0089-04	Физиологический уровень pH и изосмолярность для сохранения целостности клеток
Стерильный ирригационный раствор	Alcon 9008625-0113	0065-0795-15viso	Физиологический уровень pH ~ 7,5 с буфером ацетат натрия/цитрат и изосмолярность приблизительно 300 мОсм/кг для сохранения целостности клеток
0,9% хлорид натрия	Baxter Healthcare	0338-0049-11	Изосмолярность для сохранения целостности клеток
0,1N NaOH	J.T.Baker® VWR #JT5636-2	Подходящие по волюметрическим и аналитическим свойствам для использования в фармакопейных методиках ACS, USP NF и общих лабораторных применений	Для доведения уровня pH среды GS2 до 7,4
3% гиалуронат натрия (например, Healon® EndoCoat (Abbott), Hyasis® (Novozymes), Pro-Visc® (Alcon) (необязательный компонент)	Abbott, Novozymes, Alcon	05047-4547-06	Защитное действие против усилия сдвига во время экструзии через канюлю, для уменьшения потери клеток

NDC=Национальный лекарственный код

Конечная композиция GS2 является физиологической в отношении уровня pH (от 7,2 до 7,6) и осмолярности (рассчитанная осмолярность 315).

Среда GS2 была изготовлена и расфасована в выделенном чистом помещении согласно ISO-7 для конечного продукта ПЭС в соответствии со стандартом ISO-5 BSC (бокс биологической безопасности). В стерильный резервуар добавляли стерильные компоненты, приведенные в табл. 1, и резервуар помещали на роторную качалку (30-40 оборотов в минуту). Минимум через три часа образцы удаляли из резервуара, затем измеряли уровень pH и доводили его до pH 7,4 +/- 0,2 с помощью добавления дополнительного количества 0,1N NaOH. Среда GS2 для заполнения не контактировала с образцом pH. Раствор стерилизовали с использованием мембранного фильтра и повторно определяли уровень pH.

Аликвотное количество GS23 мл разливали в обработанные гамма-облучением криопробирки, состоящие из первичного полипропиленового полимера, соответствующего требованиям USP класса VI. Образцы переносили из каждой заполненной пробирки, и пробирки закрывали крышками. Тестирование контроля качества (QC) проводили на объединенном образце, как описано ниже. Каждую пробирку подвергали визуальному осмотру при видимом и УФ-свете с целью подтверждения отсутствия твердых частиц. Затем пробирки возвращались в стерильные условия для маркировки и хранились при температуре от 2 до 8°C. После минимум одного дня холодного хранения несколько пробирок забирали и повторно определяли уровень pH с помощью pH-метра, калиброванного по стандартному pH при температуре от 2 до 8°C, чтобы подтвердить их пригодность при температуре использования (от 2 до 8°C).

Пример 4. Контроль качества и спецификация для выпуска конечного продукта клеток ПЭС в GS2

Было проведено 14-дневное исследование стерильности, уровня pH, осмотического давления и наличия эндотоксинов по стандарту USP, для которого брали аликвотное количество объединенной GS2, состоящее из образцов из всех заполненных ампул. Также оценивались показатели каждой партии GS2 по показателям сохранения жизнеспособности клеток ПЭС и их роста после изготовления композиции и экструзии через инъекционную канюлю. Примеры тестов по контролю качества и спецификация для выпуска готового продукта представлены в табл. 2 ниже.

Таблица 2

Пример тестирования качества готового продукта GS2, критерий I		
Тест	Способ	Спецификация
Стерильность	USP/21 C.F.R. 610.12 Способ погружения	Отрицательный
Эндотоксин	Эндотоксин - специфический турбидиметрический метод	<0,50 EU/мл
pH при t от 2 до 8°C	pH-электрод	7,2-7,6
Осмолярность	Осмометр	295-335 мОсм
Визуальный осмотр	Визуальный/УФ- световой осмотр	Отсутствие частиц в исследованных пробирках
Сохранение жизнеспособности и роста клеток ПЭС	Подтверждение приемлемой жизнеспособности и роста клеток ПЭС в композиции с GS2	>= 80% стандартных показателей GS2 по плотности и жизнеспособности клеток через 48 часов хранения после изготовления композиции, как перед, так и после экструзии через канюлю
Пример тестирования качества готового продукта GS2, критерий II		
Стерильность	USP/21 C.F.R. 610.12 Способ погружения	Отрицательный
Эндотоксин	Эндотоксин - специфический турбидиметрический метод	<0,20 EU/мл
pH при t от 2 до 8°C	pH-электрод	6,8-7,8
Осмолярность	Осмометр	270-345 мОсм

Рост клеток ПЭС	Рост клеток после 2-дневного хранения в среде GS2	$\geq 25\%$ увеличение количества клеток после 2-3 дней культивирования (например, ≥ 25000 клеток/лунку после 2-х дней культивирования, начиная с 20000 клеток/лунку)
Жизнеспособность клеток ПЭС	Тест на исключение окрашивания трипановым синим после 2-дневного хранения в среде GS2	$\geq 79\%$
Плотность жизнеспособных клеток	Подсчет жизнеспособных клеток после 2-дневного хранения в GS2	$\geq 0,7$ от плотности клеток в композиции

Следует понимать, что критерии выпуска готового продукта, перечисленные в табл. 2, являются примерными и что любую комбинацию любых указанных в табл. 2 критериев можно объединять и использовать как по отдельности, так и в комбинации с дополнительными критериями, для тестирования выпуска готового продукта и контроля качества.

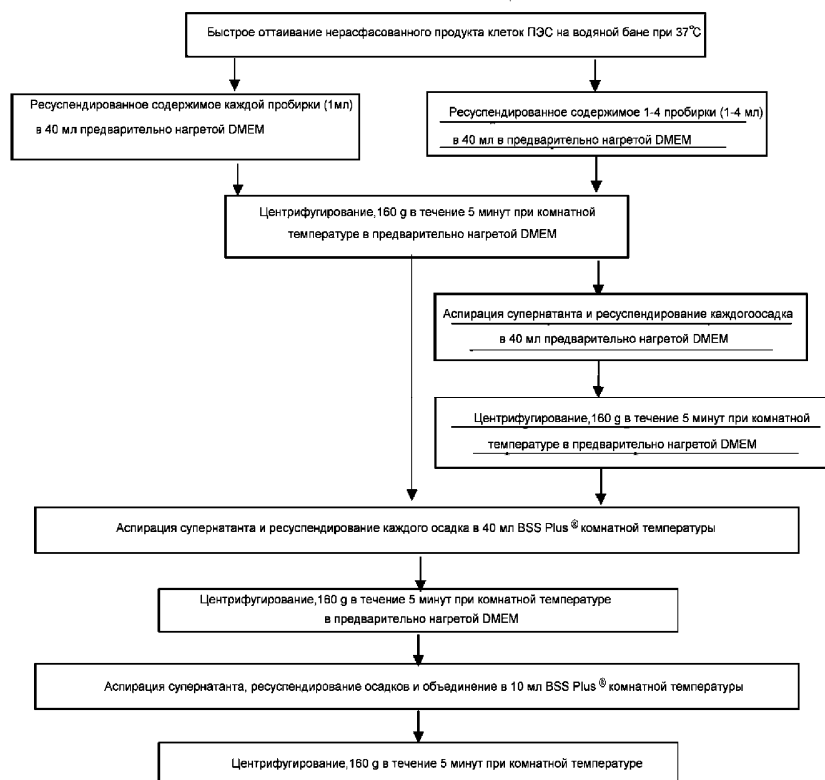
В соответствии с примерным вариантом осуществления анализа роста клеток ПЭС, после периода хранения в GS2 клетки высевали в покрытые желатином 96-луночные планшеты при начальной плотности, например 20000 клеток на лунку в среду RPE GM или EGM2/EBM2 (Lonza, например, Cat #: CC-3156, CC-4176). Клетки выращивали в течение 2-3 дней при подходящих условиях, например, в 5% CO₂ при 37°C и в термостате с контролируемой влажностью. Клетки поднимали из лунок, например, с помощью расщепления трипсином и затем подсчитывали. В этом тесте отмечали соответствие критериям качества готового продукта GS2, если в конце периода культивирования количество клеток на лунку составляло 125% или больше от начальной плотности клеток, например, ≥ 25000 клеток/лунку при начальной плотности 20000 клеток/лунку).

Пример 5. Изготовление композиции конечного продукта ПЭС, упаковка и поставка

В описанном ниже способе использовали BSS Plus® на начальном этапе промывки для обработки средой GS2. Промывка в GS2 вместо BSS Plus® также рассматривается в вариантах осуществления настоящего изобретения и входит в его объем. Пробирки с криоконсервированными клетками MA09-hRPE, выпускаемыми для медицинского применения, извлекали из хранилища с жидким азотом. В зависимости от дозы требовалось от 2 до 4 пробирок клеток. Криопробирки переносили в чистое помещение и быстро оттаивали в водяной бане при 37°C. Размороженное содержимое каждой пробирки (1 мл криоконсервационной среды (90% фетальной телячьей сыворотки (FCS)+10% ДМСО), содержащей 2 млн клеток в момент криоконсервации) осторожно ресуспендировали в теплой DMEM, переносили в коническую пробирку объемом 50 мл и доводили до конечного объема 40 мл дополнительным количеством теплой среды DMEM. Каждую пробирку суспендированных клеток центрифугировали (160 g в течение 5 мин при комнатной температуре), и каждый осадок ресуспендировали в 40 мл раствора BSS Plus® комнатной температуры. Каждую клеточную суспензию повторно центрифугировали, осадки собирали и ресуспендировали в 10 мл раствора BSS Plus® комнатной температуры. Ресуспендированные объединенные клетки центрифугировали (160 g в течение 5 мин при комнатной температуре) в третий раз и удаляли супернатант аспирацией.

