



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 115067

(13) U

(51) МПК

A61K 35/28 (2015.01)

C12N 5/0797 (2010.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2016 13111	(72) Винахідник(и): Мосійчук Василь Володимирович (UA)
(22) Дата подання заявки: 22.12.2016	(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: 27.03.2017	(74) Представник: Тиртична Галина Василівна, реєстр. №219
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 27.03.2017, Бюл.№ 6	

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНО-СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧНОГО ЗАСТОСУВАННЯ**(57) Реферат:**

Спосіб культивування мезенхімально-стромальних клітин для терапевтичного застосування включає внесення до ємності культурального середовища, введення виділених мезенхімально-стромальних клітин пупкового канатика людини у культуральне середовище та подальшу експансію мезенхімально-стромальних клітин. Перед внесенням культурального середовища поверхню ємності покривають 2-5 %-ною сироваткою пуповинної крові людини або 1-2 %-ним лізатом тромбоцитів плазми пуповинної крові людини. Як культуральне середовище використовують середовище CTS™ Stem Pro[®] MSC SEM (Gibco, USA) з додаванням L-глутаміну та антибіотика/антимікотика.

UA 115067 U

Корисна модель належить до біотехнології, конкретно до клітинних технологій культивування мезенхімально-стромальних клітин (МСК) людини, та може бути використана у клітинній біології та клітинній терапії.

5 Значна частина людських медичних порушень, станів та хвороб практично не піддаються лікуванню із застосуванням існуючих засобів сучасної медицини або одужування носить тимчасовий характер.

Протягом останніх років відбувається активний пошук альтернативних рішень лікування пошкоджень та захворювань тканин організму людини. Серед вказаних рішень найбільш перспективні відносяться до клітинної терапії з використанням мезенхімально-стромальних клітин. Мезенхімально-стромальні клітини можуть бути використані як субстрати замісної та відновної терапії широкого спектру захворювань, в тому числі таких, які вважалися раніше невиліковними.

10 Мезенхімально-стромальні клітини, завдяки здатності до самовідновлення, мультилінійного диференціювання і прояву імунотропних властивостей, привертають увагу фахівців у галузі клітинної біології та клітинної медицини.

Швидкий розвиток клінічного застосування мезенхімально-стромальних клітин вимагає нових та вдосконалення традиційних способів їх культивування, що дозволяють не тільки зберегти морфофункціональні властивості клітин, але й одержати їх у кількості, необхідній для терапевтичного використання.

20 В цей час відомий спосіб культивування мезенхімально-стромальних клітин людини *ex vivo* (патент RU 2323250 МПК C12 N5/08, публ. 27.04.2008 [1]). Спосіб включає в себе виділення з кісткового мозку ядровмісних кісткомозкових клітин, здійснення щонайменше двох циклів їх культивування в ростовому середовищі до одержання заданої кількості мезенхімально-стромальних клітин, в процесі кожного з яких висіюють виділені клітини у відповідну культуральну ємність, в якій у ростовому середовищі збільшують популяцію мезенхімально-стромальних клітин до утворення з неї складного моношару, який витягають з культуральної ємності шляхом обробки моношару мезенхімально-стромальних клітин розчином трипсину. У процесі кожного наступного циклу культивування як виділені клітини використовують мезенхімально-стромальні клітини, витягнуті з культуральної ємності попереднього циклу культивування. Протягом кожного циклу культивування регулярно визначають рН ростового середовища і замінюють ростове середовище, рН якого менше 6,0 або більше 8,0, на ростове середовище, рН якого знаходиться в межах 6,0 – 8,0. Регулярно елімінують клітини, які не відносяться до популяції мезенхімально-стромальних клітин. Для обробки моношару мезенхімально-стромальних клітин використовують 0,03 – 0,1 %-ний розчин трипсину. Як ростове середовище в даному винаході був використаний мінерально-сольовий розчин, що містить амінокислоти, антибіотики, L-глутамін та 15 % ембріональну телячу сироватку. Відомий винахід дозволяє за короткий час (приблизно 40 діб) виростити 0,5-1,0 мл пунктату кісткового мозку, що є достатнім для ефективної терапії.

40 Однак, суттєвим недоліком згаданого способу є ксеногенні ризики у терапевтичному застосуванні одержаних мезенхімально-стромальних клітин.

Численні етапи роботи із стовбуровими клітинами, у тому числі: їх виділення, експансія та направлене диференціювання *in vitro*, - пов'язані із дією факторів ксеногенного походження. Основним ксеногенним ризиком є небезпека розвитку у реципієнтів імунного відгуку на антигени клітин тварин і ксенозоонозів. До ксенозоонозів належать бактеріальні, вірусні, паразитарні та мікотичні захворювання.

