



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110691** (13) **C2**  
(51) МПК (2016.01)**C12N 5/078** (2010.01)**A61K 35/28** (2015.01)**A61P 43/00****C12N 15/09** (2006.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>а 2011 07956</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Хірано Хісанобу (JP),</b> <b>Охкубо Ясусі (JP),</b> <b>Сасакі Кендзіро (JP),</b> <b>Ісіяма Хіронобу (JP)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>19.11.2009</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ОЦУКА ФАРМАСЬЮТІКАЛ КО., ЛТД.,</b> 9, Kanda-Tsukasasamachi 2-chome, Chiyoda- ku, Tokyo 1018535, Japan (JP)
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>10.02.2016</b>	<b>(74)</b> Представник: <b>Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.</b> <b>№115</b>
<b>(31)</b> Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>2008-299359</b>	<b>(56)</b> Перелік документів, взятих до уваги експертизою: ALOK CHANDRA BHARTI ET AL: "Gangliosides derived from a T cell lymphoma inhibit bone marrow cell proliferation and differentiation", INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY, vol. 1, no. 1, 1 January 2001 (2001-01-01) , P. 155-165 WO 03/083092 A1, 09.10.2003 KUCIA M ET AL: "A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4+SSEA- 1+Oct4+ stem cells identified in adult bone marrow", LEUKEMIA, MACMILLAN PRESS LTD, US, vol. 20, 1 January 2006 (2006-01- 01), P. 857-869 Karpiak S. E. et al: "Reduction of cerebral edema with GM1 ganglioside", Journal of Neuroscience Research, vol. 12, no. 2-3, 1 January 1984 (1984-01-01), P. 485-492
<b>(32)</b> Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: <b>25.11.2008</b>	
<b>(33)</b> Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: <b>JP</b>	
<b>(41)</b> Публікація відомостей про заявку: <b>26.09.2011, Бюл.№ 18</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.02.2016, Бюл.№ 3</b>	
<b>(86)</b> Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ <b>РСТ/JP2009/069648,</b> <b>19.11.2009</b>	

**(54) ОДЕРЖАНА З МОНОЦИТУ ЛЮДИНИ СТОВБУРОВА КЛІТИНА ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ І СПОСІБ ЇЇ ІНДУКЦІЇ****(57) Реферат:**

Винахід належить до стовбурових клітин, одержаних культивуванням моноцитів в присутності (i) M-CSF і (ii) щонайменше одного представника, вибраного з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді екстракту рослинного походження, за допомогою цього дедиференціюючи моноцити; до терапевтичного засобу для лікування пошкоджених клітин, тканин або органів; до клітинного лікарського засобу; до способу одержання стовбурових клітин, культурального середовища для дедиференціації моноцитів; засобу, що викликає дедиференціацію; до набору клітинного лікарського засобу; до набору для одержання дедиференційованих клітин; і до фармацевтичної композиції.

UA 110691 C2



Галузь техніки, якої стосується винахід

Даний винахід належить до способу одержання клітин для застосування в клітинних лікарських засобах завдяки клітинам, що швидко диференціюються, які належно диференційовані в живому організмі. Даний винахід також належить до засобу для лікування захворювань, пов'язаних з клітинними пошкодженнями, пошкодженнями тканин або органів. Даний винахід, крім того, належить до клітинного лікарського засобу, способу одержання стовбурових клітин, культурального середовища для моноцитів, що диференціюються, засобу, що індукує дедиференціювання, набору клітинного лікарського засобу, набору для одержання дедиференційованих клітин і фармацевтичної композиції, які ефективно індукують клітинну дедиференціацію, і до стовбурових клітин.

Попередній рівень техніки

Деякий час тому увага дослідників було повернута до медичних процедур, направлених на сприяння регенерації тканин для заміщення клітин, втрачених з будь-якої причини, як основне лікування захворювань. В останні роки, подальший розвиток отримала концепція клітинних лікарських засобів, які призначені для регенерації і відновлення тканин в патологічній ділянці за допомогою взаємодії міжклітинних біологічно активних речовин шляхом ін'єкції стовбурових клітин або клітин-попередників клітин тканини.

У зв'язку з цим, було багато повідомлень про те, що диференційовані клітини в тканині, наприклад, моноцити, що походять з периферичної крові, диференціюються в стовбурові клітини при культивуванні в присутності специфічних цитокінів.

Однак, коли стовбурові клітини або тканинні клітини-попередники вводять в живий організм у вигляді клітинного лікарського засобу, то процентна частка клітин, що надходять в мішеневу пошкоджену ділянку, не завжди висока і непостійна. Для розв'язання цієї проблеми потрібне одержання великої кількості клітин. Крім того, поведінка клітин, які розподіляються в ділянках, які відрізняються від ділянки-мішені, ще не була детально досліджена, і залишається питання побічних ефектів. Крім того, хоча для посиленого терапевтичного ефекту необхідне введення великої кількості клітин, одержання аутологічних клітин за короткий період часу представляється складним.

Недавно стало зрозуміло, що відбувається феномен, який називається "хомінгом". При цьому феномені відбувається експресія SDF1 (що походить з клітин строми фактор 1) або VEGF (судинний ендотеліальний клітинний фактор росту) пошкодженій ділянці в умовах ішемії; як частини системи біологічної репарації ці фактори служать як молекули, що індукуються; і клітини, що експресують рецептори, які відповідають цим молекулам, що індукуються, примусово направляються в пошкоджену ділянку. Рецепторами цих факторів є CXCR4 для SDF1 і VEGFR для VEGF. Наприклад, в непатентному документі 1 повідомляється, що рана не заживає, якщо SDF1 блокується в ішемічній ділянці, або коли клітини, що експресують CXCR4, видаляються з крові.

Fandrich (непатентний документ 2), Huberman (непатентний документ 3), і т. д., повідомляють про способи одержання плюрипотентних стовбурових клітин з моноцитів людини шляхом індукції дедиференціації. У цих способах для інкубації використовуються різні цитокіни, включаючи M-CSF (фактор, що стимулює колонії макрофагів). Кожний спосіб культивування показав, що деякі недиференційовані маркери ставали позитивними. Крім того, Kuwana et al. (непатентний документ 4) повідомляють, що мультипотентні стовбурові клітини (MOMC) можуть бути індуковані з моноклеарних клітин людини з використанням культурального планшета, на який наноситься фібрoneктин.

Список посилань

Непатентний документ 1: Nat. Med. 2004 Aug; 10 (8): 858-64

Непатентний документ 2: Ruhnke M, Fandrich F, "Differentiation of in vitro-modified human peripheral blood monocytes into hepatocyte-like and pancreatic islet-like cells", Gastroenterology, 128 (2005) 1774

Непатентний документ 3: Yong Zhao, Eliezer Huberman, "A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells", PNAS 100 (2003) 2426

Непатентний документ 4: Kuwana M. et al., "Human circulating CD14+monocytes as a source of progenitors that exhibit mesenchymal cell differentiation", J. Leukoc. Biol., 74 (2003) 833

Непатентний документ 5: Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H., "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues", J. Biol. Chem., 226, 497-509 (1957)

Короткий опис суті винаходу

Технічне завдання

Одержання стовбурових клітин, які ефективно поступають в ділянку-мішень, вважалось проблематичним в галузі клітинних лікарських засобів. Метою даного винаходу є одержання

таких стовбурових клітин, спосіб масового одержання стовбурових клітин за короткий термін, і фармацевтична композиція для індукції стовбурових клітин.

Іншою метою винаходу є одержання засобу для лікування захворювань, пов'язаних з пошкодженими клітинами, тканинами або органами.

5 Ще однією метою винаходу є одержання культурального середовища, що індукує дедиференціацію, засобу, що індукує дедиференціацію, набору клітинного лікарського засобу, набору для одержання дедиференційованих клітин і стовбурових клітин.

Вирішення завдання

10 Як вирішення вказаних вище завдань, заявники виявили, що культивування моноцитів периферичної крові протягом короткого періоду часу в присутності індукуючого дедиференціацію засобу за даним винаходом продукує велику кількість дедиференційованих клітин. Заявники також виявили, що безпосереднє введення фармацевтичної композиції за даним винаходом в живий організм значно ефективно для лікування пов'язаних з пошкодженням захворювань. Заявники, крім того, виявили, що введення щонайменше одного  
15 представника, вибраного з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту, викликає дедиференціацію моноцитів в клітині, здатні відновлювати пошкоджені тканини або органи, такі як стовбурові клітини, можливо, в кооперації з інтравітальним M-CSF. Таким чином, даний винахід належить до терапевтичного засобу для лікування захворювань, пов'язаних з пошкодженими клітинами, тканинами або органами.

20 Зокрема, даний винахід належить до наступних аспектів.

Пункт 1. Стовбурові клітини, одержані культивуванням моноцитів в присутності (i) M-CSF і (ii) щонайменше одного представника, вибраного з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту, за допомогою цього дедиференціюючи моноцити.

25 Пункт 2. Стовбурові клітини за п. 1, де активний інгредієнт розчинного у воді рослинного екстракту являє собою цукор або комплекс, що містить цукор, причому активний інгредієнт дедиференціює моноцити.

Пункт 3. Стовбурові клітини за п. 1, де активний інгредієнт розчинного у воді рослинного екстракту має молекулярну масу від 1000 до 500000, причому активний інгредієнт дедиференціює моноцити.

30 Пункт 4. Стовбурові клітини за п. 1, де активний інгредієнт розчинного у воді рослинного екстракту адсорбований на колонці Con A, причому активний інгредієнт дедиференціює моноцити.

Пункт 5. Стовбурові клітини за п. 1, де активний інгредієнт розчинного у воді рослинного екстракту адсорбований на аніонообмінній смолі, причому активний інгредієнт дедиференціює моноцити.  
35

Пункт 6. Стовбурові клітини за п. 1, де активний інгредієнт розчинного у воді рослинного екстракту являє собою фракцію водної фази рослинного походження, екстраговану методом Folch, або її очищений продукт.

Пункт 7. Стовбурові клітини за п. 1, де моноцити являють собою моноцити людини.

