



УКРАЇНА

(19) UA (11) 16917 (13) U
(51) МПК (2006)
C12N 5/00
C12N 5/08

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КУЛЬТИВУВАННЯ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ

1

(21) u200607338

(22) 03.07.2006

(24) 15.08.2006

(46) 15.08.2006, Бюл. № 8, 2006 р.

(72) Білько Надія Михайлівна, Василовська Світлана Володимирівна, Білько Денис Іванович, Вотякова Ірина Андріївна, Бойко Роман Володимирович

(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "МЕДИЧНИЙ ЦЕНТР ТКАНИННОЇ І КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ "ЕМБРІОТЕК"

(57) Спосіб культивування клітин кордової крові, що включає вилучення популяції стовбурових клі-

2

тин та їх найближчих нащадків (а саме, АС 133+ клітин) з кордової крові шляхом очищення моноклеарної фракції кордової крові за допомогою АС133 антитіл-кон'югованих супермагнетичних мікронамистинок і Мінімакс-колонки, їх культивування in vitro з комплексом ростових факторів, наступне культивування у напіврідкому агарі і визначення кількості колоній, який **відрізняється** тим, що перед культивуванням in vitro додатково проводять інкубацію очищеної популяції клітин кордової крові з ростовим фактором Flt-3 у повному живильному середовищі протягом 12-18 годин.

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема гематології, онкології, трансплантології і може використовуватися для збагачення кордової крові стовбуровими клітинами для подальшої її аlogenної трансплантації.

Отримання популяції клітин, збагаченої стовбуровими клітинами та їх найближчими нащадками для подальшої трансплантації, є однією з головних задач експериментальної медицини.

Відомий спосіб вибору кордової крові як джерела стовбурових клітин і отримання моноклеарної фракції шляхом відстоювання кордової крові і центрифугування надосадової рідини в градієнті щільності лімфопрепу з наступним визначенням її функціональної активності через короткострокове культивування in vitro [декларційний патент України UA №65471A, МПК7 А61В5/145; бюл. №3, 2004р.]

Недолік цього способу полягає у отриманні цільної, а не очищеної фракції моноклеарних клітин. Тому кількісні розрахунки колонієутворення у аналога визначаються як сума числа колоній різного походження і різного рівня дозрівання. Цей спосіб не передбачає очищення популяції та збагачення її стовбуровими клітинами. В результаті чого не вдається отримати очищеної фракції, збагаченої стовбуровими клітинами. Ефективність і користь переливання неочищеної кордової крові не є високою, а присутність в ній лімфоцитів під-

вищує її імуногенність, що згодом негативно впливає на результати трансплантації. Крім того, відомо, що кількості стовбурових клітин у кордовій крові не достатньо для відновлення кровотворення у дорослої людини.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є спосіб вилучення популяції стовбурових клітин та їх найближчих нащадків (а саме, АС133+ клітин) шляхом очищення моноклеарної фракції кордової крові за допомогою АС133+ антитіл-кон'югованих супермагнетичних мікронамистинок і Мінімакс-колонки (Miltenyi Biotec, Germany) і наступним культивуванням АС133+ клітин in vitro з комплексом ростових факторів (цитокінів), а саме гранулоцитарно-макрофагальним (GM-SCF), LIF (лейкемієінгібуючим) і IL-3 (інтерлейкіном 3) [Bilko N.M., Votjakova L.A., Vasylovska S.V., Bilko D.I. Characterization of the interactions between stromal and haematopoietic progenitor cells in expansion cell culture models // Cell biology.- 2005. - V.29, p.83-86. Копія оригіналу статті та її переклад надані у Додатку №1 до матеріалів заявки].

Такий спосіб дозволяє отримати очищену фракцію клітин і збагатити її стовбуровими клітинами з високим проліферативним потенціалом, про що свідчать колонії, які виростають при наступному культивуванні у напіврідкому агарі.

Але недоліком цього способу є порівняно невисокий рівень функціональної активності стовбу-

(19) UA (11) 16917 (13) U

рових клітин, обумовлений їх примітивністю. В результаті чого кількість колоній не є високою, тобто їх проліферативний потенціал не розкривається.

