

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ



(19) BG

(11) 107770 A
7(51) C 12 N 5/08
A 61 K 35/14

ЗАЯВКА ЗА ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 107770
(22) Заявено на 30.04.2003
(24) Начало на действие
на патента от:

Приоритетни данни

(31) 245168 (32) 03.11.2000 (33) US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 2 на 27.02.2004

(45) Отпечатано на

(46) Публикувано в бюлетин №
на

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(71) Заявител(и):
KOURION THERAPEUTICS GMBH
DUSSELDORF (DE)

(72) Изобретател(и):
Peter Wernet
Dusseldorf (DE)

(74) Представител по индустриална
собственост:
Красимир Минков Драголов, 1000 София,
ул. "Ген. Гурко" 44

(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/EP01/12768, 03.11.2001

(87) № и дата на PCT публикация:
WO02/36751, 10.05.2002

**(54) ИЗВЛЕЧЕНИ ОТ КРЪВ НА ЧОВЕШКА ПЪПНА ВРЪВ СВОБОДНИ СОМАТИЧНИ СТВО-
ЛОВИ КЛЕТКИ**

(57) Изобретението се отнася до състав от кръв на човешка пъпна връв и от кръв от плацента, който съдържа свободни соматични стволови клетки и може да се прилага in vitro в големи количества, достатъчни за използване в медицината, като регенеративни медикаменти. Изобретението се отнася и до иницирането, запазването и ex vivo експанзията на такива стволови клетки от пъпна връв. Тези клетки, използвайки пременящи се протоколи за индукция на диференциацията, ясно изразяват прогениторен произход на кръвотворни, ендотелни и мезенхимни протогениторни клетки на мускули, кости, хрущял и ембрион, както и на нервни протогениторни клетки, които могат да бъдат култивирани и отгледани с цел използване в регенеративната медицина.

11 претенции, 18 фигури

BG 107770 A

ИЗВЛЕЧЕНИ ОТ КРЪВ НА ЧОВЕШКА ПЪПНА ВРЪВ СВОБОДНИ СОМАТИЧНИ СТВОЛОВИ КЛЕТКИ

Настоящото изобретение се отнася до соматични стволови клетки, по-специално до стволови клетки, серия от стволови клетки, медикамент, съдържащ стволовите клетки съгласно изобретението и метод за пречистване, изолиране и уникална възможност за диференциация на стволовите клетки съгласно изобретението.

Въпреки, че стволовите клетки са самоподменящи се, обикновено, този цикъл е бавен. Обикновено, се предполага, че тези клетки дават нарастване до директно прилагана клетъчна популация с ограничен самовъзстановяващ се капацитет, за да се повиши броят на диференцираните клетки. Било е предизвикателство да се въведат стволови клетки във възрастни хора и, поради това, в наличната литература има достатъчно данни за използването на множество маркери на заместители (например, формиращи колония тестове за кръвотворен произход).

Множество американски патенти, например, US 5,486,359; 5,591,625; 5,736,396; 5,811,094; 5,827,740; 5,837,539; 5,908,782; 5,908,784; 5,942,225; 5,965,436; 6,010,696; 6,022,540; 6,087,113; 5,858,390; 5,804,446; 5,846,796; 5,654,186; 6,054,121; 5,827,735; 5,827,735; 5,906,934 се занимават с мезенхимните стволови клетки (MSC), които могат да бъдат диференцирани в няколко прогениторни клетки, например мускулни прогениторни клетки, прогенитори на съединителнотъканни клетки или на яйчни клетки. Прогениторните клетки на мускулите са диференцирани по-нататък в сърдечни, скелетни, както и в гладки мускулни клетки, тъй като прогенитора на съединителнотъканните клетки може да се диференцира в

кости, хрущял или мазнина. Яйчните клетки могат да диференцират в клетки на черен дроб или на панкреас (Grompe et al, 2001).

Наличието на не-кръвотворни клетки вътре в кръвта на пъпната връв е все още дискуссионно (Mayani et al., 2000, Mareschi et al. 2001). Германската патентна заявка DE 198 03 267 A1 беше първата, описваща остеобластни прогенитори и костни образувания в кръв от човешката пъпна връв.

Често използването на такива мезенхимни протогениторни клетки в предшестващото състояние на техниката е ограничено, тъй като те са много развити с да цел да бъдат полезни инструменти за генериране на органи и тъкани. С други думи, те вече изглеждат толкова много ангажирани и специализирани в произвеждането на функционално увредени органи или тъкани.

Задача на изобретението е да се осигури стволова клетка, която е в състояние да диференцира в различни протогениторни клетки, такива като мезенхимни клетки, нервни клетки, кръвни клетки или ендотелиални клетки.

Друга задача на изобретението е да се осигури стволова клетка, която няма недостатъците на ембрионалните стволови клетки

Беше установено, че ново-идентифицираната стволова клетка е в състояние да реши по-горе поставените задачи. Стволовата клетка съгласно изобретението е извлечена от кръв на човешка пъпна връв, кръв на плацента и/или от кръв от новородено дете, споменатата стволова клетка е различна от и е в състояние да диференцира вътре в мезенхимни стволови или протогениторни клетки, в клетки с кръвотворен произход или в протогениторни клетки, в нервни стволови или протогениторни клетки или в ендотелиални клетки или в чернодробни протогениторни клетки. Тези

клетки представляват протогенитор с кръвотворен произход на мезенхимните стволови клетки, както и на нервните стволови клетки. Този уникален мултифункционален капацитет и технологията за експанзия на тези свободни соматични стволови клетки, извлечени от кръв на пъпна връв, само като такива соматични стволови клетки или като ангажирани клетки при различни протоколи на диференциация, позволяват прецизното им характеризиране, стандартизиране и използване за производство и за провеждане на терапия със стволови клетки в регенеративната медицина.

Фигура 1 показва фотография под микроскоп на първична култура свободни соматични стволови клетки (USSC), разстлана с ниска плътност.

Фигура 2 показва фотография под микроскоп на култура от сливащи се USSC клетки.

Фигура 3 показва FACS анализи на CD45 антиген след приключване на курс на *in vitro* култура.

Фигура 4 показва FACS анализи за SSEA4 ембрионален маркер.

Фигура 5 показва FACS анализи за HLA-клас I (A, B, C), HLA DR и CD14.

Фигура 6 показва FACS кинетични криви на CD34 повърхностен маркер.

Фигура 7 показва фотография под микроскоп на USSC клетки след нервно индуциране.

Фигура 8 показва, че USSC клетките съгласно изобретението имат имунно оцветяване на нервна стволова клетка с анти-нестин на маркера нестин.

Фигура 9 показва USSC, генериращи клетки с нервен произход.

Фигура 10 показва USSC, генериращи клетки с глиален произход.

Фигура 11 показва минерализирано образование след костно индуциране и след оцветяване с ализарин червен (B).

Фигура 12 показва показва оцветяване с алциан синьо на USSC клетки, извлечени от зърнеста култура.

Фигура 13 показва оцветени (зелено) с колаген тип II USSC култури след хондрогенна диференциация.

Фигура 14 показва липогенна диференциация на USSC култури, която е демонстрирана с оцветяване с Oil Red.

Фигура 15 показва фотография под микроскоп на USSC клетки след миогенна диференциация.

Фигура 16 показва химия на клетъчния имунитет за бавнодействащ миозин след третиране с азацидин.

Фигура 17 показва фенотип на яйчна клетка на производни на USSC.

Фигура 18 показва преживяване и интегриране на USSC култури след инжектиране в паренхима на черен дроб на SCID мишка.

Соматичните стволови клетки съгласно изобретението могат да бъдат изолирани и пречистени чрез няколко метода, съдържащи стъпките изолиране в плътност градиент, култура от сливащи се клетки и прилагане на субкултура с фактори на растеж, както е описано в пример 1. След като е бил образуван слой от сливащи се клетки, за да се извлекат клетките съгласно изобретението, изолационният процес е контролиран рутинно чрез морфология (фибробластоидна морфология) и фенотипни анализи, използващи антитела, насочени срещу CD13 (положителни), CD14 (отрицателни), CD45 (отрицателни) и CD29 (положителни; виж пример 2) повърхностни антигени.

Соматичната стволова клетка съгласно изобретението е реагираща негативно със специфичните маркерите с кръвотворен произход, такива като CD45, и поради това, е различна от кръвотворните стволови клетки, които също могат да бъдат изолирани от кръв на плацентна пъпна връв.

CD14 е друг повърхностен антиген, който може да бъде открит върху USSC клетки. Стволовата клетка съгласно изобретението се характеризира с комплект от антигени, които са налични върху повърхността на клетката, такива като CD13, CD29, CD44, CD49e. Препаратите на USSC клетки се характеризират и чрез наличието на mRNA копия за определени молекули-рецептори като рецептор на епидермалния фактор на растеж (EGF-R), алфа плоскостен рецептор на извлечен фактор на растеж (PDGF-RA), рецептор на инсулинов фактор на растеж (IGF-R). Тази клетки също са типични фактори на експресно копиране като YB1 (фактор 1 на копиране Y-кутия), Runx1 (свързан с фактор 1 на копиране джудже) и AML1C (фактор на копиране на остра миелоидна левкемия), както е открито чрез RT-PCR. USSC препаратите са типично негативни за копия на хондрогенния фактор на копиране Cart-1 и нервните маркери като неврофиламент, синаптофизин, тирозин хидроксилаза (TH) и глиален фибрален киселинен протеин (GFAP).

Таблица 1: анализи на копирани структури на USSC клетки чрез RT-PCR.

Резултатите от RT-PCR са получени с предварително изчислени олигонуклеотидни начални параметри и mRNA копия и mRNA положителен контрол от други тъкани като кост, хрущял или мононуклеарни клетки от кръв на пъпна връв.

име	PCR-резултат USSC	PCR-резултат (други тъкани)
PDGFR alpha	+	+ (зряла кост)
IGFR	+	+ (зряла кост)
Неврофиламент	-	+ (зрял на възрастен)
CD105	+	+ (моноядрени клетки от СВ)

GFAP	-	+ (ембрионален мозък)
Синаптофизин	-	+ (ембрионален мозък)
Тироксинхидроксилаза	-	+ (ембрионален мозък)
YB1	+	+ (ембрионален мозък)
Runx1	+	+ (зряла кост)
AML1c	+	+ (зряла кост)
BMPR II	+	+ (зрял хрущял)
Колаген тип I	+	+ (зряла кост)
Cart-1	-	+ (моноядрени клетки от СВ)
хондроадерин	-	+ (зряла кост)
CD49e	+	+ (зряла кост)

RNA представянето на USSC препарати и извлечени MSC клетки от костен мозък (Caplan, 1991) бяха сравнени директно чрез използването на изчислителни микроматрици чрез Affymetrix GeneChipTM. Копието на гена Fibulin-2 (номер на генната банка X82494) беше открито в USSC клетките във високо изразени нива, но не и в MSC клетките. Fibulin-2 продукта беше демонстриран предварително във фибробласт (Pan et al., 1993). Анализът с Northern-пренос на mRNA от различни човешки тъкани разкри едно изменено 4.5-kb копие в тъкани от сърце, плацента и яйчник (Zhang et al., 1994). Протеинът беше локализиран при светлинно микроскопско ниво в човешки ембриони от 4-10 седмична бременност, използвайки антитела с много клони. Fibulin-2 беше открит първоначално вътре в невропителиума, гръбначния нервен възел и периферните нерви (Miosge et al., 1996).

В образец от плъх, миофибробластите на черен дроб на плъх (rMF) са ко-локализирани с Fibulin-2. Тези клетки бяха локализирани в областта на вратните вена, стените на централните вени, и само рядко в паренхимата. В ранните стадии на фиброза, rMF бяха открити вътре в

развиващи се белези от рани. В напредналите стадии на фиброза, rMF за серия изброени клетките са локализирани в белега (Knittel et al., 1999). В друг образец от опитно животно протеинът Fibulin-2 на мишка е показан по време на епително-мезенхимна трансформация в ендокардиалната матрица на зараждане на ендокарда по време на развитието на сърцето на ембриона. Fibulin-2 също е синтезиран с клетки-предшественици от гладък мускул на развиващи се съдове на дъгата на аортата и на коронарните ендотелиални клетки, които са произлезли, съответно, от клетки на нервен израстък и на епикардиални клетки (Tsuda et al., 2001).