Ниже приведена схема этапов получения продукта, описанного выше (этапы с технологической средой GS2 обозначены подчеркиванием).

Изготовление композиции ПЭС - I



После удаления максимально возможной части супернатанта осадок ресуспендировали в объеме холодного раствора BSS Plus® (обычный технологический раствор) или холодной среды GS2 (технологическая среда GS2) с доведением до конечного объема 50 мкл на каждый один миллион оттаянных клеток. С этого момента клетки находились в пробирках в охлаждающих штативах, чтобы поддерживать температуру клеток от 2 до 8°C в течение остальных этапов этого способа. Результатом обычного разведения от 15 до 25% целевого объема является получение клеточной суспензии приблизительно из 4 000 жизнеспособных клеток ПЭС на 1 мкл.

После отбора образцов проводили подсчет жизнеспособных клеток, определяли плотность жизнеспособных клеток и общее количество клеток в разведении. К суспензии клеток добавляли дополнительное количество холодного раствора BSS Plus® или холодной среды GS2, чтобы довести конечную концентрацию клеток до 2300 жизнеспособных клеток ПЭС/мкл (на 300 клеток больше, чем целевая конечная концентрация композиции из 2000 жизнеспособных клеток ПЭС/мкл). Затем проводили контрольный подсчет клеток и добавляли дополнительно холодный раствор BSS Plus® или холодную среду GS2, чтобы довести конечную концентрацию до 2000 жизнеспособных клеток ПЭС/мкл. Нужный объем клеток расфасовывали в укупорки с готовым продуктом (стерильные микроцентрифужные пробирки объемом 0,5 мл; Fisher, Cat. № 02-707-351). Этикетку продукта прикрепляли на каждую пробирку с технологическим раствором BSS Plus® или на вихрь-пакет, содержащий пробирку с продуктом с технологической средой GS2, с указанием 4-часового срока годности для клеток ПЭС в BSS Plus® или 48-часового срока годности для клеток ПЭС в GS2. Из каждой пробирки с продуктом извлекали образец и эти образцы объединяли для архива и тестирования контроля качества.

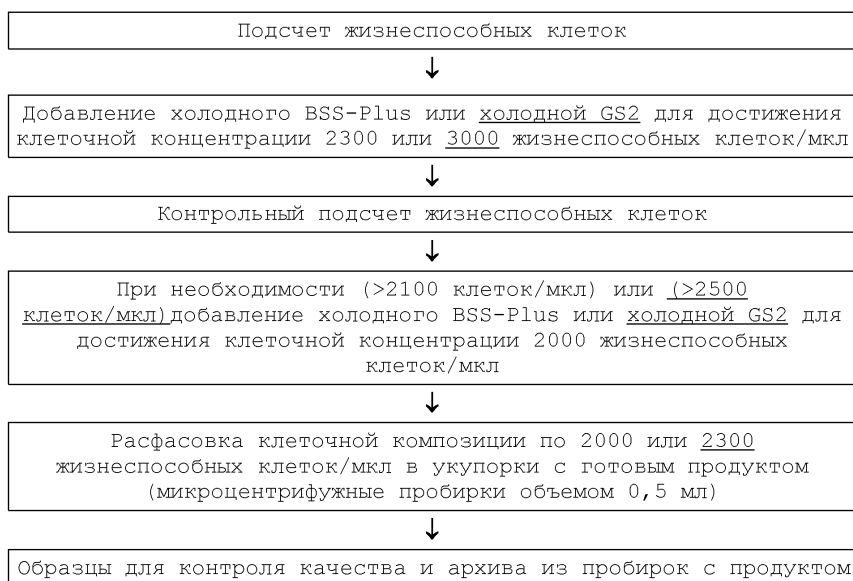
Дополнительно, был разработан протокол изготовления композиции культивируемых клеток. Согласно этому протоколу, криоконсервированные клетки ПЭС оттаивали и предварительно культивировали в течение 3-7 дней перед изготовлением композиции клеток в трансплантационной среде GS2. Культивируемые клетки снимали с культуральной чашки и промывали сначала в среде DMEM, а затем в растворе BSS-Plus, и в конце в растворе BSS-Plus в смеси 1:1 со средой GS2. После последнего этапа промывки клетки переносили в холодную среду GS2 (от 2 до 8°C). Извлечение, тестирование и доведение объема образцов до конечной плотности клеток выполняли, как описано выше.

Ниже приведена схема этапов получения продукта, описанного выше (этапы с технологической средой GS2 обозначены подчеркиванием):

Изготовление композиции ПЭС - II

Ресуспендированный осадок в холодном BSS-Plus или холодной GS2 с получением конечного объема 40 мкл или 40 мкл/на 1 миллион оттаянных клеток



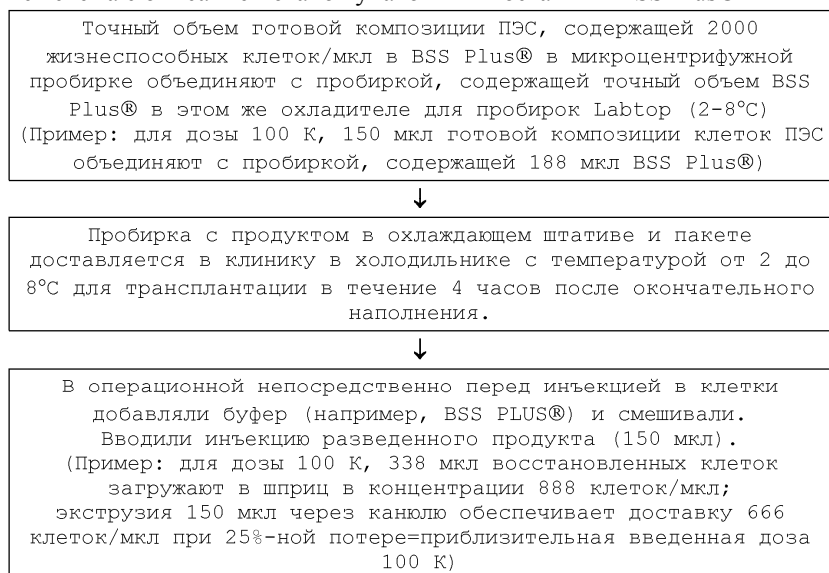


Упаковка и отгрузка ПЭС в BSS PLUS®

В клинических трансплантационных испытаниях (при SMD и AMD) каждая доза состояла из пары пробирок: одна из пробирок содержала предварительно отмеренный объем клеток ПЭС в виде композиции из 2000 жизнеспособных клеток ПЭС/мкл, и другая пробирка содержала предварительно отмеренный объем BSS Plus®. Каждую пару пробирок помещали в охлаждающий штатив Labtop при температуре от 2 до 8°C. Охлаждающие штативы помещали в пакеты, устанавливали в охлаждающий контейнер Coleman Cooler, содержащий приблизительно 16 фунтов предварительно охлажденного льда INSUL-Ice и доставлялись курьером в лечебное учреждение.

В операционной непосредственно перед трансплантацией к клеткам добавляли BSS Plus® с помощью тупоконечной иглы для инъекции наполнителей. Клетки смешивали и набирали в шприц для инъекций объемом 1 мл. Продукт (150 мкл для всех доз) выдавливали через канюлю для инъекции в субретинальное пространство. Плотность клеток в наполненном шприце была установлена с коэффициентом $1,33 \times$ плотность вводимой дозы для компенсации предполагаемой потери 25% во время экструзии через канюлю.

Ниже приводится схема с описанием этапов упаковки и поставки в BSS Plus®



Упаковка и доставка ПЭС в GS2

Каждая доза состояла из одной микроцентрифужной пробирки, содержащей 250 мкл клеток ПЭС в виде композиции из 2300 жизнеспособных клеток ПЭС/мкл. Единственную пробирку, содержащую одну дозу готового продукта в виде композиции ПЭС помещали в стерильный вихрь-пакет объемом 2 унции, к которому прикрепляли этикетку готового продукта. Пробирки в пакетах помещали в чистый, предварительно охлажденный (от 2 до 8°C), индивидуально пронумерованный портативный охладитель для пробирок. В дополнении к маркированной пробирке (пробиркам) с продуктом, в каждый охладитель Chillette также помещали маркированную дополнительную пробирку (не в пакете), содержащую 30 мкл готовых клеток ПЭС, и отдельную пробирку, содержащую 100 мкл 0,4% красителя трипановый синий.

Этикетку на готовое изделие также прикрепляли к каждому охладителю Chillette. Каждый охладитель с продуктом помещали в стерильный вихрь-пакет в стерильных условиях. Упакованный охладитель с продуктом, сопроводительная форма с медицинскими указаниями и двумя этикетками размещались в чистом помещении, со сквозным проходом в зону окончательной упаковки и отгрузки. Чтобы избежать путаницы, в каждый охладитель Chillette пробирки с продуктом загружали в стерильных условиях, и каждый охладитель по одному переносили в чистое помещение со сквозным проходом.

Выполняющие упаковку работники извлекали каждый охладитель Chillette, сопроводительные документы и этикетки готового продукта из чистого помещения со сквозным проходом и помещали охладитель Chillette в пакетах, воздушно-пузырьковую пленку, тупоконечную иглу для наполнителя, шприц, инъекционную канюлю и гемоцитометр в транспортный контейнер предварительно охлажденной холодильной установки NanoCool. Крышку холодильной установки надежно закрывали, и внешнюю транспортную тару упаковывали вместе с документами для получения, инспекции, хранения и проверки жизнеспособности после транспортировки. До завершения всех испытаний выпуска готового продукта упакованный продукт помещался на карантин, после чего выдавался "Сертификат выпуска готового продукта клеток ПЭС для трансплантологии" ("RPE Cell Final Product Certificate of Release for Transplantation"). Транспортную тару NanoCool с продуктом и документами направляли в лечебное учреждение на следующий день. После получения транспортную тару можно хранить при комнатной температуре или при температуре от 2 до 8°C до использования продукта в течение 48 ч с момента окончательного заполнения. Этикетки готового продукта с датой и временем истечения срока действия прикрепляли на внешней транспортной таре, охладителе для пробирок Chillette и пакете с пробирками, содержащими готовый продукт.