40 Пункт 8. Стовбурові клітини за будь-яким з пп. 1-7, де експресований щонайменше один представник недиференційованих маркерів Nanog, Nestin, c-Kit, CD9 і Oct3/4, і експресія гена CXCR4 є значущою, в порівнянні зі стовбуровими клітинами, одержаними культивуванням моноцитів в присутності тільки M-CSF.

Пункт 9. Стовбурові клітини, в яких експресований щонайменше один представник недиференційованих маркерів Nanog, Nestin, c-Kit, CD9 і Oct3/4, і експресія гена CXCR4 є значущою.  
45

Пункт 10. Спосіб одержання стовбурових клітин, що включає культивування моноцитів в присутності (i) M-CSF і (ii) щонайменше одного представника, вибраного з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту.

50 Пункт 11. Спосіб за п. 10, де культивування виконується протягом від 7 до 14 днів.

Пункт 12. Культуральне середовище для дедиференціації моноцитів, що містить (i) M-CSF і (ii) щонайменше один представник, вибраний з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту.

55 Пункт 13. Фармацевтична композиція, що містить стовбурові клітини за будь-яким з пп. 1-9 як активний інгредієнт.

Пункт 14. Клітинний лікарський засіб, що містить стовбурові клітини за будь-яким з пп. 1-9 як активний інгредієнт.

60 Пункт 15. Засіб, що викликає дедиференціацію, який містить (i) M-CSF і (ii) щонайменше один представник, вибраний з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту, як активні інгредієнти.

Пункт 16. Засіб для лікування захворювань, пов'язаних з пошкодженими клітинами, тканинами або органами, що містить щонайменше один представник, вибраний з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту, як активний інгредієнт.

Пункт 17. Засіб для лікування захворювань, пов'язаних з пошкодженими клітинами, тканинами або органами, за п. 16, де захворювання вибрані з групи, що складається із зовнішніх травм, запальних захворювань, пошкоджень кісток або хрящів, серцево-судинних захворювань, неврологічних розладів, захворювань печінки, ниркових захворювань, діабету, atopічного дерматиту і GVHD (хвороби трансплантат проти хазяїна).

Пункт 18. Засіб для лікування захворювань, пов'язаних з пошкодженими клітинами, тканинами або органами, за п. 16, де захворювання вибрані з групи, що складається із зовнішніх травм, панкреатиту, променевого пошкодження, дерматоміозиту, множинного міозиту, некротичного фасциїту, хронічного бронхіту, перелому кісток, остеопорозу, кістково-хрящових переломів, остеохондриту, дилатативної кардіоміопатії, інфаркту міокарда, ішемічної кардіоміопатії, серцевої недостатності, гіпертрофії міокарда, застійної серцевої недостатності, рестенозу, аритмії, атеросклерозу, васкуліту, периферичної нейропатії, нейропатичного болю, інсульту, енцефаліту, менінгіту, діабетичної нейропатії, розладу з дефіцитом уваги, аутизму, хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, хвороби Крейцфельда-Якоба, зовнішніх пошкоджень або ішемії мозку або хребта, цирозу печінки, хронічного гепатиту, хронічної ниркової недостатності, гломерулонефриту, ниркової ішемії, діабету, atopічного дерматиту і GVHD.

Пункт 19. Набір клітинного лікарського засобу, що містить щонайменше стовбурові клітини за будь-яким з пп. 1-9 як суттєвий інгредієнт.

Пункт 20. Набір для одержання дедиференційованих клітин, що містить (i) M-CSF і (ii) щонайменше один представник, вибраний з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту, як суттєвих інгредієнтів.

Пункт 21. Набір за п. 20, що додатково містить моноцити як компонент.

Пункт 22. Стовбурові клітини, спосіб одержання стовбурових клітин, культуральне середовище для дедиференціації моноцитів, клітинний лікарський засіб, засіб для лікування захворювань, засіб, що викликає дедиференціацію, набір клітинного лікарського засобу або набір для одержання дедиференційованих клітин за пунктами 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 або 21, де гангліозид являє собою щонайменше один представник, вибраний з групи, що складається з GD1a, GD1b, GD2, GD3, GM1, GM2, GM3, GT1b і GQ1b.

Переваги винаходу

Використовуючи моноцити, даний винахід забезпечує масове одержання за короткий період часу стовбурових клітин, що поступають в пошкоджені тканини. Даний винахід також належить до засобу для індукції стовбурових клітин. Таким чином, очікується, що даний винахід вносить внесок в ділянку створення клітинних лікарських засобів.

Крім того, було доведено, що гангліозид і розчинний у воді екстракт рослинного походження, такий як фракція водної фази рослинного походження, екстрагована методом Folch, або її очищений продукт, служать як лікарський засіб для лікування захворювань, пов'язаних з пошкодженими клітинами, тканинами або органами.

Короткий опис креслень

На Фіг. 1 показані криві росту стовбурових клітин, індукованих з моноцитів, культивуванням в середовищах 1-5.

На Фіг. 2 показані результати генної експресії з використанням RT-PCR (полімеразної ланцюгової реакції із зворотною транскрипцією).

На Фіг. 3 представлені ефекти дедиференціації в стовбурові клітини додаванням гангліозидів.

Фіг. 4 ілюструє форми клітин після додавання гангліозидів.

На Фіг. 5 показана індукуюча дедиференціацію активність кожної екстрагованої з рослини фракції.

На Фіг. 6 показані результати активності фракцій одержаного з екстракту плодоніжки солодкої картоплі індукуючого дедиференціацію компонента, одержаного хроматографією.

На Фіг. 7 представлені зображення забарвлених анти-колагенових антитіл в мишачій печінковій тканині.

Найкращий спосіб здійснення винаходу

У даному винаході використовуються моноцити, такі як моноцити периферичної крові, як клітини, що піддаються дедиференціації.

У даному винаході використовуються моноцити свавця, одержані у людей, коней, корів, мавп, таких як шимпанзе, свиней, овець, кроликів, мишей, щурів, собак, кішок і подібних ссавців.

Серед них, переважні люди, мавпи, включаючи шимпанзе, і тому подібні примати. Особливо переважні моноцити людини. Моноцити одержують з кісткового мозку або крові. Переважне використання моноцитів, одержаних з крові, зокрема, моноцитів, одержаних з периферичної крові.

Спосіб виділення моноцитів із зразка крові або тому подібного матеріалу добре відомий. Наприклад, існує спосіб, що передбачає спочатку виділення моноклеарних клітин з крові з використанням розчину для сепарації клітин крові "Lymphoprep™" (Cosmo Bio Co. Ltd.), а потім обробку одержаних моноклеарних клітин покритими антитілами магнітними кульками (Miltenyi Biotec), здатними розпізнавати поверхневий антиген CD14, за допомогою цього відділяючи моноцити-мішені. Моноклеарні клітини можуть також безпосередньо використовуватися як джерело для одержання моноцитів за даним винаходом.

Моноцити людини можуть бути вибрані з продуктів, які є комерційно доступними, таких як PT038 (Lonza).

Відповідно до даного винаходу, здійснюється дедиференціація моноцитів в стовбурові клітини, і одержані клітини проліферують перед введенням випробуваному індивіду, такому як людина. У цьому випадку, моноцити одержують у пацієнта, і тому необхідне одержання як можна більшої кількості стовбурових клітин з мінімальної кількості моноцитів. Даний винахід має перевагу дедиференціації стовбурових клітин з моноцитів з високою ефективністю проліферації, за допомогою чого продукується велика кількість стовбурових клітин з невеликої кількості моноцитів.

Приклади моноцитів включають клітини типу моноцитів (моноцити, моноклеарні клітини, монобласти), що мають рецептор M-CSF (c-fms). Оскільки моноцити проліферують, тільки якщо і моноцити, і моноклеарні клітини використовуються в один і той самий час, даний винахід належить до можливості використання моноклеарних клітин як дедиференційованих клітини, на додаток до моноцитів.

У даному описі термін "стовбурова клітина" означає клітину, що експресує недиференційований маркер і має ауторепродуктивну властивість. Шляхом використання моноцитів, може бути одержана велика кількість стовбурових клітин за даним винаходом. Стівбурові клітини за даним винаходом можуть викликати диференціацію і, переважно, мають властивість плюрипотентної диференціації. Стівбурові клітини, одержані в даному винаході, є CD14- і CD45-позитивними.

Стівбурові клітини за даним винаходом характеризуються значною експресією генів CXCR4; вони також відрізняються тим, що експресований щонайменше один представник, переважно, щонайменше два представники, переважніше, щонайменше три представники, ще переважно, щонайменше чотири представники, особливо переважно, експресовані всі представники Nanog, Nestin, c-Kit, CD9 і Oct3/4.

У переважній формі стовбурової клітини за даним винаходом, ген CXCR4 значно сильніше експресований, ніж ген в стовбурових клітинах, одержаних культивуванням моноцитів в присутності тільки M-CSF, і експресований щонайменше один представник, переважно, щонайменше два представники, переважніше, щонайменше три представники, ще переважніше, щонайменше чотири представники, особливо переважно, експресовані всі п'ять представників з Nanog, Nestin, c-Kit, CD9 і Oct3/4.

Нижче представлені ознаки стовбурових клітин за даним винаходом в більш переважному варіанті здійснення:

- (i) ген CXCR4 значно сильніше експресований, ніж в стовбурових клітинах, одержаних культивуванням моноцитів в присутності тільки M-CSF;
- (ii) експресований c-Kit; і
- (iii) експресований щонайменше один недиференційований маркер, вибраний з групи, що складається з Nanog, Nestin, CD9 і Oct3/4.

