

(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРом О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)

(19) Всемирная Организация
Интеллектуальной Собственности
Международное бюро



(43) Дата международной публикации
16 октября 2008 (16.10.2008)

РСТ

(10) Номер международной публикации
WO 2008/123793 A1

(51) Международная патентная классификация:
G01N 30/72 (2006.01) **C12Q 1/25** (2006.01)

(21) Номер международной заявки: РСТ/RU2007/000571

(22) Дата международной подачи:
16 октября 2007 (16.10.2007)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:
200700942 6 апреля 2007 (06.04.2007) ЕА

(71) Заявитель и

(72) Изобретатель: **ЛОХОВ Петр Генриевич (LOKHOV, Petr Genrievich)** [RU/RU]; Черноморский бульвар, д. 23, к. 1, кв. 45, Москва, 113452, Moscow (RU).

(74) Агент: **НЮХОВСКИЙ Вячеслав Анатольевич (NIOUKHOVSKY, Viatcheslav Anatolievich)**; Центр юридических услуг, Бабаевская ул., д. 3, Москва, 107014, Moscow п (RU).

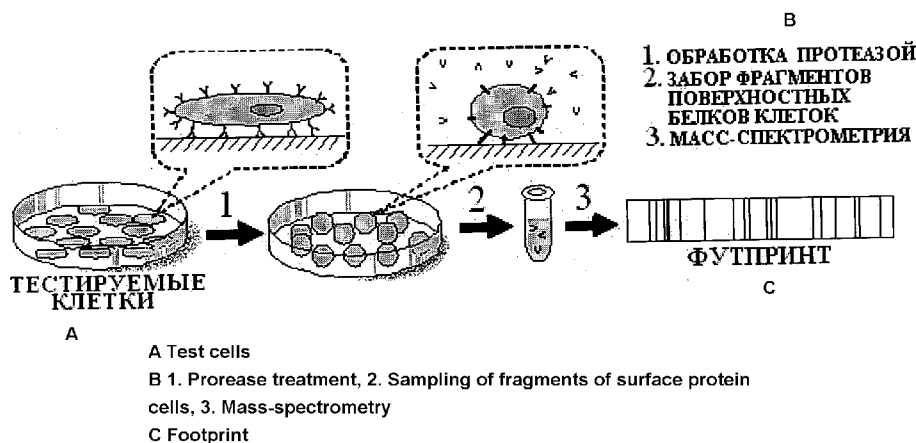
(81) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства (если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), европейский патент (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[продолжение на следующей странице]

(54) Title: METHOD FOR TESTING A CELL CULTURE QUALITY

(54) Название изобретения: СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАЧЕСТВА КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ



Фиг. 1

(57) Abstract: The invention relates to cell engineering, in particular to the analysis of *in vitro* cultivated cells and can be used in bioengineering, cosmetology and medicine (cell transplantology) for obtaining characterised cell material exhibiting medicinal and cosmetic properties. The inventive method for testing a cell culture quality is based on the spectrometric analysis of surface cell proteins and consists in exposing pre-washed live cells of the analysed cell culture to the protease vital action, in selecting the separated fragments of surface proteins and in mass-spectrometrically determining the mass thereof. The presence of the qualitative characteristics of the analysed cell culture is determined by comparing the entirety of the obtained masses with the entirety of the mass-spectrometrically determined masses of the fragments of the surface proteins of the live cells exhibiting modified qualitative characteristics. Said invention makes it possible to increase the objectivity (accuracy) of the identification of *in vitro* cultivated cells for selecting quality cells (having expected useful properties) and to reduce the time and material consumption.

[продолжение на следующей странице]

WO 2008/123793 A1



Опубликована:

— с отчётом о международном поиске

(57) Реферат: Изобретение относится к области клеточных технологий, а именно к анализу культивируемых *in vitro* клеток, и может быть использовано в биотехнологии, косметологии, медицине (клеточной трансплантологии), для получения охарактеризованного клеточного материала, обладающего лечебными или косметологическими свойствами. Способ определения качества клеточной культуры включает масс-спектрометрический анализ поверхностных клеточных белков. Предварительно промытые живые клетки исследуемой клеточной культуры подвергают витальному воздействию протеазы, отбирают отщепленные фрагменты поверхностных белков и масс-спектрометрически определяют их массы. Контролируют наличие качественных характеристик у исследуемой культуры клеток путем сравнения совокупности полученных масс с совокупностью масс-спектрометрически определенных масс фрагментов поверхностных белков живых клеток с известными качественными характеристиками. Технический результат, достигаемый при использовании патентуемого изобретения, заключается в повышении объективности (точности) идентификации культивируемых *in vitro* клеток для отбора качественных (с ожидаемыми полезными свойствами) клеток при снижении временных и материальных затрат.

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАЧЕСТВА КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ

Область применения

5 Изобретение относится к области клеточных технологий, а именно к анализу культивируемых *in vitro* клеток и может быть использовано в биотехнологии, косметологии, медицине (клеточной трансплантологии), для получения охарактеризованного клеточного материала, обладающего лечебными или косметологическими свойствами.

10 *Предшествующий уровень техники*

Проблема анализа клеточного материала, а именно контроля изменчивости является актуальной задачей во всех областях, где применяются культивируемые клетки. Так эксперименты на клеточных культурах являются неотъемлемой частью исследований в биологии и медицине. На клеточных моделях исследуют такие биологические процессы как апоптоз, дифференцировка, онкологическая трансформация клеток, изучают многие аспекты метаболизма, выявляют механизмы действия лекарств и т.д. Последние достижения клеточных технологий позволяют использовать культивируемые клетки в качестве лекарственных препаратов, перспективных, по мнению многих ученых, в лечении многих ранее неизлечимых 15 болезней (Tersikh A.V. et al., "Mammalian stem cells", *Pediatr. Res.*, 2006, v.59, 13-20).

