



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **107482** (13) **C2**  
(51) МПК  
**A61K 35/32** (2015.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	<b>а 2012 10094</b>	(72) Винахідник(и):	<b>Дзєвішек Войцех (PL), Цегєлські Марек (PL), Бохня Марек (PL)</b>
(22) Дата подання заявки:	<b>26.01.2011</b>	(73) Власник(и):	<b>СТЕМ СЕЛЛС СПІН С.А.,</b> Lenartowicza 6, PL-51-150 Wroclaw, Poland (PL)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	<b>12.01.2015</b>	(74) Представник:	<b>Павлович Наталія Володимирівна, реєстр. №195</b>
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>P 390272, P 393720</b>	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO2008133536 A2, 06.11.2008 UA93121780, 25.12.1996 Cegielski Marek et al: "Experimental application of xenogenous antlerogenic cells in replacement of auricular cartilage in rabbits", Xenotransplantation, Munksgaard, DE, vol. 15, no. 6, 01.11.2008, pages 374-383
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції:	<b>26.01.2010, 24.01.2011</b>		
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку:	<b>PL, PL</b>		
(41) Публікація відомостей про заявку:	<b>10.10.2012, Бюл.№ 19</b>		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	<b>12.01.2015, Бюл.№ 1</b>		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	<b>PCT/PL2011/050003, 26.01.2011</b>		

## (54) КЛІТИННИЙ ГОМОГЕНАТ ЗІ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН, ОТРИМАНИХ ІЗ ЗРОСТАЮЧИХ РОГІВ ОЛЕНЯ, СПОСІБ ЙОГО ОДЕРЖАННЯ ТА ЙОГО ВИКОРИСТАННЯ

### (57) Реферат:

Предметом даного винаходу є біологічно активний клітинний гомогенат, вироблений із клітин, що належать лінії стовбурової клітини MIC-1, отриманої зі зростаючих рогів оленя (Cervidae), задепонованої у PSMZ під номером доступу DSM ACC2854, спосіб його виробництва та застосування. Даний винахід також охоплює фармацевтичну та косметичну композицію, що містить вищезгаданий гомогенат.

UA 107482 C2



Предметом даного винаходу є клітинний гомогенат, отриманий зі стовбурових клітин зростаючих рогів оленя, спосіб його одержання та використання. Предметом даного винаходу є також фармацевтична або косметична композиція, що містить вищезгаданий клітинний гомогенат.

5 В сучасному рівні техніки було багато відомих спроб, щоб виокремити та виробити стійкі лінії стовбурової клітини, з яких було б можливо зробити стабільні препарати для різного використання.

Розкриті рішення, що стосуються одержання стовбурових клітин, які диференціюються в остеобласт, отримані винятково з різних типів людської тканини. Заявки WO 2005/085422 та US 10 2005/0048644 розкривають стовбурові клітини, виокремлені з жирової тканини, що використовуються у лікуванні хвороб м'язів та скелету. Заявка WO 2005/038012 розкриває спосіб одержання стовбурових клітин, здатних до диференціації в остеобласт або хондробласт, з людської постнатальної тканини. Заявка US 2007/0122902 розкриває спосіб виокремлення та культивування мультіпотентних стовбурових клітин, отриманих з пуповинної крові. Були також 15 спроби генетично змінити клітини, здатні до регенерації хряща та кісткової тканини, які були розкриті в описі патенту US6398816. Найбільш етичне протиріччя стосується застосувань, що стосуються стовбурових клітин, отриманих з ембріональної тканини (WO003068937, WO02064755, WO000385831).

Використання людських стовбурових клітин, широко описане у відомому рівні техніки, 20 спричиняє багато проблем, які є доказом нагальної необхідності провести подальші дослідження в цій сфері. Деякі з головних перешкод, викликаних використанням ембріональних клітин, є етичні питання, небезпека проявлення генетичних дефектів так само як ризик передачі вірусних та онкогенних хвороб. Таким чином, є нагальна необхідність у лініях стовбурової клітини, використання яких виключало б ризик вищезгаданих перешкод.

Відомий рівень техніки розкриває властивості тканини рога оленя, яка визнана найшвидше 25 зростаючою формою кості серед тканин ссавців. Були спроби використовувати проліферативні властивості цієї тканини, особливо через виокремлення факторів росту. Заявка WO93/19085 розкриває спосіб виокремлення фактору росту, що є практично здатним при регенерації ушкодженої кісткової тканини. Розкритий спосіб одержання екстракту, виокремленого з рогів японського оленя (*Cervus nippon*), який стимулює проліферацію кровотворних стовбурових 30 клітин та мегакаріоцитів. Заявка WO 2004/112806 розкриває композицію для лікування нейронних порушень, зроблену з маркерів гормону росту, отриманих з рогів оленя.

В 2005 році автори даного винаходу почали досліджувати процес росту рогів шляхетного оленя (*Cervus elaphus*). У цих експериментах зі зростаючих рогів оленя була отримана лінія 35 стовбурової клітини MIC-1. Стійка клітинна лінія була задепонована у DSMZ під номером доступу DSM ACC2854. В 2006 році була зроблена заявка на патент P. 378963, предмети якого включали нову лінію стовбурової клітини MIC-1 із зростаючих рогів оленя, використання граничних бічних фрагментів зростаючих рогів оленя у виробництві стійкої лінії стовбурової клітини так само як використання цих клітин у реконструкції кістки та ушкоджень хряща у людей 40 та тварин. У цей час, одним з головних напрямків дослідження є пошук джерел препарату для стимулювання регенеративних процесів у складних органах, таких як шкіра. Дослідження в області фізіології процесів старіння та регенерації в тканинах призвело до відкриття ролі стовбурових клітин у цих процесах.

Мета даного винаходу полягає в тому, щоб забезпечити препарат та вироби, засновані на 45 стовбурових клітинах, які мають сприятливий вплив на регенерацію шкіри та реконструкцію її елементів.

Неочікувано, виявилось, що цей клітинний гомогенат з клітин лінії стовбурової клітини MIC-1 демонструє особливо вигідну активність у стимулюванні росту та регенерації хворих або ушкоджених елементів шкіри.

50 Предметом даного винаходу є клітинний гомогенат, отриманий деструкцією клітин з лінії стовбурової клітини MIC-1, отриманої зі зростаючих рогів оленя (*Cervidae*), задепонований у DSMZ під номером доступу DSM ACC2854.

Краще, якщо деструкція клітин та гомогенати виконані із використанням ультразвуку. Деструкція антлерогенних стовбурових клітин вивільняє активні речовини, що там 55 утримувалися, які активізують регенеративні процеси.

У кращому втіленні даного винаходу одна одиниця гомогенату включає екстракт із 1 мільйона клітин.

Наступним предметом даного винаходу є спосіб одержання біологічно активного клітинного гомогенату, який характеризується тим, що клітини є культивовані та згодом відділені від 60 середовища, деструктовані із використанням ультразвуку, де клітини, що були використані, є

клітинами лінії стовбурової клітини MIC-1, отриманої зі зростаючих рогів оленя (Cervidae), задепоновані у DSMZ під номером доступу DSM ACC2854.

Краще, якщо у способі відповідно до даного винаходу клітини культивовані на твердому середовищі або в суспензії.

5 Краще, якщо у способі відповідно до даного винаходу, вироблений стандартизований гомогенат, який включає екстракт, отриманий з 1 мільйона клітин в одній одиниці.

Наступним предметом даного винаходу є фармацевтична або косметична композиція, яка включає активний інгредієнт та фармацевтично допустимий носій, що характеризується тим, що активною речовиною є гомогенат клітин з лінії стовбурової клітини MIC-1, отриманої зі зростаючих рогів оленя (Cervidae), за депонованих у DSMZ під номером доступу DSM ACC2854.

10 Краще, якщо композиція призначена для інтрадермального або локального застосування.

Перевагами даного винаходу є, насамперед, умови культивування еталонної клітини та клітини з високим потенціалом проліферації, так само як відсутність етичних міркувань, які звичайно піднімаються проти дослідження в області людських ембріональних клітин.

15 Інший предмет даного винаходу - використання гомогенату, отриманого із клітин з лінії стовбурової клітини MIC-1, отриманої зі зростаючих рогів оленя (Cervidae), задепонованих у DSMZ під номером доступу DSM ACC2854, у виробництві препарату для медичного та косметичного лікування шкіри.

Краще, якщо препарат розроблений для локального або інтрадермального застосування.

20 Шкіра, як бар'єрний орган, є особливо схильною до хвороб та травм через її захисну функцію. Процеси відновлення відбуваються в ній протягом життя. Завдяки біостимулюючим властивостям, екстракт корисний у широко визначеній регенеративній медицині та косметології. Клітинний гомогенат з клітин з лінії стовбурової клітини MIC-1 має сприятливий вплив на формування епітелію, стимулює зцілення ран та ушкоджень шкіри, активізує волосні фолікули, стимулює виробництво волокон колагену, збільшує проліферацію фібробластів та активізує васкуляризацію тканини. Гомогенат лінії стовбурової клітини MIC-1 проявляє властивості, які впливають на регенерацію шкіри та її відродження, яке дозволяє відновити погіршення стану, пов'язане з віком. Клітинний гомогенат та препарати, зроблені на його основі, широко застосовуються як засоби проти зморшок, засоби ліфтингу та антивікові засоби, які відновлюють шкіру, ушкоджену сонячним випромінюванням, відновлюють шкіру, збільшуючи її ніжність та еластичність, так само як косметичні препарати для використання на слизових оболонках. Крім того, клітинний гомогенат та препарати, зроблені на його основі, широко корисні як засоби для лікування важких для лікування ран, що виникають, наприклад, у результаті діабету, виразки гомілки, що впливають із судинного захворювання, такого як поверхневі пошкодження, хвороба Рено, так само як засоби для ослаблення радіаційної шкоди та ушкодження шкіри після хіміотерапії.

35 Клітинний гомогенат, що становить предмет даного винаходу, та препарат, вироблений на його основі, є крім того корисні в естетичній медицині, дерматології та у спортивній медицині, особливо як засоби для стимулюючої регенерації після прищів, для лікування опіків та для лікування судинних розладів після травми.

Предмет даного винаходу є корисним як біостимулюючий препарат для слизових оболонок, особливо при пародонтозі, виразці слизової оболонки, наприклад, у ротовій порожнині, носі та піхві. Клітинний гомогенат, що є предметом даного винаходу, так само як препарати, зроблені з нього, також корисні у ветеринарії при прискоренні зцілення та відрощуванні волосся.

