



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **99167** (13) **C2**

(51) МПК (2012.01)

A61K 35/44 (2006.01)

C12N 5/00

C12N 5/073 (2010.01)

A61P 19/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2010 09287	(72) Винахідник(и):	Браун Лаура Дж. (US), Госевска Анна (US), Кіхм Ентоні Дж. (US), Крамер Брайан К. (US)
(22) Дата подання заявки:	17.12.2008	(73) Власник(и):	ЕТІКОН, ІНКОРПОРЕЙТЕД, Route 22 West, PO Box 151, Somerville, NJ 08876-0151, United States of America (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	25.07.2012	(74) Представник:	Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр. №115
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	61/016,849	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	US 2005/0019865 A1, 27.01.2005 US 2006/0233765 A1, 19.10.2006 US 6,340,369 B1, 22.01.2002
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	27.12.2007		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	US		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.11.2010, Бюл.№ 22		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.07.2012, Бюл.№ 14		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	РСТ/US2008/087237, 17.12.2008		

(54) ЛІКУВАННЯ ДЕГЕНЕРАЦІЇ МІЖХРЕБЦЕВИХ ДИСКІВ З ВИКОРИСТАННЯМ КЛІТИН, ОДЕРЖАНИХ З ТКАНИНИ ПУПОВИНИ ЛЮДИНИ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу лікування пацієнта, що має захворювання або стан, пов'язаний з дегенерацією IVD, що включає введення клітин, одержаних з тканини пуповини людини, або введення фармацевтичних композицій, що містять такі клітини або одержані з таких клітин.

UA 99167 C2

Для даної заявки вимагається пріоритет на основі попередньої заявки на видачу патенту США № 61/016849, поданої 27 грудня 2007, зміст якої включений в даний опис за допомогою посилання в повному об'ємі.

Винахід загалом стосується галузі терапевтичних засобів, оснований на клітинах. У деяких аспектах винахід стосується застосування клітин, одержаних з тканини пуповини, для лікування захворювання або стану, пов'язаного з дегенерацією міжхребетних дисків.

Протягом опису цитовані різні публікації, включаючи патенти, опубліковані заявки, технічні статті і наукові статті. Кожна з таких цитованих публікацій включена в даний опис за допомогою посилання в повному об'ємі і для всіх цілей.

Біль в нижньому відділі спини є одним з найбільш поширених причин непрацездатності і викликає значний фізичний і емоційний дискомфорт у уражених таким захворюванням людей. Порушення структури міжхребетного диска (IVD) є однією з лідируючих причин болю в нижньому відділі спини. IVD утворений зовнішнім волокнистим фіброзним кільцем (annulus fibrosus), що оточує більш м'яке, гелеподібне драглисте ядро (nucleus pulposus). Волокна фіброзного кільця прикріплені до замикаючих пластинок тіл хребців хребта і охоплюють драглисте ядро, створюючи ізобаричне оточення. При аксіальному навантаженні драглисте ядро здушується і переносить таке навантаження радіально на фіброзне кільце. Шарувата природа фіброзного кільця додає йому високу міцність при розтягненні і тому дозволяє йому розширятися в радіальному напрямі у відповідь на таке перенесене навантаження.

У здоровому IVD клітини драглистого ядра утворюють тільки близько одного процента тканини диска по об'єму. Такі клітини утворюють позаклітинний матрикс (ECM) з високим процентним вмістом протеогліканів. Протеоглікани містять сульфатовані функціональні групи, які втримують воду, тим самим забезпечуючи амортизуючі якості драглистого ядра. Клітини драглистого ядра також можуть секретувати невеликі кількості цитокінів і металопротеїназ матриксу (MMP), які допомагають регулювати метаболізм клітин драглистого ядра.

У деяких випадках захворювання IVD поступова дегенерація IVD зумовлена механічною нестійкістю в інших частинах спини. У таких випадках підвищені навантаження і здушення драглистого ядра стають причиною того, що клітини в диску (або проникаючі макрофаги) виділяють більше вказаних вище цитокінів, ніж нормальні кількості. У інших випадках захворювання IVD генетичні чинники або апоптоз можуть спричинити зменшення кількості клітин в диску і/або вивільнення токсичних кількостей цитокінів і MMP. У деяких випадках насосна функція диска може бути порушена (внаслідок, наприклад, зниження концентрації протеогліканів в драглистому ядрі), тим самим приводячи до сповільнення потоку поживних речовин в диск, а також стоку продуктів життєдіяльності з диска. Така знижена здатність забезпечувати клітини поживними речовинами і видаляти продукти життєдіяльності може приводити до зниження життєздатності і метаболізму в клітинах, приводячи до додаткового руйнування ECM нарівні з накопиченням високих рівнів токсинів, які можуть спричинити роздратування нервів і біль.

По мірі прогресування дегенерації IVD токсичні рівні цитокінів і MMP, присутні в драглистому ядрі, починають руйнувати ECM. Зокрема, MMP (які опосередковані цитокінами), починають розщеплення водоутримуючих частин протеогліканів, тим самим знижуючи їх водоутримуючу здатність. Таке руйнування приводить до зниження еластичності драглистого ядра, що змінює характер навантаження в межах диска і, в свою чергу, може приводити до розшарування фіброзного кільця. Такі зміни викликають велику механічну нестійкість, яка може стати причиною того, що клітини виділяють ще більше цитокінів, що приводить до підвищеної регуляції MMP. По мірі того, як такий каскад деструкції продовжується, і дегенерація IVD прогресує, диск починає випинатися ("грижа міжхребетного диска"), і потім, зрештою руйнується, приводячи до того, що драглисте ядро контактує з хребтом і викликає біль.

У цей час основним способом лікування дегенерації IVD є хірургічне втручання, при якому піддані дегенерації диски вирізають або з'єднують з сусідніми дисками. Хірургічні способи лікування націлені на полегшення болю і інших симптомів дегенерації IVD, але нічого не роблять для відновлення або регенерації уражених хворобою IVD. Іншим способом лікування підданих дегенерації клітин і тканин IVD є застосування оснований на клітинах способів терапії, при яких вводять живі клітини, щоб репарувати, замінити і/або ремоделювати уражені хворобою тканини. У декількох недавніх дослідженнях вивчали застосування оснований на клітинах способів терапії дегенеративних станів IVD. Наприклад, в патентах США № 6352557 ("Ferree") і 6340369 ("Ferree II") наведені інструкції по збору живих клітин IVD у пацієнта, культивуванню клітин і їх трансплантації в уражений IVD. Подібним чином, в Alini, Eur. Spine J., 2002: 11 (Supp.2): S215-220 описане виділення і культивування клітин з драглистого ядра, виведення клітин в біоматрикс і потім ін'єкція укладених в біоматрикс клітин пацієнтам, щоб відновити

функціональність уражених IVD. Такі підходи, незважаючи на перспективність, показали обмежену ефективність у відновленні підданих дегенерації IVD, і пацієнти страждали від ускладнень, викликаних імунологічній несумісністю між донорами і реципієнтами клітин.

Альтернативний оснований на клітинах спосіб терапії полягає в застосуванні стовбурових клітин, які мають здатність ділитися і диференціюватися в клітини, що складають уражені захворюванням тканини. Трансплантація стовбурових клітин може бути використана як клінічний засіб для реконструкції тканини-мішені, з відновленням таким чином фізіологічної і анатомічної функціональності. Застосування методики стовбурових клітин має широкий діапазон, включаючи конструювання тканин, терапію, основу на доставці генів, і клітинну терапію, тобто доставку біотерапевтичних засобів в цільове положення за допомогою екзогенно живих клітин, що поставляються, або клітинних компонентів, які утворюють або містять такі засоби (огляд див. в Tresco, P. A. et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000; 42: 2-37). Ідентифікація стовбурових клітин стимулювала дослідження, націлене на виборче створення специфічних типів клітин для регенеративної медицини. Одна з перешкод для реалізації терапевтичного потенціалу методики стовбурових клітин полягала в тому, що важко було одержати достатні кількості стовбурових клітин. Одним джерелом стовбурових клітин є тканина ембріона або плоду. Ембріональні стовбурові клітини і клітини-попередники виділені з декількох видів ссавців, включаючи людину, і було показано, що декілька таких типів клітин здатні до самопідтримання і розмноження, а також до диференціювання в декілька різних ліній клітин. Однак використання як джерела витягання стовбурових клітин з ембріонів і плодів викликало множини етичних і моральних проблем, які перешкодили подальшій розробці способів терапії на основі ембріональних стовбурових клітин.

Таким чином, в даній галузі існує необхідність в основаних на стовбурових клітинах способах терапії, які дозволяють уникати проблем, пов'язаних з ембріональними і фетальними стовбуровими клітинами. Постнатальні тканини, такі як пуповина і плацента, викликали інтерес як альтернативне джерело мультипотентних або поліпотентних стовбурових клітин. Наприклад, описані способи витягання стовбурових клітин за допомогою перфузії плаценти або збору з пуповинної крові або тканини пуповини. Обмеженням заготівлі стовбурових клітин внаслідок застосування таких способів бралось в недостатність об'єму пуповинної крові або кількості клітин, що одержуються, а також гетерогенності або відсутності характеристики популяцій клітин, що одержуються з таких джерел.

Відповідно, надійне одержання у великих кількостях добре охарактеризованих, по суті гомогенних популяцій стовбурових клітин, що мають здатність диференціюватися в клітини, які фенотипічні схожі з ендogenous клітинами IVD, може мати переваги у різних випадках діагностичних і терапевтичних застосувань для репарації, регенерації і/або заміни клітин IVD і для реконструкції і/або ремоделювання тканин IVD.

У одному аспекті в даному описі пропонуються способи лікування захворювання або стану, пов'язаного з дегенерацією IVD. Способи включають введення клітин, одержаних з тканини пуповини, в кількості, ефективній для лікування захворювання або стану. Тканина пуповини, з якої одержують клітини, переважно по суті не містить крові. Клітини, одержані з тканини пуповини, переважно здатні до самопідтримання і розмноження в культурі і мають здатність диференціюватися, наприклад, в фенотип клітин IVD; вимагають L-валін для росту; можуть рости щонайменше приблизно при 5 % кисні; не утворюють CD117 або HLA-DR або теломеразу; експресують альфа-актин гладких м'язів; і експресують підвищені рівні інтерлейкіну 8 і ретикулону 1, в порівнянні з фібробластами людини, мезенхімальними стовбуровими клітинами або клітинами кісткового мозку клубового грєбєня.

У іншому аспекті пропонуються фармацевтичні композиції для лікування захворювання або стану, пов'язаного з дегенерацією IVD, при цьому композиції містять фармацевтично прийнятний носій і клітини, одержані з тканини пуповини, в кількості, ефективній для лікування захворювання або стану, при цьому тканина пуповини, з якої одержують клітини, по суті не містить крові, і при цьому клітини здатні до самопідтримання і розмноження в культурі і мають здатність диференціюватися, наприклад, в фенотип клітин IVD; вимагають L-валін для росту; можуть рости щонайменше приблизно при 5 % кисні; не утворюють CD117 або HLA-DR або теломеразу; експресують альфа-актин гладких м'язів; і експресують підвищені рівні інтерлейкіну 8 і ретикулону 1, в порівнянні з фібробластами людини, мезенхімальними стовбуровими клітинами або клітинами кісткового мозку клубового грєбєня.

Згідно з іншим аспектом пропонуються набори для лікування пацієнта, що має захворювання або стан, пов'язаний з дегенерацією IVD, при цьому набори включають інструкції по застосуванню набору в способі лікування захворювання або стану, пов'язаного з дегенерацією IVD, фармацевтично прийнятний носій, і клітини, одержані з тканини пуповини,

в кількості, ефективній для лікування захворювання або стану, при цьому тканина пуповини, з якої одержують клітини, по суті не містить крові, і при цьому клітини здатні до самопідтримання і розмноження в культурі і мають здатність диференціюватися, наприклад, в фенотип клітин IVD; вимагають L-валін для росту; можуть рости щонайменше приблизно при 5 % кисні; не утворюють CD117 або HLA-DR або теломеразу; експресують альфа-актин гладких м'язів; і експресують підвищені рівні інтерлейкіну 8 і ретикулону 1, в порівнянні з фібробластами людини, мезенхімальними стовбуровими клітинами або клітинами кісткового мозку клубового гребеня. У деяких варіантах набори, що пропонуються в даному винаході, додатково містять щонайменше один реагент і/або інструкції по культивуванню клітин. У деяких варіантах набори, що пропонуються в даному винаході, містять інструкції відносно індукції клітин щонайменше до часткового диференціювання *in vitro*, наприклад, в клітини, що мають фенотип клітин драглистого ядра і/або фенотип клітин фіброзного кільця.

У різних варіантах клітини, одержані з тканини пуповини, що використовуються в способах, композиціях і/або наборах, описаних в даній публікації, експресують ретикулон, ліганд 3 рецептора хемокінів і/або хемотаксичний білок 2 гранулоцитів. У деяких варіантах клітини, одержані з тканини пуповини, описані в даній публікації, експресують CD10, CD13, CD44, CD73 і CD90. У деяких варіантах клітини, одержані з тканини пуповини, описані в даній публікації, мають здатність диференціюватися в клітини фіброзного кільця і/або драглистого ядра.

У різних варіантах захворювання або стан, пов'язаний з дегенерацією IVD, може бути викликано або індуквано віком, травмою, аутоімунною реакцією, запальною реакцією, генетичним дефектом, відкладенням імунних комплексів і/або їх поєднанням. IVD, що є мішенню для лікування, можуть бути інтактними або в будь-якій стадії пошкодження або дегенерації. Наприклад, IVD, що є мішенню для лікування, можуть випинатися з утворенням грижі, бути зруйнованими, розшарованими і/або іншим чином пошкодженими або підданими дегенерації.

У деяких варіантах способи, що пропонуються в даному винаході, включають введення недиференційованих клітин, одержаних з пуповини, або похідних клітин. Клітини, одержані з тканини пуповини людини, утворюють корисні трофічні чинники, включаючи без обмеження цитокіни, чинники росту, інгібітори протеаз, білки позаклітинного матриксу, які стимулюють життєздатність, ріст і диференціювання ендogenous клітин-попередників IVD. Трофічні чинники, описані в даній публікації, можуть безпосередньо секретуватися трансплантованими клітинами, одержаними з тканини пуповини людини, в середовище організму-хазяїна. Трофічні чинники або інші клітинні похідні можуть бути зібрані з клітин, одержаних з тканини пуповини людини, *ex vivo* і потім введені пацієнту.

У деяких варіантах клітини, одержані з тканини пуповини, описані в даній публікації, індукують *in vitro* для диференціювання в клітини лінії хондроцитів і/або в клітини, що виявляють фенотип клітини фіброзного кільця, клітини драглистого ядра і/або іншої IVD-подібної клітини, перед, після або одночасно з введенням клітин. Відповідно, в деяких варіантах способи, що пропонуються в даному винаході, додатково включають стадію індукції клітин, одержаних з тканини пуповини щонайменше до часткового диференціювання *in vitro*.

У деяких варіантах, клітини, одержані з тканини пуповини, можуть бути сконструйовані генетично так, щоб вони експресували генний продукт, такий як без обмеження генний продукт, який стимулює репарацію і/або регенерацію тканин IVD. Наприклад, в деяких варіантах клітини, одержані з тканини пуповини, конструюють генетично так, щоб вони експресували трофічний чинник або інший генний продукт. У деяких варіантах генний продукт надає трофічну дію або іншим чином модулює клітини, одержані з тканини пуповини, додаткові типи клітин, що вводяться з клітинами, одержаними з тканини пуповини, ендogenous клітини IVD і/або інші ендogenous клітини. У деяких варіантах генний продукт є компонентом позаклітинного матриксу або засобом, який модулює позаклітинний матрикс. У деяких варіантах генний продукт стимулює експресію одного або декількох білків позаклітинного матриксу.

У деяких варіантах, клітини, одержані з тканини пуповини, вводять разом щонайменше з одним іншим типом клітин, таким як без обмеження клітина фіброзного кільця, клітина драглистого ядра, фібробласт, хондроцит, мезенхімальна стовбурова клітина, клітина, одержана з жирової тканини, або інший тип мультипотентної або поліпотентної стовбурової клітини. Щонайменше один тип клітин можна вводити одночасно, перед або після введення клітин, одержаних з тканини пуповини.

У деяких варіантах клітини, одержані з тканини пуповини, вводять щонайменше з одним засобом. Наприклад, в деяких варіантах клітини, одержані з тканини пуповини, вводять з трофічним чинником, таким як без обмеження TGF-бета, GDF-5, TIMP-1 і PDGF-BB. У різних варіантах щонайменше один засіб надає трофічну дію або іншим чином модулює клітини, одержані з тканини пуповини, одні або декілька додаткових типів клітин, що вводяться разом з

клітинами, одержаними з тканини пуповини, ендogenous IVD клітини і/або інші ендogenous клітини. У деяких варіантах щонайменше один засіб стимулює експресію одного або декількох білків позаклітинного матриксу. Інші засоби включають без обмеження протизапальні засоби, засоби, сприяючі життєздатності клітин, болезаспокійливі засоби і імуномодуючі засоби. Засіб можна

5 вводити одночасно, до або після введення клітин, одержаних з тканини пуповини.

У різних аспектах клітини можуть бути введені, направлені для введення або приготовані у вигляді препарату для введення шляхом ін'єкції в IVD, включаючи, наприклад, введення в драглисте ядро і/або фіброзне кільце підданого дегенерації IVD. У деяких варіантах клітини вводять, направляють для введення або готують у вигляді препарату для введення таким

10 чином, що клітини інкапсульовані в пристрій, що імплантується, або за допомогою імплантації пристрою або матриці, що містить клітини.

Наведені вище і інші характерні ознаки і переваги винаходу будуть очевидні, виходячи з наступного більш конкретного опису переважних варіантів винаходу, які проілюстровані на прикладених кресленнях.

15 Протягом опису і в формулі винаходу використовуються різні терміни, що відносяться до способів і інших аспектів даного винаходу. Таким термінам потрібно приписувати звичайне в даній галузі значення, якщо не обумовлено особливо. Інші спеціально певні терміни необхідно розглядати відповідно до визначення, наведеному в даному описі.

У тому, що використовується в даному описі і прикладеній формулі винаходу значенні форми однини включають і форми множини, якщо контекст ясно не диктує інше. Таким чином, наприклад, згадку "клітина" включає поєднання двох або більше клітин і тому подібне.

Мають на увазі, що термін "приблизно" в значенні, що використовується в даному описі у відношенні до значення, що вимірюється, такого як кількість, тривалість у часі і тому подібне, охоплює варіювання $\pm 20\%$ або $\pm 10\%$, більш переважне $\pm 5\%$, ще більш переважне $\pm 1\%$ і ще

25 більш переважно $\pm 0,1\%$ від конкретного значення, оскільки такі варіації є відповідними для здійснення описаних способів.

Термін "одержані" використовують для вказівки того, що клітини були одержані з їх біологічного джерела і вирощені, розмножити в культурі, іморталізовані або піддані іншій обробці *in vitro*.

30 "Ізольований" означає "змінений штучно людиною" в порівнянні з природним станом. Якщо молекула або композиція зустрічається в природі, то вона "ізольована", якщо вона була змінена або витягнута з свого початкового оточення, або одночасно змінена і витягнута з початкового оточення.

Термін "експресувати", "експресований" або "експресія" молекули нуклеїнової кислоти або гена стосується біосинтезу генного продукту, наприклад, біосинтезу поліпептиду.

"Трофічні чинники" являють собою речовини, які стимулюють життєздатність, ріст, диференціювання, проліферацію і/або дозрівання клітини або стимулюють підвищену біологічну активність клітини. Похідні клітин відносяться до будь-якого матеріалу, який може бути одержаний з клітин, і включають кондиціоновані середовища клітин, клітинний лізат, білки позаклітинного матриксу, трофічні чинники, клітинні фракції, клітинні мембрани.

40 "Дегенерація" стосується будь-якого фізичного збитку, пошкодження, переродження або травми IVD.

"Патологія" стосується будь-яких структурних або функціональних ознак відхилення від нормального стану клітини, тканини, органу або системи, які вимірюють будь-якими

45 відповідними способами, відомими в даній галузі. "Захворювання" являє собою будь-яке відхилення або порушення здоров'я, стану або функціонування клітини, тканини, органу, системи або організму загалом, які вимірюють будь-якими відповідними способами, відомими в даній галузі.

