



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 122562

(13) C2

(51) МПК

C12N 5/0775 (2010.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО
"УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки:	а 2017 00460	(72) Винахідник(и):	Бадер Петер (DE), Куці Селім (DE), Куці Зірафете (DE), Бьоніг Халвард (DE)
(22) Дата подання заявки:	14.07.2015	(73) Володілець (володільці):	ЙОХАНН ВОЛЬФГАНГ ГЬОТЕ- УНІВЕРЗИТЕТ, ФРАНКФУРТ АМ МАЙН, Theodor-W.-Adorno-Platz 1, 60323 Frankfurt am Main, Germany (DE), ДРК БЛУТШПЕНДЕДІНСТ БАДЕН- ВУРТТЕМБЕРГ-ХЕССЕН ГМБХ, Sandhofstraße 1, 60528 Frankfurt am Main, Germany (DE)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності:	11.12.2020	(74) Представник:	Кістерський Кирило Арсенійович, реєстр. №207
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції:	14177312.7	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	WO 2011064733 A1, 03.06.2011 Ringden O. et al. Pooled MSCs for treatment of severe hemorrhage. Bone marrow transplantation, 2011, vol. 46, no. 8, p.1158 - 1160 Cooper Khushnuma et al. Establishment of a Mesenchymal Stem Cell Bank. Stem cells international, 2011, vol. 108, no. 10, p. 792 - 8, Thirumala Sreedhar et al. Manufacturing and banking of mesenchymal stem cells. Expert opinion on biological therapy, 2013, vol. 13, no. 5, p. 673 - 691 Dal Pozzo Simone et al. High recovery of mesenchymal progenitor cells with non-density gradient separation of human bone marrow. Cytotherapy, 2010, vol. 12, no. 5, p. 579 - 586
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Парижської конвенції:	16.07.2014		
(33) Код держави-учасниці Парижської конвенції, до якої подано попередню заявку:	EP		
(41) Публікація відомостей про заявку:	25.05.2017, Бюл.№ 10		
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію:	10.12.2020, Бюл.№ 23		
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ	PCT/EP2015/066083, 14.07.2015		

(54) IN VITRO СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТРОМАЛЬНИХ КЛІТИН (MSC)**(57) Реферат:**

Винахід стосується *in vitro* способу виділення мезенхімальних стромальних клітин (MSC), що включає об'єднання зразків кісткового мозку, отриманих щонайменше від двох генетично відмінних донорів, з отриманням пулу клітин зразків, з наступним виділенням мезенхімальних стромальних клітин із зазначеного пулу клітин зразків.

UA 122562 C2

Галузь техніки

Даний винахід відноситься до поліпшеної композиції мезенхімальних стромальних клітин (MSC) та способу її отримання. Даний винахід відноситься до нової стратегії виділення MSC з моноклеарних клітин кісткового мозку (BM-MNC) шляхом об'єднання BM-MNC кількох

5 неродинних (третьої сторони) донорів кісткового мозку. Композиція MSC, виготовлена за методикою відповідно до даного винаходу, характеризується стабільною проліферативною здатністю та підвищеним імуносупресорним потенціалом у порівнянні з препаратами MSC окремого донора або з пулом окремих MSC, отриманих від кількох донорів. MSC, отримані

10 відповідно до даного винаходу, особливо застосовні для медичних застосувань, таких як лікування хвороби "трансплантат проти хазяїна" (GvHD) у реципієнтів з трансплантатами кровотворних стовбурових клітин, хворих аутоімунними порушеннями, та як клітинна терапія у регенераційній медицині.

Суть винаходу

Мезенхімальні стромальні клітини (MSC) з моменту їх відкриття у 1970-их роках Friedenstein

15 et al. були глибоко досліджені у відношенні їх імунomodulatoryного та регенеративного потенціалу, як *in vitro*, так і *in vivo*. В останнє десятиліття було досягнуто значного прогресу у з'ясуванні плейотропної функції MSC, незважаючи на відсутність унікального маркера клітинної поверхні для їх ідентифікації та наступного виділення. Для забезпечення порівняння ефекту клінічно застосовних MSC різних виробників Міжнародною спілкою клітинної терапії був

20 запропонований набір фенотипових та функціональних критеріїв для визначення MSC. Відсутність антигенів HLA II класу та костимулюючих молекул на поверхні MSC, паракринна секреція широкого спектра молекул з імунomodulatoryним потенціалом, а також легкість можливого її виділення з багатьох тканин робить їх надто привабливим джерелом у стратегіях клітинної терапії для широкого діапазону клінічних станів, таких як пошкодження тканин,

25 запальні процеси та аутоімунні порушення. Однак для усіх цих клінічних застосувань існує потреба у наявності в потрібний момент великої кількості наявних у готовому вигляді MSC.

На сьогоднішній день більшість клінічних досліджень проводили з використанням мезенхімальних стромальних клітин (MSC), отриманих від одного донора кісткового мозку. Оскільки ефекти препаратів MSC помітно варіюють від донора до донора, результати, отримані

30 в цих дослідженнях, були у великій мірі неоднорідними. Крім того, автори даного винаходу та інші дослідники показали, що MSC демонструють широку гетерогенність не тільки від донора до донора, а також і усередині популяції на клональному рівні. Така суттєва гетерогенність представляє головну перешкоду у розробці клінічних протоколів виготовлення, які можуть бути використані для відтворюваного створення продуктів MSC з еквівалентною терапевтичною

35 ефективністю.

Процес виділення людських мезенхімальних стромальних клітин із зразків кісткового мозку описується у патенті США № 5486359. Було розроблене антитіло, що зв'язується з мезенхімальними стромальними клітинами, для очищення MSC від аспіраційних матеріалів кісткового мозку або матеріалу роздрібної кістки. Зразки кісткового мозку відділяють через

40 градієнт фіколу та фракцію з низькою щільністю застосовують для виділення стовбурових клітин. Відповідно до патенту США № 5486359 культивували клітини в нормальному середовищі протягом 1 дня на пластику для культури тканини з метою забезпечення адгезії стовбурових клітин. Потім середовище міняли, а клітини культивували до конфлюентності, при цьому середовище міняли кожні 4 дні для отримання MSC.

В міжнародній заявці WO 2012/048093 розкривається виділення одержуваних з кісткового мозку MSC від окремих донорів. В міжнародній заявці WO 2012/048093 розкривається, що

45 препарати MSC, отримані від одного донора, можуть бути розмножені для клінічних препаратів.

Відомо, що можливо об'єднання препаратів MSC після їх отримання з окремих фракцій моноклеарних клітин кісткового мозку неродинних донорів кісткового мозку або кісткових

50 зразків для лікування кровотечі, що загрожує життю, у хворого мієлофіброзом, що переніс алогенну трансплантацію кровотворних стовбурових клітин (O Ringdén and K LeBlanc, Bone Marrow Transplantation, 2011; 46:1158-1160). У цьому дослідженні окремі клінічні препарати MSC, отримані від двох різних донорів, об'єднували для посилення імовірності відповіді.

З огляду на описаний вище відомий рівень техніки в клінічній практиці все ще існує потреба

55 в отриманні клінічних препаратів MSC з передбачуваною проліферацією, імуносупресорним потенціалом та мінімальною варіабельністю між партіями. Таким чином, задача даного винаходу полягає у забезпеченні процесу отримання/виділення MSC із зразків кісткового мозку з поліпшеними характеристиками.

Вищезгадана задача вирішується у першому аспекті за допомогою препарату

60 мезенхімальних стромальних клітин (MSC), що містить MSC, виділені із моноклеарних клітин

кісткового мозку (BM-MNC), що характеризується тим, що зазначений препарат MSC є hTERT-негативним та полігенним. Згідно з переважними варіантами здійснення зазначені MSC являють собою MSC ссавців, переважно людини.

Термін "моногенний" при застосуванні в контексті опису зразка або композиції клітин відноситься до тих клітин, які походять із загального джерела або мають однаковий генетичний фон. Термін "полігенний", з іншого боку, відноситься до композиції клітин, що походять з різних джерел та мають різні генетичні фони. В контексті даного винаходу термін "полігенний препарат MSC" означає композицію, що містить MSC з різними генетичними фонами, наприклад, MSC, що отримані щонайменше від двох генетично відмінних донорів кісткового мозку.

В контексті описуваного у даному документі даного винаходу терміни "мезенхімальні стромальні клітини" та "мезенхімальні стовбурові клітини" слід розуміти як синонімічні описи однієї і тієї ж фракції мультипотентних клітин, виділеної із зразків кісткового мозку.

Для мінімізації варіабельності між донорами у відношенні їх алосупресивного потенціалу автори даного винаходу розробили унікальну трьохстадійну методику для створення GMP-сумісного, безсироваткового MSC-Master Cell Bank з об'єднаних моноклеарних клітин кісткового мозку (BM-MNC) від 8 здорових донорів третьої сторони: (i) виділення змішаних полігенних та кріоконсервування окремих BM-MNC від 8 здорових донорів третьої сторони цілком відповідно до дозволу регіонального Комітету з етики та Гельсінської декларації, (ii) отримання MSC з об'єднаних BM-MNC після розморожування та кріоконсервування у флаконах та (iii) розморожування зразків MSC для їх безсироваткового розмноження та створення "наявних у готовому вигляді" клінічних доз. Таким чином, автори даного винаходу розробили незвичайно ефективний протокол для створення клінічних препаратів MSC з постійним більш високим алосупресивним потенціалом та постійною проліферативною здатністю у порівнянні з MSC, отриманими від окремих донорів кісткового мозку. Таким чином, даний протокол забезпечує клінічних дослідників клінічними MSC однорідної якості для лікування хвороби "трансплантат проти хазяїна" та інших запальних порушень. Незважаючи на суттєві попередні витрати, даний протокол забезпечує стабільність, відтворюваність та надійність в імуносупресорній характеристиці клінічних MSC.

Наступний варіант здійснення відноситься до препарату MSC відповідно до даного винаходу, який додатково характеризується тим, що зазначені MSC є TERT-негативними. TERT являє собою зворотну транскриптазу теломерази (скорочено TERT або hTERT у людей), яка є каталітичною субодиницею ферменту теломерази, що сукупно з РНК-компонентом теломерази (TERC) містить найбільш важливу одиницю комплексу теломерази, необхідну для підтримування проліферативної здатності імуорталізованих клітин. Показали, що препарат MSC відповідно до даного винаходу містить MSC, які не є імуортальними, що узгоджується з відсутністю експресії hTERT.

Згідно з одним додатковим переважним варіантом здійснення даний винахід відноситься до препарату MSC, що описується у даному документі, при цьому зазначений препарат MSC містить

(a) щонайменше 80 %, переважно щонайменше 95 % CD73+ клітин, найбільш переважно щонайменше 98 %, та/або

(b) щонайменше 80 %, переважно щонайменше 95 % CD90+ клітин, найбільш переважно щонайменше 98 %, та/або

(c) щонайменше 80 %, переважно щонайменше 95 % CD105+ клітин, найбільш переважно щонайменше 98 %, та/або

(d) щонайменше 80 %, переважно щонайменше 95 % HLA I класу+ клітин, найбільш переважно щонайменше 98 %, та/або

(e) менш ніж 10 %, переважно менш ніж 1 % CD45+ клітин, найбільш переважно менш ніж 0,1 %, та/або

(f) менш ніж 10 %, переважно менш ніж 1 % CD14+ клітин, найбільш переважно менш ніж 0,5 %, та/або

(g) менш ніж 10 %, переважно менш ніж 1 % CD34+ клітин, найбільш переважно менш ніж 0,5 %, та/або

(h) менш ніж 10 %, переважно менш ніж 5 % HLA-DR+ клітин, найбільш переважно менш ніж 1 %.