Однако, фенотип культивируемых клеток изменчив. Перенос клеток из физиологических условий *in vivo* в культуральные флаконы приводит к стрессу клеток и существенной перестройке их метаболизма. Причина тому - невозможность воссоздания "в пробирке" естественной для клеток среды обитания (Wright W.E., Shay 25 J.W., "Historical claims and current interpretations of replicative aging", *Nat. Biotechnol.*, 2002, v.20, 682-688; Gershon H., Gershon D., "Critical assessment of paradigms in aging research", *Exp. Gerontol.*, 2001, v.36, 1035-1047), что ведет к:

- изменению в экспрессии генов (Campisi J., "Replicative senescence and immortalization", in: Stein G.S., Baserga A., Giordano A., Denhardt D.T. (eds.). "The 30 Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control", Wiley-Liss, New York, 1999, pp. 348-373; Cristofalo V.J. et al., "Age-dependent modifications of gene expression in human fibroblasts", *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression*, 1998, v.8, 43- 80);

- активации лизосомальных гидролаз (Bayreuther K. et al., "Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1988, v.85, 5112–5116);
- деградации гормон-зависимого метаболизма, сдвигам в
5 изоферментном составе (Crabb D.W., Roepke J., "Loss of growth hormone-dependent characteristics of rat hepatocytes in culture", In Vitro Cell Dev. Biol., 1987, v.23, 303-307; Roepke J.E., Crabb D.W., "Loss of sexual differentiation of rat hepatocytes in short-term culture", Alcohol Alcohol Suppl., 1987, v.1, 263-264);
- изменениям в синтезе глутатиона (Reiners J.J.Jr. et al., "Depletion of
10 cellular glutathione by conditions used for the passaging of adherent cultured cells", Toxicol. Lett., 2000, v.115, 153–163);
- потере в процессе культивирования экстрацеллюлярных белков и деградации рецепторного аппарата (Huggins J.W. et al., "Molecular changes in cell surface membranes resulting from trypsinization of sarcoma 180 tumor cells", Biochim.
15 Biophys. Acta, 1976, v.426, 630–637);
- повышению в клетках с каждым пассированием активности теломеразы и укорочению теломеров (Bodnar A.G. et al., "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells", Science, 1998, v.279, 349–352), что, в конечном счете, приводит к неспособности клеток пролиферировать (Hayflick L.,
20 Moorhead P.S., "The serial cultivation of human diploid cell strains", Exp. Cell Res., 1961, v.25, 585–621).
- потере комплекса гистосовместимости (Collins T. et al., "Loss of HLA in culture", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, v.83, 446-450; Angus R., et al., "Expression of major histocompatibility complex (MHC) antigens and their loss on culture in renal carcinoma",
25 Eur. J. Cancer, 1993, v.29, 2158-2160).

Таким образом, *in vitro* клетки подвержены морфофункциональной дегенерации, ведущей к их гибели. Более того, действующие *in vitro* дестабилизирующие условия и естественный отбор клеточного материала приводит к возникновению спектра отличающихся друг от друга популяций клеток.

- 30 В медицинских клеточных технологиях вопрос изменчивости клеточных культур стоит наиболее остро. Возьмем, к примеру, создание противоопухолевых вакцин на основе культивируемых опухолевых клеток пациента. При культивировании существенно искажается антигенный фенотип клеток (Angus R., et

al., "Expression of major histocompatibility complex (MHC) antigens and their loss on culture in renal carcinoma", *Eur. J. Cancer*, 1993, v.29, 2158-2160; Nanchahal J. et al., "Cultured composite skin grafts: biological skin equivalents permitting massive expansion", *Lancet*, 1989, v.22, 191-193), что ведет к несовпадению антигенов вакцины и опухоли.

- 5 Вероятно, именно с этим связан тот факт, что в большинстве проведенных в последнее десятилетие рандомизированных исследований таких вакцин не было получено очевидной противоопухолевой активности (Fisher R.I. et al., "Adjuvant immunotherapy or chemotherapy for malignant melanoma", Preliminary report of the National Cancer Institute randomized clinical trial. *Surg. Clin. North Am.*, 1981, v.61, 1267–
10 1277; Mitchell M.S., "Perspective on allogeneic melanoma lysates in active specific immunotherapy", *Semin. Oncol.*, 1998, v.25, 623–635).

Не менее актуален вопрос изменчивости клеток при использовании клеточных трансплантатов, полученных путем размножения клеток самого пациента. В частности, известны способы лечения аутологичными фибробластами (см, например,
15 "Биотрансплантат и способ коррекции дефектов мягких тканей, способ получения биотрансплантата", заявка: 2005127087/15, опубл. 20.08.2006, МПК A61K35/36; A61K35/36, а так же WO9840027 опубл. 17.09.1998, МПК A61F2/10; A61L27/24; A61L27/38; C12N5/00; US5660850, опубл. 26.08.1997, МПК C12N5/06; A61F2/00). Изменение в процессе культивирования антигенов (Collins T. et al., "Loss of HLA in
20 culture", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, v.83, 446-450) или, например, утрата возможности пролиферировать (Hayflick L., Moorhead P.S., "The serial cultivation of human diploid cell strains", *Exp. Cell Res.*, 1961, v.25, 585–621) делает подобные биотрансплантаты бессмысленными, а возможно и вредными.

Таким образом, культивированные клетки, используемые в медицинских и
25 косметологических препаратах, должны в обязательном порядке подвергаться качественному анализу.

Сегодня к оценке качества культивируемых клеток относят способы, направленные на выявление контаминаций, определение количества живых клеток, их тканевой принадлежности, выявление кросс-контаминаций (загрязнение клетками
30 другого вида), а также абсолютная их идентификация.

Существуют различные методы обнаружения контаминаций клеточных препаратов микоплазмой, грибами и вирусами. Данные способы позволяют

характеризовать качество клеточного препарата, но не характеризуют качество самих клеток препарата.

Существуют различные методы оценки качества культуры, основанные на исключении красителя живыми клетками, эффективности клонирования и пролиферации в массовой культуре (Хэй Р. "Сохранение и оценка качества клеток", в кн.: "Культура животных клеток", под ред. З. Фрешни, М.: Мир, 1989, с. 108-164). Данные методы позволяют только определять процент живых клеток в клеточном препарате и их жизнеспособность, но не дают представления о качественных (специальных) характеристиках самих клеток.

Известны различные способы определения тканевой принадлежности клеточных линий, а именно основанные на: тонком структурном анализе клеток с помощью электронного микроскопа; иммунологическом тесте белков цитоскелета (Ramaekers F.C.S. et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1982, v.46, 331); выявлении тканеспецифических антигенов (Nijweide P.J. and Mulder R.J.P., "Identification of osteocytes in osteoblast-like cell cultures using a monoclonal antibody specifically directed against osteocytes", 1986, v.84, 342-347); биохимическом тестирования специфических функций клеток (применим для клеток со специфическими функциями, см., например, Hay R.J. et al., "American Type Culture Collection Catalogue I I", 4th edn., 1983, Rockville, MD, p.12), количественной оценке иммунологических продуктов (применим для идентификации гибридом).

Недостатком тестов на тканеспецифичность при оценке клеточных препаратов является невозможность определить источник клеток. В частности фибробласты, применяемые в клеточных препаратах, могут быть как фетального (эмбрионального) происхождения, так и выделенными из тканей взрослого человека, например из кожи или жировой клетчатки (адипогенные фибробласты). Таким образом, фибробласты, полученные из различных источников, хоть и относятся к одному типу ткани, обладают различными полезными качествами.

В настоящее время известно несколько способов выявления кросс-контаминаций и идентификации клеточных культур.