"Лікувати" або "лікування" стосується будь-якого успіху або ознак успіху в ослабленні або поліпшенні у випадку захворювання, пошкодження або стану, включаючи будь-який об'єктивний або суб'єктивний параметр, такий як ослаблення, ремісія, зменшення симптомів або забезпечення того, що захворювання, пошкодження або стан краще переноситься пацієнтом, сповільнення швидкості дегенерації або зменшення дегенерації, забезпечення меншого ослаблення здоров'я в кінцевій точці дегенерації або поліпшення фізичного або психічного

55 здоров'я суб'єкта. Лікування або ослаблення симптомів може бути основане на об'єктивних або суб'єктивних параметрах, включаючи результати медичного огляду, неврологічного обстеження і/або психіатричного обстеження. Терміни "ефективну кількість" або "терапевтично ефективну кількість" використовують в даному описі взаємозамінно, і вони відносяться до кількості з'єднання, речовини або композицій, які описані в даній публікації, ефективному для досягнення конкретного біологічного

60

результату, такого як без обмеження біологічні результати, розкриті, описані або наведені в даному описі як приклад. Такі результати можуть включати без обмеження лікування захворювання або пошкодження IVD у суб'єкта, які визначені будь-якими відповідними способами, відомими в даній галузі.

"Фармацевтично прийнятні" стосується таких властивостей і/або речовин, які є прийнятними для пацієнта з фармакологічної/токсикологічної точки зору і для фармацевтичного виробника з фізичної/хімічної точки зору відносно композиції, препарату, стабільності, прийому пацієнтом і біодоступності. "Фармацевтично прийнятний носій" стосується середовища, яке не заважає ефективності біологічної активності активного інгредієнта(ів) і не є токсичним для хазяїна, якому його вводять.

Виявлено, що захворювання і стани, пов'язані з дегенерацією міжхребетних дисків (IVD), можна лікувати введенням клітин, одержаних з тканини пуповини, як описано в даній публікації. Переважно способи, композиції і набори, що пропонуються в даному винаході, стимулюють репарацію і регенерацію підданих дегенерації IVD, і тим самим ослабляють один або декілька симптомів, асоційованих з дегенерацією IVD. Відповідно, в одному аспекті пропонуються способи лікування захворювання або стану, пов'язаного з дегенерацією IVD, що включають введення клітин, одержаних з тканини пуповини, в IVD в кількості, достатній для лікування захворювання або стану.

У різних варіантах захворювання або стан, пов'язаний з дегенерацією IVD, може бути викликано або індуковано віком, травмою, аутоімунною реакцією, запальною реакцією, генетичним дефектом, відкладенням імунних комплексів (наприклад, утворенням рубцової тканини) і/або їх поєднанням. IVD, що є мішенню для лікування, можуть бути інтактними або в будь-якій стадії пошкодження або дегенерації. Наприклад, IVD, що є мішенню для лікування, можуть випинатися з утворенням грижі (наприклад, коли частина фіброзного кільця має випинання або іншу протрузію), бути зруйнованими (наприклад, коли щонайменше частина фіброзного кільця зруйнована, що приводить до зменшення тиску і/або об'єму драглистого ядра), розшарованими (наприклад, коли два або більше шари фіброзного кільця розділені) і/або іншим чином пошкодженими або підданими дегенерації (наприклад, коли фіброзне кільце має тріщини, щілини, розриви або ту подібну і/або коли позаклітинну матрикс зруйнований або змінений).

У різних варіантах клітини, одержані з тканини пуповини, вводять в уражений дегенерацією IVD, наприклад за допомогою ін'єкції, трансплантації, імплантації, ін'єкції або введення у вигляді комплексу матриксу з клітинами або будь-якими іншими способами, відомими в даній галузі для здійснення клітинної терапії. У деяких варіантах клітини вводять безпосередньо в фіброзне кільце і/або драглисте ядро IVD. У деяких варіантах клітини вводять в IVD опосередковано. Наприклад, клітини можуть знаходитися у водному носії, інкапсульовані в пристрій або посіяні на матриксі, який потім імплантують в схильний дегенерації IVD або поблизу нього. Водні носії включають без обмеження фізіологічні буферні розчини, такі як забуферений розчин солі, фосфатно-сольовий буфер, розчин збалансованих солей Хенкса, розчин солі, забуферений трисом і розчин солі, забуферений Нерес. У різних варіантах пристрій, матрикс або інше клітинне депо можуть бути імплантовані так, щоб вони були пов'язані із зовнішньою стінкою фіброзного кільця або локалізовані зовні, але поблизу стінки фіброзного кільця або поблизу замикательних пластинок тіл хребців, навколишніх IVD.

У деяких варіантах клітини вводять в формі пристрою, такого як комплекс матрикс-клітини. Речовинами для пристрою без обмеження є біологічні саморуйнівні речовини, такі як колагени, 35/65 полі(епсилон-капролактон)(PCL)/полі(гліколева кислота) (PGA), біологічні конструкції, що розсмоктуються PANACRYLTM, поліглактин 910 VICRYLTM і здатні до самозбирання пептиди і речовини, що не розсмоктуються, такі як фторполімери (наприклад, фторполімери TEFLONo), пластик і метал. Матрикси включають біосумісні каркаси, решітки, здатні до самозбирання структури і тому подібне, або що біологічно розсмоктуються, або що не розсмоктуються, рідина, гель або тверда речовина. Такі матрикси відомі в галузі основанийого на клітинах терапевтичного лікування, хірургічної репарації, конструювання тканин і загоєння ран. Переважно матрикси попередньо обробляють терапевтичними клітинами. Більш переважно матрикси заселяють клітинами, що знаходяться в тісній асоціації з матриксом або в його просторах. Клітини можуть прилипати до матриксу або можуть вловлюватися або знаходитися в просторах всередині матриксу. Найбільш переважними є комплекси матрикс-клітини, в яких клітини ростуть в тісній асоціації з матриксом, і при терапевтичному застосуванні стимулюється і підтримується зростання, репарація і/або регенерація власних клітин IVD пацієнта, і одночасно стимулюється і підтримується правильний ангиогенез. Композиції матриксу з клітинами можуть бути введені в організм пацієнта будь-яким шляхом, відомим в даній галузі, включаючи без обмеження

імплантацію, ін'єкцію, хірургічне введення, трансплантацію з іншою тканиною і тому подібне. У деяких варіантах матрикси утворюються *in vivo* або ще більш переважно *in situ*, наприклад, можна використовувати полімеризуємі *in situ* гелі згідно з винаходом. Приклади таких гелей відомі в даній галузі.

Клітини, описані в даній публікації, також можна висівати на тривимірні матрикси, такі як каркаси, і імплантувати *in vivo*, при цьому клітини, що висіваються можуть проліферувати на каркасі або всередині каркаса, або сприяють утворенню замінюючої тканини *in vivo* у взаємодії або без взаємодії з іншими клітинами. Зростання клітин, одержаних з тканини пуповини, на тривимірному каркасі переважно приводить до утворення тривимірної тканини або її створення, яка може бути використана *in vivo*, наприклад, для репарації і/або регенерації пошкодженої або ураженої захворюванням тканини.

Клітини можна висівати на тривимірному каркасі або матриксі, такому як каркас, піна, електростатично скручений каркас, нетканий каркас, пориста або непориста мікрочастинка або гідрогель, і відповідно вводити. Каркасу можна додавати різні форми, такі як по суті плоску, по суті циліндричну або трубчасту форму, або він може бути в абсолютній вільній формі, що може бути необхідно або бажано для поновлюючої структури, що розглядається. Два або більше по суті плоских каркаса можуть бути накладені один на одну і скріплені разом, якщо це необхідно, для створення багат шарового каркаса.

На таких тривимірних каркасах клітини можна вводити спільно з іншими типами клітин або іншими попередниками м'яких тканин, включаючи стовбурові клітини. У випадку росту в тривимірній системі проліферуючі клітини можуть дозрівати і сегрегувати належно з утворенням компонентів дорослих тканин, аналогічних аналогам, що зустрічаються в природі *in vivo*.

Матрикси, описані і наведені як приклад в даному описі, можуть бути сконструйовані так, щоб структура матриксу підтримувала клітини, одержані з тканини пуповини, без подальшого руйнування, підтримувала клітини з моменту посіву аж до ремодельовання тканинного трансплантата тканиною хазяїна, або забезпечувала клітинам, що висіваються, можливість прикріплення, проліферації і розвитку в тканинну структуру, що має достатню механічну цілісність, щоб підтримувати себе *in vitro*, і в такий момент матрикс руйнують.

Матрикси, каркаси, такі як пінисті структури, неткані структури, електростатично скручені структури, що складаються з мікрочастинок і здатні до самозбирання системи, що пропонуються для застосування в даному винаході, можуть бути імплантовані в поєднанні з будь-яким одним або декількома з наступних компонентів: клітинами, чинниками росту, лікарськими засобами або іншими компонентами, такими як біологічно активні засоби, які стимулюють загоєння, регенерацію, репарацію або вrostання тканини або стимулюють її васкуляризацію або іннервацію, або іншим чином посилюють або поліпшують результат терапії або практичне здійснення винаходу, в доповнення в клітинам згідно з винаходом.

У деяких варіантах клітини, описані в даній публікації, можуть бути вирощені вільно в культурі, витягнуті з культури і інокуловані в тривимірний каркас. Інокуляція тривимірного каркаса клітинами в концентрації, що становить, наприклад, близько 10^6 - 5×10^7 клітин в мілілітрі, переважно приводить до створення тривимірної підтримки у відносно більш короткі періоди часу. Крім того, в деяких застосуваннях може бути переважно використання більшої або меншої кількості клітин в залежності від необхідного результату.

У деяких аспектах корисне відтворення в культурі клітинного мікрооточення, що зустрічається *in vivo*, оскільки міра, до якої клітини вирощують до імплантації *in vivo* або використовують *in vitro*, можуть відрізнятися. Клітини можуть бути інокуловані в каркас до або після утворення форми, необхідної для імплантації, наприклад, джгути, трубки, волокна і тому подібне. Після інокуляції клітин в каркас такий каркас переважно інкубують у відповідному ростовому середовищі. Під час періоду інкубації інокуловані клітини будуть рости і покривати каркас і можуть, наприклад, утворювати перемички або часткові перемички між внутрішньопоровими просторами. Переважно, але не обов'язково вирощувати клітини до відповідної міри, яка відображає щільність клітин *in vivo* в тканині, що піддається репарації або регенерації. У інших варіантах присутність клітин, навіть в невеликих кількостях на каркасі стимулює вrostання ендогенних здорових клітин, полегшуючи загоєння, наприклад, пошкодженої або травмованої тканини.

Прикладами матриксів, наприклад, каркасів, які можуть бути використані для здійснення аспектів винаходу, є матриці, пористі або напівпористі піни, здатні до самозбирання пептиди і тому подібні. Неткані матриці можуть бути утворені, наприклад, з використанням волокон, що складаються з природних або синтетичних полімерів. У переважному варіанті для утворення матриці використовують співполімери, розсмоктовуюваних гліколевої і молочної кислот (PGA/PLA), що продаються під торговою маркою VICRYLTM (Ethicon, Inc., Somerville, NJ). Піни,

що утворені, наприклад, з співполімера полі(епсилонкапролактон)/полі(гліколева кислота) (PCL/PGA), утворений такими способами, як сушка виморожувати або ліофілізація, які обговорюються в патенті США № 6355699, також можуть служити як каркаси.

Гелі також утворюють відповідні матриці, що використовуються в даному винаході.

5 Прикладами є ін'єкційні гелі, полімеризовні *in situ* гелі і гідрогелі, наприклад, що складаються із здатних до самозбирання пептидів. Такі матеріали часто використовують як підкладки для зростання тканини. Наприклад, ін'єкційні гелі можуть складатися з води, фізіологічного розчину солі або фізіологічного буферного розчину і гелеутворюючої речовини. Гелеутворюючими речовинами є без обмеження білки, такі як колаген, еластин, тромбін, фібрoneктин, желатин, 10 фібрин, тропоеластин, поліпептиди, ламінін, протеоглікани, фібриновий клей, фібриновий згусток, згусток збагаченої тромбоцитами плазми (PRP), згусток збідненої тромбоцитами плазми (PPP), гідрогелі на основі здатних до самозбирання пептидів і ателоколаген; полісахариди, такі як пектин, целюлоза, окислена целюлоза, хітин, хітозан, агароза, гіалуронова кислота; полінуклеотиди, такі як рибонуклеїнові кислоти, дезоксирибонуклеїнові кислоти, і інші, 15 такі як, альгінат, поперечно зшитий альгінат, полі(N-ізопропілакриламід), полі(оксіалкілен), співполімери полі(етиленоксид)-полі(пропіленоксид), полі(вініловий спирт), поліакрилат, співполімери моностероїлгліцерин-косукцинат/поліетиленгліколь (MGSА/PEG) і їх поєднання.

In situ сітки, що руйнуються, які утворюються, також підходять для застосування у винаході (див., наприклад, Anseth, K.S. et al., J. Controlled Release, 2002; 78: 199-209; Wang, D. et al., 20 Biomaterials, 2003; 24: 3969-3980; публікація патенту США 2002/0022676, He et al.). Такі матеріали готують у вигляді рідин, відповідних для ін'єкції, і потім різними способами (наприклад, зміною температури, рН, вплив світла) може бути індуковане утворення сіток, що зруйнуються з гідрогеля *in situ* або *in vivo*.

У деяких варіантах каркас може являти собою повстятий матеріал, який може складатися з 25 мультифіламентних ниток, одержаних з матеріалу, що біологічно розсмоктується, наприклад, PGA, PLA, співполімерів PCL або сумішей або гіалуронової кислоти. З ниток одержують повсть з використанням стандартних способів обробки, які полягають в наданні звивистості, різанні, кардуванні і іглопробиванні. Клітини згідно з винаходом можна висівати на пінисті каркаси, які можуть являти собою композитні структури. Крім того, тривимірному каркасу можна додати 30 необхідну для застосування форму, таку як форма конкретної структури в IVD або навколо IVD, яку необхідно репарувати, замінити або наростити.

Каркас може бути оброблений перед інокуляцією клітин згідно з винаходом, щоб посилити прикріплення клітин. Наприклад, перед інокуляцією клітин згідно з винаходом нейлонові матрикси можуть бути оброблені 0,1 молярною оцтовою кислотою і інкубовані в полілізіні, PBS 35 і/або колагені для утворення покриття на нейлоні. Полістирол може бути подібним чином оброблений з використанням сірчаної кислоти.

Крім того, зовнішні поверхні тривимірного каркаса можуть бути модифіковані для поліпшення прикріплення або росту клітин і диференціювання тканини, наприклад плазменний покриттям каркаса або доданням одного або декількох білків (наприклад, колагенів, еластичних 40 волокон, ретикулярних волокон), глікопротеїдів, глікозаміногліканів (наприклад, сульфату гепарину, хондроїтин-4-сульфату, хондроїтин-6-сульфату, сульфату дерматану, сульфату кератину), клітинного матриксу і/або інших речовин, таких як нарівні з іншими і без обмеження, желатин, альгірати, агар, агароза і рослинні камеді.

Каркас може складатися або може бути оброблений речовинами, які роблять його 45 нетромбогенним. Такі обробки і речовини також можуть стимулювати і підтримувати ендотеліальний ріст, міграцію і відкладення позаклітинного матриксу. Прикладами таких речовин і обробок є без обмеження природні речовини, такі як білки базальної мембрани, наприклад, ламінін і колаген типу IV, синтетичні матеріали, такі як ePTFE, і матеріали на основі сегментованої поліуретансечовини і силікону, такі як PURSPAN® (The Polymer Technology 50 Group, Inc., Berkeley, CA). Такі матеріали можуть бути додатково оброблені, щоб зробити каркас нетромбогенним. Такі обробки включають обробку антитромботичними засобами, такими як гепарин, і обробки, які змінюють поверхневий заряд матеріалу, такі як плазмене покриття.

Різні співвідношення різних типів колагену, наприклад, осажденного на каркасі, можуть впливати на ріст специфічних для тканини або інших клітин, які можуть бути згодом інокуловані 55 на каркас, або які можуть рости на структурі *in vivo*. Альтернативно на каркас можна висівати суміш клітин, які можуть синтезувати відповідні необхідні типи колагенів. У залежності від тканини, що культивується може бути вибраний відповідний тип колагену, інокулованого на каркас або продукуюваного клітинами, що висіваються на каркас. Наприклад, відносні кількості колагенових і еластичних волокон, присутніх в каркасі, можна модулювати за допомогою

регуляції співвідношення колаген-продукуючих клітин і еластан- продукуючих клітин в вихідному інокуляті.

Засіяний або інокулований тривимірний каркас згідно з винаходом може бути призначений для трансплантації або імплантації або клітин, що культивуються, одержаної з матриксу, або матриксу, що сам культивується *in vivo*. Тривимірні каркаси згідно з винаходом можна застосовувати для заміни або нарощування існуючої тканини, введення нової або зміненої тканини, модифікації штучних протезів або для з'єднання біологічних тканин або структур.

У деяких варіантах клітини можуть бути введені (наприклад, ін'єктувані) в IVD через голку, таку як голка невеликого калібру. У деяких варіантах голка має калібр приблизно 22 або менше, так щоб зменшити імовірність вийти за межі IVD. При ін'єкції певних об'ємів в драглисте ядро бажано, щоб об'єм лікарського засобу, що доставляється був не більше ніж приблизно 3 мл, переважно не більше ніж приблизно 1 мл, більш переважно приблизно від 0,1 до приблизно 0,5 мл. Передбачається, що при ін'єкції в таких менших кількостях об'єм, що додається не буде викликати помітного збільшення тиску в драглистому ядрі. Якщо об'єм що вводиться шляхом прямої ін'єкції є досить великим, так що викликає неспокій з приводу надміру здавленого драглистого ядра, то переважно, щоб щонайменше частина драглистого ядра була видалена перед прямою ін'єкцією. У деяких варіантах об'єм драглистого ядра, що видаляється по суті аналогічний об'єму ін'єцируемого препарату. Наприклад, об'єм драглистого ядра, що видаляється може становити приблизно 80-120 % від об'єму ін'єцируемого препарату. У деяких варіантах клітини, одержані з тканини пуповини, концентрують перед введенням.

Клітини, що використовуються в способах, композиціях і наборах, що пропонуються в даному винаході, можуть бути одержані з пуповини ссавців, витягнутої в момент або відразу після закінчення донесеної або недонесеної вагітності, наприклад, після відділення посліду або хірургічного видалення після кесарева перетину. Кров і залишки видаляють з тканини пуповини перед виділенням клітин, наприклад, внаслідок промивання будь-яким відповідним середовищем або буфером.

Клітини можуть бути виділені з тканини пуповини за рахунок прикладання механічної сили або ферментативним розщепленням. Переважними ферментами є металлопротеїнази, нейтральні протеази і муколітичні протеази. Наприклад, можна використовувати різні поєднання колагенази, диспази і гіалуронідази для диссоціації клітин з тканини пуповини. Фахівцеві в даній галузі буде зрозуміло, що багато які такі ферментні обробки для виділення клітин з різних тканинних джерел відомі в даній галузі. Наприклад, серії ферментний сполучень LIBERASE® Blendzyme (Roche) підходять для застосування в способах згідно з даним винаходом. Відомі і інші джерела ферментів, і фахівець в даній галузі також може одержати такі ферменти безпосередньо з їх природних джерел. Фахівець в даній галузі також має в своєму розпорядженні хороше обладнання, щоб оцінити нові або додаткові ферменти або поєднання ферментів відносно їх застосовності для виділення клітин згідно з винаходом. Переважні обробки ферментами здійснюють протягом 0,5, 1, 1,5 або 2 годин або протягом більш тривалого періоду.