Відомий спосіб культивування мезенхімально-стромальних клітин кісткового мозку для терапевтичного застосування, наведений в патенті UA 15680 U (МПК C12 N5/08, A61K 35/28, публ. 17.07.2006 [2]). Відомий спосіб включає в себе приготування живильного ростового середовища для культивування *in vitro* мезенхімально-стромальних клітин, до складу якого входять суміш живильних культуральних середовищ DMEM/F12, 10 % ембріональна теляча сироватка, 1 мг/л основного фактора росту фібробластів та 50 мкг/мл L-аскорбінової кислоти або її солі. Особливості складу живильного ростового середовища для культивування *in vitro* мезенхімально-стромальних клітин кісткового мозку людини визначають перевагу наведеного способу, яка полягає в тому, що він стимулює проліферацію мезенхімально-стромальних клітин та зберігає недиференційований статус клітин, що дозволяє отримати у 8-12 разів більшу кількість мезенхімально-стромальних клітин, придатних для терапевтичного застосування.

55 Однак, застосування в наведеному вище способі ксеногенного компонента, а саме ембріональної телячої виворотки, викликає недоліки, пов'язані з ризиком розвитку у реципієнта побічних явищ, які є дуже небезпечними при терапевтичному застосуванні.

Найбільш близьким аналогом є спосіб культивування мезенхімально-стромальних клітин, що включає внесення до ємності культурального середовища, введення виділених мезенхімально-стромальних клітин пупкового канатика людини у культуральне середовище та подальшу експансію мезенхімально-стромальних клітин (Johansson L., Klinth J., et al//Journal of Cell Culture Technology.-2003, Vol. 42. N 2-p. 67-74 [3]). Живильне середовище для культивування мезенхімально-стромальних клітин містить середовище Ігла, модифіковане Дюльбекко (DMEM), і включає різноманітні ростові добавки, такі як ембріональна теляча сироватка або сироватка новонароджених телят. Такі добавки забезпечують живильне середовище речовинами, необхідними для довготривалого культивування та підтримування у диференційному стані мезенхімально-стромальних клітин, отриманих з пуповини людини.

Недоліком зазначеного способу культивування є внесення ксеногенного компонента у середовище культивування та потенційне підвищення вірогідності контамінації культури і канцерогенезу, зумовлене використанням стандартних тваринних добавок.

Задачею запропонованої корисної моделі є вдосконалення способу культивування мезенхімально-стромальних клітин для терапевтичного використання шляхом використання певного покриття поверхні культуральної ємності та підбору культурального середовища, що стимулює функціональний потенціал мезенхімально-стромальних клітин без застосування стандартних тваринних добавок. В результаті досягається отримання необхідної кількості клітин, що мають типовий для мезенхімально-стромальних клітин фенотип при виключенні ризику дії на реципієнта ксеногенних компонентів.

Поставлена задача вирішується запропонованим способом культивування мезенхімально-стромальних клітин для терапевтичного застосування, що включає внесення до ємності культурального середовища, введення виділених мезенхімально-стромальних клітин пупкового канатика людини у культуральне середовище та подальшу експансію мезенхімально-стромальних клітин, згідно з корисною моделлю, перед внесенням культурального середовища поверхню ємності покривають 2-5 %-ною сироваткою пуповинної крові людини або 1-2 %-ним лізатом тромбоцитів плазми пуповинної крові людини, а як культуральне середовище використовують середовище CTSTM Stem Pro^RMSC SEM (Gibco, USA) з додаванням L-глутаміну та антибіотика/антимікотика.

Краще, в способі культивування мезенхімально-стромальних клітин як ємність використовувати культуральні флакони.

У запропонованій корисній моделі представлена сукупність компонентів культурального ростового середовища, складником якої є як заміна сироватки тварин на сироватку пуповинної крові або на лізат тромбоцитів плазми пуповинної крові людини, так і склад використаного середовища.

Пуповинна кров має ряд переваг: атравматичність одержання матеріалу клітин, дешевизна, простота збереження в умовах лабораторного кріобанку. Пуповинна кров та лізат тромбоцитів плазми пуповинної крові людини містять ростові фактори, що здатні стимулювати експансію мезенхімально-стромальних клітин пупкового канатика людини.

Було встановлено, що для успішного прикріплення клітин мезенхімально-стромальних клітин пупкового канатика людини до стінок культуральної ємності слід їх покривати 2-5 %-ною сироваткою пуповинної крові у збалансованому розчині Хенкса або 1-2 %-ним лізатом тромбоцитів плазми пуповинної крові людини на HBSS.

Вибір культурального середовища було вирішено на користь CTSTM Stem Pro^RMSC SEM: клітини у такому середовищі добре проліферують до 10 пасажів без зміни їх фенотипу та каріотипу. Крім того, вказане середовище не потребує великих витрат і його можна одержувати в Україні.