45 Наступним предметом даного винаходу є нове використання клітинного гомогенату, зробленого із використанням деструкції клітин з лінії стовбурової клітини MIC-1, отриманих зі зростаючих рогів оленя (Cervidae), задепонованих у DSMZ під номером доступу DSM ACC2854, у виробництві препаратів для регенерації тканини, відібраної із числа м'язової, нервової та епітеліальної тканини.

50 Краще, якщо препарат використовується у формі крапель для очей, мазі для очей та препарату для ін'єкцій, або препарату для насичення спонгостану.

Краще, якщо композиція очних крапель містить у собі, на мілілітр, гомогенат у розрахунку 10 Од/мл (U/ml), 50 мг або 10 U/ml 25 мг, а також допоміжні речовини.

55 Краще, якщо допоміжні речовини відібрані з групи, що включає полівініловий спирт, двонатрієвий гідроген фосфат, натрієвий гідроген фосфат, хлорид натрію, хлорид бензалконію та воду.

Краще, якщо очна мазь містить модуль у розрахунку 10 U/ml 50 мг, препарат для ін'єкцій включає гомогенат у розрахунку 10 U/ml 100 мг, та препарат для насичення спонгостану включає гомогенат у розрахунку 10 U/ml 100 мг.

60 Предмет даного винаходу показаний в ілюстраціях, де

Фіг. 1 показує ефект клітинного гомогенату MIC-1 на проліферацію: фібробластів (F), міоцитів (M), хондроцитів (CH) та гепатоцитів (H). Гомогенат фібробласти-MIC-1 (F+HMIC-1), гомогенат міоцити-MIC-1 (M+HMIC-1), гомогенат хондроцити-MIC-1 (CH+HMIC-1), гомогенат гепатоцити-MIC-1 (H+HMIC 1),

5 Фіг. 2 представляє поверхню ушкодження в пікселях після використання краплі з концентрацією 0,5 мільйонів клітин /мл препарату,

Фіг. 3 представляє поверхню ушкодження в пікселях після застосування краплі з концентрацією 0,5 мільйонів клітин /мл препарату.

10 Фіг. 4A представляє відкритий нерв після 12 тижнів спостереження,

Фіг. 4B показує виокремлений нейрон, видимі шви, що з'єднують імплантати із залишками,

Фіг. 5 представляє контрольну групу 12 тижнів, впровадження сидничного нерва в пацюка,

Фіг. 6 представляє контрольну групу після 12 тижнів, впровадження сидничного нерву в пацюка,

15 Фіг. 7 представляє експериментальну групу після 12 тижнів, периферійної регенерації імплантату,

Фіг. 8 представляє експериментальну групу 12 тижнів після операції, периферійної регенерації впровадження,

Фіг. 9 показує експериментальні групи після 12 тижнів, нервові волокна у центрі імплантату,

20 Фіг. 10 показує довжину шляху в сантиметрах та час відпочинку в секундах миші після 180 с відеозапису,

Фіг. 11A показує зображення м'язу негайно після ушкодження,

Фіг. 11B представляє зображення м'язу після 14 днів після використання гомогенізованих,

Фіг. 11C показує зображення м'язу негайно після ушкодження,

Фіг. 11D показує зображення м'язу після 14 днів використання середовища,

25 Фіг. 12A показує тварину з експериментальної групи: зображення майже незмінного кісткового м'язу – заключні етапи лікування,

Фіг. 12B показує експериментальну групу, повністю відновлений кістковий м'яз, повздовжній переріз. Ушкодження, якому піддалися, підтверджене окремими ядрами, розташованими в центральній частині волокон м'язу,

30 Фіг. 13A представляє контрольну групу, де м'язові трубочки та шрам, що формується, видимі після того, як тканина була подрібнена,

Фіг. 13B представляє тварину з контрольної групи, що відновлює ушкоджений м'яз, у центрі є видимий шрам з поглинанням тканини та гігантських клітин,

35 Фіг. 14A представляє тангенціальний розріз шкіри після 21-денного застосування дермального гомогенату, видимим є збільшена кількість вторинного волосся у волоссяних фолікулах так само як численні існуючі зв'язки колагенових волокон,

Фіг. 14B представляє контрольний тангенціальний розріз шкіри після 21-денного застосування фізіологічного розчину (контроль),

40 Фіг. 15 представляє паралельний розріз шкіри після 21-денного застосування інтрадермальної гомології. Окреска Ван Гісона показує нещодавно сформовані колагенові волокна,

Фіг. 16 показує рану, що вилікувана у п'ятий 24-годинний період після виокремлення секції тканини, яка охопила всі шари шкіри.

45 Предмет даного винаходу також показаний на прикладах втілення, які не обмежують обсяг його охорони.

Приклад 1. Виробництво гомогенату, що містить мезенхімну стовбурову клітину MIC-1 з рогів оленя

50 Культура утримується в термостаті при нормальних умовах, при температурі +37 °C та атмосфері, що містить 5 % CO<sub>2</sub>. Антлерогенні клітини є адгезивними, та ростуть у колбах на 175 мл (колба клітинної культури BD Falcon) у мінімальному підтримуючому середовищі від Cambrex, яке містить 10 % ембріональну бичачу сироватку, 100 U/ml пеніциліну та 0,1 мг/мл стрептоміцину. Ефективність від однієї пляшки – приблизно 30 мільйонів клітин за 14-денний цикл культури. Після того, як отриманий повний моношар, клітини від'єднанні від дна колби, використовуючи 0,05 % трипсин з 0,02 % етилендіамінотетраоцтовою кислотою (EDTA) та передані до центрифужних пробірок. Трипсин у центрифужних пробірках інактивований шляхом додавання 10 мл надосадової рідини. Потім клітини двічі промиті в PBS та центрифуговані. Центрифугування виконане в центрифугу Негеус протягом 10 хвилин приблизно при 1000 обертах за хвилину. У результаті надосадова рідина декантирована у клітинний осадок. Це осаджується у 0,9 % хлористому натрію у розрахунку 1 мільярд клітин на 50 мл рідини.

60 Гомогенна суспензія охолоджена у гомогенизаційній камері, що охолоджується водою, до

температури приблизно 4 °C. Для деструктування клітин у сталевій камері, з безперервним охолодженням, 30 секунд використовуються ультразвуки з частотою 20 кГц (надзвуковий дезінтегратор UD-20, Techrap). Розчин масштабований в одиницях біологічної активності, одна одиниця представляє екстракт, отриманий з 1 мільйона клітин. Гомогенат зберігається заморожений при -80 °C.

Приклад 2. Виробництво форми клітинного гомогенату, що містить мезенхімні стовбурові клітини MIC-1 з рогів оленя

Препарат, заснований на клітинному гомогенаті, може зустрічатися у формі мазі, крему, тонізуючого засобу або будь-якої іншої форми, що підходить для місцевого застосування. Препарат може також мати наскірне використання. Приклад основи мазі – Nascobase або будь-яка інша відома та звичайно використовувана основа мазі, що використовується фахівцями, така як Lekobaza, безводний еуцерин, холестеринова мазь або вазелін (Farmacja stosowana. red. Stanislaw Janicki i Adolf Flebig, PZWL Warszawa 1996). 10 г суспензії, що містить 50 одиниць гомогенату, були додані до 40 г середовища. Суміш була гомогенізована, використовуючи напіваавтоматичну суміш, PA 200 Alpine a (Польща). Гомогенізація була виконана більш, ніж п'ять хвилин у спеціалізованому контейнері, об'ємом 50 мл, на автоматичних параметрах настроювання.

Був виготовлений тонізуючий засіб, де 50 мл 96 % етилового спирту були додані до 50 мл суспензії, що містить 100 одиниць біологічної активності гомогенату. Препарати, отримані у результаті, зберігались в холодних умовах.

Приклад 3. Експертиза ефекту клітинного гомогенату на шкіру після одиничної локальної або інтрадермальної дози

Оцінка ефекту клітинного гомогенату на шкіру після одиничного локального або інтрадермального застосування проводилася на 2 з 4 груп, що містили 6 осіб, кожна відібрана із групи з 24 білих новозеландських кроликів.

Під час локального застосування, 6 см<sup>2</sup> позбавленої волосся неушкодженої шкіри на одній стороні кролика (в області грудної клітини) обробили 0,5 мл препарату. Ту ж саму поверхню з іншої сторони (контрольну) обробили відповідним середовищем. Місце застосування було досліджено більш, ніж 96 годин.

Під час інтрадермального застосування, на 6 см<sup>2</sup> поголеної неушкодженої шкіри на одній стороні кролика (в області грудної клітини) були введені на визначеному місці інтрадермальним способом 0,5 мл препарату. На визначене місце з іншої сторони кролика було введено 0,5 мл фізіологічного розчину, та стан шкіри був оцінений після 96 годин.

Після одиничної дози ми спостерігали невелике почервоніння шкіри, що почалося на другий день спостереження, яке закінчилося після 10 днів. Обидві форми добре перенеслися.

Приклад 4. Оцінка ефекту клітинного гомогенату на шкіру після багаторазового локального та інтрадермального застосування

Оцінка ефекту гомогенату клітини на шкіру після багаторазового локального або інтрадермального застосування проводилася на 2 з 4 груп, що містять 6 осіб, кожна відібрана із групи з 24 білих новозеландських кроликів.

Під час локального застосування, 6 см<sup>2</sup> позбавленої волосся неушкодженої шкіри на одній стороні кролика (в області грудної клітини) обробляли 0,5 мл препарату один раз щодня більш, ніж 28 днів поспіль. Ідентична поверхня з іншої сторони контрольно була оброблена відповідним середовищем у такий же спосіб як препарат, що досліджувався. Місце застосування контролювали багаторазово у перші 8 годин лікування та потім щодня протягом наступних 21 дня.

Під час інтрадермального застосування, 6 см<sup>2</sup> позбавленої волосся неушкодженої шкіри на одній стороні кролика (в області грудної клітини) обробляли 0,5 мл препарату один раз щодня більш, ніж 14 днів поспіль. Ту ж саму поверхню з іншого боку контрольно обробили відповідним середовищем ідентичним способом як препаратом, що досліджувався. Місце застосування контролювали багаторазово у перші 8 годин лікування та потім щодня більш, ніж наступних 21 дня.