Ізольовані клітини можна використовувати для ініціації клітинних культур. Ізольовані клітини переносять в стерильні посудини для культури тканини або не покриті, або покриті позаклітинним матриксом або лігандами, такими як ламінін, колаген (наївний, денатурований, ателоколаген або поперечно зшитий колаген), желатин, фібронектин і інші білки позаклітинного матриксу. Клітини, одержані з тканини пуповини, культивують в будь-якому культуральному середовищі, здатному підтримувати ріст клітин, такий як, без обмеження, DMEM (з високим і низьким вмістом глюкози), вдосконаленого DMEM, DMEM/MCDB 201, основане середовище Ігла, середовище Хама F10 (F10), середовище Хама F-12 (F12), середовище Хейфліка, модифіковане за способом Ісків середовище Дульбекко, середовище для росту мезенхімальних стовбурових клітин (MSCGM), DMEM/F12, RPMI 1640 і CELL-GRO-FREE. Культуральне середовище може бути доповнене одним або декількома компонентами, включаючи, наприклад, фетальну бичачу сироватку, переважно близько 2-15 % (об./об.); кінську сироватку; сироватку людини; фетальну сироватку теляти; бета-меркаптоетанол, переважно близько 0,001 % (об./об.); один або декілька чинників росту, наприклад, одержаний з тромбоцитів чинник росту (PDGF), епідермальний чинник росту (EGF), чинник росту фібробластів (FGF), чинник росту ендотелію судин (VEGF), інсуліноподібний чинник росту 1 (IGF-I), чинник інгібування лейкоцитів (LIF) і еритропоетин; амінокислоти, включаючи L-валін; і один або декілька антибіотиків і/або протигрибкових засобів для боротьби з мікробним забрудненням, таких як, наприклад, пеніцилін G, сульфат стрептоміцину, амфотерицин B, гентаміцин і ністатин, або окремо, або в поєднанні.

Клітини висівають в посудини для культивування з такою щільністю, яка дозволяє клітинам рости. У одному варіанті клітини культивують в умовах змісту приблизно від 0 до 5 процентів CO_2 в повітрі по об'єму. У деяких варіантах клітини культивують в умовах змісту приблизно від 2 до 25 процентів O_2 в повітрі, переважно приблизно від 5 до 20 процентів O_2 в повітрі. Клітини переважно культивують приблизно при 25-40 °C і більш переважно культивують при 37 °C. Середовище в судині для культивування може бути нерухомою або може струшуватися, наприклад, у випадку використання біореактора. Клітини, одержані з тканини пуповини, переважно вирощують в умовах низького окислювального стресу (наприклад, з додаванням глутатіону, вітаміну С, каталази, вітаміну Е, N-ацетилцистеїну), що має на увазі відсутність або мінімальне пошкодження клітин, що культивуються вільними радикалами.

Клітини, одержані з тканини пуповини, можна пересівати або витягувати в окрему посудину для культивування, що містить свіже середовище такого ж або іншого типу, відмінного від середовища, що використовується спочатку, в якому популяція клітин може розмножуватися мітозом. Клітини згідно з винаходом можна використовувати в будь-якій точці від пасажа 0 до старіння. Клітини переважно пересівають приблизно від 3 до 25 разів, більш переважно пересівають приблизно від 4 до 12 разів і переважно пересівають 10 або 11 разів. Можна здійснювати клонировані і/або субклонировані для підтвердження того, що була виділена клональна популяція клітин.

Різні типи клітин, присутні в тканині пуповини, можуть бути фракціоновані на субпопуляції. Це можна здійснити, використовуючи стандартні методики розділення клітин, включаючи, без обмеження, обробку ферментами; клонування і селекцію конкретних типів клітин, наприклад, без обмеження, селекцію на основі морфологічних і/або біохімічних маркерів; виборче зростання необхідних клітин (позитивну селекцію), виборче руйнування небажаних клітин (негативну селекцію); розділення на основі диференціальної здатності клітин до аглютинації в змішаній популяції, наприклад, з використанням аглютиніну сої; способи заморожування-відтавання; диференціальні адгезивні властивості клітин в змішаній популяції; фільтрування; звичайне і зональне центрифугування; елютраційне центрифугування (протитечійне центрифугування); гравітаційне розділення елементів; протитечійний розподіл; електрофорез; флуоресценцією сортування клітин, що активується (FACS); і тому подібне.

Приклади клітин, виділених з тканини пуповини, депоновані в Американській колекції культур клітин 10 червня 2004 і одержали наступні номери доступу в ATCC: (1) штам, названий UMB 022803 (P7), одержав номер доступу PTA-6067; і (2) штам, названий UMB 022803 (P17), одержав номер доступу PTA-6068.

Клітини, одержані з тканини пуповини, можуть бути охарактеризовані, наприклад, з використанням показників росту (наприклад, здатність подвоєння популяції, час подвоєння, кількість пересівань до старіння), аналізу каріотипу (наприклад, нормальний каріотип; материнська лінія або лінія плоду), проточної цитометрії (наприклад, FACS-аналізу), імуногістохімії і/або імуноцитохімії (наприклад, для виявлення епітопів), визначення профілю експресії генів (наприклад, матриці генів на чіпах; полімеразна ланцюгова реакція (наприклад, ПЛР із зворотною транскриптазою, ПЛР в реальному часі і традиційний ПЛР)), матриць білків, аналізу секреції білків (наприклад, за допомогою аналізу згортання плазми або аналізу PDC-кондиціонованого середовища, наприклад, твердофазним імуноферментним аналізом (ELISA)), реакції змішаних лімфоцитів (наприклад, як міра стимуляції PBMC) і/або іншими способами, відомими в даній галузі.

У різних аспектах клітини, одержані з тканини пуповини, мають одну або декілька з наступних ознак росту: вимагають L-валін для росту в культурі; здатні рости в атмосферах, що містять кисень приблизно від 5 % до щонайменше приблизно 20 %; мають здатність щонайменше приблизно до 40 подвоєнь в культурі перед досягненням стану старіння; і/або прикріплюються і розмножуються на покритих або непокритих посудинах для культури тканини, при цьому покрита судина для культури тканини має покриття з желатину, ламініну, колагену, поліорнітину, вітронектину або фібронектину.

У деяких варіантах клітини мають нормальний каріотип, який підтримується по мірі пересівань клітин. Каріотипування особливо корисне для того, щоб ідентифікувати і відрізнити клітини плоду від материнських клітин, одержаних з плаценти. Способи каріотипування доступні і відомі фахівцям в даній галузі.

У деяких варіантах клітини можуть бути охарактеризовані по продукції деяких білків, включаючи продукцію щонайменше одного з наступних білків: тканинного чинника, віментину і альфі-актину гладких м'язів; і продукцію щонайменше одного з маркерів клітинної поверхні CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-альфи, PD-L2 і HLA-A, B, C, які виявляють, наприклад, проточною цитометрією. У інших варіантах клітини можуть бути охарактеризовані по відсутності

продукції щонайменше одного з маркерів клітинної поверхні CD31, CD34, CD45, CD80, CD86, CD117, CD141, CD178, B7-H2, HLA-G і HLA-DR, HLA-DP і/або HLA-DQ, які виявляють будь-якими відповідними способами, такими як проточна цитометрія. У деяких варіантах переважні клітини, які утворюють щонайменше два з наступних білків: тканинний чинник, віментин і альфа-актин гладких м'язів. У деяких варіантах переважні клітини, що продукують всі три білки: тканинної чинник, віментин і альфа-актин гладких м'язів.

У деяких варіантах клітини мають в порівнянні з клітиною людини, а саме фібробластом, мезенхімальною стовбуровою клітиною або клітиною кісткового мозку клубового гребеня, підвищену експресію гена, що кодує щонайменше один з наступних продуктів: інтерлейкін 8; ретикулон 1; ліганд 1 хемокіну (метил С-Х-С) (активність, стимулююча ріст меланоми, альфа); ліганд 6 хемокіну (метил С-Х-С) (хемотаксичний білок 2 гранулоцитів); ліганд 3 хемокіну (метил С-Х-С); чинник некрозу пухлин, альфа-індукований білок 3.

У наступних варіантах клітини мають, в порівнянні з клітиною людини, а саме фібробластом, мезенхімальною стовбуровою клітиною або клітиною кісткового мозку клубового гребеня, знижену експресію гена, що кодує щонайменше один з наступних продуктів: гомеобокс 2, пов'язаний з низьким ростом; білок 2 теплового шоку 27 кД; ліганд 12 хемокіну (метил С-Х-С) (чинник 1, одержаний з стромальних клітин); еластин (надклапанний стеноз гирла аорти, синдром Вільямса-Бурена); мРНК *Homo sapiens*; кДНК DKFZp586M2022 (з клона DKFZp586M2022); гомеобокс 2 мезенхіми (гомеобокс, специфічний для затримки росту); гомолог 1 гомеобоксу *sine oculis* (*Drosophila*); кристалін, альфа В; асоційований з Disheveled активатор морфогенезу 2; білок DKFZP586B2420; схожий з нейраліном 1; тетранектин (плазміноген-зв'язуючий білок); гомолог *src* три (SH3) і багатий цистеїном домен; холестерин-25-гідроксилазу; споріднений *runt* чинник транскрипції 3; рецептор інтерлейкіну, альфа; енхансер проколаген-С-ендопептидази; гомолог Frizzled 7 (*Drosophila*); гіпотетичний ген BC008967; колаген, тип VIII, альфа 1; тенасцин 3 (гексабрахіон); гомеобоксний білок *igoquois* 5; гефаестин; інтегрин, бета 8; глікопротеїд 2 синаптичного пухирця; білок нейробластоми, придушення канцерогенності 1; білок 2, зв'язуючий інсуліноподібний чинник росту, 36 кД; кДНК *Homo sapiens* FLJ12280 *fis*, клон MAMMA1001744; подібний рецептору цитокіну чинник 1; калієвий канал, що активується кальцієм з проміжною/низькою провідністю, підроїдина N, представник 4; інтегрин, бета 7; транскрипційний коактиватор з PDZ-зв'язуючим мотивом (TAZ); гомолог 2 гомеобоксу *sine oculis* (*Drosophila*); білок KIAA 1034; везикуло-асоційований мембранний білок 5 (міобревін); EGF-вмісний фібулін-подібний білок позаклітинного матриксу 1; продукт гена ранньої ростової відповіді 3; гомеобокс гена *distal-less* 5; гіпотетичний білок FLJ20373; сімейство альдокеторедуктази 1, представник C3 (3-альфа-гідроксистероїддегідрогеназа, тип II); биіглікан; транскрипційний коактиватор з PDZ-зв'язуючим мотивом (TAZ); фібронектин 1; проенкефалін; інтегрин, бета-подібний 1 (з EGF-подібними доменами, що повторюються); клон кДНК з повнорозмірною вставкою мРНК *Homo sapiens* EUROIMAGE 1968422; EphA3; білок KIAA0367; рецептор натрійуретичного пептиду С/гуанілатциклаза С (рецептор атріонатрійуретичного пептиду С); гіпотетичний білок FLJ14054; мРНК *Homo sapiens*; кДНК DKFZp564B222 (з клона DKFZp564B222); подібний білку 3, взаємодіючому з білком BCL2/аденовіруса E1B 19 кД; білок 1, зв'язуючий AE; і поліпептид 1 субодиниці VIIa цитохром-с-оксидази (м'яз).

У деяких варіантах клітини можуть бути охарактеризовані на основі секреції щонайменше одного з продуктів: MCP-1, IL-6, IL-8, GCP-2, HGF, KGF, FGF, HB-EGF, BDNF, TPO, MIP1a, RANTES і TIMP1. У деяких варіантах клітини можуть бути охарактеризовані на основі відсутності секреції щонайменше одного з продуктів: TGF-beta2, ANG2, PDGFbb, MIP1a і VEGF, які виявляють в ELISA.

У деяких переважних варіантах клітина має два або більше перерахованих вище за ознаку росту, продукції білка/поверхневого маркера, експресії гена або секретій речовин. У деяких варіантах переважні клітини, що мають три, чотири або п'ять характерних ознак. У деяких варіантах переважні клітини, що мають шість, сім або вісім або більш характерних ознак. У деяких варіантах переважні клітини, що володіють всіма вказаними вище характерними ознаками.

До клітин, які є переважними для використання в різних аспектах винаходу, відносяться клітини, що мають описані вище ознаки, і більш конкретно клітини, які мають нормальні каріотиби і зберігають нормальні каріотиби при пересіваннях, і крім того, клітини, які експресують кожний з наступних маркерів: CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-альфа і HLA-A, B, C, при цьому клітини утворюють білки, що імунологічно виявляються, які відповідають перерахованим маркерам. Також переважними є такі клітини, які в доповнення у вищезгаданого не утворюють білків, відповідних будь-якому з маркерів CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 або

HLA-DR, DP, DQ, які виявляють будь-якими відповідними способами, відомими в даній галузі, такими як проточна цитометрія. Високо переважними є клітини, які не експресують CD117 або HLA-DR або теломеразу.

У деяких переважних аспектах способи включають введення клітин, одержаних або виділених з тканини пуповини людини, в підданий дегенерації IVD, при цьому клітини здатні до самопідтримування і розмноження в культурі, вимагають L-валін для росту, можуть рости щонайменше приблизно при 5 % кисні, не утворюють CD117 або HLA-DR або теломеразу, експресують альфа-актин гладких м'язів і експресують в порівнянні з фібробластом, мезенхімальною стовбуровою клітиною або клітиною кісткового мозку клубового гребеня людини підвищені рівні інтерлейкіну 8 і ретикулону 1. Клітини, виділені з тканини пуповини людини, можуть бути розмножені в культурі перед введенням. У деяких варіантах клітини, одержані з тканини пуповини людини, мають здатність диференціюватися в клітини фенотипу IVD, такий як без обмеження фенотип клітин фіброзного кільця або фенотип клітин драглистого ядра. Клітини, одержані з тканини пуповини, можуть інтегруватися в IVD пацієнта або альтернативно можуть забезпечувати підтримання росту або стимуляцію до диференціювання присутніх в природних умовах стовбурових клітин IVD. Життєздатність клітин, що вводяться не є такою, що визначає успіху або результатів їх застосування, коли існує поліпшення при захворюванні або стані, пов'язаному з дегенерацією IVD, і/або поліпшення загального стану здоров'я пацієнта. У деяких варіантах клітини переважно щонайменше частково інтегруються, розмножуються або продовжують жити в організмі пацієнта. У деяких варіантах пацієнт випробовує корисну дію терапії, наприклад, внаслідок здатності клітин підтримувати ріст інших клітин, включаючи стовбурові клітини або клітини-попередників, присутні в IVD і/або в навколишніх тканинах, внаслідок вrostання в тканину або васкуляризації тканини і/або внаслідок присутності корисних клітинних чинників, хемокинів, цитокінів і тому подібного, але при цьому клітини не інтегруються і не розмножуються в організмі пацієнта. У деяких аспектах пацієнт одержує користь внаслідок терапевтичного лікування клітинами, але клітини не продовжують жити протягом тривалого періоду часу в організмі пацієнта. Наприклад, в деяких варіантах поступово зменшується кількість клітин, життєздатність або біохімічна активність. У деяких варіантах такому зменшенню може передувати період активності, наприклад, ростової активності, розподілу або біохімічної активності. У деяких варіантах старіючі, нежиттєздатні або навіть мертві клітини здатні надавати корисну терапевтичну дію.

Деякі клітини, що мають здатність диференціюватися в лінії, що приводять до різних фенотипам, є нестійкими і, отже, можуть диференціюватися спонтанно. Таким чином, в деяких варіантах переважні клітини, які не диференціюються спонтанно. Наприклад, деякі переважні клітини при вирощуванні в ростовій середовищі є по суті стабільними відносно клітинних маркерів, що продукуються на їх поверхні, і відносно картини експресії різних генів, наприклад, картини експресії, що визначається при дослідженні профілю експресії генів з використанням, наприклад, матриць нуклеїнових кислот або поліпептидів. Такі клітини залишаються по суті постійними, наприклад, по ознаках їх поверхневих маркерів, при пересіваннях протягом численних подвоєнь популяції.

У деяких варіантах способи, що пропонуються в даному винаході, індукують одержану з тканини пуповини клітини до диференціювання по клітинному шляху IVD до фенотипам клітин IVD або попередників або більш ранніх родичів вищезгаданих клітин. Клітини, одержані з тканини пуповини, можуть інтегруватися в IVD пацієнта, або альтернативно можуть забезпечувати підтримання росту або стимуляцію диференціювання присутніх в природних умовах стовбурових клітин IVD. Життєздатність клітин, що вводяться, не є такою, що визначає успіху або результатів їх застосування, коли існує поліпшення при захворюванні або стані, пов'язаному з дегенерацією IVD, і/або поліпшення загального стану здоров'я пацієнта. У деяких варіантах клітини переважно щонайменше частково інтегруються, розмножуються або продовжують жити в організмі пацієнта. У деяких варіантах пацієнт випробовує корисну дію терапії, наприклад, внаслідок здатності клітин підтримувати ріст інших клітин, включаючи стовбурові клітини або клітини-попередників, присутні в IVD і/або в навколишніх тканинах, внаслідок вrostання в тканину або васкуляризації тканини і/або внаслідок присутності корисних клітинних чинників, хемокинів, цитокінів і тому подібних, але при цьому клітини не інтегруються і не розмножуються в організмі пацієнта. У деяких аспектах пацієнт одержує користь внаслідок терапевтичного лікування клітинами, але клітини не продовжують жити протягом тривалого періоду часу в організмі пацієнта. Наприклад, в деяких варіантах поступово змен кількість клітин, життєздатність або біохімічна активність. У деяких варіантах такому зменшенню може передувати період активності, наприклад, ростової активності, розподілу або біохімічної

активності. У деяких варіантах старіючі, нежиттєздатні або навіть мертві клітини здатні надавати корисну терапевтичну дію.

У деяких аспектах способи, згідно з винаходом, можуть додатково включати оцінку пацієнта відносно поліпшення структури і/або функції IVD і/або поліпшення загального стану здоров'я. Такі оцінки можуть бути одержані будь-якими відповідними способами, відомими в даній галузі, включаючи способи, описані і проілюстровані в даному описі.

У деяких варіантах клітини, одержані з тканини пуповини, вводять разом з одним або декількома іншими типами клітин, включаючи без обмеження інші мультипотентні або поліпотентні клітини, або хондроцити, хондробласти, остецити, остеобласти, остеокласти, контурні клітини кістки або клітини кісткового мозку. Клітини різних типів можуть бути змішані з клітинами, одержаними з тканини пуповини, відразу ж або безпосередньо перед введенням, або їх можна спільно культивувати протягом деякого періоду часу перед введенням. У деяких варіантах популяція клітин, одержаних з тканини пуповини, підтримує життєздатність, проліферацію, ріст, збереження, дозрівання, диференціювання і/або підвищену активність одного або декількох інших типів клітин, що вводяться разом з клітинами, одержаними з тканини пуповини і/або навпаки.

У деяких варіантах клітини, одержані з тканини пуповини, забезпечують трофічну підтримку іншим типам клітин, з якими їх вводять, і/або навпаки. У деяких варіантах бажано знаходження клітин, одержаних з тканини пуповини, і клітин, що спільно культивуються в контакт. Це можна здійснити, наприклад, висіваючи клітини у вигляді гетерогенної популяції клітин в культуральне середовище або на відповідний субстрат для культивування. Альтернативно клітини, одержані з тканини пуповини, можна спочатку вирощувати до злиття і використовувати як субстрат для клітин, що спільно культивуються. У інших варіантах клітини, що спільно культивуються, можна культивувати в контакт з кондиціонованим середовищем, позаклітинним матриксом і/або клітинним лізатом клітин, одержаним з тканини пуповини.

У різних варіантах клітини, одержані з тканини пуповини, можуть бути введені разом з біологічно активним засобом, таким як засіб, який модулює проліферацію, диференціювання і/або іншу клітинну активність. Засіб може бути введений до, після або одночасно з клітинами, одержаними з тканини пуповини. Конкретний засіб може бути вибраний по розсуду медичного працівника, що здійснює лікування пацієнта, і може змінюватися відповідно до конкретних потреб або стану пацієнта. Вибраний засіб можна використовувати для різних цілей, таких як без обмеження полегшення введення клітин, поліпшення репарації і/або регенерації IVD, поліпшення загального стану здоров'я пацієнта, зменшення болю, зменшення або запобігання відторгненню трансплантованих клітин і тому подібне.

Прикладами засобів, які можна вводити з клітинами, одержаними з тканини пуповини, є без обмеження вітаміни і інші добавки поживних речовин; антитромбогенні засоби; протизапальні засоби; імунодепресанти (наприклад, циклоспорин, рапаміцин); антиоксиданти; гормони; глікопротеїди; фібрoneктин; пептиди і білки; вуглеводи (прості і/або складні); протеоглікани; олігонуклеотиди (смыслові і/або антисмыслові ДНК і/або РНК); морфогенетичні білки кісток (BMP); чинники диференціювання; антитіла (наприклад, антитіла до інфекційних агентів, пухлин, лікарських засобів або гормонів); і реагенти для генної терапії. У деяких варіантах засіб являє собою речовину, таку як анальгетик, протизапальне засіб, наркотик, м'язовий релаксант або їх поєднання, які полегшують один або декілька симптомів захворювання або стану, пов'язаного з дегенерацією IVD.

