



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 100881

(13) U

(51) МПК

A61K 35/28 (2015.01)

A61K 35/51 (2015.01)

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 5/077 (2010.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ****(21)** Номер заявки: **u 2015 02276****(22)** Дата подання заявки: **16.03.2015****(24)** Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.08.2015****(46)** Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.08.2015, Бюл.№ 15****(72)** Винахідник(и):**Кордюм Віталій Арнольдович (UA),
Дерябіна Олена Григорівна (UA),
Маслова Ольга Олександрівна (UA),
Шувалова Надія Сергіївна (UA)****(73)** Власник(и):**Кордюм Віталій Арнольдович,
вул. Артема, 53, кв. 25, м. Київ, 02053 (UA),
Дерябіна Олена Григорівна,
вул. Прорізна, 3, кв. 21, м. Київ, 01001 (UA),
Маслова Ольга Олександрівна,
вул. Огієнка, 73-а, кв. 2, м. Кам'янець-
Подільський, Хмельницька обл., 32300 (UA),
Шувалова Надія Сергіївна,
пров. Лабораторний, 4, кв. 23, м. Київ,
01133 (UA)****(54) ЗАСІБ ДЛЯ ВІДНОВЛЕННЯ УРАЖЕНИХ ТКАНИН ОРГАНІЗМУ ЛЮДИНИ****(57)** Реферат:

Засіб для відновлення уражених тканин організму людини являє собою мезенхімальні стовбурові клітини сполучної тканини пуповини новонародженого з попередньо видаленими кровоносними судинами та подрібненої до розмірів не більше 0,5 см з наступним культивуванням клітин з трикратним перенесенням подрібненої тканини пуповини в свіже культуральне середовище для досягнення необхідної сумарної кількості мезенхімальних стовбурових клітин, причому пересів клітин та їх збір проведено протягом не більше двох пасажів, а клітини, що виділені з моношарів в ефективній для клінічного використання кількості, перенесені у відповідний рідкий носій.

UA 100881 U

Корисна модель належить до біотехнології та медицини, зокрема до клітинної терапії, та може бути використана при лікуванні пошкоджень та захворювань тканин організму людини.

Велика кількість людських медичних порушень, станів та хвороб не піддаються лікуванню із застосуванням існуючих засобів медикаментозної терапії та трансплантації або вони є тимчасовими.

Протягом останніх років відбувається активний пошук альтернативних рішень лікування пошкоджень та захворювань тканин організму людини. Найперспективнішим рішенням є клітинна терапія з використанням аутологічних та алогенних мезенхімальних стовбурових клітин (МСК).

Відомо технічне рішення, представлене в патентній заявці США № 2003/0017587. Ембріональні стовбурові клітини отримують з недоношеного плоду або свіжих ембріонів, або заморожених бластоцист. Відразу після виділення ембріональних стовбурових клітин вводять культуральне середовище, доповнене факторами росту, ембріональною сироваткою великої рогатої худоби, лейкоїєм-інгібуючим фактором, фактором росту фібробластів та ін.

Вказані ембріональні стовбурові клітини є ефективним джерелом спеціалізованих диференційованих клітин для регенеративного терапевтичного застосування.

Значним недоліком вказаного засобу є велика вірогідність побічних ефектів після введення клітин до організму пацієнта. Крім того, слід відзначити обмежену кількість сировини для виділення вказаних клітин та існуючі на сьогоднішній день етичні проблеми, пов'язані з ними.

Ще одним відомим рішенням є засіб для клітинно-замісної терапії дефектів м'яких тканин (RU 2522816 C1). Відома композиція містить стовбурові клітини з амніотичної рідини людини з фенотипом CD73+/CD90+/CD105+/-, живильне середовище, еритропоєтин, епідермальний фактор росту та колаген, що взяті в ефективній кількості. Вказаний засіб призначений для регенерації м'яких тканин невеликих об'ємів. Позитивним внеском відомого засобу є зниження концентрації клітин, які ініціюють регенерацію в місці дефекту тканин.

На сьогодні найбільш популярним методом клітинної терапії є використання аутологічних та алогенних МСК, отриманих з кісткового мозку. Проте, процедури отримання клітин з цього органу є досить небезпечними та часом недостатньо ефективними. До більш сучасних джерел МСК відносять жирову тканину, плаценту, кордову кров.

Але найбільш перспективним напрямком згаданих вище об'єктів слід вважати сполучну тканину (матрикс, пуповинний канатик або Вартонові драгли) пуповини. Безсумнівною перевагою цього джерела МСК є його доступність і відповідність нормам етичності.