Копията на гена Hyaluronan Synthase (D84424), гена Fibromodulin (U05291) и копието на 1NFLS (W03846) не бяха открити в клетките, а на високи нива в MSC клетките. Northern-принос анализите показаха, че генът Hyaluronan Synthase е изразен повсеместно в човешките тъкани (Itano and Kimata, 1996). Продуктът на този ензим, Hyaluronan, служи при много функции, включително и при чувството за пространство, съставите на смазващата среда и осигуряване на матрица, чрез която клетките могат да мигрират (Hall et al., 1995). Fibromodulin е член на семейството на малките междуточкови протоглики. Протеинът показва широко разпространение в тъканите, като с най-високо изобилие е наблюдаван в ставния хрущял, сухожилието и свързките (Sztrolovics et al., 1994). Копието на 1NFLS беше клонирано от черен дроб на човешки ембрион.

Генът CD24 (L33930) е изразен в много ниско ниво в USSC клетките в сравнение с изразеното му ниво в MSC клетките. CD24 е изразен в много клетки с В-произход и по узрелите гранулоцити (Van der Schoot et al., 1989).

Когато MSC клетките се сравнят със соматичните клетки съгласно изобретението ясно се вижда, че последните са базирани на източник на тъкан, от който те са били изолирани. USSC клетките са характеризирани с

не-изразяване на антигени на човешки левкоцити клас I (HLA-class I). В отличие от соматичните клетки съгласно изобретението, описаните преди това MSC клетки, изолирани от костен мозък и мускулна тъкан, показват много високи нива на антигени на HLA-class I по техните клетъчни повърхности. Клетките съгласно изобретението също изразяват скок на специфичен по-ранен антиген 4 (SSEA4) (виж фигура 4).

Соматичната клетка съгласно изобретение показва фибробластна форма на клетката и се разраства чрез слепване.

В едно предпочитано примерно изпълнение на настоящото изобретение соматичната стволова клетка съгласно изобретението (USSC) е присъстваща в една серия или в смеси, представляващи предшественици на други соматични стволови клетки, т.е. на клетки с кръвотворен произход, за предпочитане, изразяващи AC133 и CD34, мезенхимни протогениторни соматични стволови клетки, нервни протогениторни соматични стволови клетки или комбинации от тях. Това примерно изпълнение е с предимство, тъй като съдържа висок регенеративен потенциал, основан на възможността за диференциация в други различни соматични стволови клетки или в наличието на такива соматични стволови клетки като предпочитано примерно изпълнение на изобретението. За предпочитане, мезенхимните протогениторни соматични стволови клетки или нервните протогениторни соматични стволови клетки са получени чрез диференциация от стволова клетка съгласно изобретението.

Съгласно изобретението е осигурен медикамент (регенеративен терапевтичен), съдържащ соматични стволови клетки съгласно изобретението, както серия или смеси от соматични стволови клетки съгласно изобретението. Медикаментът може по-нататък да съдържа носеща субстанция или допълнителни субстанции, които са медицински и фармакологични приемливи. Настоящото изобретение е свързано, също

така, с метод за използване на USSC клетки или извличане от електролизьори или смеси от стволови клетки съгласно изобретението в терапията на гените, подмяната на органи, тестването на медикаменти, израстването *in vitro* на кръвоносни съдове, терапията на болести на кръвоносната система, костната система, както и на хепатит и панкреатични и нервни заболявания.

USSC клетките съгласно настоящото изобретение могат да бъдат приложени локално при нужда, например, с или без биоматериали.

В зависимост от вида на заболяването е подходящо локалното и/или системното прилагане на USSC клетки. USSC клетките могат да бъдат приложени директно или заедно с допустими лекарствени носители или помощни добавки. За препоръчване е добавяне на субстанции, които съдействуват за лечение на заболяванията. Например, при ортопедични приложения, субстанциите, които подобряват регенерирането на костите, могат да бъдат използвани заедно с USSC клетки.

Известните методи за прилагане на MSC клетките могат да бъдат приложени по аналогичен начин на начина, по който се използват USSC клетки. Нещо повече, прилагането на стволови клетки е описано, например, в B.E.Straur et al. M. "Intracoronare, humane autologe Stammzelltransplantation nach Herzinfarkt", Dtsch med Wochenschr 2001, 126, 932-938; Quarto R. et al. "Repair of Large Bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells", N Engl J Med 2001, 344, 385-386; Vacanti C.A., "Brief Report: Replacement of an avulsed phalanx with tissue-engineered bone" N Engl J Med 2001, 344, 1511-1514, May 17, 2001; Hentz V.R. "Tissue Engineering for reconstruction of the thumb" N Engl L Med 2001, 344, 1547-1548; Britterg M., "Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation", N Engl L Med 1994q 331, 889-895, Oct.6, 1994; Freed C.R., "Transplantation of embrionic dopamin neurons

for severe Parkinson's disease" N Engl J Med 2001, 344, 710-719; Shin'oka T., "Transplantation of tissue-engineered pulmonary artery", N Engl J Med 2001q 344, 532-533; Shapiro A.M., "islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen", N Engl J Med 2000q 343, 230-238. Тези цитирани материали са включени в описанието чрез посочването им.

Стволовите клетки съгласно изобретението са описани по-нататък в по-големи подробности.

Стволовите клетки съгласно изобретението са сравнени с една с друга една клетка с фибробластна форма и две или три нуклеоли (виж фигура 1), получени след третиране с трипсин етилендиаминтетраоцетна киселина (EDTA), повторна посевка при подходящи за културата условия (пример 1) и бързо разширение до израстване на една дълга разтегната морфология (фиг.2). Фигура 1 показва фотография под микроскоп на първична култура USSC клетки. Клетките са разстлани с ниска плътност, за да се демонстрира фибробластната морфология на USSC клетките. Тези клетки могат да бъдат отгледани лесно в повече от 14 пасажи на културата. Фигура 2 показва фотография под микроскоп на култури от слепени USSC клетки. Слой от почти слепени USSC клетки показва едно паралелно ориентиране на клетките.

Фенотипът на повърхностния маркер на първичния слой прилепнали клетки, както и последващо получените от него пасажи, са и остават негативни за CD45 маркера. Фигура 3 показва активиран от флуоресценцията анализ на клетката (FACS) за CD45 антиген след приключване на *in vitro* курса на културата. CD45, характерен маркер антиген за кръвотворни клетки, почти не се открива в USSC клетките на по-късните пасажи (фиг. 3 на 48-ия, 54-ия, 82-ия ден).

След *in vitro* културата, използваща метод А (пример 1), получените USSC клетки стават положителни за специфичното предишно състояние на антиген 4 (SSEA4) и показват хомогенно изразяване на тези ембрионални маркери. Фигура 4 показва FACS-анализи за SSEA4 ембрионални маркери. Клетките, отгледани чрез метод А (пример 1), показват силно видимо изразяване на специфичното състояние на предишния антиген 4 (SSEA4). В същото време, културите от USSC клетки са отрицателно изразени за повърхностния антиген HLA-class I (фиг.5A), за HLA-DR антиген (фиг.5B), както и за CD14 (фиг.5C). Фигура 5 показва FACS-анализи за HLA-class I (A, B,C), HLA-DR и CD14. Културите от USSC клетки съгласно изобретението след разрастване *in vitro* са негативни за антигени HLA-class I (сектор А). Тези клетки са негативни, също, за повърхностни антигени HLA-DR (сектор В) и CD14 (сектор С), характерни за антигени, представляващи клетки (HLA-DR) и моноцити (CD14).

Фигура 6 показва FACS криви за CD34 повърхностен маркер. USSC клетките бяха отгледани в H5100 или PEI за над 10 пасажа. През този период в културата беше наблюдавано значително нарастване на изявяването на CD34 антигена. По отношение на маркера CD34 на кръвотворни стволови клетки фигура 6 разкрива, че в пасажа 3 до 54 дни не са били открити положителни стволови клетки CD34. Напротив, в седмия пасаж на 82-ия ден се е появила нова положителна субпопулация на CD34. От друга страна, ако тези CD34 или/и FIF1 положителни протогениторни клетки бяха култивирани в подобрена с цитокин среда, специфична за кръвотворната диференциация, биха се развили типично смесени или кръвотворни колонии от червени и бели кръвни клетки-предшественици (CFU-GM и BFU-E) развити спрямо CD45⁺ кръвотворните протогениторни клетки (пример 9).

От друга страна, моноядрени клетки от кръв на пъпна връв за CD14 са култивирани в среда, съдържаща високо съдържание на гликоза и те разкриват свойства на нервни стволони клетки. Фигура 7 показва фотография под микроскоп на USSC клетки съгласно изобретението, култивирани в среда Dilbecco's modified eagle medium (DMEM) с висока концентрация на гликоза, които демонстрират морфология, подобна на тази на астроцит. Фигура 7 показва пример на такива култивирани клетки, показващи глиална морфология, получена след 13-ия дни в култура (пример 6). След като са били разширени с PEI, USSC клетките са изразени чрез маркера за нервна стволонна клетка нестин. Първото наблюдение показва, че оцветяването с нестин е по-слабо изразено след като клетките са били стимулирани с нервни индуциращи агенти, като ретиноидна киселина (RA), основен фибробластен фактор на растеж bFGF, и нервен фактор на растежа β (NGF- β) (McKay, 1997).

Фигура 8 показва в детайли USSC клетки съгласно изобретението, изразени с маркера за нервна стволонна клетка нестин. Фигура 8 А показва USSC клетки, които са били отгледани в среда H5100 или PEI за 7 дни и са били подложени на стандартна анти-зачатъчна имунохистохимия. Фигура 8 В, показва клетките, които са били отгледани за 7 дни в H5100 или PEI, последвани от 9 дни на индукция в H5100 с RA, bFGF и NGF. Отбелязва се, че оцветяването с нестин е намалено в сравнение с клетките, отгледани при условия (А).

По-нататъшни анализи на тези клетки разкриват, също така, изразяване на протеинови свойства за нервни клетки подобни на γ -аминобутирична киселина (GABA, фиг.9 В), тирозин хидроксилаза (фиг. 9 В), синаптофизин (фиг. 9 D), неврофиламент (фиг. 9 F) или типично глиални антигени като галактоцереброзид (GalC, фиг.10 В) и глиални фибриларни киселинни протеини (GFAP, фиг.10 D). Фигура 9 показва

USSC клетки съгласно изобретението, генериращи клетки с невронен произход. USSC клетки съгласно изобретението бяха отгледани в H5100 или PEI за 7 дни и пазени 27 дни върху H5100, съдържащ RA, bFGF и NGF. След стандартните фиксиращи протоколи бяха приложени невронни специфични антитела. Фигури 9 А, 9 С, 9 D представляват фотографии с фазов контраст, фигури 9 В, 9 D, 9F представляват флуоресцентни фотографии на същите препарати от фиг. 9 А, 9 С, 9 D. Оцветителят на DNA DAPI (синьо) е използван за да оцвети ядрата на клетките. Фигура 9 В представлява двойно-имунофлуорисцентна фотография, използваща анти-GABA (червено), и анти-тиросин хидроксилаза (TH, зелено). Фигура 9 D показва оцветяване с анти-синаптофизин (зелено). Фигура 9 F показва оцветяване със специфичен невронен анти-неврофиламент (червено). Беше използвана смес от антитела срещу различни субтипове на неврофиламента. Фигура 10 показва USSC клетки съгласно изобретението, генериращи клетки с глиален произход. Клетките бяха подложени на същите условия като културата, както е показано на фигура 9. DAPI е в синьо. Фигури 9 А, 9 С показват фазо-контрастни фотографии. Фигура 9 В показва същите клетки, както се виждат от фиг.9 А, които са били подложени на анти-GalC имунооцветяване (червено). Фигура 9 D показва същата клетка от фиг.9 С, оцветена с анти-глиален фибриларен киселинен протеин (GFAP).

Ако по-горе описаните универсални стволови клетки са взети от който и да е от изразените пасаж и са индуцирани в DAG (дексаметазон, аскорбинова киселина, β -гликол фосфат), изпълняващ условията на културата или в среда, съдържаща фиброхектин, е индуцирана диференциация с остеногенен произход (пример 3). Както е показано в таблица 2 гените на специфични костни маркери (алкалин фосфатаза,

остеокалцин, колаген тип I) са индуцирани лесно и могат да бъдат открити чрез RT-PCR.

Таблица 2: RT-PCR анализи по време на остеогенна диференциация на USSC клетки.

	контрол	7 ден	14 ден
β -актин	+	+	+
алкалин фосфатаза	-	+	+
колаген тип I	-	+	+
остеокалцин	+	+	-

Всички гени на маркери на остеогенна диференциация показват повишено mRNA изразяване на 7-мия ден от DAG индукцията. β -актинът служи като позитивен контрол.