У деяких варіантах додатковий засіб являє собою трофічний чинник або інший засіб, який здійснює трофічну дію відносно клітин, одержаних з тканини пуповини, відносно додаткових клітин, що вводяться разом з клітинами, одержаними з тканини пуповини, відносно ендогенних клітин IVD (наприклад, клітин фіброзного кільця, клітин драглистого ядра) і/або відносно інших ендогенних клітин (наприклад, клітин-попередників з'єднувальної тканини). У деяких варіантах трофічний чинник являє собою чинник, який секретується клітинами, одержаними з тканини пуповини, і в такому випадку він може бути одержаний з препаратів таких клітин, одержаних з тканини пуповини, або з іншого джерела. Прикладами таких чинників або засобів є без обмеження представники сімейства чинників росту фібробластів, включаючи кислий і основний чинники росту фібробластів (FGF-1 і FGF-2) і FGF-4; представники сімейства одержаного з тромбоцитів чинника росту (PDGF), включаючи PDGF-AB, PDGF-BB і PDGF-AA; EGF, представники інсуліноподібного чинника росту (IGF), включаючи IGF-I і -II; надсімейство TGF-бета, включаючи TGF-бета 1, 2 і 3 (включаючи MP-52), чинник остеοіндуκції (OIF), ангіогенін(ни), ендотеліни, чинник росту гепатоцитів і чинник росту кератиноцитів; представники сімейства морфогенетичних білків кісток (BMP), таких як BMP-1, BMP-3, BMP-2, OP-1, BMP-2A, BMP-2B, BMP-4, BMP-7 і BMP-14; HBGF-1 і HBGF-2; чинники росту диференціювання (GDF);

представники сімейств білків Hedgehog, включаючи білки, названі в честь індійського, "звукового" і ефіопського їжака; ADMP-1; GDF-5; TIMP-1 і представники сімейства колонієстимулюючих чинників (CSF), включаючи CSF-1, G-CSF і GM-CSF; і їх аналоги і ізоформи.

5 У деяких варіантах чинник росту вибраний з групи, що складається з TGF-бета, TGF-бета 1, FGF, bFGF і IGF-1. Вважають, що такі чинники росту стимулюють регенерацію драглистого ядра, стимулюють проліферацію і/або диференціювання хондроцитів і стимулюють секрецію у позаклітинний матрикс. У деяких варіантах чинником росту є TGF-бета. Більш переважно TGF-бета вводять в кількості приблизно від 10 нг/мл до приблизно 5000 нг/мл, наприклад, від 50

10 нг/мл до приблизно 500 нг/мл, наприклад, від 100 нг/мл до приблизно 300 нг/мл.

У деяких варіантах пропонується концентрат тромбоцитів як додатковий терапевтичний засіб. У деяких варіантах концентрат тромбоцитів є аутологічним. У деяких варіантах концентрат тромбоцитів являє собою збагачену тромбоцитами плазму (PRP). PRP має переваги, оскільки вона містить чинники зростання, які можуть рестимулювати ріст ECM, і

15 оскільки фібриновий матрикс забезпечує відповідний каркас для нового росту тканини. У деяких варіантах додатковим засобом є клітинний лізат, розчинна клітинна фракція, збагачена мембранами клітинна фракція, середовища для культивування клітин (наприклад, кондиціоновані середовища) або позаклітинного матриксу з клітин, одержаних з тканини пуповини, або інших клітин.

20 У деяких варіантах клітини, одержані з тканини пуповини, вводять разом з інгібітором HMG-CoA-редуктази, включаючи без обмеження симвастатин, правастатин, ловастатин, флувастатин, церивастатин і аторвастатин.

У деяких варіантах клітини, одержані з тканини пуповини, звичайно конструюють так, щоб вони експресували один або декілька засобів, таких як без обмеження один або декілька

25 додаткових терапевтичних засобів, описаних в даній публікації. Клітини згідно з винаходом можуть бути сконструйовані з використанням будь-якої з множини векторів, включаючи без обмеження інтегруючі вірусні вектори, наприклад, ретровірусний вектор або вектори на основі аденоасоційованих вірусів; неінтегруючі репліковні вектори, наприклад, вектори на основі вірусу папіломи, вектори SV40, аденовірусні вектори; або дефектні по реплікації вірусні вектори. Інші

30 способи введення ДНК в клітини включають застосування ліпосом, електропорації, пушки для частинок або прямий ін'єкція ДНК.

Клітини-хазяї переважно трансформують або трансфекують ДНК, що контролюється або оперативно пов'язано з одним або декількома відповідними елементами регуляції експресії, такими як нарівні з іншими елементами послідовності промотора або енхансера, термінатори

35 транскрипції, сайти поліаденілування, і селективним маркером.

Після введення чужерідної ДНК сконструйованим клітинам можна дати можливість рости в збагачених середовищах і потім переводять в селективне середовище. Селективний маркер в чужерідній ДНК додає резистентність до селекції і дозволяє клітинам стабільно інтегрувати чужерідну ДНК, наприклад, що знаходиться в плазміді, в їх хромосоми і рости з утворенням

40 осередків, які в свою чергу можуть бути клонувати і розмножувати з одержанням клітинних ліній. Такий спосіб переважно можна застосовувати для конструювання клітинних ліній. Які експресують генний продукт.

Будь-який промотор можна використовувати для керування експресією вбудованого гена. Наприклад, вірусні промотори включають без обмеження промотор/енхансер CMV, промотор

45 SV40, папіломавірусу, вірусу Епштейн-Барр або генів еластину. Переважно регуляторні елементи, що використовуються для регуляції експресії представляючого інтересу гена, повинні забезпечувати можливість регуляції експресії гена так, щоб продукт синтезувався *in vivo* тільки тоді, коли це необхідно. Якщо потрібна тимчасова експресія, переважно використовують конститутивні промотори в не інтегруючому і/або дефектному по реплікації векторі.

50 Альтернативно можна використовувати промотори, що індукуються для керування експресією вбудованого гена, коли це необхідно. Промоторами, що індукуються є без обмеження промотори, асоційовані з металотіонеїном і білками теплового шоку.

Клітини згідно з винаходом можуть бути генетично сконструйовані так, щоб "нокаутувати" або піддати "нокдауну" експресію чинників, які стимулюють запалення або відторгання в місці

55 імплантата. Способи негативного модулювання для зменшення рівнів експресії генів-мішеней або рівнів активності продукту гена-мішені обговорюються нижче. "Негативне модулювання" в значенні, що використовується в даному описі стосується зменшення рівня і/або активності продукту гена-мішені в порівнянні з рівнем і/або активністю продукту гена-мішені у відсутність модулюючої обробки. Експресія гена може бути зменшена або нокаутувана з використанням

60 декількох методик, включаючи, наприклад, інігування експресії за допомогою повної інактивації

гена (звичайно званої "нокаутом") з використанням способу гомологічної рекомбінації. Звичайний екзон, що кодує важливу область білка (або екзон, розташований з 5'-сторони від даної області), переривають позитивним селективним маркером, наприклад, нео, запобігаючи продукції нормальної мРНК з гена-мішені і приводячи до інактивації гена. Ген також може бути інактивованим внаслідок створення делеції в частині гена або внаслідок делеції повного гена. З використанням конструкції з двома областями гомології з геном-мішенню, які знаходяться на деякій відстані один від одного в геномі, можуть бути делетовані послідовності, що знаходяться між двома такими областями (Mombaerts et al., Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1991; 88: 3087).

Антисмислові молекули, молекули малих інтерферуючих РНК, ДНКзимів і рибозимів, які інгібують експресію гена-мішені, також можуть бути використані згідно з винаходом для зменшення рівня активності гена-мішені. Наприклад, показано, що антисмислові молекули РНК, які інгібують експресію генів основного комплексу гістосумісності (HLA), є найбільш універсальними відносно імунних відповідей. Крім того, триспіральні молекули можуть бути використані для зменшення рівня активності гена-мішені.

Вказані і інші способи детально описані в публікації L. G. Davis et al. (eds), Basic Methods In Molecular Biology, 2nd ed., Appleton and Lange, Norwalk, Conn. (1994), яка включена в даний опис у вигляді посилання.

IL-1 є сильним стимулятором резорбції хряща і продукції модуляторів запалення хондроцитами (Campbell et al., J. Immun., 1991; 147(4): 1238-1246). Використовуючи будь-кого з вказаних вище методик, можна здійснити нокаут або нокдаун експресії IL-1 в клітинах згідно з винаходом, щоб зменшити ризик резорбції імплантованого хряща або продукції медіаторів запалення клітинами згідно з винаходом. Подібним чином, експресія молекул МНС класу II можуть бути піддані нокауту або нокдауну, щоб зменшити ризик відторгання імплантованої тканини.

Після генетичного конструювання клітин згідно з винаходом вони можуть бути безпосередньо імплантовані пацієнту для забезпечення лікування захворювання або стану, пов'язаного з дегенерацією IVD, наприклад, завдяки утворенню продукту, що надає терапевтичну дію, направлену проти одного або декількох симптомів захворювання або стану, такого як протизапальний генний продукт. Альтернативно генетично сконструйовані клітини можна використовувати для одержання нової тканини in vitro, яку потім імплантують суб'єкту, як описано в даній публікації.

У деяких аспектах пропонуються фармацевтичні композиції, які містять клітини, одержані з тканини пуповини, які описані в даній публікації, і фармацевтично прийнятний носій. Фармацевтичні композиції, що пропонуються в даному винаході, можуть індукувати клітини, одержані з тканини пуповини, до диференціювання по шляху або лінії клітин IVD, наприклад, до вияву фенотипу клітин драглистого ядра і/або фенотипу клітин фіброзного кільця. У деяких варіантах фармацевтичні композиції, що пропонуються в даному винаході, модулюють клітинні процеси ендогенних клітин IVD і/або клітин навколишніх тканин, включаючи без обмеження розподіл клітин, диференціювання і експресію генів. У деяких варіантах фармацевтичні композиції, що пропонуються в даному винаході, стимулюють репарацію і регенерацію підданого дегенерації IVD.

Також відмітною ознакою даного винаходу є набори для практичного здійснення способів згідно з винаходом. У одному аспекті пропонуються набори для лікування пацієнта, що має захворювання або пошкодження щонайменше одного IVD. Набори містять фармацевтично прийнятний носій, клітини, одержані з тканини пуповини людини, в кількості, ефективній для лікування захворювання або стану, такі як клітини, які описані і наведені як приклад в даному описі, і інструкції по застосуванню набору в способі лікування пацієнта, що має захворювання або стан, пов'язаний з дегенерацією IVD. Набори можуть додатково містити щонайменше один реагент і інструкції по культивуванню клітин. Набори можуть додатково містити популяцію щонайменше одного іншого типу клітин, і/або щонайменше один засіб.

У деяких аспектах набори містять фармацевтично прийнятний носій, лізат, позаклітинний матрикс або кондиціоноване середовище клітин, одержаних з тканини пуповини людини, при цьому клітини володіють характерними ознаками, які описані і проілюстровані в даному описі. Набори застосовні для забезпечення репарації і/або регенерації IVD, який пошкоджений або уражений захворюванням.

Наступні приклади пропонуються для більш докладного опису винаходу. Вони призначені для ілюстрації, але не обмежують винахід.

ПРИКЛАД 1

Виділення клітин, одержаних з тканини пуповини

Пуповину одержували з National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA). Тканини одержували після нормального проходження пологів. Протокол виділення клітин здійснювали асептично у витяжній шафі з ламінарним потоком. Для того щоб видалити кров і залишки, пуповину промивали в фосфатно-сольовому буфері (PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA) в присутності протигрибкового засобу і антибіотика (100 одиниць/мілілітр пеніциліну, 100 мікрограм/мілілітр стрептоміцину, 0,25 мікрограм/мілілітр амфотерицину В). Потім тканини розділяли механічно в чашках для культури тканини розміром 150 см² в присутності 50 мілілітрів середовища (DMEM з низьким вмістом глюкози або DMEM з високим вмістом глюкози; Invitrogen), доти, поки тканина не була розкришена до тонкоподрібненої м'якої мас. Розкришені тканини переносили в конічні пробірки об'ємом 50 мілілітрів (приблизно 5 грам тканини на пробірку). Потім тканину розщеплювали або в середовищі DMEM з низьким вмістом глюкози, або в середовищі DMEM з високим вмістом глюкози, кожна з яких містила протигрибковий засіб і антибіотик, як описано вище. У деяких експериментах використовували суміш ферментів колагенази і диспази ("3:D"; колагеназа (Sigma, St Louis, MO), 500 одиниць/мілілітр; і диспаза (Invitrogen), 50 одиниць/мілілітр в середовищі DMEM з низьким вмістом глюкози). У інших експериментах використовували суміш колагенази, диспази і гіалуронідази ("C:D:H") (колагеназа, 500 одиниць/мілілітр; диспаза, 50 одиниць/мілілітр; і гіалуронідаза (Sigma), 5 одиниць/мілілітр, в DMEM з низьким вмістом глюкози). Конічні пробірки, що містять тканину, середовище і ферменти для розщеплення, інкубували при 37 °C на орбітальному струшувачі (Enviro, Brooklyn, NY) при 225 об./хв протягом 2 годин.

Після розщеплення тканину центрифугували при 150×g протягом 5 хвилин, надосад аспірували. Осад ресуспендували в 20 мілілітрах ростового середовища (DMEM:з низьким вмістом глюкози (Invitrogen), що містить 15 процентів (об./об.) фетальної бичачої сироватки (FBS; визначена бичача сироватка; партія № AND18475; Hyclone, Logan, UT), 0,001 % (об./об.) 2- меркаптоетанолу (Sigma), 1 мілілітр на 100 мілілітрів антибіотики/протигрибкового засобу, які описані вище. Суспензію клітин фільтрували через 70-мікрометровий нейлоновий клітинний фільтр (BD Biosciences). Через фільтр пропускали додатково 5 мілілітрів розчину для промивання, що містить ростове середовище. Потім суспензію клітин пропускали через 40-мікрометровий нейлоновий клітинний фільтр (BD Biosciences) і промивали додатково 5 мілілітрами ростового середовища.

Фільтрат ресуспендували в ростовому середовищі (загальний об'єм 50 мілілітрів) і центрифугували при 150×g протягом 5 хвилин. Надосад аспірували і клітини ресуспендували в 50 мілілітрах свіжого ростового середовища. Вказаний процес повторювали ще два рази.

Після кінцевого центрифугування надосад аспірували і осад клітин ресуспендували в 5 мілілітрах свіжого ростового середовища. Кількість життєздатних клітин визначали, використовуючи фарбування трипановим синім. Потім клітини культивували в стандартних умовах.

Клітини, виділені з пуповини, висівали по 5000 клітин/см² в покриті желатином флакони T-75 см² (Corning Inc., Corning, NY) в ростове середовище з антибіотиками/протигрибковими засобами, які описані вище. Через 2 дні (в різних експериментах клітини інкубували від 2 до 4 діб), використане середовище аспірували з флаконів. Клітини промивали три рази PBS, щоб видалити уламки і одержані з крові клітини. Потім в клітини додавали ростове середовище і давали можливість рости до злиття в моношар (приблизно 10 діб після пасажу 0) до пасажу 1. Прі подальших пасажах (від пасажу 1 до пасажу 2 і так далі) клітини майже досягали злиття (злиття на 75-85 процентів) за 4-5 діб. У випадку вказаних подальших пасажів клітини висівали по 5000 клітин/см². Клітини вирощували в інкубаторі із зволоженням в умовах 5-процентного вмісту діоксиду вуглецю і атмосферного кисня при 37 °C.

ПРИКЛАД 2

Оцінка поверхневих маркерів клітин, одержаних з післяпологових тканин людини, з використанням проточної цитометрії

Тканину пуповини характеризували, використовуючи проточну цитометрію, щоб одержати профіль ідентифікації одержаних з неї клітин.

Клітини культивували в ростовому середовищі (Gibco Carlsbad, CA) з пеніциліном/стрептоміцином. Клітини культивували в оброблених плазмою флаконах для культури тканини T75, T150 і T225 (Corning, Corning, NY) аж до злиття в моношар. Поверхні для росту у флаконах покривали желатином за допомогою інкубації з 2 % (мас./об.) желатину (Sigma, St. Louis, MO) протягом 20 хвилин при кімнатній температурі.

Прикріплені клітини у флаконах промивали в PBS і відчеплювали, використовуючи трипсин/EDTA. Клітини збирали, центрифугували і ресуспендували в 3 % (об./об.) FBS в PBS при концентрації клітин 1(10⁷ в мілілітрі. Згідно з інструкціями виробника додавали антитіло до

- представляючого інтерес маркера клітинної поверхні (див. нижче) до ста мікролітрам клітинної суспензії і суміш інкубували в темряві протягом 30 хвилин при 4 °С. Після інкубації клітини промивали PBS і центрифугували, щоб видалити непов'язане антитіло. Клітини ресуспендували в 500 мікролітрах PBS і аналізували проточною цитометрією. Проточно-цитометричний аналіз здійснювали на приладі FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).
- Використовували наступні антитіла до маркерів клітинної поверхні.

Антитіло	Виробник	Номер в каталозі
CD 10	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555375
CD13	BD Pharmingen	555394
CD31	BD Pharmingen	555446
CD34	BD Pharmingen	555821
CD44	BD Pharmingen	555478
CD45RA	BD Pharmingen	555489
CD73	BD Pharmingen	550257
CD90	BD Pharmingen	555596
CD117	BD Pharmingen	340529
CD 141	BD Pharmingen	559781
PDGFr-альфа	BD Pharmingen	556002
HLA-A, B, 3	BD Pharmingen	555553
HLA-DR, DP,	DQBD Pharmingen	555558
IgG-ФІТЦ	Sigma (St, Louis, MO)	F-6522
IgG-PE	Sigma	P-4685

- Аналізували клітини пасажів 8, 15 і 20, і клітини, одержані з тканини пуповини від різних донорів, порівнювали один з одним. Крім того, клітини, культивовані на покритих желатином флаконах, порівнювали з клітинами, культивованими на непокритих флаконах.

- Клітини, одержані з тканини пуповини, виявляли позитивну експресію CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-альфа і HLA-A, B, 3, що виявляється на основі підвищених значень флуоресценції в порівнянні з контрольним IgG. Такі клітини були негативними відносно експресії, що реєструється CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 і HLA-DR, DP, DQ, що виявляли на основі значень флуоресценції, порівнянних зі значеннями для контрольного IgG. Враховували зміни значень флуоресценції позитивних кривих. Середні значення (наприклад, CD13) і діапазон (наприклад, CD90) для позитивних кривих були в деякій мірі варіабельними, але криві виглядали нормальними, підтверджуючи наявність гомогенної популяції. Обидві криві по окремоті мали значення більш високі, ніж у випадку контрольного IgG.

- Всі клітини пасажів 8, 15, і 20 експресували CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-альфа і HLA-A, B, 3, що показано на основі підвищеної флуоресценції в порівнянні з флуоресценцією у випадку контрольного IgG. Такі клітини були негативними у відношенні CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 і HLA-DR, DP, DQ, що показано на основі значень флуоресценції відповідних значенням у випадку контрольного IgG.

- У кожному з ізолятів від окремих донорів спостерігали позитивну експресію CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-альфа і HLA-A, B, 3, що відбивалося в підвищених значеннях флуоресценції в порівнянні з контрольним IgG. Такі клітини були негативними відносно експресії CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 і HLA-DR, DP, DQ зі значеннями флуоресценції, відповідними значенням для контрольного IgG.

- Всі клітини, які розмножувалися в покритих желатином і непокритих флаконах, були позитивними відносно експресії CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-альфа і HLA-A, B, 3, з підвищеними значеннями флуоресценції в порівнянні зі значенням для контрольного IgG. Такі клітини були негативними відносно експресії CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 і HLA-DR, DP, DQ зі значеннями флуоресценції, відповідними значенням для контрольного IgG.

- Таким чином, клітини, одержані з тканини пуповини, є позитивними у відношенні CD10, CD13, CD44, CD73, CD90, PDGFr-альфа, HLA-A, B, 3 і негативними у відношенні CD31, CD34, CD45, CD117, CD141 і HLA-DR, DP, DQ. Така особливість зберігалася при змінах змінних, включаючи донора, пасаж і покриття поверхні посудини для культивування. Спостерігали деяку варіабельність в середніх значеннях і діапазонах на гістограмах значень флуоресценції, але всі позитивні криві при всіх тестованих умовах були нормальними і відображали значення флуоресценції більш високі, ніж у випадку контрольного IgG, тим самим підтверджуючи, що клітини складають гомогенну популяцію, яка має позитивну експресію маркерів.