Клітини пуповини є молодими та активними порівняно із стовбуровими клітинами з інших джерел. Вони можуть перетворюватись практично у всі клітини організму. До того ж, їх отримання не потребує травматичного втручання.

Матрикс пуповини збагачений онтогенетично ранньою популяцією клітин, які здатні до більш широкого спектра диференціації, аніж МСК з інших джерел, мають посилену здатність до руху в напрямку місця ураження (хоумінгу) та не схильні викликати конфлікт з імунною системою реципієнта. Клітини матриксу пуповини, завдяки своїм імунофенотиповим характеристикам, можуть бути використані як для аутологічної, так і для алогенної терапії.

МСК, що містяться в пуповині, застосовуються для відновлення органів при інфаркті, інсульті, цирозі печінки, гепатитах, травмах, опіках, цукровому діабеті, неспецифічному виразковому коліті, хворобах Крона та ін. Також вони покращають стан імунної системи.

У патенті RU 2347579 C1, опублікованому 27.02.2009 р., описано спосіб одержання клітинної культури для лікування захворювань нервової системи. Вказана клітинна культура одержана за допомогою виділення з вени пуповини новонародженого МСК з використанням ферменту, їх культивування до формування моношару, з наступним його переведенням у суспензію шляхом обробки сумішшю розчину Версена та розчину трипсину, після промивання суспензію осаджують центрифугуванням, осад клітин ресуспендують у стерильному фізіологічному розчині. Одержані алогенні МСК пуповини в кількості 0,5-5,0 млн клітин переносять до 5 мл фізіологічного розчину.

Суттєвим недоліком розглянутого рішення є те, що застосування ферментів може змінювати характеристики клітин та впливати на їх терапевтичний потенціал. Крім того, ефект від введення клітинного матеріалу починає проявлятися не раніше двох тижнів, а клітинний матеріал має малі терміни зберігання, що підтверджує його недостатню стабільність.

Ще одним недоліком відомого патенту є недостатня кількість стовбурових клітин у сполучній тканині пуповини, які виділяються без культивування, що дуже важливо для проведення негайних медичних маніпуляцій.

Задачею корисної моделі є удосконалення засобу для відновлення уражених тканин організму людини шляхом використання особливої послідовності дій та прийомів культивування МСК пуповини, в результаті чого досягається стабільність культур клітин, максимальне

нарощування маси кількості клітин, запобігання злоякісній трансформації клітин та швидкому старінню популяції, підвищення ефективності потрапляння введеного матеріалу до ділянок, що найбільш його потребують.

Поставлена задача вирішується тим, що засіб для відновлення уражених тканин організму людини, згідно з корисною моделлю, являє собою МСК сполучної тканини пуповини новонародженого з попередньо видаленими кровоносними судинами та подрібненої до розмірів не більше 0,5 см з наступним культивуванням клітин з трикратним перенесенням подрібненої тканини пуповини в свіже культуральне середовище для досягнення необхідної сумарної кількості МСК, причому пересів клітин та їх збір проведені протягом не більше двох пасажів, а клітини, що виділені з моношарів в ефективній для клінічного використання кількості, перенесені у відповідний рідкий носій.

Авторами цієї корисної моделі проаналізовані властивості і відповідні можливості використання МСК пуповини позасудинної локалізації. За своєю природою МСК сполучної тканини пуповини в момент народження дитини є ембріональними, іншими словами, закладаються в пуповині в процесі ембріогенеза, що і визначає популяцію збережених ембріональних МСК.

Однією з вимог до матеріалу МСК пуповини є однорідність, у зв'язку з чим запропоновано попередньо видалити з фрагментованого вмісту внутрішньої частини пуповини судини та інші фрагменти, що не відповідають однорідності та швидкості росту.

Умови існування МСК в організмі діаметрально протилежні, тим, що створені в культурі. В організмі МСК знаходяться в спеціальному клітинному оточенні, зануреному у складний за структурою та функціям міжклітинний матрикс. Мультиплікація клітин супроводжується їх змінами, у зв'язку з чим необхідно знайти такі умови, які звели б до мінімуму вплив вказаних змін, що в кінцевому результаті, забезпечить одержання потрібного об'єму біомаси.

В рішенні, що заявляється, передбачено збільшити до максимуму об'єм одержаної біомаси, що здійснюється за допомогою виявлення відповідної сукупності дій та прийомів мультиплікації (або культивування клітин).

Розмір подрібненої тканини пуповини вибрано в межах не більше 0,5 см, що обумовлено значним полегшенням виходу клітин з пуповини.