Известен метод непрямой окраски клеток флуоресцентно-мечеными антителами. Данный способ позволяет верифицировать культуру клеток, определить

кросс-контаминацию, установить изменчивость по определенным антигенам (Stulberg C.S. in: "Contamination in Tissue Culture", Fogh J. (ed.), Academic Press, 1973, London and New York, p.1). Недостатком данного способа является необходимость предварительного получения видоспецифических антител для конкретной культуры, которые получают путем иммунизации животного тестируемыми клетками. Метод не может характеризовать утрату полезных свойств клетками в процессе культивирования.

Известен метод, основанный на анализе изоферментного состава. Показано, что определение изоформ семи ферментов с помощью электрофореза достоверно позволяет определить принадлежность клеток человеку (O'Brien S.J. et al., "Enzyme polymorphisms as genetic signatures in human cell cultures", Science, 1977, v.195, 1345-1348). Недостатком данного метода является длительность его исполнения (электрофорез идет 16-18 часов) и применимость только для выявления межвидовых кросс-контаминаций. Метод не может характеризовать утрату полезных свойств клетками в процессе культивирования.

Известен цитогенетический (кариологический) способ оценки наличия примесей других типов клеток в культуре. Метод основан на том, что хромосомные наборы могут значительно отличаться у клеток разных видов, что можно обнаружить с помощью микроскопа. Однако при наличии загрязнения клетками близкородственного вида анализ резко усложняется (применяется G-сегментирование, см., например, Seabright M., "A rapid banding technique for human chromosomes", Lancet, 1971, v.2, 971-972). Метод позволяет выявлять только межвидовую кросс-контаминацию и не может установить утрату полезных свойств клетками в процессе культивирования.

Известен иммунологический тест на антигены группы крови (Hay R.J. In: "Markers of Colonic Cell Differentiation", Wolman S.R., Mastromarino A.J. (eds.), 1984, Raven Press, New York, p.3) и антигены гистосовместимости (Pollack M.S. et al., "HLA-A, B, C and DR alloantigen expression on forty-six cultured human tumor cell lines", J. Natl. Cancer Inst., 1981, v.66, 1003-1012). Недостатком данного метода является частичное или полное отсутствие экспрессии этих антигенов у некоторых клеточных культур.

Известно использование полимеразной цепной реакции и ДНК секвенирования (Liu M.Y. et al., "Identification and authentication of animal cell culture by polymerase chain reaction amplification and DNA sequencing", In Vitro Cellular & Developmental

Biology – Animal, 2003, v.39, 424–427; Parodi B. et al., “Species identification and confirmation of human and animal cell lines: a PCR-based method”, Biotechniques, 2002, v.32, 432-434, 436, 438-440). Недостатком метода является применимость к клеточным линиям неблизкородственных видов, а также длительность исполнения, т.к. он требует проведение электрофореза. Метод не может характеризовать утрату полезных свойств клетками в процессе культивирования.

Известен ДНК фингерпринтинг (см, например, US2005123947, опубл. 09.06.2005; WO2005116257, опубл. 08.12.2005; US2006035261, опубл. 16.02.2006). ДНК фрагментируется рестриктазой и полученные фрагменты ДНК отличаются по размеру и в совокупности формируют уникальный профиль, позволяющий идентифицировать источник происхождения ДНК. Подобный подход широко используется для идентификации клеточного материала. Для ДНК фингерпринтинга наиболее широко используют полиморфизм длины фрагментов рестрикции (RFLP) (см., например, Kanter E. et al., “Analysis of restriction fragment length polymorphisms in deoxyribonucleic acid (DNA) recovered from dried bloodstains”, J. Forensic Sci., 1986, v.31, 403-408), переменные нуклеотидные тандемные повторы (VNTRS) (Budowle B. et al., “Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE”, Am. J. Hum. Genet., 1991, v.48, 137-144) или микросателлиты (Jeffreys A.J. et al., “Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA”, Nature, 1985, v.314, 67-73). За исключением монозиготных близнецов подобный метод позволяет точно идентифицировать принадлежность клеточного материала индивидууму. Однако метод никак не характеризует изменение качества клеточной культуры в процессе культивирования.

Известен двумерный белковый электрофорез, позволяющий выявить до 2 тысяч белков (Anderson N.G., Anderson N.L., “Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future”, Electrophoresis, 1996, v.17, 443-453). Недостатком данного способа является сложность исполнения. Способ требует последовательное проведение двух электрофоретических разделений белков, в связи с чем не применяется в качестве рутинного метода для оценки качества культур клеток. Более того, двумерный белковый электрофорез не характеризует наиболее актуальную для клеточной терапии фракцию поверхностных антигенов клеток, ввиду того, что данным способом не анализируют мембранные белки.

Известно применение масс-спектрометрии для идентификации клеточных культур (Zhang X. et al., "Identification of Mammalian Cell Lines Using MALDI-TOF and LC-ESI-MS/MS Mass Spectrometry", J. Am. Soc. Mass Spectrom., 2006, v.17, 490-499). Быстрый и относительно простой метод профилирования белков клеток описан для
5 клеток млекопитающих при непосредственном анализе времяпролетной (MALDI TOF) и другими видами масс-спектрометрии. Используя MALDI масс-спектры как уникальный отпечаток можно дифференцировать клеточные линии млекопитающих.

Недостатком данного подхода является низкая специфичность, обуславливаемая присутствием в анализируемой пробе множества цитозольных (внутриклеточных) белков, чьи фрагменты, как правило, в массе своей не специфичны для типов клеток, засоряют масс-спектры и не позволяют провести чувствительный анализ и охарактеризовать клетки по наиболее актуальным для клеточной трансплантологии мембранным белкам.

Из патента WO2006115426 ("Способ регулирования биохимических процессов и устройство для его осуществления", опубл. 02.11.2006, МПК G01R23/16; C12M3/00; C12N1/00) известен способ оценки качества культивирования клеточных культур на основе регистрации временных интервалов состояний клеток "рост-размножение" и "накопление-мутация", в котором границы интервалов определяются радиосигналами
20 в среднечастотном и низкочастотном диапазонах. Недостатком данного способа является необходимость применения специального оборудования, а так же возможность определения параметров только в результате постоянного мониторингирования роста клеток, что не применимо к оценке качества готовых клеточных препаратов.

Известен способ оценки свойств культуры клеток нейронов (см. патент US2004106101, опубл. 03.06.2004, МПК G01N33/487; G06Q10/00; G01N33/487) на основе измерения электрической активности клеток путем выращивания их на микроэлектродном чипе. Данный способ относится только к культуре нейронных клеток и не распространяется на другие клеточные культуры. Так же известен способ
30 сертификации культуры клеток хондроцитов (см. патент WO02095399, опубл. 28.11.2002, МПК C12Q1/42; G01N33/50; G01N33/68). Недостатком данного способа является применимость его только в регенеративной терапии хрящевых тканей.