ПРИКЛАД 3

Імуногістохімічна характеристика фенотипів клітин

Тканину пуповини людини збирали і фіксували зануренням в 4 % (об./об.) параформальдегід протягом ночі при 4 °C. Імуногістохімію здійснювали, використовуючи антитіла, направлені проти наступних епітопів: віментин (1:500; Sigma, St. Louis, MO), десмін (1:150, одержане проти кролячого; Sigma; або 1:300, одержане проти мишачого; Chemicon, Temecula, CA), альфа-актин гладких м'язів (SMA; 1:400; Sigma), цитокератин 18 (CK18; 1:400; Sigma), чинник фон Віллебранда (vWF; 1:200; Sigma) і CD34 (CD34 людини, клас III; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Крім того, тестували наступні маркери: анти-GROalpha-PE людини (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), анти-GCP-2 людини (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), анти-рецептор 1 окислених LDL людини (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech) і анти-NOGO-A людини (1:100; Santa Cruz Biotech). Фіксовані зразки обрізали скальпелем і вміщували в речовину для заливки OCT (Tissue-Tek OCT; Sakura, Torrance, CA) на бані з сухим льодом, утримуючій етанол. Потім робили зрізи заморожених блоків (товщиною 10 мкм), використовуючи стандартний кріостат (Leica Microsystems), і закріплювали на предметному склі для фарбування.

Імуногістохімію здійснювали подібно описаним раніше дослідженням (Messina et al., Exper. Neurol, 2003; 184: 816-29). Стисло, зрізи тканини промивали фосфатно-сольовим буфером (PBS) і обробляли розчином блокуючого білка, утримуючим PBS, 4 % (об./об.) сироватки кози (Chemicon, Temecula, CA) і 0,3 % (об./об.) тритона (Triton X-100; Sigma), протягом 1 години, щоб досягнути внутрішньоклітинних антигенів. У випадках, коли представляючий інтерес епітоп міг бути локалізований на клітинній поверхні (CD34, ox-LDL R1), тритон виключали на всіх стадіях процедури, щоб запобігти втраті епітопів. Крім того, в тих випадках, коли перше антитіло було проти епітопів кози (GCP-2, ox-LDL R1, NOGO-A), використовували 3 % (об./об.) сироватку осла замість сироватки кози протягом всієї процедури. Потім перші антитіла, розбавлені в буфері для блокування, наносили на зрізи на 4 години при кімнатній температурі. Розчини перших антитіл видаляли і культури промивали PBS перед нанесенням розчинів другого антитіла (1 година при кімнатній температурі), що містять блок нарівні з антитілом кози проти IgG миші - техаського червоного (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) і/або антитілом кози проти IgG кролика - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) або антитілом осла проти IgG кози - ФІТЦ (1:150; Santa Cruz Biotech). Культури промивали, і наносили 10 мікролітрів DAPI (Molecular Probes) на 10 хвилин, щоб візуалізувати ядра клітин.

Флуоресценцію візуалізували, використовуючи відповідний фільтр для флуоресценції на інвертованому епіфлуоресцентному мікроскопі Olympus (Olympus, Melville, NY). Позитивне фарбування було представлене сигналом флуоресценції вище контрольного фарбування. Типові зображення вловлювали, використовуючи цифрову кольорову відеокамеру і комп'ютерну програму ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). У випадку тричі забарвлених зразків кожне зображення одержували, використовуючи тільки один емісійний фільтр, за один раз.

Маркери віментин, десмін, SMA, CK18, vWF і CD34 експресувались на підгрупі клітин, знайдені в пуповині. Зокрема, експресія vWF і CD34 була обмежена кровоносними судинами, що знаходяться в пуповині. Клітини CD34+ знаходилися на самому внутрішньому шарі (з боку просвіту). Експресія віментину виявлена в матриксі і кровоносних судинах пуповини. SMA був обмежений матриксом і зовнішніми стінками артерії і вени, але не зустрічався в самих судинах. CK18 і десмін спостерігали тільки в посудинах, при цьому десмін був обмежений середнім і зовнішнім шарами. Експресію GRO-альфа, GCP-2, ox-LDL R1 і NOGO-A не спостерігали в тканині пуповини.

ПРИКЛАД 4

Аналіз олігонуклеотидної матриці

Матриці Affymetrix GeneChip використовували для порівняння профілів генної експресії клітин, одержаних з тканини пуповини, з фібробластами, мезенхімальними стовбуровими клітинами людини і іншої ліній клітин, одержаної з кісткового мозку людини. У такому аналізі одержали характеристику клітин, одержаних з післяпологової тканини, і ідентифікували унікальні молекулярні маркери таких клітин.

Пуповина людини одержувала з National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA) після нормальних родів донесених дітей із згоди пацієнтів. Тканини одержували і виділяли клітини як описано вище. Клітини культивували в ростовому середовищі (використовуючи DMEM-LG) в покритих желатином пластикових флаконах для культури тканини. Культури інкубували при 37 °C з 5 % CO₂.

Фібробласти шкіри людини придбавали у Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; партія номер 9F0844) і ATCC CRL-1501 (CCD39SK). Обидві лінії культивували в середовищі DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad, CA) з 10 % (об./об.) фетальної бичачої сироватки (Hyclone) і

пеніциліном/стрептоміцином (Invitrogen). Клітини вирощували на стандартних пластик для культивування тканини.

Мезенхімальні стовбурові клітини людини (hMSC) придбавали у Cambrex Incorporated (Walkersville, MD; номери партій 2F1655, 2F1656 і 2F1657) і культивували згідно з інструкціями виробника в середовищі MSCGM (Cambrex). Клітини вирощували на стандартних пластик для культивування тканини при 37 °C і 5 % CO₂.

Кістковий мозок клубового гребеня людини одержували з NDRI із згоди пацієнтів. Кістковий мозок обробляли згідно з способом, описаним Но з співавторами (WO 2003/025149). Кістковий мозок змішували з лизуючим буфер (155 мМ NH₄Cl, 10 мМ KHCO₃ і 0,1 мМ EDTA, pH 7,2) в співвідношенні 1 частина кісткового мозку на 20 частин лізуючого буфера. Суспензію клітин струшували, інкубували протягом 2 хвилин при температурі навколишнього середовища і центрифугували протягом 10 хвилин при 500g. Надосад відкидали і осадок клітин ресуспендували в мінімальному поживному середовищі альфа (Invitrogen) з доданням 10 % (об./об.) фетальної бичачої сироватки і 4 мМ глутаміну. Клітини знов центрифугували і осад клітин ресуспендували в свіжому середовищі. Життєздатні мононуклеарні клітини підраховували, використовуючи виключення при фарбуванні трипановим синім (Sigma, St. Louis, MO). Мононуклеарні клітини висівали в пластикових флаконах для культивування тканини по 5×10⁴ клітин/см. Клітини інкубували при 37 °C і 5 % CO₂, або в стандартній атмосфері O₂, або при 5 % O₂. Клітини культивували протягом 5 днів без заміни середовища. Середовище і клітини, що не прикріпилися видаляли через 5 днів культивування. Прикріплені клітини підтримували в культурі.

Активно зростаючі культури клітин витягували з флаконів за допомогою скребачки для клітин в холодний PBS. Клітини центрифугували протягом 5 хвилин при 300×g. Надосад видаляли і клітини ресуспендували в свіжому PBS і знову центрифугували. Надосад видаляли і осад клітин відразу ж заморожували і зберігали при -80 °C. Клеточну мРНК екстрагували і транскрибували в кДНК, яку потім транскрибували в кРНК і мітили біотином. Мічену біотином кРНК гібридизували з олігонуклеотидною матрицею HG-U133A GeneChip (Affymetrix, Santa Clara CA). Гібридизацію і збір даних здійснювали згідно з інструкціями виробника. Аналізи здійснювали, використовуючи комп'ютерну програму "Significance Analysis of Microarrays" (SAM), версію 1.21 (Stanford University; Tusher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002; 98: 5116-21).

Аналізували чотирнадцять різних популяцій клітин. Клітини, а також інформація про пасажі, субстрат для культивування і культуральні середовища вказані в таблиці 1.

Таблиця 1

Клітини, що аналізуються в дослідженні на мікроматрицях. Лінії клітин перераховані з вказівкою ідентифікаційного коду нарівні з вказівкою пасажу в момент аналізу, субстрат для росту клітин і ростового середовища.

Популяція клітин	Пасаж	Субстрат	Середовище
Пуповина (022803)	2	Желатин	DMEM, 15 % FBS, 2-ME
Пуповина (042 103)	3	Желатин	DMEM, 15 % FBS, 2-ME
Пуповина (07 1003)	4	Желатин	DMEM, 15 % FBS, 2-ME
ICBM (070203) (5 % O2)	3	Пластик	MEM, 10 % FBS
ICBM (062703) (std, O2)	5	Пластик	MEM, 10 % FBS
ICBM (062703) (5 % O2)	5	Пластик	MEM, 10 % FBS
hMSC (Lot 2F 1655)	3	Пластик	MSCGM
hMSC(Lot2F1656)	3	Пластик	MSCGM
hMSC (Lot 2F 1657)	3	Пластик	MSCGM
Фібробласт людини (9F0844)	9	Пластик	DMEM-F12, 10 % FBS
Фібробласт людини (CCD39SK)	4	Пластик	DMEM-F12, 10 % FBS

Дані оцінювали з використанням аналізу головних компонентів, аналізуючи 290 генів, яких по-різному експресувалися в клітинах. Такий аналіз дозволяє провести відносно порівняння для виявлення схожості між популяціями. У таблиці 2 показані Евклідові відстані, які можуть бути обчислені для порівняння пар клітин. Евклідові відстані основані на порівнянні клітин по 290 генах, яких по-різному експресуються в різних типах клітин. Евклідова відстань є зворотно пропорційною схожості між експресією 290 генів (тобто, чим більше відстань, тим менша схожість існує).

Таблиця 2

Евклідові відстані для пар клітин.

Пара клітин	Евклідова відстань
ICBM-hMSC	24,71
Плацента-пуповина	25,52
ICBM-фібробласт	36,44
ICBM-плацента	37,09
Фібробласт-MSC	39,63
ICBM-пуповина	40,15
Fibroblast-пуповина	41,59
MSC-плацента	42,84
MSC-пуповина	46,86
ICBM-плацента	48,41

У таблицях 3 і 4 нижче показана експресія генів, підвищена в клітинах, одержаних з тканини пуповини (таблиця 3), і знижена в клітинах, одержаних з тканини пуповини (таблиця 4). Колонка, озаглавлена "ID набору зондів" стосується ідентифікаційного коду виробника для наборів з декількох олігонуклеотидних зондів, локалізованих в конкретному місці на чипе, яких гібридизуються з названим геном (колонка "назва гена"), що містить послідовність, яка може бути знайдена в базі даних NCBI (GenBank) з конкретним номером доступу (колонка "номер доступу в NCBI").

Таблиця 3

Гени, які, як було показано, мають специфічно підвищену експресію в клітинах, одержаних з тканини пуповини, в порівнянні з іншими лініями клітин, що аналізуються

Гени з підвищеною експресією в клітинах, одержаних з тканини пуповини		
ID набору зондів	Назва гена	Номер доступу в NCBI
202859_x_at	інтерлейкін 8	NM_000584
211506_s_at	інтерлейкін 8	AF043337
210222_s_at	ретикулон 1	BC000314
204470_at	ліганд 1 хемокіну (метил C-X-C) (активність, стимулююча ріст меланоми)	NM_001511
206336_at	ліганд 6 хемокіну (метил C-X-C) (хемотаксичний білок 2 гранулоцитів)	NM_002993
207850_at	ліганд 3 хемокіну (метил C-X-C)	NM_002090
203485_at	ретикулон 1	NM_021136
202644_s_at	чинник некрозу пухлин, альфа-індукований білок 3	NM_006290

Таблиця 4

Гени, які, як було показано, мають знижену експресію в клітинах, одержаних з тканини пуповини, в порівнянні з іншими лініями клітин, що аналізуються

Гени із зниженою експресією в клітинах, одержаних з тканини пуповини, і з плаценти		
ID набору зондів	Назва гена	Номер доступу в NCBI
210135_s_at	гомеобокс 2, пов'язаний з низьким ростом	AF022654.1
205824_at	білок 2 теплового шоку 27 кД	NM_001541.1
209687_at	ліганд 12 хемокіну (метил C-X-C) (чинник 1, одержаний з стромальних клітин)	U19495.1
203666_at	ліганд 12 хемокіну (метил C-X-C) (чинник 1, одержаний з стромальних клітин)	NM_000609.1
212670_at	еластин (надкласаний стеноз гирла аорти, синдром Вільямса-Бурена)	AA479278
213381_at	мРНК Homo sapiens; кДНК DKFZp586M2022 (з клона DKFZp586M2022)	N91149

Гени із зниженою експресією в клітинах, одержаних з тканини пуповини, і з плаценти		
ID набору зондів	Назва гена	Номер доступу в NCBI
206201_s_at	гомеобокс 2 мезенхіми (гомеобокс, специфічний для затримки зростання)	NM_005924.1
205817_at	гомолог 1 гомеобоксу sine oculis (Drosophila)	NM_005982.1
209283_at	кристаллин, альфа В	AF007162.1
212793_at	асоційований з Disheveled активатор морфогенезу 2	BF513244
213488_at	білок DKFZP586B2420	AL050143.1
209763_at	схожий з нейраліном 1	AL049176
205200_at	тетранектин (плазміноген-зв'язуючий білок)	NM_003278.1
205743_at	гомолог src три (SH3) і багата цистеїном домен	NM_003149.1
200921_s_at	ген 1 транслокації В-клітин, антипроліферативний	NM_001731.1
206932_at	холестерин-25-гідроксилаза	NM_003956.1
204198_s_at	споріднений runt транскрипції 3	AA541630
219747_at	гіпотетичний білок FLJ23191	NM_024574.1
204773_at	рецептор інтерлейкіну, альфа	NM_004512.1
202465_at	енхансер проколаген-С-ендопептидази	NM_002593.2
203706_s_at	гомолог Frizzled 7 (Drosophila)	NM_003507.1
212736_at	гіпотетичний ген BC008967	BE299456
214587_at	колаген, тип VIII, альфа 1	BE877796
201645_at	тенаascin 3 (гексабрахіон)	NM_002160.1
210239_at	гомеобоксний білок iroquois 5	U90304.1
203903_s_at	гефаестин	NM_014799.1
205816_at	інтегрин, бета 8	NM_002214.1
203069_at	глікопротеїд 2 синаптичного пухирця	NM_014849.1
213909_at	кДНК Homo sapiens FLJ12280 fis, клон МАММА1001744	AU 147799
206315_at	подібний рецептору цитокіну чинник 1	NM_004750.1
204401_at	калієвий канал, що активується кальцієм з проміжною/низькою провідністю, підродина N, представник 4	NM_002250.1
216331_at	інтегрин, альфа 7	AK022548.1
209663_s_at	інтегрин, альфа 7	AF072132.1
213125_at	білок DKFZP586L151	AW007573
202133_at	транскрипційний коактиватор з PDZ-зв'язуючим мотивом (TAZ)	AA081084
206511_s_at	гомолог 2 гомеобоксу sine oculis (Drosophila)	NM_016932.1
213435_at	білок KIAA1034	AB028957.1
206115_at	продукт гена ранньої ростової відповіді 3	NM_004430.1
213707_s_at	гомеобокс гена distal-less	NM_005221.3
218181_s_at	гіпотетичний білок FLJ20373	NM_017792.1
209160_at	сімейство альдокеторедуктази 1, представник C3 (3-альфа-гідроксистероїддегідрогеназа, тип II)	AB018580.1
213905_x_at	биглікан	AA845258
201261_x_at	биглікан	BC002416.1
202132_at	транскрипційний коактиватор з PDZ-зв'язуючим мотивом (TAZ)	AA081084
214701_s_at	фібронектин 1	AJ276395.1
213791_at	проенкефалин	NM_006211.1
205422_s_at	інтегрин, бета-подібний 1 (з EGF-подібними доменами, що повторюються)	NM_004791.1
214927_at	клон кДНК з повнорозмірною вставкою мРНК Homo sapiens EUROIMAGE 1968422	AL359052.1
206070_s_at	EphA3	AF2 13459.1

Гени із зниженою експресією в клітинах, одержаних з тканини пуповини, і з плаценти		
ID набору зондів	Назва гена	Номер доступу в NCBI
212805_at	білок KIAA0367	AB002365.1
219789_at	рецептор натрійуретичного пептиду C/гуанілатциклазу C (рецептор атріонатрійуретичного пептиду C)	AI628360
219054_at	гіпотетичний білок FLJ14054	NM_024563.1
213429_at	мРНК Homo sapiens; кДНК DKFZp564B222 (з клона DKFZp564B222)	AW025579
204929_s_at	асоційований з везикулами мембранний білок 5 (міобревін)	NM_006634.1
201843_s_at	EGF-утримуючий фібулін-подібний білок позаклітинного матриксу 1	NM_004105.2
221478_at	подібний білку 3, взаємодіючому з білком BCL2/аденовірусу E1B 19 кД	AL1 32665.1
201792_at	білок 1, зв'язуючий АЕ	NM_001129.2
204570_at	поліпептид 1 субодиноці VIIa цитохром-с-оксидази (м'яз)	NM_001864.1
201621_at	нейробластоми, придушення канцерогенності 1	NM_005380.1
202718_at	білок 2, зв'язуючий інсуліноподібний чинник росту, 36 кД.	NM_000597.1

У таблицях 5, 6, і 7 показана експресія генів, підвищена в фібробластах людини (таблиця 5), клітинах ICBM (таблиця 6) і MSC (таблиця 7).

Таблиця 5

Гени, які, як було показано, мають підвищену експресію в фібробластах в порівнянні з іншими лініями клітин, що аналізуються

Гени з підвищеною експресією в фібробластах
фосфатаза 2 з подвійною специфічністю
білок KIAA0527
кДНК Homo sapiens: FLJ23224 fis, клон ADSU02206
дінеїн, цитоплазматичний проміжний поліпептид 1
анкірин 3, перехоплення Ранвье (анкірин G)
інгібін, бета A (активін A, альфа-поліпептид активина AB)
ектонуклеотидпірофосфатаза/фосфодіестераза 4 (передбачувана функція)
Білок KIAA1053
асоційований з мікротрубочками білок 1A
білок цинкового пальця 41
білок HSPCO19
кДНК Homo sapiens: FLJ23564 fis, клон LNG10773
мРНК Homo sapiens; кДНК DKFZp564A072 (з клона DKFZp564A072)
білок LIM (схожий з білком енігму, зв'язуючим протеїнказу C щурів)
інгібітор ехансера гена поліпептиду легкого ланцюга каппа в В-клітинах, білок, асоційований з кіназним комплексом
гіпотетичний білок FLJ22004
послідовність мРНК людини (клон CTG-A4)
EST, помірно схожі з чинником 2, подібним рецептору цитокіну; попередник рецептора цитокіну CRL2 [Homo sapiens]
трансформуючий чинник росту, бета 2
гіпотетичний білок MGC29643
антигенний, ідентифікований з використанням моноклонального антитіла MRC OX-2
передбачуваний X-зчеплений білок ретинопатії

Таблиця 6

Гени, які, як було показано, мають підвищену експресію в клітинах, одержаних з ICBM, в порівнянні з іншими лініями клітин, що аналізуються

Гени з підвищеною експресією в клітинах ICBM
<ul style="list-style-type: none"> - білок серця з анкіриновими повторами - ORF області MHC класу I - інтегрин, альфа 10 - гіпотетичний білок FLJ22362 - UDP-N-ацетил-альфа-D-галактозамін:поліпептид N-ацетилгалактозамінілтрансфераза 3 (GalNAc-T3) - білок, що індукується інтерфероном 44 - SRY (визначальна підлогу область Y)-бокс 9 (кампомелічна дисплазія, аутомомна реверсія підлоги) - асоційований з кератином білок 1-1 - гіпокальцин-подібний 1 - jagged 1 (синдром Алажіля) - протеоглікан 1, секреторна гранула

Таблиця 7

Гени, які, як показано, мають підвищену експресію в клітинах MSC в порівнянні з іншими лініями клітин, що аналізуються

Гени з підвищеною експресією в клітинах MSC
<ul style="list-style-type: none"> - інтерлейкін 26 - мальтаза-глюкоамілаза (альфа-глюкозидаза) - підродина 4 ядерних рецепторів, група A, представник 2 - гомолог вірусного онкогена остеосаркоми миші v-fos FBJ - гіпотетичний білок DC42 - підродина 4 ядерних рецепторів, група A, представник 2 - гомолог B вірусного онкогена остеосаркоми миші FBJ - білок 1 шляху передачі сигналу, що індукується WNT1 - трансформуюча послідовність, одержана з лінії клітин MCF.2 - калієвий канал, підродина K, представник 15 - гомеобелок 1 класу парних гомеобоксів хряща - кДНК Homo sapiens FLJ12232 fis, клон MAMMA1001206 - кДНК Homo sapiens FLJ34668 fis, клон LIVER2000775 - протоонкоген jun B - B-клітинний CLL/лімфома 6 (білок цинкових пальців 51) - білок цинкових пальців 36, тип C3H, гомолог (миша)

- 5 Наведений вище аналіз включав клітини, одержані з трьох різних пуповин і двох різних ліній фібробластів шкіри, трьох ліній мезенхімальних стовбурових клітин і трьох ліній клітин кісткового мозку клубового гребеня. мРНК, яка була експресована вказаними клітинами, аналізували з використанням олігонуклеотидної матриці, яка містила зонди для 22000 генів. Результати показали, що 290 генів диференційовано експресувались у вказаних п'яти різних типах клітин. До таких генів відносяться сім генів, експресія яких специфічно підвищена в
- 10 клітинах, одержаних з тканини пуповини. Виявлено, що п'ятдесят чотири гена мають специфічно більш низькі рівні експресії в клітинах, одержаних з тканини пуповини, в порівнянні з іншими типами клітин. Експресію вибраних генів підтверджували за допомогою ПЛР. Одержані результати свідчать, що клітини, одержані з тканини пуповини, мають відмінний профіль генної експресії, наприклад, в порівнянні з клітинами, одержаними з кісткового мозку, і фібробластами.