Суттєва особливість корисної моделі, що заявляється, полягає в тому, що клітини активно виходять з фрагментованого вмісту пуповини і залишаються в культуральному посуді без примусового відкріплення і переносу в новий культуральний посуд.

В новий культуральний посуд були поміщені тільки фрагменти попередньо обробленої тканини пуповини, після чого мультиплікація повторювалась до досягнення необхідної кількості МСК пуповини. На цій стадії культивування, клітини, що вже вийшли, також не були піддані примусовому відкріпленню. Тобто без механічного або ферментативного втручання були отримані клітини нульового пасажу в значно більшій кількості, ніж це передбачено виконанням інших дій та прийомів, які застосовувались раніше.

Вказані вище дії мультиплікації сприяють збереженню стабільності виділених МСК відносно комплексу їх споживчих властивостей.

Дії, направлені на пересів та збір МСК не несуть особливий вклад у властивості клітин, але авторами виявлено, що виконання цих дій в два пасажі впливає на досягнення кінцевого технічного результату, а саме: зберігання їх поверхневої структури і максимальної інтактності.

Крім того, авторами показано, що одержані МСК при необхідності можуть бути піддані кріоконсервації, для чого успішно використовується матеріал, одержаний після першого пасажу.

Але, при необхідності негайного застосування засобу, що заявляється, використовують клітини, зняті в другому пасажі і масштабовані до потрібної лікувальної дози. Крім того, готова повнорозмірна доза може бути кріокон-сервована і придатна до використання одразу після розконсервування.

Лікування засобом, що заявляється, і призначене для попередження, купірування, відновлення широкого кола патологій, у тому числі печінки, суглобів, слизової оболонки носу, добре поєднується з іншими необхідними терапевтичними засобами.

Корисна модель ілюструється детальним описом одержання засобу, що заявляється, і підтвердженням його ефективності при відновленні уражених тканин організму.

Пуповини отримують від здорових породіль під час нормальних пологів. Надані частини пуповини транспортують у скляних пляшках при кімнатній температурі в середовищі ДМЕМ або фосфатному буферному розчині (ФБР) без сироватки з додаванням 10-кратної концентрації антибіотиків (пеніцилін та стрептоміцин, 1 мг та 1000 одиниць на см³, відповідно) та 1-кратної концентрації амфотерицину Б (2,5 мкг/мл).

Сполучену тканину пуповини (пуповинний канатик) дістають з розчину, максимально відмивають від крові, на 20-30 хвилин поміщають в нове середовище Ігла або ДМЕМ з антибіотиками (10-кратна концентрація) та антимікотиком у звичайній концентрації. Усі маніпуляції проводяться у стерильних умовах.

5 Перед початком обробки пуповини вилучають з наданого фрагмента судини - 2 артерії та 1 вену. Для цього пуповину ріжуть поперек на частки приблизно 1,5-2 см, добре відмивають їх від залишків крові, щоб досягти мінімальної кількості еритроцитів.

Проводять обрізання сполучної тканини (Вартонових драглів) (ВД) навколо вени, разом з артеріями, і вміщують їх в чашку Петрі в свіже середовище без антибіотиків і сироватки, звільняючись таким чином від вени. В отриманих шматках матриксу пуповини за допомогою пінцетів видаляють артерії.

10 Очищені фрагменти ВД, подрібнені ножицями до найменш можливого розміру 0,1-0,5 см, переносять в культуральний флакон з поверхнею 25 см² або 75 см² з ростовим середовищем ДМЕМ або α -МЕМ, з додаванням 10 % ембріональної сироватки КРС, 2 mM L-глутаміну та FGF2 0,0025 мкг/мл який знаходився перед цим при 37 °C в термостаті.

15 Коли середовище змінило колір в бік пожовтіння, проводять часткову його зміну свіжою порцією - одну третину або половину поживного середовища, в яких культивували експланти, замінюють свіжим. Таку процедуру виконують у міру зміни кольору середовища, але не рідше ніж один раз на тиждень.

20 Через 7-15 днів з експлантів виходять МСК, які утворюють клони, розміри яких складають від 50 до 500 клітин. При появі перших клонів, слід вирощувати їх до досягнення 70 % моношару. Середовище міняють не рідше одного разу на 5 діб у міру його пожовтіння, як і на попередньому етапі не повністю, залишаючи одну третину або четверту частину кондиційованого середовища. Клітини в клонах являють собою матеріал нульового пасажу поза організмом.