Згідно з одним переважним варіантом здійснення препарат MSC містить

(a) щонайменше 80 %, переважно щонайменше 95 % CD73+ клітин, найбільш переважно щонайменше 98 %, та

(b) щонайменше 80 %, переважно щонайменше 95 % CD90+ клітин, найбільш переважно щонайменше 98 %, та

(с) щонайменше 80 %, переважно щонайменше 95 % CD105+ клітин, найбільш переважно щонайменше 98 %.

Додатково препарат MSC відповідно до даного винаходу може містити

5 (е) менш ніж 10 %, переважно менш ніж 1 % CD45+ клітин, найбільш переважно менш ніж 0,1 %, та

(ф) менш ніж 10 %, переважно менш ніж 1 % CD14+ клітин, найбільш переважно менш ніж 0,5 %, та

(г) менш ніж 10 %, переважно менш ніж 1 % CD34+ клітин, найбільш переважно менш ніж 0,5 %.

10 Задача даного винаходу, більш того, вирішується за допомогою *in vitro* способу виділення мезенхімальних стромальних клітин, при цьому спосіб включає об'єднання зразків кісткового мозку, отриманих щонайменше від двох генетично відмінних донорів, з отриманням пулу клітин зразків, а потім виділення мезенхімальних стромальних клітин із зазначеного пулу клітин зразків.

15 Процес отримання або виділення MSC із зразків кісткового мозку відповідно до даного винаходу включає стадію об'єднання кісткового мозку або фракції мононуклеарних клітин, отриманої з кісткового мозку, від генетично відмінних донорів. Таким чином, щонайменше два генетично відмінних зразка кісткового мозку або генетично відмінних фракції BM-MNC об'єднують у спосіб відповідно до даного винаходу. Важливим є те, що спосіб відповідно до
20 даного винаходу включає об'єднання генетично відмінних зразків BM на стадії, на якій зразки BM все ще містять суміш різних типів клітин. Таким чином, краще об'єднання генетично відмінних зразків BM-MNC виконувати перед очищенням або розмноженням фракції MSC із зазначених зразків. Об'єднання клітин перед виділенням MSC забезпечує препарати MSC з несподівано поліпшеним алосупресивним потенціалом.

25 Згідно з одним варіантом здійснення спосіб відповідно до даного винаходу включає стадії

(а) забезпечення ряду зразків кісткового мозку, отриманих щонайменше від двох генетично відмінних донорів,

(b) об'єднання зазначених зразків кісткового мозку з отриманням пулу клітин зразків,

(с) необов'язково, культивування зазначеного пулу клітин зразків та

30 (d) виділення із зазначеного пулу клітин зразків, отриманого на стадії (b), зазначених мезенхімальних стромальних клітин.

Згідно з одним переважним варіантом здійснення спосіб включає стадії забезпечення ряду зразків кісткового мозку, отриманих щонайменше від двох генетично відмінних донорів, виділення фракції мононуклеарних клітин із зразків кісткового мозку, об'єднання зазначених
35 зразків мононуклеарних клітин кісткового мозку з отриманням пулу BM-MNC, необов'язково, культивування зазначеного пулу BM-MNC та виділення із зазначеного пулу BM-MNC зазначених мезенхімальних стромальних клітин. Слід враховувати, що усі додаткові спеціальні варіації способу відповідно до даного винаходу, описуваного у даному документі вище та нижче, еквівалентні переважним варіантам здійснення даної методики, яка включає стадію виділення
40 BM-MNC із зразків кісткового мозку.

Термін "пул клітин зразків" в контексті даного винаходу відноситься до суміші отриманих з кісткового мозку клітин з різним генетичним фоном. Таким чином, пул клітин зразків відповідно до даного винаходу є полігенним. Найбільш переважно пул клітин зразків відповідно до даного винаходу характеризується тим, що MSC складають усього лише незначний відсоток,
45 переважно менш ніж 80 %, переважно 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % та найбільш переважно менш ніж 10 %, ще більш переважно менш ніж 5 %, менш ніж 1 %, найбільш переважно менш ніж 0,1 %.

Використовуваний у даному документі термін "генетично відмінний" вказує на те, що існує щонайменше одна відмінність на геномному рівні між донорами кісткового мозку/суб'єктами.
50 Кістковий мозок може бути зібраний у 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 або більше донорів. Найбільш переважним є застосування зразків 4-8 різних донорів.

Термін "зразок кісткового мозку" відповідно до даного винаходу може означати аспіраційний матеріал або кісткового мозку, або кісткових фрагментів, таких як фрагменти губчастої кістки.
55 Згідно з переважним варіантом здійснення зразком кісткового мозку є аспіраційний матеріал кісткового мозку. Фахівцю в даній галузі відомо, як збирати зразок кісткового мозку. Зазначені зразки кісткового мозку відповідно до даного винаходу згідно з одним переважним варіантом здійснення містять суміш різних типів клітин. Наприклад, кожен з зазначених зразків кісткового мозку містить щонайменше одну фракцію неадгерентних клітин та щонайменше одну фракцію
60 адгерентних клітин. Згідно з одним особливо переважним варіантом здійснення зазначеним

зразком кісткового мозку є зразок або фракція моноклеарних клітин кісткового мозку (BM-MNC). BM-MNC отримують з кісткового мозку.

В контексті даного винаходу термін "фракція моноклеарних клітин кісткового мозку" (що також називають у даному документі "BM-MNC") включає В-, Т- та NK-лімфоцити, ранні мієлоїдні клітини та надто невелику кількість ендотеліальних клітин-попередників, кровотворних стовбурових/клітин-попередників та/або мезенхімальних стромальних клітин.

Згідно з переважним варіантом здійснення даного винаходу зазначеним зразком кісткового мозку є зразок кісткового мозку ссавця, а зазначеною мезенхімальною стромальною клітиною є мезенхімальна стромальна клітина ссавця. Більш переважним є те, що зазначеним зразком кісткового мозку є зразок кісткового мозку людини, а зазначеною мезенхімальною стромальною клітиною є мезенхімальна стромальна клітина людини.

Згідно з наступним варіантом здійснення даний винахід відноситься до описуваного раніше процесу виділення MSC, при цьому спосіб додатково включає стадію (a') екстрагування моноклеарних клітин кісткового мозку (BM-MNC) із кожного зазначеного зразка кісткового мозку з отриманням зразків BM-MNC, і при цьому на стадії (b) зазначені зразки BM-MNC об'єднують з отриманням зазначеного пулу клітин зразків. Як згадувалося вище, фракція/зразок BM-MNC містить усього лише невелику кількість MSC. Таким чином, згідно з одним переважним варіантом здійснення даного винаходу зазначені зразки BM-MNC, що підлягають об'єднанню, характеризуються відсотковим відношенням мезенхімальної стромальної клітини до загальної кількості клітин у зазначеному зразку менш ніж 80 %, переважно 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 % та найбільш переважно менш ніж 10 %, ще більш переважно менш ніж 5 %, менш ніж 1 %, найбільш переважно менш ніж 0,1 %.

В контексті описуваного у даному документі даного винаходу згідно з усіма його варіантами здійснення та аспектами особливо переважним є те, що зазначені зразки кісткового мозку (або зразки BM-MNC) отримують щонайменше від трьох, більш переважно щонайменше від чотирьох, більш переважно щонайменше від п'яти, більш переважно щонайменше від шести, більш переважно щонайменше від семи та найбільш переважно щонайменше від восьми генетично відмінних донорів. Іншими словами, препарат клітин MSC та спосіб їх отримання згідно з одним особливо переважним варіантом здійснення включає об'єднання щонайменше трьох, більш переважно щонайменше чотирьох, більш переважно щонайменше п'яти, більш переважно щонайменше шести, більш переважно щонайменше семи та найбільш переважно щонайменше восьми генетично відмінних клітинних зразків.

Способи виділення BM-MNC із зразка кісткового мозку, зокрема, аспіраційного матеріалу кісткового мозку, добре відомі фахівцю в даній галузі. Однак згідно з одним варіантом здійснення даного винаходу переважним є те, що BM-MNC виділяють із зразка кісткового мозку з використанням розділення клітин у градієнті щільності, такому як градієнт фіколу.

При об'єднанні отриманий пул клітин зразків відповідно до даного винаходу застосовують для виділення та очищення MSC. Способи виділення MSC із зразків кісткового мозку або BM-MNC також добре відомі з рівня техніки. Переважним способом відповідно до даного винаходу є відділення адгерентних клітин від неадгерентних шляхом простого видалення клітин, що плавають, за допомогою аспірації клітинного культурального середовища з контейнера для культури через регулярні проміжки часу. Шляхом заміни середовища кілька разів фракція неадгерентних клітин постійно зменшується, тоді як фракція адгерентних MSC продовжує рости до конфлюентності. Такими адгерентними клітинами є MSC.

Таким чином, згідно з одним варіантом здійснення переважним є те, що стадія (d) способу відповідно до даного винаходу включає стадію видалення, щонайменше один раз, неадгерентних клітин з культури зазначеного пулу клітин зразків; або при цьому після культивування зазначеного пулу клітин зразків застосовують щонайменше один виявлюваний поверхневий маркер або антитіло для очищення зазначених MSC.

Як доповнення, спосіб відповідно до даного винаходу може включати додаткову стадію або зберігання зазначених виділених мезенхімальних стромальних клітин, або розмноження зазначених виділених мезенхімальних стромальних клітин.

Згідно з одним додатковим аспектом даний винахід відноситься до способу отримання клінічних препаратів MSC. Даний спосіб включає стадії згаданого вище способу для виділення MSC, але додатково включає розмноження виділених MSC, доки не буде отримано застосовну у клініці кількість MSC. Розмноження MSC відповідно до даного винаходу може відбуватися відразу ж за виділенням MSC, або, як альтернатива, виділені MSC зберігаються за допомогою кріоконсервування, потім розморожуються аліквоти клітин для початку процесу розмноження. З рівня техніки відомо, як розмножувати MSC, та це в якості прикладу пояснюється у розділі Приклади у даній заявці.

Інший аспект даного винаходу відноситься до клітинної композиції, що містить зразки кісткового мозку щонайменше від двох генетично відмінних донорів кісткового мозку. Як альтернатива, клітинна композиція відповідно до даного винаходу може містити BM-MNC щонайменше від двох генетично відмінних донорів кісткового мозку. Таким чином, клітинна композиція відповідно до даного винаходу переважно є полігенною.

Згідно з одним варіантом здійснення клітинну композицію відповідно до даного винаходу отримують шляхом об'єднання щонайменше двох моногенних та генетично відмінних зразків кісткового мозку перед виділенням та/або розмноженням фракції стовбурових клітин, що міститься в зазначених зразках кісткового мозку. Таким чином, за допомогою об'єднання клітинна композиція стає полігенною.

Згідно з одним переважним варіантом здійснення зазначеними зразками кісткового мозку є зразки мононуклеарних клітин кісткового мозку.

Згідно з варіантом здійснення даний аспект відноситься до клітинної композиції відповідно до даного винаходу, яку отримують способом, що включає стадії

(а) отримання щонайменше двох зразків кісткового мозку, при цьому кожен із зразків від генетично відмінного донора кісткового мозку,

(b) виділення з кожного із зазначених зразків кісткового мозку фракції мононуклеарних клітин кісткового мозку з отриманням моногенних зразків мононуклеарних клітин кісткового мозку та

(c) об'єднання зазначених моногенних зразків мононуклеарних клітин кісткового мозку, отриманих з кожного зразка кісткового мозку, з отриманням полігенної клітинної композиції.

Слід розуміти, що в контексті даного винаходу термін "фракція мононуклеарних клітин кісткового мозку" включає стандартну клітинну композицію, відому для даної клітинної фракції, отриманої з кісткового мозку. У зв'язку з цим переважним є те, що зазначені зразки моногенних мононуклеарних клітин об'єднують перед здійсненням наступної стадії очищення або розмноження клітин, переважно перед виділенням або очищенням з них будь-яких MSC.