На 14-й день спостереження у 6 тварин з групи багаторазового застосування ми зібрали зрізи шкіри для гістологічної оцінки з місць із інтенсивним волоссяним ростом. У 3 тварин з контрольної групи зрізи тканини з місць, де застосовували фізіологічний розчин, були зібрані для гістологічної оцінки. Застосування гомогенату інтрадермальним способом не наносило жодної шкоди шкірі та добре переносилось. У препаратах ми спостерігали збільшену кількість волосся у фазі росту в порівнянні з контрольною групою, так само як потовщення волосся навколо волоссяної цибулини. У шкірі ми спостерігали збільшену кількість волокон колагену. Ці

процеси спостерігалися найбільш чітко в групі, що одержувала клітинний гомогенат MIC-1 інтрадермально.

Ділянки шкіри, які обробили клітинами, показали більш швидке відростання волосся, ніж області, що оброблялися фізіологічним розчином. Видимі відмінності спостерігалися на 6-й день спостереження. Повне відростання волосся до його належної довжини для даної особи, маючи на увазі від 35 до 42 мм, відбулося приблизно після 10-14 тижнів. Волоссяний ріст протягом 2-3 тижнів був прискорений та становив приблизно 4 мм на тиждень. Ніякого значного росту не спостерігалось в контрольній групі. Згодом, ріст становив 2-3 мм на тиждень. Застосування гомогенату інтрадермально не нанесло жодної шкоди шкірі та добре переносилось. Гістологічні препарати після застосування гомогенату, у порівнянні з контрольною групою, призвели до значного росту вторинного волосся та збільшення кількості нещодавно синтезованих волокон колагену.

Приклад 5. Оцінка ефекту мазі, заснованої на гомогенаті стовбурової клітини MIC-1

Оцінка була виконана на 9 кроликах, розбитих на 3 групи з 3 тварин кожна, використовуючи 3 типи мазі різних концентрацій: 1 Од/л (U/l) г Hascobase, 0.5 U/l г Hascobase та само як 0.1 U/l г Hascobase. Групу 1 кроликів обробили маззю 1 U/l г, групу 2 обробили маззю 0,5 U/l г, та групу 3 обробили 0,1 U/l г. Усі групи обробили відповідно до наступної процедури: 6 см<sup>2</sup> позбавленої волосся неушкодженої шкіри на одній стороні кролика (в області грудної клітини) обробляли 0,5 мл препарату один раз щодня більш, ніж 28 днів поспіль. Ту ж саму поверхню на протилежній стороні (контрольну) обробляли відповідним середовищем (Hascobase) у такий же спосіб як препаратом, що досліджувався. Місце застосування контролювали багаторазово протягом перших 8 годин після застосування та потім щодня у наступні 28 днів.

В групі, що одержувала мазь 0,1 U/l г жодного посилення росту волосся не спостерігалось. Група, що оброблялась маззю 0,5 U/l г. спостерігався прискорений волоссяний ріст приблизно на 26-й день після застосування. Найбільша концентрація була активною приблизно на 21-й день після застосування.

Ми виміряли кровотік в шкірі кроликів групи 1, як на обробленій, так і на контрольній сторонах.

Вимірювання було зроблене з використанням лазерного вимірювача потоку Доплера, та MBF3D (Moor Instruments Ltd) та зонду P4s, 0.46 мм у діаметрі. Обладнання випромінює монохроматичне світло в довжині хвилі 780-820 нм, що виробляється напівпровідниковим лазером, 1,5 мВт потужністю. Метод лазера Доплера заснований на емісії монохроматичного оптичного випромінювання в тканині та виявлення розсіяного світла, яке повертається до поверхні тканини. Під час розсіювання світла на еритроцитах, які переміщуються, частота хвилі змінюється залежно від швидкості еритроцитів та куту, зробленого еритроцитами та фотоном (явище Доплера). Відповідне обладнання виявлення з перетворювачем сигналу та аналізатором дозволяє зібрати інформацію щодо насиченості крові даної тканини, визначеної як вибір місцевої швидкості крові та концентрації еритроцитів, усереднених на об'єм тканини, куди проникає світло. Виміри кровотоку в одній області шкіри тривали хвилину. Аналіз був виконаний на самому повільному 20-секундному інтервалі потоку. Міра течії крові, перфузія, була виражена як результат концентрації еритроцитів та їх швидкості, використовуючи відносну одиницю (одиниця перфузії). 47 % збільшення перфузії крові в шкірі спостерігалось в порівнянні з контрольною шкірою.

Використання мазі на шкірі добре переносилось. Ми спостерігали незначну гіперперфузію в області застосування, та більш швидке відростання волосся на стороні, де тонізуючий засіб використовувався. Рани на місцях, де зразки тканини були зібрані для гістології, виліковувались набагато швидше, ніж на контрольній стороні. Гістологічний аналіз продемонстрував подібні зміни як у групі, що одержує гомогенат як ін'єкцію.

Приклад 6. Оцінка *in vitro* (у лабораторних умовах)

Дослідження *in vitro* (у лабораторних умовах) показали, що речовини, що містяться у оксаміті (м'яка шкіра, що покриває зачатки рогів в період росту) та у екстракті оленячих рогів, стимулюють проліферацію фібробластів, спленоцитів та кровотворних стовбурових клітин. Беручи до уваги присутність кровоносних судин м'язів у рогах, ми також оцінили ефект гомогенату антлерогенних клітин на фібробластах (сполучна та епітеліальна тканина), гладких м'язових клітинах (м'язова тканина), хондробластах (сполучна тканина), гепатоцитах (епітеліальна тканина) та нейронах (тканина нервової системи).

Для цього дослідження ми використовували наступні зразкові клітинні лінії: мишині ембріональні фібробласти (3T3 Balb/c) та людські міоцити від ембріональної аорти (UASMC). Основна хондробластна культура була отримана з механічно деструктурованих фрагментів хряща вуха кролика (білий каліфорнійський кролик, жіноча особина, приблизно 4-кілограмової

ваги). Щоб забезпечити основну гепатоцитну культуру та культуру нейрона, ми використовували фрагменти органу, зібрані від неонатального пацюка (Wistar), які були механічно деструктуровані та культивовані в середовище гладкого м'язу для вирощування (Cambrex Bio Science, Walkersville Maryland USA). Міоцити були культивовані в середовищі гладкого м'язу для вирощування, тоді як клітинні лінії, що залишились, в DMEM (Bio Whittaker, Lonza, Verviers, Belgium) у межах додавання 10 % ембріональної бичачої сироватки та 1 % розчину, що містить L-глутамін, пеніцилін та стрептоміцин (Sigma-Aldrich, Chemie, Steinheim, Germany). Культури утримувались при 37 °C у вологій атмосфері, що містить 5 % CO<sub>2</sub>. Час, що був потрібен для досягнення 70 % злиття у колбах з культурою (75 мл) був: 5 днів для міоцитів та нейронів, 10 днів для фібробластів та хондробластів, та 21 день для гепатоцитів. Оцінені клітини були вилучені з колб з культурою, використовуючи розчин 0,25 % трипсин-EDTA (Sigma-Aldrich) та повторно інокульовані 100 000 клітин на лунку на 12 лункових тарілок. Після 24 годин середовище було змінено та гомогенізована суспензія клітин MIC-1 була додана в дозі 0,2 одиниць (1 одиниця біологічної активності дорівнює гомогенату, отриманому з 1 000 000 клітин MIC-1). Чашки були культивовані протягом 120 годин, після цього часу клітини були сфотографовані та підраховані із використанням колориметричного тесту SRB (де тест SRB визначає число живих клітин, які зв'язують фарбник, sulphorhodamine B). Клітини були закріплені 50 % трихлороцтовою кислотою та потім пофарбовані з 0,4 % SRB у 1 % оцтовій кислоті протягом 30 хвилин. Незв'язаний фарбник був вилучений промиванням у 1 % оцтовій кислоті та пофарбована зона до білків клітин була екстрагована з 10 mM небуферизованим Трипом. Тоді оптична щільність була зчитана на пристрої для зчитування чашок Elx-800 (Bio-Tek instruments, USA) при довжині хвилі 562 нм. Зразковий контроль складався з того ж самого середовища, що використовувалось у способі. Усі реактиви для тестів були куплені від Sigma.

Щоб оцінити значення відмінностей між окремими групами результатів, ми використовували t-тест Стюдента та як статистично значимий, ми прийняли  $p < 0,05$ . Усі статистичні аналізи були виконані із використанням пакету Statistica 7.1 від Statsoft.

Найбільше збільшення у проліферації було отримано для фібробластів та міоцитів, тому що їх кількості вирости відповідно на 32 та 28 %. У культурі контра-бластів з гомогенату клітин MIC-1 було 19 % збільшення кількості хангер-бластів в порівнянні з тими, що вирощувались без додавання гомогенату. Подібний стимулюючий вплив гомогенату спостерігався на гепатоцитах, кількість яких вирости на 16 %, порівнюючи з наявними даними місць, що не були оброблені ним (Фіг. 1). Ці відмінності були завжди статистично значні. Ніякого збільшення кількості клітин не спостерігалось для нейронів, оброблених гомогенатом. Після 120 годин інкубації з гомогенатом всіх клітинних типів, вони не показують жодних ознак старіння (зморщування), що спостерігалось у випадку клітин, не оброблених гомогенатом.

Мезенхімні стовбурові клітини (MSC), введені в ушкоджену тканину, беруть участь у її регенерації, та після кількох тижнів після введення залишається тільки невелика їх кількість, що призводить до висновку, що регенерація є результатом факторів, що виділяють MSC, які модулюють мікросередовище на місці ушкодження, та в такий спосіб стимулюють виживання та проліферацію в ендogenous клітинах – хазяїв. Вищезгадані фактори включають білки, що регулюють кровотворення, розвиток кровоносних судин, зцілення, імунну реакцію так само як мобілізацію та проліферацію кровотворних стовбурових клітин. Подібний механізм спостерігався після застосування антлерогенних стовбурових клітин в ушкодженнях хряща у вусі та щелепній кістці кролика. Відновлені тканини містили концентрації недиференційованих стовбурових клітин, які з часом піддалися апоптозу. Аналогічно, окремі дослідження підтверджують вплив MSC на виживання та секреторну діяльність інших клітин. Участь клітин MIC-1 у регенерації ушкоджених тканин так само як в описаному стимулюючому впливі речовини, що міститься в рогах, на проліферацію клітин та прискорення зцілення розривів призвело нас до вивчення впливу гомогенату клітин MIC-1 на різні типи клітин у лабораторних умовах. Отримані результати вказують на значну стимуляцію проліферації фібробластів та міобластів гомогенатом клітин MIC-1 так само як менший вплив на проліферацію хондробластів та гепатоцитів. Тільки для нейронів не було жодного збільшення у кількості, що спостерігалось під час культивування з додаванням гомогенату. Однак, здатність клітин до виживання збільшилася втричі, та нейрони, на додаток до збільшення їх розміру, розробляли щільну мережу відповідних взаємозв'язків. Таким чином, клітинні культури з додаванням антлерогенного клітинного гомогенату створюють нові можливості в регенеративній медицині, що полегшує можливість одержання достатньої кількості матеріалу, щоб заповнити ушкодження в будь-якій тканині.

