

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **040824**

(13) **B1**

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

- (45) Дата публикации и выдачи патента  
**2022.08.01**
- (21) Номер заявки  
**201992021**
- (22) Дата подачи заявки  
**2010.08.27**
- (51) Int. Cl. *A61F 2/02* (2006.01)  
*A61M 37/00* (2006.01)  
*A61K 35/12* (2006.01)  
*A61P 3/10* (2006.01)  
*C12N 5/00* (2006.01)

---

(54) **СПОСОБ И УСТРОЙСТВО ДЛЯ КЛЕТочНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ**

---

- (31) **61/238,011**
- (32) **2009.08.28**
- (33) **US**
- (43) **2020.08.31**
- (62) **201690437; 2010.08.27**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**СЕРНОВА КОРПОРАЙНШ (СА)**
- (72) Изобретатель:  
**Хасило Крейг, Лойшнер Джастин  
(СА), Хаворт Дэниэл Николас, Шонет  
Саймон (GB), Толейкис Филип  
Майкл, Сирозн Дельфина Мария  
Маццука (СА)**
- (74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**
- (56) **WO-A1-1993008850  
US-A-5733336  
RU-C2-2240755  
US-B1-6689608**

- 
- (57) Описаны устройства и способы для трансплантации клеток в организм хозяина. Устройство содержит пористый каркас, обеспечивающий врастание сосудистых и соединительных тканей, вкладыш или систему вкладышей, выполненные с возможностью размещения в пористом каркасе, а также уплотнитель, выполненный с возможностью закрыть проксимальное отверстие в пористом каркасе. Устройство может дополнительно содержать устройство для доставки клеток, предназначенное для доставки клеток в пористый каркас. Способ трансплантации клеток содержит двухэтапный процесс. Устройство проходит инкубацию в организме хозяина для образования васкуляризованной коллагеновой матрицы вокруг вкладыша, расположенного в пористом каркасе. Далее вкладыш извлекают из пористого каркаса, после чего клетки доставляют в васкуляризованное пространство, созданное в пористом каркасе.

**B1**

**040824**

**040824**

**B1**

Для заявки на данное изобретение испрашивается приоритет по предварительной заявке США № 61/238011, поданной 28 августа 2009 г., которая полностью включена в настоящее описание посредством ссылки.

Настоящее раскрытие относится к области клеточной терапии, конкретнее, к способам и устройствам для трансплантации клеток в организм хозяина.

Недавние открытия в области клеточной терапии предоставляют новые возможности для использования клеточной трансплантации при заболеваниях, острая потребность в лечении которых остается неудовлетворенной. В настоящее время не существует в полной мере эффективной медикаментозной терапии для многих приобретенных и врожденных заболеваний, таких как диабет или болезнь Паркинсона, вызванных потерей или повреждением клеток, продуцирующих биомолекулы, необходимые для контроля физиологических функций. Клеточная терапия дает надежду на замену потерянных или поврежденных клеток донорскими клетками или стволовыми клетками для восстановления нарушенных физиологических функций. Например, трансплантация клеток островков Лангерганса обеспечит средство восстановления управления углеводным обменом у пациентов, страдающих инсулинозависимыми формами диабета. Аналогичным образом трансплантация допаминергических нейронов или нейральных стволовых клеток появилась в качестве перспективной клеточной терапии для лечения болезни Паркинсона.

Основные ограничивающие факторы при применении клеточной терапии - сложность трансплантации клеток в ткань хозяина и обеспечение того, что пересаженные клетки будут продолжать функционировать, не вызывая иммунного ответа и не приводя к другим вредоносным побочным эффектам в организме хозяина. Предпринимались попытки введения терапевтических клеток непосредственно в организм хозяина, например, в сосудистую систему, или путем имплантации в орган или ткань. Однако при прямой клеточной трансплантации пациенту потребуется пожизненная иммунодепрессантная терапия, при этом иммунодепрессантные препараты могут вызывать токсикоз организма хозяина и оказаться токсичными для имплантированных клеток. Кроме того, непосредственный выход клеток в кровь может привести к немедленной воспалительной реакции, опосредованной через кровь (IBMIR), которая инициирует коагуляционный каскад и может разрушить значительную часть трансплантированных клеток. Помимо этого, клетки могут отложиться в микрососудах и привести к блокированию и тромбозу сосудов, что может стать причиной потери функциональных способностей трансплантированных клеток и повреждения местной ткани.

Следующий терапевтический подход заключается в доставке клеток с использованием устройств, обеспечивающих клеткам биологически пригодную среду для пребывания в организме хозяина. Основные проблемы, связанные с данным подходом, инкорпорирование кровеносных сосудов в устройство для питания клеток и поддержания оптимальной среды в устройстве с целью обеспечения длительного выживания клеток. В отсутствие немедленно доступной васкуляризованной среды трансплантированные клетки не имеют возможности получать достаточное количество кислорода и легко избавляться от продуктов выделения, и могут быстро погибнуть или получить повреждения вследствие эффектов ишемии и гипоксии. Кроме того, даже при раннем росте некоторых сосудов, сосуды могут не получать поддержки существования. В дополнение к этому, каскад естественных воспалительных реакций организма также может привести к гибели или повреждению клеток. В число некоторых дополнительных проблем, присутствующих данному подходу, входят образование царапин и/или блокирование устройства, несовместимость материала устройства с биологической средой, сложности визуализации устройства и среды имплантации, неподходящие размеры устройства, отрицательно влияющие на биологические функции клеток, неспособность загрузки соответствующего количества клеток для получения устойчивого терапевтического эффекта, сложность удаления устройства, когда его требуется переместить. Кроме того, конфигурация устройства может не соответствовать внешним контурам тела, что может привести к ненормальному "выступанию" устройства, делая устройство неприемлемым для пациента с эстетической точки зрения.

Таким образом, сохраняется потребность в разработке эффективной технологии для успешной трансплантации терапевтических клеток. В настоящем раскрытии предложены способы и устройства для доставки и поддержки клеток *in vivo* в течение продолжительного отрезка времени, решая при этом множество проблем, свойственных существующим подходам клеточной терапии на основе использования устройств.

В одном аспекте настоящего раскрытия создано устройство для трансплантации клеток в организм хозяина. Устройство содержит пористый каркас, содержащий по меньшей мере одну камеру, имеющую проксимальный конец и дистальный конец, а также по меньшей мере один съемный вкладыш, выполненный с возможностью размещения по меньшей мере в одной камере. Пористый каркас содержит сетку с ячейками, выполненными с возможностью способствовать прорастанию сосудистых и соединительных тканей по меньшей мере в одну камеру. В некоторых вариантах изготовления пористый каркас содержит полипропиленовую сетку.

В другом варианте изготовления настоящего раскрытия представлено устройство для имплантации клеток в организм хозяина, при этом устройство содержит пористый каркас, содержащий одну или несколько камер, имеющих проксимальный конец и дистальный конец, а также отверстие на проксималь-

ном конце или дистальном конце, либо и на проксимальном конце, и на дистальном конце. Пористый каркас содержит сетку с ячейками, выполненными с возможностью способствовать прорастанию сосудистых и соединительных тканей в одну или несколько камер. Устройство также содержит одну или несколько систем с двумя вкладышами, содержащих внешний вкладыш, выполненный с возможностью размещения в одной или нескольких камерах, а также внутренний вкладыш, выполненный с возможностью размещения во внешнем вкладыше. Кроме того, устройство содержит по меньшей мере один уплотнитель, выполненный с возможностью закрыть систему вкладышей в камере, а также закрыть отверстие на проксимальном конце или дистальном конце, либо и на проксимальном конце, и на дистальном конце камеры.

В другом аспекте настоящего раскрытия предложен способ трансплантации клеток в организм хозяина. Способ включает этапы имплантации устройства для удерживания клеток в организме хозяина, при этом устройство содержит пористый каркас, содержащий по меньшей мере одну камеру, имеющую проксимальный конец и дистальный конец. Пористый каркас содержит сетку с ячейками, выполненными с возможностью способствовать прорастанию сосудистых и соединительных тканей по меньшей мере в одну камеру. В некоторых вариантах изготовления пористый каркас содержит полипропиленовую сетку. Устройство дополнительно содержит, меньшей мере, один вкладыш, выполненный с возможностью размещения по меньшей мере в одной камере, при этом по меньшей мере одна камера содержит отверстие на проксимальном конце или дистальном конце, либо и на проксимальном конце, и на дистальном конце. Способ включает этапы закрытия отверстия на проксимальном конце или дистальном конце, либо и на проксимальном конце, и на дистальном конце камеры после имплантации устройства. Способ дополнительно включает поддержание устройства в организме хозяина до проникновения сосудистых и соединительных тканей в пористый каркас, получение доступа к устройству через хирургический надрез, повторное открытие проксимального конца или дистального конца либо и проксимального конца, и дистального конца камеры, извлечение вкладыша из камеры для образования пространства в пористом каркасе, инкапсулированного в васкуляризованную коллагеновую матрицу, доставку клеточного материала в васкуляризованное пространство, а также повторное закрытие отверстия на проксимальном конце или дистальном конце, либо и на проксимальном конце, и на дистальном конце камеры.

В другом альтернативном варианте изготовления в способе имплантации клеток в организм хозяина обеспечено имплантируемое устройство для удерживания клеток в организме хозяина, при этом имплантируемое устройство содержит пористый каркас, имеющий поры, выполненные с возможностью способствовать прорастанию сосудистых и соединительных тканей в пористый каркас, а также по меньшей мере одну систему с двумя вкладышами, выполненную с возможностью размещения в пористом каркасе. Пористый каркас имплантируемого устройства содержит по меньшей мере одну камеру, имеющую отверстие на проксимальном конце или дистальном конце, либо и на проксимальном конце, и на дистальном конце камеры. Устройство содержит уплотнитель для закрытия отверстия на проксимальном или дистальном конце либо и на проксимальном, и на дистальном конце по меньшей мере одной камеры. По меньшей мере одна система вкладышей имплантируемого устройства содержит внешний вкладыш, выполненный с возможностью размещения по меньшей мере в одной камере, а также внутренний вкладыш, выполненный с возможностью размещения во внешнем вкладыше. Способ дополнительно включает этапы имплантации устройства в организм хозяина, поддержания устройства в организме хозяина до проникновения сосудистых и соединительных тканей в пористый каркас, а также обеспечения устройства для доставки клеток, содержащего по меньшей мере одну трубку для инфузии клеток, загруженную клеточным материалом, при этом трубка для инфузии клеток выполнена с возможностью размещения во внешнем вкладыше по меньшей мере одной системы вкладышей. Кроме того, способ включает получение доступа к имплантированному устройству через хирургический надрез и открытие уплотнителя на проксимальном конце или дистальном конце, либо и проксимальном конце, и дистальном конце устройства, извлечение внутреннего вкладыша из системы вкладышей, введение трубки для инфузии клеток в наружный вкладыш, извлечение наружного вкладыша по меньшей мере из одной камеры и одновременное вливание клеточного материала в камеру, а также повторное закрытие уплотнителя. Следует понимать, что как предшествующее общее описание, так и последующее подробное описание лишь служат примером и пояснением, но не ограничивают изобретение, выраженное формулой изобретения.

В следующем аспекте раскрытия предложено устройство для трансплантации клеток, содержащее пористый каркас, имеющий поры, выполненные с возможностью способствовать прорастанию сосудистых и соединительных тканей в пористый каркас, содержащий по меньшей мере одну камеру, но предпочтительно 2-12 камер, при этом пористый каркас имеет покрытие из биосовместимого, биodeградируемого материала, выполненного с возможностью временного заполнения пор каркаса. В некоторых вариантах изготовления пористый каркас содержит полипропиленовую сетку. Пригодные биосовместимые, биodeградируемые материалы включают в себя, например, коллаген, фибронектин, экстрацеллюлярные матричные протеины, а также мембранные белки цитоскелета. В раскрытии также предложен способ трансплантации клеток в организм хозяина, при этом способ содержит имплантацию устройства для трансплантации, содержащего пористый каркас, имеющий поры, выполненные с возможностью способствовать прорастанию сосудистых и соединительных тканей в пористый каркас, содержащий по мень-

шей мере одну камеру, но предпочтительно 2-12 камер, при этом пористый каркас имеет покрытие из биосовместимого, биodeградируемого материала, который временно заполняет поры каркаса, при этом по меньшей мере одна камера заполняется трансплантируемыми клетками и уплотняется.

Прилагаемые чертежи, входящие в состав данного описания и составляющие его часть, совместно с самим описанием иллюстрируют способы и варианты изготовления изобретения.