Известен способ определения качества клеточной культуры, включающий масс-спектрометрический анализ органических молекул клеток. Известный способ предусматривает применение масс-спектрометров, измеряющих массы молекул с высокой точностью за счет применения ионно-циклотронного резонанса, что
5 позволяет увеличивать количество информации получаемой с проб клеток (US6974702, опубл. 02.06.2005, МПК G01N27/62; G01N33/15; G01N33/483).

Недостатком данного метода является, с одной стороны загрязненность получаемых спектров неинформативными цитозольными белками и другими биополимерами, т. к. для анализа используют целые клетки, и, во вторых,
10 использование определенного и дорогостоящего масс-спектрометра, позволяющего с высокой точностью определять массы молекул. В связи с этим данный подход не получил распространение в качестве рутинного метода анализа качества культур.

Наиболее близким аналогом заявленного изобретения является способ, основанный на масс-спектрометрическом анализе именно поверхностных белков
15 клеток, раскрытый в патенте "Preparation of highly-purified plasma membranes" (WO03025565, опубл. 27.03.2003, МПК-7 G01N27/62; C07K1/22; C07K16/28), в котором описан способ определения качества клеточной культуры, включающий масс-спектрометрический анализ предварительного выделенных мембранных белков.

Недостатком данного способа является необходимость использования
20 специфичных для мембранных белков антител или их антигенсвязывающих фрагментов для формирования комплексов с белками мембраны для последующего их выделения и очистки. Подобная многостадийность не позволяет применять данный подход в качестве рутинного метода анализа качества культивируемых клеток.

25 В настоящем изобретении была поставлена задача разработки нового способа определения качества клеточной культуры, ориентированного на анализ клеточных препаратов, отличительными чертами которого являются:

- *быстрота исполнения* (не более 2-х часов), что позволит использовать его для оценки качества готовых клеточных препаратов перед их применением, учитывая
30 малый срок их годности с момента изготовления (несколько часов);

- *чувствительность*, позволяющая определять потерю качества клетками в процессе культивирования;

- *чувствительность*, позволяющая дифференцировать морфофункционально идентичные клетки от одного донора, но обладающие при применении различными полезными свойствами;
- *ориентация на анализ поверхностных белков* клеток, определение сохранности которых в процессе культивирования наиболее актуально;
- *интегрируемость* в культивирование клеток, что подразумевает отсутствие специального оборудования и сложных манипуляций для подготовки проб для анализа;
- *относительная дешевизна*, чтобы цена анализа была несопоставимо меньше стоимости клеточного препарата;
- *минимальное или отсутствие потребления* клеток, что позволит многократно проводить анализ культивируемых клеток без их расхода;
- *возможность численного выражения результатов* анализа, что необходимо для реализации стандарта GMP, исключающего человеческий фактор при проведении оценки качества культуры клеток.

Раскрытие изобретения

Технический результат, достигаемый при использовании патентуемого изобретения, заключается в повышении объективности (точности) идентификации культивируемых *in vitro* клеток для отбора качественных (с ожидаемыми полезными свойствами) клеток при снижении временных и материальных затрат.

Указанный технический результат обеспечивается при реализации способа определения качества клеточной культуры, включающего масс-спектрометрический анализ поверхностных клеточных белков. Согласно настоящему изобретению предварительно промытые живые клетки исследуемой клеточной культуры подвергают витальному воздействию протеазы, отбирают отщепленные фрагменты поверхностных белков и масс-спектрометрически определяют их массы, контролируют наличие качественных характеристик у исследуемой культуры клеток путем сравнения совокупности полученных масс с совокупностью масс-

спектрометрически определенных масс фрагментов поверхностных белков живых клеток с известными качественными характеристиками.

В предпочтительном варианте реализации изобретения в качестве протеазы используют трипсин.

5 Для идентификации отношения клеточной культуры к определенной группе клеточных препаратов с полезными свойствами контролируют наличие качественных характеристик, определяющих источник клеток.

В предпочтительном варианте реализации изобретения контролируют наличие качественных характеристик, определяющих пригодность для проведения
10 противоопухолевой иммунотерапии.

Для установления сохранности полезных свойств клетками контролируют наличие качественных характеристик, свидетельствующих об отсутствии изменений фенотипа клеток исследуемой клеточной культуры в процессе культивирования.

В качестве живых клеток с известными качественными характеристиками
15 может быть использована первичная культура клеток.

В качестве живых клеток с известными качественными характеристиками могут быть использованы клетки, не претерпевшие изменений в фенотипе в процессе хранения и культивирования.

Отщепленные фрагменты поверхностных белков перед масс-
20 спектрометрическим анализом могут быть дегликозилированы.

Обработка первичной культуры клеток витальным воздействием трипсина приводит к отщеплению с поверхности клеток фрагментов белков, состав которых специфичен для конкретных культур клеток. Таким образом, согласно данному
25 изобретению, действие трипсина, как и других протеаз, приводит к высвобождению в раствор специфичных для культивируемых клеток фрагментов поверхностных белков, совокупность измеренных масс которых являются характеристической для культуры клеток. Для подобных характеризующих культивируемые клетки совокупностей масс был введен термин протеомный **футпринт** (белковый отпечаток).

30 Клетки при обработке витальным воздействием протеазы не погибают, что дает возможность избежать загрязнения анализируемых проб мажорными белками цитоплазмы клетки и избежать расхода клеточного материала при анализе.

Краткое описание чертежей

Далее изобретение поясняется конкретными примерами реализации изобретения и прилагаемыми фигурами, на которых изображено следующее:

5 На фиг. 1 – схема получения согласно данному изобретению протеомного футпринта культивируемых клеток.

На фиг. 2 – протеомные футпринты фибробластов из различных тканей человека, классифицированные иерархическим кластерным анализом.

10 На фиг. 3 – масс-спектр фрагментов поверхностных белков и соответствующий ему футпринт, полученный согласно второму примеру реализации изобретения со свежеиницированной первичной культуры опухолевых клеток человека (3А); масс-спектр фрагментов поверхностных белков и соответствующий ему футпринт, полученный с той же культуры клеток после непродолжительного их культивирования (3Б); масс-спектр и соответствующий ему футпринт полученный с той же культуры
15 клеток после более длительного культивирования клеток (3В).

Лучшие варианты осуществления изобретения**Пример 1. НА ФИБРОБЛАСТАХ ЧЕЛОВЕКА**

20

Морфологически все типы фибробластов практически идентичны (имеют веретенообразную форму). Однако фибробласты, полученные из различных источников, существенно отличаются по своим свойствам, и соответственно, имеют различные показания к применению в клеточной терапии.