Згідно з наступним аспектом даний винахід відноситься до застосування суміші мононуклеарних клітин кісткового мозку, отриманих щонайменше від двох генетично відмінних донорів кісткового мозку, у способі виділення мезенхімальних стромальних клітин.

Наступний аспект відноситься до застосування клітинної композиції, описуваної раніше у даному документі, у способі очищення/виділення мезенхімальних стромальних клітин.

Задача даного винаходу також вирішується за допомогою мезенхімальної стромальної клітини, яку отримують способом виділення/очищення MSC, як описується у даному документі вище.

У даному документі описуються препарати MSC або MSC переважно для застосування в медицині. MSC, як правило, використовують в найрізноманітніших медичних застосуваннях. Без обмеження наступними прикладами MSC відповідно до даного винаходу переважно застосовують у лікуванні аутоімунних захворювань, таких як розсіяний склероз, цукровий діабет 1 типу, ревматоїдний артрит, увеїт, аутоімунне захворювання щитовидної залози, запальне захворювання кишечника (IBD), склеродермія, хвороба Грейвса, вовчак, хвороба Крона, аутоімунне лімфопроліферативне захворювання (ALPS), демієлінізуювальне захворювання, аутоімунний енцефаломієліт, аутоімунний гастрит (AIG) та аутоімунні гломерулярні захворювання. Зокрема, препарат MSC відповідно до даного винаходу застосовують у лікуванні хвороби "трансплантат проти хазяїна" (GVHD).

Однак в контексті описуваного у даному документі даного винаходу препарати MSC застосовні при будь-якому регенеративному або аутоімунному захворюванні, переважно при такому, яке переходить, рецидивує або ремітує. Іншими клінічними застосуваннями препаратів MSC відповідно до даного винаходу є застосування при загоєнні ран, виразці рогівки, інсульті або для полегшення приживлення при трансплантації алогенних стовбурових клітин.

Клітинна терапія, що включає введення MSC, ґрунтується, наприклад, на наступних стадіях: збирання тканини (кісткового мозку), що містить MSC, виділення та розмноження MSC за описуванням у даному документі способом та введення MSC суб'єкту/хворому з біохімічною або генетичною маніпуляцією або без такої.

Згідно з одним аспектом даний винахід відноситься до способу лікування суб'єкта при необхідності цього, що включає стадію введення терапевтичної дози препарату MSC, що отримують відповідно до даного винаходу.

Терапевтична доза для аутоімунного захворювання або хвороби "трансплантат проти хазяїна" може містити від приблизно 1×10^5 клітин/кг до приблизно 1×10^7 клітин/кг. Згідно з іншим варіантом здійснення терапевтична доза становить від приблизно 1×10^6 клітин/кг до приблизно 5×10^6 клітин/кг. Згідно з іншим варіантом здійснення терапевтична доза становить від приблизно 2×10^6 клітин/кг до приблизно 8×10^6 клітин/кг. Згідно з іншим варіантом здійснення

терапевтична доза становить приблизно 2×10^6 клітин/кг або приблизно $2 \times 10^6 \pm$ приблизно 10 %, приблизно 20 % або приблизно 30 % клітин/кг. Згідно з іншим варіантом здійснення терапевтична доза становить приблизно 8×10^6 клітин/кг або приблизно $8 \times 10^6 \pm$ приблизно 10 %, приблизно 20 % або приблизно 30 % клітин/кг та включає будь-які кількості або діапазони між ними. Приймаючи до уваги препарат MSC відповідно до даного винаходу кількість мезенхімальних стромальних клітин, що підлягає введенню, залежить від ряду факторів, у тому числі від віку, маси та статі хворого, захворювання, що підлягає лікуванню, а також від його ступеню та важкості.

MSC відповідно до даного винаходу можуть бути введені за допомогою ряду процедур. MSC можуть бути введені системно, наприклад, внутрішньовенним, внутрішньоартеріальним або внутрішньоочеревинним введенням. Мезенхімальні стромальні клітини можуть бути введені за допомогою прямої ін'єкції в орган або тканину при необхідності цього. Мезенхімальні стромальні клітини можуть бути нанесені місцево. Мезенхімальні стромальні клітини можуть бути нанесені безпосередньо на тканину при необхідності цього у ході хірургічної процедури.

Мезенхімальні стромальні клітини відповідно до даного винаходу можуть бути використані у лікуванні, полегшенні або попередженні будь-якого захворювання або порушення, яке може бути полегшено,вилікувано або попереджено за допомогою ангиогенезу. Таким чином, наприклад, мезенхімальні стромальні клітини можуть бути введені тварині для лікування заблокованих артерій, у тому числі артерій в кінцівках, тобто плечах, ногах, руках та ступнях, а також в шії або в різних органах. Наприклад, мезенхімальні стромальні клітини можуть бути використані для лікування заблокованих артерій, які живлять головний мозок, з лікуванням або попередженням таким чином інсульту. Також мезенхімальні стромальні клітини можуть бути використані для лікування кровеносних судин в ембріональних та постнатальних рогівках та можуть бути використані для забезпечення формування гломерулярної структури. Згідно з іншим варіантом здійснення мезенхімальні стромальні клітини можуть бути використані у лікуванні ран, як внутрішніх, так і зовнішніх, а також у лікуванні шкірних виразок, що утворюються на стопах, руках, ногах або плечах, у тому числі без обмеження шкірних виразок, викликаних захворюваннями, такими як цукровий діабет та серповидноклітинна анемія.

Більш того, оскільки ангиогенез залучається до імплантації ембріона та формування плаценти, мезенхімальні стромальні клітини можуть бути використані для забезпечення імплантації ембріона та попередження невиношування.

Крім того, мезенхімальні стромальні клітини можуть бути введені ненародженому суб'єкту, у тому числі людям, для забезпечення розвитку судинної системи у ненародженого суб'єкта.

Згідно з іншим варіантом здійснення мезенхімальні стромальні клітини можуть бути введені суб'єкту, народженому або ненародженому, для забезпечення хрящової резорбції та формування кісток, а також для забезпечення коректного морфогенезу пластинок росту.

Мезенхімальні стромальні клітини можуть бути генетично сконструйовані з одним або кількома полінуклеотидами, що кодують терапевтичний засіб. Полінуклеотиди можуть бути доставлені у мезенхімальні стромальні клітини за допомогою відповідного носія експресії. Носії експресії, які можуть бути використані для генетичного конструювання мезенхімальних стромальних клітин, включають без обмеження ретровірусні вектори, аденовірусні вектори та вектори на основі аденоасоційованого вірусу. MSC відповідно до даного винаходу можуть бути, наприклад, генетично сконструйовані з надекспресією TERT і, таким чином, з іморталізацією клітин.

Також препарат MSC відповідно до даного винаходу або мезенхімальна стромальна клітина можуть бути застосовані в трансплантації стовбурових клітин.

Крім того, забезпечується застосування препарату MSC або MSC відповідно до даного винаходу в отриманні остеозаміщувального матеріалу.

Інший аспект даного винаходу відноситься до способу отримання медикаменту, що містить мезенхімальні стромальні клітини, що включає стадії способу згідно з будь-яким з описуваних у даному документі способів виділення/очищення MSC.

Згідно з іншим варіантом здійснення MSC відповідно до даного винаходу або одержувані способами відповідно до даного винаходу можуть диференціюватися в остеобласти, адипоцити та/або хондроцити при відповідних умовах культивування, таких як відповідні умови індукування клітинного диференціювання, наприклад, при культивуванні у відповідному індуктивному середовищі, такому як середовище, що індукує остеогенез, адипогенез та хондрогенез, відповідно. Згідно з одним варіантом здійснення відповідні умови культивування та відповідні індуктивні середовища є такими, як визначено в прикладах. Згідно з іншим варіантом здійснення приклади прийнятих умов та середовищ розкриваються в Aubin J. E. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell

interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.* (1999) 72(3):396-410 (у відношенні остеогенезу); Falconi D, Oizumi K, Aubin J E. Leukemia inhibitory factor influences the fate choice of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells.* (2007) 25(2):305-312 (у відношенні адипогенезу) та Zhang S, Uchida S, Inoue T, Chan M, Mockler E, Aubin J E. Side population (SP) cells isolated from fetal rat calvaria are enriched for bone, cartilage, adipose tissue and neural progenitors. *Bone.* (2006) 38(5):662-670 (у відношенні хондрогенезу).

Згідно з одним аспектом даний винахід відноситься до набору для здійснення способу відповідно до даного винаходу, що містить одно або більше з наступних: культуральне середовище та інструкції щодо його застосування. Згідно з іншим варіантом здійснення даний винахід може забезпечувати набір, що містить зразок виділених мезенхімальних стромальних клітин відповідно до даного винаходу та необов'язково культуральне середовище та/або інструкції для застосування в експериментах та/або в трансплантації.

Препарат мезенхімальних стромальних клітин (MSC), описуваний у даному документі, більш того, характеризується тим, що містить MSC, які виділені з моноклеарних клітин кісткового мозку (BM-MNC), але є полігенними та мають щонайменше одну з наступних характеристик:

(a) підвищена експресія p21 у порівнянні з експресією p21 в моногенних MSC (отриманих від окремих донорів),

(b) знижена експресія p53 у порівнянні з експресією p53 в моногенних MSC (отриманих від окремих донорів) та/або

(c) знижена експресія c-тус у порівнянні з експресією c-тус в моногенних MSC (отриманих від окремих донорів).

Ці характеристики можуть бути використані як альтернативні або додаткові структурні особливості, що відрізняють описуваний препарат MSC відповідно до даного винаходу від відомих з рівня техніки препаратів. Згідно з одним варіантом здійснення препарат MSC відповідно до даного винаходу містить MSC з підвищеною експресією p21 у порівнянні з експресією p21 в моногенних MSC (отриманих від окремих донорів). MSC відповідно до даного винаходу, як доповнення або як альтернатива, можуть характеризуватися зниженою експресією p53 у порівнянні з експресією p53 в моногенних MSC (отриманих від окремих донорів).

Даний винахід згідно з одним варіантом здійснення відноситься до препарату MSC, при цьому зазначені MSC, як доповнення або як альтернатива, характеризуються зниженою експресією c-тус у порівнянні з експресією c-тус в моногенних MSC (отриманих від окремих донорів).

Згідно з конкретними варіантами здійснення зазначене підвищення експресії p21 є щонайменше 2-кратним, переважно щонайменше 3-кратним, більш переважно щонайменше 4-кратним; та/або при цьому зазначене зниження експресії p53 є щонайменше 10-кратним, переважно щонайменше 20-кратним; та/або при цьому зазначене зниження експресії c-тус є щонайменше 10-кратним, переважно щонайменше 20-кратним та найбільш переважно не виявляється.

Переважні препарати MSC відповідно до даного винаходу містять MSC з усіма згаданими вище характеристиками (a) - (c). Виділені MSC відповідно до даного винаходу містять щонайменше одну людську MSC з хромосомною транслокацією між хромосомами 5 та 9, що може бути використано як додаткова характеристика MSC відповідно до даного винаходу. Переважно MSC мають характеристики (a) і (b), (a) і (c) або (b) і (c). Найбільш переважно зазначені MSC мають характеристики (a), (b) і (c). Також переважним є препарат MSC, в якому зазначена відмінність в експресії p21, p53, c-тус та/або hTERT спостерігається між MSC відповідно до даного винаходу та моногенними MSC, отриманими від окремих донорів.