#### **Краткое описание чертежей**

На фиг. 1А-1Е показаны различные варианты изготовления однокамерного устройства для трансплантации клеток согласно настоящему раскрытию;

на фиг. 1F показан вариант изготовления многокамерного устройства для трансплантации клеток согласно настоящему раскрытию;

на фиг. 2А-2D показаны различные конфигурации сетки, которые могут быть использованы для образования устройства для трансплантации клеток согласно настоящему раскрытию;

на фиг. 3А показано устройство для трансплантации клеток по одному варианту изготовления в настоящем раскрытии;

на фиг. 3В показаны компоненты устройства для трансплантации клеток, представленного на фиг. 1А;

на фиг. 4 показан пористый каркас устройства для трансплантации клеток согласно одному варианту изготовления в настоящем раскрытии;

на фиг. 5А показан уплотнитель устройства для трансплантации клеток согласно одному варианту изготовления в настоящем раскрытии;

на фиг. 5В показан вид в разрезе уплотнителя, представленного на фиг. 3А;

на фиг. 6А показано множество внешних вкладышей системы вкладышей, состоящей из двух частей, устройства для трансплантации клеток согласно одному варианту изготовления в настоящем раскрытии;

на фиг. 6В показан вид в разрезе внешнего вкладыша, представленного на фиг. 5А;

на фиг. 6С показан вид в разрезе системы вкладышей и одного сборочного узла пористого каркаса до имплантации в организм хозяина;

на фиг. 6D показан вид в разрезе сборочного узла, представленного на фиг. 4С, после инкубации в организме хозяина;

на фиг. 6Е показан вид в разрезе пористого каркаса, имплантированного в организм хозяина, после удаления системы вкладышей;

на фиг. 7 показано множество внутренних вкладышей системы вкладышей, состоящей из двух частей, устройства для трансплантации клеток согласно одному варианту изготовления в настоящем раскрытии;

на фиг. 8 показан уплотнитель для закрытия клеток в васкуляризованной камере устройства для трансплантации клеток согласно одному варианту изготовления в настоящем раскрытии;

на фиг. 9А показано устройство для доставки клеток в устройство для трансплантации клеток согласно одному варианту изготовления в настоящем раскрытии;

на фиг. 9В показан механизм для инфузии клеток доставочного устройства, представленного на фиг. 8А;

на фиг. 9С показаны дополнительные этапы работы механизма для инфузии клеток доставочного устройства, представленного на фиг. 8А, 8В;

на фиг. 10 показана блок-схема алгоритма, представляющая этапы реализации способа трансплантации клеток согласно настоящему раскрытию;

на фиг. 11А-11D показан схематичный общий вид определенных этапов процедуры инфузии клеток согласно настоящему раскрытию;

на фиг. 12А показаны линейные диаграммы замеров уровня глюкозы крови после интраперитонеальной имплантации устройств для трансплантации клеток по описанию в примере 1;

на фиг. 12В показаны линейные диаграммы замеров уровня глюкозы крови после подкожной имплантации устройств для трансплантации клеток по описанию в примере 1;

на фиг. 12С показаны линейные диаграммы ответов на внутривенный глюкозотолерантный тест у крыс Льюиса, которые подверглись трансплантации островковых клеток, через 40 дней после трансплантации, через 80 дней после трансплантации, а также после удаления устройства (через 110 дней после трансплантации) по описанию в примере 1;

на фиг. 12D показаны линейные диаграммы уровня инсулина в ответ на нагрузку глюкозой у крыс Льюиса, которые подверглись трансплантации островковых клеток;

на фиг. 13А представлено гистологическое окрашивание на инсулин в камере имплантированного устройства по описанию в примере 2;

на фиг. 13В представлено гистологическое окрашивание на васкуляризацию (микроваскуляризацию) в камере имплантированного устройства по описанию в примере 2;

на фиг. 14 показана таблица средней толщины коллагена и общего количества кровеносных сосудов/см<sup>2</sup>, рассчитанных для четырех устройств для трансплантации клеток согласно вариантам изготовле-

ния в настоящем раскрытии по описанию в примере 3;

на фиг. 15А показано инкорпорирование ткани в устройство для трансплантации клеток через 2, 4 и 8 недель после имплантации по описанию в примере 3;

на фиг. 15В показано образование кровеносных сосудов на различных гранях имплантированного устройства до трансплантации клеток по описанию в примере 3;

на фиг. 16 показаны столбчатые диаграммы уровней инсулина, выработанного зрелыми и незрелыми островковыми клетками по описанию в примере 4;

на фиг. 17А представлено гистологическое окрашивание на инсулин и микроваскуляризацию в камере имплантированного устройства по описанию в примере 4;

на фиг. 17В представлено гистологическое окрашивание на микроваскуляризацию в камере имплантированного устройства после трансплантации клеток по описанию в примере 4;

на фиг. 18 показаны линейные диаграммы уровней глюкозы крови после аутогенной трансплантации островков по описанию в примере 4;

на фиг. 19А показаны линейные диаграммы уровней глюкозы крови в ответ на нагрузку глюкозой у свиней породы йоркшир-ландрас, которые подверглись трансплантации островковых клеток по описанию в примере 4;

на фиг. 19В показаны столбчатые диаграммы площади под кривой (AUC) для уровней глюкозы крови в ответ на нагрузку глюкозой у свиней породы йоркшир-ландрас, которые подверглись трансплантации островковых клеток по описанию в примере 4;

на фиг. 19С показаны линейные диаграммы кратности изменения уровня С-пептида в ответ на нагрузку глюкозой у свиней породы йоркшир-ландрас, которые подверглись трансплантации островковых клеток по описанию в примере 4.

#### **Описание примеров вариантов изготовления**

Далее будут подробно рассмотрены варианты изготовления по настоящему раскрытию, примеры которых представлены на прилагаемых чертежах. Там, где это возможно, для обозначения одинаковых или схожих деталей на всех чертежах будут использованы одинаковые ссылочные позиции. В описании термины "инфузия клеток" и "трансплантация клеток" взаимозаменяемы.

Предложено устройство для трансплантации клеток, предназначенное для содержания клеток *in vivo*. В одном примере варианта изготовления устройство для трансплантации клеток содержит по меньшей мере один пористый каркас, содержащий камеру и имеющий отверстие на проксимальном конце или дистальном конце, либо и на проксимальном конце, и на дистальном конце каркаса, а также по меньшей мере один вкладыш, выполненный с возможностью размещения в камере. Отверстия на одном или обоих концах камеры выполнены с возможностью введения вкладыша в камеру и отвода назад из камеры. В одном варианте изготовления по меньшей мере один пористый каркас имеет трубчатую форму, при этом по меньшей мере один вкладыш имеет форму цилиндра и продолжается вдоль полости по меньшей мере одного пористого каркаса. В некоторых вариантах изготовления пористый каркас открыт только на проксимальном конце. В одном подобном варианте изготовления дистальный конец трубчатого пористого каркаса содержит закругленную или плоскую нижнюю поверхность. В другом варианте изготовления кромки на дистальном конце пористого каркаса выполнены на конус и приходят в соприкосновение друг с другом для уплотнения дистального конца.

В другом примере варианта изготовления устройство для трансплантации клеток содержит пористый каркас, содержащий одну или несколько камер, имеющих проксимальный конец и дистальный конец. Одна или несколько камер содержат отверстие на проксимальном конце. Устройство также содержит одну или несколько систем вкладышей, содержащих внешний вкладыш, выполненный с возможностью размещения в одной или нескольких камерах, а также внутренний вкладыш, выполненный с возможностью размещения во внешнем вкладыше. Кроме того, устройство содержит по меньшей мере один уплотнитель, выполненный с возможностью закрытия системы вкладышей в камере и уплотнения отверстия на проксимальном конце камеры.

Пористый каркас выполнен из биосовместимого материала и должен вызывать лишь умеренную воспалительную реакцию в организме. Умеренное воспаление стимулирует ангиогенез и способствует инкорпорированию васкуляризованной коллагеновой матрицы в устройство, но не приводит к существенным воспалительным процессам вокруг устройства. Примером такого биосовместимого материала служит полипропилен. В примерах вариантов изготовления пористый каркас содержит плетеную полипропиленовую сетку, обладающую достаточной жесткостью, чтобы обеспечить изготовление устройства. Полипропиленовая сетка также выполнена с возможностью обеспечения проникновения микрососудов в устройство и их поддержки в качестве крепких и здоровых сосудов, что принципиально важно для выживания и нормального функционирования терапевтических клеток, инфузировавшихся в устройство.

Путем содействия регулируемому прорастанию васкуляризованной ткани в устройство, пористый каркас предотвращает обволакивание устройства рубцовой тканью. Проросшие ткани также стабилизируют имплантат и предотвращают случайное перемещение устройства *in situ*. Кроме того, в некоторых вариантах изготовления пористый каркас имеет покрытие из биологических или небιологических агентов для стимуляции инкорпорирования ткани и ангиогенеза, например факторов роста. Покрытие на уст-

ройство может наноситься путем окунания в полимерную лекарственную композицию или с использованием других известных технологий нанесения покрытий на устройство. В число примеров биологических или небологических агентов для стимуляции инкорпорирования ткани и ангиогенеза, в частности, входят: VEGF (васкулярный эндотелиальный фактор роста), PDGF (тромбоцитарный фактор роста), FGF-1 (фактор роста фибробластов), NRP-1 (нейропиплин-1), Ang-1, Ang-2 (ангиопозтин-1,2), эндоглин, MCP-1,  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ , CD-31, VE-кадгерин, эприн, активаторы плазминогена, ангиогенин, Del-1, aFGF (кислый фактор роста фибробластов), vFGF (основной фактор роста фибробластов), фоллостатин, G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), HGF (гепатоцитарный фактор роста), IL-8 (интерлейкин-8), лептин, мидкин, плацентарный фактор роста, PD-ECGF (тромбоцитарный эндотелиальный фактор роста), PTN (плейотропин), програнулин, пролиферин, TGF- $\alpha$  и TNF- $\alpha$ .

В некоторых вариантах изготовления наружной поверхности пористого каркаса придана шероховатость для стимуляции проникновения ткани. В некоторых вариантах изготовления пористый каркас включает в себя различные препарат-элюирующие полимерные покрытия. В других вариантах изготовления пористый каркас может иметь покрытие из биодеградируемого и небиодеградируемого полимера, не содержащего лекарственного вещества. Каркас может иметь полимерное покрытие частично или полностью. Репрезентативные полимеры, которые могут быть использованы для покрытия и/или выделения лекарственного вещества, включают, но не ограничиваясь перечисленным, метакрилатные полимеры, полиэтиленимин и сульфат декстрана, сополимер поливинилсилоксана и полиэтиленимина (поли(винилсилоксан)экополимерполиэтиленимин), фосфорилхолин, полиэтилметакрилат, полиуретан, полиэтиленгликоль, сополимер молочной и гликолевой кислот, гидроксиапатит, полимолочная кислота, полигидроксивалерат и его сополимеры, полигидроксипропанат и его сополимеры, поликапролактон, полидиоксанон, полиангидриды, полицианокрилаты, полиаминокислоты, полиортоэфир, полиэфир, коллаген, желатин, целлюлозные полимеры, хитозаны, альгинаты или их сочетания. В число других примеров материалов, которые могут быть использованы в качестве покрытия для каркаса, в частности, входят: коллаген, фибронектин, экстрацеллюлярные матричные протеины, винкулин, агар, а также агароза. Следует понимать, что могут быть использованы различные смеси полимеров.

С учетом выделения лекарственных веществ в некоторых иллюстративных вариантах изготовления пористый каркас содержит антибиотическое покрытие для минимизации инфицирования. Репрезентативные антибиотики включают, но не ограничиваясь перечисленным, ампициллин, тетрациклин, нафциллин, оксациллин, клоксациллин, диклоксациллин, флуклоксациллин, ванкомицин, канамицин, гентамицин, стрептомицин, клиндамицин, триметоприм-сульфаметазол, линезолид, тейкопланин, эритромицин, ципрофлоксацин, рифампин, пенициллин, амоксициллин, сульфонамиды, налидиксовую кислоту, норфлоксацин, ципрофлоксацин, офлоксацин, спарфлоксацин, ломефлоксацин, флероксацин, пефлоксацин, амифлоксацин, 5-фторурацил, хлорамфеникол, полимиксин, митомицин, хлорохин, новобиоцин, нитроимидазол. В другом варианте изготовления пористый каркас содержит бактерицидные агенты. Репрезентативные бактерицидные агенты включают, но не ограничиваясь перечисленным, бензалкония хлорид, хлоргексидина глюконат, сорбиновую кислоту и ее соли, тимеросал, хлорбутанол, фенетиловый спирт, а также п-гидроксибензоат.

В некоторых других вариантах изготовления детали устройства для трансплантации клеток имеют покрытие с участием антифиброзных препаратов для ингибирования образования капсулы из фиброзной ткани. Репрезентативные антифиброзные агенты включают, но не ограничиваясь перечисленным, паклитаксел, еверолиму, такролиму, рапамицин, халофугинон гидробромид, комбретагестин, а также их аналоги и производные (такие как комбретагестин А-1, А-2, А-3, А-4, А-5, А-6, В-1, В-2, В-3, В-4, D-1, D-2 и комбретагестина А-4 фосфат (Оксиджен), доцетаксел, винбластин, винкристин, винкристина сульфат, виндесин, винорелбин, камптотецин, топотекан, иринотекан, этопозид, тенипозид, антрамицин, митоксантрон, меногарил, ногаламицин, аклациномицин А, оливомицин А, хромомицин А3, пликамицин, метотрексат, эдатрексат, триметрексат, ралтитрексид, пиритрексим, деноптерин, томудекс, птероптерин, а также их производные и аналоги. В некоторых вариантах изготовления устройство для трансплантации клеток может также включать в себя полиметилметакрилат или костный цемент, либо другие типы цианоакрилатов.