25 В частности, фибробласты, полученные из жировой ткани человека, отличаются плюрипатентностью подобно стволовым клеткам (см., например, Zuk P.A. et al., “Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells”, Mol. Biol. Cell., 2002, v.13, 4279-4295). Фибробласты кожи человека обладают слабым потенциалом к размножению, но пригодны для мезотерапии большими дозами размноженных клеток
30 самого пациента. Эмбриональные фибробласты кожи человека обладают хорошим потенциалом к размножению и пригодны для аллогенной клеточной трансплантации (Сухих Г.Т., “Трансплантация фетальных клеток в медицине: настоящее и будущее”, Бюлл. Эксп. Биол. Мед., 1998, 126, Прил.1, 3-13). Фибробласты дермального сосочка

волосяного фолликула обладают трихогенными свойствами и могут использоваться в клеточной терапии алопеций (см., например, патент “Биотрансплантант, способ его получения (варианты) и способ лечения алопеции”, заявка: 2004125092/15, опубл. 18.08.2004).

5

Ниже приведен пример определения согласно данному изобретению качественных характеристик тестируемой культуры фибробластов, путем установления идентичности ее протеомного футпринта полученным аналогичным образом футпринтам культур фибробластов известного происхождения и с установленными полезными свойствами.

10

Сорок две первичные культуры кожных, адипогенных, фетальных фибробластов и фибробластов дермального сосочка волосяного фолликула получали из соответствующих источников согласно описанным ранее методикам. Первичные культуры кожных фибробластов получали согласно методике Rittie и Fisher (“Isolation and culture of skin fibroblasts”, *Methods Mol. Med.*, 2005, v.117, 83-98). Первичные культуры адипогенных фибробластов получали согласно методике Zuk и соавт. (“Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies”, *Tissue Eng.*, 2001, v.7, 211-288). Первичные культуры фибробластов дермального сосочка волосяного фолликула получали согласно методике Zhong-fa и соавт. (“Biological characterization of cultured dermal papilla cells and hair follicle regeneration in vitro and in vivo”, *Chinese Medical Journal*, 2006, v.119, 275-281). Первичные культуры фетальных фибробластов человека получали из абортивного материала согласно методике Salvatori и соавт. (“Retroviral vector-mediated gene transfer into human primary myogenic cells leads to expression in muscle fibers in vivo”, *Hum. Gene Ther.*, 1993, v.4, 713-723). Культивирование первичных культур проводили в идентичных условиях (ростовая среда ДМЕМ, 5% CO₂, 37°C, 10% фетальной бычьей сыворотки). На 20-25 день после инициации культур делали стерильный клеточный препарат (1 млн фибробластов в 1 мл физиологического раствора), который анализировали по следующему протоколу:

25
30

1. Клеточный препарат, содержащий тестируемые фибробласты, в стерильных условиях выливают в культуральный флакон. Во флакон доливают ростовой

среды (ДМЕМ с 10% фетальной бычьей сыворотки) и инкубируют при 37°C в CO₂-инкубаторе в течение 30-45 мин.

2. Удаляют ростовую среду из флакона и трижды промывают прикрепившиеся ко дну флакона клетки стерильным физиологическим раствором, используя объем

равный половине ростовой среды.

3. Добавляют к клеткам 0,0001% раствор трипсина, используя 1 мл р-ра на 25 см² поверхности культурального флакона.

4. Инкубируют флакон при 37°C. Между пятой и седьмой минутами инкубации отбирают из флакона раствор трипсина, содержащий отщепленные от клеток

фрагменты белков.

5. Раствор трипсина, отобранный от клеток, используют для масс-спектрометрического определения совокупности масс фрагментов поверхностных белков, соответствующей анализируемым клеткам.

6. Измеренную совокупность масс фрагментов поверхностных белков анализируемых клеток сравнивают с полученной аналогичным способом совокупностью масс фрагментов поверхностных белков клеточных культур с известными качественными характеристиками.

Масс-спектрометрический анализ проводят следующим образом. Пробы, полученные в процессе инкубации клеток с трипсином (см. пункт №4 протокола) обессоливают, применяя наконечники для автоматических пипеток с обращенной фазой ZipTip_{C18} (Millipore Corp., США), в соответствии с протоколом производителя. Массы пептидных фрагментов, содержащиеся в пробе, измеряют методом времяпролетной (MALDI-TOF) масс-спектрометрии. 2 мкл обессоленного раствора смешивают на масс-спектрометрической мишени в соотношении 1:1 с насыщенным раствором α-циано-4-гидроксисинаминовой кислоты, содержащей 50% ацетонитрила и 0,5% трифторуксусной кислоты. Полученные на мишени капли проб высушивают на воздухе и проводят масс-спектрометрический анализ в диапазоне масс пептидов от 600 до 4000 Да.

Полученные масс-спектры, соответствующие разным клеточным линиям, предварительно обрабатывают для последующей классификации иерархическим кластерным анализом. Список масс пептидов переводят в бинарный код ("1" – есть

определенная масса пептида в спектре и, соответственно, "0"— отсутствие массы пептида), генерируя таким образом протеомный футпринт клеточной культуры. Классификацию (разбиение на группы) футпринтов проводят кластеризацией по методу Варда, с использованием квадратов евклидовых расстояний для расчета матрицы дистанций.

Из фиг. 2 видно, что футпринты 42-х препаратов фибробластов из различных источников, таких как дермального сосочка волосяного фолликула, жировой клетчатки, кожи предплечья взрослого человека и фетальной кожи четко классифицируются по четырем группам соответственно происхождению фибробластов (1, 2, 3 и 4 группы на фиг. 2, соответственно). Таким образом, имея тестируемый клеточный препарат фибробластов, можно точно установить его происхождение по принадлежности его футпринта к тому или иному кластеру. К примеру, если тестируемому клеточному препарату соответствует отмеченный звездочкой (*) на фиг. 2 футпринт, то достоверно можно утверждать, что фибробласты тестируемого препарата были выделены из дермального сосочка волосяного фолликула, размножены соответствующим образом и в процессе культивирования не были утрачены качественные характеристики, позволяющие отнести данные фибробласты к фибробластам с трихогенными свойствами.

В случае, если тестируемая культура клеток не будет принадлежать ни одному из кластеров (см, например, футпринт адипогенных фибробластов в кластере 2' на фиг. 2), можно утверждать, что клетки не принадлежат ни одному из определяемых источников, либо в процессе культивирования их фенотип изменился и ассоциировать их с качественными клеточными препаратами установленного происхождения и с известными свойствами уже нельзя.

Из приведенного примера видно, что совокупность (набор) молекулярных масс фрагментов поверхностных белков, т.н. протеомный футпринт, является своеобразным "штрих-кодом" характеризующим клетки на предмет отношения к фибробластам с определенными, представляющими интерес для клеточной терапии, свойствами.