Приклад 7. Дослідження у природних умовах, епітеліальна тканина (рогівка)

У цьому дослідженні ми використовували 12 кроликів, молодих 8-місячних жіночих особин



новозеландського білого різновиду, з вагою від 2,5 до 2,9 кг. Під час експерименту тварини утримувалися в окремих клітках з необмеженим доступом до їжі та води у циклі 12 годин при світлі: 12 годин у темряві. До початку експерименту всім кроликам досліджували їхні очі, щоб виключити будь-які існуючі порушення рогівки або кон'юнктиви так само як передніх структур очного яблука (передня камера та райдужна оболонка), що залишились. Ми проводили дослідження флуоресцеїну (оцінка передньої частини після застосування 2 % розчину флуоресцеїну на кон'юнктиву, використовуючи кобальтовий фільтр) та оцінку, використовуючи щілинну лампу. Жодних відхилень від норми не спостерігалось. У кожній тварини було досліджено одне око, а інше око прийнято контрольним. Зношування рогівкового епітелію було виконано в такий спосіб. Після місцевої анестезії розчином Alcaine (хлоргідрид проксиметаїну, 5 мг/мл, Alcon) рогівковий епітелій був ушкоджений в обох очах кожного кролика через застосування диска, 3 мм шириною, тканини Whatman №1, насиченої n-гептанолом (Sigma-Aldrich). Диск був прикладений до центру рогівки та залишений на місці на 30 секунд, після його видалення, око було промито ізотонічним розчином, 0,9 % NaCl. Протягом експериментів, у 6 кроликів, праві очі (експериментальне око) були оброблені 3 рази на добу через рівні інтервали (кожні 8 годин) до завершального дня гомогенатом у концентрації 0,5 U/ml (очні краплі номер 1) (3 ока) та 0,25 U/ml (очні краплі номер 2) (3 ока) у розрахунок 3 краплі. Одна одиниця біологічної активності дорівнює гомогенату, отриманому з 1 000 000 клітин MIC-1, що відповідає 1 мг клітинної маси, поміщеної в 100 мг дистильованої води. Ліве око, прийняте контрольним, обробили за тим же самим зразком та в обсязі використовуваного середовища. Для 6 інших кроликів ми використовували гомогенат у формі мазі в такій же концентрації як у краплях. Вони були оброблені за такою ж самою схемою для кожного ока, у формі шматка мазі розміром з горошину перцю. Були здійснені оцінки ушкодження рогівки та темпу її регенерації в дослідній групі (2 × 6 тварин) у порівнянні з контролем. Щоб оцінити темп зцілення ушкодження в оці кроликів, очі були підфарбовані 2 % розчином флуоресценту та досліджені з 10-годинним інтервалом між ушкодженням та початком вимірів. Цей час відповідає латентному періоду у зціленні рогівки, що спостерігається в природних умовах. Очі були досліджені, використовуючи щілинну лампу, та ми також виконали флуоресцентне дослідження та фотографії (фотографічна документація) всіх експериментальних та контрольних рогівок. Фотографії були зроблені протягом кожних 10 годин після травми. Поверхня ушкодженої області рогівки була виміряна в пікселях, аналізуючи розмір ушкодження, із використанням пакету AdobePhotoshop CS Extended. Отримані результати були усереднені, щоб оцінити зменшення поверхні рани з часом. Експеримент завершувався з виявленням 100 % змикання рани в рогівки в обох групах, як експериментальної, так і контрольної. Результати були зібрані у Таблиці 1 так само як Фіг. 2, що демонструє поверхню ушкодження в пікселях після застосування крапель з концентрацією 0,5 мільйонів клітин/мл препарату, Таблиця 2 та Фіг. 3 представляють дані для поверхні ушкодження в пікселях після застосування мазі у концентрації нульового десятикового 5 мільйонів клітин/мл препарату.

Таблиця 1

	Праве око		Ліве око	
час	середнє значення	SD	середнє значення	SD
0				
10	195735	11690	197212	4883
24	178169	10004	316094	15551
48	15175	981	95291	5462
72	0		19987	1885
82	0		0	

40

Таблиця 2

	Праве око		Ліве око	
час	середнє значення	SD	середнє значення	SD
0				
10	196968	11639	201174	8293
24	169675	12902	292304	13688
48	16110	4860	92942	12295
72	0		19133	2534
82				

У всіх очах, які обробили препаратом (краплями або маззю), що містить гомогенат MIC-1, зцілення відбулося набагато швидше. У перший 24-годинний період після лікування в ушкоджених областях ніякого збільшення не спостерігалось. Повне зцілення відбулося раніше, ніж за 72 години спостереження. Сприятливий вплив обох препаратів був приблизно рівним. Препарати з більш низькою концентрацією гомогенату показали ефективність, зменшену приблизно на третину.

Приклад 8. Дослідження у природних умовах, нервова тканина (сідничний нерв)

У цих експериментах ми використовували молодих (від 2 до 3-місячного віку) пацюків Вістара обох статей, що важать від 240 до 310 грамів. Під час експерименту тварини утримувались в клітках з необмеженим доступом до води та їжі у циклі світло/темрява 12:12. Експериментальна група складалася з 4 тварин, а контрольна група з 3 тварин (1 пацюк помер під час експерименту – не прокинувся після анестезії). Тварини оперувались під повною анестезією із внутрішньочеревною ін'єкцією кетаміну та ксилазину у дозі 75/5 мг/кілограмів ваги тіла. Ми оперували із використанням мікроскопа та інструментальних засобів мікрохірургії як в септичних умовах. Після видалення волосся та дезінфекції з Octenisept (Schulke&Meyr GmbH, Норддерштедт, Німеччина), область була оточена стерильною тканиною. Розріз приблизно 2,5 см був зроблений уздовж на зовнішній частині стегна. Після відділення шарів м'язів стегна, використовувались затуплені інструменти, щоб зробити сідничний нерв, розташований між задніми та внутрішніми м'язами стегна та гомілкою кістки стегна, видимим. Було вивільнено нерв довжиною 1,5 см та був вирізаний його фрагмент 1 см. Вирізнена частина нерву була повторно імплантована, з'єднавши обидва залишки у обох кінцях із застосуванням двох нерозчинних епіневральних швів з 4/0 нейлонового моноволокна MEDICO (SHJIAZHUANG) INDUSTRIES AND TRADE CO., LTD. Під імплантат ми помістили тонкий шар Spomgostan, абсорбуючої желатинової губки, виробництва Johnson and Johnson, Варшава, Польща, розміром 1 на 0,5 см, яка була насичена клітинним гомогенатом у концентрації однієї одиниці на 1 мм 0,9 % NaCl. Розріз був зашитий як моношар, шкіра була знову дезінфікована для подальшого зростання та залишена відкритою. У контрольній групі тканина губки була насичена тільки 0,9 % NaCl. Післяопераційне відновлення та усі тварини були правильні, рани вилікувані з основним загоєнням та шкірні шви були видалені на 7-й день після процедури. Ми спостерігали помітно швидше зцілення ран в експериментальній групі. Після 12 тижнів тварини були омертвлені через використання тіопенталу, доданого у нормі 120 мг/кг. Мікрохірургія використовувалася щоб ізолювати нерв, який був прооперований, збираючи його фрагмент, який охопив проксимальний фрагмент, імплантат та віддалений фрагмент.

(Фіг. 4А та 4В). Виокремлений імплантат було розділено на 3 частини та розміщено у 4 % розчин буферизованого формаліну. Порівнюючи результати контрольної групи (Фіг. 5, 6) та експериментальної групи (Фіг. 7, 8, 9), значна різниця регенерації нерву в тому імплантаті, що належав периферії волокна нерва, але зв'язка на місцях, де була поміщена желатинова губка, насичена клітинним гомогенатом MIC-1. На місцях ми спостерігали активацію та стимуляцію парування стінних клітин та збільшення кількості тонких кровоносних судин. Віддалено, у нервових пучках було багато мієлінових та немієлінових аксонів, які є доказом процесу відновлення безперервності волокон нерва (Фіг. 7, 8). У центральних частинах імплантатів була менша частота мієлінових аксонів (Фіг. 9).

Приклад 9. Оцінка у природних умовах. Тканина м'язу (трицепс)

У цьому експерименті ми використовували молодих, 3-місячних мишей BALB/c вагою від 18 до 22 г кожна. Тварини були розділені на 2 групи з 4 мишей, експериментальну та контрольну групи. Миші з обох груп були прооперовані під анестезуючим засобом (внутрішньочеревний кетамін та ксилазин у розрахунку 50/5 мг/кг). Після гоління та дезінфекції шкіри Octenisept, розріз уздовж розкрив тонкі м'язи. Підколінне сухожилля було ушкоджено подрібненням області

приблизно 3 × 3 × 3 мм протягом 30 секунд із хірургічними шарнірними пристроями з тиском приблизно 80 кг/см. Шкіра була зашита як моношар, та рана була дезинфікована Ostenisept та залишена відкритою. Тваринам з експериментальної групи дали 7 доз по 0,5 мл клітинного гомогенату у концентрації 1 U/ml препарату в області ушкодження. Перша внутрішньом'язова ін'єкція була виконана відразу після дроблення та потім у 48-годинних інтервалах. У контрольній групі, за тим же самим зразком, ми використовували воду для ін'єкції. Зцілення завжди відбувалося правильно. Шви були зняті на 7-й день після хірургії. Ми спостерігали помітно швидшу регенерацію ран в експериментальній групі протягом 2 тижнів, як оцінено з використанням рухової активності мишей. З цією метою ми використовували пакет Smart 2.5.20 (на 5-й, 10-й та 15-й день після хірургії). Таблиця 3 та Фіг. 10 показують довжину шляху в сантиметрах та час відпочинку у секундах мишей протягом 180 секунд відеозапису.