В некоторых вариантах изготовления пористый каркас выполнен из материала, позволяющего визуализировать имплантированное устройство с использованием, например, технологий МРТ, функционального МРТ, КТ-сканирования, рентгенографии, ультразвукового исследования, ПЭТ-сканирования и т.д. В одном таком варианте изготовления пористый каркас содержит полимерную сетку (например, полипропиленовую, политетрафторэтиленовую (ПТФЭ), полиуретановую, полиэфирные сетки, сетки из шелка и т.д.), которые иммунологически совместимы и позволяют визуализировать новообразованную сосудистую ткань. В другом варианте изготовления пористый каркас содержит комбинацию материалов. В одном таком варианте изготовления пористый каркас содержит сплетенные полипропиленовых и шелковых нитей.

Размер пор материала каркаса подобран так, чтобы способствовать инкорпорированию и васкуляризации в камере пористого каркаса. В некоторых других вариантах изготовления размер пор может ле-

жать в диапазоне от около 50 нм до 5 мм. В одном примере варианта изготовления пористый каркас содержит плетеную полипропиленовую сетку, диаметр пор которой составляет 0,53 мм.

В некоторых вариантах изготовления размер пор подобран так, чтобы не допустить проникновения иммунных клеток или иммунных агентов в имплантированное устройство. В некоторых других вариантах изготовления размер пор не обязательно должен быть выполнен так, чтобы исключить инфильтрацию иммунных клеток или иммунных агентов в устройство. Это происходит в тех случаях, когда, например, устройство используется для трансплантации комбинации клеток, в том числе иммунозащитных клеток (например, клеток Сертоли, мезенхимальных стволовых клеток и т.д.), способных обеспечить иммунную защиту котрансплантированным клеткам. Это также происходит в тех случаях, когда, например, устройство используется для трансплантации сингенных клеток или клеток, полученных от пациента, которому производится трансплантация.

Вкладыш или система вкладышей устройства для трансплантации клеток выполнены с возможностью встраивания в камеру в пористом каркасе. Вкладыш или система вкладышей может содержать непористый материал (например, политетрафторэтилен (ПТФЭ), полипропилен и т.д.), ингибирующий вращение биологической ткани во вкладыш или систему вкладышей. Вкладыш или система вкладышей могут представлять собой полую или цельную конструкцию. Однако если используется полый вкладыш, следует принять меры для предотвращения инфильтрации коллагена или любого другого биологического материала в полость вкладыша, когда устройство имплантировано в ткань организма хозяина. Система вкладышей будет подробнее рассмотрена ниже.

В некоторых вариантах изготовления проксимальный конец вкладыша или системы вкладышей соединены с уплотнителем. В подобном варианте изготовления уплотнитель выполнен с возможностью закрытия проксимального конца камеры, когда вкладыш или система вкладышей полностью введены в камеру пористого каркаса. Уплотнитель выполнен с возможностью удерживания вкладыша или системы вкладышей на своем месте внутри пористого каркаса. В другом варианте изготовления уплотнитель отделен от вкладыша или системы вкладышей. В еще одном варианте изготовления уплотнитель соединен с пористым каркасом. Кроме того, в некоторых примерах вариантов изготовления проксимальный конец камеры закрыт с использованием хирургических нитей и/или сосудистых клипсов без применения отдельного уплотнителя.

Будучи имплантированным в организм хозяина, пористый каркас устройства способствует вращению сосудистой или соединительной ткани, так что вкладыш или система вкладышей, расположенные в каркасе, становятся инкапсулированными в васкуляризованную тканевую матрицу. Когда вкладыш или система вкладышей извлекаются из пористого каркаса, в устройстве образуется неоваскуляризованная камера, которую далее можно использовать для удерживания клеточного материала в организме хозяина.

Размеры пористого каркаса, а также вкладыша или системы вкладышей подобраны так, чтобы обеспечить оптимальное отношение площади поверхности к объему для содержания клеток *in vivo* и для обеспечения длительного выживания клеток в неоваскуляризованной камере. Аналогичным образом количество камер в устройстве для трансплантации определяют на основе объема и/или количества клеток, которые должны быть трансплантированы. В некоторых вариантах изготовления общий объем устройства для трансплантации клеток регулируется путем увеличения или уменьшения числа камер при поддержке оптимального отношения площади поверхности к объему каждой отдельной камеры. В других вариантах изготовления для изменения общего объема регулируется длина камер. По альтернативному варианту в различных вариантах изготовления устройство для трансплантации клеток содержит фиксированное количество камер, однако инфузия клеток проводится только в выбираемое число камер в зависимости от общего требуемого объема устройства. В других вариантах изготовления для изменения общего требуемого объема регулируется как длина камер, так и число камер.

Описанное устройство для трансплантации клеток может имплантироваться либо подкожно, либо интраперитонеально в организм хозяина, в том числе в сальник, или на другом подходящем участке. По альтернативному варианту описанное устройство для трансплантации клеток может имплантироваться частично интраперитонеально в организм хозяина, в том числе в сальник, или на другом подходящем участке, и продолжаться в подкожной среде. В одном варианте изготовления клетки могут загружаться на участок устройства, продолжающийся в подкожной среде, в то время как остальная часть устройства пребывает в интраперитонеальной среде. В другом варианте изготовления устройство для трансплантации клеток может имплантироваться в головной мозг, область спинного мозга или любой другой орган по необходимости для получения терапевтического эффекта от трансплантированных клеток. В большинстве случаев организмом хозяина является человеческий организм, но может быть также иное млекопитающее или немлекопитающее существо. Процедура трансплантации клеток представляет собой двухэтапный процесс, содержащий этап имплантации устройства, за которым следует этап инфузии клеток (трансплантации клеток). Этап инфузии клеток реализуется после инкубационного периода *in vivo*, в течение которого происходит инфильтрация васкуляризованной коллагеновой матрицы в имплантированное устройство. В одном варианте изготовления инкубационный период составляет примерно тридцать дней, что является достаточным временем для ангиогенеза и инфильтрации коллагена в пористый каркас. Инкубационный период может быть продлен или укорочен в зависимости от требуемой или же-

лаемой степени неоваскуляризации или образования ткани (коллагена и клеток). Например, васкуляризация устройств для трансплантации может проходить с различной скоростью в зависимости от материала устройства, размеров или имеющихся покрытий, таких как антибиотические покрытия, факторов роста и т.д. Васкуляризация устройств для трансплантации может также проходить с различной скоростью в различных организмах хозяина или в различных тканях одного организма хозяина. Определение соответствующего инкубационного периода входит в компетенцию специалиста в данной области техники. Например, перед доставкой клеток могут быть проведены визуализирующие исследования, чтобы убедиться, что в процессе инкубационного периода вокруг стенок пористого каркаса и внутри них произошло достаточное отложение сосудистой и/или соединительной ткани. Для выполнения этапа инфузии клеток путем хирургического надреза обеспечивается доступ к участку имплантации, после чего вкладыш или система вкладышей извлекаются из пористого каркаса для образования в каркасе кармана, выстланного коллагеном и кровеносными сосудами. Далее клеточный материал доставляется в васкуляризованный карман, после чего пористый каркас повторно уплотняется. В другом варианте изготовления процедура трансплантации клеток представляет собой одноэтапный процесс, при котором размещение устройства и имплантация клеток происходят в одно и то же время. В этом случае клетки могут размещаться в матрице так, чтобы не происходила их утечка через поры устройства либо, по альтернативному варианту, устройство может иметь покрытие из деградируемого полимера, чтобы предотвратить утечку клеток из устройства в процессе развития коллагена и ангиогенеза.

В некоторых вариантах изготовления до загрузки в камеру любого из устройств для трансплантации, представленных в настоящем описании, трансплантируемые клетки могут быть объединены с биосовместимым вязким раствором или биodeградируемым полимерным материалом. Биodeградируемый полимер обеспечит защиту клеток, пока не произойдет полная васкуляризация устройства в организме хозяина. Данные материалы могут помещаться в камеру до или после размещения устройства в организме хозяина, но до того как в устройстве сформировались коллагеновая матрица и сосудистые структуры. Клетки, объединенные с биосовместимым вязким раствором или биodeградируемым полимерным материалом, особенно целесообразны в устройствах, выполненных с возможностью загрузки клетками до имплантации устройства в организм хозяина. Репрезентативные полимеры, которые могут быть использованы в качестве биodeградируемых материалов совместно с клетками, включают, но не ограничиваясь перечисленным, полиэтиленмин и сульфат декстрана, сополимер поливинилсилоксана и полиэтиленмина, фосфорилхолин, полиэтиленгликоль, сополимер молочной и гликолевой кислот, полимолочная кислота, полигидроксивалерат и его сополимеры, полигидроксibuтират и его сополимеры, полидиоксанон, полиангидриды, полиаминокислоты, полиортоэфир, полиэфиры, коллаген, желатин, целлюлозные полимеры, хитозаны, альгинаты, фибронектин, экстрацеллюлярные матричные протеины, винкулин, агар, агароза, гиалуроновую кислоту, матригель, а также их сочетания.

Следует отметить, что клетки могут размещаться в устройстве; однако клетки также могут быть инкапсулированы. Следующее описание представлено в качестве примера, но не в ограничительном смысле. В число примеров полимерных систем для инкапсуляции клеток входят инкапсуляция в альгинатную оболочку, полисахаридные гидрогели, хитозан, альгинад кальция или бария, слоистая матрица алтината и полилизина, фотополимеризуемый полимер полиэтиленгликоля для инкапсуляции отдельных клеток или клеточных кластеров, поликрилаты, в том числе гидроксиэтилметакрилат, метилметакрилат, силиконовые капсулы, силиконовые нанокапсулы, а также полимембраны (сополимер винилхлорида с акрилонитрилом).

На фиг. 1А-1Е показаны различные примеры вариантов изготовления устройства 1 для трансплантации клеток. Устройство 1 содержит полимерную сетку (например, полипропиленовую сетку, ПТФЭ-сетку или любой другой пригодный материал), образующую пористую камеру 2 для содержания клеток в организме хозяина. В некоторых вариантах изготовления устройство 1 может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более пористых камер 2. Доступность множества камер позволяет использовать любое число или сочетание камер в зависимости от требуемого объема клеточного материала, определение которого находится в компетенцию специалиста в данной области техники.

Как показано на фиг. 1А, устройство 1 содержит проксимальный конец 3, дистальный конец 4, а также вкладыш 5, помещенный в пористую камеру 2. В одном варианте изготовления пористая камера 2 имеет трубчатую форму, при этом вкладыш 5 выполнен в виде цилиндра и продолжается вдоль полости пористой камеры 2. В другом примере варианта изготовления пористая камера 2 содержит отверстие на проксимальном конце 3. Отверстие на проксимальном конце 3 выполнено с возможностью обеспечения введения вкладыша 5 и отвода его назад из пористой камеры 2. В одном таком примере варианта изготовления отверстие на проксимальном конце 3 имеет уплотнение с использованием хирургических нитей и/или сосудистых зажимов в процессе инкубации устройства и после инфузии клеток в устройство. Средний специалист в данной области техники поймет, что для уплотнения отверстия на проксимальном конце 3 может быть использован любой другой хирургический уплотнительный элемент, например, микрососудистые клипсы, зажимы и т.д. В другом варианте изготовления устройство 1 содержит непористый клапан 6 на проксимальном конце 3, как показано на фиг. 1В. В одном таком примере варианта изготовления клапан 6 выполнен из силикона. Клапан 6 может быть уплотнен с использованием хирургиче-

ских нитей, зажимов или любых других пригодных уплотнительных механизмов в процессе инкубации устройства и после инфузии клеток в устройство. В одном примере варианта изготовления дистальный конец 4 устройства 1 содержит закругленную или плоскую нижнюю поверхность. В другом варианте изготовления устройство 1 содержит отверстие на дистальном конце 4, которое может быть уплотнено с использованием хирургических нитей, зажимов или любого другого хирургического уплотнительного элемента в процессе инкубации устройства и после инфузии клеток в устройство. В еще одном примере варианта изготовления, как показано на фиг. 1С, дистальный конец 4 содержит непористый участок 7, предотвращающий врастание ткани на дистальном конце устройства и способствующий извлечению вкладыша 5 из устройства до инфузии клеток.

В некоторых вариантах изготовления, как показано на фиг. 1D, проксимальный конец вкладыша 5 соединен с уплотнителем 8. В одном таком варианте изготовления уплотнитель 8 выполнен с возможностью закрытия отверстия на проксимальном конце 3, когда вкладыш 5 введен в камеру 5. Уплотнитель 8 выполнен с возможностью удерживания вкладыша 5 на своем месте внутри пористой камеры. В другом варианте изготовления вкладыш 5 длиннее пористой камеры 2 и выполняет функции уплотнителя как на проксимальном конце 3, так и на дистальном конце 4, как показано на фиг. 1Е. Кромки пористой камеры 2 вокруг вкладыша 5 уплотнены с использованием хирургических нитей и/или хирургического клея. После удаления вкладыша 5 до инфузии клеток отверстия на проксимальном конце 3 и дистальном конце 4 могут быть уплотнены с использованием хирургических нитей, сосудистых зажимов или любого другого пригодного уплотнительного механизма, как ясно среднему специалисту в данной области техники.