Готовую композицию клеток ПЭС с 2300 жизнеспособных клеток/мкл в среде GS2 в микроцентрифужной пробирке помещали в вихрь-пакет (Whirl-Pak) и переносили в охладитель пробирок Chillette (2-8°C)
↓
Упакованный охладитель пробирок, содержащий пакет с готовым продуктом в пробирке, помещают в транспортную тару Nano Cool (при температуре от 2 до 8°C), и курьер транспортирует этот груз в лечебное учреждение на следующий день. Приоритетная доставка для трансплантации осуществляется в течение 48 часов после окончательного заполнения.
↓
В операционной непосредственно перед инъекцией клетки ресуспендируют и смешивают. Продукт (250 мкл) загружают в 1 мл шприц для инъекции с помощью канюли. При введении 150 мкл доставляется доза 300 К с номинальной потерей клеток во время инъекции.

Анализ контроля качества при выпуске конечного продукта клеток ПЭС

Анализ контроля качества при выпуске имеющегося конечного продукта (в растворе BSS Plus®), выполняемый перед трансплантацией, включает проверку жизнеспособности клеток и окрашивание по Граму. Образцы направляли для USP испытаний в течение 14 дня на анализ стерильности, и результаты получали после трансплантации.

Выпуск конечного продукта клеток ПЭС перед трансплантацией		
Анализ	Способ	Спецификация
жизнеспособность	исключение по окрашиванию трипановым синим	>/= 70%
окрашивание по Граму	микроскопическое исследование	отрицательно
Выпуск конечного продукта клеток ПЭС после трансплантации		
стерильность	USP/21 CFR 610.12 с иммерсией	отрицательно

Анализ кПЦР для обнаружения контаминантов

Поскольку срок годности готового продукта клеток ПЭС увеличен с 4-х ч в BSS-Plus® по меньшей мере до 48 ч в среде GS2, можно выполнять анализы с более продолжительным циклом исследования перед выпуском продукта. Например, получена возможность проводить ПЦР-анализы конечного продукта клеток ПЭС и получать результаты для контроля качества и для выпуска перед выпуском и использованием продукта. Одним из подходящих для проведения анализов является кПЦР-анализ с пан-

праймерами ДНК. Такой анализ может быть завершен в течение 2 ч. Анализы кПЦР являются чрезвычайно чувствительными и могут быть использованы для обнаружения широкого спектра патогенных контаминантов, например, загрязнителей из окружающей среды, микробных и вирусных контаминантов, а также обычной кожной микрофлоры. Анализы кПЦР можно проводить в дополнение к анализам выпуска готового продукта для обнаружения микробной контаминации в дополнение к окрашиванию по Граму и тесту на стерильность USP. Результаты кПЦР будут известны до отгрузки продукции, таким образом предотвращается отправка потенциально загрязненного продукта из лаборатории. Следует понимать, что описанный в изобретении анализ кПЦР является иллюстративным и что можно выполнять другие подходящие анализы вместо или в дополнение, в том числе и без ограничения, к другим ПЦР-анализам и другим типам анализов, которые могут быть выполнены в течение увеличенного срока хранения конечного продукта клеток ПЭС.

Осмотр и проверка жизнеспособности конечного продукта после транспортировки

При получении в лечебном учреждении обученный персонал должен принять продукт во внешней транспортировочной таре, подтвердить правильность информации в отношении серии и партии и проверить наличие повреждений внешней тары. Если в лечебном учреждении есть возможность выполнить проверку на жизнеспособность клеток, то на этом этапе из охладителя Chillette вынимают сопроводительную пробирку с клетками и пробирку с трипановым синим. Пробирки передают в испытательную лабораторию для пост-транспортировочной проверки жизнеспособности клеток. Если жизнеспособность клеток составляет менее 70%, продукт не подлежит к использованию.

Инструкция по заполнению инъекционной канюли

В операционной непосредственно перед трансплантацией клетки смешивают с помощью тупоконечной иглы для наполнителей и набирают их в шприц для инъекций объемом 1 мл. Продукт (150 мкл) выдавливают через инъекционную канюлю в субретинальное пространство. Поскольку при экструзии через канюлю в GS2 потеря клеток является номинальной, плотность клеток в заполненном шприце (2000 жизнеспособных клеток ПЭС/мкл) представляет собой плотность при доставке 150 мкл в виде инъекции дозы 300 К.

Пример 6. Стабильность клеток в среде GS2

На фиг. 1 показано, что клетки ПЭС могут сохраняться в растворе HypoThermosol (BioLife Solutions, Inc., Bothell, WA, USA) в течение 24 ч (но не в течение 48 ч) без видимого снижения последующей способности к культивированию и росту в культуре.

На фиг. 2-5 показана стабильность клеток ПЭС в среде GS2 при температуре от 2 до 8°C. На фиг. 2 показано, что клетки ПЭС могут сохраняться в GS2 в течение по меньшей мере 48 часов без видимого снижения количества жизнеспособных клеток или последующей способности к культивированию и росту в культуре. На фиг. 3 показано, что клетки ПЭС могут сохраняться в GS2 в течение 4-5 дней только с номинальной потерей жизнеспособности клеток и без значительного снижения плотности жизнеспособных клеток. Фиг. 4 показывает, что способность клеток ПЭС к культивированию и росту в культуре начинает снижаться после 5 дней в среде GS2 при холодном хранении. На фиг. 5 показано, что среда GS2 совместима с существующей инъекционной системой.

Пример 7. Трансплантационная среда GS2 - влияние вязкоупругого полимера

Выполняли оценку влияния разных звенений концентрации вязкоупругого полимера на жизнеспособность клеток после их экструзии через канюлю. Человеческие клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) из нерасфасованной партии NRPE-313 5C P2 были изготовлены в соответствии с методиками cGMP и подверглись криоконсервации. В день эксперимента флаконы оттаивали и готовили композицию. Клетки оттаивали в предварительно нагретой (37°C) среде DMEM (Gibco). Затем клетки центрифугировали (5 мин при 160 д). Каждый осадок ресуспендировали в 40 мл раствора BSS Plus® (Alcon) комнатной температуры и повторно центрифугировали. Полученный осадок объединяли в одной центрифужной пробирке, ресуспендировали в растворе BSS Plus® комнатной температуры и затем разделяли на несколько (4) пробирок перед этапом заключительного центрифугирования в объеме 10 мл на пробирку. Клеточные осадки вводили в отличающиеся композиции трансплантационной среды под названием GS2 TM.

Трансплантационную среду GS2 TM готовили путем объединения 5% декстрозы и солевого раствора (0,9% раствор NaOH), Braun NDC #00264-7610-00 или Baxter NDC #0338-0089-04; физиологического раствора (0,9% раствор NaOH), Baxter NDC #0338-0049-11; ирригационного раствора Alcon BSS, NDC #0065-0795-15; и гиалуроновой кислоты или гиалуроната натрия (HA), например, Abbott Healon EndoCoat, NDC #05047-4547-06; в стерильном резервуаре, и смешивали компоненты на орбитальном шейкере. Измеряли уровень pH и доводили его до pH 7,4 +/- 0,2 путем добавления дополнительного количества 0,1N NaOH перед стерильной фильтрацией. В этом эксперименте получали среду GS2 TM, содержащую гиалуроновую кислоту (HA) от Healon EndoCoat (Abbott) в конечной концентрации или 0,15, 0,1, 0,05 или 0%.

Клетки разбавляли по нарастающей, до получения конечной плотности сохраняющихся клеток приблизительно 2000 клеток на микролитр. После восстановления и разведения в разных трансплантаци-

онных средах были подготовлены по три экземпляра флаконов с клетками для каждого условия анализа. Флаконы с клетками хранили в течение 2-х дней в холодильнике при температуре от 2 до 8°C. Затем подсчитывали количество клеток с помощью гемоцитометра. Жизнеспособность клеток определяли по исключению окрашивания трипановым синим. Средние значения были рассчитаны по результатам в трех экземплярах подготовленных для каждого условия пробирок с клетками, и концентрацию жизнеспособных клеток в каждой пробирке определяли путем трехкратного подсчета. Была рассчитана разница (или дельта) в количестве клеток до и после экстрюзии через канюлю MedOne # 3233.

Результаты этого эксперимента приведены на фиг. 6. Показана средняя плотность жизнеспособных клеток из трех экземпляров пробирок \pm стандартные отклонения. Плотность человеческих клеток ПЭС определяли с помощью гемоцитометра. Жизнеспособность клеток определяли по исключению окрашивания трипановым синим. Средние значения были рассчитаны по результатам в трех экземплярах подготовленных для каждого условия пробирок с клетками, и концентрацию жизнеспособных клеток в каждой пробирке определяли путем трехкратного подсчета.

Процентное изменение (или дельта) в количестве клеток до и после экстрюзии через канюлю MedOne # 3233 указано над каждой группой значений, для каждого условия.

При всех протестированных значениях концентрации НА было показано улучшение жизнеспособности клеток после экстрюзии через канюлю. Вместе с тем, было установлено, что добавление 0,05% НА является предпочтительным для композиции трансплантационной среды. Меньшая потеря клеток после экстрюзии клеток ПЭС через канюлю MedOne # 3233 наблюдали при использовании среды GS2 TM, которая содержит 0,05% НА, чем в случае среды GS2 TM, которая была изготовлена без НА или содержала 0,1 или 0,15% НА. В частности, на 10% меньше потерь выявлено при включении 0,05% НА по сравнению со средой GS2 TM без добавления НА.