Фигура 11 показва минерализирано кълбовидно образование след остеогенно индуциране и след оцветяване с ализарин червен (B). Остеогенната диференциация на почти успоредните слоеве USSC беше индуцирана чрез добавяне на дексаметазон, аскорбинова киселина и β -глицеролфосфат към среда на културата H5100. На 10-ия ден от стимулирането се появиха характерните костни образувания (11A). Минералното депозиране на тези образувания може да бъде демонстрирано чрез ализарин червен (11B). При тези условия на остеогенна индукция клетките съгласно изобретението претърпяват завършена остеогенна диференциация като демонстрираната чрез акумулиране на минерализирана кост в ясно изразени кълбовидни образувания (фиг.11A), които могат да бъдат оцветени с ализарин червен (фиг.11B). Алтернативно, акумулирането на хидроксиapatит в клетъчната култура може да бъде открито след 6 дни чрез оцветяване с Kossa.

От тези резултати е очевидно, че кръвта от пъпната връв съдържа неоткрита досега стволова клетка, която може да бъде отгледана в големи количества. В допълнение, тази клетка може да бъде индуцирана, за да диференцира вътре в MSC клетки и да оформи там вътре в тях остеобласти, както вече беше демонстрирано чрез фигура 11 А. След приключване на индукцията с DAG може да бъде извършена по-нататъшна диференциация до създаването на минерализирани костни кълбовидни образувания, както е показано на фигура 11В чрез оцветяване с ализарин червен.

Подвижността на клетките съгласно изобретението е очевидно по-голяма, което е показано чрез хондрогенна диференциация след култивиране в DMEM гликоза с високо съдържание, съдържаща дексаметазон, пролин, натриев пируват, ITS⁺ премикс, и TGF- β 1 (Johnstone et al., 1998). На 0-вия и 14-ия ден от тези експерименти за диференциация, клетките бяха събрани и анализирани чрез RT-PCR (таблица 3, пример 4).

Таблица 3: RT-PCR анализи по време на хондрогенната диференциация на USSC клетки.

	контрол	14-ти ден
β -актин (поз.контрол)	+	+
карт-1	-	+
колаген тип II (несъединен)	-	+
хондроадхерин	-	+

На 14-ия ден от хондрогенната стимулация са изразени три характерни маркерни гена на протичащата хондрогенеза.

Резултатите от тези изследвания ясно демонстрират регулирането нагоре с карт-1, специфичен фактор на хондрогенна транскрипция 14 дни след хондрогенната стимулация. Нещо повече, mRNA транскрипцията за

два типично хрущялни извънклетъчни протеина (колаген тип II и хондроадхерин), също така, бяха регулирани нагоре. Следователно, ясно е, че клетките съгласно изобретението произвеждат извънклетъчен молекулен протогликан, типичен за хондроцитната диференциация, както е демонстрирано чрез оцветяване с алкиан син. Фигура 12 показва оцветяване с алкиан син на USSC клетки, извлечени от зърнеста култура. USSC клетките бяха отгледани като седиментационна култура в една хондрогенна среда за диференциация. След 6 дни в индуцираната среда не са открити съществени количества на протогликани (PG) като характерни маркери на хондрогенната диференциация чрез оцветяване с алкин син (фиг.12 A). В отличие от това, лесно са открити протогликани като индицирани чрез син или зелен цвят (фиг.12 B).

Наличието на специфичния за хрущяла колаген тип II може да бъде демонстрирано на протеиново ниво. Фигура 13 показва оцветяване с колаген тип II (зелено) на USSC култури след хондрогенна диференциация.

USSC клетките бяха култивирани в среда на хондрогенна диференциация. Изявяването на извънклетъчния матричен протеин колаген тип II на 14-ия ден беше демонстрирано чрез флуоресцентна макроскопия, използвайки анти-колаген тип II, първични антитела и FITC вторични антитела на мишка (фиг.13 B).

По-нататък е показана подвижността на свободните стволови клетки чрез диференциация на същите описани по-горе при PEI-протокол отгледани култури в мастни клетки с висока концентрация на дексаметазон (пример 5).

Фигура 14 показва мастни клетки, които могат да бъдат оцветени специфично с Oil Red (Sigma). Адипоцитите са характеризирани чрез голямо количество вътреклетъчни мехурчета и със специфично червено оцветяване с Oil Red.

Нещо повече, когато USSC клетки са култивирани за 24 часа в H5100 с 10 μ M 5'-азацитидин и последващо с 100 ng/ml bFGF показват силно изразени данни за мускулна диференциация. Промяната в морфологията на клетката е приключила чрез изявяването на бавно-действащ миозин (фиг. 15 и 16).

В допълнение, външността и пъпкуването на типично яйчните клетки е наблюдавано постоянно в късните преходи (фиг.17), когато PEI индуцирани USSC клетки са субклонирани от CD34⁺, което е показано на фигура 6 (пример 8). Тези клетки изразяват в променяща се степен ензима дипептидил пептидаза IV, обозначавайки, че такива яйчни клетки могат да диференцират по-нататък вътре в клетки на черен дроб.

In vitro отгледаните USSC клетки оцеляват и се запазват след инжектиране вътре в регенериращите черни дробове на SCID мишки с 50% частична хепатектомия както и не-хепатектомийни черни дробове, докато моноядрените клетки, извлечени от кръв на пъпна връв не могат да бъдат открити даже когато са били трансплантирани 25 порции с по-висока концентрация на клетки. Фигура 18 показва оцеляването и интегрирането на USSC култури след инжектиране вътре в паренхима на черния дроб на SCID мишка. Фигура 18 А показва червена флуоресценция 7 дни след трансплантацията, доказваща оцелелите и интегрирани човешки USSC съгласно изобретението, белязани с PKH26, вътре в тъкан от черен дроб на мишка (без хепатектомия). В контраст на това, след трансплантиране на моноядрени клетки, извлечени от кръв на пъпна връв (MNC) не беше открита червена флуоресценция, доказваща интегриране на човешките MNC клетки. Фигура 18 В показва крио-разрез на тъкан от черен дроб на мишка, съответстващ на този от фиг. 18 А, изследван чрез предаваща светлина микрография на тъканта от черен дроб на мишка с интегрирани човешки USSC клетки.

Следователно предшественикът на чернодробни и панкреатични β изолирани клетки, такива като СВ-извлечени яйчни клетки, могат, също така, да бъдат диференцирани вътре в произвеждащите инсулин изолирани клетки, правейки ги полезен инструмент за клетъчна терапия на пациенти с диабет или на пациенти с хепатитни нарушения.

В допълнение към тези задължителни клинични приложения, всяка от тези добре характеризирани и разширени при стандартни условия компоненти на стволовите клетки, както и техните прогени могат да бъдат използвани, за да се наблюдават и дефинират въздействията и молекулярните и клетъчните ефекти на нови разработени фармакологични агенти, като по този начин, могат да заместят по същество експериментите, които са базирани на опити с животни.

Тези добре стандартизирани стволови клетки са диференцирани клетки, извлечени от култури на кръв от човешка пълна връв и могат да се използват като реагенти за оценяващ тест за фармацевтичната индустрия и при производството на биоматериали.

Препаратите от USSC клетки при определени подходящи условия за културата развиха съставни колонии от различен кръвотворен произход, осигурявайки доказателства, че тези клетки могат да нараснат до кръвотворство.

При определени условия на средата на културата с определени концентрации на VEGF, Flt 3L, SCGF (фактор на растеж на стволовите клетки) и в метил-целулоза тези клетки развиват смесени колонии с клетки, които също така са положителни за FLK1+ AC133+, Tel1 и Tel2 маркери. При по-нататъшна диференциация беше развит профил на маркер, характерен за ендотелиални клетки с AC133 отрицателен, CD31⁺, CD54⁺, VWF⁺, VE-цетерин⁺.

В настоящото изобретение е претендирана явната полезност на такива ендотелиални клетки за *in vitro* отглеждането на автологични и алогични кръвоносни съдове за терапия на заболявания на кръвоносната система.

В същото време е ясно, че всички тези *in vitro* генерирани и хомогенно отгледани прогенитори и техните диференцирани клетки на клонирано ниво ще служат като изключително важен инструмент за дефиниране на ролята на специфични гени и на техните продукти в клетъчната биология и всички следващи медицински приложения ще се основават на клетъчно- или молекулно-осъществени терапии.

Само малък брой от тези уникални видове клетки са подходящи за генериране на големи количества от отгледани слепено USSC клетки съгласно изобретението, както и за повечето диференцирани мезенхимни стволови клетки за произвеждане на медицински приложими регенеративни видове клетки.

Един съвсем нов аспект на това познание е фактът, че такива предшественици могат да се развият асиметрично в два или повече ясно диференцирани вида клетки. Това открива нов биологичен принцип на многокомпонентно регулиране в регенерирането на функционално ориентирана клетка, намиращо приложение даже *in vitro*.

Последицата от това изобретение е, че терапиите, базирани на стволовата клетка съгласно изобретението, трябва да бъдат разработени съгласно този принцип, а не само да се свеждат до един тип клонирана клетка. По-нататък изобретението е описано с неорганичаващи го примери.

Пример 1

Събиране на кръв от пътна връв (СВ)

Събиране на кръв от пъпна връв беше изпълнено в отделенията по акушерство с информираното съгласие на майката. След раждането на бебето с плацента, намираща се още в матката на майката, пъпната връв беше преципана двойно и отрязана напречно на 7-10 cm от пъпа. След дезинфекция на пъпната връв, пъпната вена беше продупчена и кръвта от нея беше събрана в торбички, съдържащи декстроза на цитрат фосфат (CPD), служеща като антикоагулант.

Изолиране на моноядрени клетки от кръвта на пъпната връв

Кръвта от пъпната връв беше заредена внимателно в разтвор на фикол (плътност 1.077 g/cm^3). Беше извършено центрофугиране в плътност градиент (450 g, стайна температура, 25 минути). Моноядрените клетки (MNC) на вътрешната фаза бяха събрани и измити два пъти в буферен фосфатен салин, pH 7,3 (PBS).

Генериране на слепени слоеве с фибробластоидна морфология

Моноядрените клетки бяха разстлани с плътност от около 5×10^3 клетки/ cm^2 в T25 колби за култура (Nunc) [A), B), C)]. Бяха използвани четири различни метода за отглеждане на култура, за да се инициира растеж на слепен стволови клетки:

A) СВ-извлечените MNC клетки бяха отгледани първоначално в среда миелокулт H5100 (StemCell Technology, Vancouver/Canada), съдържаща 10^{-7} M дексаметазон.

B) СВ-извлечените MNC клетки бяха отгледани първоначално в среда мезенкулт (StemCell Technology, Vancouver/Canada), съдържаща 10^{-7} M дексаметазон.

C) В-извлечените MNC клетки бяха отгледани първоначално в DMEM гликоза с ниско съдържание (Bio-Whittaker) с 30% FCS, съдържаща 10^{-7} M дексаметазон.

D) CB-извлечените MNC клетки бяха разстлани с плътност $5 \times 10^6/\text{ml}$ миелокулт H5100 (StemCell Technology, Vancouver/Canada) в 50 ml колби за култура (Nunc) без дексаметазон.

Всички култури бяха инкубирани при 37°C в 5% CO_2 в напълно овлажнена атмосфера и бяха подхранвани веднъж седмично чрез отстраняване на отработената среда с не-прилепналите клетки и добавяне на 10 ml свежа среда. След известно време се показаха слепени клетки с формата на вретено, които бяха отстранени чрез третиране с 0.05% трипсин и 0.53 mM EDTA за 2 min, промити с 50% серум съдържаща среда, събрани чрез центрифугиране до 780g и анализирани чрез проточна цитометрия или RT-PCR. След две до три седмици слепените клетки на фибробластоидната морфология се появиха в около 30% от културата от клетки.

Условия за отглеждане на култура от USSC клетки съгласно изобретението

USSC клетки съгласно изобретението могат да бъдат отгледани в H5100 среда, съдържаща 10 ng/ml IGF I (инсулиноподобен фактор на растеж-I), 10 ng/ml PDGF-BB (тромбоцит-извлечен фактор-BB на растеж) и 10 ng/ml EGF (рекомбинант човешки епидермален фактор на растеж) (PEI среда) при плътност в обхвата от 1×10^4 до 1×10^5 клетки/ml (метод на израстване A). Алтернативно, USSC проби могат да бъдат израстнати и в първоначалната среда за отглеждане A, B, C.