В некоторых примерах вариантов изготовления устройство 1 содержит множество пористых камер 2, которые латерально соединены друг с другом. В одном таком варианте изготовления множество пористых камер 2 образовано, например, с помощью ультразвуковой сварки верхней и нижней поверхностей пористого материала вдоль линии, по существу параллельной продольной оси устройства. На фиг. 1F показано устройство для трансплантации клеток, имеющее восемь пористых камер 2. В каждой камере 2 размещен вкладыш 5 на этапе инкубации устройства. Вкладыши 5 удаляются из камер 2 до инфузии клеток в камеры. В одном варианте изготовления устройство 1 содержит восемь пористых камер и имеет общую длину 50 мм при ширине 45 мм. Каждая пористая камера 2 имеет внутренний диаметр, не превышающий 2,5 мм, и вмещает вкладыш 5, длина которого составляет примерно 40 мм, а диаметр - 2,5 мм. В одном таком варианте изготовления вкладыш 5 выполнен из непористого биосовместимого материала, например, политетрафторэтилена (ПТФЭ).

В примерах вариантов изготовления устройство для трансплантации клеток в настоящем раскрытии образовано полипропиленовыми сетками, пригодными для использования в медицине, например, пропиленовой вязаной сетки (РПКМ), закупленной у SURGICALMESH™, Брукфилд, Коннектикут, США. В иллюстративных вариантах изготовления сетки выполнены из монофиламентных нитей диаметром от 0,1 до 0,3 мм, при этом размеры пор сетки составляют от 0,3 до 1 мм, от 0,4 до 0,85 мм, а также от 0,5 до 0,6 мм. На фиг. 2A-2D показаны различные примеры конфигураций сеток, которые могут быть использованы для образования устройств для трансплантации клеток. На фиг. 2A показана полипропиленовая сетка (РПКМ601) с размером пор 0,5 мм и толщиной монофиламентной нити 0,3 мм; на фиг. 2B показана полипропиленовая сетка (РПКМ602) с размером пор 0,53 мм и толщиной монофиламентной нити 0,18 мм; на фиг. 2C показана полипропиленовая сетка (РПКМ404) с размером пор 0,53 мм и толщиной монофиламентной нити 0,13 мм; а на фиг. 2D показана полипропиленовая сетка (РПКМ604) с размером пор 0,85 мм и толщиной монофиламентной нити 0,2 мм.

На фиг. 3A показан другой пример варианта изготовления устройства 10 для трансплантации клеток. На фиг. 3B показаны компоненты устройства 10 для трансплантации клеток. Устройство 10 содержит пористый каркас 12, первичный уплотнитель 14, по меньшей мере одну систему вкладышей, содержащую внешний вкладыш 16 и внутренний вкладыш 18, а также вторичный уплотнитель 20.

Как показано на фиг. 4, пористый каркас 12 устройства 10 для трансплантации клеток может содержать полимерную сетку (например, полипропиленовую сетку, ПТФЭ-сетку или любой другой пригодный материал), образующую одну или несколько пористых камер 22 для содержания клеток в организме хозяина. В некоторых вариантах изготовления пористый каркас 12 может содержать 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или более пористых камер 22.

Доступность множества камер позволяет использовать любое число или сочетание камер в зависимости от требуемого объема клеточного материала, определение которого находится в компетенцию специалиста в данной области техники.

Пористые камеры 22 могут быть созданы, например, путем соединения верхней и нижней поверхностей пористого каркаса 12 вдоль линии, по существу параллельной продольной оси устройства. Множество пористых камер 22 могут иметь одинаковые или разные размеры сечений и площади поверхности. В одном варианте изготовления множество пористых камер 22 образовано путем ультразвуковой сварки полимерной сетки от проксимального конца 24 до дистального конца 26 каркаса. Верхние и нижние поверхности пористого каркаса 12 являются непрерывными по одной или нескольким пористым камерам 22, при этом непрерывность нарушается только линиями 28 сварных швов, образованных при ультразвуковой сварке, проходящими по существу параллельно продольной оси пористого каркаса 12.

Верхняя и нижняя поверхности могут быть незначительно вдавлены на каждой линии сварного шва, что предоставляет дополнительную площадь поверхности для васкуляризации и придает физическую устойчивость устройству 10 в организме хозяина. В одном варианте изготовления кромки на дистальном конце 26 выполнены на конус и соединены друг с другом ультразвуковой сваркой для уплотнения дистального конца 26.

Как показано на фиг. 3В, первичный уплотнитель 14 выполнен с возможностью уплотнения одной или более пористых камер 22 в процессе инкубации устройства и после инфузии клеток. Первичный уплотнитель 14 содержит инертную биосовместимую полимерную пленку или любой другой пригодный материал. В одном варианте изготовления первичный уплотнитель 14 приварен с помощью ультразвуковой сварки на латеральных кромках и выполненном на конус проксимальном конце 31, как показано на фиг. 5А и 5В. Дистальный конец 32 первичного уплотнителя 14 крепится к проксимальному концу 24 пористого каркаса 12. В одном варианте изготовления дистальный конец 32 приварен с помощью ультразвуковой сварки к проксимальному концу 24 пористого каркаса 12.

В различных вариантах изготовления первичный уплотнитель 14 содержит повторно уплотняемый затвор 34, способствующий поддержке по меньшей мере одного внешнего вкладыша 16 в пористой камере 22 в процессе инкубационного периода. Затвор 34 также предотвращает утечку клеточного материала в ходе процесса инфузии клеток. В качестве затвора 34 может быть использован любой пригодный повторно уплотняемый запорный механизм. В одном варианте изготовления затвор 34 содержит взаимоблокировочные элементы в виде паза и выступа, образующие герметичное уплотнение при сжатии вместе и размыкающиеся при разведении верхней и нижней поверхностей уплотнителя 14 на проксимальном конце 31. По истечении инкубационного периода устройства к внешнему вкладышу 16 получают доступ путем обрезки проксимального конца 31 первичного уплотнителя 14 и открытия повторно уплотняемого затвора 34. После того как клеточный материал доставлен в пористый каркас 12, затвор 34 повторно закрывают, а проксимальный конец 31 повторно уплотняют с использованием, например, хирургических нитей, скоб или биоадгезивов, либо герметичных уплотнителей.

Количество систем вкладышей может соответствовать количеству пористых камер 22 в устройстве 10 для трансплантации клеток. Внешний вкладыш 16 размещен в пористой камере 22 в процессе инкубационного периода устройства. В некоторых вариантах изготовления длина внешнего вкладыша 16 приблизительно равна длине соответствующей пористой камеры 22. Как показано на фиг. 6А, в одном варианте изготовления на проксимальном конце 40 присоединено множество внешних вкладышей 16 с использованием общего остова 42. Общий остов 42 может включать в себя одну или несколько канавок 43, чтобы способствовать удалению внешних вкладышей 16 из пористых камер 22. Например, канавки 43 могут позволить захватить общий остов 42, используя щипцы. В некоторых вариантах изготовления внешний вкладыш 16 имеет полую сердцевину 45, в которой размещается внутренний вкладыш 18. Как показано на фиг. 6В, в одном варианте изготовления полая сердцевина 45 наделена ограничительными внутренними выступами 47 по длине внутренней поверхности вкладыша. Внутренние выступы 47 создают воздушное пространство между внешним вкладышем 16 и внутренним вкладышем 18, обеспечивающее выход захваченных воздушных пузырьков в процессе доставки клеточного материала, что будет подробнее описано ниже. Воздушное пространство также предотвращает образование вакуума в процессе удаления внутреннего вкладыша 18, тем самым поддерживая цельность новообразованной васкуляризованной коллагеновой матрицы внутри и вокруг пористой камеры. Таким образом, в некоторых аспектах система вкладышей, содержащая внешний вкладыш 16 и внутренний вкладыш 18, может способствовать доставке клеток в устройство 10 для трансплантации клеток, а также может увеличить шансы на выживание клеток в интактной коллагеновой матрице.

В некоторых вариантах изготовления проксимальный конец 40 и дистальный конец 41 внешнего вкладыша 16 содержат механизмы уплотнения, например внутренние канавки или конические поверхности, для обеспечения эффективного уплотнения с помощью внутреннего вкладыша 18. Как показано на фиг. 7, проксимальный конец 50 и дистальный конец 51 внутреннего вкладыша 18 может включать в себя дополнительные механизмы 53 уплотнения для предотвращения инфильтрации коллагеновой матрицы в полую сердцевину 45 в процессе инкубационного периода. Например, в одном варианте изготовления механизм 53 уплотнения содержит канавку, продолжающуюся по периферии проксимального и дистального концов внутреннего вкладыша 18, при этом внешний вкладыш 16 содержит выступ по периферии своих дистального и проксимального концов. В таком варианте изготовления выступ на внешнем вкладыше 16 и канавка на внутреннем вкладыше 18 взаимоблокируются, когда внутренний вкладыш 18 введен в полую сердцевину 45 внешнего вкладыша 16, так чтобы образовать полное уплотнение между внутренним и внешним вкладышами и не допустить попадания какого-либо биологического материала в полую сердцевину 45. Кроме того, в таких вариантах изготовления, если внешний вкладыш 16 содержит один или несколько внутренних выступов 47, высота выступов на проксимальном и дистальном концах внешнего вкладыша 16 может превышать высоту внутренних выступов 47.

На фиг. 6С и 6D показаны виды в разрезе сборочного узла пористой камеры 22 и вкладышей 16, 18 согласно одному варианту изготовления согласно настоящему раскрытию. На фиг. 6С показан вид в разрезе сборочного узла до имплантации в организм хозяина, а на фиг. 6D показан вид в разрезе сборочного

узла после инкубации в организме хозяина. Внутренний диаметр пористой камеры 22 и наружный диаметр внешнего вкладыша 16 подобраны так, чтобы сохранять зазор 46 по периферии внешнего вкладыша 16 для образования ткани. Например, в одном иллюстративном варианте изготовления внутренний диаметр пористой камеры 22 не превышает 4,5 мм, а наружный диаметр внешнего вкладыша 16 не превышает 3,5 мм. В другом варианте изготовления внутренний диаметр пористой камеры 22 не превышает 3,5 мм, а наружный диаметр внешнего вкладыша 16 не превышает 2,5 мм. В данных вариантах изготовления, например, обеспечивается зазор, составляющий примерно 0,5 мм, вокруг внешнего вкладыша 16 для формирования васкуляризованной коллагеновой матрицы. Зазор вокруг внешнего вкладыша 16 также создает достаточное пространство для введения и извлечения внешнего вкладыша в пористую камеру и из нее.

Когда устройство 10 для трансплантации клеток имплантировано в организм хозяина, сосудистые и соединительные ткани проникают через пористую камеру 22 в пространство 46 и образуют васкуляризованную тканевую матрицу 48 вокруг внешнего вкладыша 16. Вкладыш 16 предотвращает проникновение тканевой матрицы 48 глубже в полость пористой камеры 22. После извлечения внутреннего вкладыша 18 и внешнего вкладыша 16 из пористой камеры 22 в пористой камере 22 образуется карман 49, который можно использовать для содержания клеток в организме хозяина. Карман 49 заключен в васкуляризованную тканевую матрицу 48, как показано на фиг. 6Е.

Количество внутренних вкладышей 18 может соответствовать количеству внешних вкладышей 16. Внутренний вкладыш 18 размещен в полой сердцевине внешнего вкладыша 16 на этапе инкубации устройства. В одном варианте изготовления множество внутренних вкладышей 18 соединены на проксимальном конце 50 с использованием общего остова 52. В некоторых вариантах изготовления общий остов 52 содержит захватный элемент 54, чтобы способствовать манипулированию внутренним вкладышем 18 в процессе извлечения из внешнего вкладыша 16.

Вторичный уплотнитель 20, как показано на фиг. 8, выполнен с возможностью содержания клеточного материала в пористых камерах, когда первичный уплотнитель повторно закрывается после доставки клеточного материала в устройство 10 для трансплантации клеток. Вторичный уплотнитель 20 располагают на проксимальном конце 24 пористого каркаса 12 после того как клеточный материал полностью доставлен в пористую камеру 22, а внешний вкладыш 16 извлечен из устройства 10. В некоторых вариантах изготовления вторичный уплотнитель 20 содержит выемки 60, чтобы способствовать введению в устройство 10 с использованием щипцов.

В другом аспекте настоящего раскрытия описаны устройство и способ для доставки клеток в устройство для трансплантации клеток, пояснение к которым будут даны со ссылкой на устройство 10 для трансплантации клеток. На фиг. 9А показаны различные компоненты устройства 70 для доставки клеток. Устройство 70 для доставки клеток содержит по меньшей мере одну трубку 71 для инфузии клеток, крышку 72 соединителя, имеющую захватный элемент 73, и спейсер 74 соединителя.

Трубка 71 для инфузии клеток может содержать полимерную трубку (например, полиэтиленовую трубку) или любой другой пригодный материал для доставки клеточного материала в пористую камеру 22 устройства 10 на этапе инфузии клеток. Количество трубок для инфузии клеток в доставочной системе может соответствовать количеству пористых камер 22.

Спейсер 74 соединителя расположен на дистальном конце трубки 71 для инфузии клеток и соединяет или создает границу раздела с проксимальным концом 40 внешнего вкладыша 16 в ходе процесса доставки клеток. Спейсер 74 соединителя включает в себя одно или несколько сквозных отверстий, через которые вводится трубка 71 для инфузии клеток, как показано на фиг. 9А. Сквозные отверстия выполнены с возможностью обеспечения посадки трубки 71 для инфузии клеток с небольшим натягом. Посадка выполнена с возможностью сохранения трубки 71 для инфузии клеток на своем месте в ходе процесса доставки клеток. Кроме того, в определенных вариантах изготовления спейсер 74 соединителя содержит вентиляционные отверстия 76 для отвода воздуха из воздушных пространств во внешнем вкладыше 16, образованных внутренним выступом 47, в ходе процесса доставки клеток, как будет описано ниже. В одном варианте изготовления внешний вкладыш 16 имеет втулку 78 на проксимальном конце 40. В таком варианте изготовления спейсер 74 соединителя вводится во втулку 78 в ходе процесса доставки клеток с целью крепления доставочного устройства 70 к устройству 10 для трансплантации клеток.