15 ПРИКЛАД 5

Клітинні маркери в клітинах, одержаних з тканини пуповини

Як показано вище, ідентифіковано шість "пізнавальних" генів для клітин, одержаних з тканини пуповини: гени рецептора 1 окислених LDL, інтерлейкіну-8, реніну, ретикулону, ліганду 3 рецептора хемокіну 3 (ліганд 3 CXС) і хемотаксичного білка 2 гранулоцитів (GCP-2). Вказані

"пізнавальні" гени експресувались на відносно високих рівнях в клітинах, одержаних з післяпологової тканини.

Способи, описані в даному прикладі, здійснювали для того, щоб перевірити дані, одержані з використанням мікроматриць, і знайти відповідність/невідповідність між експресією гена і білка, а також встановити порядок надійного аналізу для виявлення унікальних ідентифікуючих ознак для клітин, одержаних з тканини пуповини.

Клітини, одержані з тканини пуповини (чотири ізоляти), і фібробласти шкіри здорових людей (NHDF; новонародженої і дорослої людини) вирощували в ростовому середовищі, що містить пеніцилін/стрептоміцини, в покритих желатином флаконах T75. Мезенхімальні стовбурові клітини (MSC) вирощували в ростовому середовищі для мезенхімальних стовбурових клітин з набору Bullet (MSCGM; Cambrex, Walkersville, MD).

Для протоколу дослідження IL-8 клітини розморожували з рідкого азоту і висівали в покриті желатином флакони по 5000 клітин/см², вирощували протягом 48 годин в ростовому середовищі і потім вирощували ще протягом 8 годин в 10 мілілітрах середі, позбавленої сироватки [DMEM з низьким змістом глюкози (Gibco, Carlsbad, CA), пеніцилін/стрептоміцин (Gibco, Carlsbad, CA) і 0,1 % (мас./об.) бичачого сироваткового альбуміну (BCA; Sigma, St. Louis, MO)]. Після такої обробки екстрагували РНК і надосади центрифугували при 150×g протягом 5 хвилин, щоб видалити уламки клітин. Потім надосадки заморозували при -80 °C для аналізу ELISA.

Постнатальні клітини, одержані з пуповини, а також фібробласти людини, одержані з крайньої плоти новонароджених дітей, культивували в ростовому середовищі в покритих желатином флаконах T75. Клітини заморозували при пасажі 11 в рідкому азоті. Клітини розморожували і переносили в 15-мілілітрові центрифужні пробірки. Після центрифугування при 150×g протягом 5 хвилин надосад відкидали. Клітини ресуспендували в 4 мілілітрах культурального середовища і вважали. Клітини вирощували у флаконах 75 см, що містять 15 мілілітрів ростового середовища, по 375000 клітин/флакона протягом 24 годин. Середовище замінювали на середовище для голодування клітин без сироватки на 8 годин. Середовище для голодування без сироватки збирали в кінці інкубації, центрифугували при 14,000×g протягом 5 хвилин (і зберігали при -20 °C).

Щоб оцінити кількість клітин в кожному флаконі, в кожен флакон додавали 2 мілілітри трипсину/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Після відкріплення клітин від флакона активність трипсину нейтралізували, використовуючи 8 мілілітрів ростового середовища. Клітини переносили в 15-мілілітрову центрифужну пробірку і центрифугували при 150×g протягом 5 хвилин. Надосад видаляли і в кожен пробірку додавали 1 мілілітр ростового середовища, щоб ресуспендувати клітини. Кількість клітин оцінювали, використовуючи гемоцитометр.

Кількість IL-8, секретованого клітинами в середовище для голодування без сироватки, аналізували, використовуючи аналізи ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Всі аналізи здійснювали згідно з інструкціями, запропонованими виробником.

РНК екстрагували із злитих в моношар клітин, одержаних з тканини пуповини, і фібробластів або для дослідження експресії IL-8 з клітин, оброблених, як описано вище. Клітини лізували, використовуючи 350 мікролітрів буфери RLT, що містить бета-меркаптоетанол (Sigma, St. Louis, MO), згідно з інструкціями виробника (мінінабір RNeasy; Qiagen, Valencia, CA). РНК екстрагували згідно з інструкціями виробника (мінінабір RNeasy; Qiagen, Valencia, CA) і піддавали обробці ДНКазой (2,7 одиниць/зразка) (Sigma St. Louis, MO). РНК елювали, використовуючи 50 мікролітрів DEPC-оброблених води, і зберігали при -80 °C.

РНК також екстрагували з тканини пуповини людини. Тканина (30 міліграм) суспендували в 700 мікролітрах буфери RLT, що містить 2-меркаптоетанол. Зразки механічно гомогенізували і екстракцію РНК здійснювали згідно з інструкціями виробника. РНК екстрагували, використовуючи 50 мікролітрів DEPC-оброблених води, і зберігали при -80 °C. РНК зворотно транскрибували, використовуючи випадкові гексамери і реагенти для зворотної транскрипції TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA), при 25 °C протягом 10 хвилин, 37 °C протягом 60 хвилин і 95 °C протягом 10 хвилин. Зразки зберігали при -20 °C.

Гени, ідентифіковані з використанням мікроматриці кДНК як унікально регульовані в постнатальних клітинах (пізнавальні гени - включаючи гени рецептора окислених LDL, інтерлейкіну-8, реніну і ретикулону), додатково досліджували з використанням ПЛР в реальному часі і традиційній ПЛР.

ПЛР здійснювали на зразках кДНК, використовуючи продукти експресії генів Assays-on-Demand™: рецептора окислених LDL (Hs00234028); реніну (Hs00166915); ретикулону (Hs00382515); ліганду C CXC (Hs00171061); GCP-2 (Hs00605742); IL-8 (Hs00174103) і GAPDH (Applied Biosystems, Foster City, CA), які змішували з кДНК і універсальною основною сумішшю

для ПЛР TaqMan згідно з інструкціями виробника (Applied Biosystems, Foster City, CA), використовуючи систему виявлення 7000 послідовностей за допомогою комп'ютерної програми ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems, Foster City, CA). Умови термічного циклу спочатку являли собою 50 °C протягом 2 хвилин і 95 °C протягом 10 хвилин, потім 40 циклів 95 °C протягом 15 секунд і 60 °C протягом 1 хвилини. Дані ПЛР аналізували згідно з інструкціями виробника (User Bulletin №2, Applied Biosystems for ABI Prism 7700 Sequence Detection System).

Традиційну ПЛР здійснювали, використовуючи ABI PRISM 7700 (Perkin Elmer Applied Biosystems, Boston, Massachusetts, USA), щоб підтвердити результати ПЛР в режимі реального часу. ПЛР здійснювали, використовуючи 2 мікролітри розчини кДНК, 1× буфер для реакції ПЛР з універсальної суміші AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA) і початкову денатурацію при 94 °C протягом 5 хвилин. Ампліфікацію оптимізували для кожного набору праймерів. Для IL-8, ліганду С СХС і ретикулону (94 °C протягом 15 секунд, 55 °C протягом 15 секунд і 72 °C протягом 30 секунд, 30 циклів); для реніну (94 °C протягом 15 секунд, 53 °C протягом 15 секунд і 72 °C протягом 30 секунд, 38 циклів); для рецептора окислених LDL і GAPDH (94 °C протягом 15 секунд, 55 °C протягом 15 секунд і 72 °C протягом 30 секунд, 33 цикли). Праймери, що використовуються для ампліфікації, перераховані в таблиці 8. Концентрація праймерів в кінцевій реакції ПЛР становила 1 мікромоль, за винятком GAPDH, де вона становила 0,5 мікромоль. Праймери у випадку GAPDH були такими ж як для ПЛР в режимі реального часу, за винятком того, що зонд TaqMan виробника не додавали до кінцевої реакції ПЛР. Зразки розганяли в 2 % (мас. /об.) агарозному гелі і фарбували бромідом етидію (Sigma, St. Louis, MO). Зображення реєстрували, використовуючи плівку 667 Universal Twinpack (VWR International, South Plainfield, NJ), за допомогою поляроїдної камери з довгофокусним об'єктивом (VWR International, South Plainfield, NJ).

Таблиця 8

Використовувані праймери

Назва праймера	Назва праймера
Рецептор окислених LDL	S: 5'-GAGAAATCCAAAGAGCAAATGG-3' (SEQ ID N0:1)
	A: 5'-AGAATGGAAAAGCTGGAATAGG-3' (SEQ ID N0:2)
Ренін	S: 5'-TCTTCGATGCTTCGGATTCC-3' (SEQ ID N0:3)
	A: 5'-GAATTCTCGGAATCTCTGTTG-3' (SEQ ID N0:4)
Ретикулон	S: 5'-TTACAAGCAGTGCAGAAAACC-3' (SEQ ID N0:5)
	A: 5'-AGTAAACATTGAAACACAGCC-3' (SEQ ID N0:6)
Інтерлейкін-8	S: 5'-TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG-3' (SEQ ID N0:7)
	A: 5'-CTTCAAAAAGTTCTCCACAACC-3' (SEQ ID N0:8)
Ліганд 3 хемокіну (СХС)	S: 5'-CCCACGCCACGCTCTCC-3' (SEQ ID N0:9)
	A: 5'-TCCTGTCAGTTGGTGCTCC-3' (SEQ ID N0:10)

Клітини фіксували холодним 4 % (мас./об.) параформальдегідом (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Використовували один ізолят при пасажі 0 (РО) (безпосередньо після виділення) і два ізоляту при пасажі 11 (P11) і фібробласти (P11). іммуноцитохімію здійснювали, використовуючи антитіла, направлені проти наступних епітопів: віментину (1:500, Sigma, St. Louis, MO), десміну (1: 150; Sigma - одержаний проти кролячого білка; або 1:300; Chemicon, Temecula, CA одержаний проти мишачого білка), альфи-актину гладких м'язів (SMA; 1:400; Sigma), цитокератину 18 (CK18; 1:400; Sigma), чинник фон Віллебранда (vWF; 1:200; Sigma) і CD34 (CD34 людини, клас III; 1:100; DAKOCytomation, Carpinteria, CA). Крім того, тестували наступні маркери постнатальних клітин при пасажі 11: анти-GRO-альфа людини - PE (1:100; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), анти-GCP-2 людини (1:100; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), анти-рецептор 1 окислених LDL людини (ox-LDL R1; 1:100; Santa Cruz Biotech) і анти-NOGA-A людини (1:100; Santa Cruz, Biotech).

Культури промивали фосфатно-сольовим буфером (PBS) і витримували в блокуючому розчині білка, що містить PBS, 4 % (об./об.) сироватки кози (Chemicon, Temecula, CA) і 0,3 % (об./об.) тритона (тритон X-100; Sigma, St. Louis, MO) протягом 30 хвилин, щоб досягнути внутрішньоклітинних антигенів. У тому випадку, коли представляючий інтерес епітоп розташовувався на клітинній поверхні (CD34, ox-LDL R1), тритон X-100 виключали на всіх стадіях процесу, щоб запобігти втраті епітопів. Крім того, в тих випадках, коли перше антитіло було проти епітопів кози (GCP-2, ox-LDL R1, NOGA-A), використовували 3 % (об./об.) сироватку осла замість сироватки кози протягом всієї процедури. Потім перші антитіла, розбавлені в

буфері для блокування, вносили в культури на 1 годину при кімнатній температурі. Розчини перших антитіл видаляли і культури промивали PBS перед нанесенням розчинів другого антитіла (1 година при кімнатній температурі), що містять блок нарівні з антитілом кози проти IgG миші - техаським червоним (1:250; Molecular Probes, Eugene, OR) і/або антитілом кози проти IgG кролика - Alexa 488 (1:250; Molecular Probes) або антитілом осла проти IgG кози - ФІТЦ (1:150; Santa Cruz Biotech). Культури промивали, і наносили 10 мікролітрів DAPI (Molecular Probes) на 10 хвилин, щоб візуалізувати ядра клітин.

Після імунозафарбовування флуоресценцію візуалізували, використовуючи відповідний фільтр для флуоресценції, на інвертованому епіфлуоресцентному мікроскопі Olympus (Olympus, Melville, NY). У всіх випадках позитивне фарбування було представлене сигналом флуоресценції вище контрольного фарбування, коли використовували описаний вище спосіб повністю, за винятком нанесення розчину першого антитіла. Типові зображення вловлювали, використовуючи цифрову кольорову відеокамеру і комп'ютерну програму ImagePro (Media Cybernetics, Carlsbad, CA). У випадку тричі забарвлених зразків кожне зображення одержували, використовуючи тільки один емісійний фільтр, за один раз. Потім одержували пошаровий монтаж, використовуючи комп'ютерну програму Adobe Photoshop (Adobe, San Jose, CA).

Прикріплені у флаконах клітини промивали в фосфатно-сольовому буфері (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) і відчеплювали трипсином/EDTA (Gibco, Carlsbad, CA). Клітини збирали, центрифугували і ресуспендували в 3 % (об./об.) FBS в PBS при концентрації клітин 1×10^7 в мілілітрі. Аліквоти по сто мікролітрів розносили в конічні пробірки. Клітини, забарвлені у відношенні внутрішньоклітинних антигенів, пермеабілізували буфером Perm/Wash (BD Pharmingen, San Diego, CA). До аліквот додавали антитіло згідно з інструкціями виробника і клітини інкубували в темряві протягом 30 хвилин при 4 °C. Після інкубації клітини промивали PBS і центрифугували, щоб видалити надмірне антитіло. Клітини, у випадку яких було необхідне друге, ресуспендували в 100 мікролітрах 3 % FBS. Додавали друге антитіло згідно з інструкціями виробника і клітини інкубували в темряві протягом 30 хвилин при 4 °C. Після інкубації клітини промивали PBS і центрифугували, щоб видалити надмірне друге антитіло. Промиті клітини ресуспендували в 0,5 мілілітрах PBS і аналізували проточною цитометрією. Використовували наступні антитіла: до рецептору 1 окислених LDL (sc-5813; Santa Cruz, Biotech), GROα (555042; BD Pharmingen, Bedford, MA), IgG1 каппа миші (P-4685 і M-5284; Sigma), антитіло осла проти IgG кози (sc-3743; Santa Cruz, Biotech.). Проточно-цитометричний аналіз здійснювали на приладі FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Дані, одержані на основі ПЛР в режимі реального часу, аналізували способом $\Delta\Delta CT$ і виражали, використовуючи логарифмічну шкалу. Рівні експресії ретикулону і рецептора окислених LDL були вище в клітинах, одержаних з тканини пуповини, в порівнянні з іншими клітинами. Не виявлено значущих відмінностей в рівнях експресії ліганду 3 CXС і GСР-2 між клітинами, одержаними з післяпологової тканини, і контролями. Результати ПЛР в режимі реального часу були підтверджені традиційної ПЛР. Секвенування продуктів ПЛР додатково підтвердило одержані дані. Не виявлено значущої відмінності в рівні експресії ліганду 3 CXС між одержаними з післяпологової тканини клітинами і контролями при використанні праймерів ліганду 3 CXС для традиційної ПЛР, перерахованих вище.

Продукція цитокіну IL-8 в постнатальних клітинах була підвищена як в тих, що культивуються в ростовому середовищі, так і в тих, що голодують через нестачу сироватки клітинах, одержаних з післяпологової тканини. Все дані ПЛР в режимі реального часу підтверджували за допомогою традиційної ПЦП і секвенування продуктів ПЛР.

Коли досліджували надосади клітин, вирощених в бессироватковому середовищі відносно присутності IL-8, найбільші кількості виявлені в середовищах, одержаних від клітин пуповини і деяких ізолятів клітин плаценти (таблиця 9). Не виявлене IL-8 в середовищі, одержаному від фібробластів шкіри людини.

Таблиця 9

Кількість білка IL-8, виміряна в ELISA

Тип клітин	IL-8
Фібробласти людини	ND
Ізолят 1 із пуповини	2058,42 ± 144,67
Ізолят 2 із пуповини	2368,86 ± 22,73

Значення в пикограммах/миллион клітин, n=2, sem; ND = не визначали.

Клітини, одержані з тканини пуповини людини, пасажа 0 досліджували у відношенні продукції вибраних білків з використанням імуноцитохімічного аналізу. Відразу після виділення (пасажа 0) клітини фіксували 4 % параформальдегідом і піддавали впливу антитіл до шести білок: чинники фон Віллебранда, CD34, цитокератину 18, десмину, альфі-актину гладких м'язів і віментину. Клітини, одержані з тканини пуповини, були позитивними відносно альфі-актину гладких м'язів і віментину, при цьому картина фарбування зберігалася до пасажа 11.

Відповідність між рівнями експресії генів, виміряними з допомогою мікроматриці і ПЛР (як в режимі реального часу, так і традиційної), була встановлена для чотирьох генів: рецептора 1 окислених LDL, реніну, ретикулону і IL-8. Експресія вказаних генів диференційовано регулювалася на рівні мРНК в PPDC, при цьому IL-8 також диференційовано зазнавав регуляції на рівні білка. Клітини, одержані з тканини пуповини людини, пасажа 0 досліджували у відношенні експресії альфі-актину гладких м'язів і віментину, і клітини були позитивними в обох випадках. Картина фарбування зберігалася до пасажа 11.

ПРИКЛАД 6

Імунологічний оцінка *in vitro* одержаних з післяпологової тканини клітин

Одержані з післяпологової тканини клітини (PPDC) оцінювали *in vitro* відносно їх імунологічних властивостей, намагаючись передбачити імунологічну відповідь, якщо такий можливо, який такі клітини можуть викликати при трансплантації *in vivo*. PPDC аналізували проточною цитометрією відносно присутності HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 і B7-H2. Такі білки експресувались антигенпрезентуючими клітинами (APC) і був потрібен для безпосередньої стимуляції нативних CD4⁺-Т-клітин (Abbas and Lichtman, Cellular and Molecular Immunology, 5th Ed. (Saunders, Philadelphia, 2003; p. 171). Лінії клітин також аналізували проточною цитометрією відносно експресії HLA-G (Abbas and Lichtman, 2003, вище), CD 178 (Coumans, et al., Journal of Immunological Methods, 1999; 224: 185-196) і PD-L2 (Abbas and Lichtman, 2003, вище; Brown, et. al., The Journal of Immunology, 2003; 170: 1257-1266). Передбачають, що експресія таких білків клітинами, що знаходяться в тканинах плаценти, опосередковує імунопривілейований статус плацентарних тканин *in utero*. Щоб прогнозувати міру, з якої лінії клітин, одержані з тканин плаценти і пуповини, викликають імунну відповідь *in vivo*, лінії клітин тестували в однонаправленій реакції змішаних лімфоцитів (MLR).