Далі даний винахід буде описуватися наступними прикладами з посиланням на графічні матеріали та послідовності, що додаються, без обмеження ними. Для цілей даного винаходу усі посилальні матеріали, що згадуються у даному документі, включені за допомогою посилання в усій своїй повноті. Згідно з графічними матеріалами:

На фіг. 1 представлено збирання кісткового мозку та відділення моноклеарних клітин кісткового мозку. А) Кістковий мозок збирали від 8 здорових донорів третьої сторони під загальною анестезією шляхом білатеральної аспірації з гребеня клубової кістки. В) Зразки кісткового мозку збирали в мішки та антикоагулювали за допомогою 7-12 % ACD-A та 7-12 міжнародних одиниць гепарину на мл аспіраційного матеріалу кісткового мозку. С) Моноклеарні клітини кісткового мозку збагачували від аспіраційного матеріалу кісткового мозку шляхом центрифугування у градієнті щільності фіколу (GE Healthcare, Munich, Germany) з використанням процесу Sepax II NeatCell (Biosafe, Switzerland). D) BM-MNC двічі промивали та ресуспендували у кріосередовищі, що складається з 10 % DMSO/5 % HSA/X-vivo. E) Мішки, що

містять BM-MNC від кожного донора кісткового мозку у кріосередовищі, заморожували в паровій фазі рідкого азоту до застосування.

На фіг. 2 показано створення банку MSC з моноклеарних клітин кісткового мозку. А) Мішки, що містять моноклеарні клітини кісткового мозку кожного донора, розморожували при +37 °C та після дворазового промивання середовищем їх об'єднували у визначеному об'ємі DMEM, доповненому 5 % тромбоцитарним лізатом. Усі клітини висівали в один 1-рівневий планшет CellStack та одинадцять 2-рівневих планшетів CellStack. В) Через 72 години неадгерентну фракцію видаляли, а адгерентні клітини далі культивували у DMEM, доповненому 5 % PL, ще 11 діб з заміною середовища кожні три доби. Як тільки MSC становилися помітними та доростали до конфлюентності 80 %, MSC від'єднували з використанням трипсину (TrypLE) та після промивання їх середовищем дебриси ресуспендували у кріосередовищі, що складається з 10 % DMSO/5 % HSA/DMEM. С) MSC заморожували у 210 кріофлаконах, при цьому кожен містив $1,5 \times 10^6$ MSC пасажу P1. Автори даного винаходу визначають цей набір флаконів з MSC як банк MSC.

На фіг. 3 показано створення клінічних кінцевих продуктів MSC. А) Три довільно вибраних кріоконсервованих флакони з MSC розморожували через 6-8 тижнів після їх початкового кріоконсервування. В) Їх висівали в один 1-рівневий CellStack (636 см²) та культивували протягом 6-7 діб у DMEM, що містить 10 % тромбоцитарний лізат. Середовище заміняли кожні три доби. С) В день 6 або 7 (згідно з їх конфлюентним ростом) MSC (наприкінці P1) від'єднували за допомогою трипсину, промивали та висівали у вісім 2-рівневих CellStack при концентрації клітин 2×10^3 MSC/1 см² та розмножували ще тиждень. Середовище заміняли кожні 3-4 доби та наприкінці тижня (наприкінці P2) MSC від'єднували за допомогою трипсину, двічі промивали та підраховували кількість клітин. MSC кріоконсервували та визначали як клінічний продукт MSC, який через 2-3 тижні піддавали валідації у відношенні їх проліферативного, диференціювального та асосупресивного потенціалу.

На фіг. 4 показаний фенотип MSC та їх диференціювальний потенціал. А) MSC, отримані шляхом розмноження аліквот з банку MSC, наприкінці пасажу 2 мітили мишачими антитілами проти імуноглобуліну людини, кон'югованими з флуорохромами, як показано в таблиці 1. В) Культивування MSC в тканиноспецифічних культуральних середовищах індукувало їх диференціювання в адипоцити та остеобласти.

На фіг. 5 представлені кінетичні показники росту MSC від окремих донорів та кінцевих продуктів MSC. А) Початкову кількість $4,4 \times 10^4$ MSC від кожного донора кісткового мозку розмножували протягом одного пасажу (від початку до кінця P2). В той же час MSC усіх 8 донорів об'єднували та розмножували від самого початку до кінця P2 (пул MSC), а також 4 аліквоти з банку MSC. Наприкінці пасажу 2 MSC трипсинізували та рахували їх кількість; ns = не значна. В) Десять кріофлаконів з MSC з банку MSC розморожували та розмножували протягом двох пасажів для оцінювання їх проліферативного потенціалу. Середня кількість клітин усіх флаконів з клітинами, що розмножуються, наприкінці пасажу 2 становила $5,3 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$ MSC. С) MSC демонстрували приблизно 4 подвоєння популяції (PD) на пасаж. Таким чином, сукупна кількість PD (CPD) становила $8,7 \pm 0,4$ PD. D) Для демонстрації того, що кінцеві продукти MSC не є імортальними клітинами, автори даного винаходу оцінювали їх кінетичні показники росту в ході 12 пасажів та підраховували число PD. Як показано на фіг., з пасажів 9-12 ці MSC не могли навіть подвоїти свою кількість (n=3).

На фіг. 6 показаний асосупресивний потенціал MSC, отриманих від окремих донорів, та кінцевих продуктів MSC. А) MSC пасажів 0-8 від окремих донорів, а також пул MSC, який отримували шляхом об'єднання MSC 8 донорів перед розмноженням (пул MSC), та один кінцевий продукт MSC (MSC-140) розмножували наприкінці пасажу 2. Потім MSC трипсинізували, двічі промивали середовищем та після визначення кількості та життєздатності клітин за допомогою трипанового синього їх використовували для оцінювання у них асосупресивного потенціалу в аналізі MLR. В день 6 в клітини додавали BrdU, на наступний день виконували аналіз для оцінювання інгібування проліферації алогенних моноклеарних клітин крові від двох відмінних за HLA донорів. В) Шість кінцевих продуктів MSC (клінічні дози) розморожували та після промивання клітини безпосередньо використовували для аналізу MLR. Ціль даних експериментів полягала у з'ясуванні того, чи здатні розморожені кінцеві продукти MSC, як їх надають хворим, пригнічувати алогеніндуковану проліферацію моноклеарних клітин від двох донорів алогенних MNC.

На фіг. 7 представлена генетична характеристика клінічного кінцевого продукту MSC. А) Нормальна каріограма клінічних кінцевих продуктів MSC наприкінці пасажу 2. В) Інтерфазні ядра після двокольорової гібридизації набору зондів 5p15 (зелений) та 5q35 (червоний) виявили нормальний диплоїдний патерн для хромосоми 5. С) Інтерфазні ядра після трьохкольорової

гібридизації зонда Break Apart MYC показували майже в усіх клітинах два сигнали нормального злиття. D) Кількість MSC з нормальним диплоїдним та анеуплоїдним патерном після двокольорової гібридизації набору зондів 5p15 та 5q35. Загальне число аналізованих MSC становило 396. E) Кількість MSC з нормальним диплоїдним та анеуплоїдним патерном після трьохкольорової гібридизації зонда Break Apart MYC для хромосоми 8q24. Загальне число аналізованих MSC становило 356.

На фіг. 8 показана експресія генів, що трансформують, та химерний аналіз кінцевих продуктів MSC. A) RT-PCR аналіз генів, що беруть участь в клітинній трансформації, в 3 клінічних кінцевих продуктах MSC. Виділяли загальну РНК з трьох кінцевих продуктів MSC та MSC від одного донора (контроль). Після транскрипції в cDNA її використовували для кількісного вираження експресії p21, p53 та c-myc за допомогою PCR. B) STR-PCR аналіз клінічного кінцевого продукту MSC. З MSC клінічного кінцевого продукту MSC виділяли ДНК, яку потім використовували для оцінювання конкретних ділянок STR, знайдених в ядерній ДНК. Генотипи усіх восьми донорів були представлені в кінцевому продукті MSC, отриманому з об'єднаних MSC.

Приклади

Матеріали та способи

Збирання сировинного матеріалу

Кістковий мозок аспірували під загальною анестезією білатеральною аспірацією з гребеня клубової кістки. Кістковий мозок антикоагулювали за допомогою 7-12 % ACD-A та 7-12 міжнародних одиниць гепарину на мл аспіраційного матеріалу кісткового мозку.

Тестування інфекційного захворювання

Панель маркерів інфекційного захворювання перевищувала мінімальні вимоги JACIE та закону Німеччини про стовбурові клітини. Таким чином, в рамках обстеження донорів шукали ознаку серонегативної реакції для HiV1/2, антитіла проти HBc, HBsAg, антитіла проти HCV, антитіла проти HTLV1/2 (IgM та IgG для усіх), антитіла проти вірусу гепатиту A IgM, антитіла проти токсоплазми IgM, антитіла проти EBV IgM, антитіла проти CMV IgM та TPNA, а також негативність за допомогою NAT для HiV, HAV, HBV, HCV та ParvoB 19; тести для HiV1/2, антитіла проти HBc, HBsAg, антитіла проти HCV, CMV, TPNA та описуваний NAT повторювали у день процедури здавання кісткового мозку. Усі донори відповідали критеріям. Більш того, оскільки CMV є резидентним вірусом в клітині, шукали негативність для геному CMV у дебрісі кісткового мозку (Dept. of Virology, Goethe University, та Bioreliance, Glasgow, UK).

Обладнання для обробки

Усі процеси виконували в повній відповідності критеріям GMP у блоці "чиста зона" (клас А в В) відділу Клітинних терапевтичних засобів/обробки клітин (GMP), який є частиною Донорської служби Червоного хреста Німеччини та повністю підпорядковується її системі контролю якості, з офіційного дозволу державного уряду (виробнича ліцензія згідно з §20 b/c (збирання та тестування BM) та §13 (отримання та тестування MSC) закону Німеччини "Про лікарські засоби").

Обробка кісткового мозку

Мононуклеарні клітини кісткового мозку збагачували з аспіраційного матеріалу кісткового мозку шляхом центрифугування у градієнті щільності фіколу (GE Healthcare, Munich, Germany) з використанням процесу Sepax II NeatCell (Biosafe, Switzerland), як описується виробником. Усі з'єднання виконували шляхом сплавлення стерильних трубок (TSCD, Terumo, Düsseldorf, Germany) так, що застосовувався повністю закритий процес.

Збирання тромбоцитарних концентратів та отримання тромбоцитарних лізатів (PL)

Як вихідний матеріал для тромбоцитарних лізатів використовували одно - дводенні об'єднані тромбоцити лейкоцитарної плівки, що містять приблизно 10 % плазми в PASIII. Тромбоцити освітлювали для клінічного застосування за вказівками стосовно харчових продуктів Німеччини. Для отримання однієї партії тромбоцитарного лізату об'єднували до 4-6 тромбоцитарних концентратів. Тромбоцити аліквотували в А в оточенні В в стерильних 50-мл пробірках Falcon та одразу ж заморожували при -80 °C. Окремі аліквоти розморожували щонайменше через 24 години та центрифугували протягом 10 хвилин при 3774 × g з гальмом (прискорення 8, гальмо 4). Супернатанти (тромбоцитарні лізати) збирали та піддавали розширеному тестуванню готового продукту, у тому числі на відсутність бактерій (BacTAlert, Biomerieux) та потенціал забезпечення адгезії клітин-попередників для MSC та розмноження MSC.

