



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2009133972/15**, 11.09.2009(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
11.09.2009

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: **11.09.2009**(43) Дата публикации заявки: **20.03.2011** Бюл. № 8(45) Опубликовано: **10.09.2013** Бюл. № 25(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2008680 C1**, 28.02.1994. **RU 2176390 C1**, 27.11.2001. Николаенко М.Н. Синтез и исследование биологической активности производных 2-аминопропан-1,3-диола. Автореферат диссертации, 2007.

Адрес для переписки:

**420008, г.Казань, ул. Кремлевская, 18,
ФГАОУ ВПО КФУ, патентно-лицензионный
отдел, И.А.Назмиеву**

(72) Автор(ы):

**Ризванов Альберт Анатольевич (RU),
Блатт Наталья Львовна (RU),
Салафутдинов Ильнур Ильдусович (RU),
Шафигуллина Айгуль Касыймовна (RU),
Шахин Фикреттин (TR),
Ялвач Мехмет Эмир (TR),
Андраш Палоташ (HU),
Киясов Андрей Павлович (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования
"Казанский (Приволжский) федеральный
университет" (ФГАОУ ВПО КФУ) (RU),
государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования "Казанский
государственный медицинский университет"
Министерства здравоохранения Российской
Федерации (ГБОУ ВПО Казанский ГМУ
Минздрава России) (RU),
Ризванов Альберт Анатольевич (RU)****(54) СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВЕЩЕСТВА**

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к медицине и описывает способ определения биологической активности вещества, заключающийся в том, что выделяют клетки из биологических тканей человека или животных, проводят мечение с использованием флюоресцентного красителя, ко-культивируют с пораженными заболеванием клетками, к ко-культуре добавляют исследуемое вещество, определяют биологическую активность

исследуемого вещества, анализируя жизнеспособность определенной клеточной популяции в ко-культуре здоровых и пораженных заболеванием клеток по увеличению или снижению процента мертвых клеток. Изобретение обеспечивает повышение достоверности результата определения биологической активности веществ и расширение области применения способов определения биологической активности веществ. 1 з.п. ф-лы, 1 ил.

RU 2 4 9 2 4 7 2 C 2

RU 2 4 9 2 4 7 2 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION(21)(22) Application: **2009133972/15, 11.09.2009**(24) Effective date for property rights:
11.09.2009

Priority:

(22) Date of filing: **11.09.2009**(43) Application published: **20.03.2011 Bull. 8**(45) Date of publication: **10.09.2013 Bull. 25**

Mail address:

420008, g.Kazan', ul. Kremlevskaja, 18, FGAOU
VPO KFU, patentno-litsenzionnyj otdel,
I.A.Nazmievu

(72) Inventor(s):

**Rizvanov Al'bert Anatol'evich (RU),
Blatt Natal'ja L'vovna (RU),
Salafutdinov Il'nur Il'dusovich (RU),
Shafigullina Ajgul' Kasyjmovna (RU),
Shakhin Fikretin (TR),
Jalvach Mekhmet Ehmira (TR),
Andrash Palotash (HU),
Kijasov Andrej Pavlovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federal'noe gosudarstvennoe avtonomnoe
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego
professional'nogo obrazovaniya "Kazanskij
(Privolzhskij) federal'nyj universitet" (FGAOU
VPO KFU) (RU),
gosudarstvennoe bjudzhetnoe obrazovatel'noe
uchrezhdenie vysshego professional'nogo
obrazovaniya "Kazanskij gosudarstvennyj
meditsinskij universitet" Ministerstva
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (GBOU
VPO Kazanskij GMU Minzdrava Rossii) (RU),
Rizvanov Al'bert Anatol'evich (RU)**

(54) METHOD OF DETERMINING BIOLOGICAL ACTIVITY OF SUBSTANCE

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: cells are isolated from human or animal biological tissues, labeling is carried out using a fluorescent dye, co-culturing is carried out with the diseased cells, the test substance is added to co-culture, the biological activity of the test substance is determined analysing the viability of a

certain cell population in the co-culture of healthy and diseased cells according to increase or reduce the percentage of dead cells.