Таблиця 3

	Експериментальна група		Контрольна група	
	Довжина шляху	Час відпочинку	Довжина шляху	Час відпочинку
Начальна дата	1875	32	2146	30
5 день	1250	61	980	75
10 день	1380	34	1154	77
15 день	1740	48	1352	58

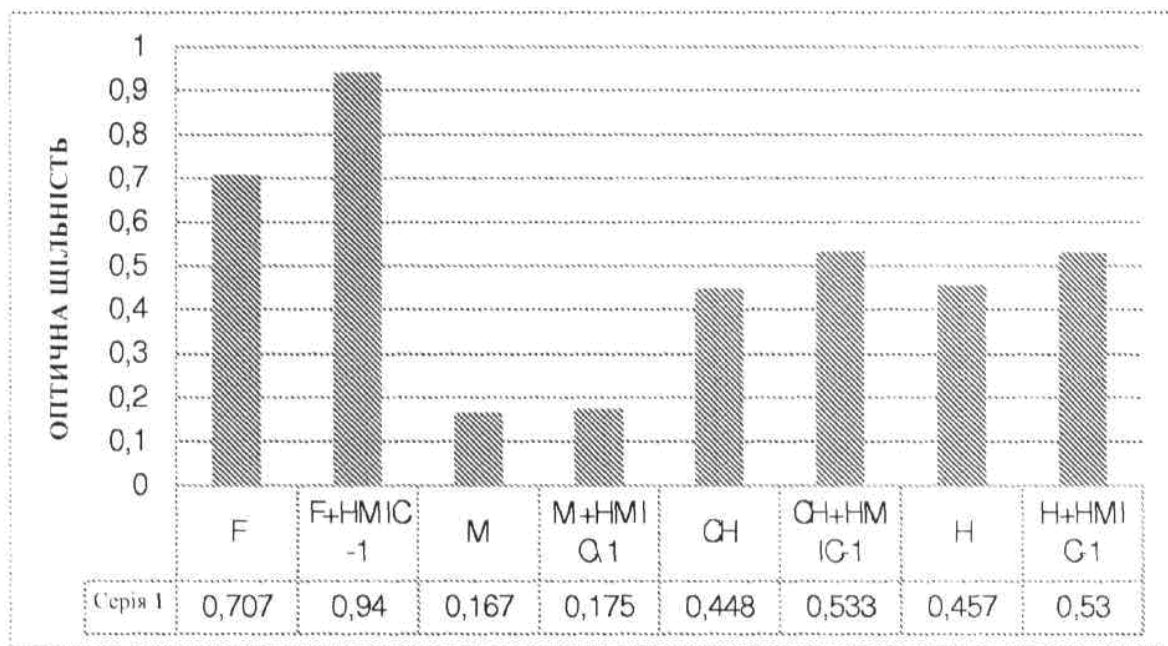
До того ж, ми спостерігали, що була вища рухова активність та коротші проміжки відпочинку у тварин, що одержують гомогенні ін'єкції. Після 2 тижнів (на 15-й день) ми зібрали фрагмент м'язу з області, що відновлювалась, щоб оцінити його гістологічно. Під час приготування ми спостерігали за допомогою мікроскопу, що ушкоджені області в експериментальній групі були меншими в кожному випадку, ніж у контрольній групі (Фіг. 11A-11D). Ці спостереження підтвердили те, що є результатом дослідження поведінки. Зібрані фрагменти були поміщені в 4 % буферизований формалін. Вони використовувалися для підготування гістологічних досліджень. У порівнянні з контрольною групою у всіх тварин, що одержували гомогенат у місці ушкодження, ми спостерігали повну регенерацію (Фіг. 12A, 12B, 13A, 13B).

Експерименти у лабораторних умовах та у природних умовах чітко підтверджують сприятливий вплив гомогенату на регенераційні процеси у всіх тканинах. В такий спосіб цей препарат повинен знайти багато використань як універсальний засіб для стимулювання регенерації тканин та органів. Варто згадати, що ці процеси відбуваються без рубцювання.

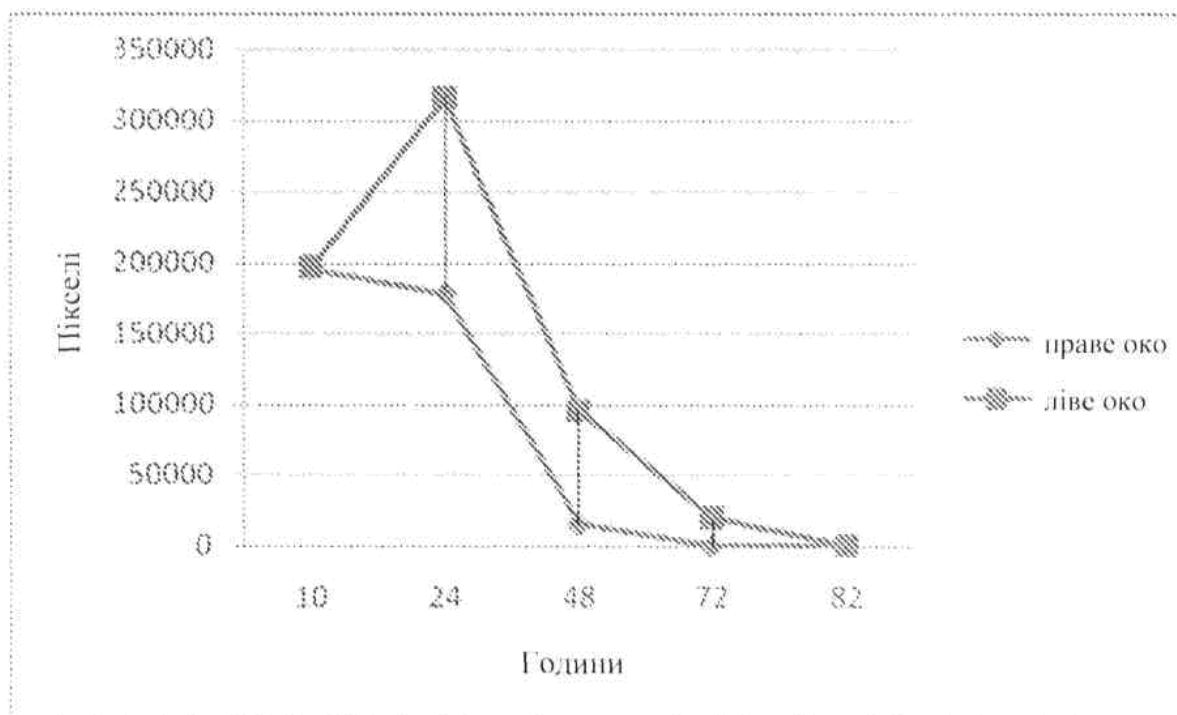
#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Клітинний гомогенат, вироблений за допомогою деструкції клітин, що належать лінії стовбурової клітини MIC-1, отриманої зі зростаючих рогів оленя (Cervidae), задепонованої у DSMZ під номером доступу DSM ACC2854.
2. Гомогенат відповідно до пункту 1 формули винаходу, який характеризується тим, що деструкція клітин виконана з використанням ультразвуку.
3. Гомогенат відповідно до пунктів 2 або 3 формули винаходу, який характеризується тим, що одна одиниця гомогенату включає екстракт з 1 мільйона клітин.
4. Спосіб одержання біологічно активного клітинного гомогенату, який характеризується тим, що підтримують клітинну культуру, клітини відділяють від середовища та потім піддають деструкції ультразвуком, де клітини, що використовуються, є клітинами лінії стовбурової клітини MIC-1, отриманої зі зростаючих рогів оленя (Cervidae), задепонованої у DSMZ під номером доступу DSM ACC2854.
5. Спосіб відповідно до пункту 4 формули винаходу, який характеризується тим, що культура є культурою на твердому середовищі або є суспензійною культурою.
6. Спосіб відповідно до пункту 4 або 5 формули винаходу, який характеризується тим, що вироблений титр гомогенату, який включає екстракт, отриманий з 1 мільйона клітин в одній одиниці.
7. Фармацевтична композиція або косметична композиція, що включає активний інгредієнт та фармацевтично допустимий носій, яка характеризується тим, що активний інгредієнт є гомогенатом, виробленим із клітин, що належать лінії стовбурової клітини MIC-1, отриманої зі зростаючих рогів оленя (Cervidae), задепонованої у DSMZ під номером доступу DSM ACC2854.
8. Композиція відповідно до пункту 7 формули винаходу, яка характеризується тим, що одна одиниця гомогенату включає екстракт з 1 мільйона клітин.

