



MD 3569 G2 2008.04.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **3569** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) Int. Cl.: *C12N 5/02* (2006.01)
C07J 71/00 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. depozit: a 2007 0202 (22) Data depozit: 2007.07.13	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2008.04.30, BOPI nr. 4/2008
(71) Solicitant: CENTRUL NAȚIONAL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE MEDICINĂ PREVENTIVĂ, MD (72) Inventatori: SPÎNU Constantin, MD; SPÎNU Igor, MD; ROȘCA Angela, MD; BÎRCĂ Ludmila, MD; CHINTEA Pavel, MD; COJUHARI Lilia, MD (73) Titular: CENTRUL NAȚIONAL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE MEDICINĂ PREVENTIVĂ, MD	

(54) Mediu de cultivare a celulelor umane și animale

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la biotehnologie, în special la
mediile de cultivare a celulelor umane și animale *in vitro*.

Esența invenției constă în aceea că mediul de
cultivare include un mediu de creștere standard cu
adaos de ser bovin, iar suplimentar conține capsu-
cozidă 3-O- $[\beta$ -D-glucopiranozil (1 $\rightarrow$ 2)]- $[\beta$ -D-glucopiranozil (1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-glucopiranozil (1 $\rightarrow$ 4)- β -D-

2
galactopiranozil (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucopiranozil-[(25R)-
5 α -furostan-2 α , 3 β , 22 α , 26-tetraol]-26-O- β -D-glucopiranozil în concentrație finală de 0,001%.
Revendicări: 1

10

MD 3569 G2 2008.04.30

Descriere:

Invenția se referă la biotehnologie, și anume la mediile de cultivare a celulelor umane și animale *in vitro*.

Este cunoscut mediul nutritiv standard (Eagle; MEM-Eagle, mediul 199, hidrolizat de lactalbumină în soluție de Honx + ser bovin în concentrație de 8...10%, antibiotice) utilizat în procesul de cultivare a celulelor umane și animale [1].

Dezavantajul acestui mediu constă în aceea că mediile standard nu asigură o reproducere maximală a culturilor celulare cultivate pentru obținerea unui produs finit în cantități sporite.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în extinderea asortimentului de substanțe biologice active utilizate în biotehnologia de obținere a masei de culturi celulare care ar permite sporirea cantitativă evidentă a produsului finit, ulterior utilizate în virusologie pentru izolarea și identificarea virusurilor, obținerea anticorpilor monoclonali, fabricarea vaccinurilor etc.

Esența invenției constă în aceea că mediul de cultivare include un mediu de creștere standard cu adaos de ser bovin, iar suplimentar conține capsicozidă 3-O-[β-D-glucopiranozil (1→2)]-[β-D-glucopiranozil (1→3)]-β-D-glucopiranozil (1→4)-β-D-galactopiranozil (1→3)-β-D-glucopiranozil-[(25R)-5α-furostan-2α, 3β, 22α, 26-tetraol]-26-O-β-D-glucopiranozil în concentrație finală de 0,001%.

Rezultatul invenției constă în obținerea mediului standard utilizat în cultivarea celulelor cu soluție de capsicozidă 3-O-[β-D-glucopiranozil (1→2)]-[β-D-glucopiranozil (1→3)]-β-D-glucopiranozil (1→4)-β-D-galactopiranozil (1→3)-β-D-glucopiranozil-[(25R)-5α-furostan-2α, 3β, 22α, 26-tetraol]-26-O-β-D-glucopiranozil, care sporește cantitatea evidentă a produsului finit de 4 ori după 48...72 ori de incubare.

Capsicozida prezintă o substanță în formă de praf cristalin de culoare galbenă-cafenie, rezistentă la acțiunea luminii, higroscopică, solubilă în apă, termenul de păstrare în ambalaj ermetic la temperatura camerei constituie 5 ani. Substanța fiind un metabolit al plantelor superioare nu posedă acțiune cito- și fitotoxică. Capsicozida se obține prin extragerea din semințe de ardei în metanol de 70%. Extrasul se usucă bine și se cromatografiază repetat în coloană cu silicagel. În mediul propus numărul populațional de celule sporește cel puțin de 4 ori în comparație cu mediile nutritive de referință.

Exemplul 1. Prepararea culturii celulare primar tripsinizate de fibroblaști din embrionul uman (FEU).

Țesuturile trunchiului, membrilor superioare și inferioare ale embrionului uman la un termen de 2...4 luni de graviditate se mărunțesc cu foarfecele în bucățele mici cu dimensiunile de 2...4 mm, apoi se spală în soluție Henx cu pH 7,4 de trei ori. Țesuturile mărunțite se tripsinizează. Suspensia celulară obținută se sedimentează prin centrifugare timp de 15 min la 1500...2000 rot./min. Supernatantul se înlătură, iar suspensia de celule se introduce în frigider la temperatura de +4°C...+6°C până la suplimentarea cu noi fracții de celule din următoarele extracte. Extracțiile de celule prin tripsinizare se efectuează până când supernatantul rămâne transparent.