Пример 2

Имунофенотип на клетки чрез цитофлуорометрия

С цел да се определи имунофенотипа на USSC клетките, клетките бяха оцветени с FITC-свързани анти-CD45 (Becton Dickinson, Coulter), PE свързани анти-CD14 (PharMingen Coulter), анти-SSEA-4 (MC-813-70) белязани с F(ab')_2 анти-мишка IgG+IgM (H+L)-FITC (Coulter), анти-CD10-

PE (CALLA, PharMingen), анти-HLA-клас I (Coulter) белязан с $F(ab')_2$, анти-мишка IgG+IgM (H+L)-FITC, анти-CD13-PE (Becton Dickinson, Coulter), анти-CD29 (Coulter), анти-CD44 (Coulter), анти-CD49e (Coulter), анти-CD90 (Coulter), анти-HLA-клас II-FITC (Coulter). Клетките бяха анализирани, използвайки EPICS (Coulter) или FACS (Becton Dickinson) анализатор.

Пример 3

Демонстриране на възможността за остеогенна диференциация на USSC клетки

USSC клетките, получени както беше описано в пример 1, бяха култивирани в стандартна среда докато достигнаха 70% слепване. Остеогенната диференциация на тези клетки беше индукирана чрез добавяне на 10^{-7} М дексаметазон, 50 $\mu\text{g/ml}$ аскорбинова киселина, 10 mM β -глицеролфосфат (Bruder et al., 1994, Jaiswal et al., 1997). На 10-ия ден от стимулацията, клетките показаха отлагане на калциев фосфат, изразяващ се в костни кълбовидни образувания. Минерализираните костни образувания бяха открити чрез оцветяване с ализарин червен както следва: прилепналите клетки в културата бяха измити два пъти с PBS, pH 7.3 и оцветени с 5 ml 0.1% разтвор на ализарин червен за един час при стайна температура и последващо измити с 0.1% оцетна киселина и чист етанол, както и с PBS. Оцветяването с ализарин червен и вон коса на калций демонстрира възможността за минерализация на тези клетки (Stahford et al., 1995, Rungby et al., 1993). Остеогенната диференциация беше демонстрирана чрез RT-PCR, използвайки специфичните маркери за костна диференциация - остеокалцин (OC), остеопонтин (OP), специфичния костен алкалин фосфат (AP), специфичния костен протеин (BSP), тромбоцит-извлечен рецептор алфа (PDGF-Ra) на фактора на растеж, рецептор на епидермалния фактор на растеж (EGFR) и колаген тип I.

Пример 4

Демонстриране на възможността за хондрогенна диференциация на USSC клетките

За хондрогенна диференциация 2×10^5 слепени стволови клетки бяха поставени в седиментационна култура в 15 ml полипропиленови съдове. Като среда за клетъчна култура беше използвана DMEM гликоза с високо съдържание, съдържаща дексаметазон, пролин, натриев пируват, ITS+ премикс и TGF- β 1 (Johnstone et al., 1998, Yoo et al., 1998). На 7-мия, 14-ия и 21-ия ден фракциите от клетки бяха анализирани чрез RT-PCR за специфични хрущялни генни продукти, кодирани като Cart1, колаген тип II и хондроадерин. В допълнение, USSC клетките бяха използвани в други седиментационни култури. След две седмици бяха фиксирани Dewax разрези с 4% параформалдехид за 15 минути при стайна температура и измити в етанол. Разрезите бяха оцветени в 1% алкин син или с 3% оцетна киселина, pH 2,5 (Sigma) за 5 минути и измити в дестилирана вода. Те ясно показаха положително оцветяване на специфични протогликани, както е показано чрез оцветяване с алкин син (фиг.12) (Chao, G et al., 1993). След един период на хондрогенна индукция от 14 дни клетките бяха фиксирани съгласно стандартен протокол и анализирани чрез флуоресцентна микроскопия (Rosenbaum et al., 1998), показвайки наличието на специфична извънклетъчна матрица на колаген тип II (фиг.13 B).

Пример 5

Демонстриране на възможност за адипогенна диференциация на USSC клетки

USSC клетки бяха култивирани в H5100, съдържащ 10^{-6} дексаметазон, 50 $\mu\text{g/ml}$ аскорбинова киселина и 10 mM β -глицеролфосфат, получавайки частична диференциация на USSC клетките до адипоцити, както е демонстрирано чрез оцветяване с Oil Red (Ramirez-Zacarias et al., 1992).

Пример 6

Демонстриране на възможността за неврогенна диференциация на USSC клетки

Изолиране на клетки и условия за култура от глиални клетки

Моноядрените клетки от пъпна връв, извлечени, както беше описано по-горе, бяха развити за CD14⁺ клетки чрез магнитно сортиране на активирани клетки (MACS) на CD14 и чрез система за изолиране, прилагаща VS⁺ сепариране на колонии съгласно инструкциите на производителя (Miltenyi Biotec, Bergsch Gladbach). Отделените моноядрени клетки CD14 бяха култивирани при плътност от $2 \times 10^6/\text{ml}$ в 10 ml среда с високо съдържание на гликоза (Dulbecco's MEM with 4500 G/L Glucose) вътре в T25 колби за култура (Nunc) и инкубирани при 37°C в напълно влажна атмосфера. След 10-15 дни в културата бяха открити клетки с глиална форма.

Диференциация до нервни клетки

А) клетките бяха израстнати за 7 дни или в чиста среда H5100 или в същата среда с наличие на 40 pg/ml PDGFB, 10 pg/ml IGF-I. Клетките бяха трипсинизирани и разстлани при плътност от около $3,5 \times 10^3$ клетки/ cm^2 в 24 добре напълнени широки плоски съда върху покривни стъкла, покрити с поли D-лизин (PDL) и ламинин (PDL/lam). Последващата, невронна диференциация беше инициирана чрез добавяне на агенти за индукция като

универсална-транс ретиноидна киселина (10^{-5} M), bFGF (20ng/ml) и NGF- β (50 ng/ml).

Флуоресцентна микроскопия

След период на индукция (27 дни) клетките бяха фиксирани съгласно стандартен протокол (Rosenbaum et al., 1998) и оцветени с антитела срещу специфични нервни антигени. Препаратът беше анализиран, използвайки флуоресценция и излъчваща светлина микроскопия.

Пример 7

Демонстриране на възможност за диференциация с миоцитен произход

1×10^4 USSC клетки бяха култивирани в H5100 среда (StemCell Technology) с добавяне на 10 ng/ml PDGFBB, 10 ng/ml EGF, 10 ng/ml IGF при 37°C, 5% CO² докато достигнаха около 70% сливане. След това клетките бяха инкубирани с 10 μ M 5'-азациитидин (Sigma) за 24 часа, измити два пъти с PBS и култивирани в H5100 среда с прибавени 100 ng/ml bFGF (Sigma). След една седмица в средата за диференциация, морфологията на клетките се промени (фиг.15). След 10 дни клетките бяха трипсинизирани и прехвърлени за имунно оцветяване върху стъклена камера, покрита с фибронектин.

Имунохистохимия.

Клетките бяха фиксирани с 5% формалдехид или с PBS за 15 минути и измити два пъти в PBS, pH 7.3. Използвайки стандартен протокол, клетките бяха инкубирани с антискелетен миозин (бавен) специфично първично антитяло (клон NOQ7.5.4D, 1:400), (показан в зелено) и с анти-CD13 първично антитяло (показано в червено) или моноклонингово антискелетно първично антитяло миозин (клон MY-32,

1:4000). Оцветяването беше положително за USSC клетки, култивирани при горе описаните условия (фиг.16).

Пример 8

Човешки USSC клетки, както и моноядрени клетки извлечени от кръв на пъпна връв (MNC) бяха белязани с PKH26 RED Fluorescent Cell Linker Kit (Sigma, PKH26-GL). 2×10^5 MNC клетки бяха инжектирани в паренхима от черен дроб на SCID мишка с и без 50% хепатектомия. Седем дни след извършената трансплантация за животните с хепатектомия беше получена завършена регенерация на черния дроб. Тъканта на черния дроб беше анализирана чрез флуоресцентна микроскопия на крио-сечения за наличие на червено белязани човешки клетки (фиг.18).

Пример 9

Демонстриране на възможност за диференциация на USSC клетки вътре в клетки с кръвотворен произход

Три различни USSC проби ($\text{USSC}^{\text{KSB55}}$ в DMEM среда, съдържаща 30% FCS, $\text{USSC}^{\text{KSB12}}$ в среда H5100, съдържаща дексаметазон, $\text{USSC}^{\text{KSB13}}$ в MesenCult среда, съдържаща дексаметазон и $\text{USSC}^{\text{KSB12}}$ в H5100 среда, съдържаща PEI) бяха отгледани в подходяща среда за израстване за определени периоди на израстване (пасажи 5 до 8) и бяха посетени в $250 \mu\text{l}$ (2×10^4 – 2×10^5 клетки) клетъчна суспензия в трипликат в 24 добре изравнение плоскости в среда на специфична кръвотворна култура (Methocult 4434). Бяха изброени колонии на повече от 50 клетки и класифицирани като извлечени от гранулоцит или макрофага (CFU-GM), ранен еритроид (BFU-E) или мултипотент (CFU-GEMM) клетки-предшественици съгласно установения критерий. Формирането на колонии в различните култури беше започнало очевидно от първата седмица на

наблюдението и приключено до 3 седмици при определените условия на диференциация. USSC пробите развиха серия колонии с различен произход, осигурявайки доказателство, че тези клетки могат да дадат ръст до кръвотворство.

Пример 10

Молекулни методи за анализиране на свободни соматични стволови клетки и техните продукти, получени чрез последваща диференциация

PCR-изходни продукти за използване на специфични cDNA поредици от остеокалцин, остеопонтин, костен сиало-протеин, алкалин фосфатаза, PDGFR α и EGF рецептор бяха избрани от ясно изразени екзони, с цел да се осигури възможност те да бъдат разграничени по размера на съответно генерираните DNA фрагменти.

Чрез клониране вътре в pCRL1 вектор (Invitrogen/USA) и последващо трансформиране в E.coli strain TOP 10F бяха получени и характеризирани съответните специфични cDNA клони чрез циклична поредица с автоматизиран секвенсер (Applied Biosystems).

RT-PCR реакциите бяха изпълнение в двустепенна процедура. Общо 200 ng RNA от клетките първо са презаписани реверсивно с 10 U AMV Revers Transcriptase (Promega, Mannheim), 1.5 pmol 3'-генни специфични примери, 1 mM dNTP и добавен буфер (Promega, Mannheim) в обем от 20 μ l за 1 час при 50 $^{\circ}$ C. PCR реакцията беше изпълнена с 2 μ l от cDNA с 1 U HotStarTaq DNA полимераза, буфер и Q-воден разтвор (Qiagen, Hilden), 1.5 mM dNTP и 20 pmol специфичен пример на 3'- и 5'-ген. PCR реакцията беше проведена с операция линеализиране за 15 минути при 95 $^{\circ}$ C, 37 цикъла при 94 $^{\circ}$ C за 30 секунди, 56 $^{\circ}$ C за 30 секунди, 68 $^{\circ}$ C за 1 минута и крайна операция полимеризация за 5 минути при 68 $^{\circ}$ C.

Таблица 4: PCR-примери за прилагане на специфични cDNA поредици

Таблицата показва поредиците на 3'- и 5'-гени примери на изпитаните и очакваните дължини на PCR-фрагмента в bp.

name	5'primer sequence	3'primer sequence	bp
PDGFR alpha	acagtggagattacgaatgtg	cacarcagtggatctcag	251
IGFR	cgagtggagaaatctgcgg	gaccagggcgtagttgtag	272
EGFR	tgccacaaccagtgtgct	ccacataattacggggacac	205
Neurofilament	attcgcgcgagcttgaag	cctggtaggaggcaatgtc	265
GFAP	ctctccctggctcgaatgc	cctcctgataactggccg	871
Synaptophysin	cctgcagaacaagtaccgag	ccttgctgcccatagtcgc	516
Tyrosine hydroxylase	caccttcgcgagttctcg	ctgtccagcacgtcgatgg	387
YB1	ggtgaggaggcagcaaattgt	agggttggaatactgtggtc	279
Runx1	gcaagctgaggagcggcg	gaccgacaaacctgaagtc	296
AML1c	cagtgttcatgagagaatgc	gaccgacaaacctgaagtc	453
Cart-1	ggagacgctggacaatgag	ggtagctgtcagtccttggc	560
CD105	cctgccactggacacagg	atggcagctctgtggtgttg	411
Collagen Typ I	ggacacaatggattgcaagg	aaccactgtccactctgg	441
Collagen Typ II	tttcccaggtaagatggtc	cttcagcacctgtctcacca	377
Osteocalcin	agtccagcaaagggtgcagc	ggccgtagaagcgccgat	231
alkaline phosphatase	gcttcagaagctcaacacca	cgttgtctgagtaccagtcc	454
beta actin	gagaaaaatcttgcaccacac	ctcggtgaggatcttcat	340

ЦИТИРАНА ЛИТЕРАТУРА

Bruder S., Fink DJ., and Caplan AI. (1994). Mesenchymal stem cells in bone formation, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J. Cell. Biochem.* 56: 284.