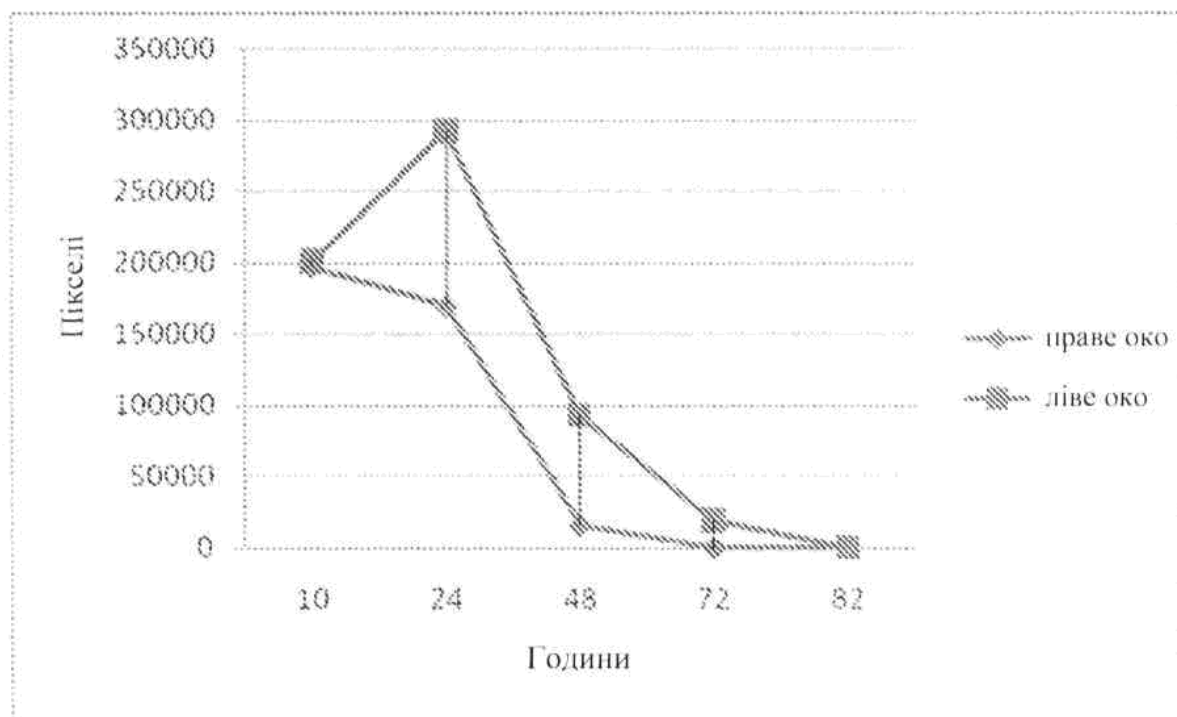
9. Композиція відповідно до пункту 7 або 8 формули винаходу, яка характеризується тим, що вона розроблена для локального або інтрадермального застосування.
10. Застосування гомогенату, виробленого із клітин, що належать лінії стовбурової клітини MIC-1, отриманої зі зростаючих рогів оленя (Cervidae), задепонованої у DSMZ під номером доступу DSM ACC2854, у виробництві препарату для медичного та/або косметичного лікування шкіри.
11. Застосування відповідно до пункту 10 формули винаходу, яке характеризується тим, що препарат розроблений для локального або інтрадермального застосування.
12. Застосування гомогенату, виробленого із клітин, що належать лінії стовбурової клітини MIC-1, отриманої зі зростаючих рогів оленя (Cervidae), задепонованої у DSMZ під номером доступу DSM ACC2854, у виробництві препарату для регенерації тканини, відібраної з числа нервової, епітеліальної та м'язової тканини.
13. Застосування відповідно до пункту 12 формули винаходу, яке характеризується тим, що препарат використовується у формі очних крапель, мазі, препарату, що вводиться, або препарату для насичення спонгостану.
14. Застосування відповідно до пункту 13 формули винаходу, яке характеризується тим, що композиція очних крапель включає в 1 мл гомогенат у розрахунку 10 Од/мл 50 мг або 10 Од/мл 25 мг, а також допоміжні речовини.
15. Застосування відповідно до пункту 14 формули винаходу, яке характеризується тим, що допоміжні речовини відібрані із групи, що включає полівініловий спирт, дивонатрієвий гідрогенфосфат, натрієвий гідрогенфосфат, хлорид натрію, хлорид бензалконію та воду.
16. Застосування відповідно до пункту 12 або 13 формули винаходу, яке характеризується тим, що очна мазь включає гомогенат у розрахунку 10 Од/мл 50 мг, препарат, що вводиться, включає гомогенат у розрахунку 10 Од/мл 100 мг, та препарат для насичення спонгостану включає гомогенат у розрахунку 10 Од/мл 100 мг.