Проксимальный конец трубки 71 для инфузии клеток содержит крышку 72 соединителя. По мере введения трубки во внешний вкладыш 16 крышка 72 соединителя продвигается дистально в направлении спейсера 74 соединителя. Когда трубка 71 полностью введена во внешний вкладыш 16, крышка 72 соединителя насаживается на спейсер 74 соединителя и/или втулку 78, при этом захватный элемент 73 соединяется с внешним вкладышем 16 и/или втулкой 78 вдоль общего остова 42, как показано на фиг. 9С. Это обеспечивает извлечение крышки 72 соединителя, спейсера 74 соединителя и внешнего вкладыша 16 как единого блока, когда клеточный материал инфузироваан в пористую камеру 22.

В следующем аспекте настоящего раскрытия представлен способ трансплантации клеток, пояснение к которому будут даны со ссылкой на устройство 10 для трансплантации клеток и устройство 70 для доставки клеток. Способ трансплантации клеток не ограничивается вариантами изготовления устройств, раскрытыми в настоящем описании, и может использоваться с любыми устройствами для транспланта-

ции клеток и доставки клеток.

На фиг. 10 показана блок-схема алгоритма, на которой представлены этапы типовой процедуры трансплантации клеток.

Процедура трансплантации клеток, в общем, представляет собой двухэтапный процесс, содержащий этап имплантации устройства, за которым следует этап инфузии клеток. Устройство 10 имплантируется в организм хозяина до доставки клеток, чтобы обеспечить достаточное время для инфильтрации коллагена и кровеносных сосудов в пористый каркас 12. В некоторых вариантах изготовления до проведения имплантации устройство 10 стерилизуют с использованием этиленоксида. Устройство 10 может быть упаковано в самозапечатающийся пакет или любую иную стерилизуемую упаковку вместе с индикаторной полоской на стерильность для процесса стерилизации на основе этиленоксида. В некоторых других вариантах изготовления для стерилизации устройства перед имплантацией используют гамма-излучение или стерилизацию в сухожаровом шкафу. Используемый способ стерилизации зависит от материала каркаса, поскольку известно, что стерилизация в сухожаровом шкафу приводит к деформированию определенных полимерных материалов (например, полипропилена) в силу низкой деформационной теплостойкости. Гамма-излучение при стерилизационных дозах, равных 6 Мрад, может с успехом обеспечить стерилизацию устройств, предназначенных для имплантации клеток; однако гамма-излучение может снизить срок годности устройств, выполненных из полипропилена.

Устройство 10 может быть имплантировано подкожно или интраперитонеально. Например, для подкожной имплантации устройства в тело хозяина выполняют надрез через дерму и эпидермис, далее следует осторожное тупое отделение соединительной ткани и жировой ткани с образованием подкожного кармана, каудального по отношению к линии надреза (этап 810). Когда образовано достаточное пространство (примерно по размерам устройства), устройство 10 имплантируется в подкожный карман, после чего надрез сшивается (этап 820). По альтернативному варианту устройство 10 может быть имплантировано в перитонеальную полость через абдоминальный разрез. Этапы имплантации устройства (этапы 810 и 820) сопровождаются периодом инкубации устройства (этап 830), в течение которого происходит отложение васкуляризованной коллагеновой матрицы внутри и вокруг пористого каркаса 12.

По истечении инкубационного периода к устройству 10 получают доступ посредством второго хирургического надреза. Например, проксимальный конец 31 первичного уплотнителя 12 может быть срезан *in situ* для вскрытия устройства 10. После этого внутренний вкладыш 18 извлекается из внешнего вкладыша 16 и утилизируется (этап 850). В процессе удаления внутреннего вкладыша внутренние выступы 47 способствуют созданию движения воздуха, не допускающего образования вакуума внутри устройства, способного вызвать разрушение новообразованных кровеносных сосудов внутри и вокруг устройства. Удаление внутреннего вкладыша 18 приводит к отцеплению проксимального конца 50 и дистального конца 51 внутреннего вкладыша 18 от проксимального конца 40 и дистального конца 41 внешнего вкладыша 16. Далее клеточный материал доставляется в устройство 10 с использованием устройства 70 для доставки клеток.

На фиг. 11A-11D показан схематичный общий вид определенных этапов типичной процедуры инфузии клеток, которым будут даны пояснения со ссылкой на блок-схему алгоритма, представленную на фиг. 10. Для доставки клеток в устройство 10 трубка 71 для инфузии клеток доставочного устройства 70 загружается клеточным материалом 79, после чего трубка вводится в полую сердцевину 45 внешнего вкладыша 16, как показано на фиг. 11A (этап 860). Спейсер 74 соединителя соединяется с проксимальным концом 41 и/или втулкой 78 внешнего вкладыша 16. По мере продвижения трубки 71 во внешний вкладыш воздух выводится посредством внутренних выступов 47 внешнего вкладыша 16 и вентиляционных отверстий 76 спейсера 74 соединителя. Когда трубка 71 полностью задвинута во внешний вкладыш 16, крышка 72 соединителя стыкуется со спейсером 74 соединителя. Зажим 73 крышки 72 соединителя далее соединяется с втулкой 78 внешнего вкладыша 16 (этап 870). В этом случае внешний вкладыш 16, крышка 72 соединителя и спейсер 74 соединителя незначительно отводятся назад из пористой камеры 22 в виде единого блока для образования пространства на дистальном конце пористой камеры 22 (этап 875). В некоторых вариантах изготовления внешний вкладыш 16 может быть незначительно отведен назад из пористой камеры 22 до соединения доставочного устройства 70 с внешним вкладышем 16. Другими словами, этап 875 может быть выполнен до этапа 870. На шприц, присоединенный к трубке 71 для инфузии клеток, осуществляют легкое нажатие для доставки клеток в пористую камеру 23 (этап 880). Следят за тем, чтобы трубка 71 оставалась в пористой камере 22, когда прикладывается давление для доставки клеточного материала. В одном варианте изготовления внешний вкладыш 16 отводится примерно на 5 мм перед началом инфузии клеток, как показано на фиг. 11B. Когда к шприцу, соединенному с трубкой 71 для инфузии клеток, прикладывается давление (P), осуществляется инфузия клеточного материала 79 в пористую камеру 22. Когда клеточный материал доставлен в пористую камеру 22, внешний вкладыш 16 и трубка 71 для инфузии клеток извлекаются из устройства, как показано на фиг. 11C и 11D (этап 885). Когда устройство полностью заполнено клеточным материалом 79, инфузия клеток прекращается, и трубка 71 для инфузии клеток полностью выводится из устройства 10 (этап 890). Далее пористую камеру 22 оценивают на предмет оставшегося объема для клеточного материала, после чего оставшийся клеточный материал можно осторожно добавить в концевую часть пористой камеры. Клеточ-

ный материал удерживается в пористой камере 22 путем размещения вторичного уплотнителя 20 на проксимальном конце 40 пористой камеры 22, за которым следует закрытие повторно уплотняемого затвора 34 первичного уплотнителя 12 и фиксирование проксимального конца 31 первичного уплотнителя 12 с помощью хирургических нитей или скоб, либо других пригодных уплотнительных механизмов (этап 895). Наконец, хирургический надрез закрывают с использованием хирургических нитей, скоб или тканевого клея, тем самым завершая процедуру трансплантации клеток.

Раскрытые устройства и способы для клеточной трансплантации могут использоваться для трансплантации любых терапевтических клеток или комбинаций клеток в организм хозяина для доставки терапевтического биологического материала в организм хозяина с целью лечения заболевания. Клетки могут представлять собой аллогенные, ксеногенные или сингенные донорские клетки, клетки, полученные от самого пациента, в том числе стволовые клетки, клетки пуповинной крови и эмбрионные стволовые клетки. Стволовые клетки могут быть преобразованы в соответствующие терапевтические клетки. Клетки могут быть незрелыми, частично дифференцированными или полностью дифференцированными, а также зрелыми клетками при размещении в устройстве. Клетки также могут представлять собой клетки, полученные посредством генной инженерии, или клеточные линии. В одном аспекте используется вариант изготовления, согласующийся с настоящим раскрытием, для трансплантации клеток островков Лангерганса с целью обеспечения средства для регулирования уровня глюкозы в крови в организме хозяина. В другом аспекте один вариант изготовления устройства для трансплантации клеток используется для совместной трансплантации островков Лангерганса и клеток Сертоли, при этом клетки Сертоли обеспечивают иммунную защиту островковых клеток в организме хозяина. Иммунная защита, обеспечиваемая клетками Сертоли в организме хозяина, была раскрыта ранее, например, в патенте США № 5725854, который полностью включен в настоящее описание путем ссылки. Соответственно предметом рассмотрения в настоящем раскрытии также являются способы лечения различных заболеваний путем трансплантации терапевтически значимых количеств клеток в объекты, которые в них нуждаются, используя вариант изготовления устройства для трансплантации клеток согласно настоящему описанию.

Концентрация трансплантируемых терапевтических клеток или комбинаций клеток определяется на основе веса тела хозяина и терапевтического эффекта клеток. Как отмечалось ранее, размеры устройства для трансплантации клеток и количество используемых пористых камер (в мультикамерном устройстве) определяются на основе требуемого количества клеток, степени васкуляризации, которая может быть достигнута в течение периода инкубации устройства, а также диффузионных характеристик питательных веществ и продуктов жизнедеятельности клеток, вводимых и выводимых из имплантированных устройств.

### Примеры

Следующие примеры представлены для пояснения различных вариантов изготовления и никоим образом не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего раскрытия. Используемые в данных примерах устройства для трансплантации клеток выполнены из полипропиленовых сеток и содержат единственный ПТФЭ-вкладыш в каждой пористой камере устройств.

1. Устройство для трансплантации клеток, содержащие островковые клетки, способны восстанавливать нормогликемию у крыс Льюиса.

Устройства для трансплантации клеток были использованы для имплантации сингенных островковых клеток крысам Льюиса для восстановления нормогликемии. Изменение содержания глюкозы при имплантации клеток сравнивали с изменением содержания глюкозы при введении островковых клеток непосредственно в портальные вены крыс. Крысы Льюиса были поделены на три исследуемые группы, по девять крыс в каждой группе. В первой и второй исследуемых группах устройства были имплантированы в интраперитонеальные и подкожные полости соответственно. В третьей группе островковые клетки вводились непосредственно в портальные вены.

Имплантированные устройства подверглись инкубации в организме крыс Льюиса по меньшей мере в течение одного месяца, чтобы обеспечить прорастание сосудов. Далее у крыс химически индуцировали диабет путем инъекции стрептозотоцина. Считалось, что крысы наделены диабетом, если три последовательных показания содержания глюкозы в крови составляли по меньшей мере 18,0 мМ. Далее проводили инфузию изолированных островковых клеток крыс Льюиса (10000 IEQ/кг веса) в имплантированные устройства или непосредственно в портальные вены диабетных крыс. Инсулиновые пеллеты удаляли через 14 дней после трансплантации островков (обозначены замкнутыми прямоугольниками над графиками на фиг. 11А и 11В). Уровень глюкозы в крови у крыс контролировали в течение 100 дней. По истечении 100 дней после трансплантации устройства удаляли, чтобы подтвердить, что за устранение диабета были ответственны трансплантированные островки.

На фиг. 12А и 12В показаны результаты нормализации содержания глюкозы у крыс, которым устройства для трансплантации клеток были имплантированы соответственно интраперитонеально (в сальниковую полость) и подкожно. Успешная трансплантация клеток приводила к нормализации содержания глюкозы в крови (показатели содержания глюкозы составляли менее 8,0 мМ), как показано сплошными линиями. Случаи трансплантации, при которых нормогликемия не была достигнута, обозначены точечными линиями. Результаты показывают, что нормальный уровень гликемии поддерживался у статисти-

чески значимого количества диабетных крыс, которым вводили островковые клетки. Вслед за удалением имплантированных устройств через 100 дней после трансплантации, у крыс, демонстрировавших нормальные уровни гликемии, происходил возврат к гипергликемии, указывающий на то, что устройства содержали полностью функциональный трансплантат, ответственный за достижение нормогликемии до извлечения устройства. Скорость, с которой концентрация глюкозы в крови достигала недиабетического уровня, статистически различалась в исследуемых группах ( $p < 0,0001$ , t-тест).

На фиг. 12C показаны IVGTT (внутривенный глюкозотолерантный тест) ответы у крыс Льюиса, которые подверглись трансплантации островковых клеток. Внутривенные глюкозотолерантные тесты проводили через 40 и 80 дней после трансплантации. Изменение содержания глюкозы у крыс при интраперитонеальной и подкожной трансплантации сравнивали с изменением содержания глюкозы у крыс, которым островковые клетки вводили внутрипортально. Внутривенные глюкозотолерантные тесты выполнялись на трех крысах в каждой исследуемой категории. Через 40 и 80 дней после трансплантации содержание глюкозы в крови у крыс, подвергнутых трансплантации островковых клеток, снижалась ниже 8,0 мМ в течение 50 мин после получения нагрузки глюкозой, как показано на фиг. 12C. Устройства для трансплантации клеток удалялись через 100 дней. После болюсного введения глюкозы на 110 день снижение уровня содержания глюкозы в крови не происходило, указывая на то, что за нормогликемию, достигнутую у диабетных крыс до удаления имплантированных устройств, ответственны трансплантированные островковые клетки.