25 Коли у флаконі нульового пасажу з'явилось декілька клонів, клітини яких почали розмножуватись, шматочки пуповини переносять в інший культуральний флакон, залишаючи прикріплені МСК з поживним середовищем в старому. Додають свіже поживне середовище і продовжують культивування як описано на попередньому етапі. Таким чином, отримують наступні флакони теж нульового пасажу. Процедuru повторюють ще раз, поки в культуральних флаконах "другого етапу" не з'являються клони, які утворюють шар МСК теж нульового пасажу.

Для пересіву клітин з метою отримання МСК першого, а потім і другого пасажів, використовують розчини Версену (0,02 % розчин ЕДТА в ФБР) та трипсину (0,25 %), взяті в рівних об'ємах.

35 Клітини, які досягли необхідної стадії конfluентності (приблизно 70 %), двічі швидко, але край обережно, не направляючи струмінь на клітини, промивають теплим (37 °C) розчином Версену, після чого заливають на них теплий розчин трипсину (на флакон 25 см² - 1 см³, на флакон 75 см² - 2 см³). Флакони видержують 2-5 хвилин в термостаті при 37 °C. Як тільки клітини стають округлими і частина їх відкріплюється, слід обережно за допомогою піпетки змити легким струменем клітини, що залишилися прикріпленими, обережно ресуспендувати їх, додати кілька крапель фетальної сироватки ВРХ (для зупинки дії трипсину) та суспензію клітин відцентрифугувати при 800-1000×g протягом 10 хвилин при кімнатній температурі. Розчин трипсину, що знаходиться в надосаді, відібрати, а клітини, які знаходяться в осаді, ретельно, але обережно, ресуспендувати в 1 см³ поживного середовища без сироватки (для запобігання утворенню піни) і перенести в мікропробірку на 1,5 см³. Після підрахунку концентрації клітин в камері Горяєва під мікроскопом, висівають їх в культуральні флакони із рахунку 5×10^4 клітин на флакон 25 см² та $1,5 \times 10^5$ на флакон 75 см².

40 Як і у випадку попереднього пасажу (нульового) заміну поживного середовища проводять частково, починаючи з 3-5 дня в залежності від його кольору. Таким чином отримують клітини першого пасажу, які вирощують до досягнення конfluентності 70 %, після чого знов пересівають згідно з методикою, описаної для клітин попереднього пасажу, вирощують і отримують МСК 2 пасажу поза організмом, які використовують для введення в організм тварин. Можливість використання клітин 2 пасажу в культурі підтверджена зберіганням нативних характеристик клітин (морфологія, поверхневі маркери) протягом такого культивування.

55 Морфологічні характеристики клітин підтверджують відсутність відхилень від нативних характеристик клітин та однорідність популяції. Одержані матеріали відповідають фенотипу CD73+, CD90+, CD-105+.

60 Засіб для відновлення уражених тканин організму людини, як і будь-який лікувальний засіб, спрямований для використання на людях, потребує попереднього випробування на тваринах. Таке дослідження спрямоване на визначення безпечності нового засобу та визначення його

ефективності. Дослідження з цією метою були проведені на лабораторних тваринах (миші і щури) з експериментальними патологіями, а саме: артрит колінного суглоба, токсичне ураження печінки, атрофія слизової оболонки носа, експериментальний алергічний енцефаломієліт.

Приклад 1 Лікування атрофічного риніту у мишей.

Атрофічний риніт (атрофія слизової оболонки носа) у мишей, підтверджений клінічними спостереженнями та морфологічними дослідженнями, лікують введенням 1 млн охарактеризованих МСК з Вартонових драглів пуповини людини на рівні другого пасажу в культури в 100 мкл фізіологічного розчину у хвостову вену.

Клінічні спостереження протягом 2 місяців після ін'єкції клітин за станом лікованих і нелікованих тварин показали, що після введення МСК у мишей спостерігався гарний апетит, жвавість, приріст маси тіла, відновлення нормального вигляду слизової оболонки. В той же час, неліковані тварини зберігали ознаки хворих на атрофію - наявні ознаки слабкості та утрудненого носового дихання внаслідок накопичення густого гнійного слизу на рівні верхніх дихальних шляхів, млявість, малорухливість, поганий апетит, малий приріст у вазі.

Клінічні спостереження в різному стані тварин були підтверджені морфологічними дослідженнями, які показали, що через 2 місяці після введення МСК мишам з експериментальним атрофічним ринітом мало місце активне відновлення структури слизової оболонки носа. Особливо привертало увагу превалювання продуктивних процесів з розростанням судин у власній пластинці слизової оболонки та відновлення структури епітеліального покриву.