Пример 8. Среда GS2 - влияние концентрации глюкозы на жизнеспособность клеток

Выполняли оценку влияния различных концентраций вязкоупругого полимера на жизнеспособность клеток после их экстрюзии через канюлю. Для этих целей человеческие клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) из нерасфасованной партии NRPE-313 5C P2 были получены в соответствии с методиками cGMP и подверглись криоконсервации. В день эксперимента флаконы оттаивали и клетки разводили предварительно нагретой (37°C) средой DMEM (Gibco). Затем клетки центрифугировали (5 минут при 160 g). Каждый осадок ресуспендировали в 40 мл раствора BSS Plus® (Alcon) комнатной температуры и повторно центрифугировали. Полученный осадок объединяли в одной центрифужной пробирке, ресуспендировали в растворе BSS Plus® комнатной температуры, и затем разделяли на несколько (6) пробирок перед этапом заключительного центрифугирования в объеме 10 мл BSS Plus® на пробирку. Клеточные осадки вводили в отличающиеся композиции трансплантационной среды GS2 TM.

Трансплантационную среду GS2 TM готовили путем объединения 5% декстрозы и солевого раствора (0,9% раствор NaOH) солевого раствора (0,9% раствор NaOH); ирригационного раствора Alcon BSS, NDC # 0065-0795-15, в стерильном резервуаре и смешивали компоненты на орбитальном шейкере. Изменяли уровень pH и доводили его до pH 7,4 +/- 0,2 путем добавления дополнительного количества 0,1N NaOH перед стерильной фильтрацией. В этом эксперименте получали среду GS2 TM с разной концентрацией глюкозы, как показано в табл. 3 ниже. Объем указан в миллилитрах.

Таблица 3

	без глюкозы	1/3 x глюкозы	1 x глюкозы	2 x глюкозы	3 x глюкозы	4 x глюкозы
0,9% натрия хлорид	52,50	51,25	48,75	45,00	41,25	37,50
5% декстрозы и 0,9% натрия хлорид	0,00	1,25	3,75	7,50	11,25	15,00
BSS (Alcon	13,13	13,13	13,13	13,13	13,13	13,13
рассчитанная осмолярность	300,0	305,0	314,9	329,7	344,6	359,4

После изготовления клеточной композиции с разными трансплантационными средами GS2 клетки по нарастающей разводили до конечной плотности сохраняющихся клеток приблизительно 2000 клеток на микролитр. Затем эти клетки хранили в стерильных флаконах (Fischer) в течение 3-х дней в холодильнике при температуре от 2 до 8°C. После этого определяли количество жизнеспособных клеток с помощью гемоцитометра, и приблизительно 20000 жизнеспособных клеток на лунку высевали в 96-луночные планшеты для культивирования ткани (Costar) с желатиновым покрытием (Stem Cells, Inc.). Клетки культивировали в ростовой среде для клеток ПЭС (EBM-2 с EGM2 Single Quots, Stem Cells, Inc, например, Lonza Cat #: CC-3156, CC-4176) в течение 3-х дней в условиях 5% CO₂, 37°C, в инкубаторе с контролируемой влажностью. После этого клетки снимали с планшета с помощью 40 Мг/лунку смеси 1:1 трипси-на (Sigma) и среды для диссоциации на основе HEPES (Gibco). Среда с содержанием сыворотки (40

мкл/лунку) использовали для нейтрализации действия трипсина, пипеткой проводили титрование клеток для подъема, и подсчитывали количество с помощью гемоцитометра. На фиг. 7 показано среднее число человеческих клеток ПЭС на лунку из шести лунок для каждого условия испытания \pm SD. При каждой концентрации глюкозы выявлены улучшенные результаты по сравнению с контрольным образцом, не содержащим глюкозу.

Пример 9. Повышение жизнеспособности мезенхимальных стволовых клеток в среде GS2

На фиг. 8 показана жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) в различных композициях среды. Полученные из человеческих эмбриональных стволовых клеток МСК выращивали до 70% конфлюэнтности, собирали с использованием 0,05% трипсина, ресуспендировали в среде aMEM+15% FCS (среда MSC) и центрифугировали при 200 g в течение 5 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в небольшом объеме среды MSC и подсчитывали жизнеспособность клеток путем исключения по окрашиванию трипановым синим. Пять миллионов МСК были помещены в каждую из 4 пробирок типа Эппендорф, центрифугировали и ресуспендировали в 1 мл каждой из указанных сред. Пробирки хранили в холодном помещении при 4°C в течение указанного периода времени.

CS=собачья сыворотка; FBS=фетальная бычья сыворотка. На фиг. 8 показано, что композиция в среде GS2, как с сывороткой, так и без сыворотки, повышает жизнеспособность МСК и увеличивает время хранения МСК.

На фиг. 9 показано, что более высокая плотность клеток (измеряемая в миллионах клеток на 1 мл) повышает жизнеспособность МСК при хранении в среде GS2. Было обнаружено, что наличие сыворотки (в данном случае FBS) имеет небольшое влияние на жизнеспособность клеток после их хранения в среде GS2 в течение 24 ч (указано стрелкой).

На фиг. 10 показано, что жизнеспособность МСК сохраняется после хранения в среде GS2 при 4°C и последующем выдавливании через иглу/шприц калибром 26G.

Пример 10. Пример сертификата анализа для транспортной среды GS2

В рамках контроля качества было проведено несколько тестов рассматриваемой транспортной среды, предназначенной для применения у больных людей и/или для ветеринарного применения. Это тестирование было предназначено для достижения максимальной полезности среды как компонента фармацевтических или хирургических манипуляций, и для максимального снижения риска неблагоприятных реакций или событий. Например, эндотоксины являются чрезвычайно мощными, термоустойчивыми и проходят через большинство стерилизующих мембранных фильтров, и присутствуют везде, где находятся или находились бактерии. Эндотоксины представляют собой наибольшую проблему в случае применения транспортной среды для местного введения, например, в субретинальном пространстве, и указанное введение предполагается осуществлять с применением композиции клеток ПЭС для инъекций. Таким образом, транспортные композиции GS2 были подвергнуты ряду анализов, и в результате было выявлено соответствие следующим критериям:

Анализ	Способ	Спецификация
Стерильность	Иммерсионный способ USP/21 CFR 610.12	отрицательно
Эндотоксин	Эндотоксин-специфичный турбидиметрический способ	<0,20 EU/мл
pH при 25 \pm 2 ° C	pH - электрод	6,8-7,8
Осмоляльность	осмометр	270-345 мОм
Рост клеток ПЭС	рост клеток (после хранения в GS2)	\geq 25000 клеток/на лунку
Жизнеспособность клеток ПЭС	тест с исключением по окрашиванию трипановым синим (после хранения в GS2)	\geq 79%
Плотность жизнеспособных клеток ПЭС	Подсчет жизнеспособных клеток (после хранения в GS2)	\geq 0,7 от заявленной плотности клеток

Пример 11. Тестирование транспортной среды способом светоблокировки

Также в рамках контроля качества, в частности, для использования клеток в композиции для применения у больных людей, транспортная среда настоящего изобретения в общем не будет содержать неприемлемое количество твердых частиц. Твердые частицы состоят из подвижных нерастворенных частиц (то есть, которые не являются газовыми пузырьками), которые, как правило, нельзя определить количественно с помощью химического анализа по причине малого количества имеющегося материала и его гетерогенности. При испытании способом светоблокировки (USP, методика тестирования 788), то есть, при подсчете твердых частиц с использованием электронного счетчика частиц было показано, что композиции транспортных сред по настоящему изобретению имеют не более 25 частиц размером \geq 10

микрон на мл транспортной среды и не более 3 частиц размером ≥ 25 мкм на мл транспортной среды.

Методика USP 788 относится к технологии определения твердых частиц способом 1 (тест с подсчетом частиц со светоблокировкой) и способом 2 (тест с подсчетом частиц путем микроскопии). При исследовании транспортной среды на наличие невидимых невооруженным глазом частиц предпочтительно применяют способ 1. Вместе с тем, в некоторых случаях рассматриваемых композиций, для заключения о соответствии требованиям может потребоваться анализ композиций путем подсчета частиц со светоблокировкой с последующей микроскопией для подсчета частиц.

Не все парентеральные композиции могут быть проанализированы на наличие невидимых невооруженным глазом частиц с помощью одного или обоих указанных способов. Если способ 1 не применим, например, в случае композиций, имеющих пониженную прозрачность или повышенную вязкость, испытание следует проводить по способу 2, например, если транспортная среда включает в качестве компонентов коллоиды или липосомы. Аналогичным образом, для тех вариантов осуществления транспортной среды, в которых возможно образование воздушных или газовых пузырьков при засасывании в датчик, может также потребоваться микроскопия с подсчетом частиц. В рассматриваемых предпочтительных вариантах осуществления транспортная среда является не слишком вязкой. Но если вязкость тестируемой композиции является достаточно высокой, настолько, что исключается возможность проведения анализа каким-либо способом, можно применить количественный анализ с разведением подходящим разбавителем для уменьшения вязкости, при необходимости, что даст возможность провести необходимый анализ.