Caplan, AI., Mesenchymal stem cells. (1991) *J. Orthop. Res.* 9: 641-50.

Grompe, M and Finegold M.J. Liver Stem Cells. / p. 455 - 497 from *Stem Cell Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Grompe, M. and Finegold MJ. Liver stem cells . p. 455-497 from *Stem Cell Biology*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Hall, C. L.; Yang, B.; Yang, X.; Zhang, S.; Turley, M.; Samuel, S.; Lange, L. A.; Wang, C.; Curpen, G. D.; Savani, R. C.; Greenberg, A. H.; Turley, E. A. :

Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation. *Cell* 82: 19-26, 1995.

Itano, N.; Kimata, K. Expression cloning and molecular characterization of HAS protein, a eukaryotic hyaluronan synthase. *J. Biol. Chem.* 271: 9875-9878, 1996

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* 1997 Feb;64(2):295-312.

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.* 1998 Jan 10;238(1):265-72.

Knittel T, Kobold D, Piscaglia F, Saile B, Neubauer K, Mehde M, Timpl R, Ramadori G. Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseased rat livers: distinct roles of (myo-)fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair. *Histochem Cell Biol* 1999 Nov;112(5):387-401

Kritzik M.R. and Sarvetnick N. Pancreatic Stem Cells, p. 499 - 513 from Stem Cell Biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Haematologica 2001 Oct;86(10):1099-100. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood.

Pan, T.-C.; Sasaki, T.; Zhang, R.-Z.; Fassler, R.; Timpl, R.; Chu, M.-L. : Structure and expression of fibulin-2, a novel extracellular matrix protein with multiple EGF-like repeats and consensus motifs for calcium binding. J. Cell Biol. 123: 1269-1277, 1993.

Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. Histochemistry 1992 Jul;97(6):493-7. Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O.

Rosenbaum, C., Kluwe, L., Mautner, VF., Friedrich, R.E., Müller, HW., Hanemann, CO. (1998): Enhanced proliferation and potassium conductance of Schwann cells isolated from NF2 schwannomas can be reduced by quinidine. Neurobiol Dis 5, 55-64.

Rungby J, Kassem M, Eriksen EF, Danscher G. Histochem J. 1993 Jun;25(6):446-51. The von Kossa reaction for calcium deposits: silver lactate staining increases sensitivity and reduces background.

Stanford CM, Jacobson PA, Eanes ED, Lembke LA, Midura RJ. J Biol Chem 1995 Apr 21;270(16):9420-8. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP).

Shapiro A.M. J., Lakey J. R.T., Ryan E. A., Korbitt G. S., Toth E., Warnock G. L., Kneteman N. M., Rajotte R. V. N Engl J Med 2000 Jul 27; (343):230-238. Islet Transplantation in Seven Patients with Type 1 Diabetes Mellitus Using a Glucocorticoid-Free Immunosuppressive Regimen.

Sztrolovics, R.; Chen, X.-N.; Grover, J.; Roughley, P. J.; Korenberg, J. R. :

Localization of the human fibromodulin gene (FMOD) to chromosome 1q32 and completion of the cDNA sequence. Genomics 23: 715-717, 1994.

Tsuda T, Wang H, Timpl R, Chu ML. Fibulin-2 expression marks transformed mesenchymal cells in developing cardiac valves, aortic arch vessels, and coronary vessels. *Dev Dyn* 2001 Sep;222(1):89-100

Van der Schoot, C. E.; Huizinga, T. W. J.; Gadd, S. K.; Majdic, O.; Wijmans, R.; Knapp, W.; Von dem Borne, A. E. G. : Identification of three novel PI-linked proteins on granulocytes. In: Knapp, W.; Dorken, B.; Gilks, W. R.; Rieber, E. P.; Schmidt, R. E.; Stein, H.; Von dem Borne, A. E. G. K. : Leukocyte Typing IV: White Cell Differentiation Antigens. Oxford: Oxford Univ. Press (pub.) 1989. Pp. 887-891

Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am.* 1998 Dec;80(12):1745-57.

Zhang, R.-Z.; Pan, T.-C.; Zhang, Z.-Y.; Mattei, M.-G.; Timpl, R.; Chu, M.-L. : Fibulin-2 (FBLN2): human cDNA sequence, mRNA expression, and mapping of the gene on human and mouse chromosomes. *Genomics* 22: 425-430, 1994.

ИЗПОЛЗУВАНИ СЪКРАЩЕНИЯ

DAG	остеогенна среда за диференциация, съдържаща дексаметазон, аскорбинова киселина и β -глицеролфосфат
HLA	антиген на човешки левкоцит
MSC	мезенхимна стволова клетка
PEI	среда, съдържаща PDGF-BB, EGF и IGF
SSEA4	начален антиген 4 на специфичен етап
USSC	свободна соматична стволова клетка
PG	протеогликани
RNA	рибонуклеинова киселина
MNC	моноядрена клетка
FACF	активиран от флуоресценцията анализ на клетка
EGF-R	рецептор на епидермалния фактор на растеж
PDGF-RA	плоскостен рецептор на извлечен фактор на растеж
IGF-R	рецептор на инсулинов фактор на растеж
AML1C	фактор на копиране на остра миелоидна левкемия
TH	тироксин хидроксилаза
GFAP	глиален фибрален киселинен протеин
EDTA	етилендиаминтетраоцетна киселина
DMEM	Dilbecco's modified eagle medium
RA	ретиноидна киселина
FGF	фибробластен фактор на растеж
NGF	нервен фактор на растеж
GABA	гама-аминобутирична киселина
GalC	галактоцереброзид

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Свободни соматични стволови клетки (USSC) извлечени от кръв на човешка пъпна връв, кръв на плацента и/или кръвни проби от новородено, които са различни от и са в състояние да диференцират вътре в мезенхимни стволови или протогениторни клетки, в стволови с кръвотворен произход или протогениторни клетки, в нервни стволови или протогениторни клетки или в ендотелиални стволови или протогениторни клетки.

2. Свободни соматични стволови клетки съгласно претенция 1, реагиращи отрицателно с маркери, специфични за CD45 и CD14, и положително с маркери за повърхностните антигени CD13, CD29, CD44 и CD49e.

3. Свободни соматични стволови клетки съгласно претенция 1, реагиращи положително с маркера SSEA4 на ембрионална стволова клетка след култивиране в подходяща среда и изявяващи факторите на транскрипция YB1, AML-1 и RUNX-1.

4. Свободни соматични стволови клетки съгласно претенция 1, различаващи се от мезенхимните стволови клетки, базирани на източник на тъкани за изолиране и изявяване на проби с повърхностни антигени (HLA I), както и с фактори на транскрипция.

5. Свободни соматични стволови клетки съгласно претенция 1, различаващи се от MSC клетките, базирани на изявяване с fibulin-2 (гена

банка № X82494) и липса на изявяване с хиалуронен синтез (D84424), фибромодулин (U05291), 1NFLS (WO3846), както е установено чрез афиметричен анализ.

6. Свободни соматични стволови клетки съгласно претенция 1, имащи фибробластна форма на клетките с изисквания за свързано израстване.

7. Серия или смеси от свободни соматични стволови клетки съгласно претенция 1, като соматичните стволови клетки са с кръвотворен произход, изявявани, за предпочитане, с AC133 и CD34, мезенхимни протогениторни соматични стволови клетки, нервни протогениторни соматични стволови клетки или комбинация от тях.

8. Серия или смеси от свободни соматични стволови клетки съгласно претенция 7, в които мезенхимните протогениторни клетки или нервните протогениторни клетки са диференцирали от стволови клетки съгласно претенция 1.

9. Медикамент, съдържащ свободни соматични стволови клетки съгласно коя и да е претенция от 1 до 6 или серия или смеси от свободни соматични стволови клетки съгласно претенция 7 и/или 8.

10. Метод за използване на свободни соматични стволови клетки съгласно коя и да е претенция от 1 до 6 или серия или смеси от свободни соматични стволови клетки съгласно претенция 7 и/или 8 в генната терапия, замяната на органи, тестването на медикаменти, тестването на биоматериали, съдържащи ортопедични устройства, отглеждането *in vitro*

на кръвоносни съдове, лечението на болести на кръвоносната система, сърцето или гладката мускулатура, хепатит, болести на костите, панкреаса или нервите.

11. Метод за изолиране и пречистване на свободни соматични стволови клетки съгласно коя и да е претенция от 1 до 6, който се свежда до операциите изолиране в плътност градиент, култивиране на слепени клетки и използване на фактори на растеж на субкултури.

-1/19-

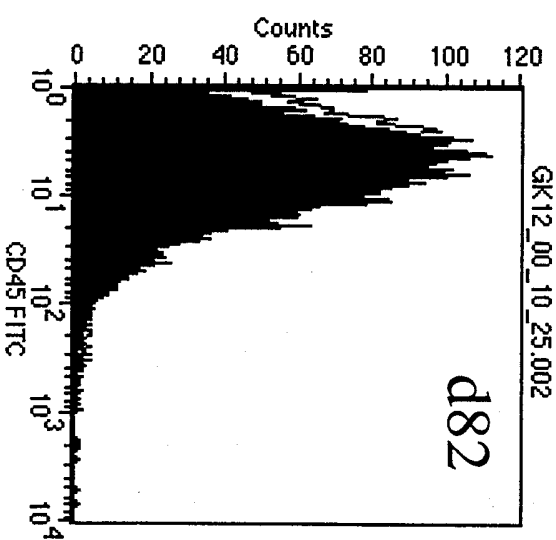
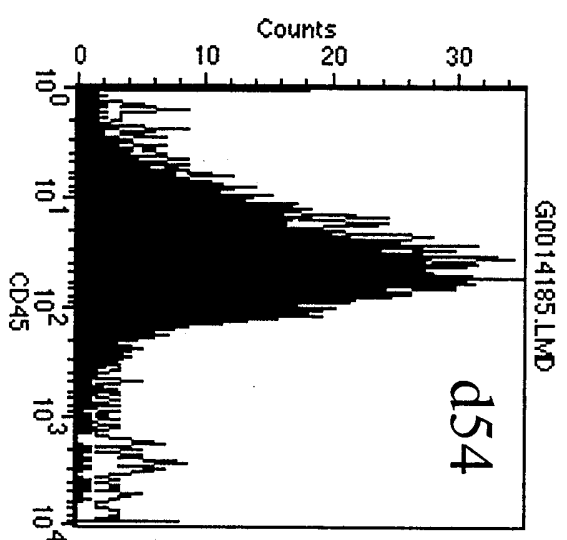
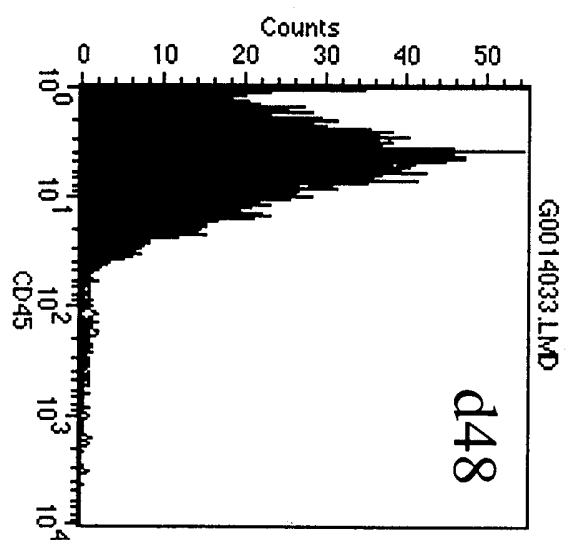