Тестування тромбоцитарних лізатів

а) Потенціал тромбоцитарних лізатів у забезпеченні адгезії клітин-попередників для MSC

Мононуклеарні клітини кісткового мозку (BM-MNC) розморожували при 37 °С, двічі промивали за допомогою DMEM, доповненого 5 % PL, та після останнього промивання дебрис ресуспендували у DMEM, доповненому 5 міжнародними одиницями гепарину/мл та 5 % або 10 % PL. BM-MNC висівали зі щільністю $1,71 \times 10^5/1 \text{ см}^2$ та інкубували протягом 72 годин при 37 °С з 5 % CO₂ і вологістю насичення. Фракцію неадгерентних клітин видаляли, а адгерентні клітини далі культивували ще 11 діб. Культуральне середовище заміняли кожні 3-4 доби. Як тільки веретеноподібні клітини (MSC) досягали конфлюентності 70-80 %, їх ферментативно від'єднували за допомогою трипсину та підраховували їх кількість. Дану процедуру виконували з обома середовищами, тобто з DMEM, доповненими або 5 % PL, або 10 % PL.

b) Здатність PL розмножувати MSC

Характеристики тромбоцитарних лізатів встановлювали як IDM відповідно до стандартів, викладених у німецьких вказівках, відсутність бактерій, розмноження кріоконсервованих аліквот MSC щонайменше в 2 рази за 7 діб. Для створення клінічних протоколів MSC використовували тільки тромбоцити, які відповідають цим критеріям.

Створення банку MSC клінічних кінцевих продуктів

а) Створення банку MSC

Мішки, що містять мононуклеарні клітини кісткового мозку від кожного донора, розморожували в Plasmatherm при +37 °С. Їх двічі промивали за допомогою DMEM, доповненого 5 % PL, шляхом центрифугування протягом 10 хвилин при 400 g та ресуспендували при визначеному об'ємі DMEM+5 % тромбоцитарний лізат. Після даної стадії клітинної суспензії від кожного донора об'єднували разом та підраховували кількість клітин за допомогою пристрою для підрахунку клітин (Sysmex). Потім пул клітинної суспензії висівали в одинадцять 2-рівневих CellStack (на один 2-рівневий CellStack: 250×10^6 BM-MNC/260 мл середовища) та в 1 одинарний CellStack (на 1-рівневий CellStack: 125×10^6 BM-MNC/130 мл середовища). Через 72 години неадгерентні клітини видаляли з використанням мішків для заміни середовища (Macopharma, Langen, Germany), а адгерентні клітини культивували ще 11 діб з DMEM, доповненим 5 % PL, до досягнення MSC 80-90 % конфлюентності. Протягом цього періоду середовище заміняли кожні 3-4 доби. В день 14 перед від'єднанням MSC з кожного CellStack брали 5 мл культурального середовища, яке об'єднували в стерильну пляшку, що підлягає тестуванню на стерильність у відношенні аеробних та анаеробних бактерій та грибків. Потім клітини від'єднували з використанням синтетичного TrypLE (Life Technologies, Darmstadt, Germany) та після промивання за допомогою DMEM+5 % PL клітини центрифугували протягом 7 хвилин при $400 \times g$. Дебриси ресуспендували у визначеному об'ємі середовища і клітини підраховували з трипановим синім у гемоцитометрі. Автори даного винаходу отримували в цілому 320×10^6 MSC пасажу 1. Два мільйона клітин використовували для визначення фенотипу за допомогою проточної цитометрії. Решту MSC центрифугували протягом 7 хвилин при $400 \times g$.

Клітини ресуспендували в 5 % HSA/DMEM, при цьому кількість MSC доводили до 3×10^6 клітин/мл. Один об'єм клітинної суспензії повільно змішували з одним об'ємом холодного заморожувального середовища, що містить 20 % DMSO/5 % HSA/DMEM. Таким чином, кінцева концентрація MSC становила $1,5 \times 10^6$ /мл клітинної суспензії, тоді як кінцева концентрація кріосередовища становила 10 % DMSO/5 % HSA/DMEM. Клітини розподіляли у 210 кріофлаконів (у кожному $1,5 \times 10^6$ MSC пасажу 1), а потім кріоконсервували з використанням програмованого заморожувача Cryoserve (Schöllkrippen, Germany) відповідно до встановлених протоколів. Заморожені флакони зберігали в паровій фазі рідкого азоту (Tec-Lab, Idstein, Germany). Крім того, решту MSC змішували з заморожувальним середовищем та тестували на стерильність (аеробні і анаеробні бактерії та грибки).

б) Створення клінічних кінцевих продуктів MSC

Для створення та валідації клінічних кінцевих продуктів MSC флакони банку MSC послідовно розморожували в довільному порядку через 6-8 тижнів після їх кріоконсервування. Після розморожування при 37 °С MSC промивали в культуральному середовищі, що містить 10 % PL, при цьому кількість життєздатних клітин визначали з використанням фарбування трипановим синім у гемоцитометрі. Клітини одного флакона банку MSC висівали в один 1-рівневий CellStack (636 см^2) та культивували з DMEM, доповненим гепарином (5 міжнародних одиниць/мл середовища) та PL 10 % (об'єм/об'єм). Середовище заміняли в день 4, а в день 6-7 клітини від'єднували з використанням TrypLE, а потім далі висівали у вісім 2-рівневих CellStack (кожен $1,272 \text{ см}^2$) як пасаж два зі щільністю 2×10^3 клітин/см². Процедuru повторювали як для пасажу 1 і в день 6-7 MSC збирали. Після промивання за допомогою 0,5 % HSA/0,9 % NaCl життєздатні MSC підраховували за допомогою фарбування трипановим синім. Потім клінічні MSC ресуспендували у кріосередовищі (0,9 % NaCl з 5 % HSA та 10 % DMSO) як MSC кінцевого

пасажу 2 та розподіляли в 4-7 кріомішків, що містять $4,2-5,5 \times 10^7$ MSC в кожному в об'ємі 45 мл заморожувального середовища. Зразки кріоконсервували з використанням програмованого заморожувача Cryoserve (Schölkrippen, Germany) з використанням встановлених протоколів та зберігали в паровій фазі рідкого азоту (Tec-Lab, Idstein, Germany).

5 Тести для контролю якості

Усі тести виконували з розмороженими кінцевими продуктами MSC без розмноження у стані, в якому їх вводять хворим для клінічного застосування.

а) Підрахування клітин та життєздатність розморожених MSC

Підрахування усіх клітин виконували з використанням гемоцитометра Neubauer.

10 Життєздатність MSC оцінювали з використанням фарбування трипановим синім.

б) Фенотипова характеристика

Проточний цитометричний аналіз виконували з використанням мінімальних критеріїв ISCT для MSC. З метою визначення фенотипу розморожених MSC автори даного винаходу фарбували їх наступними кон'югованими з флуорохромом мишачими моноклональними антитілами проти імуноглобуліну людини, представленими в таблиці 1.

Таблиця 1

Антитіла, які застосовували для визначення фенотипу MSC

Антитіла	Компанія	№ за каталогом	Клон	Ізотип
IgG1 FITC	BioLegend	400109	MOPC-21	IgG1
IgG2a FITC	BioLegend	400209	MOPC-173	IgG2a
IgG1 PE	BioLegend	400113	MOPC-21	IgG1
IgG1 PerCP	BioLegend	400147	MOPC-21	IgG1
CD45 FITC	BioLegend	304005	HI30	IgG1
CD34 FITC	BioLegend	343603	561	IgG2a
CD14 FITC	BioLegend	325603	HCD14	IgG1
HLA-DR FITC	BioLegend	307603	L243	IgG2a
CD90 FITC	BioLegend	328107	5E10	IgG1
CD73 PE	BioLegend	344003	VB-CD73.3	IgG1
CD105 PE	BioLegend	323205	43A3	IgG1
Розчин пропідіуму йодиду (PI) для фарбування	BD Pharmingen	556463		

д) Оцінювання алоупресивного потенціалу кінцевих продуктів MSC

20 Для тестування імуносупресорного ефекту кінцевих продуктів MSC на контрольовану алоантигеном реакцію автори даного винаходу використовували реакцію змішаних лімфоцитів (MLR). Мононуклеарні клітини периферичної крові (PB-MNC) від здорових неродинних донорів виділяли з використанням градієнта фіколу (щільність 1,077, Biochrom KG, Berlin, Germany), двічі промивали за допомогою PBS та ресуспендували в RPMI-1640 з 10 % FBS (Invitrogen). PB-MNC від 2 неродинних донорів культивували в чорних 96-лункових планшетах протягом шести

25 діб, або окремо (контрольна група), або змішаними з летально опроміненими (30 Гр) кінцевими продуктами MSC третьої сторони, при відношенні MSC:PB-MNC 1:1 (1×10^5 MSC: 1×10^5 PB-MNC). Автори даного винаходу оцінювали шість кінцевих продуктів MSC безпосередньо після розморожування, а також MSC від усіх восьми донорів, чий BM-MNC об'єднували та використовували як джерело для отримання основного банку MSC відповідно до даного

30 винаходу. Усі MLR виконували в трьох повторностях в 96-лунковому планшеті. В день 6 клітин інкубували з 5-бром-2'-дезоксіуридином (BrdU) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) протягом 24 годин. На наступний день вимірювали відносні світлові одиниці (RLU/s) за допомогою люмінометра 1420 Multilabel Counter Victor 3 (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Germany). Рівні проліферації PB-MNC визначали в день 7 з використанням аналізу з BrdU.

35 Інгібіторний ефект кінцевих продуктів MSC на проліферацію алогенних MNC обчислювали як відсоткове відношення з використанням наступної формули: $100 - [(проліферація алогенних PB-MNC в присутності MSC / проліферація PB-MNC без MSC) \times 100]$.

е) Визначення старіння кінцевих продуктів MSC in vitro

40 Для демонстрації того, що кінцеві продукти MSC не є імортальними клітинами, автори даного винаходу оцінювали їх кінетичні показники росту за 12 пасажів. При кожному пасажі середовище заміняли кожні 3-4 доби та відділення MSC за допомогою TrypLE виконували

відповідно до їх проліферативного потенціалу. Для більш точного оцінювання їх кінетичних показників росту автори даного винаходу обчислювали число подвоєнь популяції (PD) з використанням наступної формули: $PD \text{ для кожної підкультури: } [\log 10(NH) - \log 10(NI)] / \log 10(2)$; при цьому NH = кількість зібраних клітин, NI = кількість інокульованих клітин.

5 f) Диференціювальний потенціал кінцевих продуктів MSC

Для дослідження диференціювального потенціалу в ході адипогенезу та остеогенезу кінцеві продукти MSC пасажу 2 розморожували та безпосередньо культивували у відповідних тканиноспецифічних індукуювальних середовищах згідно з інструкціями виробника (Miltenyi Biotec GmbH).

10 Адипогенез

Для утворення адипоцитів ряд розморожених MSC доводили до 5×10^4 клітин/1 мл середовища NH AdipoDiff. Потім 1,5 мл такої клітинної суспензії культивували в 35-мм чашках для культивування клітин при 37 °C в інкубаторі з 5 % CO₂ і вологістю > 95 %. Середовище заміняли кожну 3-ю добу, та через 2-3 тижні починали з'являтися великі вакуолі. В день 30 адипоцити округлювалися та наповнювалися ліпідними краплинами, які автори даного винаходу фарбували за допомогою ліпофільного червоного барвника Oil Red O (Millipore, Schwalbach, Germany).

Остеогенез

Коротко, концентрацію розморожених MSC доводили до 3×10^4 клітин/1 мл середовища NH OsteoDiff. Потім 1,5 мл такої клітинної суспензії культивували в 35-мм чашках для культивування клітин при 37 °C в інкубаторі з 5 % CO₂ і вологістю > 95 %. Середовище заміняли кожну 3-ю добу. В день 10 остеобласти можна було ідентифікувати морфологічно за їх кубоїдальним зовнішнім виглядом та за їх асоціацією з наново синтезованим кістковим матриксом. Ці клітини візуалізували шляхом фарбування лужної фосфатази (Sigma, Deisenhofen, Germany), оскільки комітовані остеогенні клітини експресують високі рівні цього ферменту. В результаті даного фарбування остеобласти виглядають як темно-пурпурові пофарбовані клітини. Тканиноспецифічне фарбування оцінювали з використанням мікроскопа Olympus IX71, оснащеного камерою Soft Imaging System F-View II, та програмного забезпечення обробки зображень cellSens Dimension.