На фиг. 12D показано изменение содержания инсулина у крыс Льюиса, которым трансплантированы островковые клетки. Уровень инсулина определяли на основе иммуносорбентного ферментного анализа (ELISA). Анализ проводили трижды. Результаты показали существенное различие в содержании инсулина в крови в ответ на нагрузку глюкозой ( $p < 0,005$ , t-тест). Как показано на фиг. 12D, уровень инсулина у крыс, которым были трансплантированы устройства, хорошо коррелировал с уровнем инсулина у крыс, которым островковые клетки вводили внутрипортально.

2. Гистологическое детектирование инсулина и васкуляризации в пористых камерах устройств для трансплантации клеток

Вслед за удалением имплантированных устройств через сто дней, в устройствах детектировали инсулин с использованием специфических первичных антител к инсулину. На фиг. 13A показаны результаты окрашивания на инсулин в пористой камере подкожно имплантированного устройства. Детектирование инсулина в камере указывает, что островковые клетки, содержащиеся в устройстве, жизнеспособны и функциональны через 100 дней после трансплантации.

Проводили также гистологическую оценку имплантированных устройств для подтверждения образования сосудистой ткани в коллагеновой матрице, отложенной внутри и вокруг устройств. Иммуногистохимическое окрашивание на Фактор VIII-связанный антиген эндотелиальных клеток указывает на хорошо сформированную сосудистую структуру, глубоко внедренную в соединительную ткань, как показано на фиг. 13B (темная структура обозначает эндотелий; клеточные ядра указаны стрелками). Гистологическая оценка также свидетельствует о проникновении неоваскуляризованной ткани в направлении сердцевин устройств для трансплантации клеток.

3. Оценка ангиогенеза и отложения коллагена в устройствах для трансплантации клеток

Для определения должной продолжительности фазы имплантации (времени между имплантацией устройства и приживлением островковых клеток) устройства для трансплантации клеток подкожно имплантировали восьмимесячным свиньям породы йоркшир-ландрас на 2, 4 и 8 недель. После имплантации на соответствующий период времени устройства эксплантировали и исследовали для определения уровня ангиогенеза и отложения коллагена.

а) Общая оценка ангиогенеза и отложения коллагена.

Для общего анализа формирования кровеносных сосудов и ткани были сделаны фотографии вентральной и дорсальной поверхностей эксплантированных устройств. Для количественной оценки формирования микрососудов и ткани (коллагена и клеток) на фотографии накладывали сетку 1×1 см. Каждый квадрат площадью 1 см<sup>2</sup> сетки учитывался для оценки формирования сосудов, что позволило рассчитать общее количество сосудов/см<sup>2</sup> для всей площади эксплантированных устройств. Для оценки количества отложения коллагена измеряли среднюю толщину по медиальным и латеральным внешним границам устройств. На фиг. 14 показана таблица средней толщины коллагена и общего количества кровеносных сосудов/см<sup>2</sup>, рассчитанных для четырех устройств, образованных с использованием различных пористых материалов (сеток). Через две недели после имплантации наблюдали достаточное формирование микрососудов и тканей для всех четырех типов сеток. Результаты также показали, что количество времени, необходимое для формирования микрососудов и отложения коллагена, может варьироваться в зависимости от материала устройства (пористости, шероховатости поверхности и т.д. сеток).

б) Гистологический анализ ангиогенеза и отложения коллагена.

Степень ангиогенеза определяли путем окрашивания эндотелиальных клеток гематоксилином и эозином (H&E) (фиг. 15A) и по фактору Виллебранда (фиг. 15B). На фиг. 15A показано инкорпорирование ткани в устройства через 2, 4 и 8 недель после имплантации. На фиг. 15B показано образование кровеносных сосудов на различных гранях устройства до трансплантации клеток. Оценка инкорпорирования

тканей в устройства показала, что в устройствах имело место инкорпорирование коллагена и микрососудов в каждый момент времени проведения измерений до трансплантации островков.

4. Оценка устройств для трансплантации клеток с ауто трансплантированными свинными островковыми клетками.

Восьмимесячным свиньям породы йоркшир-ландрас имплантировали устройства для трансплантации клеток на четыре и восемь недель. Для индуцирования диабета у животных выполняли 90% панкреатэктомию, за которой следовало внутривенное введение дозы стрептозотоцина 150 мг/кг через день после хирургического вмешательства. Перед выполнением панкреатэктомии островки изолировали из поджелудочной железы. Животным пересаживали островковый трансплантат с незрелыми клетками через пять дней после изоляции трансплантата и панкреатэктомии, чтобы предоставить достаточное время для восстановления организма и подтверждения диабета.

До проведения трансплантации тестировали инсулинопродуцирующие способности незрелых островковых клеток. Как показано на фиг. 6, незрелые островковые клетки продуцировали около 10% инсулина, в норме ожидаемого от зрелых островковых клеток. Этот факт в сочетании с малым количеством трансплантируемых островков, составляющим около 3-5K IEQ/кг (5-10% инсулинопродуцирующих островковых клеток, обычно используемых при интрапортальной трансплантации), создает жесткие условия испытаний устройств для трансплантации клеток. В настоящее время в клинической терапии на основе трансплантации островков инфузия адекватного количества  $\beta$ -клеток является препятствием при лечении инсулинозависимого диабета. Инсулинонезависимость обычно достигается при доставке достаточного количества островковых клеток, примерно 10000 IEQ/кг веса тела реципиента. Для обеспечения такого количества островковых клеток, согласно современным протоколам трансплантации островков, на одного реципиента требуется более одной донорской поджелудочной железы, что создает дефицит и без того ограниченного донорского материала. Таким образом, если гликемический контроль может осуществляться с использованием только 5-10% островковых клеток, которые в настоящее время используются при интрапортальной трансплантации, число пациентов, страдающих диабетом, которым может быть оказано терапевтическое лечение на основе трансплантации островковых клеток, существенно возрастет.

Для тестирования длительного выживания и функционирования трансплантированных островков проводили гистологический анализ эксплантированных устройств. Осуществляли также мониторинг функционирования островковых трансплантатов посредством проводимых раз в две недели замеров содержания глюкозы в крови и проводимых два раза в месяц внутривенных глюкозотолерантных тестов (IVGTT).

а) Гистологический анализ функционирования островковых трансплантатов.

После эксплантирования устройств через 9 недель в устройствах детектировали инсулин с использованием специфических первичных антител к инсулину. На фиг. 17A показаны результаты окрашивания на инсулин в пористой камере эксплантированного устройства. Детектирование инсулина в камере указывает, что островковые клетки, содержащиеся в устройстве, жизнеспособны и функциональны через 9 недель после трансплантации. Иммуногистохимическое окрашивание секций эксплантата продемонстрировало наличие здоровых, хорошо отконфигурированных островков, окруженных крепкими микрососудами (фиг. 17B; микрососуды помечены стрелками).

б) Измерения содержания глюкозы.

Для мониторинга функционирования островковых трансплантатов вслед за трансплантацией проводили еженедельные замеры содержания глюкозы в крови натощак и не натощак. Такие замеры способствовали определению общей эффективности устройств для трансплантации клеток при длительном контроле содержания глюкозы в крови. Замеры содержания глюкозы в крови натощак обеспечивали контролируемый показатель функционирования трансплантата. Если говорить кратко, из вены животного-реципиента проводили забор капли крови (несколько микролитров), после чего определяли уровень глюкозы в крови, используя глюкометр Freestyle Lite или иное устройство для тестирования содержания глюкозы.

Как показано на фиг. 18, трансплантированные островки демонстрировали длительный контроль содержания глюкозы вплоть до эксплантирования устройств через 72 дня. Животные в группе "гликемического контроля" (n=4) были инсулинонезависимыми, при этом содержание глюкозы в крови контролировали только с помощью островков в устройствах для трансплантации клеток. Животные в этой группе проявляли длительную независимость от инсулина после трансплантации островков. Однако у некоторых животных сохранялась гипергликемия (повышенное дневное содержание глюкозы в крови) после трансплантации островков в устройства (n=6). Это было связано с низким метаболическим качеством островковых трансплантатов и низкой дозой трансплантируемых островковых клеток (IEQ/кг). Качество островков до трансплантации хорошо коррелировало с долгосрочным функционированием островков.

с) Глюкозотолерантный тест.

Глюкозотолерантные тесты важны для оценки функционирования островковых трансплантатов путем сравнения IVGTT-результатов до и после трансплантации. Для тестирования эффективности устройств для трансплантации клеток проводили IVGTT-тесты до выполнения панкреатэктомии (исходная группа) в различные моменты времени после трансплантации островков в устройства, а также после экс-

плантирования устройств. IVGTT-тесты проводили путем введения дозы декстрозы и замера времени, которое требуется, чтобы эндогенный инсулин привел содержание глюкозы в соответствие с исходной группой. В дополнение к замерам содержания глюкозы в крови проводили забор образцов крови в различные моменты времени для измерения содержания С-пептида, являющегося побочным продуктом при синтезе инсулина  $\beta$ -клетками. Результаты IVGTT-тестов интерпретировали на основе абсолютных значений содержания глюкозы в крови (фиг. 19А), площади под кривой (AUC) уровня глюкозы в крови (фиг. 19В), а также кратности изменения уровня С-пептида (фиг. 19С).

Как показано на фиг. 19А и 19В, содержание глюкозы существенно повышалось ( $p < 0,001$ , согласно дисперсионному анализу) после эксплантации устройства, свидетельствуя о том, что удаление устройства приводит к прекращению инсулиновой функции аналогично диабетным животным, у которых островковые клетки отсутствуют. Хотя самые низкие уровни глюкозы были обнаружены у животных, не подвергавшихся панкреатэктомии, у реципиентов островкового аутоимплантата наблюдалось существенное снижение содержания глюкозы после инъекции декстрозы, свидетельствуя о том, что незрелые островковые клетки способны выживать и функционировать после трансплантации.

Образцы сыворотки крови, связанные с IVGTT-тестами, анализировали с использованием набора для радиоиммуноанализа на свиной С-пептид (Linco), в котором применяется антитело, разработанное специально для анализа на синтетический свиной С-пептид. Образцы сыворотки крови через 0, 5, 15, 30, 60 и 120 мин после инъекции декстрозы исследовали на наличие свиного С-пептида. Тестировали четыре группы: свиньи, не подвергнутые панкреатэктомии (исходная группа), реципиенты островкового ауто-трансплантата (после трансплантации островков), реципиенты ауто-трансплантата, у которых устройства были удалены (после удаления устройств), а также диабетные контрольные свиньи. При исследовании кратности изменения уровня С-пептида среди различных исследуемых групп в исходной группе и у реципиентов после трансплантации островков результаты были вполне сопоставимы, хотя уровень С-пептида у реципиентов после трансплантации островков повысился через 60 минут в отличие от исходной группы, в которой повышение имело место через 30 мин (фиг. 19С). Кроме того, кратность изменения уровня С-пептида в группе после удаления устройств и диабетной контрольной группе была схожей, свидетельствуя о том, что трансплантированные островки были ответственны за выброс С-пептида до удаления устройства.

Другие варианты изготовления изобретения станут очевидны специалистам в данной области техники после изучения описания и практического применения изобретения, раскрытого в нем. Описание и примеры следует рассматривать лишь в качестве иллюстрации, при этом истинный объем и сущность изобретения определяются последующей формулой изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Устройство для имплантации клеток в организм хозяина, содержащее пористый каркас, содержащий сетку из иммунологически совместимого полимерного материала, образующую стенки по меньшей мере одной камеры, где камера содержит отверстие на проксимальном конце или на дистальном конце либо и на проксимальном конце, и на дистальном конце камеры, при этом проксимальный конец и дистальный конец разделены пространством, которое ограничено стенками, и при этом пористый каркас имеет поры, выполненные с возможностью способствовать прорастанию сосудистых и соединительных тканей вокруг стенок и через стенки по меньшей мере одной камеры; по меньшей мере один уплотнитель, выполненный с возможностью закрытия проксимального или дистального конца либо и проксимального, и дистального конца камеры; по меньшей мере один съемный вкладыш, выполненный с возможностью размещения в полости по меньшей мере одной камеры, при этом вкладыш продолжается вдоль полости.
2. Устройство по п.1, где устройство дополнительно содержит биосовместимый, биодеградируемый материал, который временно заполняет поры каркаса и временно предупреждает рост сосудистой и соединительной тканей в просвет по меньшей мере одной камеры.
3. Устройство по п.1, в котором по меньшей мере часть пористого каркаса покрыта одним или несколькими из факторов роста, антифиброзного агента и/или соединений для стимуляции ангиогенеза и инкорпорирования ткани по меньшей мере в одну пористую камеру.
4. Устройство по п.3, в котором одно или несколько из соединений для стимуляции ангиогенеза и инкорпорирования ткани содержат сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), коллаген, фибронектин, мембранные белки цитоскелета, полиэтиленимин и сульфат декстрана, сополимер поливинилсилоксана и полиэтиленимина, фосфорилхолин, полиэтиленгликоль, сополимер молочной и гликолевой кислот, полимолочную кислоту, полигидроксивалерат и его сополимеры, полигидроксипропанат и его сополимеры, полидиоксанон, полиангидриды, полиаминокислоты, полиортоэфир, полиэфир, желатин, целлюлозные полимеры, хитозан, альгинаты, экстрацеллюлярные матричные протеины, винкулин, агар, агарозу, гиалуроновую кислоту, матригель или их комбинации.