fib.1

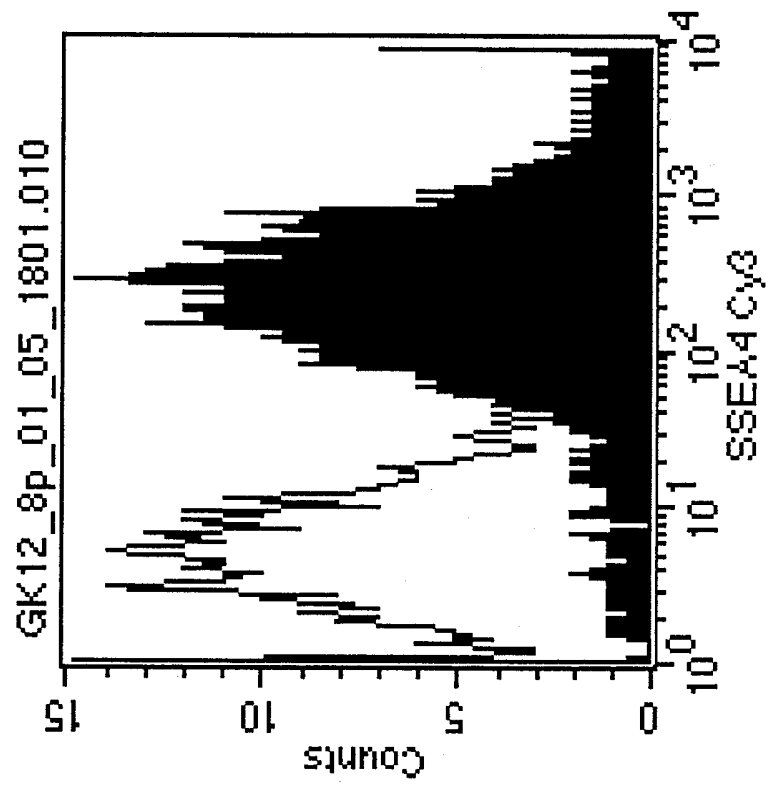
-2/19-



фиг.2

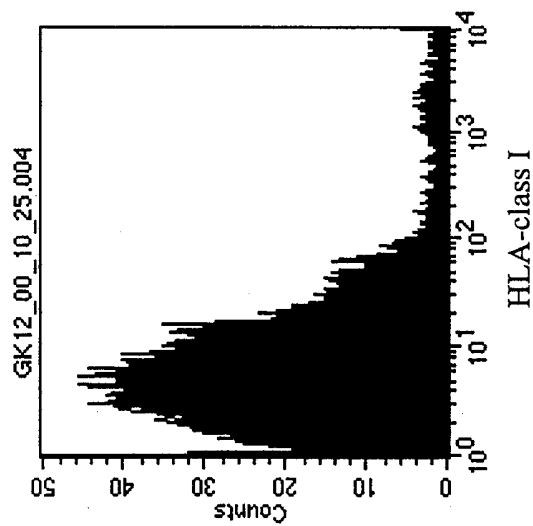


phi 2 3

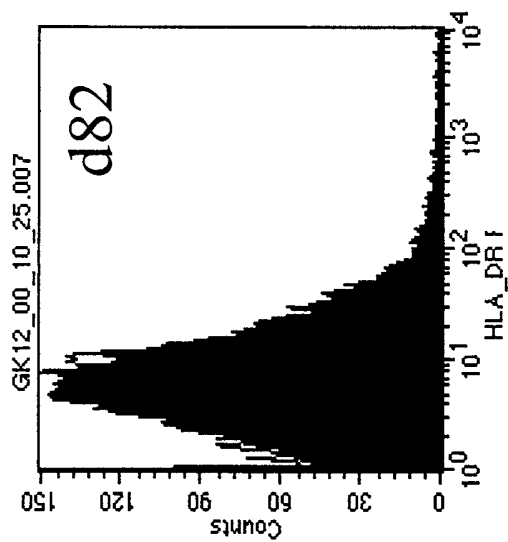


cpue 4

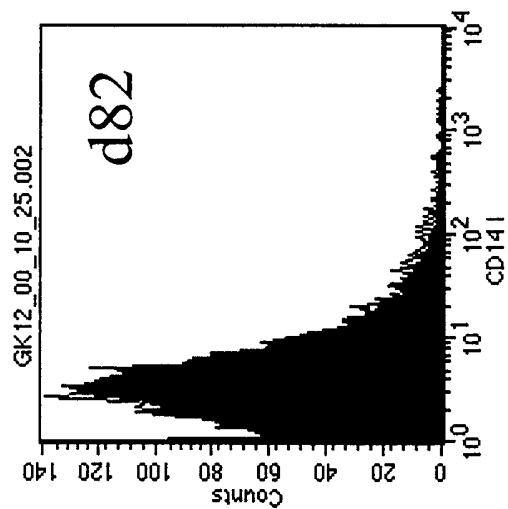
A



B



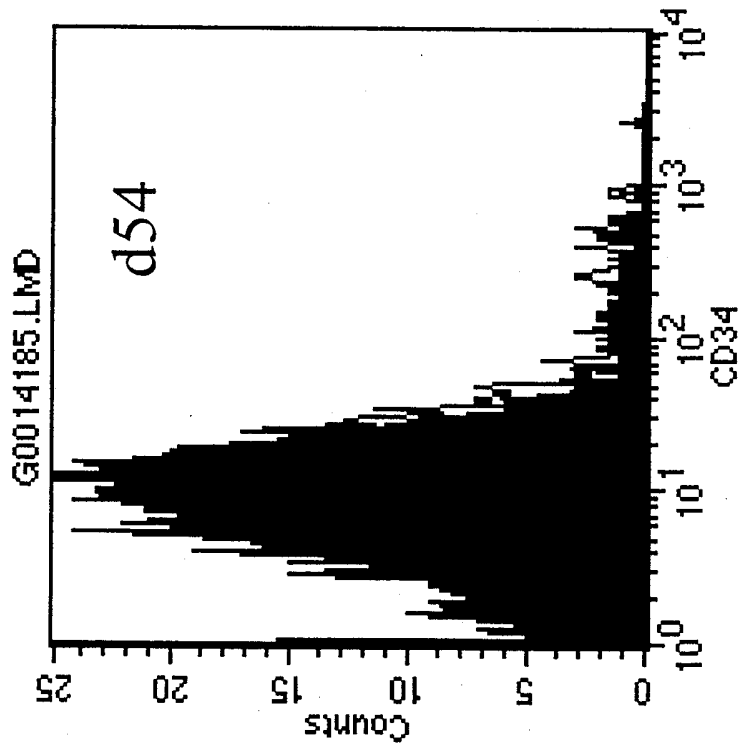
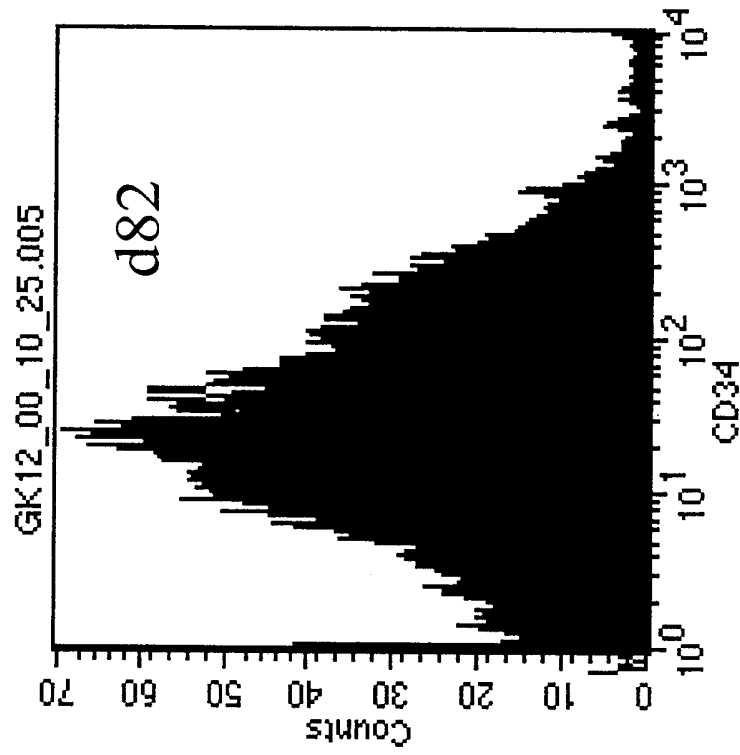
C