30 g) Генетичний аналіз клінічних кінцевих продуктів MSC

RT-PCR аналіз експресії трансформувальних генів клінічних кінцевих продуктів MSC

Екстрагували РНК з використанням мінінабору RNeasy (Qiagen) з наступною зворотною транскрипцією з 1 мкг загальної РНК з використанням Verso cDNA Kit (Thermo Scientific) з випадковими гексануклеотидами згідно з інструкціями виробника, відповідно. Для генів c-myc, p21, p53 та GAPDH виконували PCR в режимі реального часу на Eppendorf Realplex з використанням Quanti Tect SYBRE green qPCR master Mix (Qiagen). Виявлення транскрипції генів hTERT та ABL виконували на Biorad MyiQ Cyclor з використанням суміші Absolute qPCR ROX (Thermo Scientific). Олігонуклеотиди придбали в Eurofins MWG. Праймерні послідовності та умови PCR, за винятком певних періодів активації реакційної суміші, були опубліковані з

40 подробицями в іншому місці.

h) Інтерфазна флуоресцентна гібридизація in situ (FISH)

Аналіз інтерфазної FISH виконували відповідно до протоколів виробника з використанням наступних зондів для хромосом 5 і 8: двокольоровий зонд для хромосоми 5p15 (hTERT) та 5q35 (NSD1, Kreatech, Amsterdam, NL), а також трьохкольоровий зонд Break Apart для хромосоми 8q24 (MYC, Kreatech, Amsterdam, NL). Оцінювання сигналів гібридизації виконували на автоматизованій системі підраховування точок (Applied Spectral Imaging, Edingen/Neckarhausen, Germany). Для кожного зонда сканували та класифікували > 300 ядер з використанням порога 5 %.

Документація

50 Перед створенням клітинного банку MSC, клінічних зразків для тестування та клінічних зразків для випуску процес офіційно валідували в дрібномасштабних культурах, на підставі чого формально визначали інструкції виробника (SOP), протоколи партії, інструкції та протоколи тестування, а також описи. Від державного уряду отримували ліцензію на виробництво для клітинного банку MSC, а також для клінічного зразка для застосування в клінічних іспитах. Вимоги щодо якості встановлювали після отримання офіційних консультативних висновків від

Статистичний аналіз

60 Статистичну значущість аналізували з використанням програмного забезпечення GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Значущість оцінювали з використанням критерію Стюдента. Р-значення менш ніж 0,05 вважали статистично значущим.

Приклад 1. Збирання кісткового мозку від 8 здорових донорів третьої сторони та виділення BM-MNC

Після отримання письмової інформованої згоди у кожного донора кісткового мозку збирали до 250 мл додаткового аспіраційного матеріалу кісткового мозку з метою створення банку MSC зі схвалення місцевого Комітету з етики в повній відповідності до Гельсінської декларації. В цілому від 8 донорів автори даного винаходу отримували 1,66 літра кісткового мозку. Для виділення моноклеарних клітин кісткового мозку за допомогою градієнта фіколу автори даного винаходу використовували апарат Sepax, як показано на фіг. 1. Абсолютна кількість BM-MNC на 1 мл кісткового мозку після даної процедури виділення становила $3,3 \times 10^6 \pm 6,3 \times 10^5$ клітин. Загальна кількість BM-MNC, що отримували від восьми донорів, після двох стадій промивання становила $9,86 \times 10^9$. Ці клітини ресуспендували у кріосередовищі та розподіляли у мішки, які заморожували з використанням програмованого заморожувача, а потім зберігали в паровій фазі рідкого азоту до застосування.

Приклад 2. Отримання мезенхімальних стромальних клітин з моноклеарних клітин кісткового мозку - формування банку MSC

Для створення банку MSC моноклеарні клітини кісткового мозку від 8 донорів розморожували, промивали та об'єднували у DMEM, доповненому 5 % PL. Для визначення оптимальної концентрації тромбоцитарного лізату для адгезії клітин-попередників MSC автори даного винаходу культивували BM-MNC з обома концентраціями PL 5 % та 10 %. Отримані результати демонстрували, що концентрація 5 % тромбоцитарного лізату є набагато більше ефективною в стимуляції BM-MNC та отриманні MSC, ніж концентрація 10 % PL (фіг. 2A). Крім того, автори даного винаходу з'ясували, яка з цих двох концентрацій PL є кращою для клінічного розмноження MSC. Автори даного винаходу виявили, що концентрація 10 % PL значно більш ефективна для розмноження MSC, ніж 5 % PL (фіг. 2B). Більш того, в обох випадках нефільтровані тромбоцитарні лізати були більш ефективними для створення та розмноження MSC, ніж фільтровані (фіг. 2C). Ці попередні експерименти забезпечили умови для створення банку MSC. Таким чином, автори даного винаходу розморожували BM-MNC від кожного донора та після дворазового промивання об'єднували їх разом, а потім культивували протягом 14 діб, як описується у розділі Способи. Автори даного винаходу з $9,89 \times 10^9$ BM-MNC змогли отримати $3,2 \times 10^8$ MSC пасажу 1. Дані MSC експресували типові маркери для MSC, такі як CD73, CD90 і CD105, але були негативними у відношенні маркерів кровотворних клітин, наприклад, CD14, CD34, CD45. Вони не експресували антигени HLA II класу, але експресували високі рівні антигенів HLA I класу. Згідно з фарбуванням трипановим синім життєздатність цих MSC перед заморожуванням становила 95 ± 5 %.

Загальну кількість MSC розподіляли у 210 кріофлаконів з вмістом $1,5 \times 10^6$ MSC P1 в кожному та остаточно заморожували в газоподібній фазі рідкого азоту до застосування. Автори даного винаходу назвали даний набір флаконів банком MSC.

Приклад 3. Створення та валідація клінічних кінцевих продуктів MSC

а) Розморожування флаконів з банку MSC

Для отримання та тестування клінічних кінцевих продуктів MSC у відношенні їх проліферативного, диференціовального та алоупресивного потенціалу автори даного винаходу розморожували три довільно вибраних флакони з MSC із банку відповідно до даного винаходу через 6-8 тижнів після їх кріоконсервування. Середня кількість клітин, відновлених з трьох розморожених флаконів, становила $1,39 \times 10^6$ життєздатних клітин/флакон (діапазон $1,23 \times 10^6$ - $1,48 \times 10^6$), тоді як життєздатність становила 95,25 % (діапазон 93,45-96,9 %). В середньому, розмноження цих MSC за 2 тижні до кінця пасажу 2 дозволило отримати 470×10^6 життєздатних MSC (діапазон 420 - 548×10^6 MSC). Ці зразки заморожували в мішках до застосування та називали клінічними кінцевими продуктами MSC.

б) Імунофенотипування кінцевого продукту MSC та його диференціовальний потенціал

MSC клінічного кінцевого продукту наприкінці пасажу 2 були негативними за кровотворними маркерами CD45, CD14, CD34 та не експресували HLA-DR. Однак вони експресували високі рівні типових маркерів MSC, таких як CD73, CD90 і CD105. Також вони були здатні диференціюватися в остеобласти та адипоцити в тканиноспецифічних середовищах (фіг. 4).

д) Кінетичні показники проліферації та старіння MSC

Для демонстрації обґрунтування об'єднання моноклеарних клітин кісткового мозку від 8 донорів з метою створення банку MSC відповідно до даного винаходу автори даного винаходу порівнювали *in vitro* ріст MSC від 8 окремих донорів з ростом об'єднаних MSC від кожного донора в P2 та 4 кінцевих продуктів MSC у тому самому пасажі (фіг. 5A). Як і очікували, MSC від кожного донора кісткового мозку демонстрували різні кінетичні показники росту, які варіюють від $0,3 \times 10^6$ (у донора 7) до $1,7 \times 10^6$ MSC (у донора 5). Середні кінетичні показники проліферації

продукту MSC, отриманого з об'єднаних BM-MNC від 8 донорів, становили $1,0 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$ MSC, що несподівано добре корелювало з кількістю MSC, отриманих з пулу окремих MSC від 8 донорів, - $1,1 \times 10^6$. Цікавіше, що обидва значення дуже добре корелювалися з середньою кількістю MSC, отриманих при розмноженні 4 кінцевих продуктів MSC в пасажі, $1,085 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ MSC. Дані результати доводять припущення авторів даного винаходу про те, що шляхом об'єднання BM-MNC можна отримати "середнє арифметичне" MSC, що проліферуються добре та погано.

Для тестування імовірності того, що кожний кінцевий продукт MSC з банку MSC має майже однаковий проліфераційний потенціал, автори даного винаходу аналізували його при розмноженні десяти аліквот з банку MSC від P0 до кінця пасажу 2 для клінічного застосування. Як показано на фіг. 5B, середня кількість клітин усіх розмножених кінцевих продуктів наприкінці пасажу 2 становила $5,3 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$ MSC, що вказує на високооднорідний проліфераційний потенціал кінцевих продуктів. Подібним чином, кількість подвоєнь популяції в P1 та наприкінці пасажу 2 була майже такою ж ($4,3$ PD/пасаж), а сукупна кількість PD не перевищувала значення 9 ($8,7 \pm 0,4$). Для тестування того, що MSC не є імортальними, автори даного винаходу розмножували 3 кінцевих продукти MSC з банку MSC відповідно до даного винаходу за 12 пасажів. Як показано на фіг. 5D, від пасажу 5 до 12 MSC зазнавали реплікативного старіння, та число PD швидко знижувалося, вказуючи на те, що ці клітини дійсно старіють та не проліферують до нескінченності.

е) Алосупресивний потенціал MSC, виділених від окремих донорів, та кінцеві продукти MSC в реакції змішаних лімфоцитів (MLR)

Показали, що MSC проявляють алосупресивні якості або *in vitro*, або *in vivo*. Для перевірки припущення авторів даного винаходу про те, що MSC, отримані з пулу BM-MNC від 8 донорів, можуть мати більш високий алосупресивний потенціал, ніж середній алосупресивний потенціал MSC, отриманих від окремих донорів, автори даного винаходу використовували в MLR розмножені MSC пасажу 2 від 8 окремих донорів, а також пул MSC, який отримували шляхом об'єднання MSC від 8 донорів перед розмноженням (пул MSC), та один кінцевий продукт MSC (що отримують з пулу MNC, отриманого з банку MSC-MSC-140). Як і очікувалося, алосупресивний потенціал окремих MSC був дуже однорідним, тобто ці MSC інгібували абсолютно по-різному індуковану алоантигеном проліферацію MNC крові від двох відмінних за HLA донорів. Цей ефект варіював від 20 % (у донорів 1 та 8) до приблизно 80 % інгібування (у донорів 2 та 3) (фіг. 6A). Алосупресивний потенціал MSC, отриманих з пулу MSC від 8 донорів (пулу MSC), дорівнював середньому інгібіторному потенціалу MSC від 8 донорів сукупно (середнє 8 донорів). Однак алосупресивний потенціал зразка розмножених MSC-140 з банку MSC відповідно до даного винаходу значно перевищував такий у пулі MSC та середній алосупресивний потенціал MSC від 8 донорів сукупно ($P < 0,001$, $P < 0,01$, відповідно). З метою оцінювання того, чи були клінічні продукти MSC відповідно до даного винаходу після розморожування однорідними у відношенні пригнічення алореакції, автори даного винаходу розморожували 6 додаткових флаконів з MSC та безпосередньо тестували в аналізі MLR, оскільки їх вводять хворим *in vivo*. Як показано на фіг. 6B, усі ці 6 клінічних продуктів MSC демонстрували постійний алосупресивний ефект *in vitro*, що вказує на їх дуже однорідний потенціал у пригніченні алореакції. Середній алосупресивний потенціал при відношеннях мішені до ефектору, що використовують у даному документі, становив $52 \% \pm 8,7 \%$.