Ознака, яка диференціює одержані з моноцитів стовбурові клітини за даним винаходом від інших диференційованих стовбурових клітин, являє собою значну експресію гена CXCR4, який бере участь в хомінгу клітин. У стовбурових клітинах за даним винаходом, гени CXCR4 значно сильніше експресовані, ніж гени CXCR4 в стовбурових клітинах, одержаних культивацією моноцитів в присутності тільки M-CSF. Наприклад, в переважному варіанті здійснення стовбурових клітин за даним винаходом, кількість експресії гена CXCR4, що аналізується RT-PCR або тому подібним способом, більше ніж в 3 або 4 рази більше, ніж кількість експресії внаслідок культивування моноцитів в присутності тільки M-CSF, або в присутності M-CSF+IL-3, M-CSF+IL-6&LIF і т. д. Крім того, в переважному варіанті здійснення стовбурових клітин за даним винаходом, гени CXCR4 значно сильніше експресовані, ніж гени CXCR4 в мезенхімальних стовбурових клітинах, одержаних з кісткового мозку; конкретніше, кількість експресії гена

CXCR4, що аналізується RT-PCR або тому подібним способом, більше ніж в 2 або 3 рази більше, ніж експресія гена CXCR4 в кістковому мозку.

Моноцити, одержані з стовбурових клітин за даним винаходом, як і інші дедиференційовані стовбурові клітини, характеризуються експресією c-Kit, який являє собою маркер стовбурових клітин.

Відомо, що SDF1, ліганд рецептора CXCR4, експресований в тканинах, які пошкоджені внаслідок перелому кісток і циркуляторних захворювань, в пошкоджених частинах нервової тканини або тому подібних. Тому, клітини забезпечують ще кращий ефект хомінгу клітин відносно пошкоджених ділянок, коли він служить як клітинний лікарський засіб.

Стовбурові клітини, одержані за даним винаходом, можуть використовуватися для лікування захворювань шляхом введення/ін'єкції їх в уражені ділянки. Перед ін'єкцією, переважно, культивування стовбурових клітин у відповідному культуральному середовищі для проліферації клітин. Потім клітини безпосередньо вводять/ін'єктують в уражені ділянки. Стовбурові клітини можна культивувати в загальному середовищі для клітинної культури; однак, переважно, культивувати стовбурові клітини в культуральному середовищі, що викликає дедиференціацію, за даним винаходом.

Відповідно до одного варіанту здійснення даного винаходу, стовбурові клітини за даним винаходом можуть використовуватися для лікування зовнішніх травм, запальних захворювань (панкреатиту, променевого пошкодження, дерматоміозиту, множинного міозиту, некротичного фасціїту, хронічного бронхіту), пошкодження кісток або хрящів (перелому кісток, остеопорозу, кістково-хрящових переломів, остеохондриту), серцево-судинних захворювань (наприклад, дилатаційної кардіоміопатії, інфаркту міокарда, ішемічної кардіоміопатії, серцевої недостатності, гіпертрофії міокарда, застійної серцевої недостатності, рестенозу, аритмії, атеросклерозу, васкуліту і т. д.), неврологічних розладів (наприклад, периферичної нейропатії, нейропатичного болю, інсульту, енцефаліту, менінгіту, діабетичної нейропатії, розладу з дефіцитом уваги, аутизму, хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, хвороби Крейтцфельдта-Якоба, зовнішніх пошкоджень або ішемії мозку або хребта і т. д.), захворювань печінки (цирозу печінки, хронічного гепатиту), ниркових захворювань (хронічної ниркової недостатності, гломерулонефриту, ниркової ішемії і т. д.), діабету, атопічного дерматиту, GVHD або тому подібних.

Дедиференційовані стовбурові клітини за даним винаходом були депоновані в Депозитарії Міжнародної Патентної Організації Національного Інституту Передової Науки і Технології (Central 6, 1-1, Higashi 1-chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan) 30 вересня, 2009 р, під номером доступу ABP-11184.

Як вказано вище, моноцити перетворюються на стовбурові клітини при культивуванні моноцитів в присутності (i) M-CSF і (ii) щонайменше одного представника, вибраного з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту.

У даному описі "розчинний у воді рослинний екстракт" означає екстракт всієї рослини або його частини рослини (наприклад, листя, стебла/стовбура/плодоніжки, підземного стебла, кореневищ, бульб, витких рослин, коріння, квітів, бруньок, пелюсток, зав'язей, плодів, коробочок, капсул, насіння, волокон, насінних зачатків і т. д.). Приклади екстрагентів включають воду, водний розчинник (наприклад, водний спирт, такий як водний метанол, водний етанол або водний пропанол; водний THF (тетрагідрофуран); водний ацетон) і полярні розчинники, такі як DMF (диметилформамід), DMSO (диметилсульфоксид) або диметилацетамід. "Розчинний у воді рослинний екстракт" являє собою речовину, екстраговану з такого розчинника, тобто, води, водного розчинника або полярного розчинника, здатного розчиняти полярну речовину у великій кількості. Розчинний у воді рослинний екстракт може бути одержаний таким чином. Спочатку рослину екстрагують з використанням хлорованих вуглеводнів, таких як хлороформ або метиленхлорид; спиртів, таких як метанол, етанол або пропанол; ароматичних вуглеводнів, таких як бензол або толуол; складного ефіру, такого як етилацетат; простого ефіру, такого як THF або простий діетиловий ефір; кетон, такі як ацетон і метилетилкетон; аліфатичні або аліциклічні вуглеводні, такі як гексан або циклогексан. Потім рослинний екстракт обробляють водою або водним розчинником для одержання мішеневої розчинної у воді речовини. Таким чином, розчинна у воді речовина, одержана з використанням води, водного розчинника або полярного розчинника, може, якщо потрібно, крім того, бути оброблена хлорованими вуглеводнями, такими як хлороформ або метиленхлорид; ароматичними вуглеводнями, такими як бензол або толуол; складним ефіром, таким як етилацетат; простим ефіром, таким як THF або простий діетиловий ефір; аліфатичними або аліциклічними вуглеводнями, такими як гексан або циклогексан, з тим, щоб відмити ліпофільний компонент. Розчинний у воді рослинний

екстракт являє собою переважно екстраговану за Folch з рослини фракцію водної фази або її очищений продукт.

Екстракт за Folch означає фракцію, що залишається у водній фазі, внаслідок процесу екстракції рослини з використанням розчинника хлороформ:метанол=2:1 і промивання змішаного розчинника водою. Замість хлороформу можуть використовуватися інші хлоровані вуглеводні, такі як метиленхлорид, тетрахлорид вуглецю або 1,2-дихлоретан. Замість метанолу можуть використовуватися нижчі спирти, такі як етанол, н-пропанол, ізопропанол або бутанол. Відношення хлорованого вуглеводню до спирту не обмежується співвідношенням 2:1. Може використовуватися широкий діапазон співвідношень. У даному описі змішаний розчинник з хлорованого вуглеводню і спирту має властивість високого розчинення, за допомогою цього сприяючи екстракції. Відношення хлорованого вуглеводню до спирту, переважно, встановлюється на величину, яка може забезпечити розділення на водну фазу і органічну фазу при додаванні води, за допомогою цього екстрагуючи активну речовину у водній фазі. Якщо фаза не ділиться додаванням води, то додається органічний розчинник для розділення розчинника на два шари. У даному описі, водна фаза, одержана внаслідок розділення на два шари додаванням води, називається "фракція водної фази, екстрагованої з рослини за Folch". Фракція водної фази, екстрагована іншим способом, також включена в діапазон "фракції водної фази, екстрагованої з рослини за Folch", поки вона має таку ж активну речовину.

Розчинний у воді рослинний екстракт за даним винаходом містить подібну гліколіпідну речовину (що містить один або обидва з гліколіпідів і цукру) як активний інгредієнт. Оскільки така подібна до гліколіпідів речовина має низьку розчинність в органічному розчиннику, розчинний у воді рослинний екстракт переважно виділяють у вигляді фракції водної фази. Крім того, розчинний у воді рослинний екстракт може далі бути очищений з використанням різних видів хроматографії, таких як іонообмінна хроматографія або афінна хроматографія. Очищений продукт може також використовуватися як активний інгредієнт.

Активний інгредієнт в розчинному у воді рослинному екстракті може складатися тільки з цукру або може містити і цукор, і інші компоненти (ліпіди і т. д.). Приклади цукрових компонентів включають глюкозу, арабінозу, ксилозу, рибозу, рамнозу, фукозу, деоксирибозу, манозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, лактозу, целобіозу, сахарозу, тригалоу, рафінозу, мелібіозу, мальтотриозу, мелезитозу, туранозу, глюкуронову кислоту, галактуранову кислоту, мануранову кислоту, ідуранову кислоту, глюкозамін, галактозамін, манозамін, N-ацетилглюкозамін, N-ацетилгалактозамін, N-ацетилманозамін, нейрамінову кислоту, N-ацетилнейрамінову кислоту і тому подібні. Ці компоненти можуть бути сульфатованими. Переважно, вони можуть бути присутніми в формі олігосахаридів, полісахаридів, глікозидів або гліколіпідів. Конкретні приклади полісахаридів включають глікозаміноглікан,  $\alpha$ -глюкан,  $\beta$ -глюкан, леван, фруктан, галактан, манан, ксилан, арабіан, пектинову кислоту, альгінову кислоту, пектинові речовини, гуаран, сульфатований полісахарид, полісахарид, в якому один або більше видів цукрових залишків зв'язані, полісахариди, утворені з структурних одиниць одного або більше членів вказаних вище цукрових залишків, і полісахарид, в якому множинні цукрові залишки складно зв'язані. Переважно, розчинний у воді рослинний екстракт оброблений катіонообмінною смолою після екстрагування. В одному з варіантів варіанті здійснення, розчинний у воді рослинний екстракт за даним винаходом, переважно, містить компонент, який адсорбований на аніонообмінній смолі (компонент, що має аніонну групу у воді) як активний інгредієнт. В іншому варіанті здійснення, розчинний у воді рослинний екстракт за даним винаходом, переважно, містить компонент, який зв'язується з агарозою Con A (конкавалін A) як активний інгредієнт. У переважному варіанті здійснення даного винаходу розчинний у воді рослинний екстракт адсорбований на аніонообмінній смолі і містить компонент, який зв'язується з агарозою конкаваліну A як активний інгредієнт. Як активний інгредієнт, що зв'язується з агарозою конкаваліну A, переважні полісахариди або цукор (включаючи комплекси, що містять цукор, такі як гліколіпіди), що містить залишок глюкози і/або манози, зокрема, залишок манози. У переважному варіанті здійснення розчинний у воді рослинний екстракт містить компонент, що має залишок цукру і розчинний в холодній воді або гарячій воді (що екстрагується). Компонент, переважно, являє собою полісахарид або комплекс, що містить цукор, в якому нижня межа молекулярної маси становить приблизно 500, 1000, 2000, 3000, 4000 або 5000, і вище за приблизно 500000, 300000, 200000, 100000, 80000, 60000, 50000, 40000, 30000 або 20000.