Причиною цього, на наш погляд, є умови культивування, які хоча забезпечують підтримку клітин-попередників, але не сприяють значному збільшенню їх кількості.

В основу корисної моделі поставлена задача підвищення ефективності способу культивування стовбурових клітин за рахунок створення оптимальних умов для їх активної проліферації і диференціації.

Поставлена задача вирішується за рахунок того, що у способі культивування AC133+ клітин кордової крові, який включає вилучення популяції стовбурових клітин та їх найближчих нащадків (а саме, AC133+ клітин) з кордової крові шляхом очищення моноклеарної фракції кордової крові за допомогою AC133 антитіл-кон'югованих супермагнетичних мікронамистинок і Мінімакс-колонки, їх культивування *in vitro* з комплексом ростових факторів (цитокінів), наступне культивування у напіврідкому агарі і визначення кількості колоній, додатково проводять інкубацію очищеної популяції клітин кордової крові з ростовим фактором Flt-3 (Lot 073K1435). Інкубацію проводять перед культивуванням *in vitro* у живильному середовищі протягом 12-18 годин.

Між сукупністю суттєвих ознак способу, що заявляється, і технічним результатом, що досягається, мається наступний причинно-наслідковий зв'язок.

Найближчі нащадки стовбурових гемопоетичних клітин, такі як AC133+ клітини, мають обмежену здатність реагувати на дію цитокінів. Але під час «дозрівання», тобто переходу стовбурових клітин на наступні ступені розвитку, їх здатність відповідати на дію цитокінів проявляється яскравіше. Причина такого феномену знаходиться у природі рекомбінантного ростового фактора Flt3/FLK2 (Sigma), відомого ще під назвою STK-1, stem cell tyrosine-kinase-1 чи CD135, який функціонує шляхом активації рецепторів c-kit і Flt3-тирозинкінази. Виходячи з цього, призначення Flt3 зводиться, в першу чергу, до сприяння просуванню первісної популяції на наступні етапи розвитку, в результаті чого підвищується чутливість клітин до цитокінів, спостерігається накопичення функціонально активних нащадків стовбурової клітини, і, як наслідок, досягається високий рівень показників колонієутворення в культурі *in vitro*.

Серед клітинних популяцій кордової крові, генетогенність яких не викликає сумнівів, активніше на цитокіни реагують моноклеарні клітини, серед яких знаходяться зріліші попередники. AC133+ клітини менше реагують на цитокіновий комплекс, тобто експансія їх у цих умовах значно менша. Але інкубація їх протягом 12-18 годин із Flt3 з подальшою заміною супернатанту і додаванням у культуру комплексу цитокінів у повному живильному середовищі підвищує як кількість ядровмісних кровотворних клітин, так і кількість колонієутворюючих одиниць.

Вказана у способі, що заявляється, тривалість інкубації, тобто обробки клітин фактором Flt-3, є оптимальною і вибрана у зв'язку з тим, що до 12 годин ефект стимуляції функціональної активності кровотворних клітин-попередників при культивуванні кордової крові спостерігається незначний. Протягом 12-18 годин - максимальний. А у наступні після 18 годин (20 годин, 24 години) - зменшується, і це може пояснюватися тим, що довший період інкубації без комплексу інших ростових факторів не сприяє росту числа колоній у культурі.

Заявлений спосіб здійснюється таким чином.

Кордову кров отримують під час пологів у здорових жінок віком від 20 до 30 років. Вилучення стовбурових клітин та клітин-попередників з кордової крові проводять за допомогою імуноселекції з використанням моноклональних антитіл до AC133 (CD133) рецепторів [de Wynter E.A, Buck D., Hart C. et al. CD 34+ AC133+ cells isolated from cord blood are highly enriched in long-term culture-initiating cells, NOD-SCID-repopulating cells and dendritic cell progenitors // Stem cells. - 1998. - V.16, p.387-396]. Популяція AC133+ вважається найбільш чистою популяцією ранніх проліферуючих кровотворних елементів, безпосередніх нащадків поліпотентної стовбурової клітини. Процедуру здійснюють за допомогою AC133+ антитіл-кон'югованих супермагнетичних мікронамистинок і Мінімакс-колонки (Miltenyi Biotec, Germany) протягом 30 хвилин при 4°C. Збагачені примітивними популяціями клітинні суспензії проводять через другу колонку, досягаючи очищення більш як на 90%.