Приклад 4. Генетична характеристика клінічних кінцевих продуктів MSC

Оскільки *in vitro* культура, як правило, може бути джерелом хромосомних аберацій культивованих клітин, автори даного винаходу з'ясовували, чи піддаються таким змінам клінічні кінцеві продукти MSC відповідно до даного винаходу. Хромосомний аналіз 25 мітозів MSC з розділенням приблизно 350-400 бенд демонстрував нормальне число хромосом (еуплоїдію) у всіх з них (фіг. 7A). Однак з використанням розділення приблизно 300 бенд автори даного винаходу виявили транслокацію між коротким плечем хромосоми 5 та коротким плечем хромосоми 9 при 4 з 25 аналізованих мітозів. Точки розриву розташовувалися в бенді 5p13 та 19p13.3. Аналіз флуоресцентної *in situ* гібридизації (FISH) з використанням двокольорового зонда для хромосоми 5p15 (hTERT) та 5q35 (NSD1), а також трьохкольорового зонда Break Apart для хромосоми 8q24 демонстрував, що велика частина клінічних кінцевих продуктів MSC з банку MSC відповідно до даного винаходу має нормальний диплоїдний патерн обох хромосом (фіг. 7B, C). Інтерфазні ядра після двокольорової гібридизації набору зондів 5p15 (зелений) та 5q35 (червоний) вказували на те, що 97,2 % клітин демонстрували нормальний диплоїдний патерн хромосоми 5, та тільки приблизно 2,8 % показували тетраплоїдний патерн гібридизації (фіг. 7D). Подібним чином, інтерфазні ядра після трьохкольорової гібридизації зонда Break Apart MYC (фіг. 7C) показували у 97 % MSC два сигнали нормального злиття для хромосоми 8q24, а у

3 % MSC тетраплоїдний патерн сигналу (фіг. 7E). Таким чином, хромосомні аберації *in vitro* відбуваються в дуже невеликій фракції MSC.

Аналіз експресії генів p53, p21 та Мус в 3 клінічних кінцевих продуктах MSC демонстрував 2-5-кратне посилення експресії p21, приблизно 6-10-кратне зниження експресії гена p53 та відсутність експресії протоонкогена c-тус (фіг. 8A). Найбільш важливим є те, що, з огляду на поведінку старіння MSC з банку відповідно до даного винаходу, автори даного винаходу показали, що жоден з 3 кінцевих продуктів MSC не експресував hTERT (дані не показані).

Оскільки MSC з банку відповідно до даного винаходу отримували з пулу BM-MNC від 8 донорів третьої сторони, після отримання MSC автори даного винаходу зацікавилися відносним внеском кожного донора. Химерний аналіз за допомогою STR-PCR з використанням серій генетичних маркерів демонстрував внесок 8 донорів в різних пропорціях в клінічний кінцевий продукт MSC (фіг. 8B). В принципі, відсоткове відношення внеску в клінічний продукт корелювало з проліферативним потенціалом MSC, отриманих від окремих донорів, тобто MSC, які окремо розмножувалися краще, виявлялися також в більш високих пропорціях в кінцевому продукті MSC.

Приклад 5. Клінічні випадки хворих, що отримували лікування препаратами MSC відповідно до даного винаходу

Хворий 1, дата народження 26.03.1999 р.

Порушення: велика таласемія.

Після отримання трансплантації стовбурових клітин у хворого розвивалися асцит, набряк суглобів, ексудативний перикардит, спричинені імунологічним полісерозитом, можливо, у зв'язку з хворобою "трансплантат проти хазяїна" (GvHD). Одноразове введення MSC відповідно до даного винаходу відбулося без ускладнень. При одночасному лікуванні діуретиками асцит, набряк суглобів та ексудативний перикардит пройшли.

Хворий 2, дата народження 20.12.2009 р.

Порушення: важкий агранулоцитоз.

В день +12 після терапії стовбуровими клітинами (SCT) у хворого виникла гостра блискавична GvHD шкіри (IV ступеню), яка не контролювалася навіть за допомогою 2 мг/кг стероїду та 55 мг/кг мікофенолату мофетилу на добу. 22.11.2012 р. дитина отримала MSC відповідно до даного винаходу.

Після терапії MSC GvHD повільно, але стійко проходила, до повного припинення через 28 днів після введення MSC. Дитина перенесла MSC дуже добре та показала відсутність вірусної, бактеріальної або грибової інфекції через 30 днів після введення.

Хворий 3, дата народження 25.03.2010 р.

Порушення: гострий лімфобластний лейкоз.

SCT проводили 16.10.12 р. від неідентичного у відношенні HLA родинного донора. Вже в день +14 після SCT відзначали перші ознаки GvHD в кишечнику. негайно почали терапію мікофенолату мофетилу та стероїдом. Це приводило до відносного поліпшення симптомів. На день +35 після SCT, однак, GvHD II ступеню в кишечнику зберігалася, незважаючи на тривале введення стероїду.

У зв'язку з цим було прийнято рішення про посилення імуносупресорної терапії шляхом введення MSC відповідно до даного винаходу. Введення MSC пройшло без ускладнень 21.12.12 р. Протягом 30 днів після введення SCT не виявлялися будь-які інфекції. На 15.1.2013 р. не спостерігали жодних ознак GvHD в кишечнику хворого, та збереглася лише помірна GvHD шкіри, яка не вимагала будь-якого лікування.

Хворий 4, дата народження 25.03.1999 р.

Порушення: гострий мієлолейкоз.

SCT виконували 19.09.12 р. від неідентичного у відношенні HLA родинного донора.

Через 5 місяців після трансплантації стовбурових клітин у хворого розвинулися клінічні симптоми синдрому Стівенса-Джонсона. Оскільки хворий на момент реєстрації даних приймав кілька медичних препаратів, які асоціювалися з розвитком даної клінічної картини, відповідні медичні препарати (вориконазол, пеніцилін, котримоксазол) були скасовані. У зв'язку з виявленням аденовірусної інфекції було вирішено не проводити імуносупресорну терапію глюкокортикоїдами. У хворого також розвивалися типові викликані GvHD ураження шкіри, які, імовірно, стимулювалися синдромом Стівенса-Джонсона. Таким чином, почали імуносупресорну терапію за допомогою CSA. Для ослаблення запальних явищ вводили MSC відповідно до даного винаходу. Таке введення MSC добре переносилося. Також кілька разів на добу застосовували крем, що містить глюкокортикоїд. При даній терапії спостерігали майже повне загоєння викликаних GvHD уражень шкіри.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. In vitro спосіб виділення мезенхімальних стромальних клітин (MSC), що включає об'єднання зразків кісткового мозку, отриманих щонайменше від двох генетично відмінних донорів, з отриманням пулу клітин зразків, а потім виділення мезенхімальних стромальних клітин із зазначеного пулу клітин зразків.

2. Спосіб за п. 1, що включає стадії:

(а) забезпечення ряду зразків кісткового мозку, отриманих щонайменше від двох генетично відмінних донорів,

(б) об'єднання зазначених зразків кісткового мозку з отриманням пулу клітин зразків,

(с) необов'язково, культивування зазначеного пулу клітин зразків та

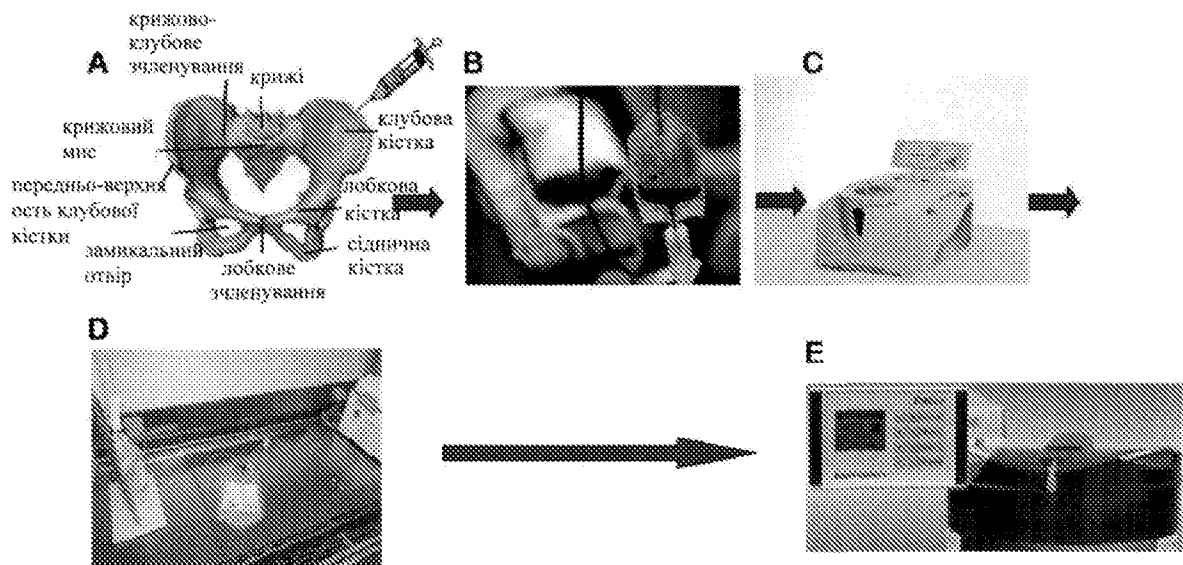
(д) виділення із зазначеного отриманого на стадії (б) пулу клітин зразків зазначених мезенхімальних стромальних клітин.

3. Спосіб за п. 1 або 2, при якому зазначеним зразком кісткового мозку є зразок кісткового мозку ссавця, а зазначеною мезенхімальною стромальною клітиною є мезенхімальна стромальна клітина ссавця; переважно, при якому зазначеним зразком кісткового мозку є зразок кісткового мозку людини, та зазначеною мезенхімальною стромальною клітиною є мезенхімальна стромальна клітина людини.

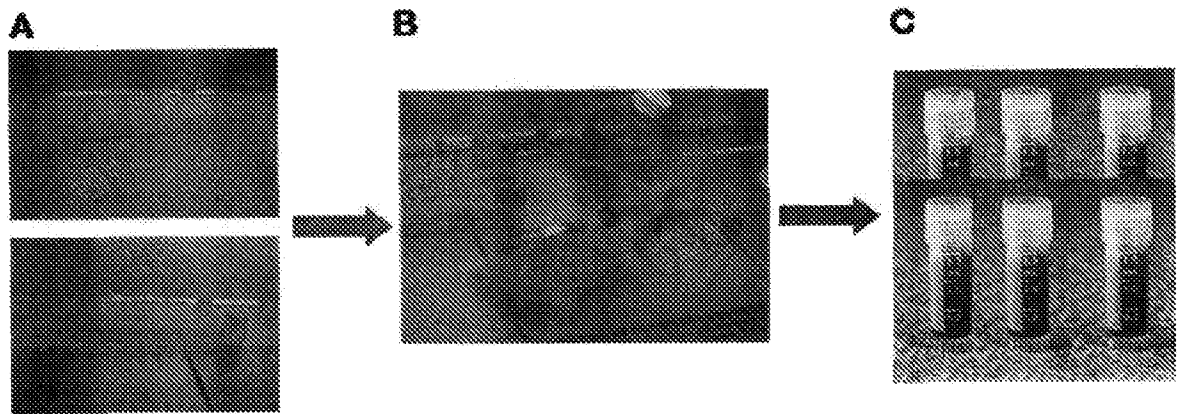
4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, при якому зазначеними зразками кісткового мозку є зразки моноклеарних клітин кісткового мозку.