Способ 1 USP. Тест с подсчетом частиц со светоблокировкой

Образцы транспортной среды GS2, с компонентами в виде гиалуроновой кислоты и без таких компонентов, тестировали в подходящем аппарате, основанном на принципе блокировки света, что позволяет автоматически определять размер частиц и количество частиц по размеру. Аппарат был откалиброван с использованием дисперсий сферических частиц известных размеров в диапазоне от 10 до 25 мкм, согласно методике USP по подсчету количества частиц по стандартному образцу. Эти стандартные частицы диспергированы в воде, не содержащей частиц. Особое внимание уделено тому, чтобы избежать агрегации частиц во время диспергирования. Тесты на твердые частицы проводились в условиях ограничения твердых частиц, а именно, в ламинарном шкафу. Стеклопосуду и фильтрационное оборудование очень тщательно промывали и ополаскивали. Непосредственно перед использованием оборудование ополаскивали сверху вниз, снаружи и внутри водой, не содержащей частиц. Количество используемых тестовых образцов было достаточным для обеспечения статистически обоснованной оценки тестируемой транспортной среды, и образцы анализировали на количество частиц, размер которых равен или превышал 10 и 25 мкм. Был проанализирован каждый из образцов транспортной среды GS2, и эти образцы включали ≤ 25 частиц размером ≥ 10 мкм на мл транспортной среды, и ≤ 3 частиц размером ≥ 25 мкм на мл транспортной среды.

Пример 12. Подтверждение жизнеспособности клеток ПЭС *in vivo* и эффективности в среде GS2

Целью этого исследования была оценка и сравнение безопасности, приживления и функциональности следующих клеток: 1) клетки пигментного эпителия сетчатки (человеческие клетки hRPE /чПЭС), полученные из эмбриональных стволовых клеток (ЭС) линии MA09, которые в композиции с BSS PLUS® были трансплантированы в пределах 4 ч; 2) клетки чПЭС, полученные из ЭС клеток линии J1, в композиции с BSS PLUS®; и 3) клетки чПЭС, полученные из клеточной линии J1, которые в композиции с транспортной средой GS2 были трансплантированы (а) в течение 22-28 ч и (б) в течение 44-52 ч. В этом исследовании подтверждено, что среда GS2 продлевает срок годности конечного продукта по сравнению с используемой в настоящее время композицией медицинской среды (BSS PLUS).

Для исследования были получены в общей сложности 32 детеныша крыс RCS (Royal College of Surgeon) (16 самцов и 16 самок). Возраст крыс составлял от 21 до 25 дней на момент начала введения.

Период акклиматизации: минимум 7 дней. День 1 соответствует дню субретинальной инъекции.

Схема эксперимента: Восемь крыс RCS (по 4 каждого пола) были рандомизированы на четыре группы введения: MA-09-hRPE (группа 1) и J1-hRPE (группы 2, 3, 4), каждая из которых состояла из трех подгрупп (табл. 1 ниже). Всем крысам провели субретинальную инъекцию клеток hRPE в правый глаз (OD) транссклеральным путем введения под анестезией. Группе 1 вводили клетки MA-09 hRPE в BSS PLUS® (в течение 4 ч), группе 2 вводили клетки J1-hRPE в BSS PLUS® (в течение 4 ч), группе 3 вводили клетки J1-hRPE в GS2 (в течение 22-28 ч) и группе 4 вводили клетки J1-hRPE в GS2 (в течение 44-52 ч). Подгруппы были распределены по введению в левый глаз; мнимая подгруппа (по 1 крысе каждого пола) получала только прокол иглой в субретинальное пространство левого глаза; подгруппа без введения (NI или интактная) (по 1 каждого пола) не получала инъекции в левый глаз; и две подгруппы с введением носителя (по 2 крысы каждого пола) получали субретинальную инъекцию или среды GS2 или BSS PLUS. Крысы были умерщвлены через 70-80 дней после инъекции.

Таблица 1. Схема экспериментальных исследований

Группа	Подгруппа	Доза субретинальной инъекции		
		Число крыс	Левый глаз (OS) (контроль)	Правый глаз (OD), клетки ПЭС
1 (MA-09-hRPE в BSS PLUS® (в течение 4 часов))	a	1M/1F	NI	MA-09-hRPE
	b	1M/1F	Мнимое	MA-09-hRPE
	c	2M/2F	Носитель (BSS PLUS)	MA-09-hRPE
2 J1-hRPE в BSS PLUS® (в течение 4 часов)	d	1M/1F	NI	J1-hRPE
	e	1M/1F	Мнимое	J1-hRPE
	f	2M/2F	Носитель (BSS PLUS)	J1-hRPE
3 (J1-hRPE в GS2 (в течение 22-28 часов))	g	1M/1F	NI	J1-hRPE
	h	1M/1F	Мнимое	J1-hRPE
	i	2M/2F	Носитель (GS2)	J1-hRPE
4 (J1-hRPE в GS2 (в течение 44-52 часов))	j	1M/1F	NI	J1-hRPE
	k	1M/1F	Мнимое	J1-hRPE
	l	2M/2F	Носитель (GS2)	J1-hRPE

NI=без инъекции; мнимое=прокол субретинального пространства пустым шприцем.

BSS PLUS®=2 мкл носителя (без клеток);

GS2=2 мкл носителя (без клеток)

hRPE=100000 клеток ПЭС в носителе BSS PLUS® или GS2.

Результаты прижизненных измерений, показателей аутопсии и гистопатологии для оценок проведенных исследований представлены в табл. 2 ниже.

Таблица 2. Параметры оценки и интервалы

Показатели	Приблизительные интервалы (число дней после инъекции)
Клинический осмотр	по меньшей мере ежедневно
Масса тела/рацион	еженедельно
Осмотр глаз	перед введением и на день 40±3 и день 70±3 после операции (оба периода)
Оptomоторные данные (слежение за поворотом головы)	на день 40±3 и день 70±3 после операции
ЭРГ (электроретинография)	на день 40±3 и день 70±3 после операции
Оптическая когерентная томография	на день 70±4 после операции
Порог яркости	на день от 70 до 80 после операции
Полная аутопсия	в конце исследования, включая заметные грубые повреждения
Сбор образцов ткани	Мозг, нижнечелюстных лимфатических узлов, сердце, печень, почки, селезенка и легкие. Сохранение тканей для архивных целей.
Вес органов	Мозг, сердце, печень, почки, селезенка и легкие
Гистопатология	Глаза и зрительные нервы, и любые макроскопические повреждения
Иммуноокрашивание	Глаза и зрительные нервы

Среду BSS PLUS® разводили в день введения в соответствии с указаниями и хранили охлажденной (от 2 до 8°C) для использования в целях разбавления клеток ПЭС для получения композиции, а также для использования хирургом с целью заполнения устройства для инъекций и использования в качестве эталонного носителя. Коротко, содержимое BSS Plus® в качестве части II вносили в содержимое BSS PLUS® в качестве части I и использовали для ресуспендирования клеток ПЭС в течение 6 часов после разведения. Время разведения и инъекции регистрировали и сохраняли в записях исследований.

Порцию среды GS2, используемой в данном исследовании, готовили и хранили при температуре от

2 до 8°C. GS2 использовали при комнатной температуре для промывки клетки в ходе изготовления композиции, и при температуре от 2 до 8°C для клеток ПЭС в конечной композиции, а также для использования хирургом с целью заполнения устройства для инъекций и использования в качестве эталонного носителя.

Подготовка BBS PLUS: Криоконсервированные клетки MA09-hRPE и клетки J1-hRPE хранили в жидком азоте (LN2), чтобы поддерживать клетки в паровой фазе при температуре $\leq 135^\circ\text{C}$. Клетки сохранялись в условиях LN2 до дня обработки и трансплантации. В день трансплантации криоконсервированные клетки чПЭС оттаивали и готовили композицию с BSS PLUS® в концентрации приблизительно 50000 жизнеспособных клеток/мкл. Концентрированные клетки чПЭС приносили хирургу в пробирке, наполненной конечным продуктом, который помещали на мокрый лед в охладителе Labtop Cooler для использования в течение 4 ч от момента изготовления композиции (фиг. 11, см. "MA-09-RPE <4 ч" и "J1-RPE <4 ч"). Время разведения и инъекции регистрировали и сохраняли в записях исследований.

Композиции GS2: Криоконсервированные клетки J1-hRPE хранили в жидком азоте (LN2) в химической паровой фазе при температуре $\leq 135^\circ\text{C}$. Клетки сохранялись в условиях LN2 до дня обработки. За один или два дня до трансплантации клетки J1-hRPE оттаивали и готовили композицию с GS2 в концентрации приблизительно 1500 жизнеспособных клеток /мкл. Затем клетки ПЭС в композиции сохраняли при температуре от 2 до 8°C и оценивали количество жизнеспособных клеток через 2-6 ч после изготовления композиции. Приблизительно через 20 или 42 ч после изготовления композиции клетки ПЭС концентрировали в среде GS2 до концентрации приблизительно 50000 жизнеспособных клеток/мкл. Концентрированные клетки чПЭС приносили хирургу в пробирке, наполненной конечным продуктом, который помещали на мокрый лед в охладителе Labtop Cooler. Затем выполняли трансплантацию клеток ПЭС приблизительно через 22 часа или 44 часа после изготовления композиции с GS2 (фиг. 11, см. "J1-RPE < 22 ч" и "J1-RPE < 44 ч" соответственно).

Доза введения: субретинальная инъекция

Животным проводили анестезию смесью кетамина (75 мг/кг) и дексметомидина (0,25 мг/кг), с последующим введением Карпрофена (5 мг/кг) путем подкожного (п/к) введения. Перед введением глаза промывали 0,9% натрия хлорида для инъекций (стерильный NaCl), USP. Затем глаза очищали 2 каплями 0,3% офтальмологического раствора Окуфлюкс (USP) и расширяли с помощью мидриатических капель (1% тропикамид), с последующим применением офтальмологического раствора 2,5% фенилэфрина гидрохлорида (USP). Тестируемые продукты, клетки чПЭС MA09 и J1 в BSS PLUS® вводили в течение от 0,25 до 4 ч после изготовления композиции (группы 1 и 2, табл. 1). Тестируемый продукт клетки J1-hRPE в GS2 вводили в течение 22 или 44 ч после изготовления композиции (группы 3 и 4, табл. 1). Тестируемые продукты для каждой группы (группы введения или клеток MA09-hRPE или клеток J1-hRPE) были введены путем субретинальной инъекции в правый глаз у 8 животных в каждой группе, как указано в описании эксперимента выше (и в таблице 1). В левый глаз у четырех животных в каждой из групп 1 и 2 вводили эталонный продукт BSS PLUS®. В левый глаз у четырех животных в каждой из групп 3 и 4 вводили эталонный продукт GS2. В левый глаз у двух животных в каждой из четырех групп была сделана процедура инъекции, но без введения какого-либо материала (мнимая инъекция). Левые глаза остальных двух животных в каждой из четырех групп оставались без инъекции (интактные).