Клітинна суспензія у випадку необхідності може бути переведена у терапевтичну дозу і використана для негайного лікування. Одержана клітинна суспензія може зберігатися за температури 4 °C не більше 4 годин з моменту приготування.

Крім того, клітини, які виділені, охарактеризовані, перевірені на відсутність гемотрансмісивних інфекцій, бактеріальну контамінацію та мікоплазменні інвазії, на першому пасажі поміщаються у кріосховище на зберігання.

Корисна модель пояснюється прикладом конкретного виконання.

Культивування мезенхімально-стромальних клітин (МСК) здійснювали наступним чином. Культуральні пластикові флакони з площею поверхні 175 см² покрили 3,5 %-ною сироваткою пуповинної крові, розведеною на HBSS. МСК пупкового канатика людини при концентрації 10⁴ кл/мл розсіювали у ростовому середовищі CTSTM Stem Pro^RMSC SEM (Gibco, USA) з L-глутаміном та антибіотиком/антимікотиком, Sigma-Aldrich (Merch). Процес тривав протягом двох годин за температури 37 °C. Культивування проводили у стандартних умовах: у CO₂-інкубаторі

(37 °C, 5 % CO₂, вологість 80 %) із заміною культурального ростового середовища кожену третю добу. При досягненні моношару 80 %-ної конфлюентності клітини пасивували у співвідношенні 1:3 на нові культуральні флакони. За 2 пасажі одержали 10⁶ кл/кг МСК, що достатньо для застосування у терапії. Так, дану партію одержаних МСК у вигляді суспензії застосовували для

5 терапевтичного лікування ішемічної хвороби серця. В день введення за 2 години перед запланованою процедурою, клітковий моношар дезагрегували за допомогою TRypLE Select (Gibco, USA). Клітини двічі відмивали від дисоціюючого розчину, ресуспендували у 15 мл середовища введення, а саме: 2,4 % альбуміну людини (Baxter, Австрія), 3 % реополіглюкіну (Україна), фізіологічний розчин - решта. Клітинну суспензію набирали у 20 мл шприц за

10 допомогою голки Сельдингера G-16.

Якість клітинної одержаної суспензії мезенхімально-стромальних клітин підтверджуються наступними параметрами:

- життєздатність, яка визначена за допомогою трипанового синього, не менше 90 %;
- лінія клітин не містить домішок ксеногенних компонентів;
- 15 - експресія специфічних поверхневих антигенів визначена методом проточної цитофлюориметрії у 95 % клітинної популяції: С 105, CD73; та CD90;
- відсутність експресії наступних поверхневих маркерів: CD45, CD34, CD14 або CD11b, CD79 альфа або CD19 та HLA II.

Аналогічні результати отримані і при культивуванні мезенхімально-стромальних клітин пупкового канатика людини у ростовому середовищі CTSTM Stem Pro^RMSC SEM (Gibco, USA) у культуральних ємностях, покритих 1-2 %-ним лізатом тромбоцитів плазми пуповинної крові.

Одержана суспензія мезенхімально-стромальних клітин може характеризуватися експресією і таких маркерів клітинної адгезії:

- CD44, CD54, CD90 та CD106, які грають важливу роль у процесі міграції та хоумінгу;
- 25 - наявність у клітин потенціалу диференціювання, тобто вони мають здатність в умовах *in vitro* диференціюватися у остеобласти, адипоцити та хондроцити;
- каріотип клітин клітинної лінії стабільний;
- у клітинній лінії відсутні інфекційні агенти.

Таким чином, запропонований спосіб культивування мезенхімально-стромальних клітин забезпечує отримання необхідної кількості клітин, що мають типовий для мезенхімально-стромальних клітин фенотип при виключенні ризику наявності ксеногенних компонентів. Одержані мезенхімально-стромальні клітини зберігають незмінний фенотип, набір клітинних маркерів і здатність диференціюватись.

35 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб культивування мезенхімально-стромальних клітин для терапевтичного застосування, що включає внесення до ємності культурального середовища, введення виділених мезенхімально-стромальних клітин пупкового канатика людини у культуральне середовище та

40 подальшу експансію мезенхімально-стромальних клітин, який **відрізняється** тим, що перед внесенням культурального середовища поверхню ємності покривають 2-5 %-ною сироваткою пуповинної крові людини або 1-2 %-ним лізатом тромбоцитів плазми пуповинної крові людини, а як культуральне середовище використовують середовище CTSTM Stem Pro^RMSC SEM (Gibco, USA) з додаванням L-глутаміну та антибіотика/антимікотика.

45 2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як ємність використовують культуральні флакони.