Amestecul de suspensii celulare cumulativ obținut în urma extracțiilor se centrifughează timp de 15 min, la 1500...2000 rot./min. După centrifugare supernatantul se înlătură, iar celulele se resuspensionează în mediu cu 0,5% hidrolizat de lactalbumină în soluție Henx pH 7,0. Sedimentul format din celule primar tripsinizate, repetat se resuspensionează în mediu nutritiv de creștere până la concentrația de 200 000 celule *per* 1 ml. În calitate de mediu de creștere se folosește mediul suplimentat cu 0,5% hidrolizat de lactalbumină în soluție Henx pH 7,0 sau mediul 199 în soluție Henx pH 7,2; la fiecare din ele se adaugă ser bovin în proporție de 10,0% și antibiotice în raportul 25 000 unități penicilină, 25,0 mg streptomycină la 100,0 ml mediu. Suspensia de celule suplimentată cu ingredientele nominalizate se divizează în 2 jumătăți. La una din ele se adaugă soluție 10% de 3-O-[β-D-glucopiranozil (1→2)]-[β-D-glucopiranozil (1→3)]-β-D-glucopiranozil (1→4)-β-D-galactopiranozil (1→3)-β-D-glucopiranozil-[(25R)-5α-furostan-2α, 3β, 22α, 26-tetraol]-26-O-β-D-glucopiranozil, pregătit în prealabil în mediul 199 și sterilizat prin plăci de filtru milipare cu diametrul porilor de 0,22 μm (10⁻⁸ m), astfel încât concentrația finală a biosubstratului utilizat în mediul de creștere să constituie 0,001%. Suspensia de celule primar tripsinizate de fibroblaști embrionari umani se repartizează în volum de 1,0 ml în tuburi de sticlă. Ultimele, fiind montate în stativ sub un unghi de 30...40°, se introduc în termostat la 37°C. După o perioadă de 72 ore de cultivare (în prezența biostimulatorului) se formează un monostrat de celule morfologic tipice.

Jumătatea a doua de suspensie celulară, în care nu a fost adăugată capsicozida, se folosește în calitate de lot martor.

Următoarea etapă conține evaluarea cantitativă a celulelor, care include următoarele procedee: detașarea celulelor de pe pereții tuburilor cu un amestec proteolitic, alcătuit din volume egale de tripsină de 0,25% și versen încălzit în baie de apă până la 30...35°C; din tuburi se înlătură mediul de creștere, monostratul celular format se spală de 3 ori cu soluție-tampon fosfat pH 7,5, apoi se prelucrează cu amestecul proteolitic (tripsină-versen) în așa mod încât monostratul să fie totalmente acoperit de acest

MD 3569 G2 2008.04.30

4

amestec; urmează centrifugarea suspensiei la 2000...2500 rot./min timp de 10 min cu înlăturarea ulterioară a amestecului tripsină-versen.

- 5 Sedimentul celular se resuspensionează în 1,0 ml mediu nutritiv, iar numărul de celule se determină în camera Goreaev. Cantitatea fibroblaștilor umani embrionari crescuți în mediul nutritiv suplimentat cu biostimulator (soluție de capsicoidă) 0,001 a constituit $7,5 \times 10^5$; $16,2 \times 10^5$ și $39,8 \times 10^5$ celule/ml, iar în lotul martor acești indici au constituit $3,9 \times 10^5$; $4,6 \times 10^5$ și $9,1 \times 10^5$ celule /ml după 24; 48 și 72 ore respectiv (v. tabelul).

- 10 *Exemplul 2. Pregătirea culturii continue de celule Hep-2.*

Suspensia de celule se supune unui control la sterilitate, după care se diluează în mediul nutritiv (mediul 199, Eagle), până la concentrația finală de 90 000 celule /ml. În calitate de mediu de creștere se folosesc mediile Eagle, 199 și MEM-Eagle suplimentat cu ser bovin până la 10% și antibiotice din calculul 25 000 unități penicilină și 25,0 mg streptomycină la 100,0 ml mediu.

- 15 Similar exemplului suspensia celulară se împarte în două jumătăți; la prima, pe lângă mediul de creștere, se adaugă soluție sterilă de 10% de 3-O-[β-D-glucopiranozil (1→2)]-[β-D-glucopiranozil (1→3)]-β-D-glucopiranozil (1→4)-β-D-galactopiranozil (1→3)-β-D-glucopiranozil-[(25R)-5α-furostan-2α, 3β, 22α, 26-tetraol]-26-O-β-D-glucopiranozil în concentrație finală de 0,001%. Cultura de celule continue Hep-2 se toarnă în tuburi de sticlă în volum de 0,1 ml. Tuburile se montează în stativ sub un unghi de 35...40° și se introduc în termostat la temperatura de 37°C. Ulterior celulele se detașează de pe suprafața sticlei cu un amestec proteolitic constituit din volume egale de tripsină-versen. După introducerea în tuburi a acestui amestec de fermenți, tuburile se agită și se introduc în termostat la temperatura de 37°C pentru 15...20 min, până la detașarea completă a celulelor de pe sticlă. Urmează sedimentarea celulelor prin centrifugarea și resuspensionarea lor în 1,0 ml de mediu nutritiv. Numărul de celule se determină în camera Goreaev. Numărul de celule ale culturii continue Hep-2 cultivate în mediul de creștere (mediul Eagle cu un conținut de 8,0% ser bovin) suplimentat cu soluție de biostimulator în concentrație finală de 0,001% a constituit $1,6 \times 10^5$, 5×10^5 , $22,3 \times 10^5$ după 24 și 48 și 72 ore respectiv.