Коротко, субретинальные инъекции выполняли с помощью операционного микроскопа. Глаза были стабилизированы с помощью шовного материала (Ethicon 4-0 Perma-Hand Silk®) позади экватора глазного яблока с помощью петли кисетного шва вокруг глазного яблока. Раствор гипромеллозы (или аналогичный раствор) наносили на глаз и фиксировали на месте с помощью кольца. Ножницами срезали небольшую часть конъюнктивы, и металлическую иглу 30 G $\times \frac{1}{2}$ " использовали для выполнения склеротомии в верхней дорсальной височной области глазного яблока. Дозирующее устройство состоит из калиброванной стерильной стеклянной пипетки (World Precision Instruments, изделие #1B150-4), соединенной с пластиковой трубкой с каналом приблизительно 0,8 мм Tygon™ (Saint-Gobain Performance Plastics #P-3603), соединенной с тупоконечной иглой 18G (Becton-Dickenson, Inc. Reference #305196), подсоединенной к 25 мкл шприцу Hamilton (модель # 702 LT, в каталоге #804010, предварительно наполненному подходящим носителем, как описано в схеме эксперимента (табл. 1). В систему вводили небольшое количество воздуха, чтобы в дозирующем устройстве отделить инъецируемый объем от носителя, после чего тестируемые или эталонные продукты набирали в стеклянную пипетку до объема 2 мкл. Для каждой инъекции/каждого глаза использовали новую стерильную стеклянную пипетку.

Склеротомию ушивали нерассасывающимся хирургическим швом (Ethicon Prolene 10-0). Удаляли шов (Ethicon 4-0 Perma-Hand Silk®) вокруг глазного яблока и веко в итоге возвращали в нормальное положение. После завершения процедуры инъекции на глаза наносили местные антибиотики (5 мг/г эритромициновой глазной мази).

Во время операции тщательно регистрировали интраоперационный рисунок глазного дна, чтобы сохранить размер и расположение фильтрационной подушки, а также любые другие офтальмологические изменения.

Животных содержали на теплой подстилке или под греющим одеялом (приблизительно при 37°C)

до полного восстановления, после чего их возвращали в их клетку. Дополнительное нанесение 0,5% эритромициновой глазной мази на поверхность глаза применяли по мере необходимости, чтобы предотвратить высыхание, пока животное полностью не проснется и сможет мигать в нормальном режиме.

Все животные получали перорально циклоспорин А (CsA), вводимый в питьевой воде (210 г/л, с достижением целевой концентрации в крови приблизительно 300 г/л). Также применяли внутрибрюшинное введение дексаметазона один раз в день в течение 14 дней (1,6 мг/кг/день) после операции.

Наблюдения у клетки в отношении смертности/атонального состояния и медицинские наблюдения проводили по меньшей мере один раз в день. Не наблюдалось каких-либо клинических признаков болезни или реакции на лечение. Животных взвешивали по меньшей мере один раз во время акклиматизации, приблизительно один раз в неделю во время исследования и непосредственно перед аутопсией (терминальная масса тела). При исследовании животных не наблюдалось каких-либо исключительных изменений массы тела. Осмотр глаз проводили перед введением, приблизительно на 40-й день после введения дозы и повторно перед аутопсией. Глаза животных расширяли для обследования с помощью 1% тропикамида в дозе 1 капля на глаз. Не было выявлено каких-либо очевидных различий в результатах офтальмологических обследований между разными группами, которым вводили композиции клеток ПЭС. Аналогично, оптокинетические реакции (ОКР) проводили с использованиемдвигающихся полосок разной пространственной частоты, которые измеряли у всех животных в точках времени согласно табл. 2. Остроту зрения измеряли по ОКР для всех глаз, и исследуемых и контрольных. Используемое устройство для оптометрического тестирования (Prusky et al., 2000), состоит из вращающегося цилиндра, покрытого вертикальной синусоидальной дифракционной решеткой, представленной в виртуальном трехмерном (3-D) пространстве на четырех компьютерных мониторах, расположенных квадратом. Крысы свободно размещались на платформе в центре площади, где они следили за решеткой с возвратными движениями головы. Пространственная частота решетки была зафиксирована в положении просмотра путем многократного повторного возвращения "цилиндра" к голове испытуемой крысы. Остроту зрения определяли количественно по увеличению пространственной частоты решетки с использованием психофизической ступенчатой прогрессии, до потери оптокинетического рефлекса, в результате чего достигался максимальный порог. Измерения проводились по количеству циклов (cycle/degree). Не было каких-либо очевидных различий, выявленных в исследованиях ОКР, между разными группами, которым вводили композиции клеток ПЭС. Также была проведена спектральная оптическая когерентная томография (SD-OCT), как описано выше, и не было выявлено никаких очевидных различий в результатах офтальмологических исследований между разными группами введения композиций клеток ПЭС. Крысам проводили анестезию путем интраперитонеальной (и/п) инъекции анестетиков. Тропикамид наносили на оба глаза для расширения зрачков, в целях улучшения визуализации сетчатки. Крысы были помещены в систему формирования изображения. Глазные капли Джентил и Систейн наносили на роговицу, чтобы поддерживать роговицу во влажном состоянии.

На фиг. 11 показаны результаты электроретинограмм (ЭРГ) на 60 дней после введения в группе из 16 крыс. Как указано выше, не было каких-либо очевидных различий, выявленных по результатам ЭРГ между разными группами введения композиций клеток ПЭС. Коротко, животных содержали в полной темноте в течение ночи (по меньшей мере 12 ч) для приведения сетчатки в состояние адаптации к темноте. Для регистрации ЭРГ животных анестезировали с помощью и/п инъекции анестезирующего вещества и помещали в стереотаксический держатель головы. При тусклом красном свете записывающий электрод (две коаксиальные проволочные петли, диаметр проволоки 50 мкм, прикрепленные к нейтральной контактной линзе) помещали на глаз животного, предварительно обработанного лидокаином. Одну из задних конечностей фиксировали для удаления шерсти электрической машинкой для стрижки, затем кожу обрабатывали бетадином перед установкой канюли (канюлю вставляли в мышцу задней конечности на все время манипуляции). Для расширения зрачка вводили Тропикамид. Перед началом регистрации проводили дополнительный 1-часовой период адаптации к темноте для восстановления адаптации после подготовки животных. Вся запись ЭРГ продолжалась приблизительно 20 мин для обоих глаз (глаза обследовали последовательно, слева направо, или справа налево). Для раздражения глаз применяли световые вспышки в полном поле. Корнеальные потенциалы регистрировали с усилителем, подключенным к электроду. Подачу вспышек контролировали с помощью компьютерной программы. Для результатов использовали средние значения реакций в течение 5-100 раздражающих вспышек, в зависимости от мощности электроретинографии, которая может быть очень низкой у животных с прогрессирующей дегенерацией сетчатки.

В целом, результаты этих исследований указывают на то, что транспортная среда GS2 обеспечивает приблизительно одинаково эффективное количество жизнеспособных и функциональных клеток ПЭС даже после пребывания в течение 44 ч в суспензии в транспортной среде GS2, по сравнению со средой BSS PLUS после суспендирования в течение менее чем 4 ч. При этом срок 4 ч является сроком годности, одобренным FDA (Управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами США) и EMA (Европейским агентством по лекарственным средствам) при использовании BSS PLUS для инъекций клеток ПЭС. В каждом случае, в контроле, при мнимом введении и в интактных глазах животных не было выявлено каких-либо улучшений по сравнению с группами животных, в глаза которых вво-

дили клетки ПЭС в транспортных средах BSS-PLUS и GS2.

Эквиваленты и объем, включение путем ссылки

Специалистам в данной области будет понятно или они смогут определить с помощью не более чем рутинных экспериментов, что для описанных в настоящем изобретении вариантов осуществления существует множество эквивалентов. Объем настоящего изобретения не следует ограничивать приведенным выше описанием, скорее он изложен в прилагаемой формуле изобретения.

Формы единственного числа включают и единственное, и множественное число, если из контекста явно не следует иное. Так, например, ссылка на "вещество" включает одно вещество и множество таких веществ.

Пункты формулы изобретения или описания, которые содержат союз "или" между двумя или несколькими членами группы, считаются выполненными, если присутствует один, более одного или все члены группы, если не указано иное или иным образом очевидно из контекста. Раскрытие группы, которая включает союз "или" между двумя или несколькими членами группы, относится к вариантам осуществления, в которых точно присутствует один член группы, к вариантам осуществления, в которых присутствует более чем один член группы, и к вариантам осуществления, в которых присутствуют все члены группы. В целях краткости эти варианты не были по отдельности изложены в изобретении, но следует понимать, что каждый из этих вариантов осуществления рассмотрен в изобретении и может быть конкретно заявлен или отвергнут в формуле изобретения.