EFFECT: increasing the reliability of the result of determining the biological activity of substances and enlarging the area of application of methods of determining the biological activity of substances.

2 cl, 1 dwg

Изобретение относится к области биологии, медицины, ветеринарии и может быть использовано для проведения исследования биологической активности веществ в биологии, медицине и ветеринарии.

5 Известен способ (1) определения биологической активности вещества. Недостатком
способа является существенная ограниченность области применения. Причиной
ограниченности является использование в качестве тестирующего только одного вида
клеточного материала - длительной культуры костного мозга. Эта ограниченность не
10 позволяет выполнить комплексное определение биологической активности вещества
на клетках животных и человека, например раковых клетках. Кроме того,
использование только одного типа клеточного тестирующего материала
принципиально не позволяет моделировать взаимодействие здоровых и раковых
клеток, которое происходит в организме больного животного или человека.

15 Известен способ (2) определения биологической активности вещества. Недостатком
способа является использование двух идентичных клеточных линий, отличающихся по
активности только одного гена. Способ не позволяет моделировать процессы
взаимодействия пораженной заболеванием клетки со здоровыми клетками организма,
которые отличаются по характеру экспрессии множества генов, в результате чего
20 клетки существенно отличаются по своей физиологии и, соответственно, воздействию
на окружающие их клетки.

Наиболее близким по существу предполагаемого изобретения, прототипом,
является известный способ определения биологической активности вещества (3).
Недостатком прототипа является существенная ограниченность применения.
25 Способ (3) не позволяет проводить исследование биологической активности вещества
на клеточных культурах, которые моделируют взаимодействие различных клеточных
популяций в организме. Таким образом, с помощью способа (3) нельзя предсказать
результат взаимодействия различных здоровых клеток организма с пораженными
заболеванием клетками на биологическую активность тестируемого вещества на
30 каждую клеточную популяцию, например раковых клеток.

Целью предполагаемого изобретения является повышение достоверности
результата определения биологической активности веществ и расширение области
применения способов определения биологической активности веществ.

35 Цели достигают тем, что выделяют клетки из биологических тканей человека или
животных, проводят мечение культур клеток. Мечение выполняют с использованием
флюоресцентного красителя. Меченые культуры клеток совместно ко-культивируют с
немечеными пораженными заболеванием клетками. К ко-культуре добавляют
40 исследуемое вещество, осуществляют анализ жизнеспособности определенной
популяции клеток в ко-культуре, по результатам анализа определяют биологическую
активность исследуемого вещества по отношению к определенной клеточной
популяции в ко-культуре здоровых и пораженных заболеванием клеток. Определение
биологической активности применяют для выявления противораковых свойств
45 исследуемого вещества по отношению к определенной клеточной популяции в ко-
культуре здоровых и пораженных заболеванием клеток.

Сущность предполагаемого изобретения иллюстрирует пример осуществления.
предлагаемого способа для оценки биологической активности, в частности
цитотоксичности (клеточной токсичности) вещества. Под определением ВЕЩЕСТВО
50 подразумеваются любые субстанции, например материалы, препараты, их
компоненты естественного и искусственного происхождения. Осуществление способа
производят последовательно, например, в три этапа.

Первый этап

Выбирают биологические ткани, подвергаемые действию испытываемого на биологическую активность вещества, из которых (биологических тканей) выделяют и метят испытываемые клетки.

5 Выделение клеток осуществляют известными способами, например из зачатков зубов человека. Для этого пульпу зуба измельчают, например, стерильным хирургическим скальпелем. Измельченную ткань помещают в емкость для культивирования клеток, например в лунку культурального планшета, и инкубируют
10 в среде DMEM (фирма-производитель красителей - Sigma, Великобритания) с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки, при температуре 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Через 1...2 недели наблюдается рост клеток вокруг кусочков зубной ткани. Данные клетки анализируют с использованием стандартных методов проточной цитофлуорометрии [4] для определения их
15 принадлежности к искомым мезенхимальным стволовым клеткам (далее по тексту - МСК).