5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, при якому зазначені зразки кісткового мозку отримують щонайменше від трьох, більш переважно щонайменше від чотирьох, більш переважно щонайменше від п'яти, більш переважно щонайменше від шести, більш переважно щонайменше від семи та найбільш переважно щонайменше від восьми генетично відмінних донорів.

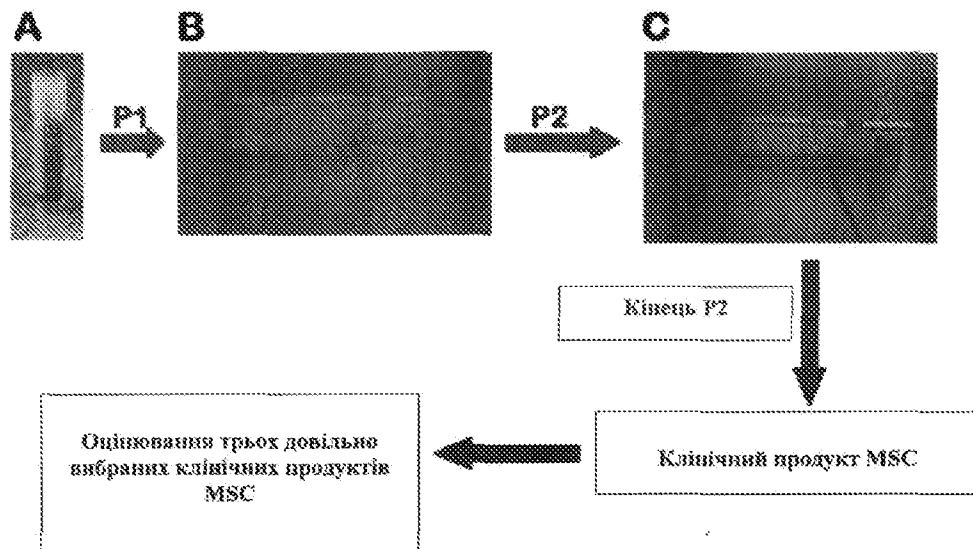
6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, що додатково включає стадію або зберігання зазначених виділених мезенхімальних стромальних клітин, або розмноження зазначених виділених мезенхімальних стромальних клітин.



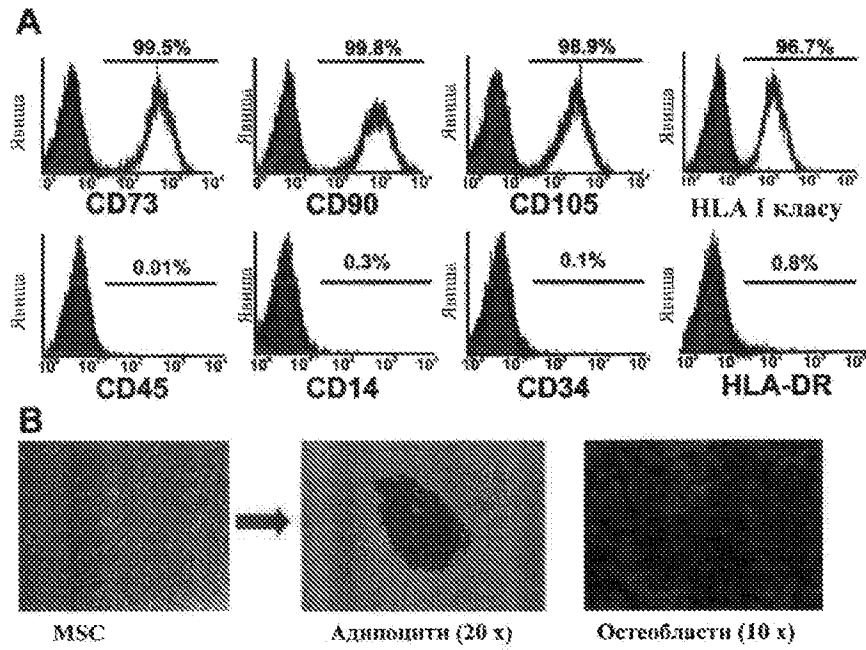
Фіг. 1



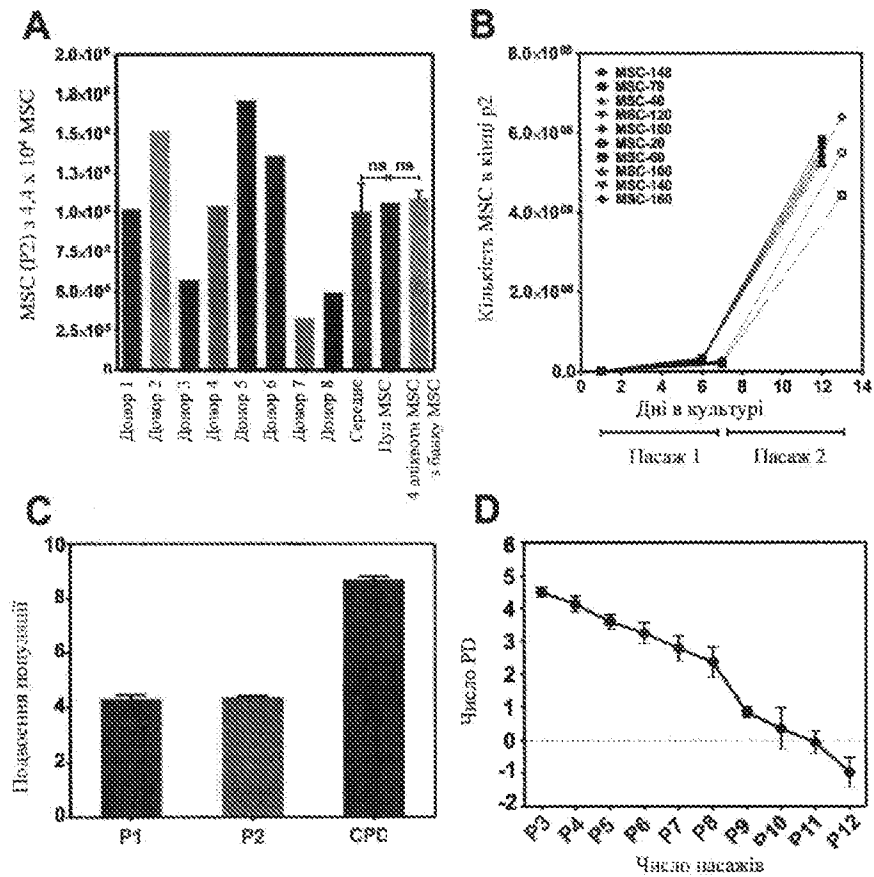
Фіг. 2



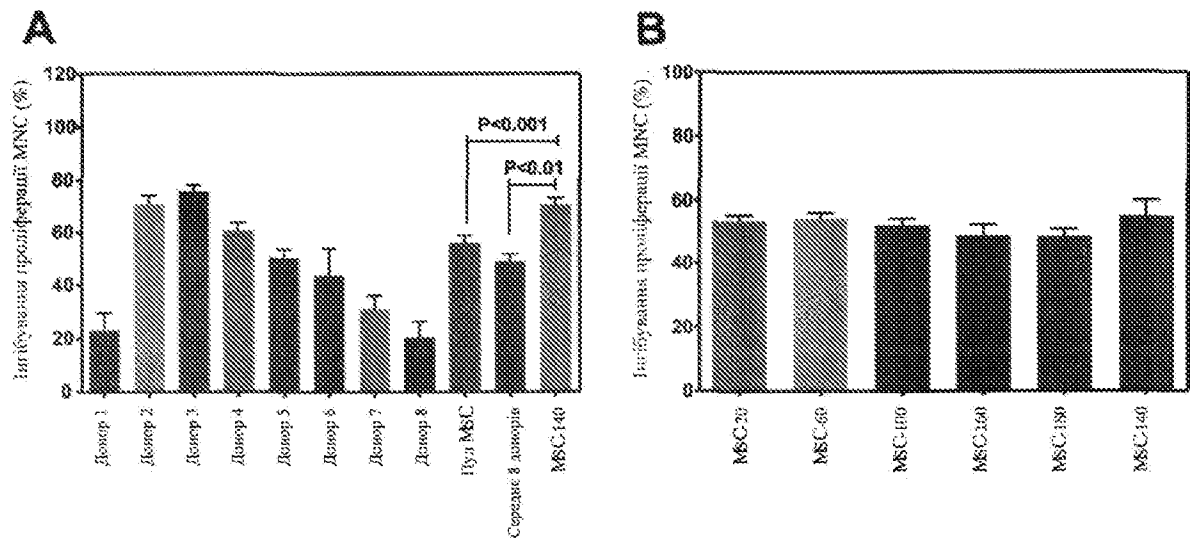
Фіг. 3



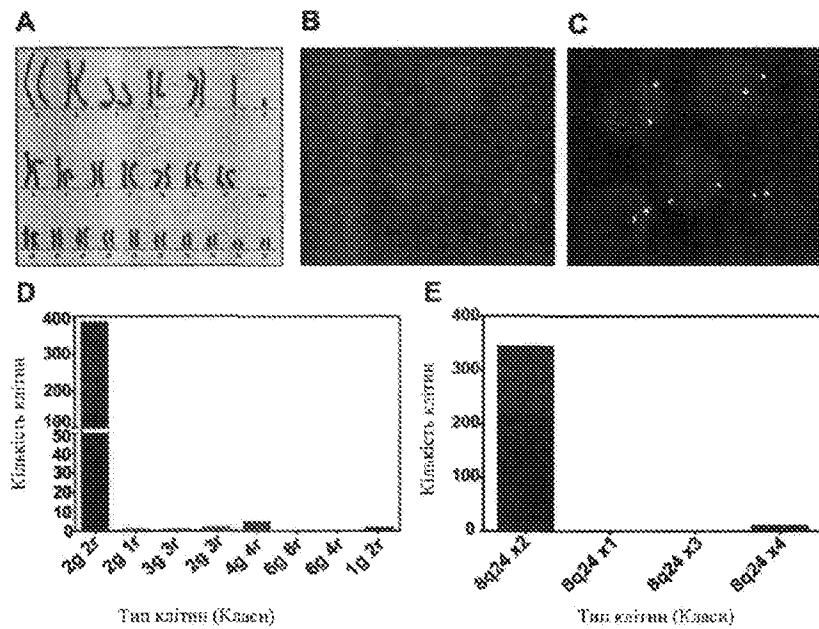
Фіг. 4



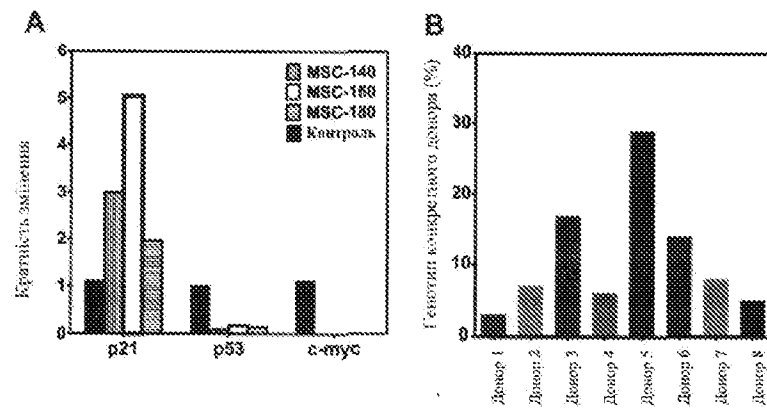
Фіг. 5



Фіг. 6



Фіг. 7



Фіг. 8