Індукція до стовбурових клітин може виконуватися культивуванням моноцитів в присутності щонайменше одного представника, вибраного з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту.

Оскільки M-CSF вже існує в живому організмі (наприклад, в організмі людини), один представник, вибраний з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного



екстракту, може служити як індуктор для викликання перетворення з моноцитів на стовбурові клітини. Стовбурові клітини поступають в уражену ділянку і, за допомогою цього, служать як терапевтичний засіб для лікування різних видів захворювань. Терапевтичний засіб, що містить як активний інгредієнт щонайменше один представник, вибраний з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту, ефективний для лікування зовнішніх травм, запальних захворювань (панкреатиту, променевого пошкодження, дерматоміозиту, множинного міозиту, некротичного фасціїту, хронічного бронхіту), пошкодження кісток або хрящів (перелому кісток, остеопорозу, кістково-хрящових переломів, остеохондриту), серцево-судинних захворювань (наприклад, дилатаційної кардіоміопатії, інфаркту міокарда, ішемічної кардіоміопатії, серцевої недостатності, гіпертрофії міокарда, застійної серцевої недостатності, рестенозу, аритмії, атеросклерозу, васкуліту і т. д.), неврологічних розладів (наприклад, периферичної нейропатії, нейропатичного болю, інсульту, енцефаліту, менінгіту, діабетичної нейропатії, розладу з дефіцитом уваги, аутизму, хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, хвороби Крейтцфельдта-Якоба, зовнішніх пошкоджень або ішемії мозку або хребта і т. д.), захворювань печінки (цирозу печінки, хронічного гепатиту), ниркових захворювань (хронічної ниркової недостатності, гломерулонефриту, ниркової ішемії і т. д.), діабету, atopічного дерматиту, GVHD або тому подібних.

Ефективна доза терапевтичного засобу, що містить щонайменше один представник, вибраний з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту як активний інгредієнт, залежить, наприклад, від застосування, віку і статі пацієнта, тяжкості захворювання або тому подібних станів. Зазвичай, кількість активного використовуваного інгредієнта складає для дорослого приблизно від 0,0001 до 100 мг, переважно, приблизно від 0,001 до 10 мг, а переважніше, приблизно від 0,01 до 5 мг на 1 кг масу тіла. Добова доза терапевтичного засобу може ділитися на 1-4 прийоми.

"Фракція водної фази, екстрагованої з рослини за Folch" включає широкий діапазон рослинних екстрактів, одержаних аналогічними способами. Крім того, активний інгредієнт розчинного у воді рослинного екстракту, що містить фракцію водної фази, екстрагованої з рослини за Folch, може комбінуватися з аніонообмінними смолами і агарозою конкаваліну А; і його активність може збільшуватися пропусканням через катіонообмінну смолу.

При застосуванні як лікарського препарату, терапевтичний засіб або фармацевтична композиція за даним винаходом може формуватися в звичайну лікарську форму шляхом використання фармацевтичного носія разом з активним інгредієнтом, який містить щонайменше один представник, вибраний з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту і, якщо потрібно, M-CSF. Терапевтичний носій вибирається залежно від бажаної лікарської форми, дозування і способу введення. Приклади терапевтичних носіїв включають різні розріджувачі і ексципієнти, такі як наповнювачі, агенти для збільшення об'єму, зв'язувальні агенти, змочувальні агенти, розпушувачі, поверхнево-активні речовини, мастильні речовини і т. д.

Лікарська форма за даним винаходом може бути вибрана з різних форм, залежно від мети лікування. Характерні приклади лікарських форм включають таблетки, пілюлі, порошки, рідини, розчини, суспензії, емульсії, гранули, капсули, супозиторії, ін'єкційні лікарські форми (рідини, суспензії і т. д.), мазі і т. д. Лікарський засіб одержують у вигляді відповідної лікарської форми звичайним способом з використанням придатного носія. Таблетка може являти собою таблетку, що має звичайне покриття, таку як таблетки з цукровим покриттям, таблетки, покриті желатином, таблетки з ентросолубільним покриттям, таблетки з плівковим покриттям, двошарові таблетки або багатошарові таблетки і т. д. Коли лікарські засоби за даним винаходом одержують у вигляді ін'єкційних препаратів в формі рідини, емульсії або суспензії, то лікарський засіб переважно стерилізується і є, переважно, ізотонічним відносно крові. Тому, фармацевтична композиція за даним винаходом може містити сіль, глюкозу або гліцерин в кількості, достатній для одержання ізотонічного розчину. Фармацевтична композиція за даним винаходом може також містити звичайний солубілізувальний агент, буфер, пом'якшувальний агент і т. д. Крім того, фармацевтична композиція за даним винаходом може також містити барвний агент, консервант, ароматизатор, віддушку, підсолоджувач і т. д., або інші лікарські засоби. При введенні і M-CSF, і щонайменше одного представника, вибраного з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту, вони можуть вводитися одночасно або окремо.

Щонайменше один представник, вибраний з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту, може прийматися всередину у вигляді харчового продукту, наприклад, напоїв, батончиків (батончиків з харчовою добавкою) і т. д. Така харчова композиція може бути одержана відповідно до звичайного способу з використанням інших

доцільних загальновідомих харчових матеріалів (сировинних матеріалів), ексципієнтів, розріджувачів і т. д.

Дедиференційовані стовбурові клітини можуть бути одержані шляхом індукування дедиференціації шляхом культивуванні вказаного вище клітинного матеріалу в комбінації (i) M-CSF і (ii) щонайменше одного представника, вибраного з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту, протягом заданого періоду.

Існують зв'язані з мембраною M-CSF, молекулярна маса яких становить приблизно 22000, і секреторні M-CSF, молекулярна маса яких становить приблизно 42000. З дисульфидним містчковим зв'язком їх молекулярна маса стає приблизно 45000 (димер M-CSF з молекулярною масою 22000) і приблизно 85000 (димер M-CSF з молекулярною масою 42000), відповідно. Існує також тип M-CSF з високою молекулярною масою, в якому протеоглікан, крім того, зв'язаний з M-CSF 85 кДа. Може використовуватися будь-який з цих різних типів M-CSF; однак переважні секреторні M-CSF, молекулярна маса яких становить приблизно 42000, і M-CSF, молекулярна маса яких становить приблизно 85000 (димер M-CSF з молекулярною масою 42000), тип M-CSF з високою молекулярною масою, в якому протеоглікан, крім того, зв'язаний з M-CSF 85 кДа. M-CSF переважно одержаний у людей, коней, корів, мавп, зокрема, шимпанзе, свиней, овець, кроликів, мишей, щурів, собак, кішок і тому подібних ссавців. Серед них, переважні люди, мавпи, зокрема, шимпанзе, і подібні примати. Особливо переважні людські моноцити. M-CSF може бути одержаний очищенням натурального продукту; однак переважний рекомбінантний M-CSF. Наприклад, переважне використання рекомбінанта, що експресується *E. coli*, без цукрового ланцюга, тому що відомо, що M-CSF має питому активність, аналогічну натуральному продукту, коли він має амінокислоти, щонайменше, від N-кінця до 153-й амінокислоти.

Гангліозид конкретно не обмежується, поки він вибраний з наступного списку, що включає GM1, GD1a, GT1b, і т. д. Безліч з цих гангліозидів можуть

17

комбінуватися. Крім того, рослинний екстракт (подібна до гліколіпиду речовина рослинного походження) може також викликати значну дедиференціацію. Може також використовуватися екстракт, одержаний з тканини тварини (подібна до гліколіпиду речовина тваринного походження). Екстракт може бути одержаний в умовах, звичайних для екстрагування подібної до гліколіпиду речовини. Активний інгредієнт лікарського засобу за даним винаходом являє собою гангліозид або розчинний у воді екстракт рослинного походження. Можуть використовуватися будь-які екстракти рослинного походження або екстракти, одержані з тканини тварин, що містять гангліозид або розчинний у воді екстракт рослинного походження. Наприклад, гангліозид у великій кількості міститься в мозку/нервовій тканині тварини, і екстракти, одержані з мозку і нервових тканин тварини, можуть використовуватися як гангліозид. Екстрагований гангліозид може бути очищений. Оскільки фракція містить гангліозид, то ступінь очищення може варіюватися. Як правило, як компонент екстракції можна використовувати фракцію, одержану в умовах, за яких можлива екстракція гліколіпід-подібних речовин. Приклади фракцій натуральних екстрактів включають екстраговану за Folch (непатентна

Джерела інформації: 5) фракцію водної фази. Переважні приклади тварин включають ссавців (корів, свиней, кроликів, овець, коней і т. д.), і гангліозид з мозку або нервових тканин свиней особливо переважний. Може також використовуватися гангліозид, одержаний з молока ссавців, такого як коров'яче молоко.