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3

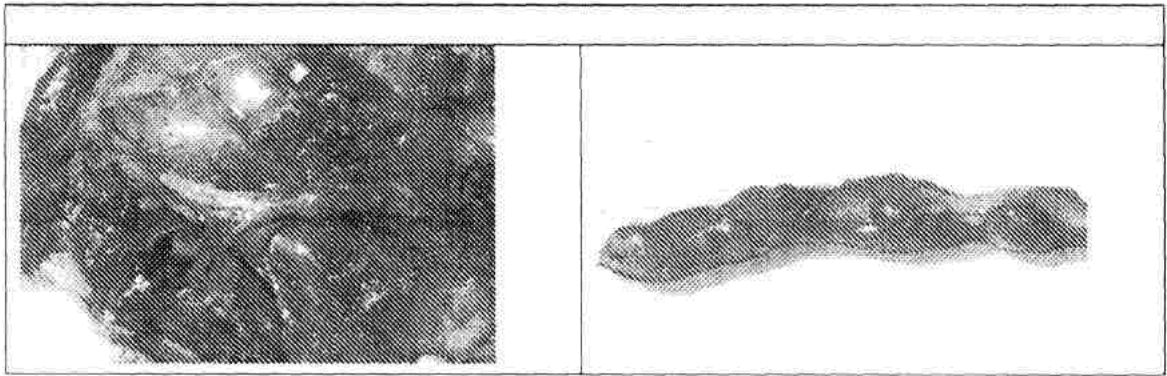


Fig. 4

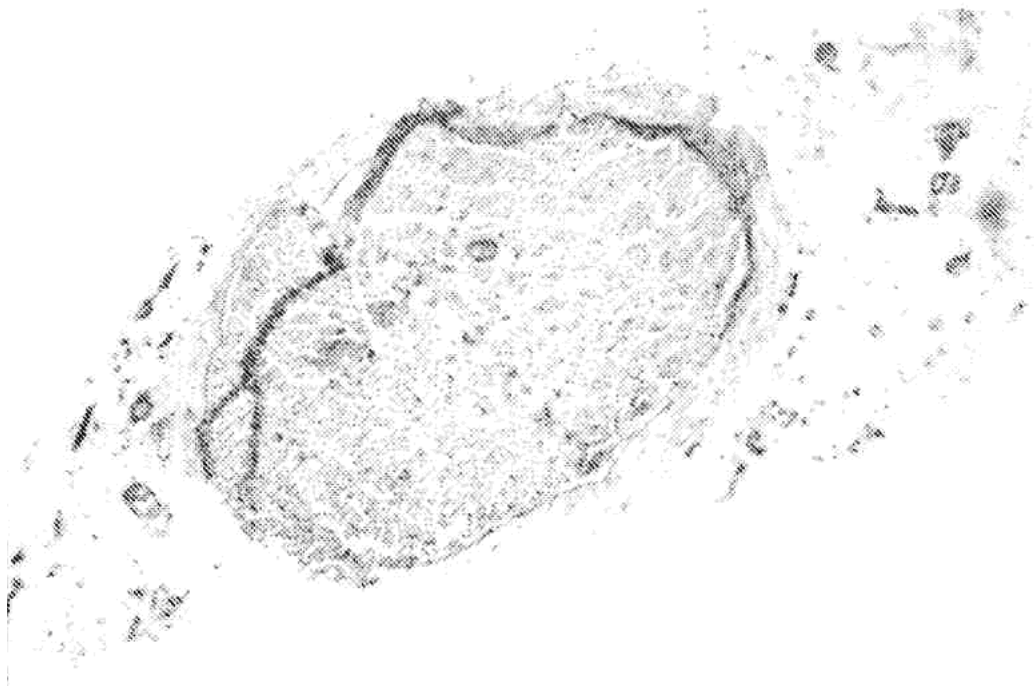


Fig. 5



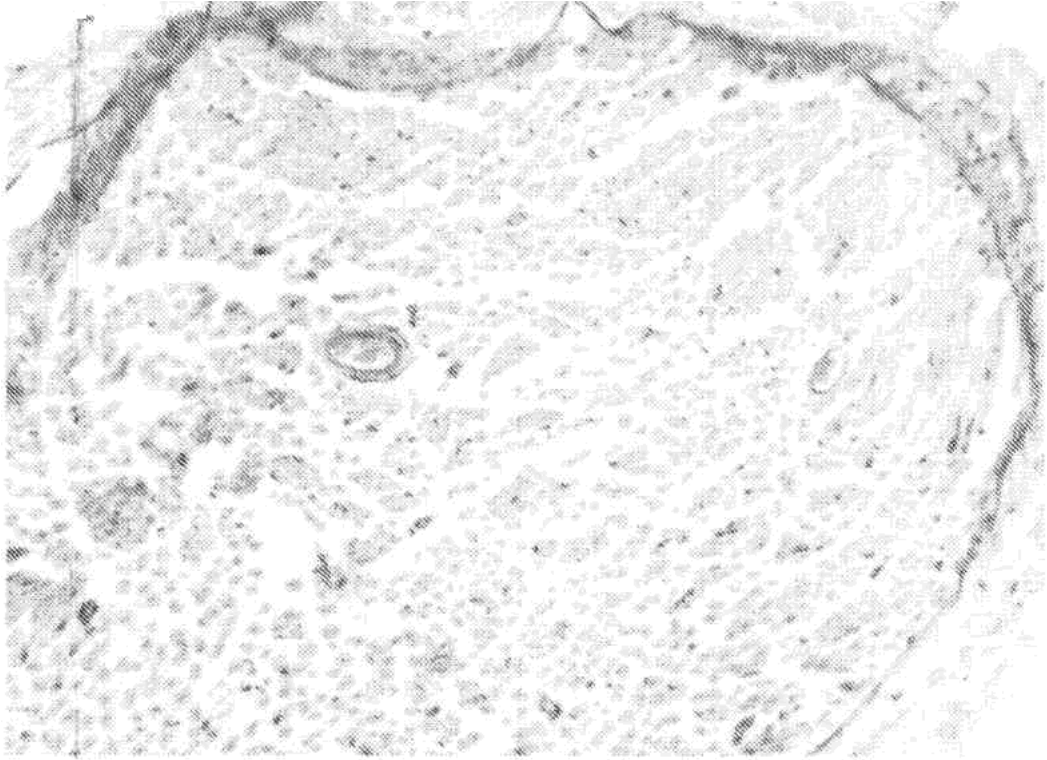


Fig. 6

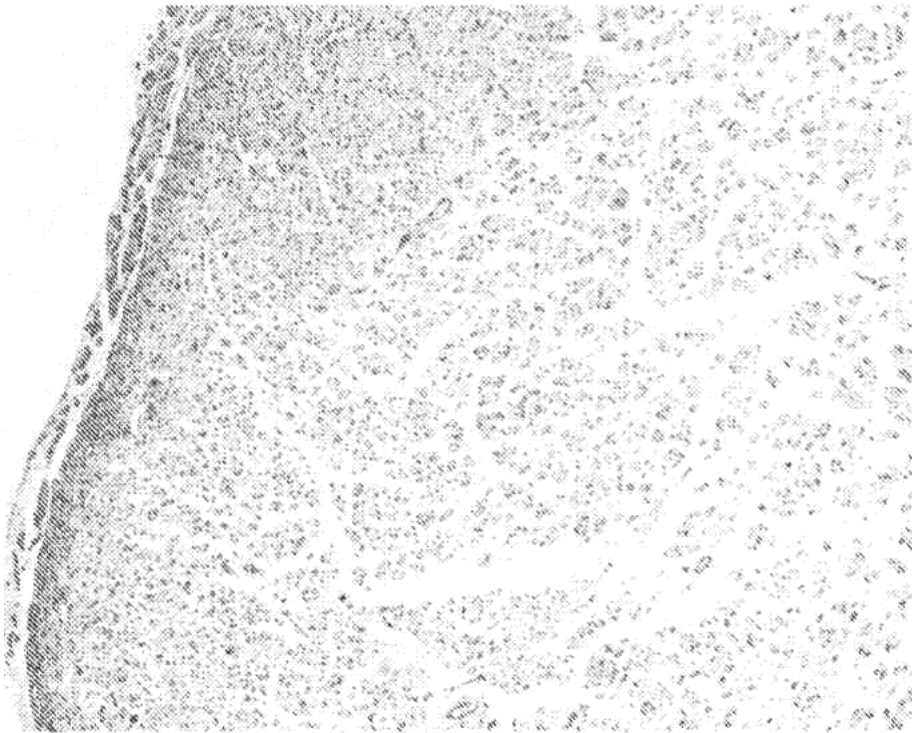


Fig. 7



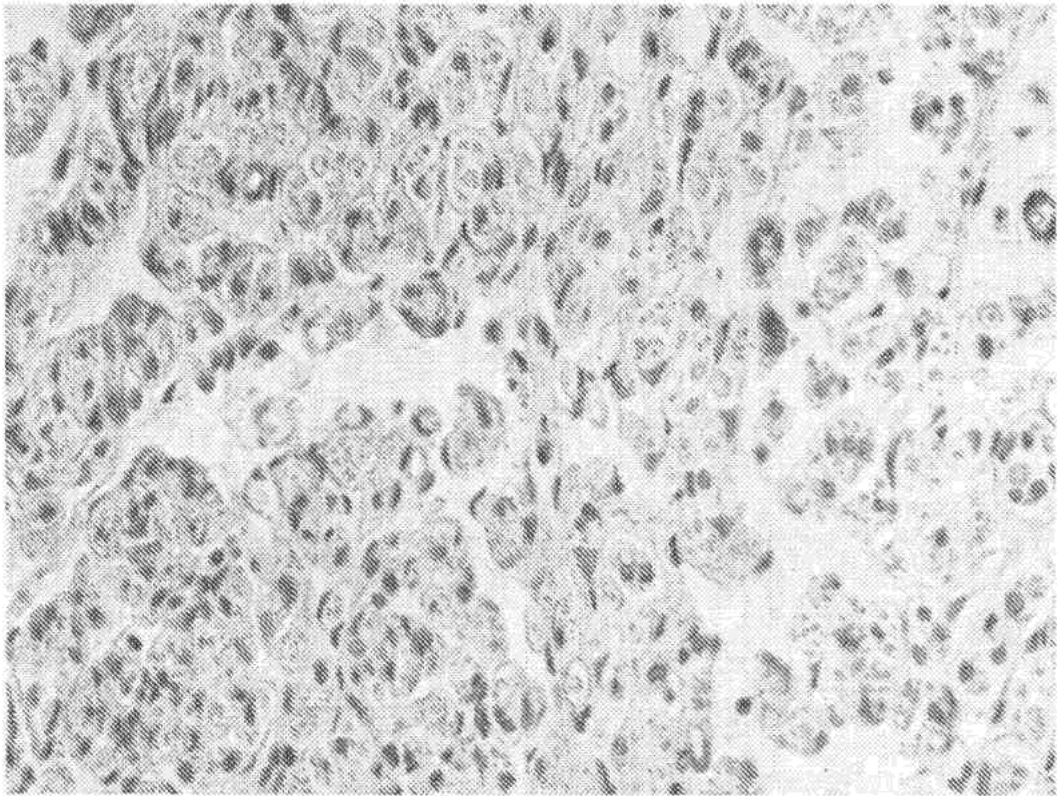


Fig. 8

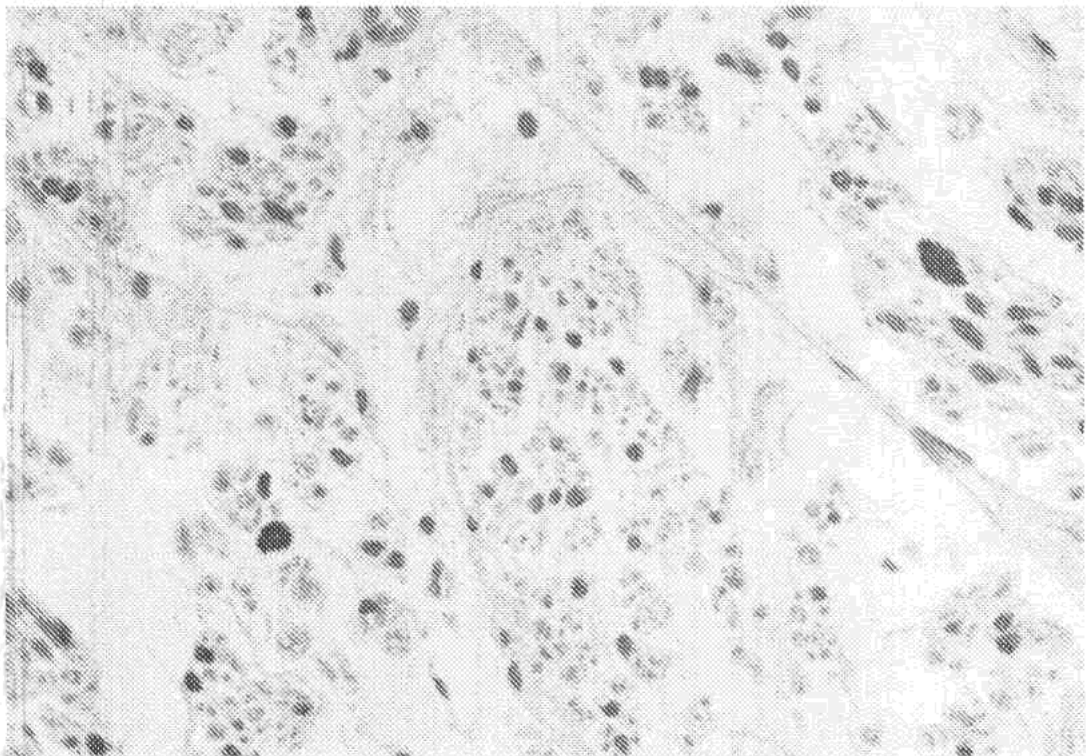


Fig. 9



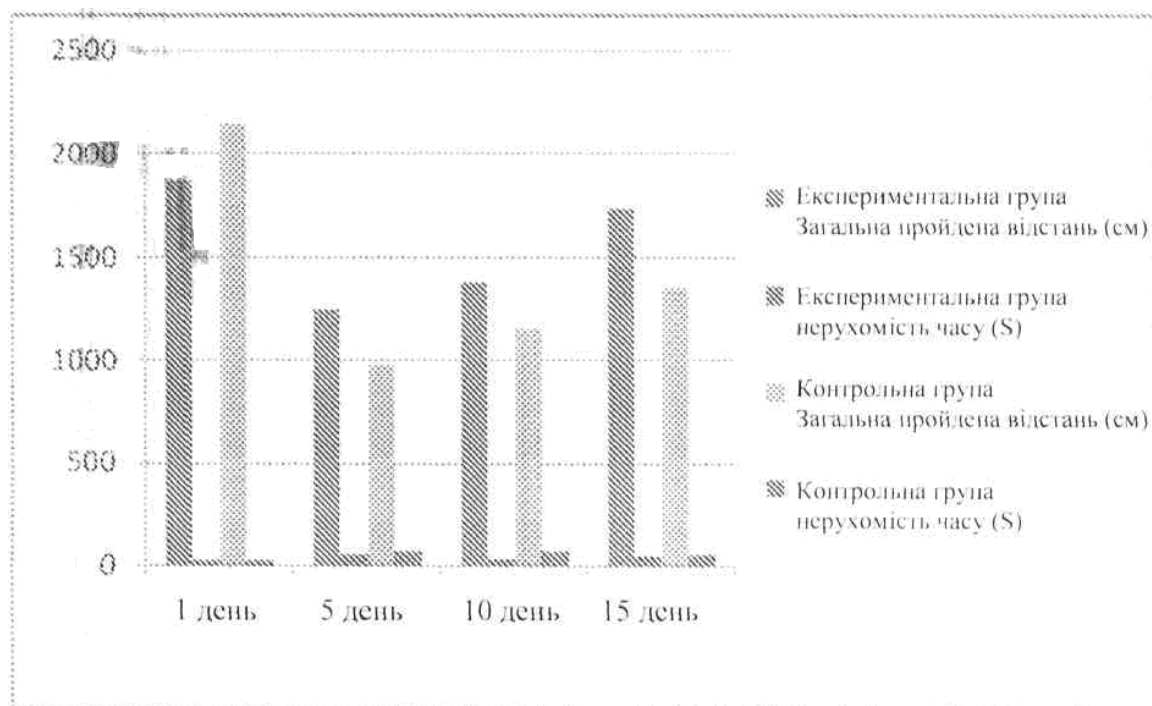


Fig. 10

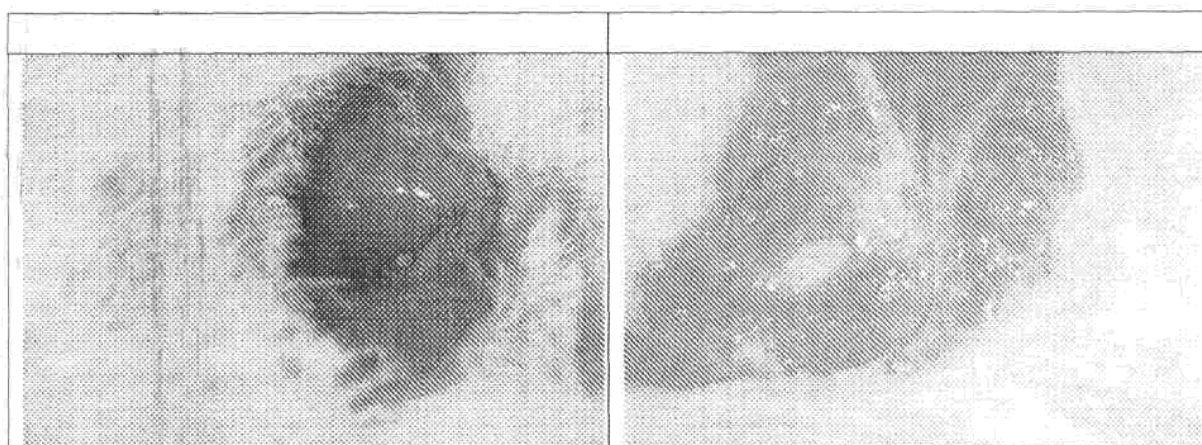


Fig. 11A

Fig. 11B

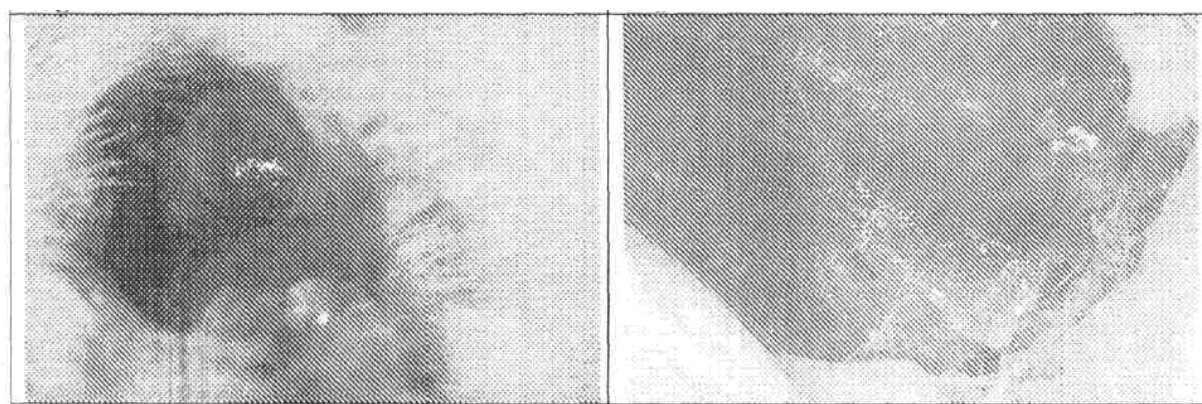