Мечение культур клеток осуществляют известным способом, например с использованием флуоресцентных *in vitro* красителей [5]. Для осуществления
20 предлагаемого способа используют, например, две клеточные культуры:

1) мезенхимальные стволовые клетки человека (полученные вышеупомянутым путем);

2) раковые клетки нейробластомы линии SH-SY5Y.

25 Клетки, например МСК, метят флуоресцентным красителем РКН67 зеленого спектра свечения (фирма-производитель красителей - Sigma, Великобритания). Для этого клетки переводят в суспензию, например, с помощью обработки ферментом трипсин в растворе Версена (фирма-производитель красителей - Sigma, Великобритания). Клетки перемешивают пипетированием и переносят в другую,
30 чистую, пробирку. К клеточной суспензии добавляют культуральную среду DMEM. Клетки осаждают на дне пробирки центрифугированием, например - в течение 5 мин при 1400 об/мин на центрифуге LMC-3000 (фирма-производитель BioSan, Латвия). Клеточный осадок ресуспензируют в буферном растворе «Diluent C» [5], после чего к клеточной суспензии добавляют краситель РКН67, разведенный в буферном растворе
35 «Diluent C». Клеточную суспензию перемешивают пипетированием и инкубируют 5 минут при комнатной температуре, например - при 20...25°C. Процесс мечения клеток останавливают добавлением 1 мл телячьей эмбриональной сыворотки и культуральной среды, например DMEM с добавлением 10% телячьей эмбриональной
40 сыворотки. Клетки осаждают на дне пробирки центрифугированием, например - в течение 10 мин при 1400 об/мин на центрифуге LMC-3000 (фирма-производитель BioSan, Латвия). Клеточный осадок повторно ресуспензируют в питательной среде, например в питательной среде DMEM с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки. Клетки осаждают на дне пробирки центрифугированием,
45 например - в течение 5 мин при 1400 об/мин на центрифуге LMC-3000 (фирма-производитель BioSan, Латвия). Клетки ресуспензируют, например - в питательной среде DMEM с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки. Затем проводят оценку количества, концентрации и жизнеспособности клеток, например - окраской
50 трипановым синим и подсчетом окрашенных (мертвых) и неокрашенных (живых) клеток в камере Горяева. Таким путем завершают получение меченой клеточной культуры и приступают ко второму этапу.

Второй этап

Клетки МСК, меченые, например РКН67, и немеченые клетки SH-SY5Y в оптимальном соотношении, например в соотношении 1:1, вносят в лунки культурального планшета и приступают к совместному культивированию (далее по тексту ко-культивирование). Ко-культуры выращивают на культуральной среде, например DMEM с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки при температуре 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. При культивировании раковые клетки SH-SY5Y образуют самоорганизующиеся структуры, напоминающие метастазы опухолей в тканях организма. Таким путем завершают получение ко-культуры клеток для определения биологической активности исследуемого вещества и выполняют третий этап.

Третий этап

Биологическую активность вещества определяют на основании жизнеспособности клеточных популяций в ко-культуре. Берут вещество, биологическую активность которого по отношению к одной из клеточной популяций требуется определить, например пероксид водорода. Пероксид водорода добавляют до конечной концентрации 100...500 мкМ и ко-культуру инкубируют 20 часов в культуральной среде DMEM с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки, при температуре 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Биологическую активность исследуемого вещества определяют, например, с помощью проточной флуоресцентной цитометрии [4], например с окраской пропидием иодида. Этот способ определения биологической активности основан на способности пропидия иодида окрашивать ядра только мертвых клеток (красная флуоресценция). Каждая культура клеток состоит из живых и определенного процента мертвых клеток (умирающих в силу естественных причин). Применение окрашивания пропидием иодида позволяет определить процент мертвых клеток в культуре. Увеличение или снижение процента мертвых клеток свидетельствует о понижении или увеличении жизнеспособности клеточной культуры, что соответственно является следствием биологической активности исследуемого вещества.

