



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **114767**

(13) **U**

(51) МПК

C12N 5/071 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2017 00383	(72) Винахідник(и): Мосійчук Василь Володимирович (UA)
(22) Дата подання заявки: 16.01.2017	(73) Власник(и): ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "ДЕВА КЛІНІК", вул. Почайнинська, 4, м. Київ, 04070, Україна (UA), Мосійчук Василь Володимирович, вул. Московська, буд. 27, кв. 7, м. Київ, 01010, Україна (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.03.2017	(74) Представник: Тиртична Галина Василівна, реєстр. №219
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.03.2017, Бюл.№ 5	

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КУЛЬТУРИ МЕЗЕНХІМАЛЬНО-СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ДЛЯ ПОДАЛЬШОГО ЇХ КУЛЬТИВУВАННЯ ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ

(57) Реферат:

Спосіб одержання культури мезенхімально-стромальних клітин для подальшого їх культивування для терапевтичного застосування включає підготовку пупкового канатика людини з отриманням подрібненої тканини пупкового канатика. Виділення мезенхімально-стромальної фракції клітин з пупкового канатика шляхом інкубації пупкового канатика у середовищі DMEM без сироватки у присутності 0,1 % колагенази типу А з наступним ресуспендуванням клітинного осаду у середовищі вирощування DMEM/F12, що містить 10 % сироватки новонароджених телят, 2 ммоль/л глютаміну, 1 % незамінних амінокислот і 1 % пеніциліну та стрептоміцину.

UA 114767 U

Корисна модель належить до біотехнології, конкретно до способу одержання культури мезенхімально-стромальних клітин для подальшого їх культивування для терапевтичного застосування, та може бути використана в клітинній терапії та медицині в медицині при лікуванні людей з відповідним захворюванням імунної системи.

Мезенхімально-стромальні клітини з пупкового канатика здатні стати універсальною заміною будь-якого органу і тканини організму людини. За своїм походженням ці клітини у момент народження дитини є ембріональними, тобто вони закладаються у пуповині у процесі ембріогенезу. Пупковий канатик зв'язує плід із плацентою, захищає пупкові судини від стискування, скручування та згинання. Він заповнений желеподібною речовиною – вартовим гелем, в якому розміщені пупкові артерії та вена.

Саме з вартанового гелю виділяють мезенхімально-стромальні клітини, які за своїми властивостями перевершують стовбурові клітини, одержані з інших джерел.

Перевагою мезенхімально-стромальних клітин, виділених з пупкового канатика, є наступні:

- це міцні «молоді» стовбурні клітини, ефективні для регенеративної терапії органів і тканин людини;

- для їх одержання не вимагається ні болючої пункції, ні ліпосакції;

- виділити клітини з вартанового гелю набагато простіше, ніж із інших матеріалів;

- із пупкового канатика можна одержати велику кількість стовбурових клітин, що означає можливість їх використання не один раз;

- саме головне – мезенхімально-стромальні клітини пупкового канатика новонародженого не відторгається чужим організмом.

Завдяки своїм унікальним властивостям і перевагам мезенхімально-стромальні клітини пупкового канатика стають ефективним засобом при лікуванні таких тяжких захворювань, як інфаркт міокарда, цукровий діабет, печінкова недостатність, кардіоміопатія, різні аутоімунні захворювання.

При всіх лікувальних процедурах одною із головних і часто обмежуючих проблем є наявність в певний час клітин потрібної якості для культивування, що може забезпечити необхідну кількість клітин потрібної якості для вчасного терапевтичного застосування.

Відомий спосіб одержання культури мезенхімально-стромальних клітин для подальшого їх культивування для терапевтичного застосування, що включає в себе підготовку фрагмента пуповини, виділення мезенхімально-стромальної фракції клітин з пупкового канатика методом ферментної дисоціації з застосуванням колагенази I типу (патент RU 2308957, 27.10.2007 [1]). При цьому при ферментній дисоціації здійснюють промивання тканини розчином Хенкса та 0,1 %-ним розчином колагенази I типу, приготуванням на середовищі DMEM, інкубування здійснюють при температурі 37 °C протягом 30 хв, після чого проводять центрифугування суспензії одержаних клітин при 1 000 об./хвил. протягом 5 хв, осад клітин, що утворився, ресуспендують у ростовому середовищі DMEM, що містить 10 % фетальної сироватки великої рогатої худоби, 100 од./мл пеніциліну, 100 од./мл стрептоміцину, 2 мМ глютаміну, 1 мМ пірувату натрію, 10 мг/мл основного фактору росту фібробластів bFGF.

До недоліків способу належить переважне отримання культури мезенхімально-стромальних клітин вени пупкового канатика, що обмежує диференційовані здатності клітин та їх застосування.