Следует понимать, что изобретение охватывает все варианты, комбинации и изменения, в которых одно или несколько ограничений, элементов, частей или описательных терминов, из одного или нескольких пунктов формулы изобретения или из одного или нескольких соответствующих разделов описания, введены в другой пункт формулы изобретения. Например, пункт формулы изобретения, который зависит от другого пункта формулы изобретения, может быть изменен, чтобы включать одно или несколько ограничений, выявленных в любом другом пункте формулы изобретения, который зависит от того же самого базового пункта формулы изобретения. Кроме того, если в пунктах формулы изобретения рассмотрена композиция, следует понимать, что включены способы изготовления или использования этой композиции в соответствии с любым из способов изготовления или использования, описанных в изобретении, или в соответствии с известными в данной области способами, если таковые имеются, если не указано иное, или если специалистам в данной области очевидно, что может возникнуть противоречие или несоответствие.

Если элементы представлены в виде списков, например, в формате группы Маркуша, следует понимать, что также раскрыты все возможные подгруппы элементов и что из группы можно удалить любой элемент или подгруппу элементов. Также следует отметить, что термин "содержащий" является открытым и допускает включение дополнительных элементов или этапов. Следует понимать, что, в общем, если вариант осуществления, продукт или способ упомянуты как включающие отдельные элементы, признаки или этапы, то изобретение также относится к вариантам осуществления, продуктам или способам, которые состоят или состоят по существу из таких элементов, признаков или этапов. В целях краткости эти варианты не были по отдельности изложены в изобретении, но следует понимать, что каждый из этих вариантов осуществления относится к изобретению, и может быть конкретно указан или отвергнут в формуле изобретения.

Если заданы диапазоны, то включены конечные точки. Кроме того, следует понимать, что если не иное указано или иным образом очевидно из контекста и/или известно рядовому специалисту в данной области, выраженные в виде диапазонов значения могут подразумевать любое конкретное значение в пределах указанных диапазонов в некоторых вариантах осуществления, до десятых долей единицы нижнего предела диапазона, если из контекста явно не следует иное. В целях краткости, значение в каждом диапазоне не было отдельно изложено в настоящем изобретении, но следует понимать, что каждое из этих значений представлено в изобретении и может быть конкретно указано или отвергнуто в формуле изобретения. Также следует понимать, что если иное не указано или иным образом очевидно из контекста и/или известно рядовому специалисту в данной области, выраженные в виде диапазонов значения могут подразумевать любой поддиапазон в пределах заданного диапазона, при этом конечные точки поддиапазона выражены со степенью точности до десятых долей единицы нижнего предела диапазона.

Дополнительно следует понимать, что любой конкретный вариант осуществления настоящего изобретения может быть явно исключен из любого одного или нескольких пунктов формулы изобретения. Если указаны диапазоны, любое значение в пределах диапазона явно может быть исключено из любого одного или нескольких пунктов формулы изобретения. Любой вариант осуществления, элемент, функция, применение или аспект композиций и/или способов по настоящему изобретению может быть исключен из любых одного или нескольких пунктов формулы изобретения. В целях краткости, все варианты осуществления, в которых исключены один или несколько элементов, признаков, целей или аспектов, в настоящем изобретении не указаны явно.

Все публикации, патенты, патентные заявки, публикации и записи в базах данных (например, значения в базе данных последовательностей), упомянутые в изобретении, например в разделах Уровень, Сущность, Подробное описание, Примеры и/или Ссылки, включены в настоящее изобретение в качестве

ссылки в полном объеме, как если бы каждая отдельная публикация, патент, патентная заявка, публикация и запись в базе данных была конкретно и отдельно включена в настоящее изобретение путем ссылки. В случае противоречий приоритет остается за настоящей заявкой, включая любые определения из данного документа.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Раствор для хранения клеток и/или для инъекции пациенту, содержащий приблизительно 0,5-0,9 мМ CaCl_2 , приблизительно 0,2-0,4 мМ MgCl_2 , приблизительно 1,6-2,4 мМ KCl , приблизительно 0,8-1,2 мМ цитрата натрия, приблизительно 13-19 мМ декстрозы и приблизительно 116-174 мМ NaCl .
2. Раствор для хранения клеток и/или для инъекции пациенту, содержащий приблизительно 0,68-1,02% NaCl , приблизительно 0,008-0,012% дигидрата CaCl_2 , приблизительно 0,012-0,018% KCl , приблизительно 0,0048-0,0072% гексагидрата MgCl_2 , приблизительно 0,028-0,042% дигидрата цитрата натрия и приблизительно 0,23-0,35% декстрозы.
3. Раствор для хранения клеток и/или для инъекции пациенту, содержащий приблизительно 0,1-1,2 мМ CaCl_2 , приблизительно 0,05-5 мМ MgCl_2 , приблизительно 1-2,5 мМ KCl , приблизительно 0,5-2 мМ цитрата натрия, приблизительно от 15-17 мМ декстрозы и приблизительно 125-175 мМ NaCl .
4. Раствор согласно п.1, содержащий приблизительно 0,85% NaCl , приблизительно 0,01% CaCl_2 дигидрата, приблизительно 0,015% KCl , приблизительно 0,006% MgCl_2 гексагидрата, приблизительно 0,035% дигидрата цитрата натрия, по меньшей мере приблизительно 0,25% декстрозы.
5. Раствор согласно п.1, содержащий приблизительно 0,9 мМ CaCl_2 , приблизительно 0,3 мМ MgCl_2 , приблизительно 2 мМ KCl , приблизительно 1,2 мМ цитрата натрия, приблизительно 15 мМ декстрозы, приблизительно 145 мМ NaCl .
6. Раствор по любому из пп.1-3, где раствор дополнительно содержит ацетат натрия.
7. Раствор по любому из пп.1-6, где раствор дополнительно содержит вязкоупругий полимер.
8. Раствор по п.7, где концентрация полимера составляет 0,005-5% вес/объем, 0,01-0,05% вес/объем или приблизительно 0,05% вес/объем.
9. Раствор по п.7, где концентрация полимера составляет приблизительно 0,05% вес/объем.
10. Раствор по п.7 или 8, где полимер представляет собой гиалуроновую кислоту или ее соль или сольват.
11. Раствор по п.10, где полимер представляет собой гиалуронат натрия.
12. Раствор согласно любому из пп.1-11, при этом указанный раствор можно:
 - (а) хранить в течение по меньшей мере 48 ч при 25°C без измеримого осаждения растворенных веществ и/или измеримой потери способности раствора поддерживать выживание и жизнеспособность клеток, хранящихся в этом растворе, и/или
 - (б) хранить в течение по меньшей мере 48 ч при температуре 2-8°C без измеримого осаждения растворенных веществ и/или измеримой потери способности раствора поддерживать выживание и жизнеспособность клеток, хранящихся в этом растворе.
13. Раствор по любому из пп.1-12, дополнительно содержащий популяцию клеток.
14. Раствор по п.13, где популяция клеток:
 - (а) подходит для трансплантации субъекту, кроме того, необязательно подходит для трансплантации в глаз субъекта,
 - (б) содержит клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС),
 - (с) содержит фоторецепторные клетки и/или
 - (д) содержит мезенхимальные клетки.
15. Раствор по п.13 или 14, где раствор хранят в течение по меньшей мере 4, по меньшей мере 6, по меньшей мере 12, по меньшей мере 24, по меньшей мере 36 или по меньшей мере 48 ч.
16. Раствор по любому из пп.1-15, где раствор по существу является апирогенным.
17. Раствор по любому из пп.1-16, где раствор является стерильным.
18. Способ получения клеточной композиции, содержащей популяцию клеток в растворе согласно любому из пп.1-12, где указанный способ включает контактирование популяции клеток с раствором.
19. Способ по п.18, где указанный способ включает контактирование популяции криоконсервированных или осажденных клеток с раствором и таким образом осуществляют разведение клеток.
20. Способ по п.18 или 19, где способ дополнительно включает хранение клеточной композиции в течение по меньшей мере 4, по меньшей мере 6, по меньшей мере 12, по меньшей мере 18, по меньшей мере 24, по меньшей мере 36, по меньшей мере 48, по меньшей мере 60 или по меньшей мере 72 ч.
21. Способ по любому из пп.18-20, где клеточная композиция подходит для введения субъекту.
22. Способ по п.21, где указанное введение включает инъекцию клеточной композиции в глаз субъекта.

23. Фармацевтическая композиция для лечения субъекта, имеющего заболевание сетчатки, содержащая популяцию клеток в растворе согласно любому из пп.1-12, при этом фармацевтическая композиция подходит для введения субъекту.

24. Фармацевтическая композиция по п.23, где фармацевтическую композицию хранят в течение по меньшей мере 4, по меньшей мере 6, по меньшей мере 12, по меньшей мере 24, по меньшей мере 36 или по меньшей мере 48 ч.

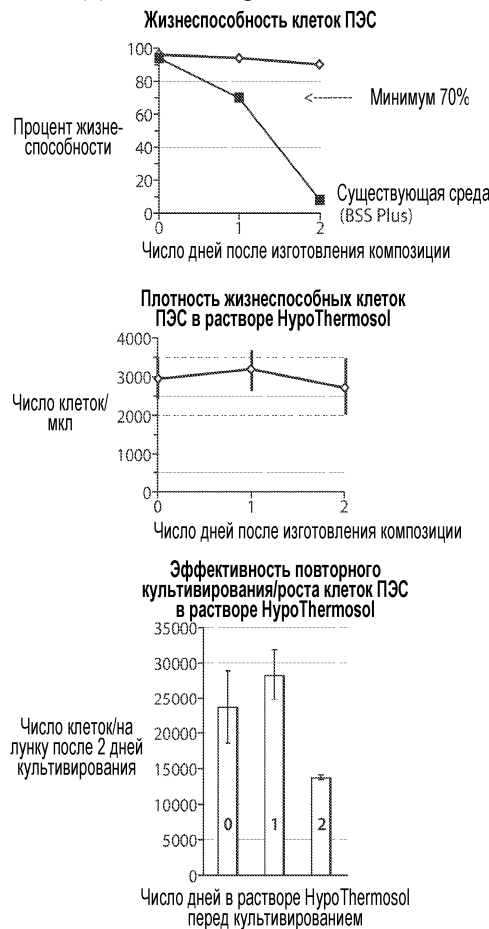
25. Фармацевтическая композиция по п.23 или 24, где заболевание сетчатки представляет собой палочковую или колбочковую дистрофию, дегенерацию сетчатки, пигментный ретинит, диабетическую ретинопатию, макулярную дегенерацию, врожденный амавроз Лебера или болезнь Штаргардта.