Переважають приклади гангліозидів або розчинних у воді екстрактів рослинного походження, що підлягають використанню як матеріал подібної до гліколіпиду речовини, включають солодку картоплю виду *Ipomea Batatas*, іпомею (morning glory), болотяної іпомею (swamp morning glory), іпомею плющоподібну (ivy-leaved morning glory), іпомею гострозубчасту (fingerleaf morning glory), кардинал виткий (cardinal climber), синю іпомею (blue morning glory), індійську іпомею, ЗМІНЕНА СТОРІНКА

і тому подібні березкові (Convolvulaceae); лотос горіхоносний (*Nelumbo nucifera*) (корінь лотоса), лотос жовтий (*Nelumbo lutea*) і подібні лотоси; соланум американський (*Solanum americanum*), томати (*Solanum lycopersicum*), паслін сосочковий (*Solanum mammosum*), баклажан (*Solanum melongena*), паслін чорний (*Solanum nigrum*), бульба картоплі (*Solanum tuberosum*), перець солодкий (*Capsicum annuum*), перець кайєнський (*Capsicum frutescens*),

дурман індійський (*Datura metel*), дурман волотевидний (*Datura meteloides*), дурман звичайний (*Datura stramonium*), бругмансію деревоподібну (*Brugmansia arborea*), бругмансію з строкатими стрічками (*Brugmansia suaveolens*), фізаліс звичайний (*Physalis alkekengi* var.

franchetii), кремена широка (*P. japonicum*), петунію гібридну (*Petunia x hybrida*) і подібні Solanaceouses. Крім наведених вище прикладів, може використовуватися широкий діапазон гангліозидів або розчинних у воді екстрактів рослинного походження, що містять гліколіпід. Рослина може являти собою листя, стебло, стовбури, плодоніжки, підземне стебло, кореневище, бульби, виткі рослини, коріння, квіти, бруньки, пелюстки, зав'язі, плоди, коробочки, капсули, насіння, волокна, насінні зачатки, трави і т. д. Екстракт може бути одержаний з будь-якої з цих частин.

Наприклад, може використовуватися бульбоцибулинна частина картоплі або солодкої картоплі, на додаток до інших частин картоплі або солодкої картоплі, таких як листя, стебло, стовбури, плодоніжки, підземне стебло, кореневища, бульби, виткі рослини, коріння, квіти, бруньки, пелюстки, зав'язі, плоди, коробочки, капсули, насіння, волокна, насінні зачатки, трави і т. д.

Наприклад, можливе використання трансгенної рослини, яка переробляється або для введення необхідних генів, або для нокдауну непотрібних генів, з тим, щоб збільшити продукцію гангліозиду або подібних до гліколіпідів речовин.

"Гангліозид" являє собою загальну назву глікофінголіпиду, що має сіалову кислоту, такого як GD1a, GD1b, GD2, GD3, GM1, GM2, GM3, GT1b або GQ1b.

Гангліозиди мають наступні структури.

GD1a=aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-3)bDGalNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer

GD1b=bDGalp(1-3)bDGalNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer

GD2=bDGalpNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer

GD3=aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer

GM1=bDGalp(1-3)bDGalNAc[aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer

GM2=bDGalpNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer

GM3=aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer

GT1b=aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-3)bDGalNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer

GQ1b=aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-3)bDGalNAc(1-4)[aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)]bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer

aNeu5Ac=5-ацетил- $\alpha$ -нейрамінова кислота

aNeu5Ac9Ac=5,9-діацетил- $\alpha$ -нейрамінова кислота

bDGalp =  $\beta$ -D-галактопіраноза

bDGalpNAc=N-ацетил- $\beta$ -D-галактопіраноза

bDGlc =  $\beta$ -D-глюкопіраноза

Cer = церамід (загальний N-ацилований сфінгоїд)

Може використовуватися будь-яке культуральне середовище для ссавців. Наприклад, культивування може виконуватися з використанням середовища, такого як RPMI 1640, DMEM, Eagle MEM,  $\alpha$ MEM, IMEM або M199, що містить, наприклад, приблизно від 1 до 20 % сироваткового компонента, такого як FBS, FCS, CS або HS. Культивування переважно виконується, без обмеження, в середовищі DMEM, що містить приблизно 10 % FBS. Може також використовуватися безсироваткова культура, така як Ultra CULTURE™ (середовище для типів клітин ссавців). Безсироваткове культуральне середовище конкретно не обмежується.

Дедиференційовані стовбурові клітини можуть бути одержані культивуванням моноцитів в середовищі, що містить (i) M-CSF і, (ii) щонайменше один представник, вибраний з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді екстракту рослинного походження, при 37 °C протягом приблизно від 7 до 14 днів в присутності 5 % CO<sub>2</sub>. Протягом цього періоду культивування, відбувається дедиференціація, і одержуються специфічні стовбурові клітини за даним винаходом, що експресують недиференційований маркер. Крім того, під час даного періоду культивування, значно збільшується експресія гена CXCR4, який є ознакою стовбурових клітин за даним винаходом. Навіть якщо період культивування продовжується, стовбурові клітини за даним винаходом можуть бути одержані, доки є значущий рівень експресії гена CXCR4.

Коли клітинний матеріал культивується в таких умовах, кінцева кількість одержаних стовбурових клітин приблизно в 5 разів більше їх кількості, одержаної культивуванням з використанням тільки M-CSF або комбінації з іншими цитокінами.

Можливе використання комплексу ковалентного зв'язку або нековалентного зв'язку M-CSF і щонайменше одного представника, вибраного з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді екстракту рослинного походження як засіб, що викликає дедиференціацію.

До цього часу в деяких повідомленнях було показане одержання стовбурових клітин шляхом культивування моноцитів з використанням тільки M-CSF. Навпаки, даний винахід комбінує (i) M-

CSF і (ii) щонайменше один представник, вибраний з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді екстракту рослинного походження, для одержання стовбурових клітин, що мають особливо значну експресію гена CXCR4. Культивування виконують з використанням M-CSF в концентрації 5-100 нг/мл, більш переважно 25 нг/мл. Гангліозид може являти собою суміш екстрактів, одержаних з рослин або тварин, матеріал, одержаний очищенням натурального продукту, що містить гангліозид, або хімічну композицію.

Гангліозид може міститися в культуральному середовищі в кінцевій концентрації приблизно 1-100 мкг/мл. Розчинний у воді екстракт рослинного походження може міститися в культуральному середовищі в кінцевій концентрації приблизно 0,1-100 мкг/мл.

Кінцева концентрація щонайменше одного представника, вибраного з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді екстракту рослинного походження, становить приблизно 1-100 мкг/мл. У даному описі, "гангліозид" означає окремий гангліозид, такий як GD1a, GD1b, GD2, GD3, GM1, GM2, GM3, GT1b або GQ1b, або суміш цих гангліозидів. "Вміст гангліозидів" означає їх загальний вміст при використанні множинних гангліозидів.

#### Набір

Даний винахід також належить до набору клітинного лікарського засобу, який містить стовбурові клітини за даним винаходом як суттєвий інгредієнт; і до набору для одержання дедиференційованих клітин, який містить (i) M-CSF і (ii) гангліозид розчинного у воді екстракту рослинного походження як основні інгредієнти.

Набір клітинного лікарського засобу містить стовбурові клітини моноцитарного походження за даним винаходом і, якщо потрібно, культуральне середовище, що містить (i) M-CSF і (ii) щонайменше один представник, вибраний з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді екстракту рослинного походження, контейнер для культури і т. д. Набір може являти собою шприц для ін'єкції, заповнений стовбуровими клітинами моноцитарного походження.

Кількість стовбурових клітин моноцитарного походження в наборі клітинного лікарського засобу складає, наприклад, приблизно від  $1 \times 10^4$  до  $1 \times 10^7$  на набір.

Набір для одержання дедиференційованих клітин за даним винаходом містить (i) M-CSF і (ii) щонайменше один представник, вибраний з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді екстракту рослинного походження; культуральне середовище, контейнер для культури, моноцити і т. д.

#### Промислова застосовність

##### Галузь техніки, в якій може застосовуватися винахід

Даний винахід може застосовуватися у всіх галузях, в яких застосовуються стовбурові клітини, зокрема, в галузі клітинних лікарських засобів, яка привертає увагу в останні роки. При застосуванні в даній галузі, клітини повинні бути одержані і надані в межах короткого періоду часу. Крім того, з урахуванням імунологічного відторгнення, важливе одержання дедиференційованих стовбурових клітин з клітин, взятих з організму пацієнта, і введення одержаних стовбурових клітин в організм того ж пацієнта з метою безпеки. Тому, важливо одержати певну кількість стовбурових клітин в межах короткого періоду часу, після того як клітинний матеріал взятий з організму пацієнта. Даний винахід значущий в цьому відношенні.

Один з варіантів здійснення даного винаходу являє собою внутрішньовенне введення дедиференційованих клітин.

Клітини можуть бути введені пацієнту звичайним способом після одержання мішеневих клітин шляхом культивування. Наприклад, після обробки трипсином, клітини збирають центрифугуванням і диспергують у відповідному ізотонічному розчині перед внутрішньовенним введенням. Крім того, можливе додавання відповідного фармацевтично прийнятного носія для стабілізації клітин. Коли є інтервал часу між виділенням клітин з культурального розчину і введенням культивованих клітин, то клітини можуть бути консервовані звичайним способом при  $-80^\circ\text{C}$  або в присутності рідкого азоту. Більш переважно клітини збирають для використання з метою лікування через 7-14 днів після початку культивування для дедиференціації моноцитів, а потім одразу використовують для цільового лікування, тому що протягом цього періоду існує імовірність найвищого рівня експресії гена CXCR4. Відповідно, період використання клітин може визначатися залежно від рівня експресії маркерного гена, а не обмежуватися періодом культивування.

##### Галузь техніки, в якій може застосовуватися терапевтичний засіб/лікарський компонент

Згідно з даним винаходом проводиться введення щонайменше одного представника, вибраного з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді екстракту рослинного походження, і, якщо потрібно, M-CSF, ссавцем, таким як люди, для лікування за допомогою цього різних захворювань, таких як зовнішні травми, запальні захворювання, пошкодження кісток або хрящів, серцево-судинні захворювання, неврологічні розлади, печінкові захворювання

і ниркові захворювання, діабет, atopічний дерматит або GVHD. Щонайменше один представник вибирають з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді екстракту рослинного походження, для дедиференціації моноцитів тестованого індивіда в стовбурові клітини, здатні вилікувати захворювання. Стовбурові клітини переміщуються в уражену ділянку і функціонують як терапевтичний засіб. В іншому варіанті щонайменше один представник, вибраний з групи, що складається з гангліозиду і екстрагованої за Folch фракції водної фази рослинного походження, може безпосередньо або непрямо діяти на клітини, відмінні від моноцитів.