Найбільш близьким є спосіб одержання культури мезенхімально-стромальних клітин для подальшого їх культивування для терапевтичного застосування, що включає підготовку пупкового канатика людини з отриманням подрібненої тканини пупкового канатика, виділення мезенхімально-стромальної фракції клітин з пупкового канатика методом ферментної дисоціації з застосуванням колагенази, що включає інкубацію подрібненої тканини пупкового канатика з отриманням клітинного осаду (RU 2384618, [2]). У відомому способі інкубацію подрібненого пупкового канатика здійснюють у суміші розчинів колагенази типу I і колагенази типу IV при їх співвідношенні 1:1 у пропорції гомогенату до робочого 0,075 %-ного розчину ферментів 1:5. Процес ферментної дисоціації протікає біля 8-10 годин при температурі 37 °C при періодичному перемішуванні.

Недоліком відомого способу одержання культури мезенхімально-стромальних клітин для подальшого їх культивування є тривалість процесу та можливість застосовувати тільки пупковий канатик людини, що отриманий не більше ніж за 12 годин до початку його підготовки, що не дозволяє забезпечити необхідну кількість клітин потрібної якості для вчасного терапевтичного застосування.

Крім того, застосування ферментів у поєднанні різних типів може призвести до змінювання характеристик клітин одержаної культури, що може вплинути на їх терапевтичний потенціал.

Задачею цієї корисної моделі є удосконалення способу одержання культури мезенхімально-стромальних клітин для подальшого їх культивування для терапевтичного застосування, в якому за рахунок запропонованої обробки пупкового канатика та умов такої обробки забезпечується прискорення процесу одержання культури, досягається стабільність характеристик отриманих культур, розширюється можливість у застосовуванні вихідної тканини, що може бути не тільки пупковий канатик людини, що отриманий не більше ніж за 12 годин до початку його підготовки, але і розморожений після криогенного зберігання пупковий канатик. В результаті спосіб дозволяє забезпечити необхідну кількість клітин потрібної якості для вчасного терапевтичного застосування.

Поставлена задача вирішується запропонованим способом одержання культури мезенхімально-стромальних клітин для подальшого їх культивування для терапевтичного застосування, що включає підготовку пупкового канатика людини з отриманням подрібненої тканини пупкового канатика, виділення мезенхімально-стромальної фракції клітин з пупкового канатика методом ферментної дисоціації з застосуванням колагенази, що включає інкубацію подрібненої тканини пупкового канатика з отриманням клітинного осаду, в якому інкубацію подрібненого пупкового канатика здійснюють у середовищі DMEM без сироватки у присутності 0,1 % колагенази типу А протягом 2-2,5 годин при температурі 37 °C і постійному погойдуванні, і додатково здійснюють промивання клітинного осаду, при якому використовують середовище DMEM з сироваткою, та ресуспендування промитого клітинного осаду, яке проводять у середовищі вирощування DMEM/F12, що містить 10 % сироватки новонароджених телят, 2 ммоль/л глютаміну, 1 % незамінних амінокислот і 1 % пеніциліну та стрептоміцину.

У заявленому способі при підготовці пупкового канатика використовують пупковий канатик, отриманий в ході нормальних пологів після відсічення пуповини, або розморожений після криогенного зберігання пупковий канатик, отриманий в ході нормальних пологів після відсічення пуповини.

Авторами цієї корисної моделі представлена така сукупність дій, прийомів та компонентів, необхідних для мультиплікації (або культивування клітин), яка забезпечує вказаний вище технічний результат.

Спосіб здійснюється таким чином. Пупковий канатик, отриманий в ході нормальних пологів після відсічення пуповини, доставлений з пологового залу протягом менш ніж 12 годин від моменту народження немовля при дотриманні умов транспортування (стерильні умови, температурі 0(+5) °C) або розморожений після криогенного зберігання пупковий канатик, отриманий в ході нормальних пологів після відсічення пуповини, промивають розчином Хенкса та піддають подрібненню.

Виділення мезенхімально-стромальної фракції клітин з пупкового канатика здійснюють методом ферментної дисоціації із застосуванням колагенази типу А (Serva). Вибір ферменту вказаного типу обумовлений його специфічністю і активністю впливу на терапевтичний потенціал одержаних клітин мезенхімально-стромальної фракції. Інкубацію подрібненого пупкового канатика здійснюють у середовищі DMEM без сироватки у присутності 0,1 % колагенази типу А протягом 2-2,5 годин при температурі 37 °C і постійному прокачуванні, що також сприятливо впливає на терапевтичні властивості одержаних клітин за рахунок відсутності ксеногенного ризику. Далі здійснюють промивання клітинного осаду, при якому використовують середовище DMEM з сироваткою. Промивання клітинного осаду зазначеним середовищем здійснюють двічі. Потім отриманий осад ресуспендують у середовищі вирощування DMEM/F12, що містить 10 % сироватки новонароджених телят, 2 ммоль/л глютаміну, 1 % незамінних амінокислот і 1 % пеніциліну та стрептоміцину. Отримані клітини культури мають стабільні характеристики і високий потенціал для культивування клітин для терапевтичного застосування.