-5/19-

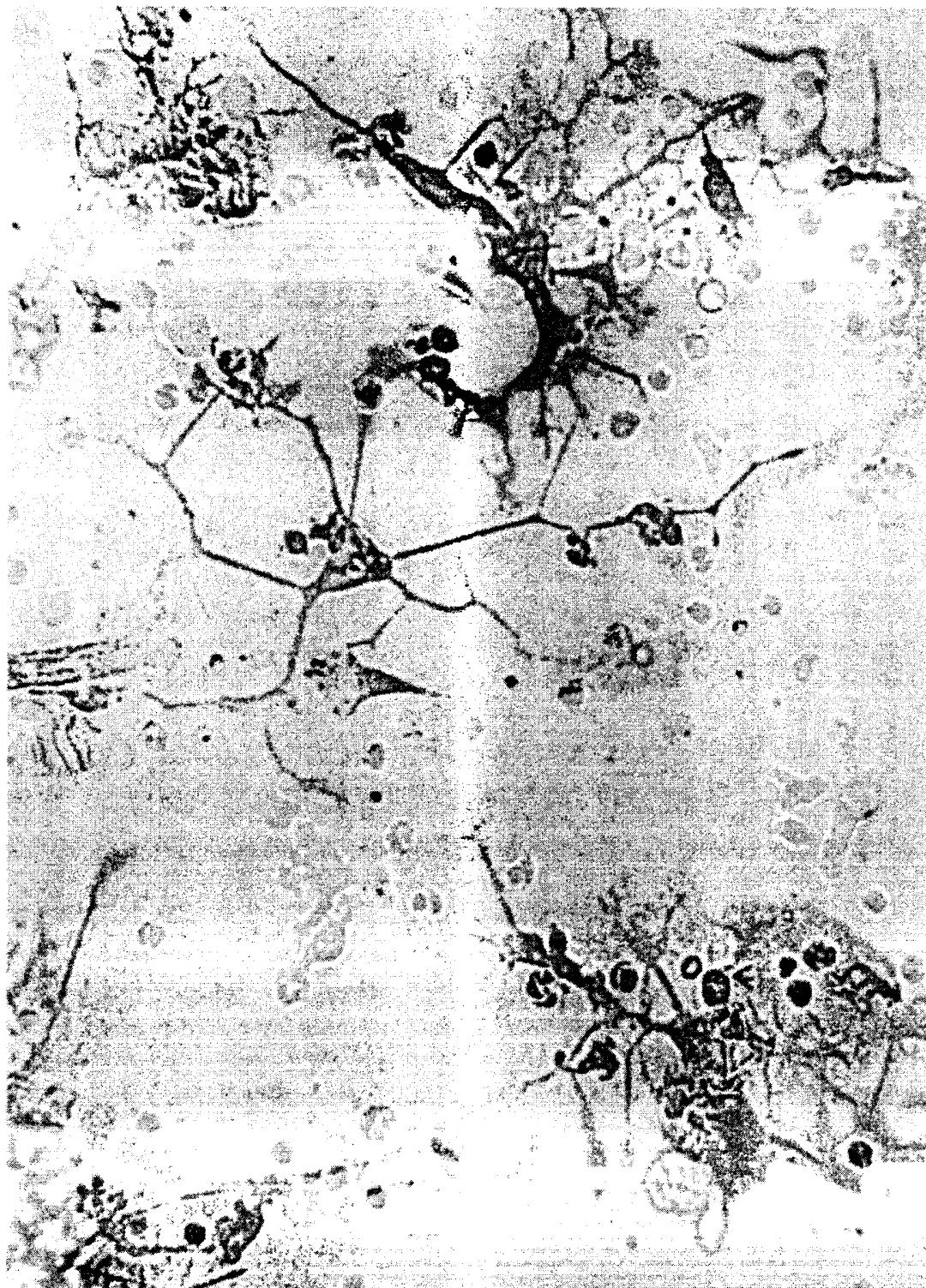
fig. 5

-6/19-

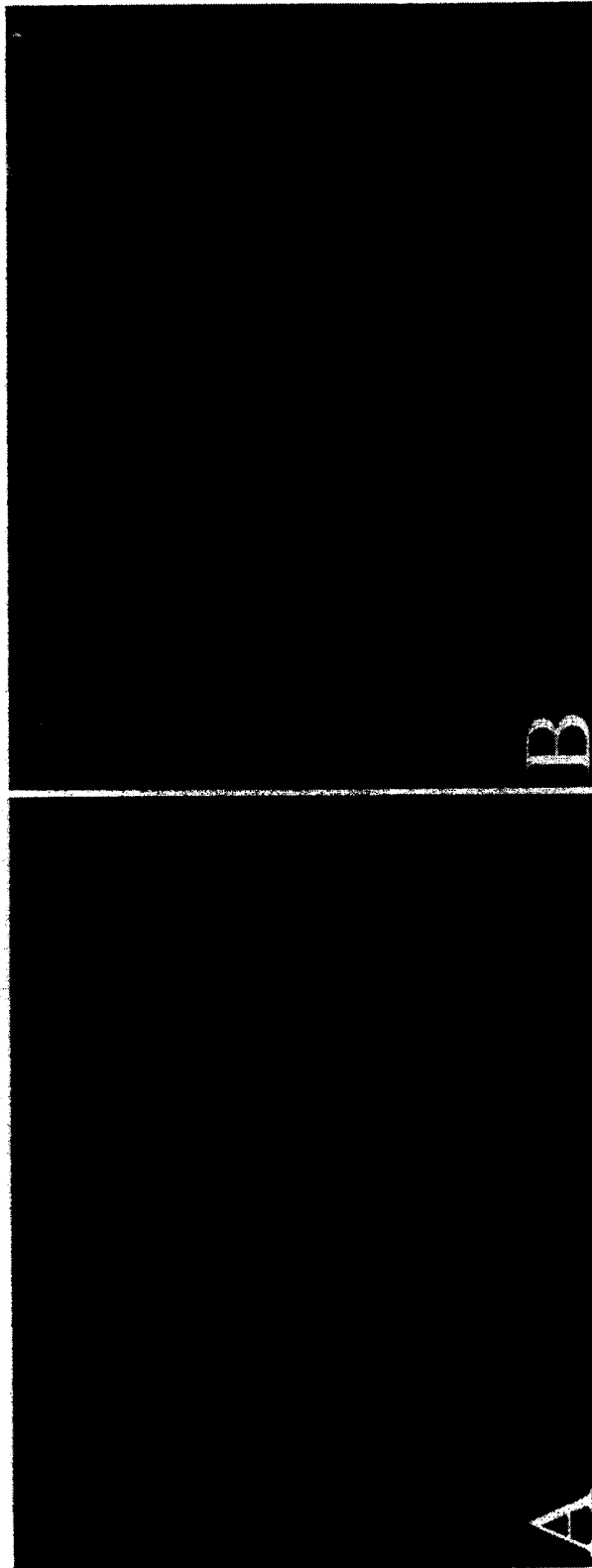


9 2nd 6

-7/19-

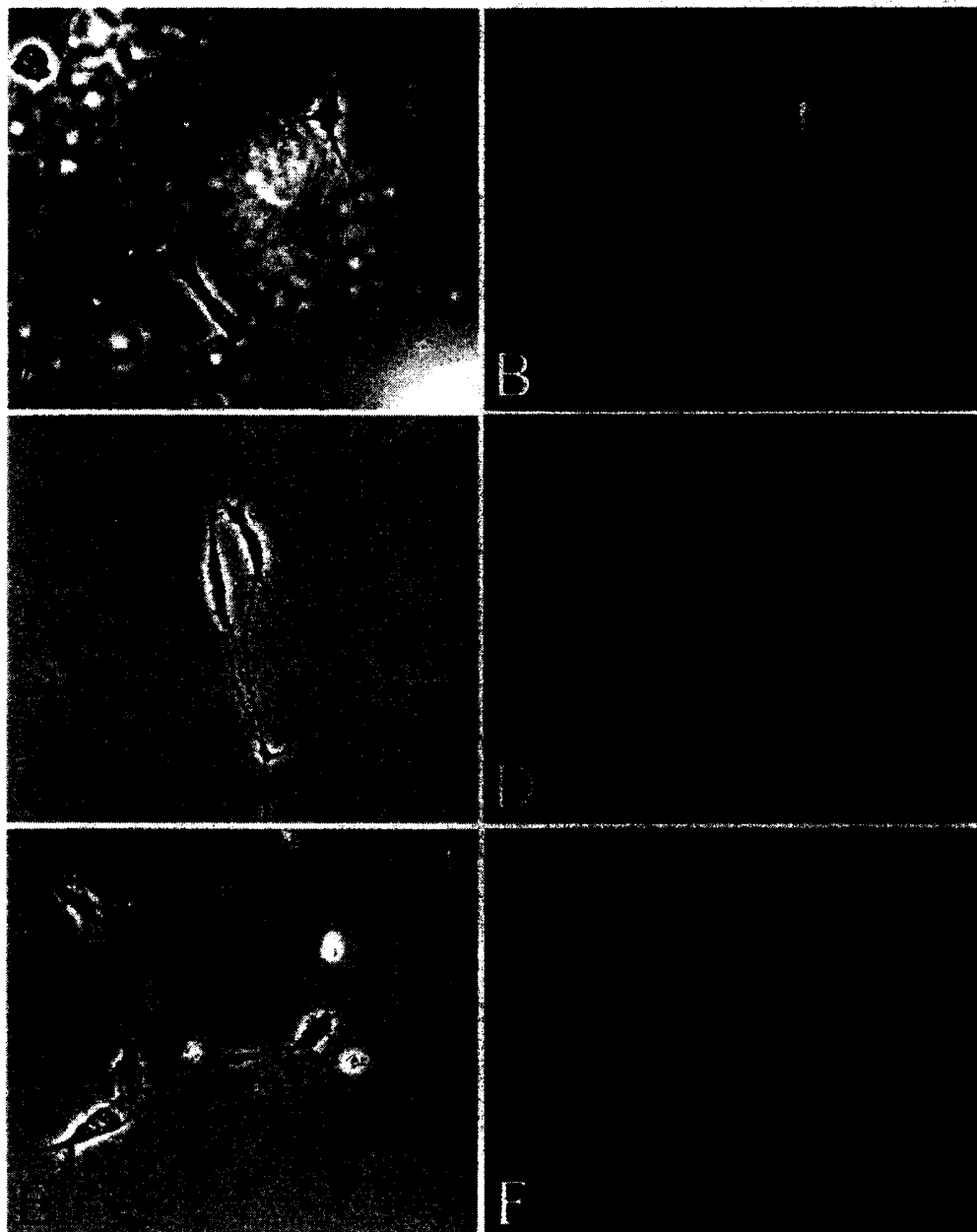


физ. 7



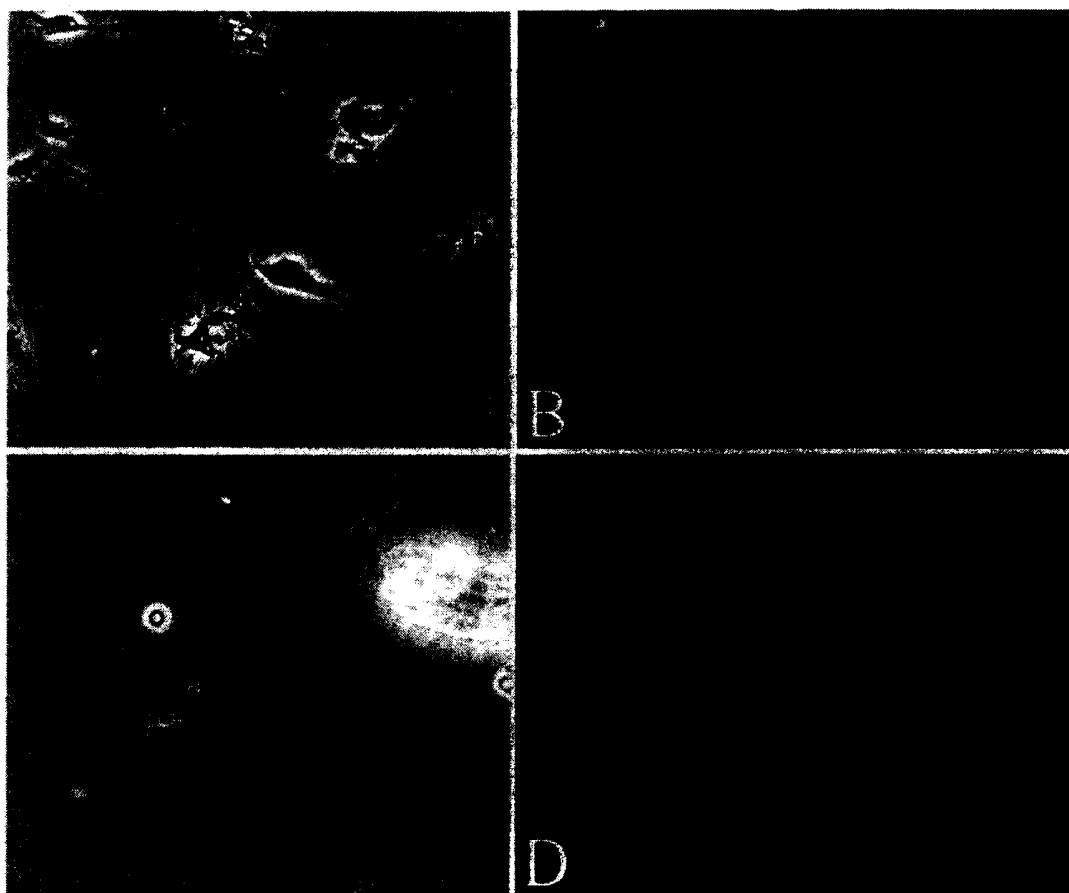
фиг. 8

-9/19-



фиг. 9

-10/19-



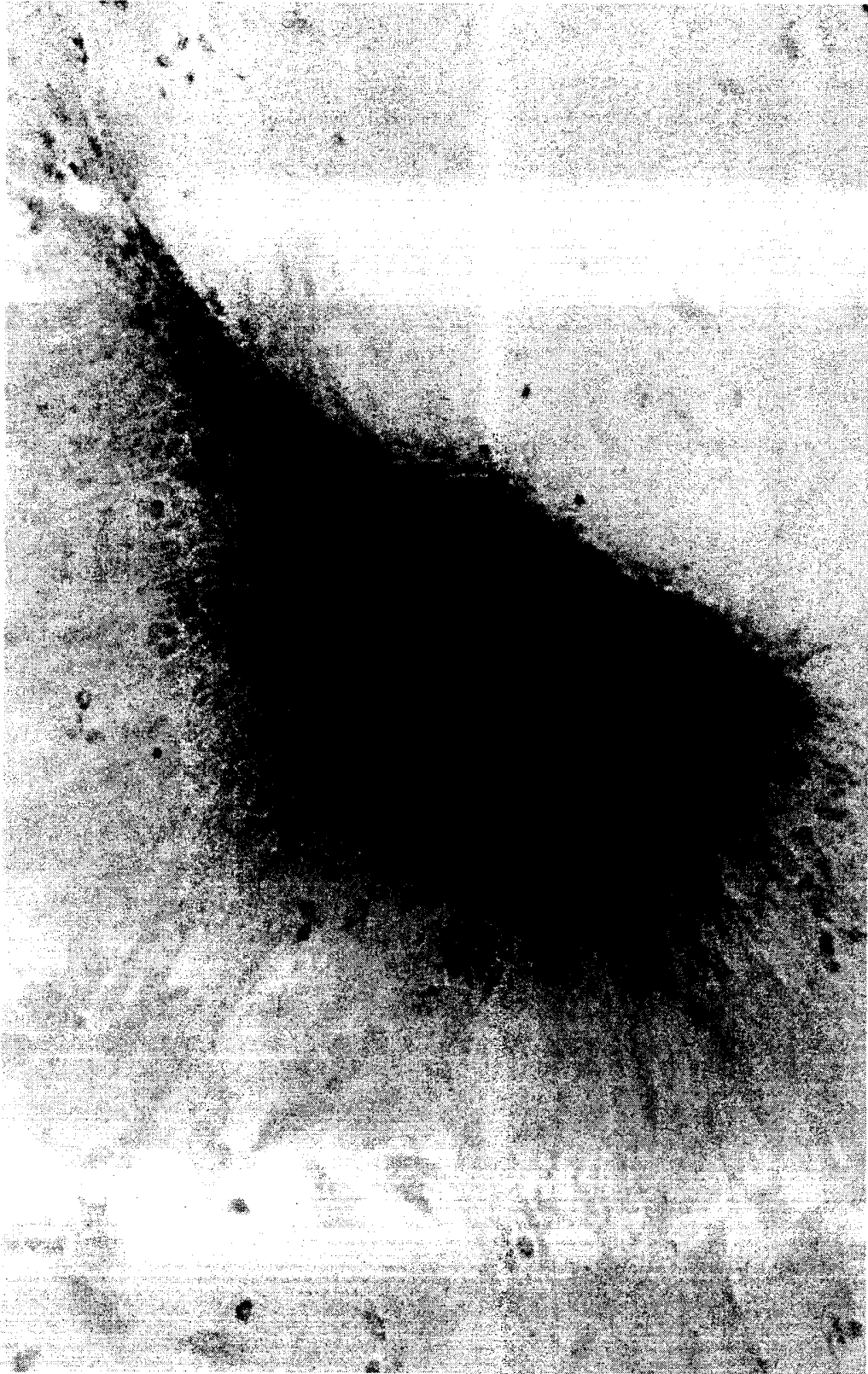
chur. 10

-11/19-



физ. 11А

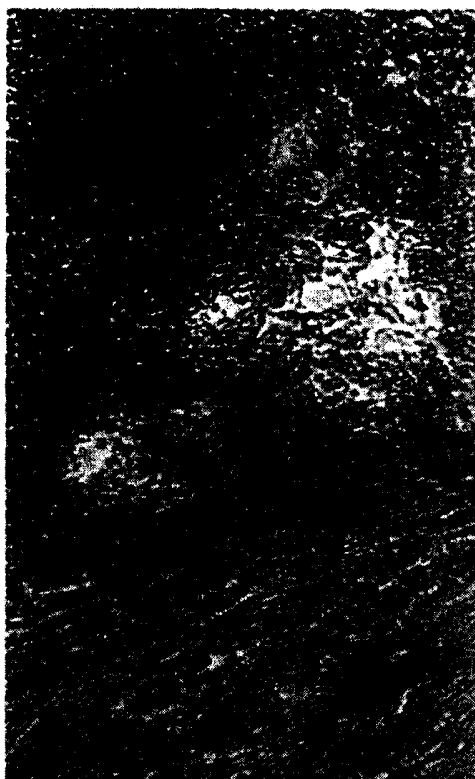
-12/19-



φειρ. 11B

-13/19-

B



A

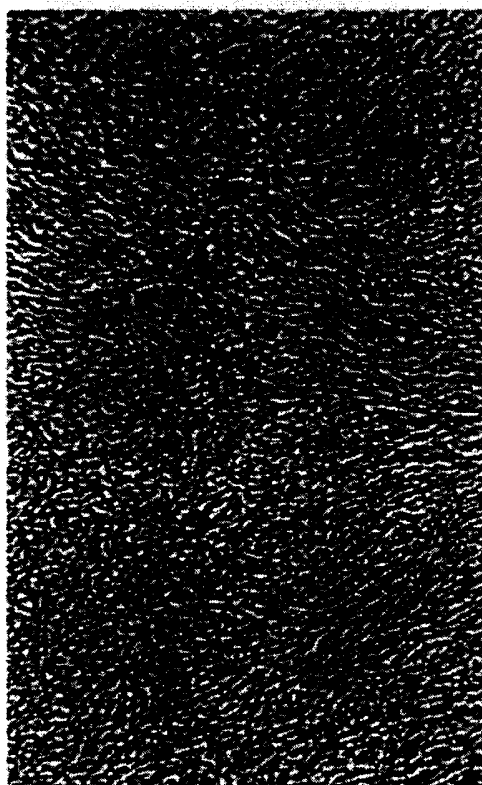