Використання набору

Дедиференційовані стовбурові клітини, одержані з використанням засобу, що викликає дедиференціацію, можуть використовуватися у вигляді набору, після того як вони зазнають відповідної консервуючої обробки.

Аналогічним чином, засіб, що викликає дедиференціацію, може використовуватися у вигляді набору, який містить засіб як суттєвий інгредієнт.

Нижче описані приклади даного винаходу для більш конкретного опису винаходу. Однак даний винахід не обмежується наведеними прикладами.

Приклади

Даний винахід більш детально пояснений нижче на основі прикладів. Однак даний винахід не обмежується даними прикладами.

Приклад 1

Відповідно до даного винаходу, людські моноцити (PT038; LONZA) культивували з додаванням наступних добавок 1-5 до основного культурального середовища (концентрації виражені у вигляді кінцевої концентрації, що далі іменується в даному описі "FC"). На Фіг. 1 показані результати. По вертикальній осі на Фіг. 1 вказана кількість життєздатних клітин, а по горизонтальній осі показана кількість днів культивування. Результати демонструють, що стовбурові клітини моноцитарного походження за даним винаходом мають дуже високу проліферативну активність, в порівнянні з клітинами, одержаними способами, описаними Fandrich, Huberman, і т. д.

Добавка 1: M-CSF (FC: 25 нг/мл) + гангліозиди (GD1a коров'ячого мозку; SIGMA) (FC: 100 мкг/мл)

Добавка 2: M-CSF (FC: 5 нг/мл) + IL-3 (FC: 0,5 нг/мл) (непатентний документ 2)

Добавка 3: M-CSF (FC: 25 нг/мл) + IL-6 (FC: 20 нг/мл) & LIF (FC: 1000 одиниць/мл) (непатентний документ 3)

Добавка 4: M-CSF (FC: 25 нг/мл)

Добавка 5: M-CSF (FC: 25 нг/мл) + гліколіпід (одержаний розчиненням екстрагованої за Folch фракції водної фази, одержаної з 1 г рослини (солодкої картоплі) на основі сухої маси в 500 мл культурального середовища)

Екстраговану за Folch фракцію водної фази, використану в добавці 5, одержували таким чином. Сублімовані клітини (з тканини солодкої картоплі) ретельно гомогенізували у придатній кількості фізіологічного сольового розчину і потім енергійно змішували з еквівалентною кількістю розчину хлороформу-метанолу (2:1). Після розділення суміші центрифугуванням на фазу органічного розчинника, фазу модифікованого білка і водну фазу, використовували екстракт в розчинній у воді фракції верхнього шару.

Додавання всіх добавок до середовища DMEM (20 % фетальна теляча сироватка), культивування моноцитів людини починали в концентрації  $1,5 \times 10^5$  клітин/мл (200 мкл/ямку, 96-ямковий планшет). Кількість життєздатних клітин визначали з використанням люмінесцентного аналізу життєздатності клітин Promega's CellTiter-Glo™. Конкретніше, ямку промивали фізіологічним сольовим розчином 3 рази на кожний день культивування для видалення неприкріплених клітин, і потім визначали кількість прикріплених і вирощених клітин.

Тим часом, рівні генної експресії стовбурових клітин, одержаних способами культивування відповідно до даного винаходу і попереднього рівня техніки, аналізували RT-PCR. Культивування моноцитів людини починали у вказаних вище умовах і в концентрації  $1,5 \times 10^5$  клітин/мл (6 мл/чашка діаметром 6 см). На 14-й день, мРНК збирали з використанням набору Micro Fast Track 2.0 Kit (Invitrogen). В подальшому, аналіз рівня експресії виконували RT-PCR. Нижче ідуть параметри і інформація про послідовність праймерів:

Nanog	F 5'-GCTTGCCTTGCTTTGAAGCA-3' (SEQ ID NO:1)
	R 5'-TTCTTGACTGGGACCTTGTC-3' (SEQ ID NO:2)
Nestin	F 5'-CTCTGACCTGTCAAGAAT-3' (SEQ ID NO:3)
	R 5'-GACGCTGACACTTACAGAAT-3' (SEQ ID NO:4)
Oct3/4	F 5'-GAGCAAAACCCGGAGGAGT-3' (SEQ ID NO:5)

	R 5'-TTCTCTTTTCGGGCCTGCAC-3' (SEQ ID NO:6)
c-Kit	F 5'-CCAAGTCATTGTTGGATAAG-3' (SEQ ID NO:7)
	R 5'-CTTAGATGAGTTTTCTTTCAC-3' (SEQ ID NO:8)
CXCR4	F 5'-ATCTTCCTGCCACCATCTACTCCATCATC-3' (SEQ ID NO:9)
	R 5'-ATCCAGACGCCAACATAGACCACCTTTTCA-3' (SEQ ID NO: 10)

Структура смуги (величини концентрації виражені у вигляді кінцевої концентрації, що далі називається "FC")

- 1: M-CSF (FC: 25 нг/мл) + гангліозиди (GD1a коров'ячого мозку; SIGMA) (FC: 100 мкг/мл)
- 2: M-CSF (FC: 5 нг/мл) + IL-3 (FC: 0,5 нг/мл) (непатентний документ 2)
- 3: M-CSF (FC: 25 нг/мл) + IL-6 (FC: 20 нг/мл) + LIF (FC: 1000 одиниць/мл) (непатентний документ 3)
- 4: M-CSF (FC: 25 нг/мл)
- 5: M-CSF (FC: 25 нг/мл) + екстрагована за Folch фракція водної фази рослинного походження
- 6: Без культури
- 7: Без культури
- 1-6: Моноцити людини, 7: кДНК кісткового мозку людини (Human Bone Marrow Marathon-Ready cDNA; Clontech)

Фіг. 2 демонструє, що стовбурові клітини, одержані за даним винаходом (смуга 1 або 5), мали дуже високий рівень експресії CXCR4.

У подальшому проводили порівняння величин індукуючої стовбурові клітини активності різних гангліозидів.

Конкретніше, гангліозиди додавали до культурального середовища в кінцевій концентрації 100 мкг/мл і культивували моноцити периферичної крові.

До неї додавали rhM-CSF в кінцевій концентрації 25 нг/мл. Потім кількість життєздатних клітин визначали на другому тижні культивування у вигляді активності люциферази з використанням набору CellTiter-Glo (Promega). У результаті, всі культури з використанням GM1, GD1a, GT1b і суміші виявили однаково сильну індукуючу стовбурові клітини активність (Фіг. 3). Крім того, не спостерігали відмінності морфології клітин (Фіг. 4; фотографії ілюструють клітинну морфологію на другому тижні культивування).

Нижче на Фіг. 3 представлені структури смуг (величини концентрації виражені у вигляді кінцевої концентрації, що далі іменується "FC"):

- 1: GM1 (FC: 25 нг/мл)
- 2: GD1a (FC: 25 нг/мл)
- 3: GT1b (FC: 25 нг/мл)
- 4: Суміш рівних кількостей GM1, GD1a і GT1b (FC: 25 нг/мл (загальна концентрація))
- 5: Тільки M-CSF
- 6: Тільки плазма

Величини індукуючої стовбурові клітини активності різних екстрактів рослинного походження

Екстракти і стовбурів кореня лотоса, і іпомеї плющоподібної одержували в таких самих умовах, як і з плодоніжки вказаної вище солодкої картоплі. Порівняння величин активності стандартизували на основі величин сухої маси рослин, використаних для екстракції. Питома активність була основана на активності відносно проліферації клітин екстракту плодоніжки солодкої картоплі, прийнятій за 100. Як ясно з Фіг. 5, аналогічні величини індукуючої стовбурові клітини активності спостерігалися у екстрактів з стовбурів кореня лотоса і іпомеї плющоподібної.

Однією ознакою активного інгредієнта розчинного у воді екстракту рослинного походження є екстракція головним чином у водну фазу способом екстракції за Folch. Розчинний у воді рослинний екстракт може бути фракціонований, відділений або очищений пропусканням через різні колонки. Активний інгредієнт характеризується зв'язуванням з аніонообмінними смолами (Q-Сефарозою, DEAE-Сефарозою і т. д.) і зв'язуючими лектин смолами (Конкаваліном А і т. д.) в широкому діапазоні рН.

На Фіг. 6 показані результати оцінки активності протокової фракції після нанесення екстрактів на смоли, що мають спорідненість зв'язування з активним інгредієнтом. Результати виявили, що протокові фракції втратили активність в зв'язку з зв'язуванням активного інгредієнта з аніонообмінній смолою і Con A агарозою. Результати також свідчать про те, що інгібітор віддалявся за допомогою катіонообмінною смоли, таким чином, підвищуючи активність.

Розрахунок був оснований на активності екстракту плодоніжки солодкої картоплі, прийнятої за 100. Підвищена активність в проточній фракції в катіонообмінній смоли вказує на видалення

інгібітору. Протокові фракції аніонообмінної смоли і зв'язуючої лектин Con A смоли втратили активність, свідчаючи про утримання активного фактора.

#### Приклад 2

Загоювальний ефект на експериментальній моделі з введенням стовбурових клітин (приклад терапевтичного випробування з використанням мишачої моделі цирозу печінки)

Тетрахлорид вуглецю (1 мл/кг (маса тіла)) вводили лабораторним мишам двічі на тиждень протягом 12 послідовних тижнів для штучної індукції цирозу печінки. Людські дедиференційовані стовбурові клітини моноцитарного походження (hMDDSC) за даним винаходом вводили двічі мишам з моделлю цирозу печінки через хвостову вену (друге введення проводили через один тиждень після першого введення;  $1 \times 10^5$  клітин на індивіда). Через один тиждень після другого введення (через 2 тижні після першого введення), у всіх мишей виймали печінку і виконували патоморфологічний і біохімічний аналіз зрізів тканини. При гепатиті, що викликається тетрахлоридом вуглецю, повідомляють про високу експресію SDF1 (фактора-1, що походить з стромальних клітин) в запаленій ділянці, як при вірусному гепатиті (Jung et al., 2006). Оскільки hMDDSC за даним винаходом виявляє високу експресію CXCR4, який є рецептором для SDF1, очікується, що hMDDSC накопичується в запаленій ділянці за допомогою зв'язку між hMDDSC і CXCR4 для надання загоювального ефекту на оточуючі тканини (Kollet et al., 2003; Nervi et al., 2006).