Следует отметить, что забор раствора трипсина, содержащего отщепленные от клеток фрагменты поверхностных белков, желательно осуществлять до момента открепления клеток от дна культурального флакона под воздействием трипсина, что

позволит предотвратить попадание клеток в пробу и избежать дополнительной стадии очистки пробы.

Условия обработки протеазой клеток определяют экспериментально для каждого типа клеток и активности используемой протеазы, и могут существенно варьировать от 0,00001% до 0,05%, для концентрации протеазы, и от 30 секунд до 10 минут для времени обработки клеток. В случае использования трипсина с другой активностью, концентрация его меняется прямо пропорционально увеличению или уменьшению активности.

В других вариантах реализации изобретения используют любой другой вариант масс-спектрометрии.

Раствор трипсина можно готовить как на стерильном физиологическом растворе, так и на любом подходящем для этого солевом или буферном растворе.

Вместо трипсина могут быть использованы другие протеазы, например, химотрипсин, протеиназа К и т.д.

Отщепленные фрагменты поверхностных белков могут перед масс-спектрометрическим анализом быть дегликозилированы, например проназой.

Вместо трипсина может быть использована комбинация протеаз.

В случае использования суспензионной культуры клеток необходимо перед забором пробы клетки осадить на дно, например центрифугированием или использовать любой другой подходящий способ для удаления клеток из тестируемой пробы.

Обессоливание и концентрирование пептидов пробы для масс-спектрометрического анализа можно осуществлять любым подходящим для этого способом.

В других вариантах реализации изобретения, если применяемый протокол масс-спектрометрического анализа не требует обессоливания и/или концентрирования анализируемой пробы, содержащей фрагменты поверхностных белков, обессоливание и/или концентрирование не проводится.

В случае использования трипсина для снятия клеток прикрепленной культуры с подложки при получении клеточного препарата, необходимо перед анализом провести дополнительное инкубирование клеток в соответствующих условиях 18-20 часов для репарации клетками поверхностных белков.

В других вариантах реализации изобретения используют для формирования характеристической совокупности масс не появление той или иной массы фрагмента поверхностного белка, а изменение его интенсивности в масс-спектре, что соответствует изменению его концентрации в анализируемой пробе.

5 В других вариантах реализации изобретения используется любая подходящая математическая обработка измеренных масс белковых фрагментов, позволяющая корректно классифицировать клеточный материал по интересующим свойствам, к примеру, применив регрессионный анализ, k-means кластеризацию, нейросети, PCA, SVM, SOM, и т.д., а также их комбинации.

10 Патентуемый способ может применяться к любым типам клеточных препаратов, в частности к суспензии клеток, смешанным культурам, органотипным культурам и клеточным агрегатам (гранулы, сфероиды), а также к свежевыделенным клеткам и тканевым фрагментам.

15 **Пример 2. НА ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА**

Далее изобретение поясняется **вторым примером** оценки качества культуры **опухолевых клеток рака толстого кишечника человека** на предмет пригодности использования их для противоопухолевой вакцинации.

20 Выделенные из опухоли больного, культивируемые и впоследствии используемые для противоопухолевой вакцинации клетки, должны быть идентичны опухолевым клеткам больного. Однако культивирование клеток существенно искажает фенотип первичной культуры по причине невозможности искусственного воссоздания *in vitro* условий, при которых опухолевые клетки росли в организме
25 больного. Таким образом, качество используемых для вакцинации культивированных опухолевых клеток подлежит обязательному контролю и выражается в степени их **соответствия** клеткам опухоли больного. Протокол установления подобного соответствия представлен ниже.

1. Из флакона с культивируемыми опухолевыми клетками удаляют ростовую
30 среду и трижды промывают клетки 0,9%-ым раствором хлорида натрия или фосфатным буфером силана, используя каждый раз объем равный не менее половины объема заливаемой в культуральный флакон ростовой среды. В результате промывки клеток должны быть удалены следы сыворотки, содержащейся в ростовой среде.

2. К клеткам добавляют 0,0001% раствор трипсина (активность ~3000 Ед/мг), используя 1 мл р-ра на один 25 см² поверхности культурального флакона.

3. Инкубируют флакон при 37°C. Между 5-ой и 7-ой минутами инкубации отбирают из флакона раствор, содержащий отщепленные от клеток фрагменты
5 поверхностных белков. Опухолевые клетки в момент отбора раствора должны быть прикреплены к дну культурального флакона. Если под воздействием трипсина часть клеток открепилась и стала свободно плавать, то ростовую среду надо отцентрифугировать при 400 g в течение 5 мин и использовать супернатант свободный от примеси клеток.

10 4. Для инактивации остатков трипсина в культуральном флаконе добавляют свежеприготовленную культуральную среду, содержащую фетальную бычью сыворотку и продолжают культивирование клеток при 37°C и 5% CO₂.

5. Раствор, полученный в пункте №3 анализируют масс-спектрометрически и сравнивают со спектром полученным аналогичным образом (пп. 1-4), но ранее для
15 свежевыделенных опухолевых клеток.

Масс-спектрометрический анализ проводят по протоколу масс-спектрометрии гликозилированных пептидов (Tajiri M. et al., "Differential analysis of site-specific glycans on plasma and cellular fibronectins: application of a hydrophilic affinity method for
20 glycopeptide enrichment", *Glycobiology*, 2005, v.15, 1332–1340). Это объясняется с одной стороны тем, что внеклеточные фрагменты белков, как правило, гликозилированы, с другой стороны, именно гликозилированные фрагменты поверхностных белков опухолевых клеток наиболее иммуногены и являются вероятными антигенами вакцины (см., например, Franco A., "CTL-Based cancer
25 Preventive/Therapeutic Vaccines for Carcinomas: Role of Tumour-Associated Carbohydrate Antigens", *Scand. J. Immunol.*, 2005, v.61, 391-397).

140 мкл анализируемого раствора фрагментов поверхностных белков смешивают со 140 мкл этанола, 720 мкл бутанола и добавляют 15 мкл сефарозы CL4B. Инкубируют при медленном перемешивании 45 мин. После инкубации сефарозу
30 дважды промывают раствором с тем же содержанием спирта и бутанола и инкубируют 30 мин в 50%-ом растворе этанола. Раствор этанола отбирают от сефарозы и высушивают на роторном испарителе. Полученный осадок растворяют в 10 мкл воды и анализируют времяпролетной (MALDI-TOF) масс-спектрометрией. 2 мкл

анализируемого раствора смешивают на масс-спектрометрической мишени в соотношении 1:1 с насыщенным раствором 2,5-дигидроксibenзойной кислоты, содержащей 50% ацетонитрила и 0,5% трифторуксусной кислоты. Полученные на мишени капли проб высушивают на воздухе и проводят масс-спектрометрический анализ в диапазоне масс пептидов от 1000 до 4000 Да.