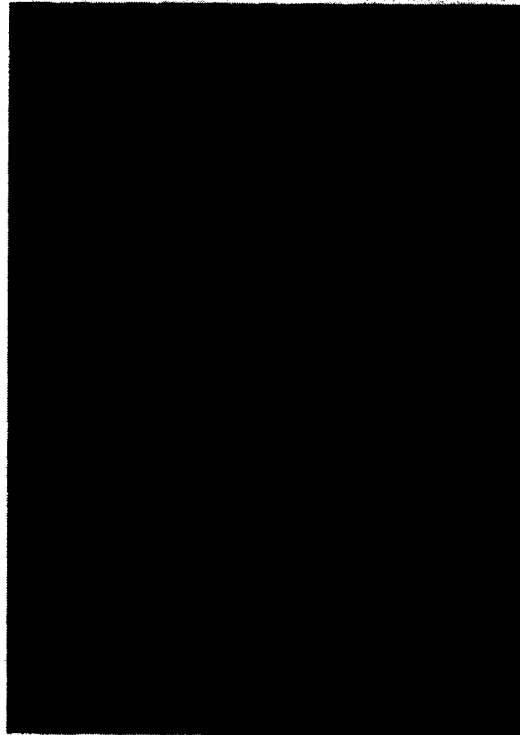


Fig. 12

B



A



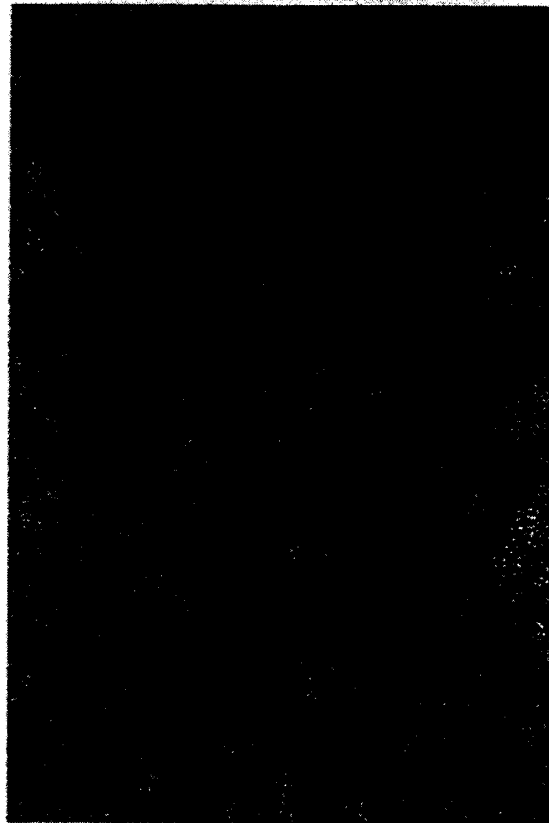
φυσ. 13

-15/19-



ch. 14

Before Induction



After Induction (1 week)



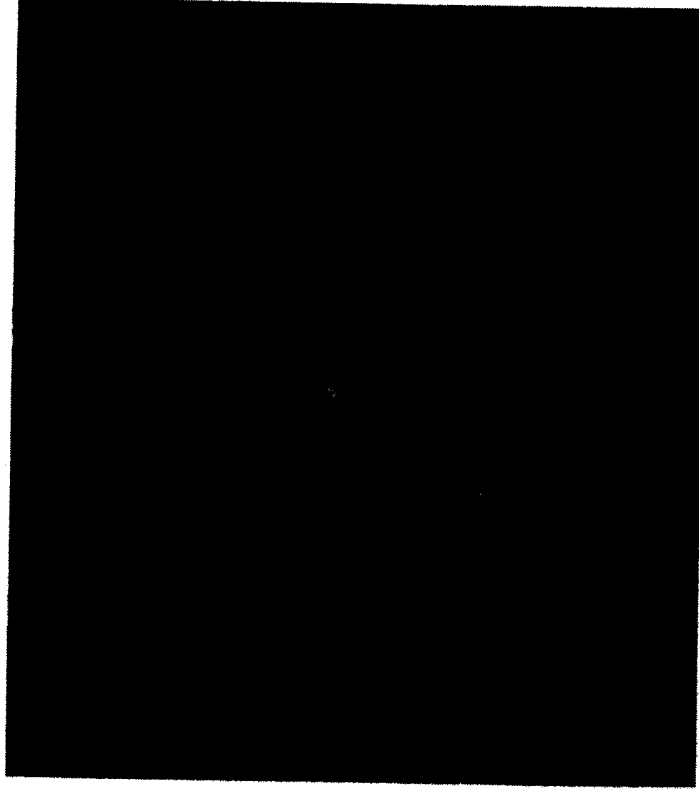
-16/19-

qbl: 15

Before Induction



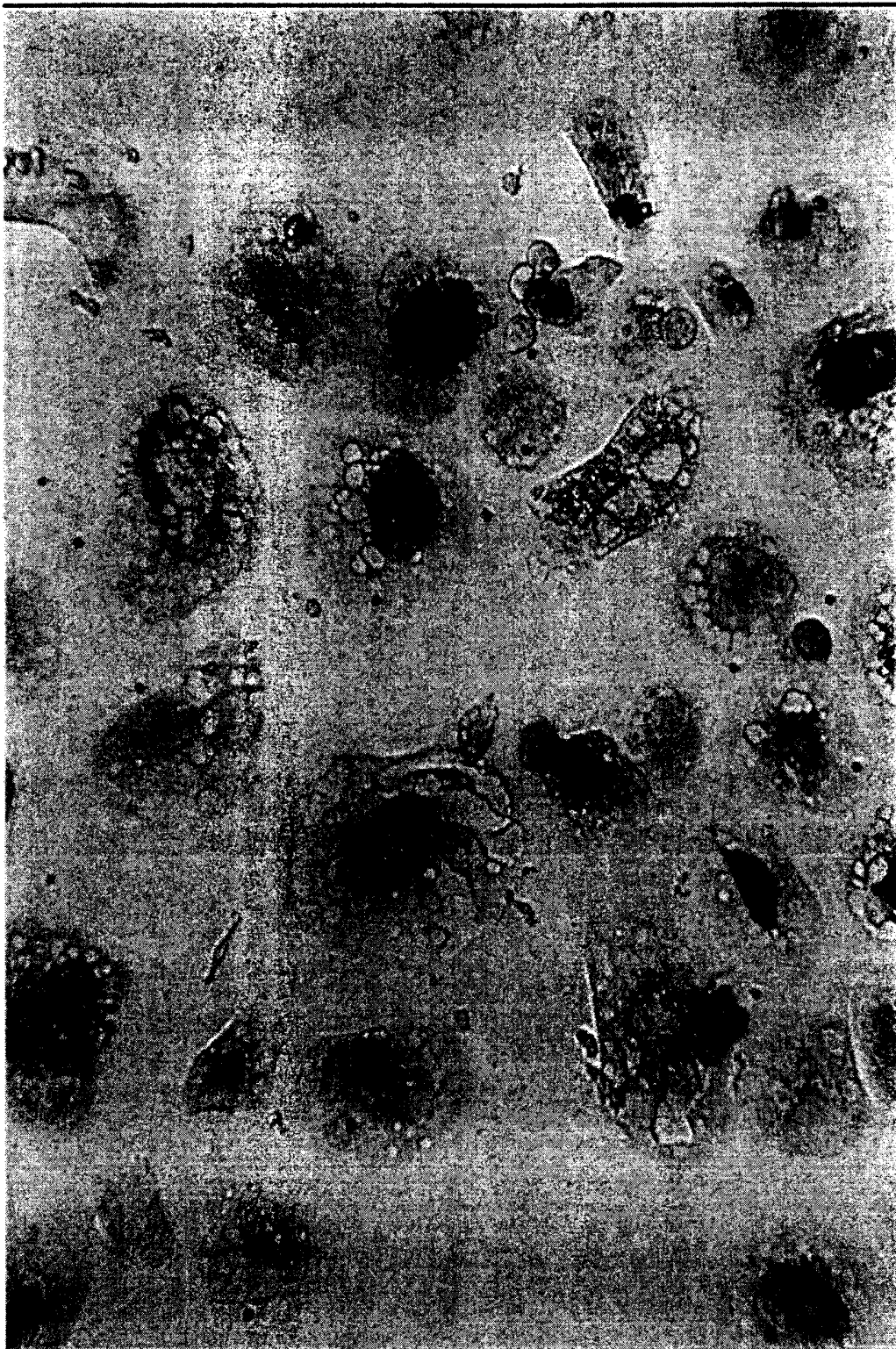
After Induction



Green: slow Myosin; Red CD13

4-22-16

-18/19-

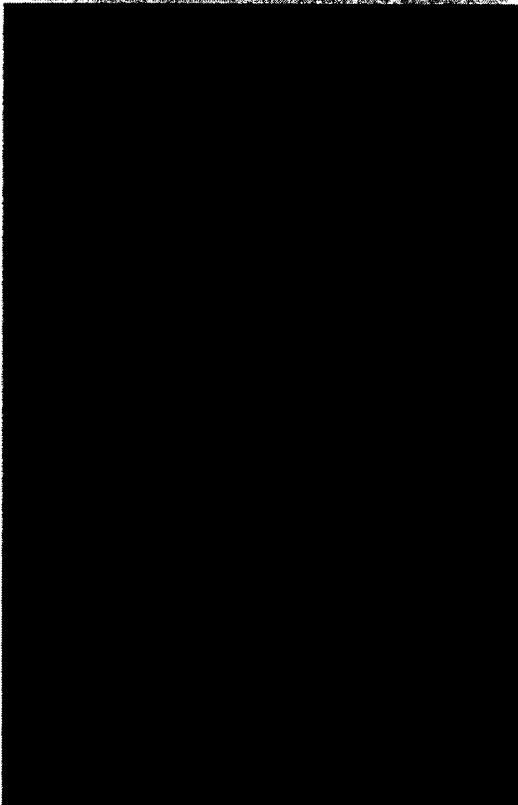


фур. 17

B



A



обл. 18