26. Набор для получения клеточной композиции для трансплантации, содержащий:

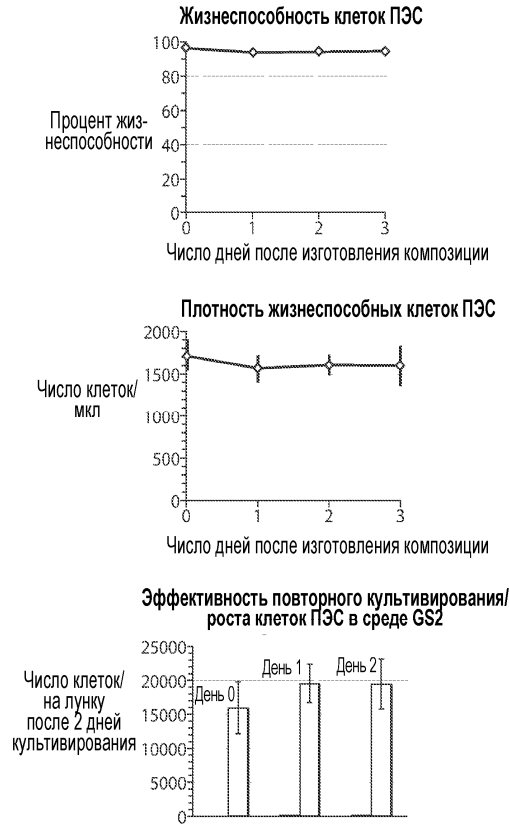
(а) раствор согласно любому из пп.1-12;

(б) инструкции по контактированию клеточной популяции с раствором (а) для получения клеточной композиции и

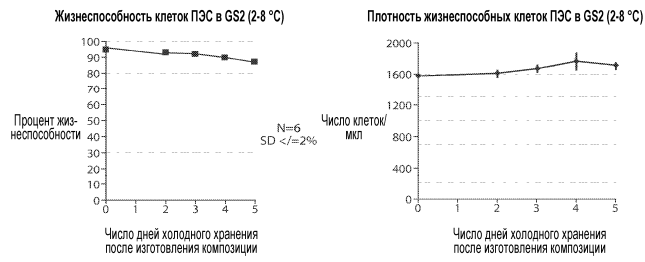
(с) контейнер для контактирования (б) и/или для хранения клеточной композиции (б).



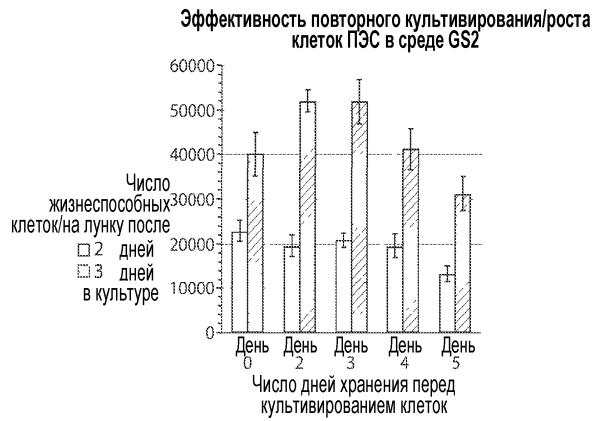
Фиг. 1



Фиг. 2

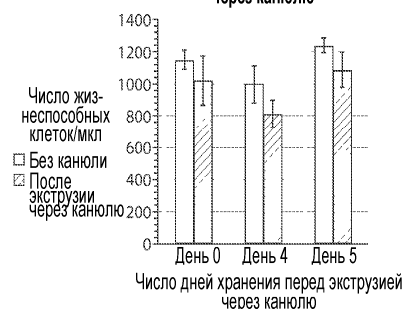


Фиг. 3



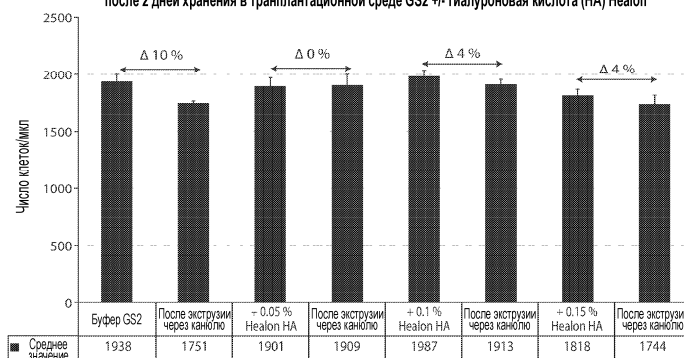
Фиг. 4

Плотность жизнеспособных клеток ПЭС после хранения в среде GS2 и экстразии через канюлю



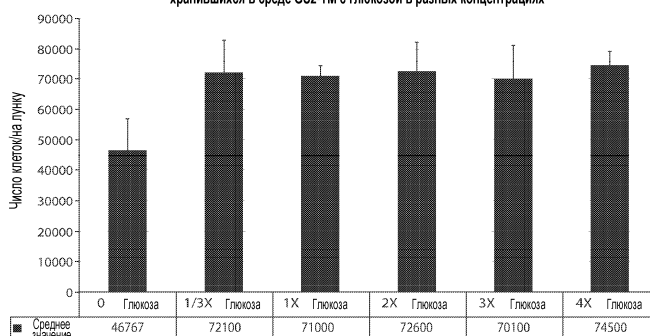
Фиг. 5

Плотность жизнеспособных клеток ПЭС после 2 дней хранения в трансплантационной среде GS2 +/- гиалуроновая кислота (HA) Healon

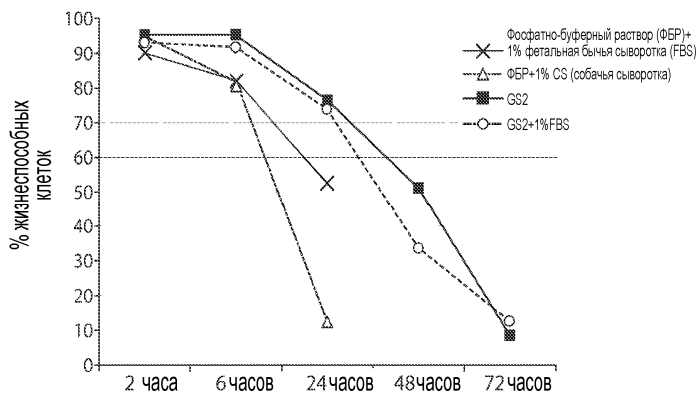


Фиг. 6

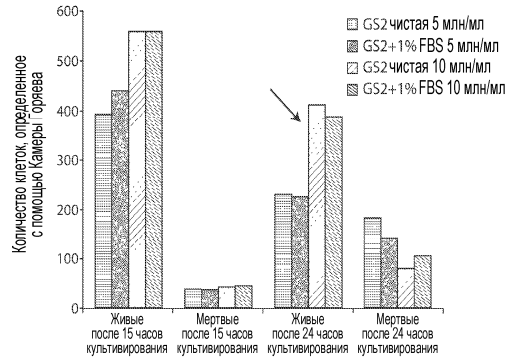
Подсчет клеток после 3 дней роста в 96-луночных планшетах клеток ПЭС, хранившихся в среде GS2-TM с глюкозой в разных концентрациях



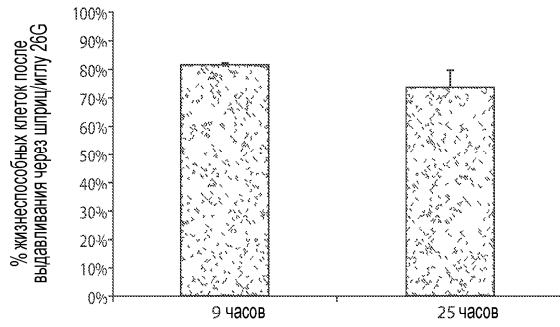
Фиг. 7



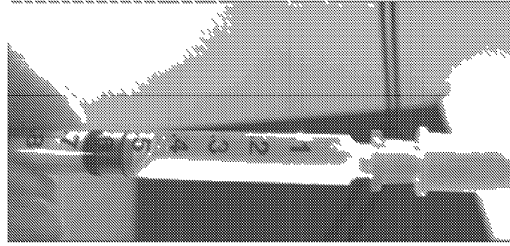
Фиг. 8



Фиг. 9

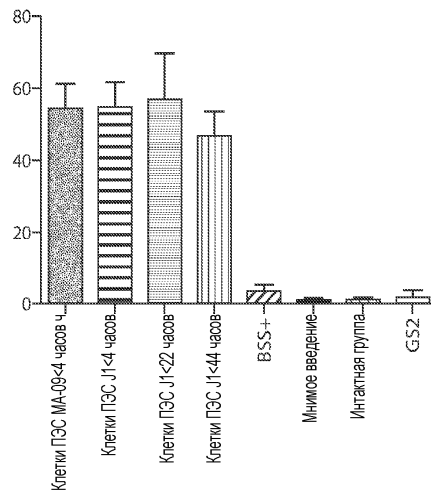


Клетки МСК в шприце через 9 и через 25 часов (показан срок 25 часов)



Фиг. 10

Электроретинограмма (ЭРГ) на 60 день



Фиг. 11