Таким чином, було показано, що МСК Вартонових драглів пуповини людини можуть бути використані для лікування атрофічних станів слизових оболонок ЛОР - органів.

Приклад 2

Лікування артрозу колінного суглоба у щурів.

Для отримання моделі остеоартриту (ОА) на щурах лінії Wistar, було вибрано метод моделювання ОА шляхом одноразового внутрішньосуглобного введення йодооцтової кислоти у праве коліно. Моделювання ОА у щурів йодооцтовою кислотою проводять під контролем відеорентгенографа. Динаміку розвитку хвороби вивчали гістологічно, рентгенологічно (рентген та УЗД) та фізіологічно (замір суглобів тварин). Модельним тваринам з явно вираженим індукованим ОА на 7 добу здійснюють ін'єкцію 1,5 млн. МСК з Вартонових драглів пуповини людини в 100 мкл буферу всередину пошкодженого суглоба. Вивчення процесів регенерації здійснюють клінічними та гістологічними методами.

Позитивні зміни у динаміці загоєння хряща у тварин, яким було введено МСК, спостерігають на 21 добу після введення цих клітин, що було підтверджено клінічними та гістологічними методами. Через 3 місяці за гістологічною будовою спостерігається відновлення хрящової тканини. Гістологічно в групі інтактних тварин, яким було введено МСК, не знайдено артрозних змін на макропрепаратах і на контрольних рентгенограмах колінних суглобів.

Приклад 3

Лікування ураження печінки.

Ураження печінки з його наступним лікуванням за допомогою МСК пуповини людини проводили на мишах. Метод індукції фіброзу печінки - внутрішньочеревне введення 30 % масляного розчину СС14 (1,5 мкл /1 г тварини) 2 рази на тиждень. Контрольним тваринам аналогічним чином вводять такий самий об'єм фізіологічного розчину. З використанням біохімічних методів дослідження крові та гістологічного дослідження печінки показано, що через 8 тижнів у тварин розвився фіброз печінки. На цьому етапі тваринам вводять МСК пуповини людини в очний синус в кількості 50 тис. клітин в 0,1 мл фізіологічного розчину. Паралельно групу тварин з фіброзом залишають для самовідновлення печінки. Через 2, 4, 6 та 8 тижнів відбирають зразки печінки та досліджували їх гістологію. Було показано, що відновлення печінки у нелікованих тварин має місце, але воно було незначним і починало розвиватися тільки через 6 тижнів. В той же час, при застосуванні клітин для лікування фіброзу печінки позитивні зміни в гістологічній картині спостерігалися вже через 2 тижні, а через 6 тижнів мало місце практично повне відновлення структури органу.

В прикладах 1, 2, 3 показано, що МСК Вартонових драглів пуповини людини успішно використано для лікування патологічних станів тканин організму.

Таким чином, технічне рішення, представлене в даній корисній моделі, дозволило знайти такі умови культивування МСК пуповини, які забезпечили одержання максимального об'єму біомаси МСК протягом незначного періоду культивування (2 пасажі) з максимальним збереженням нативних характеристик.

Безумовною перевагою засобу, що заявляється, є досягнення стабільності культур клітин за рахунок запобігання швидкого старіння популяції, що в цілому визначає високу ефективність застосування їх для лікування різноманітних патологій станів тканин організму.

5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Засіб для відновлення уражених тканин організму людини, який **відрізняється** тим, що являє собою мезенхімальні стовбурові клітини сполучної тканини пуповини новонародженого з попередньо видаленими кровоносними судинами та подрібненої до розмірів не більше 0,5 см з наступним культивуванням клітин з трикратним перенесенням подрібненої тканини пуповини в свіже культуральне середовище для досягнення необхідної сумарної кількості мезенхімальних стовбурових клітин, причому пересів клітин та їх збір проведено протягом не більше двох пасажів, а клітини, що виділені з моношарів в ефективній для клінічного використання кількості, перенесені у відповідний рідкий носій.
2. Засіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для алогенного використання додатково підданий заморожуванню після першого пасажу.
3. Засіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що він призначений для відновлення печінки, суглобів, слизової оболонки носа.
4. Засіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для негайного застосування використані клітини, зняті у другому пасажі.
5. Засіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що він призначений для хірургічного, ін'єкційного, неінвазивного введення локально або системно.
6. Засіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що він може бути використаний спільно із додатковими терапевтичними засобами.

25

Комп'ютерна верстка М. Шамоніна

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