Клітини культивували до злиття в ростовому середовищі, що містить пеніцилін/стрептоміцини, у флаконах T75 (Corning, Corning, NY), покритих 2 % желатином (Sigma, St. Louis, MO).

Клітини промивали фосфатно-сольовим буфером (PBS) (Gibco, Carlsbad, CA) і відчеплювали трипсином/EDTA (Gibco, Carlsbad, MO). Клітини збирали, центрифугували і ресуспендували в 3 % (об./об.) FBS в PBS в концентрації клітин 1×10⁷ в мілілітрі. Антитіло (таблиця 10) додавали до ста мікролітрів суспензії клітин згідно з інструкціями виробника і інкубували в темряві протягом 30 хвилин при 4 °C. Після інкубації клітини промивали PBS і центрифугували, щоб видалити непов'язане антитіло. Клітини ресуспендували в п'ятистах мікролітрах PBS і аналізували проточною цитометрією, використовуючи прилад FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Таблиця 10

Антитіла

Антитіло	Виробник	Номер в каталозі
HLA-DRDPDQ	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555558
CD80	BD Pharmingen (San Diego, CA)	557227
CD86	BD Pharmingen (San Diego, CA)	555665
B7-H2	BD Pharmingen (San Diego, CA)	552502
HLA-G	Abeam (Cambridgeshire, UK)	ab 7904-100
CD 178	Santa Cruz (San Cruz, CA)	sc-19681
PD-L2	BD Pharmingen (San Diego, CA)	557846
IgG2a миші	Sigma (St, Louis, MO)	F-6522
IgG1-каппа миші	Sigma (St, Louis, MO)	P-4685

Піддані кріоконсервації флакони з клітинами, одержаними з тканини пуповини, пасажа 10, які були помічені як клітинна лінія А, посилали на сухому льоду в CTBR (Senneville, Quebec) для проведення реакції змішаних лімфоцитів з використанням CTBR SOP No. CAC-031.

Мононуклеарні клітини периферичної крові (PBMC) збирали від численних добровільних донорів чоловічої і жіночої статі. Стимулюючи (донорні) алергенні PBMC, аутологічні PBMC і лінії постнатальних клітин обробляли мітоміцином С. Аутологічні і оброблені мітоміцином С стимулюючі клітини додавали до відповідаючим (реципієнтним) PBMC і культивували протягом 4 діб. Після інкубації в кожний зразок додавали [3H]-тимідин і культивували протягом 18 годин. Після збору клітин екстрагували радіоактивно мічену ДНК і включення [3H]-тимідину вимірювали, використовуючи сцинтиляційний лічильник.

Індекс стимуляції для алогенного донора (SIAD) обчислювали у вигляді середньої проліферації реципієнта плюс оброблений мітоміцином С алогенний донор, діленої на проліферацію реципієнта початкового рівня. Індекс стимуляції PPDC обчислювали у вигляді середнього значення проліферації реципієнта плюс оброблена мітоміцином С лінія постнатальних клітин, діленого на проліферацію реципієнта початкового рівня.

Проводили скринінг шести чоловік, добровільних донорів крові, щоб ідентифікувати одного алогенного донора, у випадку якого буде спостерігатися сильна відповідь у вигляді проліферації в реакції змішаних лімфоцитів з іншими п'ятьма донорами крові. Такого донора вибирали як алогенного позитивний контрольний донор. Інших п'ять донорів крові вибирали як реципієнти. Клітини алогенного позитивного контрольного донора і лінії клітин плаценти обробляли мітоміцином 3 і культивували в реакції змішаних лімфоцитів з клітинами п'яти окремих алогенних реципієнтів. Реакції здійснювали в трьох повторях, використовуючи дві чашки для культури клітин по троє реципієнта на чашку (таблиця 11). Середній індекс стимуляції був в діапазоні від 6,5 (чашка 1) до 9 (чашка 2), і для позитивних контролів алогенного донора від 42,75 (чашка 1) до 70 (чашка 2) (таблиця 12).

Таблиця 11

Дані реакції змішаних лімфоцитів – лінія клітин А (пуповина)

DPM для аналізу проліферації

Названі чашки: чашка 1								
Номер в аналізі	Система культивування	Повтори						
		1	2	3		Середнє	SD	CV
IM04-2478	Вихідний рівень проліферації реципієнта	1074	406	391		623,7	390,07	62,5
	Контроль автостимуляції (оброблені мітоміцином С аутологічні клітини)	672	510	1402		861,3	475,19	55,2
	Алогенний донор MLR IM04-2477 (оброблений мітоміцином С)	43777	48391	38231		43466,3	5087,12	11,7
	MLR з лінією клітин (оброблені мітоміцином С клітини типу А)	2914	5622	6109		4881,7	1721,36	35,3
SI (донор)						70		
SI (лінія клітин)						8		
IM04-2479	Вихідний рівень проліферації реципієнта	530	508	527		521,7	11,93	2,3
	Контроль автостимуляції (оброблені мітоміцином С аутологічні клітини)	701	567	1111		793,0	283,43	35,7
	Алогенний донор MLR IM04-2477 (оброблений мітоміцином С)	25593	24732	22707		24344,0	1481,61	6,1
	MLR з лінією клітин (оброблені мітоміцином С клітини типу А)	5086	3932	1497		3505,0	1832,21	52,3
SI (донор)						47		
SI (лінія клітин)						7		

DPM для аналізу проліферації

Названі чашки: чашка 1								
Номер в аналізі	Система культивування	Повтори						
		1	2	3		Середнє	SD	CV
IM04-2480	Вихідний рівень проліферації реципієнта	1192	854	1330		1125,3	244,90	21,8
	Контроль автостимуляції (оброблені мітоміцином C аутологічні клітини)	2963	993	2197		2051,0	993,08	48,4
	Алогенний донор MLR IM04-2477 (оброблений мітоміцином C)	25416	29721	23757		26298,0	3078,27	11,7
	MLR з лінією клітин (оброблені мітоміцином C клітини типу A)	2596	5076	3426		3699,3	1262,39	34,1
SI (донор)						23		
SI (лінія клітин)						3		
IM04-2481	Вихідний рівень проліферації реципієнта	695	451	555		567,0	122,44	21,6
	Контроль автостимуляції (оброблені мітоміцином C аутологічні клітини)	738	1252	464		818,0	400,04	48,9
	Алогенний донор MLR IM04-2477 (оброблений мітоміцином C)	13177	24885	15444		17835,3	6209,52	34,8
	MLR з лінією клітин (оброблені мітоміцином C клітини типу A)	4495	3671	4674		4280,0	534,95	12,5
SI (донор)						31		
SI (лінія клітин)						8		

Названі чашки: чашка 2

Номер в аналізі	Система культивування	Повтори						
		1	2	3		Середнє	SD	CV
IM04-2482	Вихідний рівень проліферації реципієнта	432	533	274		413,0	130,54	31,6
	Контроль автостимуляції (оброблені мітоміцином C аутологічні клітини)	1459	633	598		896,7	487,31	54,3
	Алогенний донор MLR IM04-2477 (оброблений мітоміцином C)	24286	30823	31346		28818,3	3933,82	13,7
	MLR з лінією клітин (оброблені мітоміцином C клітини типу A)	2762	1502	6723		3662,3	2724,46	74,4
SI (донор)						70		
SI (лінія клітин)						9		
IM04-2477 алогенний донор	Вихідний рівень проліферації реципієнта	312	419	349		360,0	54,34	15,1
	Контроль автостимуляції (оброблені мітоміцином C аутологічні клітини)	567	604	374		515,0	123,50	24,0
Лінія клітин типу A	Вихідний рівень проліферації реципієнта	5101	3735	2973		3936,3	1078,19	27,4
	Контроль автостимуляції (оброблені мітоміцином C аутологічні клітини)	1924	4570	2153		2882,3	1466,04	50,9

Таблиця 12

Середній індекс стимуляції клітин, одержаних із тканини пуповини, і алогенного донора в змішаній реакції лімфоцитів з п'ятьма окремими алогенними реципієнтами

Средний индекс стимуляции

	Реципієнт	Пуповина
Чашка 1 (реципиенти 1-4)	42,75	6,5
Чашка 2 (реципиент 5)	70	9

- 5 Гістограми клітин, одержаних з тканини пуповини, які аналізували проточної цитометрією, показали негативну експресію HLA-DR, DP, DQ, CD80, CD86 і B7-H2, як виявлено на основі значення флуоресценції, відповідного IgG-контролю, що свідчить про те, що в лініях клітин пуповини відсутні молекули клітинної поверхні, необхідні для прямої стимуляції Т-клітин CD4⁺.
- 10 Гистограмми клітин, одержаних з тканини пуповини, які аналізували проточної цитометрією, показали позитивну експресію PD-L2, що виявлено на основі підвищеного значення флуоресценції в порівнянні з IgG-контролем, і негативну експресію CD178 і HLA-G, що виявлено на основі значення флуоресценції, відповідного IgG-контролю.

- 15 У реакціях змішаних лімфоцитів, проведених з лініями клітин, одержаних з тканини пуповини, середній індекс стимуляції був в діапазоні від 6,5 до 9, а індекс стимуляції у випадку алогенних позитивних контролів був в діапазоні від 42,75 до 70. Лінії клітин, одержаних з тканини пуповини, були негативними відносно експресії стимулюючих білків HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80, CD86 і B7-H2, як було виміряно з використанням проточної цитометрії. Лінії клітин, одержаних з тканини пуповини, були негативними відносно експресії імунomodуючих білків HLA-G і CD178 і позитивними відносно експресії PD-L2, як виміряно з використанням проточної цитометрії. PBMC алогенного донора містять антигенпрезентуючі клітини, що
- 20 експресують HLA-DR, DQ, CD8, CD86 і B7-H2, тим самим забезпечуючи можливість стимуляції нативних Т-клітин CD4⁺. Відсутність молекул клітинної поверхні антигенпрезентуючих клітин на

клітинах плаценти і клітинах, одержаних з тканини пуповини, які необхідні для прямої стимуляції нативних Т-клітин CD4⁺ і присутність PD-L2, імуномодуючого білка, можуть пояснювати низький індекс стимуляції, що спостерігається у випадку таких клітин в MLR в порівнянні з алогенними контролями.

5 ПРИКЛАД 7

Секреція трофічних чинників клітинами, одержаними з тканини пуповини

Вимірювали секрецію вибраних трофічних чинників з клітин, одержаних з тканини пуповини.

Для виявлення були вибрані наступні чинники: (1) чинники, які, як відомо, володіють ангіогенною активністю, такі як чинник росту гепатоцитів (HGF) (Rosen et al., Ciba Found. Symp., 1997; 212: 215-26), хемотаксичний білок 1 моноцитів (MCP-1) (Salcedo et al., Blood, (2000; 96: 34-40), інтерлейкін-8 (IL-8) (Li et al., J. Immunol., 2003; 170: 3369-76), чинник росту кератиноцитів (KGF), основний чинник росту фібробластів (bFGF), ендотеліальний чинник росту судин (VEGF) (Hughes et al., Ann. Thorac. Surg., 2004; 77: 812-8), металлопротеїназа 1 матриксу (TIMP1), ангіопоетин 2 (ANG2), одержаний з тромбоцитів чинник росту (PDGF-bb), тромбопоетин (TPO), гепарин-зв'язуючий епідермальний чинник росту (HB-EGF), чинник 1 альфа, одержаний з стромы (SDF-1-альфа); (2) чинники, які, як відомо, володіють нейротрофічною/нейрозащитною активністю, такі як одержаний з головного мозку нейротрофічний чинник (BDNF) (Cheng et al, Dev. Biol., 2003; 258: 319-33), інтерлейкін-6 (IL-6), хемотаксичний білок 2 гранулоцитів (GCP-2), що трансформує чинник росту бета 2 (TGFbeta2); і (3) чинники, які, як відомо, володіють активністю хемокинів, такі як запальний білок 1 альфа макрофагів (MIP1a), запальний білок 1 бета макрофагів (MIP1b), хемоатрактант 1 моноцитів (MCP-1), Rantes (регульовані при активації, що експресуються і секретуються нормальними Т-клітинами), 1309, регульований тимусом і активацією хемокин (TARC), еотаксин, одержаним з макрофагів хемокин (MDC), IL-8).

Клітини з пуповини, а також фібробласти людини, одержані з крайньої плоти новонароджених дітей, культивували в ростовій середовищі з пеніциліном/стрептоміцином в покритих желатином флаконах T75. Клітини піддавали кріоконсервації при пасажі 11 і зберігали в рідкому азоті. Після розмороження клітин до клітин додавали ростове середовище і потім переносили в центрифужну пробірку об'ємом 15 мілілітрів і центрифугували клітини при 150×g протягом 5 хвилин. Надосад відкидали. Осад клітин ресуспендували в 4 мілілітрах ростового середовища і підраховували клітини. Клітини висівали по 375000 клітин/флакона 75 см², що містить 15 мілілітрів ростового середовища, і культивували протягом 24 годин. Середовище замінювали на безсироваткове середовище (DMEM з низьким вмістом глюкози (Gibco), 0,1 % (мас. /об.) бичачого сироваткового альбуміну (Sigma), пеніцилін/стрептоміцин (Gibco)) на 8 годин. Кондиціоновану безсироваткове середовище збирали в кінці інкубації центрифугуванням при 14000×g протягом 5 хвилин і зберігали при -20 °C. Щоб оцінити кількість клітин в кожному флаконі, клітини промивали PBS і відчеплювали, використовуючи 2 мілілітри трипсину/EDTA. Активність трипсину інгібували додаванням 8 мілілітрів ростового середовища. Клітини центрифугували при 150×g протягом 5 хвилин. Надосад видаляли і клітини ресуспендували в 1 мілілітрі ростового середовища. Кількість клітин оцінювали, використовуючи гемоцитометр.

Клітини вирощували при 37 °C в середовищі з 5 % діоксиду вуглецю і атмосферному кисні. Одержані з плаценти клітини (партія 101503) також вирощували в середовищі з 5 % кисню або з бета-меркаптоетанолом (BME). Кількість MCP-1, IL-6, VEGF, SDF-1 альфа, GCP-2, IL-8 і TGF-бета 2, що продукуються кожним зразком клітин, вимірювали в аналізі ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Всі аналізи здійснювали згідно з інструкціями виробника.

Хемокини (MIP1a, MIP1b, MCP-1, Rantes, 1309, TARC, еотаксин, MDC, IL8), BDNF і ангіогенні чинники (HGF, KGF, bFGF, VEGF, TIMP1, ANG2, PDGF-bb, TPO, HB-EGF) вимірювали, використовуючи протеомні матриці SEARCHLIGHT® (Pierce Biotechnology Inc.). Протеомні матриці являють собою мультиплексні ELISA типу "сендвіч" для кількісного вимірювання від двох до 16 білків на ямку. Матриці одержували нанесенням плям у вигляді картини 2×2, 3×3 або 4×4 від чотирьох до 16 різних уловлюючих антитіл в кожному ямку 96-ямкового планшета. Після здійснення ELISA типу "сендвіч" весь планшет візуалізували, вловлюючи хемілюмінесцентний сигнал, що генерується в кожній плямі в кожній ямці планшета. Кількість сигналу, що генерується в кожній плямі, пропорційна кількості білка-мішені в вихідному стандарті або зразку.

MCP-1 і IL-6 секретувались клітинами, одержаними з тканини пуповини, і фібробластами шкіри (таблиця 13). SDF-1-альфа секретувався фібробластами. GCP-2 і IL-8 секретувались клітинами, одержаними з тканини пуповини, що культивуються в присутності BME або 5 % O₂. GCP-2 також секретувався фібробластами людини. TGF-бета 2 не виявляли в аналізі ELISA.

Таблиця 13

Результати аналізу ELISA

	MCP-1	IL-6	VEGF	SDF-1 α	GCP-2	IL-8	TGF-бета2
Фібробласт	17 \pm 1	61 \pm 3	29 \pm 2	19 \pm 1	21 \pm 1	ND	ND
Пуповина (022803)	1150 \pm 74	4234 \pm 289	ND	ND	160 \pm 11	2058 \pm 145	ND
Пуповина (071003)	2794 \pm 84	1356 \pm 43	ND	ND	2184 \pm 98	2369 \pm 23	ND

Значення наведені в пікограмах/мілілітр/мільон клітин (n=2, sem); ND = не визначали

5 TIMP1, TPO, KGF, HGF, FGF, HBEGF, BDNF, MIP1b, MCP1, RANTES, 1309, TARC, MDC і IL-8 секретувались із клітин, одержаних із тканини пуповини (таблиці 14 і 15). Ang2, VEGF або PDGF-bb не виявляли.

Таблиця 14

Результати мультиплексного аналізу ELISA SearchLight®

	TIMP1	ANG2	PDGFbb	TPO	KGF	HGF	FGF	VEGF	HBEGF	BDNF
Hfb	19306,3	ND	ND	230,5	5,0	ND	ND	27,9	1,3	ND
U1	57718,4	ND	ND	1240,0	5,8	559,3	148,7	ND	9,3	165,7
U3	21850,0	ND	ND	1134,5	9,0	195,6	30,8	ND	5,4	388,6

hFB = фібробласти людини, U1 = клітини, одержані із тканини пуповини (022803), U3 = клітини, одержані із тканини пуповини (071003), ND = не визначали.

Таблиця 15

Результати мультиплексного аналізу ELISA SearchLight®

	MIP1a	MIP1b	MCP1	RANTES	1309	TARC	Eotaxin	MDC	IL8
hFB	ND	ND	39,6	ND	ND	0,1	ND	ND	204,9
PI	79,5	ND	228,4	4,1	ND	3,8	12,2	ND	413,5
UI	ND	8,0	1694,2	ND	22,4	37,6	ND	18,9	51930,1
P3	ND	ND	102,7	ND	ND	0,4	ND	ND	63,8
U3	ND	5,2	2018,7	41,5	11,6	21,4	ND	4,8	10515,9

hFB = фібробласти людини, U1 = клітини, одержані із тканини пуповини (022803), U3 = клітини, одержані із тканини пуповини (071003), ND = не визначали.

10 Клітини, одержані з тканини пуповини, секретували декілька дуже корисних трофічних чинників. Деякі з таких трофічних чинників, такі як TIMP1, катаболічний інгібітор, грають важливу роль в запобіганні руйнуванню позаклітинного матриксу металлопротеїназами матриксу. HGF, bFGF, MCP-1 і IL-8 грають важливу роль в забезпеченні функцій, пов'язаних з життєздатністю клітин і диференціюванням клітин. Інші трофічні чинники, такі як BDNF і IL-6, грають важливі ролі в регенерації нервів.

15 ПРИКЛАД 8

Інгібування IFN-гамма-індукованої експресії HLA-DR, DP, DQ в клітинах людини, що розмножуються, одержаних з тканини пуповини, інгібіторами HMG-CoA-редуктази

20 Розмножати в культурі клітини людини, одержані з тканини пуповини (022803 P4), висівали в 6-ямкові чашки для культури тканини і культивували в модифікованому Дульбекко середовищі Ігла (DMEM) з низьким вмістом глюкози, що містить 15 % фетальної бичачої сироватки (FBS), пеніцилін/стрептоміцин (P/S), бета-меркаптоетанол (BME), приблизно до злиття на 70 %. Потім клітини обробляли середовищем, що містить 10 мкМ відповідного інгібітора HMG-CoA-редуктази (симвастатинова кислота (Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland), приготованого у вигляді 10 мМ початкових реагентів в ДМСО) або наповнювач ДМСО - 0,1 % (Sigma, St. Louis, MO), і інкубували протягом ночі. Середовище видаляли аспірацією і замінювали середовищем,

що містить 500 одиниць/мл rhIFN-гамма (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ) і 10 мкМ відповідного інгібітора HMG-CoA-редуктази, і інкубували протягом 3 діб. На третій день клітини збирали з використанням трипсину.

- 5 Зібрані клітини промивали один раз PBS і ресуспендували в 100 мкл 3 % FBS в PBS з 20 мкл ФІТЦ-міченого HLA-DR, DP, DQ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) або ФІТЦ-міченого IgG-антитіла (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) і інкубували протягом однієї години. Клітини промивали один раз в PBS і ресуспендували в 500 мкл PBS і аналізували в проточному цитометрі FACSCalibur (BS Biosciences, Franklin Lakes, NJ).