5. Устройство по любому из предыдущих пунктов, в котором по меньшей мере один уплотнитель представляет собой полимерную пленку, которая приварена к пористому каркасу ультразвуком.

6. Устройство по любому из предыдущих пунктов, где устройство дополнительно содержит устройство для доставки клеток, содержащее по меньшей мере одну трубку для инфузии клеток, выполненную с возможностью размещения внутри камеры и выполненную с возможностью доставки клеток в камеру устройства.

7. Устройство по любому из предыдущих пунктов, где полимерная сетка содержит полипропилен.

8. Устройство по любому из предыдущих пунктов, где устройство содержит клетки внутри камеры.

9. Устройство по п.8, где клетки содержат островки Лангерганса.

10. Устройство по п.8 или 9, в котором клетки содержат островки клеток Лангерганса и клетки Сертоли.

11. Устройство по любому из пп.8-10, в котором клетки содержат стволовые клетки.

12. Устройство по любому из пп.8-11, в котором клетки содержат одни или несколько из следующих: нейральные стволовые клетки, стволовые клетки, дифференцированные стволовые клетки, допаминергические нейроны, клетки пуповинной крови, эмбриональные стволовые клетки и/или мезенхимальные стволовые клетки.

13. Устройство по любому из пп.8-12, в котором клетки содержат инкапсулированные клетки.

14. Устройство по п.13, в котором клетки инкапсулированы в альгинат, полисахаридный гидрогель, хитозан, альгинат кальция или бария, слоистую матрицу альгината и полилизина, фотополимеризуемый полимер полиэтиленгликоля, поликрилат, гидроксипропанметакрилат, метилметакрилат, силиконовые капсулы, силиконовые нанокапсулы, полимембраны или сополимер винилхлорида с акрилонитрилом.

15. Устройство по любому из пп.8-14, в котором клетки содержат аллогенные, ксеногенные или сингенные донорские клетки.

16. Устройство по любому из пп.8-15, в котором клетки содержат клетки или клеточные линии, полученные посредством генной инженерии.

17. Устройство по любому из пп.8-16, в котором клетки содержат два или более типа клеток, выбранных из островков, клеток Сертоли, стволовых клеток, дифференцированных стволовых клеток, эмбриональных стволовых клеток, аллогенных клеток, ксеногенных или сингенных клеток и клеток или клеточных линий, полученных посредством генной инженерии.

18. Устройство по любому из предыдущих пунктов, где клетки включены в вязкий раствор или биodeградируемый полимер.

19. Устройство по п.18, где биodeградируемый полимер представляет собой полиэтиленгликоль и сульфат декстрана, сополимер поливинилсилоксана и полиэтиленгликоля, фосфорилхолин, полиэтиленгликоль, сополимер молочной и гликолевой кислот, полимолочную кислоту, полигидроксивалерат и его сополимеры, полигидроксипропанметакрилат и его сополимеры, полидиоксанон, полиангидриды, полиаминокислоты, полиортоэфир, полиэфир, коллаген, желатин, целлюлозные полимеры, хитозаны, альгинаты, фибронектин, экстрацеллюлярные матричные протеины, винкулин, агар, агарозу, гиалуроновую кислоту, матригель, а также их сочетания.

20. Устройство по любому из предыдущих пунктов, в котором вкладыш содержит систему с двумя вкладышами.

21. Устройство по п.20, в котором система с двумя вкладышами содержит внешний вкладыш и внутренний вкладыш.

22. Устройство по п.21, в котором внешний вкладыш и внутренний вкладыш содержат дополнительные механизмы уплотнения.

23. Устройство по любому из предыдущих пунктов, в котором пористый каркас содержит одну камеру, две камеры, три камеры, четыре камеры, пять камер, шесть камер, семь камер, восемь камер, десять камер, двенадцать камер или большее количество камер, например приблизительно восемь камер, приблизительно девять камер или приблизительно десять камер.

24. Устройство по любому из п.п.1-22, в котором пористый каркас содержит множество камер, соединенных латерально.

25. Способ трансплантации клеток в организм хозяина, включающий этапы:

а) имплантация устройства по любому из пп.1-24 в организм хозяина,

б) поддержание устройства в организме хозяина до инфильтрации в устройство сосудистых и соединительных тканей;

в) оценка имплантированного устройства;

г) извлечение вкладыша и

д) инфузия клеток в камеру.

26. Способ по п.25, в котором клетки содержат островки клеток Лангерганса.

27. Способ по п.25 или 26, в котором клетки содержат островки клеток Лангерганса и клетки Сертоли.

28. Способ по любому из пп.25-27, в котором клетки содержат стволовые клетки.

29. Способ по любому из пп.25-28, в котором клетки содержат одни или несколько из следующих:

нейральные стволовые клетки, стволовые клетки, дифференцированные стволовые клетки, допаминергические нейроны, клетки пуповинной крови, эмбриональные стволовые клетки и/или мезенхимальные стволовые клетки.

30. Способ по любому из пп.25-29, в котором клетки содержат инкапсулированные клетки.

31. Способ по п.30, где клетки инкапсулированы в альгинат, полисахаридный гидрогель, хитозан, альгинат кальция или бария, слоистую матрицу альгината и полилизина, фотополимеризуемый полимер полиэтиленгликоля, поликрилат, гидроксиэтилметакрилат, метилметакрилат, силиконовые капсулы, силиконовые нанокапсулы, полимембраны или сополимер винилхлорида с акрилонитрилом.

32. Способ по любому из пп.25-31, в котором клетки содержат аллогенные, ксеногенные или сингенные донорские клетки.

33. Способ по любому из пп.25-32, в котором клетки содержат клетки или клеточные линии, полученные посредством генной инженерии.

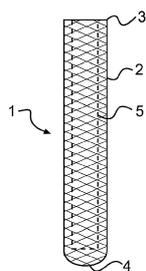
34. Способ по любому из пп.25-33, в котором клетки содержат два или более типа клеток, выбранных из островков, клеток Сертоли, стволовых клеток, дифференцированных стволовых клеток, эмбриональных стволовых клеток, аллогенных клеток, ксеногенных или сингенных клеток и клеток или клеточных линий, полученных посредством генной инженерии.

35. Способ по любому из пп.25-34, где пористый каркас визуализируют до трансплантации клеток.

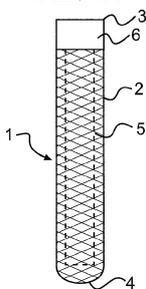
36. Способ по любому из пп.25-35, в котором организм хозяина характеризуется тем, что имеет диабет.

37. Способ по п.36, в котором диабет является инсулинозависимым диабетом.

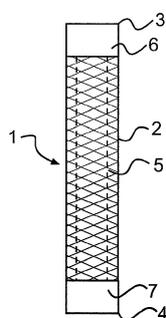
38. Способ по п.36 или 37, характеризующийся тем, что организм хозяина может быть восстановлен до нормогликемии.