Відносно функції печінки, що виявляється маркерами крові, величини GOT (глутамат-оксалацетат трансамінази) і GPT (глутамат-піруват трансамінази) одразу знижувалися і поверталися до нормальних рівнів після завершення введення тетрахлориду вуглецю. Відповідно, ці величини виявили майже нормальні рівні після двотижневого курсу лікування, і не спостерігалися великі відмінності величин, що вимірюються серед тестованих груп. Однак, як показано нижче, 12-тижневе медикаментозне лікування викликало важкий фіброз в тканині печінки, що призводить до цирозу печінки. hMDDSC за даним винаходом надавав виражений ефект на зниження і видалення фіброзної тканини, що розрослася в печінці.

#### 1. Гістопатологічний аналіз

Залиті в парафін зрізи одержували з вийнятої і імобілізованої печінки мишей і виявляли колагенові волокна, які являють собою антитіло проти колагену I і основний компонент фіброзної структури (Фіг. 7, темно-коричнє забарвлення). У той самий час, ядро забарвлювалося в синій колір (фарбування гематоксиліном).

На верхніх зображеннях показані три приклади контрольної групи, в якій вводили сольовий розчин, а hMDDSC не вводився, після індукції цирозу печінки, а на нижніх зображеннях показані три приклади, в яких двічі внутрішньовенно вводили hMDDSC. Введення hMDDSC призвело до очевидного видалення товстих пучків волокон (вказаних стрілками на верхніх зображеннях), виявленого анти-колагеновими антитілами.

Крім того, фарбування за Azan-Mallory виконували на тих самих зрізах печінки, і площу забарвленої в синій колір фіброзної тканинної частини розраховували з використанням аналізуючого зображення мікроскопа (Keyence BZ-9000) (таблиця 1).

Таблиця 1

Результати аналізу зображень фіброзних частин фарбуванням за Azan-Mallory

	Сольовий розчин	hMDDSC	Нормальна
SE	16131,3	1813,4	1351,31
Сині пікселі	40006,1	30676,7	5718
n=7, 1400000 пікселів/повну рамку			

У групи, що одержувала hMDDSC (hMDDSC), виявилася величина, що більше ніж в 5 разів перевищує величину в нормальній контрольній групі (Нормальна), якій не вводили тетрахлорид вуглецю; однак зменшення кількості фіброзної тканини в групі, якій вводили hMDDSC, досягало 23 %, в порівнянні з такою в групі, якій вводили фізіологічний сольовий розчин (Сольовий розчин).

#### 2. Біохімічний аналіз

##### А) Пептид проколагену III типу

Рівень пептиду проколагену III типу в крові вимірювали в експерименті з лікування цирозу печінки з використанням аналогічної мишачої моделі. Пептид проколагену III типу (PIIIP) являє собою кінцевий пептид, присутній в попередникові колагену, і знаходиться у вільній формі в крові і тканині у вигляді пептиду після розщеплення під час одержання колагену. Тому, PIIIP використовується як маркер, що відображає продукцію колагену (Giannini et al., 2001). Кров

брали з хвостової вени мишей одразу після експерименту двотижневого лікування, і рівень PIIIР в плазмі вимірювали способом ELISA (CUSABIO CSB-E08095) (таблиця 2).

Таблиця 2  
Кількість пептиду проколагену III типу в крові

	Сольовий розчин	hMDDSC	Нормальна
нг/мл (плазма)	283,5	64,2	57,45
SE	144	24,15	29,1
n=7			

- 5 У контрольній групі (Сольовий розчин), якій вводили фізіологічний сольовий розчин після індукції цирозу печінки, виявилася величина, приблизно в 5 разів вище, ніж в здоровій контрольній групі (Нормальна), хоча кількість проколагену в крові вказувала на різке зменшення внаслідок введення hMDDSC; була одержана величина, близька до величини у здорової миші.
- 10 У зв'язку з тим, що у групи, що одержувала фізіологічний сольовий розчин, була одержана висока величина, незвичайно висока продукція молекул колагену, ймовірно, продовжувалася протягом тривалого часу індукції цирозу печінки після припинення стимуляції тетраклоридом вуглецю. Однак виявлено, що незвичайно висока продукція колагену негайно пригнічувалася введенням hMDDSC, і кількість проколагену в крові знизилася майже до нормальних рівнів.

#### В) Гідроксипролін

- 15 З метою визначення загальної кількості волокон в тканині печінки безпосередньо за тканиною, вимірювали вміст в печінковій тканині гідроксипроліну, який є інгредієнтом колагену. Тканину печінки, виїнятої у миші після двотижневого курсу лікування, руйнували і гомогенізували, і білок, що міститься, руйнували обробкою гідроксидом натрію. Концентрацію гідроксипроліну вимірювали специфічною для гідроксипроліну кольоровою реакцією Хлораміну-Т і диметиламінобензальдегіду (таблиця 3, Reddy et al., 1996).
- 20

Таблиця 3  
Кількість гідроксипроліну в тканині печінки

	Сольовий розчин	hMDDSC	Нормальна
мкг/(г) печінки	884,4	684	222
SE	90,2	67,0	8,4
n=7			

- Хоча в групі, що одержувала hMDDSC (hMDDSC), ще виявлялася надто висока величина, яка була в 3 рази вище, ніж величина в нормальній контрольній групі (Нормальна), вона виявляла зменшення, що досягає 22,6 %, в порівнянні з групою, якій вводили фізіологічний розчин (Сольовий розчин). Іншими словами, зменшення фіброзу печінки було виявлене в групі, якій вводили hMDDSC.
- 25

- Після введення екстрагованої за Folch фракції водної фази плодоніжки солодкої картоплі вказаним вище мишам з цирозом печінки через хвостову вену в кількості 6,6 мг/кг, заявники підтвердили зменшення цирозу печінки.
- 30

#### 3. Висновок

- Таким чином, моделі лікування цирозу печінки у мишей з використанням hMDDSC за даним винаходом відрізняються тим, що продукція волокон значно пригнічується, і фіброзна тканина видаляється або її кількість зменшується простим і короткочасним лікуванням (лише двома введеннями за два тижні). У результаті, це лікування ефективно для швидкого полегшення плинності цирозу печінки і для відновлення печінкової тканини до нормального стану. Таким чином, дане лікування є інноваційною терапевтичною системою, яка сприяє регенерації печінкової тканини.
- 35

#### 4. Посилання

- 40 Jung YJ, Ryu KH, Cho SJ, Woo SY, Seoh JY, Chun CH, Yoo K, Moon IH, and Han HS. "Syngenic bone marrow cells restore hepatic function in carbon tetrachloride-induced mouse liver injury", Stem Cells Dev., 2006, 15, 687-695

- Kollet PPO, Shvitiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, Kahn J, Spiegel A, Dar A, Samira S, Goichberg P, Kalinkovich A, Arenzana-Seisdedos F, Nagler A, Hardan I, Revel M, Shafritz DA, Lapidot T. "HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+stem cell recruitment to the liver", J Clin Invest. 2003, 112, 160-169.
- 45

Nervi B, Link DC, DiPersio JF. "Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. J Cell Biochem", 2006, 99, 690-705.



Giannini E, Cagliaris S, Ceppa P, Risso D, Lantieri PB, Testa R. "Serum pro-collagen III peptide levels are related to lobular necrosis in untreated patients with chronic hepatitis C", Eur J Gastroenterol Hepatol. 2001, 13, 137-141.

5 Reddy GK, Enwemeka CS. "A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues", Clin Biochem. 1996, 29, 225-229.

## СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

```

<110> OTSUKA PHARMACEUTICAL CO., LTD.

<120> ОДЕРЖАНА ІЗ МОНОЦИТУ ЛЮДИНИ СТОВБУРОВА КЛІТИНА ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧНОГО
ЗАСТОСУВАННЯ І СПОСІВ ЇЇ ІНДУКЦІЇ

<130> P09-91

<150> JP 2008-299359
<151> 2008-11-25

<160> 10

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Праймер для Nanog

<400> 1
gcttgcccttg ctttgaagca 20

<210> 2
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Праймер для Nanog

<400> 2
ttcttgactg ggaccttgtc 20

<210> 3
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Праймер для Nestin

<400> 3
ctctgacctg tcaagaagaat 20

<210> 4
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Праймер для Nestin

<400> 4
gacgctgaca cttacagaat 20

```

```

<210> 5
<211> 19
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Праймер для Oct3/4

<400> 5
gagcaaaacc cggaggagt 19

<210> 6
<211> 19
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Праймер для Oct3/4
<400> 6
ttctctttcg ggcctgcac 19

<210> 7
<211> 20
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Праймер для CD117 (c-Kit)

<400> 7
ccaagtcatt gttggataag 20

<210> 8
<211> 21
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Праймер для CD117 (c-Kit)

<400> 8
cttagatgag ttttctttca c 21

<210> 9
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Праймер для CXCR4

<400> 9
atcttctctgc ccaccatcta ctccatcatc 30

<210> 10
<211> 30
<212> ДНК
<213> Штучна

<220>
<223> Праймер для CXCR4

<400> 10
atccagacgc caacatagac caccttttca 30

```

5

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Стовбурові клітини, одержані культивуванням моноцитів в присутності (i) M-CSF і (ii) щонайменше одного представника, вибраного з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту, екстрагованого методом екстракції Folch, за допомогою цього дедиференціюючи моноцити, де експресія гена CXCR4 вказаних стовбурових клітин

10

більш ніж в три або чотири рази більша в порівнянні з експресією стовбуровими клітинами, одержаними шляхом культивування моноцитів у присутності M-CSF і IL-3, і експресія гена CXCR4 вказаних стовбурових клітин більш ніж в два або три рази більша в порівнянні з експресією мезенхімальними стовбуровими клітинами, одержаними з кісткового мозку.