Приведенный для примера способ с использованием проточной цитометрии позволяет проводить подсчет отдельных клеток, имеющих различные спектры флуоресценции. Определение жизнеспособности клеток меченой популяции проводят по формуле:

$$Ж = 100 - (K_1 \times 100 / K_2), \text{ где}$$

Ж - процент жизнеспособных клеток;

K₁ - количество (численность) клеток, меченых зеленым флуоресцентным красителем РКН67 и красным флуоресцентным красителем пропидием иодидом;

K₂ - количество (численность) клеток, меченых зеленым флуоресцентным красителем РКН67.

Анализ жизнеспособности клеток не меченой популяции осуществляется по аналогичной формуле, в которой значения K₁ и K₂ соответствуют аналогичным параметрам клеток, не меченых зеленым флуоресцентным красителем РКН67.

Результат определения биологической активности исследуемого вещества - перикиси водорода H₂O₂ - иллюстрирует Фиг., отражающий анализ жизнеспособности клеток МСК и SH-SY5Y в ко-культуре при добавлении H₂O₂. Клетки МСК мечены зеленым красителем РКН67. Клетки SH-SY5Y не мечены. Ось X - FL3-Height - уровень красной флуоресценции пропидия иодида. Ось Y - FL1-Height - уровень зеленой флуоресценции красителя РКН67. Разметочная сетка нанесена для разделения клеточных популяций. Левый нижний угол - жизнеспособные клетки SH-SY5Y; левый

верхний угол - жизнеспособные клетки МСК; правый нижний угол - мертвые клетки SH-SY5Y; правый верхний угол - мертвые клетки МСК.

Проводя сравнение не подверженного воздействию исследуемого препарата контрольного образца с опытными образцами, подвергшимися воздействию
5 исследуемого вещества в различных концентрациях, в условиях культивирования клеток в виде чистых отдельных культур или в виде ко-культуры делают заключение о влиянии исследуемого препарата на биологические функции определенной клеточной популяции.

10 Таким образом, пример показывает достижимость цели изобретения - определение цитотоксичности (частный случай биологической активности) вещества к определенной клеточной популяции (SH-SY5Y) в ко-культуре (МСК+раковые клетки SH-SY5Y).

15 Предлагаемый способ применяют, кроме показанного в примере, и для иных клеточных популяций в ко-культуре, например для определения биологической активности исследуемого вещества на пораженные заболеванием клетки, например раковые. Для этого процедуру мечения и определения жизнеспособности меченых
20 клеток проводят с раковыми клетками с использованием способа, описанного выше для МСК.

Описанный способ определения биологической активности вещества, основанный на ко-культивировании здоровых и пораженных заболеванием клеток, обладает
25 преимуществом перед известными способами. Предлагаемый способ позволяет определить биологическую активность вещества по отношению к определенной, заранее выбранной, клеточной популяции, например к раковым и/или стволовым клеткам. Использование в качестве объекта тестирования ко-культуры здоровых и пораженных заболеванием клеток позволяет повысить достоверность определения биологической активности путем моделирования межклеточных взаимодействий,
30 например условий, в которых раковые клетки находятся в тканях организма.

Моделирование процесса взаимодействия потенциально-лекарственного вещества с клетками биологических тканей, например больного пациента, вне организма
35 пациента позволяет существенно повысить результативность поиска и применения оптимального, наиболее подходящего в конкретной ситуации лекарственного препарата. Например, таким моделированием удастся выявить препарат, обладающий низкой цитотоксичностью по отношению к здоровым клеткам и обладающий высокой цитотоксичностью к пораженным заболеванием клеткам, например обладающий противораковым эффектом.

40 Такой подбор наиболее эффективного лечебного препарата до максимально возможного повышает результативность лечебного процесса.