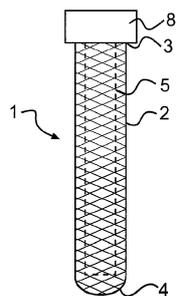
Фиг. 1А



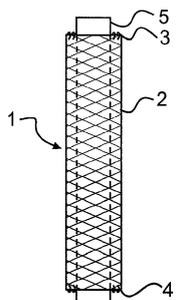
Фиг. 1В



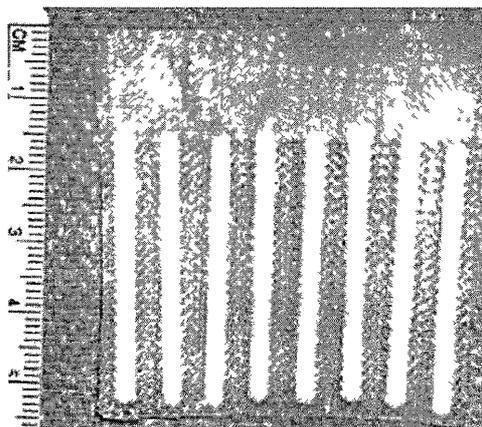
Фиг. 1С



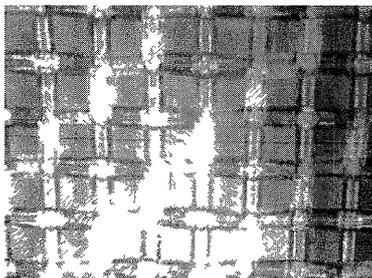
Фиг. 1D



Фиг. 1E



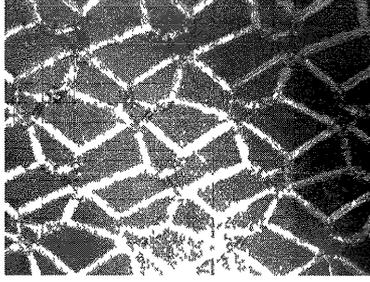
Фиг. 1F



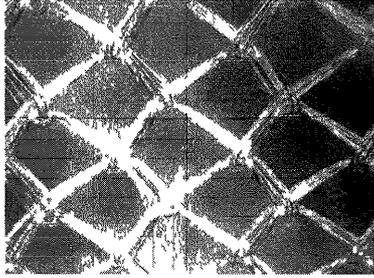
Фиг. 2A



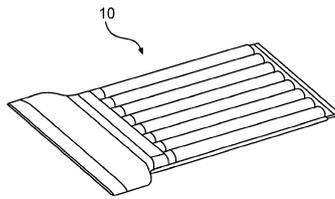
Фиг. 2B



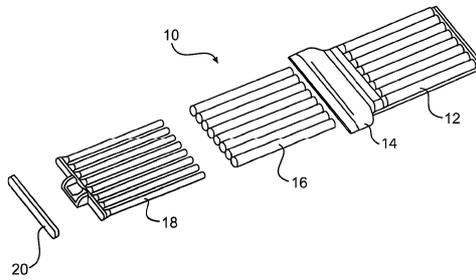
Фиг. 2С



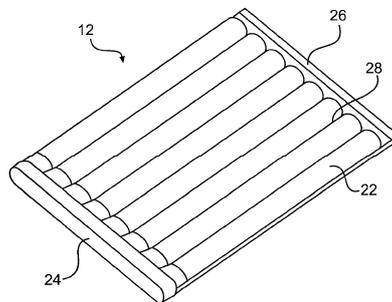
Фиг. 2D



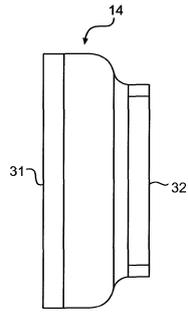
Фиг. 3А



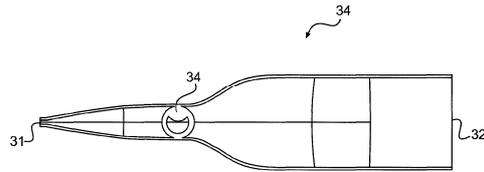
Фиг. 3В



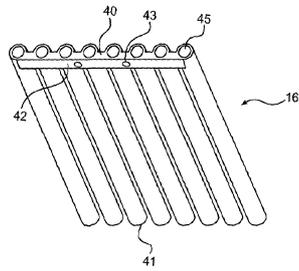
Фиг. 4



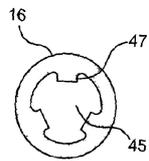
Фиг. 5А



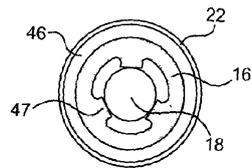
Фиг. 5В



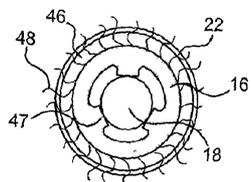
Фиг. 6А



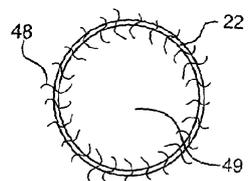
Фиг. 6В



Фиг. 6С

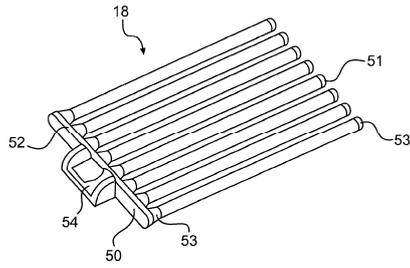


Фиг. 6D

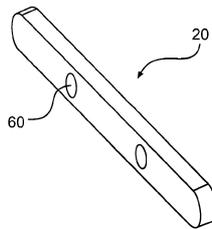


Фиг. 6Е

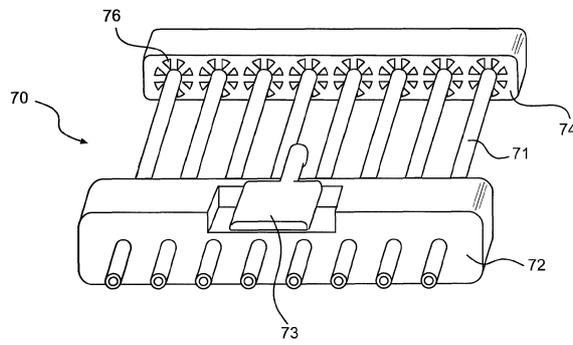
040824



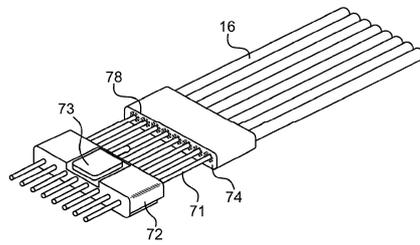
Фиг. 7



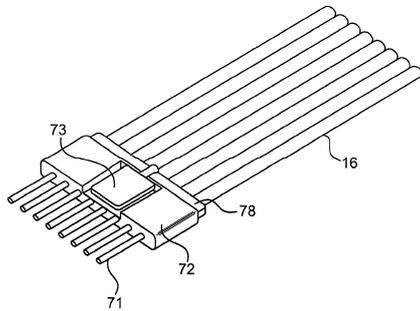
Фиг. 8



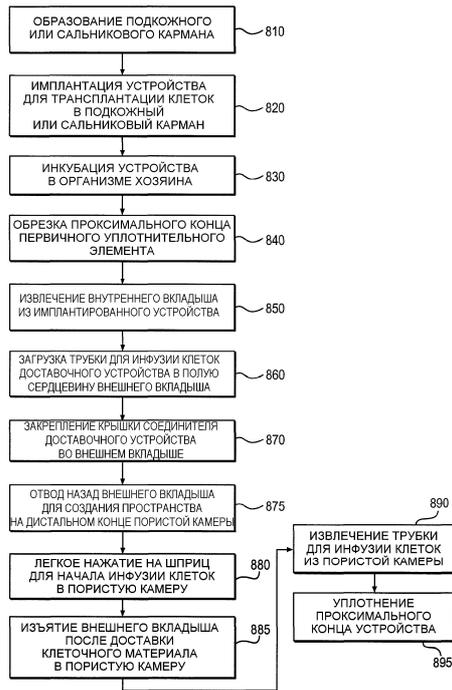
Фиг. 9А



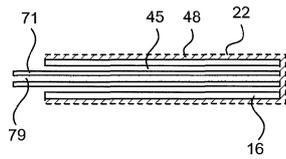
Фиг. 9В



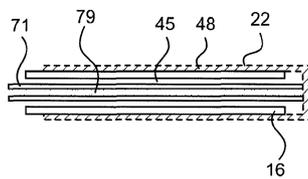
Фиг. 9С



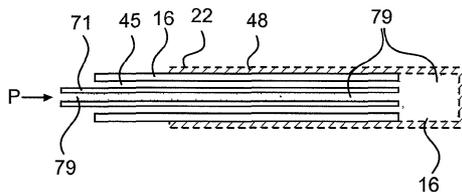
Фиг. 10



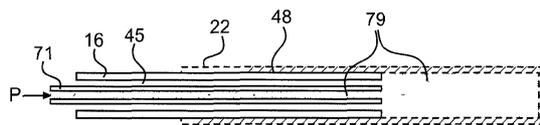
Фиг. 11А



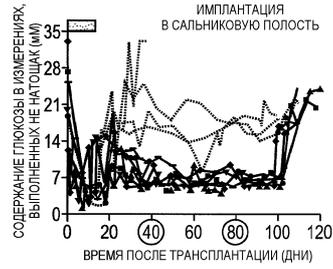
Фиг. 11В



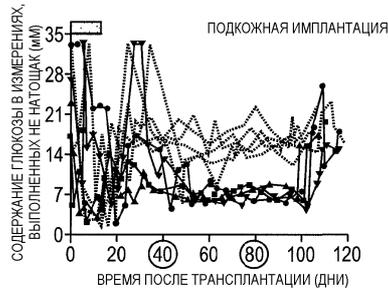
Фиг. 11С



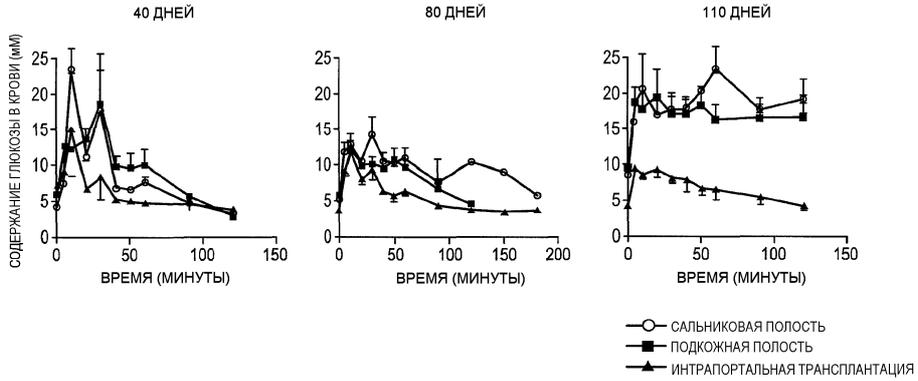
Фиг. 11D



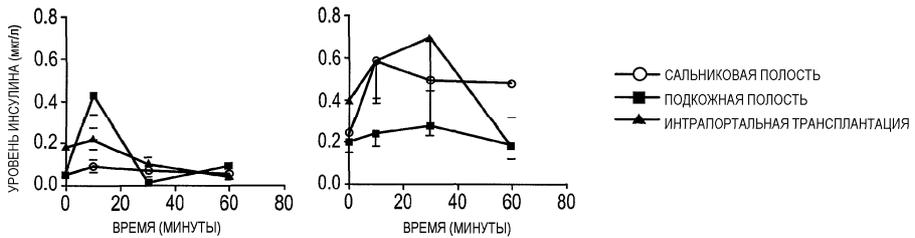
Фиг. 12А



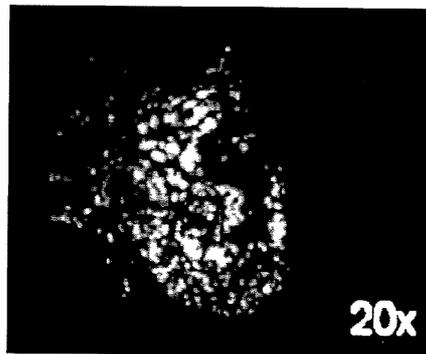
Фиг. 12В



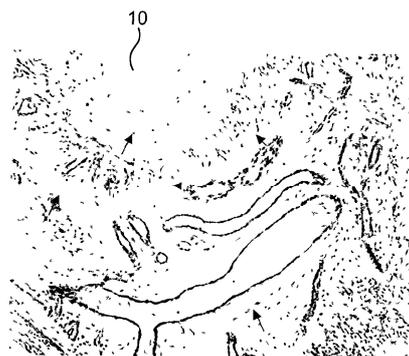
Фиг. 12С



Фиг. 12D



Фиг. 13А



Фиг. 13В

2 НЕДЕЛИ (n=2)				
	СЕТКА 1	СЕТКА 2	СЕТКА 3	СЕТКА 4
СРЕДНЯЯ ТОЛЩИНА КОЛЛАГЕНА (мм)	3.63	2.96	3.63	3.55
КОЛИЧЕСТВО СОСУДОВ НА см <sup>2</sup>	5.2	5.92	3.11	2.76

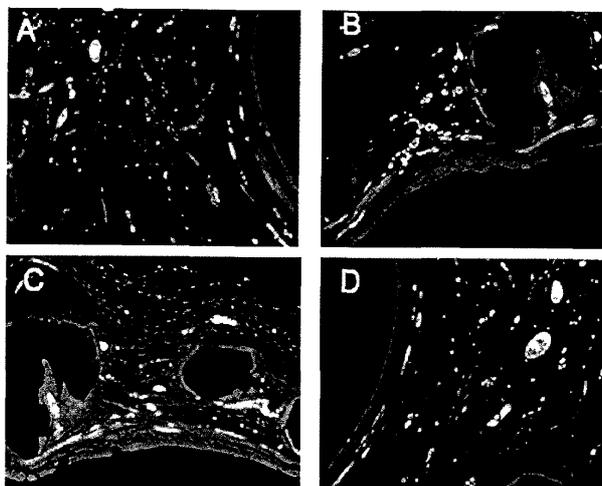
4 НЕДЕЛИ (n=1)				
	СЕТКА 1	СЕТКА 2	СЕТКА 3	СЕТКА 4
СРЕДНЯЯ ТОЛЩИНА КОЛЛАГЕНА (мм)	3.17	2.67	5.33	3.67
КОЛИЧЕСТВО СОСУДОВ НА см <sup>2</sup>	4.12	3.15	2.64	4.74

8 НЕДЕЛЬ (n=2)				
	СЕТКА 1	СЕТКА 2	СЕТКА 3	СЕТКА 4
СРЕДНЯЯ ТОЛЩИНА КОЛЛАГЕНА (мм)	3.0	3.33	4.17	5.0
КОЛИЧЕСТВО СОСУДОВ НА см <sup>2</sup>	3.75	1.87	2.39	2.21

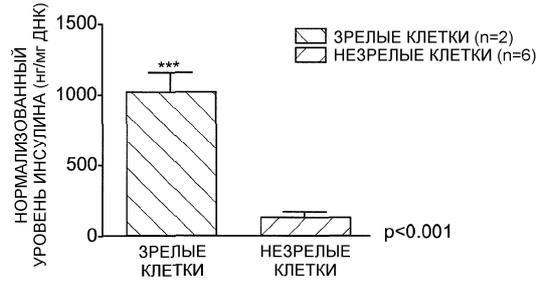
Фиг. 14



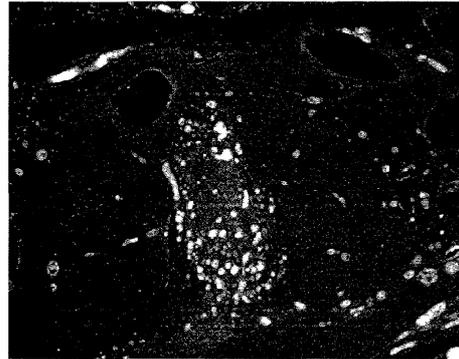
Фиг. 15А



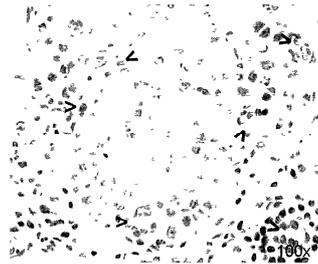
Фиг. 15В



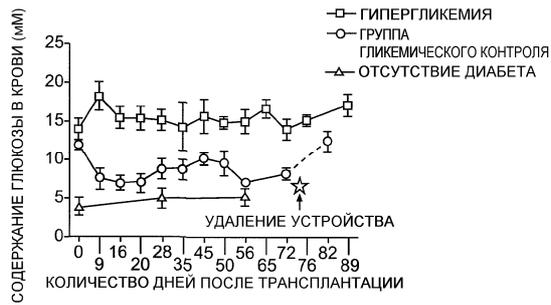
Фиг. 16



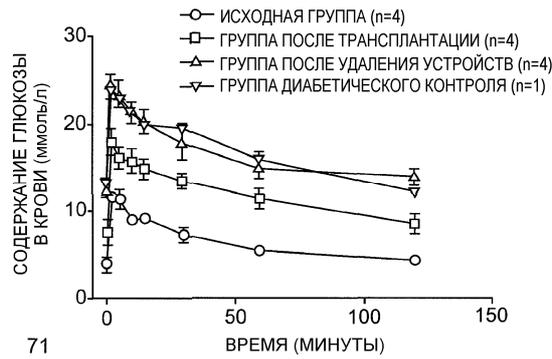
Фиг. 17А



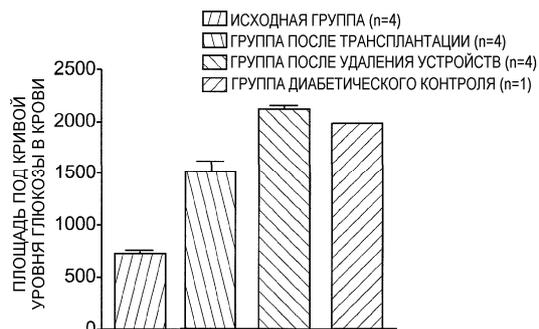
Фиг. 17В



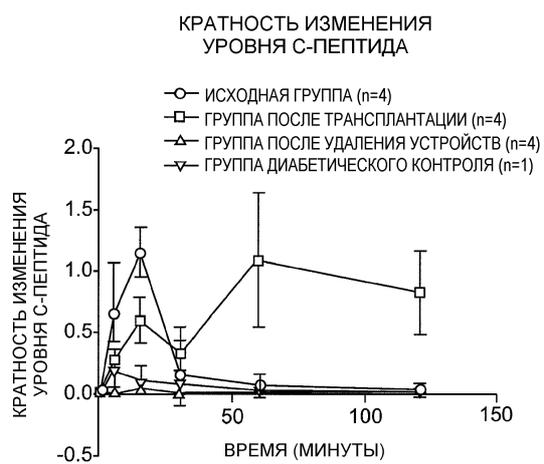
Фиг. 18



Фиг. 19А



Фиг. 19В



Фиг. 19С