Таблиця 16

Експресія HLA-DR, DP, DQ в hUTC, яку вимірювали у вигляді значень інтенсивності флуоресценції ФІТЦ після попередньої обробки інгібітором HMG-CoA-редуктази і додаткової обробки запальним цитокином IFN-гамма

Обробка інгібітором HMG-CoA-редуктази	Контроль IgG		Оброблені IFN-гамма		Без обробки цитокином	
	Середнє	Стандартне відхилення	Середнє	Стандартне відхилення	Середнє	Стандартне відхилення
Необроблені	4,88	5,12	274,23	219,04	5,56	8,97
Контроль 0,1 % наповнювач ДМСО	4,09	5,67	294,08	257,08	5,54	5,46
Симвастатин	4,4	2,38	5,57	3,98	5,66	3,25

10

Як показано в таблиці 16, в необроблених і контрольних оброблених 0,1 % наповнювачем ДМСО клітинах людини, одержаних з тканини пуповини, інкубованих із запальним цитокином IFN-гамма, спостерігали збільшення експресії HLA-DR, DP, DQ, що видно по підвищеній флуоресценції, що виявляється проточною цитометрією. Клітини людини, одержані з тканини

15

пуповини, попередньо оброблені інгібітором HMG-CoA-редуктази і потім інкубовані з IFN-гамма, мали експресію HLA-DR, DP, DQ, схожу з експресією в необроблених і оброблених наповнювачем контролях.

20

ПРИКЛАД 9

Ефективність клітин людини, одержаних з тканини пуповини (hUTC), в кролячій моделі дегенерації міжхребетних дисків

25

Дослідження проводили для того, щоб визначити, чи ефективні клітини, одержані з пуповини людини (hUTC), в кролячій моделі дегенерації міжхребетних дисків (IVD). Клітини ін'єктували в місце пошкодження, і розміри диска оцінювали за допомогою рентгенівської візуалізації. Аналіз тканини здійснювали при некропсії.

30

Щоб оцінити вплив клітин, одержаних з тканини пуповини людини (hUTC), на дегенерацію міжхребетних дисків (IVD), hUTC ін'єктували в порушений прокол IVD. Два рази в тиждень проводили рентгенівський аналіз і аналізували зміну висоти диска в порівнянні з пошкодженим обробленим наповнювачем контролем. Обробка hUTC приводила до збільшення висоти диска, а також підвищеної швидкості відновлення в порівнянні з обробленими наповнювачем контролями.

35

Створення моделі дегенерації диска: Самиць кроликів NZW 6-місячного віку вибирали без якої-небудь системи. Тварин мітили і зважували перед набором в експеримент і відразу після розкриття. Кролики одержували глікопіролат (від 0,01 до 0,02 мг/кг SQ) перед впливом седативного засобу, щоб зменшити рототрахеальну секрецію і зменшити брадикардію, асоційовану з анестезією. Бупренорфін (бупренорфін•HCl, 0,03 мг/кг) давали перед операцією як попереджаючий анальгетик. Кроликів анестезували введенням гідрохлориду кетаміну (25 мг/кг) і малеату ацепромазину (1 мг/кг, 10 мг/мл), щоб полегшити ендотрахеальну інтубацію. Передопераційне рентгенівське дослідження проводили для одержання контролю початкового рівня. Дозу ксилазину 5 мг/кг вводили підшкірно або внутрішньом'язово після завершення передопераційної радіографії. Тварин підтримували на інгаляції ізофлураном (індукція при 2-3 % і підтримка при 0,5-2 %).

40

45

Кроликів (масою 3,5 кг) вміщували в положенні лежачи на боку. Після попередньої підготовки і обкладення серветками оголяли поперекові IVD, використовуючи задньобоківу заочеревинний доступ, за допомогою тупого відділення поперекового м'яза. Оголяли передні поверхні трьох послідовних люмбальних IVD (L2/3, L3/4 і L4/5). Використовуючи голку калібру

18G з обмежувальним пристроєм, який дозволяє голці дійти до глибини 5 мм, проколювали фіброзне кільце у вентральном напрямі, входячи в драглисте ядро на рівнях L2/3 і L4/5. Дужку для судин і лігатуру накладали на поперековий м'яз на рівні L3/4 як маркери. Хірургічну рану, що утворилася, відновлювали пошарово. Шкіру закривали, використовуючи дужки.

Після операції робили післяопераційний рентгенівський знімок, щоб підтвердити рівень проколу. Мелоксикам вводили перорально в дозі 1,5 мг (за день до операції і через 2-3 дні після операції). Анальгетик (бупренорфін•HCl 0,01-0,03 мг/кг) давали при необхідності двічі в добу протягом 2-3 діб на основі консультацій з ветеринарами. Після відновлення від анестезії кроликів повертали в їх клітини і забезпечували рухливість *ad libitum*. На кроликах використовували корсети для кроликів, щоб перешкодити тому, щоб вони мали доступ і пошкодили/розкрили хірургічний розріз і зняли дужки.

Оцінка обробок: Через чотири тижні після початкової операції (проколу кільця) здійснювали схожу хірургічну процедуру з протилежної сторони, щоб уникнути кровотечі з шраму, утвореного внаслідок першої операції. Після підтвердження хірургічної дегенерації дисків за допомогою рентгенографії і візуального огляду, ін'єктували PBS, 1000000 або 100000 клітин всередину дисків в область драглистого ядра з допомогою мікрошприца і з використанням голки 28G і на рівні L2/3 і на рівні L4/5 для кожного кролика. L3/4 залишали як контроль без проколу і без обробки. Після загоєння хірургічної рани кроликів повертали в їх клітини і піддавали ретельному спостереженню. Як описано раніше, на протязі трьох діб вводили антибіотик і анальгетик. Кожний кролик одержував 1,5 мг мелоксикаму перорально (за день до операції і через 2-3 дні після операції). Ретельно стежили за поведінкою, апетитом і зміною маси тіла, і ветеринарні лікарі і дослідники контролювали післяопераційний стрес.

Всі речовини для ін'єкцій готували в стерильних умовах. У даному дослідженні використовували очищений для досліджень hUTC (партія Q030306), який оцінювали на стерильність, мікоплазму, каріотип і патогени. Клітини, що зберігалися в криогенних умовах, швидко розморожували і розбавляли в PBS. Клітини центрифугували і надосад видаляли. Клітини ресуспендували в PBS і підраховували, щоб одержати кінцеву концентрацію клітин або 100000, або 10000 клітин в мікролітрі. Для оцінки життєздатності використовували трипановий синій. Десять мікролітрів клітин набирали в попередньо простерилізовані мікрошприци і ін'єктували в IVD, як описано вище.

На 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 і 16 тижні після проколу і після умертвлення через 16 тижнів після проколу робили рентгенівські знімки, щоб виміряти висоту IVD, після введення гідрохлориду кетаміну (25 мг/кг) і малеату ацепромазину (1 мг/кг).

Через 16 тижнів після початкового проколу кільця [що відповідає 12 тижні після ін'єкції (клітин)], вісім кроликів в кожній групі анестезували гідрохлоридом кетаміна (25 мг/кг) і малеатом ацепромазину (1 мг/кг) і піддавали евтаназії з використанням надмірної дози пентобарбіталу (90 мг/кг, Euthanasia B solution: Henry Schein Inc., Melville, NY).

Рентгенівські плівки, одержані до проколу, в кожній тимчасовій точці після проколу і при евтаназії відцифровували і вимірювали висоту тіл хребців і висоту дисків. Висоту IVD виражали у вигляді DHI згідно з опублікованими способами (Chujo et al., Spine, 2006; 31:2909-17; Masuda et al., Spine, 2006; 31: 742-54). Ортопед сліпим способом відносно груп обробки незалежно інтерпретував всі рентгенівські знімки. Відцифровані рентгенівські дані, вимірювання, включаючи висоту тіл хребців і висоту IVD, аналізували, використовуючи звичайну програму для комп'ютерної програми MATLAB (Natick, MA). Дані переводили в програму Excel і висоту IVD виражали у вигляді індексу висоти дисків ($DHI = \text{висота IVD} / \text{висота сусіднього до IVD тіла}$) на основі способу, описаного в Lu et al., Spine, 22: 1828-34 (1997), з невеликою модифікацією. Середню висоту IVD (DHI) обчислювали усередненням вимірювань, одержаних для передньої, середньої і задньої частин IVD і розподілом одержаного середнього значення на середнє значення висоти сусіднього тіла хребця. % DHI одержували як (післяопераційний DHI/доопераційний DHI) (100. Крім того, %DHI нормалізували, використовуючи рівень L3/4 як контрольний рівень. Нормалізований % DHI = (%DHI на експериментальному рівні/%DHI на рівні L3/4) (100. Також обчислювали швидкість відновлення таким чином: $(\% DHI \text{ (часова точка)} - \% DHI \text{ (4W [прокол])}) / (100 - \% DHI \text{ (4W [прокол])})$).

Значущість відмінностей в середніх значеннях за даними вимірювань на рентгенівських знімках аналізували з використанням двофакторного ANOVA для багаторазових вимірювань або однофакторного ANOVA і PLSD Фішера як апостеріорний критерій. Всі дані виражали у вигляді середнього значення \pm стандартна помилка. Статистичний аналіз здійснювали, використовуючи пакет програм Statview (версія 5.0, SPSS, Chicago, IL) з рівнем значущості $p < 0,05$.

Індекс висоти дисків оцінювали два рази в тиждень, як описано вище. Диски з дефіцитом менше за 10 % виключали з дослідження. Дані (показані в таблиці 17) свідчать, що висота дисків збільшувалася у випадку дози hUTC 100000 клітин і зменшувалася у випадку дози 1000000 клітин в порівнянні з контролем в період з 2 по 12 тиждень після трансплантації (6-16 тижні після проколу) ($p < 0,05$ hUTC (1000000) в порівнянні з hUTC (100000) на 2, 4, 6 і 14 тижнях після трансплантації; $p < 0,01$ на 8 тижні після трансплантації).

Таблиця 17

Вплив hUTC на висоту дисків

Висота дисків (%)	0	2	4	6	8	10	12	14	16
	Pre-OP	2W-P	4W-P	2W	4W	6W	8W	10W	12W
Контроль	100,0	79,4	79,3	78,9	79,5	78,5	77,1	74,8	78,5
Контроль-SE	0,0	3,2	2,8	2,1	2,6	3,4	4,6	3,6	2,0
1.00E+06	100,0	76,6	76,6	74,8	74,6	72,7	70,8	74,4	72,9
SE	0,0	2,2	1,5	2,1	1,8	2,1	1,4	1,8	2,8
1.00E+05	100,0	84,8	76,6	83,7	83,8	81,3	86,0	82,4	82,2
SE	0,0	1,7	2,6	2,7	3,3	1,9	3,1	4,2	3,8

Дані по відновленню вимірювали як описано вище. Диски з дефіцитом менше 10 % виключали з дослідження. Дані (показані в таблиці 18) свідчать, що швидкість відновлення зростала у випадку дози hUTC 100000 і знижувалася у випадку дози 1000000 в порівнянні з контролем в період з 2 по 12 тиждень після трансплантації (6-16 тижні після проколу) ($p < 0,05$ контроль в порівнянні з hUTC (100000 клітин) на 2 і 14 тижнях після трансплантації; $p < 0,01$ на 12 тижні після трансплантації).

Таблиця 18

Вплив hUTC на швидкість відновлення (%)

Швидкість відновлення (%)	0	2	4	6	8	10	12	14	16
	Pre-OP	2W-P	4W-P	2W	4W	6W	8W	10W	12W
Контроль	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,1	-0,1	-0,1	-0,3	-0,2
Контроль-SE	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2
1.00E+06 %	0,0	0,0	0,0	-0,1	-0,1	-0,2	-0,3	-0,1	-0,2
SE	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
1.00E+05 %	0,0	0,0	0,0	0,3	0,2	0,1	0,4	0,3	0,3
SE	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1

Таким чином, вплив hUTC на дегенерацію IVD оцінювали в кролячій моделі дегенерації IVD за допомогою ін'єкції hUTC в проколений IVD в дозі 1000000 і 100000 клітин/ін'єкції. Два рази в тиждень одержували рентгенівські знімки і аналізували зміну висоти дисків в порівнянні з необробленим проколом контролем. Дані свідчать, що обробка hUTC в концентрації 100000 приводила до збільшення висоти дисків, при цьому обробка в концентрації 1000000 зменшувала висоту дисків в порівнянні з PBS-обробленим контролем (таблиця 17). Додатковий аналіз даних виявив, що швидкість відновлення (кількість відновлення/загального зниження нормалізованого %DHI) дисків, оброблених hUTC (100000) була вищою, ніж швидкість відновлення в контролі (таблиця 18).

ПРИКЛАД 10

Експресія білків позаклітинного матриксу клітинами, одержаними з тканини пуповини людини, in vitro

Дослідження проводили для того, щоб визначити міру експресії трьох білків позаклітинного матриксу: агрегану, колагену I і колагену II клітинами hUTC in vitro. Клітини тестували окремо і після стимуляції трофічними чинниками TGF-бета, GDF-5 і PDGF-BB.

Культури клітин, одержаних з тканини пуповини людини (hUTC; партія 120304), підтримували в культурі в стандартних умовах. Коротко, клітини висівали по 5000 клітин на квадратний сантиметр в Т-флакони з перенесенням і пересівали кожні 3-4 дні. Клітини для експеримента з використанням трофічних чинників, брали в альгінатні кульки і обробляли чинниками в стандартному ростовому середовищі. У культури додавали аскорбінову кислоту в

концентрації 100 мкг/мл. Тестували наступні чинники: PDGF-BB в концентрації 10 нг/мл, TGF-бета-1 в концентрації 5 нг/мл і GDF-5 в концентрації 200 нг/мл. Створювали п'ять груп обробки: hUTC окремо, hUTC з GDF-5, hUTC з TGF-бета 1, hUTC з PDGF-BB і hUTC з TGF-бета 1 і GDF-5.

5 Через 2 тижні культивування клітини вивільняли з альгінату, промивали, осаджували і заморожували. Виділяли РНК і здійснювали зворотну транскрипцію, щоб одержати кДНК. Зразки аналізували з використанням ПЛР в режимі реального часу відносно експресії агрекану, колагену типу I і типу II.

10 Результати аналізу ПЛР в режимі реального часу показують експресію в п'яти різних умовах культивування. Результати наведені в таблиці 19 і виражені у вигляді відносної експресії до експресії в hUTC без обробки чинниками росту. У культурах, оброблених PDGF-BB і GDF-5 з TGF-бета 1, спостерігали порівнянну експресію агрекану, колагену I і колагену II. У клітинах, оброблених TGF-бета 1, спостерігали деяку індукцію колагену I і колагену II і агрекану приблизно в 10-20 раз. Найбільшу індукцію спостерігали у випадку обробки GDF-5. У клітинах спостерігали приблизно 50-кратне збільшення експресії агрекану і колагену type I і більш ніж 300-кратне збільшення експресії колагену типу II.

Таблиця 19

Експресія білків позаклітинного матриксу клітинами hUTC in vitro

	Відповідна мРНК		
	Агрекан	Колаген I	Колаген II
hUTC	1	1	1
hUTC+GDF-5	56	45	387
hUTC+GDF-5/TGF бета	1	1	113
hUTC+PDGF	1	<1	<1
hUTC+TGF бета	23	7	13

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> BROWN, LAURA
GOSIEWSKA, ANNA
KIHM, ANTHONY J.
KRAMER, BRIAN

<120> ЛІКУВАННЯ ДЕГЕНЕРАЦІЇ МІЖХРЕБЕТНИХ ДИСКІВ З ВИКОРИСТАННЯМ КЛІТИН,
ОДЕРЖАНИХ ІЗ ТКАНИНИ ПУПОВИНИ ЛЮДИНИ

<130> 026038.0224PTUS

<140>

<141>

<150> 61/016,849

<151> 2007-12-27

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний праймер

<400> 1

gagaaatcca aagagcaaat gg

22

<210> 2

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний праймер

<400> 2

agaatggaaa actggaatag g

21

<210> 3

<211> 20

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний праймер

<400> 3

tcttcgatgc ttcggattcc

20

<210> 4

<211> 21

<212> ДНК

<213> Штучна послідовність

<220>

<210> 10
 <211> 19
 <212> ДНК
 <213> Штучна послідовність

 <220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний праймер

 <400> 10
 tcctgtcagt tgggtgctcc

19

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Спосіб лікування захворювання або стану, пов'язаного з дегенерацією міжхребцевих дисків, який включає введення клітин, одержаних з тканини пуповини людини, в міжхребцевий диск в кількості, ефективній для лікування захворювання або стану, при цьому тканина пуповини по суті не містить крові, і при цьому клітини здатні до самопідтримування і розмноження в культурі і
- 10 2. Спосіб за п. 1, в якому клітини мають щонайменше наступні характерні ознаки:
 - а) експресують рецептор 1 окислених ліпопротеїдів низької густини, ретикулон, ліганд 3 рецептора хемокіну і/або хемотаксичний білок 2 гранулоцитів;
 - б) не продукують CD31, CD34 і HLA-DR;
 - в) в порівнянні з фібробластом, мезенхімальною стовбуровою клітиною або клітиною кісткового
- 15 3. Спосіб за п. 1, в якому клітини експресують CD10, CD13, CD44, CD73 і CD90.
4. Спосіб за п. 1, в якому клітини вводять шляхом ін'єкції.
5. Спосіб за п. 1, в якому клітини вводять інкапсульованими в пристрій, що імплантується.
6. Спосіб за п. 1, в якому клітини вводять шляхом імплантації матриксу, що містить клітини.
- 20 7. Спосіб за п. 1, в якому клітини вводять щонайменше з одним іншим типом клітин.
8. Спосіб за п. 7, в якому щонайменше один інший тип клітин вводять одночасно або до, або після введення клітин, одержаних з тканини пуповини людини.
9. Спосіб за п. 7, в якому щонайменше один інший тип клітин конструюють так, щоб вони експресували щонайменше один продукт екзогенного гена.
- 25 10. Спосіб за п. 9, в якому продуктом екзогенного гена є трофічний чинник.
11. Спосіб за п. 9, в якому продукт екзогенного гена модулює експресію одного або декількох білків позаклітинного матриксу.
12. Спосіб за п. 1, в якому клітини вводять разом щонайменше з одним засобом.
13. Спосіб за п. 12, в якому щонайменше один засіб вводять одночасно, до або після введення
- 30 клітин, одержаних з тканини пуповини людини.
14. Спосіб за п. 12, в якому щонайменше один засіб являє собою трофічний чинник.
15. Спосіб за п. 14, в якому трофічний чинник вибраний з групи, що складається з: TGF-бета, GDF-5, PDGF-BB і TIMP1.
16. Спосіб за п. 14, в якому трофічний чинник здійснює трофічну дію на клітини, одержані з
- 35 тканини пуповини людини.
17. Спосіб за п. 16, в якому трофічна дія включає підвищення експресії одного або декількох білків позаклітинного матриксу.
18. Спосіб за п. 1, в якому клітини вводять в підданий дегенерації міжхребцевий диск.
19. Спосіб за п. 18, в якому клітини вводять в драглисте ядро міжхребцевого диска.
- 40 20. Спосіб за п. 18, в якому клітини вводять в фіброзне кільце міжхребцевого диска.
21. Спосіб за п. 1, в якому клітини конструюють так, щоб вони експресували щонайменше один продукт екзогенного гена.
22. Спосіб за п. 21, в якому продуктом екзогенного гена є трофічний чинник.
23. Спосіб за п. 21, в якому продукт екзогенного гена модулює експресію одного або декількох
- 45 білків позаклітинного матриксу.
24. Спосіб за п. 1, в якому клітини, одержані з тканини пуповини, мають здатність диференціюватися в клітини, що виявляють фенотип клітин драглистого ядра.
25. Спосіб за п. 1, в якому клітини, одержані з тканини пуповини, мають здатність диференціюватися в клітини, що виявляють фенотип клітин фіброзного кільця.
- 50 26. Спосіб за п. 1, який додатково включає індукцію клітин, одержаних з тканини пуповини людини, щонайменше до часткового диференціювання in vitro.

27. Спосіб за п. 26, в якому клітини індукують до диференціювання в клітини, що виявляють фенотип клітин фіброзного кільця.
28. Спосіб за п. 26, в якому клітини індукують до диференціювання в клітини, що виявляють фенотип клітин драглистого ядра.

5

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

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

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