Общепринятое использование для определения биологической активности вещества отдельных чистых культур клеток не позволяет проводить точную оценку
45 терапевтических параметров, так как при тесном взаимодействии здоровые и пораженные заболеванием клетки могут изменять физиологический статус соседних клеток, меняя их чувствительность к лекарственным препаратам. Предлагаемый способ, в отличие от общепринятых, позволяет моделировать физиологические взаимодействия здоровых и пораженных заболеванием клеток вне организма, в
50 культуре клеток, что недостижимо при применении прототипа.

Проведенные ранее эксперименты показали, что клетки, выделяемые из зачатков зубов человека по описанному в примере способу, аналогичны мезенхимным
стволовым клеткам (МСК) (6). Известно, что помимо зачатков зубов, МСК выделяют

из костного мозга, жировой ткани, хрящей, пуповины и пуповинной крови, плаценты, пульпы зубов и других тканей человека и животных (7, 8). Эти клетки обладают схожими свойствами, такими как иммунофенотип, и способностью к дифференцировке в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлении. Таким образом, приведенный пример осуществления предлагаемого способа не ограничивает применение иных (по сравнению с приведенными в примере) культур клеток, а также способов мечения клеточных популяций и способов определения биологического эффекта исследуемого вещества на здоровые и раковые клетки.

Приведенный пример применения предполагаемого изобретения показывает его полезность для исследования биологической активности лекарственных препаратов в медицине. Применение предлагаемого способа особо полезно при разработке *in vitro* тест-систем повышенной эффективности для поиска (скрининга) новых веществ, обладающих лекарственным действием.

Предлагаемое изобретение удовлетворяет критериям новизны, так как при определении уровня техники не обнаружено средство, которому присущи признаки, идентичные (то есть совпадающие по исполняемой ими функции и форме выполнения этих признаков) всем признакам, перечисленным в формуле изобретения, включая характеристику назначения.

Предлагаемый способ имеет изобретательский уровень, поскольку не выявлены технические решения, имеющие признаки, совпадающие с отличительными признаками данного изобретения, и не установлена известность влияния отличительных признаков на указанный технический результат.

Заявленное техническое решение применимо в промышленном поиске биологически активных веществ, обладающих определенными терапевтическими, лекарственными, свойствами, и применять выявленный таким путем биологически активный препарат в деятельности организаций здравоохранения, например для лечения онкологических заболеваний, посредством использования известных стандартных технических устройств и оборудования. Это соответствует критерию «промышленная применимость», предъявляемому к изобретениям.

Использованные источники

1. Способ определения биологической активности вещества для доклинических испытаний. Заявка RU 2002113711.

2. Targeted methods of drug screening using co-culture methods. US Patent 6518035.

3. Method of Testing the Safety and Efficacy of a Drug. US Patent 20070172814.

4. Dean PN, Hoffman RA. Overview of flow cytometry instrumentation. *Curr Protoc Cytom.* 2007 Jan; Chapter 1:Unit1.1.

5. Stable cell membrane labelling. Horan PK, Slezak SE. *Nature.* 1989 July 13; 340(6229): 167-8.

6. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neuro-genesis. Yalvac ME, Ramazanoglu M, Rizvanov AA, Sahin F, Bayrak OF, Salli U, Palotas A, Kose GT. *Phannacogenomics J.* 2010 Apr; 10(2): 105-13.

7. Tamok, A., Ulrich, H. and Bocsi, J. Phenotypes of stem cells from diverse origin // *Cytometry A.* - 2010. - 1: Vol.77. - p.6-10.

8. Webster RA, Blaber SP, Herbert BR, Wilkins MR, Vesey G. The role of mesenchymal stem cells in veterinary therapeutics - a review. *N Z Vet J.* 2012 Sep; 60(5):265-72.

Формула изобретения

1. Способ определения биологической активности вещества заключается в том, что выделяют клетки из биологических тканей человека или животных, проводят мечение с использованием флюоресцентного красителя, ко-культивируют с пораженными заболеванием клетками, к ко-культуре добавляют исследуемое вещество, определяют биологическую активность исследуемого вещества анализируя жизнеспособность определенной клеточной популяции в ко-культуре здоровых и пораженных заболеванием клеток по увеличению или снижению процента мертвых клеток.