Согласно полученным данным, при повторном (контрольном) масс-спектрометрическом анализе культуры клеток воспроизводится не менее 95% масс фрагментов белков, что можно считать критерием идентичности двух сравниваемых клеточных препаратов. Предлагается оценивать пригодность клеточного препарата для вакцинации больного на основе идентичности не менее 90% общих масс фрагментов белков у анализируемых клеток и свежевыделенных опухолевых клеток донора.

На фиг. 3А показан времяпролетный спектр белковых фрагментов и соответствующий футпринт, полученные согласно второму варианту реализации изобретения со свежевыделенных опухолевых клеток рака толстого кишечника человека. На фиг. 3Б показан масс-спектр и соответствующий футпринт тех же самых клеток, размноженных культивированием (1-ый пассаж) и пригодных для противоопухолевой вакцинации. Снятый с них спектр идентичен исходному спектру, полученному со свежевыделенных опухолевых клеток. На фиг. 3В представлен масс-спектр тех же самых клеток, размноженных культивированием (2-ой пассаж), но уже **не пригодных** для противоопухолевой вакцинации. В процессе культивирования произошли существенные изменения в поверхностных белках клеток (см., например, область 1800-2000 Да футпринта на фиг. 3В), что позволило считать их неидентичными клеткам исходной опухоли донора.

В случае использования протеазы для диссоциации ткани опухоли, с целью высвобождения опухолевых клеток, необходимо проводить масс-спектрометрический анализ для получения образца футпринта исходной (неизменной) культуры клеток не раньше чем через сутки после инициации опухолевой культуры, чтобы клетки успели восстановить поврежденные при выделении поверхностные белки.

Совокупность масс фрагментов поверхностных белков является своеобразным “штрих-кодом”, т.е. показателем, наиболее объективно характеризующим клетки.

Поэтому контроль наличия качественных характеристик у исследуемой клеточной культуры путем сравнения совокупности полученных масс фрагментов поверхностных белков ее клеток с совокупностью масс-спектрометрически
5 определенных масс фрагментов поверхностных белков живых клеток с известными качественными характеристиками дает возможность наиболее точно произвести отбор качественных (с ожидаемыми полезными свойствами) клеток.

Применение при реализации способа масс-спектрометрического анализа
10 позволяет определять качество клеточной культуры достаточно быстро - в течение не более 2-х часов. Это позволит использовать его для оценки качества готовых клеточных препаратов перед их применением, учитывая малый срок их годности с момента изготовления (несколько часов).

Кроме этого полученные масс-спектры могут быть преобразованы с
15 возможностью *численного выражения результатов* анализа, что необходимо для реализации стандарта GMP, исключающего человеческий фактор при проведении оценки качества культуры клеток, и позволит обеспечить необходимую объективность результатов.

Точность определения наличия качественных характеристик у исследуемой
20 культуры клеток при реализации патентуемого способа обеспечивается также за счет использования живых клеток исследуемой клеточной культуры, которые подвергают витальному воздействию протеазы. Клетки при обработке витальным воздействием протеазы не погибают, что дает возможность избежать загрязнения анализируемых проб мажорными белками цитоплазмы клетки и значительно уменьшить расход
25 клеточного материала при анализе культуры клеток.

Загрязнения анализируемых проб позволяет избежать также предварительная промывка клеток, которая необходима для удаления следов сыворотки, содержащейся в ростовой среде.

30

Промышленная применимость

Таким образом, патентуемый способ позволяет охарактеризовать клетки по наиболее актуальным, в том числе и для клеточной трансплантологии, поверхностным белкам.

Формула изобретения

1. Способ определения качества клеточной культуры, включающий масс-спектрометрический анализ поверхностных клеточных белков, **отличающийся тем,**

5 **что**

предварительно промытые живые клетки исследуемой клеточной культуры подвергают витальному воздействию протеазы, отбирают отщепленные фрагменты поверхностных белков и масс-спектрометрически определяют их массы, контролируют наличие качественных характеристик у исследуемой культуры клеток
10 путем сравнения совокупности полученных масс с совокупностью масс-спектрометрически определенных масс фрагментов поверхностных белков живых клеток с известными качественными характеристиками.

2. Способ по п.1, **отличающийся тем, что** в качестве протеазы используют трипсин.

15 3. Способ по п.1, **отличающийся тем,** контролируют наличие качественных характеристик, определяющих источник клеток.

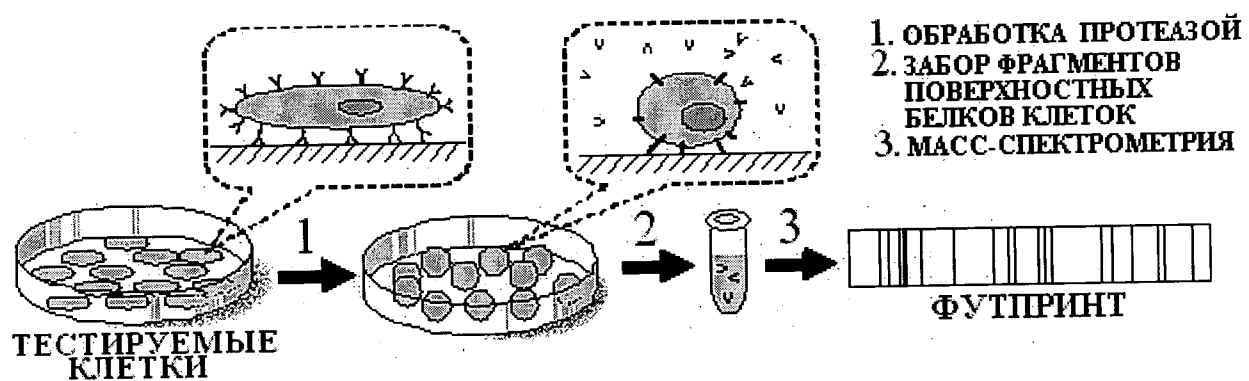
4. Способ по п.1, **отличающийся тем, что** контролируют наличие качественных характеристик, определяющих пригодность для проведения противоопухолевой иммунотерапии.

20 5. Способ по п.1, **отличающийся тем, что** контролируют наличие качественных характеристик, свидетельствующих об отсутствии изменений фенотипа клеток исследуемой клеточной культуры в процессе культивирования.

25 6. Способ по п.1, **отличающийся тем, что** в качестве живых клеток с известными качественными характеристиками используют первичную культуру клеток.