Треба зазначити, що умови існування мезенхімально-стромальних клітин в організмі діаметрально протилежні тим, що створені в культурі. В організмі мезенхімально-стромальні клітини знаходяться в спеціальному клітинному оточенні, зануреному у складний за структурою та функціями міжклітинний матрикс. Мультиплікація клітин супроводжується їх змінами, у зв'язку з чим необхідно знайти такі умови одержання клітин культури, що в кінцевому результаті, забезпечить одержання потрібного об'єму і якості біомаси. Вказані умови знайдені завдяки особливості здійснення способу, що заявляється.

Корисна модель пояснюється але не обмежується прикладами одержання культури мезенхімально-стромальних клітин із пупкового канатика людини.

Приклад 1.

Фрагмент у вигляді 10-12 сантиметрового відрізка пупкового канатика, отриманого в процесі нормальних пологів після відсікання пуповини подрібнюють. Інкубацію подрібненої пуповини

здійснювали у середовищі DMEM без сироватки у присутності 0,1 % колагенази типу А (Serva) без сироватки протягом 2 годин при t 37 °С в атмосфері CO₂ і постійному погоддуванні. Потім клітинний осад двічі промивали середовищем DMEM з сироваткою. Промитий клітинний осад ресуспендували в середовищі вирощування DMEM/F12, що містив 10 % сироватки новонароджених телят, 2 ммоль/л глютаміну, 1 % незамінних амінокислот та 1 % пеніциліну і стрептоміцину.

Отримані клітини культури мають стабільні характеристики. При застосуванні культуральних клітин для культивування мезенхімально-стромальних клітин (МСК) дозволив до кінці 4-го тижня отримати популяцію МСК у кількості $1,0 \times 10^8$ клітин, необхідних для трансплантації.

Приклад 2.

Фрагмент у вигляді 10-12 сантиметрового відрізка пупкового канатика, розмороженого після кріогенного зберігання, промивають розчином Хенкса та піддають подрібненню. Інкубацію подрібненої пуповини здійснювали у середовищі DMEM без сироватки у присутності 0,1 % колагенази типу А (Serva) без сироватки протягом 2,5 годин при t 37 °С в атмосфері CO₂ і постійному погоддуванні. Потім клітинний осад двічі промивали середовищем DMEM з сироваткою. Промитий клітинний осад ресуспендували в середовищі вирощування DMEM/F12, що містив 10 % сироватки новонароджених телят, 2 ммоль/л глютаміну, 1 % незамінних амінокислот та 1 % пеніциліну і стрептоміцину.

Отримані клітини культури мають стабільні характеристики. При застосуванні культуральних клітин для культивування мезенхімально-стромальних клітин (МСК) дозволив до кінця 5-го тижня отримати популяцію МСК у кількості $1,5 \times 10^8$ клітин, необхідних для трансплантації.

Таким чином, технічне рішення, представлене в даній корисній моделі, дозволило отримувати необхідну кількість клітин потрібної якості для вчасного терапевтичного застосування. Безумовною перевагою способу, що заявляється, є досягнення стабільності характеристик клітин культури, що в цілому визначає високу ефективність застосування культивованих на їх основі мезенхімально-стромальних клітин для лікування різноманітних патологічних станів тканин організму.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб одержання культури мезенхімально-стромальних клітин для подальшого їх культивування для терапевтичного застосування, що включає підготовку пупкового канатика людини з отриманням подрібненої тканини пупкового канатика, виділення мезенхімально-стромальної фракції клітин з пупкового канатика методом ферментної дисоціації з застосуванням колагенази, що включає інкубацію подрібненої тканини пупкового канатика з отриманням клітинного осаду, який **відрізняється** тим, що інкубацію подрібненого пупкового канатика здійснюють у середовищі DMEM без сироватки у присутності 0,1 % колагенази типу А протягом 2-2,5 годин при температурі 37 °С і постійному погоддуванні, і додатково здійснюють промивання клітинного осаду, при якому використовують середовище DMEM з сироваткою, та ресуспендування промитого клітинного осаду, яке проводять у середовищі вирощування DMEM/F12, що містить 10 % сироватки новонароджених телят, 2 ммоль/л глютаміну, 1 % незамінних амінокислот і 1 % пеніциліну та стрептоміцину.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що при підготовці пупкового канатика використовують пупковий канатик, отриманий в ході нормальних пологів після відсічення пуповини, або розморожений після кріогенного зберігання пупковий канатик, отриманий в ході нормальних пологів після відсічення пуповини.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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

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