2. Способ определения биологической активности по п.1 применяют для выявления противораковых свойств исследуемого вещества по отношению к определенной клеточной популяции в ко-культуре здоровых и пораженных заболеванием клеток.

15

20

25

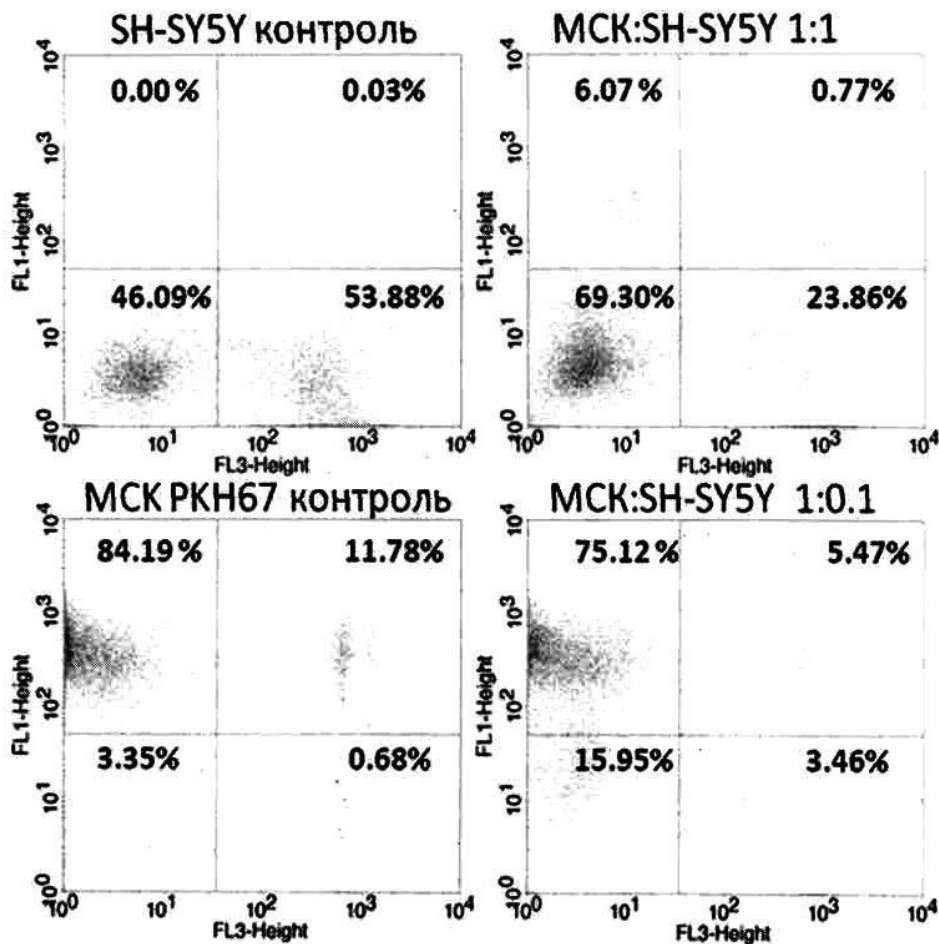
30

35

40

45

50



Анализ жизнеспособности клеток MCK и SH-SY5Y в ко-культуре при добавлении H₂O₂. Клетки MCK мечены зеленым красителем PKN67. Клетки SH-SY5Y не мечены. Ось X – FL3-Height – уровень красной флюоресценции пропидия иодида. Ось Y – FL1-Height – уровень зеленой флюоресценции красителя PKN67. Разметочная сетка нанесена для разделения клеточных популяций. Левый нижний угол – жизнеспособные клетки SH-SY5Y; левый верхний угол - жизнеспособные клетки MCK; правый нижний угол – мертвые клетки SH-SY5Y; правый верхний угол - мертвые клетки MCK.