5 2. Стовбурові клітини за п. 1, де активний інгредієнт розчинного у воді рослинного екстракту являє собою цукор або комплекс, що містить цукор, причому активний інгредієнт дедиференціює моноцити.

3. Стовбурові клітини за п. 1, де активний інгредієнт розчинного у воді рослинного екстракту має молекулярну масу від 1000 до 500000, причому активний інгредієнт дедиференціює моноцити.

10 4. Стовбурові клітини за п. 1, де активний інгредієнт розчинного у воді рослинного екстракту адсорбований на колонці Con A, причому активний інгредієнт дедиференціює моноцити.

5. Стовбурові клітини за п. 1, де активний інгредієнт розчинного у воді рослинного екстракту адсорбований на аніонообмінній смолі, причому активний інгредієнт дедиференціює моноцити.

15 6. Стовбурові клітини за п. 1, де активний інгредієнт розчинного у воді рослинного екстракту являє собою фракцію водної фази рослинного походження, екстраговану методом Folch, або її очищений продукт.

7. Стовбурові клітини за п. 1, де моноцити являють собою моноцити людини.

8. Стовбурові клітини за будь-яким з пп. 1-7, де експресований щонайменше один представник недиференційованих маркерів Nanog, Nestin, c-Kit, CD9 і Oct3/4, і експресія гена CXCR4 є значущою в порівнянні зі стовбуровими клітинами, одержаними культивуванням моноцитів в присутності тільки M-CSF.

9. Спосіб одержання стовбурових клітин, що включає культивування моноцитів в присутності (i) M-CSF і (ii) щонайменше одного представника, вибраного з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту, екстрагованого методом екстракції Folch.

25 10. Спосіб за п. 9, де культивування виконують протягом від 7 до 14 днів.

11. Застосування культурального середовища для дедиференціації моноцитів, де культуральне середовище містить (i) M-CSF і (ii) розчинний у воді рослинний екстракт, екстрагований методом екстракції Folch.

30 12. Фармацевтична композиція, що містить стовбурові клітини за будь-яким з пп. 1-8 як активний інгредієнт.

13. Клітинний лікарський засіб, що містить стовбурові клітини за будь-яким з пп. 1-8 як активний інгредієнт.

35 14. Засіб, що викликає дедиференціацію моноцитів, що містить (i) M-CSF і (ii) щонайменше одного представника, вибраного з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту, екстрагованого методом екстракції Folch, як активні інгредієнти.

15. Засіб для лікування захворювань, пов'язаних з пошкодженими клітинами, тканинами або органами, що містить (i) M-CSF і (ii) щонайменше одного представника, вибраного з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту, екстрагованого методом екстракції Folch, як активний інгредієнт.

40 16. Засіб для лікування захворювань, пов'язаних з пошкодженими клітинами, тканинами або органами, за п. 15, де захворювання вибрані з групи, що складається із зовнішніх травм, запальних захворювань, пошкоджень кісток або хрящів, серцево-судинних захворювань, неврологічних розладів, захворювань печінки, ниркових захворювань, цукрового діабету, atopічного дерматиту і GVHD (хвороби трансплантат проти хазяїна).

45 17. Засіб для лікування захворювань, пов'язаних з пошкодженими клітинами, тканинами або органами, за п. 15, де захворювання вибрані з групи, що складається із зовнішніх травм, панкреатиту, променевого пошкодження, дерматоміозиту, множинного міозиту, некротичного фасциїту, хронічного бронхіту, перелому кісток, остеопорозу, кістково-хрящових переломів, остеохондриту, дилатативної кардіоміопатії, інфаркту міокарда, ішемічної кардіоміопатії, серцевої недостатності, гіпертрофії міокарда, застійної серцевої недостатності, рестенозу, аритмії, атеросклерозу, васкуліту, периферичної нейропатії, нейропатичного болю, інсульту, енцефаліту, менінгіту, діабетичної нейропатії, розладу з дефіцитом уваги, аутизму, хвороби Альцгеймера, хвороби Паркінсона, хвороби Крейцфельдта-Якоба, зовнішніх пошкоджень або ішемії мозку або хребта, цирозу печінки, хронічного гепатиту, хронічної ниркової недостатності, гломерулонефриту, ниркової ішемії, діабету, atopічного дерматиту і GVHD.

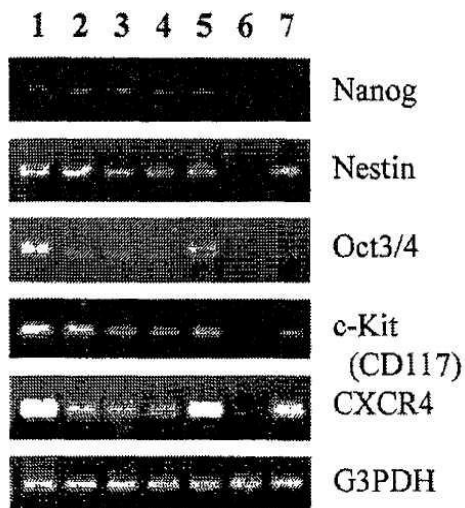
50 18. Набір клітинного лікарського засобу, що містить щонайменше стовбурові клітини за будь-яким з пп. 1-8 як суттєвий інгредієнт.

55 19. Набір для одержання дедиференційованих клітин, що містить (i) M-CSF і (ii) щонайменше одного представника, вибраного з групи, що складається з гангліозиду і розчинного у воді рослинного екстракту, екстрагованого методом екстракції Folch, як суттєві інгредієнти.

20. Набір за п. 19, що додатково містить моноцити як компонент.



Фіг. 1



Фіг. 2

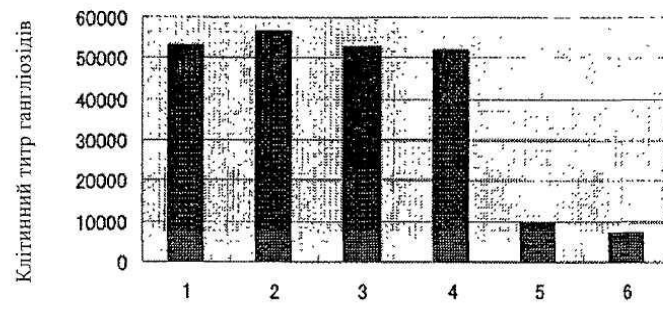


Fig. 3

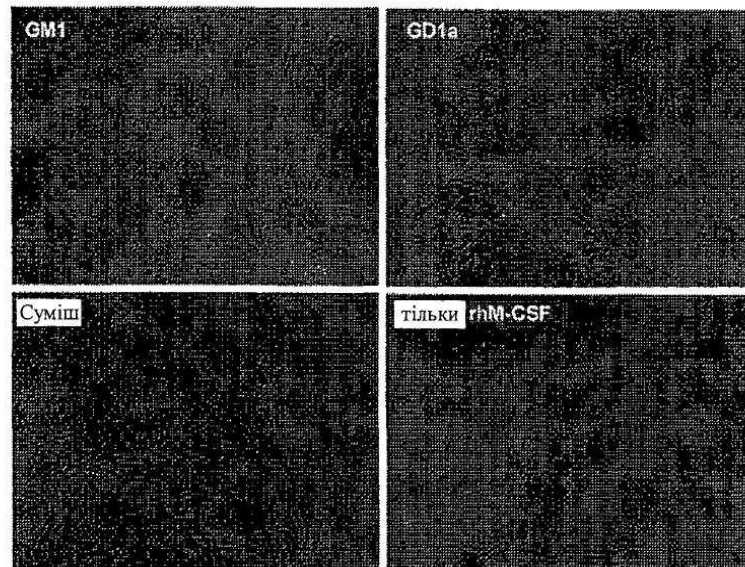
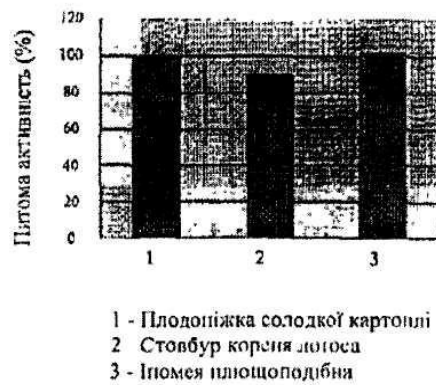


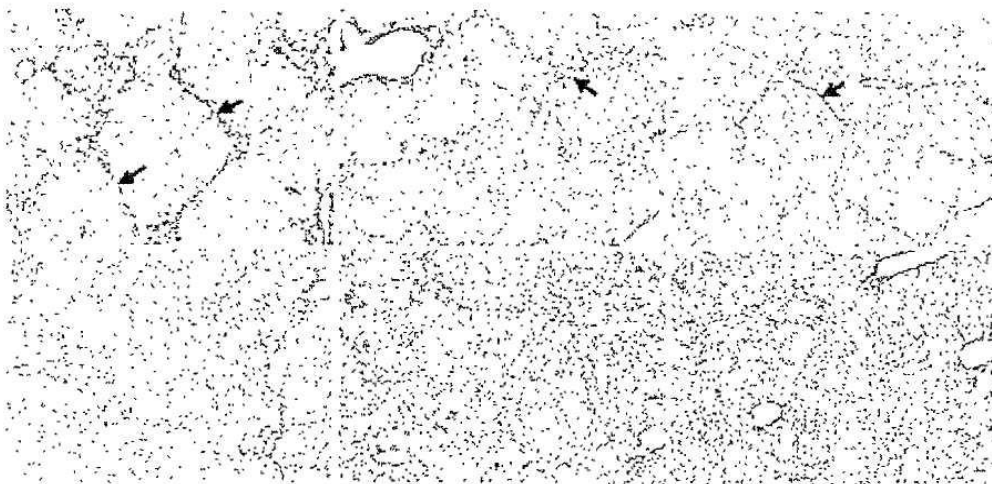
Fig. 4



Фіг. 6



Фіг. 6



Фіг. 7

---

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601