Așadar, mediul nutritiv revendicat permite de a spori cel puțin de 4 ori reproducerea masei celulare.

- 30 Rezultatele studierii proprietăților de creștere ale celulelor umane și animale pe mediul nutritiv modificat

Specia celulelor cultivate	Componenta mediului nutritiv de creștere (ingredientele)	Doza biostimulatorului, mg/ml	Timpul evidențierii reproducerii celulelor în dinamică (în ore)		
			24	48	72
Fibroblaști de embrion uman (FEU), lotul experimental	Mediul 199 și ser bovin 10,0% 3-O-[β-D-glucopiranozil (1→2)]-[β-D-glucopiranozil (1→3)]-β-D-glucopiranozil (1→4)-β-D-galactopiranozil (1→3)-β-D-glucopiranozil-[(25R)-5α-furostan-2α, 3β, 22α, 26-tetraol]-26-O-β-D-glucopiranozil (compusul chimic propus în calitate de biostimulator)	0,000625	$3,5 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$	$9,0 \times 10^5$
		0,0125	$4,0 \times 10^5$	$5,7 \times 10^5$	$10,0 \times 10^5$
		0,025	$5,0 \times 10^5$	$10,7 \times 10^5$	$20,0 \times 10^5$
		0,05	$7,5 \times 10^5$	$16,2 \times 10^5$	$39,8 \times 10^5$
		0,10	$6,5 \times 10^5$	$12,8 \times 10^5$	28×10^5
		0,20	$6,0 \times 10^5$	$11,5 \times 10^5$	$23,0 \times 10^5$
FEU, lotul martor	Aceleași ingrediente în absența compusului chimic propus		$3,9 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	$9,1 \times 10^5$
Cultura de celule continue (Hep-2)	Mediul 199 (sau Eagle) plus compusul chimic propus în calitate de biostimulator	0,00625	$0,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$
		0,0125	$0,9 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^5$
		0,025	$1,2 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	$16,0 \times 10^5$
		0,05	$1,6 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$22,3 \times 10^5$
		0,10	$1,4 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	$18,0 \times 10^5$
		0,20	$1,2 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	$14,0 \times 10^5$
Hep-2 (lotul martor)	Aceleași ingrediente în absența compusului chimic propus în calitate de biostimulator		$0,9 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$

MD 3569 G2 2008.04.30

5

(57) Revendicări:

5 Mediu de cultivare a celulelor umane și animale care include un mediu de creștere standard cu adaos de ser bovin, **caracterizat prin aceea că** suplimentar conține capsicozidă 3-O-[[β -D-glucopiranozil (1 $\rightarrow$ 2)]-[[β -D-glucopiranozil (1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-glucopiranozil (1 $\rightarrow$ 4)]- β -D-galactopiranozil (1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-glucopiranozil-[(25R)-5 α -furostan-2 α , 3 β , 22 α , 26-tetraol]-26-O- β -D-glucopiranozil în concentrație finală de 0,001%.

10

(56) Referințe bibliografice:

1. Леннет Э., Шмидт Н. Лабораторная диагностика вирусных и риккетсиозных заболеваний. Москва, Медицина, 1974, с. 68-146

Director adjunct Departament:

GUȘAN Ala

Examinator:

GROSU Petru

Redactor:

CANȚER Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2007 0202		
(22) Data depozit: 2007.07.13		
(51) : Int.Cl: C12N 5/02 (2006.01) C07J 71/00 (2006.01) Alți indici de clasificare: Titlul : Mediu de cultivare a celulelor umane și animale (71) Solicitantul : CENTRUL NAȚIONAL ȘTIINȚIFICO-PRACTIC DE MEDICINĂ PREVENTIVĂ, MD Termeni caracteristici : mediu de cultivare, capsicozid		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl.		
(MD, EA, SU, inclusiv și colecția „nepublică”) MD 1994-2007 EA 1995-2007 SU 1970-1991		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 555 31.05.1996	1
A	MD 643 31.12.1996	1
A	MD 645 31.12.1996	1
A	MD 760 31.07.1997	1
A	MD 979 30.06.1998	1
A	MD 1163 31.03.1999	1
A	SU 1303158A1 15.04.1987	1
A	SU 1331892A1 23.08.1987	1
A	SU 1337407A1 15.09.1987	1
A	SU 1613488A1 15.12.1990	1
A	SU 1654338A1 07.06.1991	1
A	SU 1723119A1 30.03.1992	1
A	SU 1735360A1 23.05.1992	1
A	SU 1830080A3 23.07.1993	1
☐ Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		☐ Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării		2008-02-07
Examinatorul		GROSU Petru