Далі проводять інкубацію очищених клітин кордової крові (AC133+) протягом 16 годин (12-18 годин) в умовах CO₂ інкубатора при 37°C з ростовим фактором Flt3 з розрахунку, в даному випадку, 10нг на 1мл середовища.

Після заміни середовища у культуру додають комплекс цитокінів, в даному випадку, LIF+ IL-3+GM-CSF, у таких концентраціях: LIF 10нг/мл+IL-3 10нг/мл, (інтерлейкін-3)+GM-CSF 10нг/мл (гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор). Цей протокол комбінації факторів і їх концентрації можуть бути зміненими в залежності від задач, що вирішуються.

Після чого, клітини культивують у коміркових планшетах фірми NUNC (по 1x10³ на кожну комірку) протягом 1-го тижня в умовах абсолютної вологості, 5% CO₂ і температурі 37°C. Для постановки культуральних досліджень використовують живильне середовище RPMI (СІЛА), 15% фетальну телячу сироватку Sigma (США), рекомбінантні ростові фактори у приведених вище концентраціях, 10ммоль/л Hepes, 2ммоль/л глютаміна, 5x10⁵/моль/л 2-меркаптоетанола, антибіотики (пеніцилін і стрептоміцин по 50Од/мл). Суспензію культивованих клітин збирають в окремі пробірки і центрифугують при 1000об/хв. протягом 5 хвилин у фосфатному буфері.

Для оцінки наявності серед культивованих клітин нащадків стовбурових клітин їх культивують вже у інших умовах, а саме у напіврідкому агарі *in vitro* у коміркових планшетах фірми NUNC у прису-

тності ГМ-КСФ (10нг/мл) [Summers Y., Heyworth C., de Wynter E., Hart C. e.a. AC133+ G₀ cells from cord blood show a high incidence of long-term culture-initiating cells and capacity for more than 100 million-fold amplification of colony-forming cells in vitro // Stem cells. 2004 - V.22, P.704-715]. Визначають кількість комітованих колоній мієлоїдних попередників (грануломоноцитарних, гранулоцитарних, макрофагальних), які виростають за 10-14 днів. Кожна отримана колонія формується однією стовбуровою клітиною або її найближчим нащадком.

В Таблиці наведені результати функціональної активності (ефективності колонієутворення) AC133+ клітин кордової крові в культурі in vitro, отримані при реалізації способу-найближчого аналога і способу, що заявляється, який включає процес інкубації з фактором Flt3. Для останнього наведені результати для 3-х прикладів його реалізації, коли термін інкубації містився у межах та поза межами часового інтервалу, що заявля-

ється. Всі інші умови, наведені вище, для реалізації обох способів були однаковими.

Результати показали, що ефективність колонієутворення AC133+ клітин при культивуванні у відповідності з заявленим способом у 7 разів перевищує дані, отримані при реалізації способу-найближчого аналога.

Таким чином, перевагою корисної моделі є розробка способу отримання високого рівня концентрації стовбурових клітин та їх найближчих нащадків (клітин-попередників) у очищеній фракції кордової крові (AC133+ клітин).

Запропонований спосіб забезпечить більш ефективне культивування фракцій кордової крові і може успішно застосовуватись у лабораторіях для збагачення стовбуровими клітинами клітинної популяції, призначеної для аlogenної трансплантації.

Рішення цієї задачі тісно пов'язане з розвитком новітніх біотехнологій, зокрема, цитокін-регулюючих технологій, і має важливе народногосподарське значення.

Таблиця

Показник кордової крові	Найближчий аналог	Корисна модель, що заявляється		
Умови культивування суспензії клітин кордової крові	Згідно з описом способу	Згідно з описом способу, при умові, коли термін інкубації з Flt-3 становив:		
		до 12 год.	16 год.	після 18 год.
Колонієутворення КУО-ГМ	31,3±1,5*	55,6±0,6	212,3±1,0*	180,2±1,5

Примітка: * - відмінність між порівнюваними показниками статистично достовірна (P<0,001)

КУО-ГМ - показник колонієутворення (колонієутворююча одиниця - грануломоноцитарна).