Fig. 11C

Fig. 11D



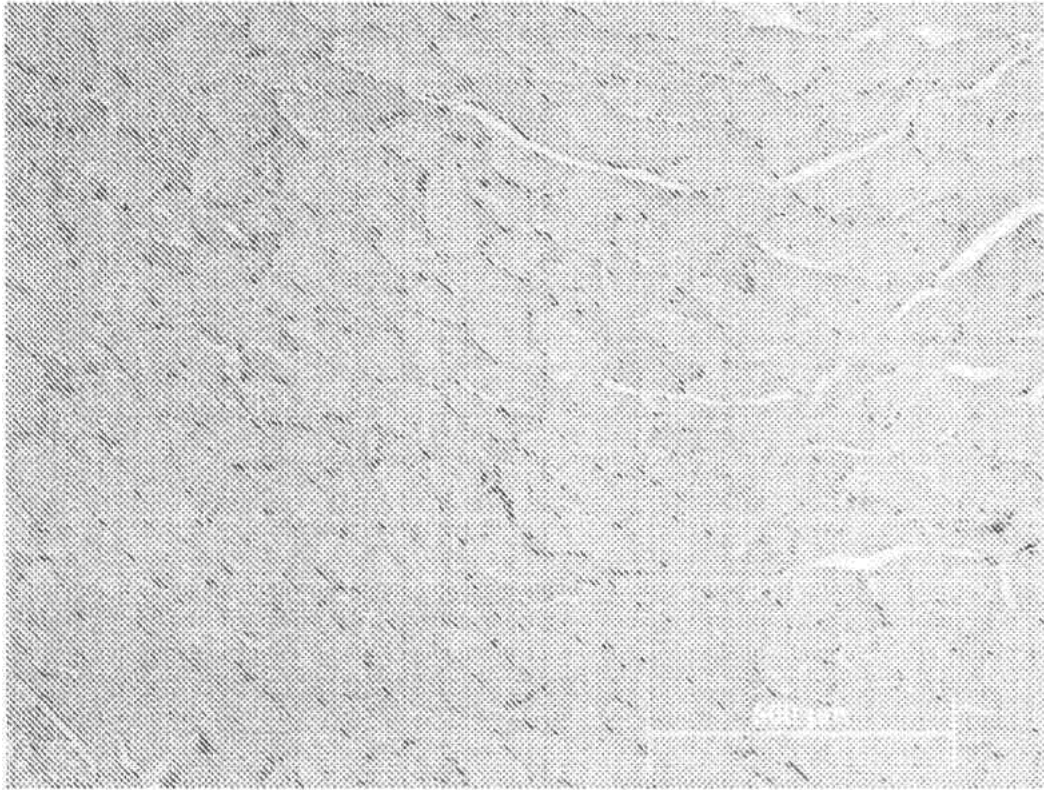


Fig. 12A

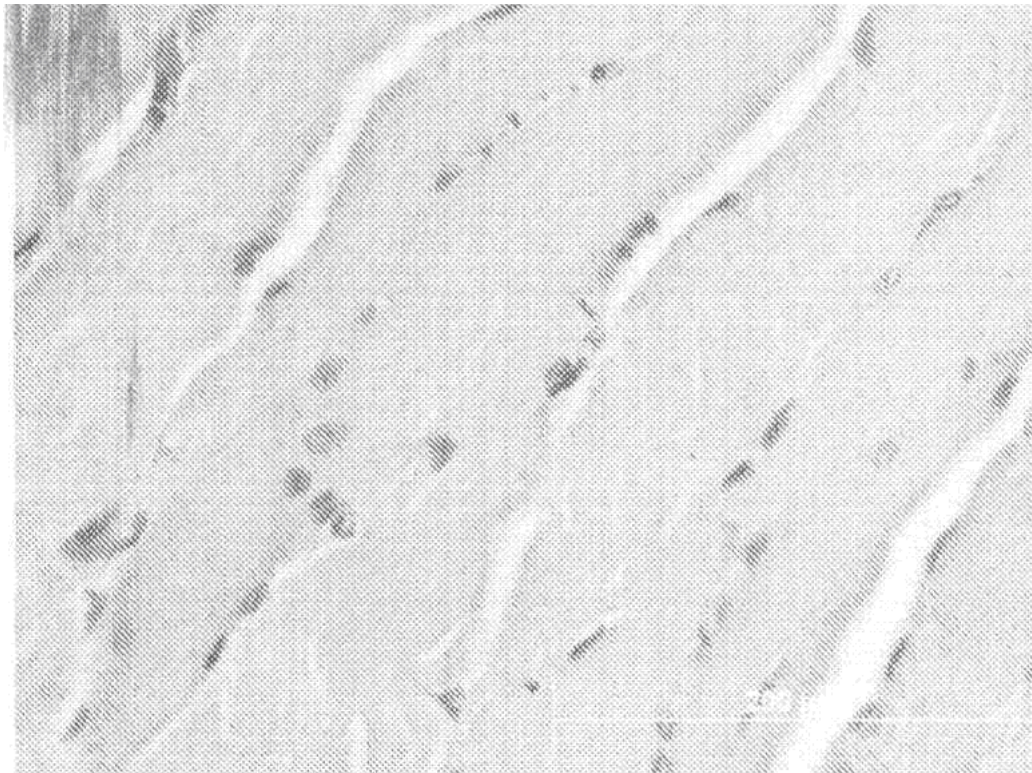


Fig. 12B



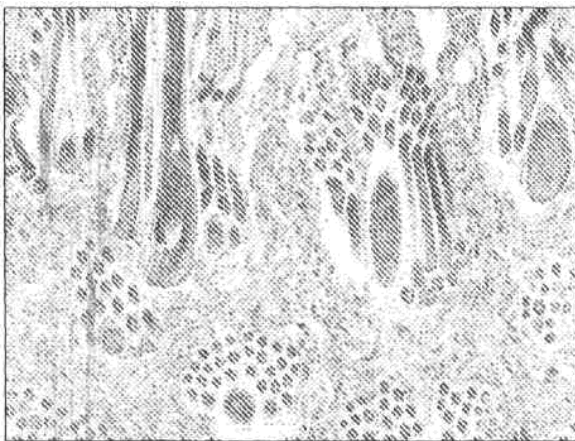


Fig. 13A

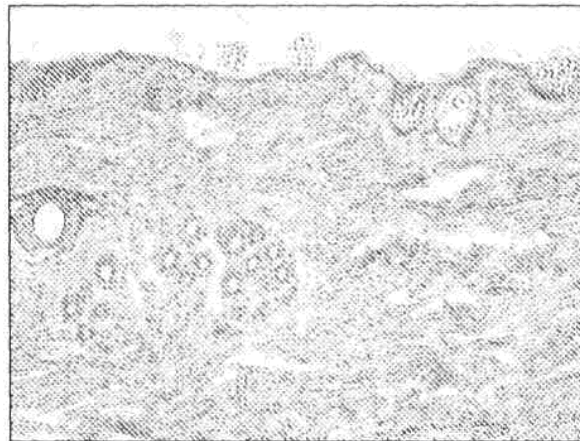


Fig. 13B

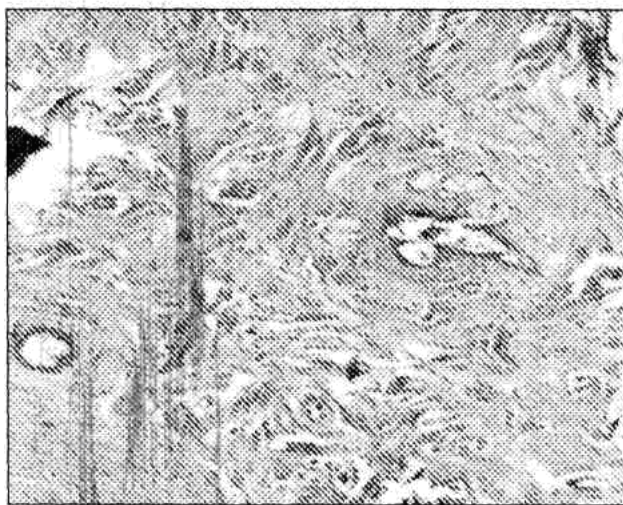




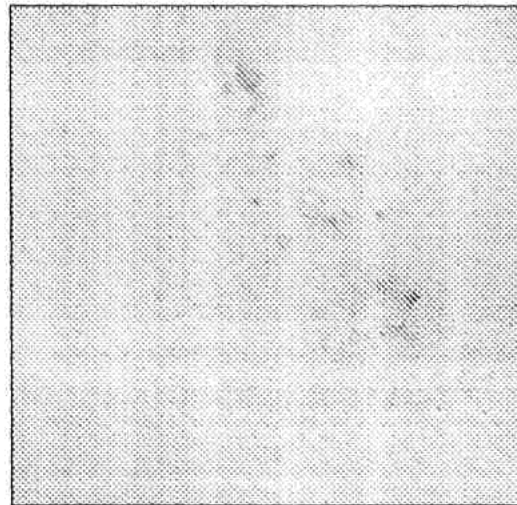
Фіг. 14А



Фіг. 14В



Фіг. 15



Фіг. 16

---

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

---

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