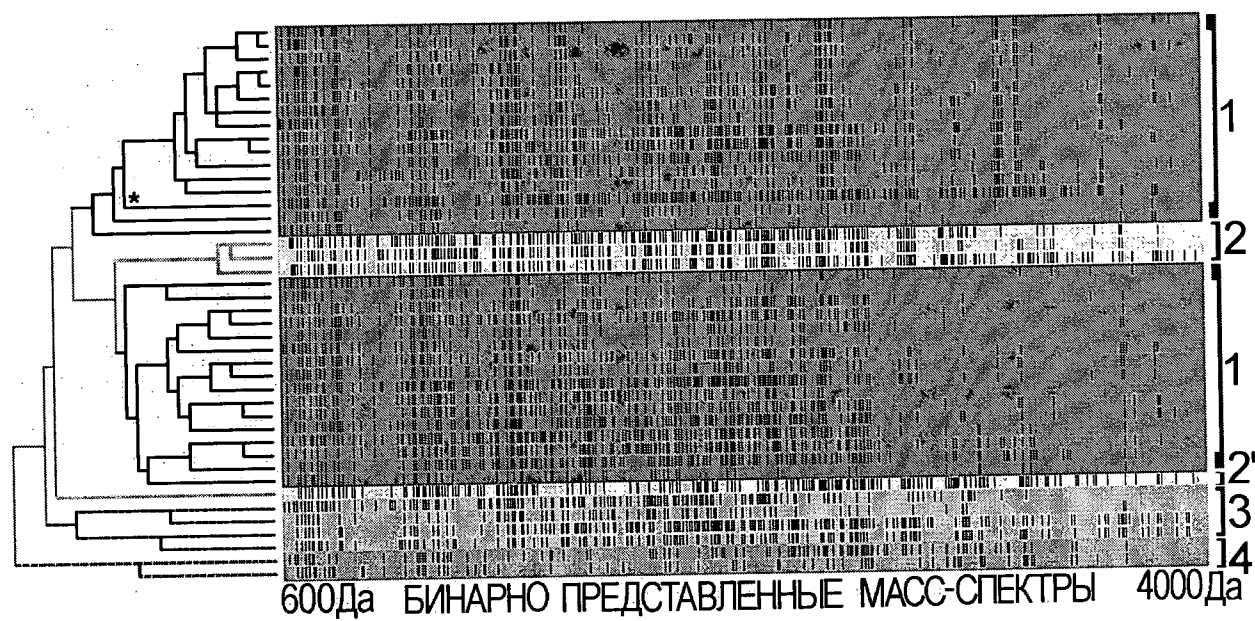
7. Способ по п.1, **отличающийся тем, что** в качестве живых клеток с известными качественными характеристиками используют клетки, не претерпевшие изменений в фенотипе.

30 8. Способ по п.1, **отличающийся тем, что** отщепленные фрагменты поверхностных белков перед масс-спектрометрическим анализом дегликозилируют.



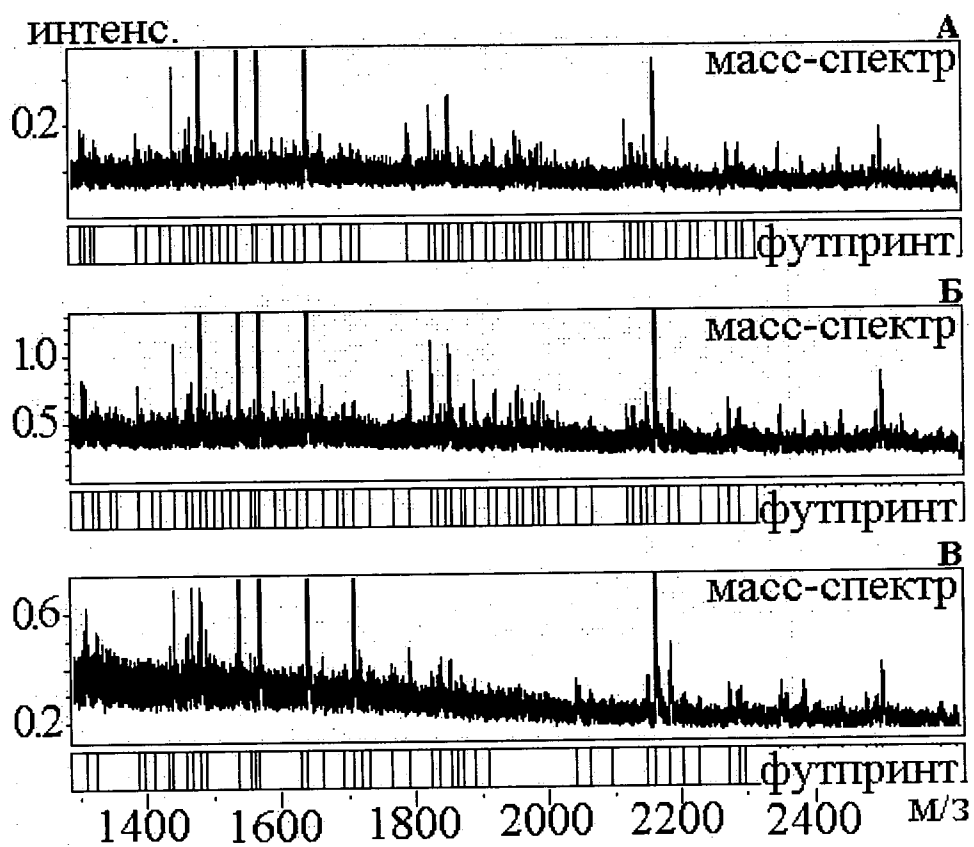
Фиг. 1

2/3



Фиг. 2

3/3



Фиг. 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/RU 2007/000571

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 30/72 (2006.01)

C012Q 1/25 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 30/72, C12Q 1/25

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03025565 A (CAPRION PHARMACEUTICALS INC) 27.03.2003, claims, examples 1-4	1-8
A	US 6861234 A (MANNKIND CORPORATION) 01.03.2005, c.9	1-8
A	SU 944580 A (KIROVSKY NAUCHNOOISSLEDOVATELSKY INSTITUT PERELIVANIYA KROVI) 23. 07.1982, claims, page 1	1-8
A	WO 2006051405 A (UNIV CAMBRIDGE TECH et al.) 18.05.2006, claims, examples	1-8
A	KR 20060015604 A (MONOQUANT PTY LTD) 17.02.2006, the claims, example 1	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 January 2008

Date of mailing of the international search report

13 March 2008

Name and mailing address of the ISA/

RU

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

ОТЧЕТ О МЕЖДУНАРОДНОМ ПОИСКЕ

Международная заявка №
PCT/RU 2007/000571

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ: **G01N 30/72 (2006.01)**
C12Q 1/25 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации МПК

В. ОБЛАСТИ ПОИСКА:

Проверенный минимум документации (система классификации с индексами классификации):
G01N 30/72, C12Q 1/25

Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в поисковые подборки:

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины):

С. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ:

Категория*	Цитируемые документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	WO 03025565 A (CAPRION PHARMACEUTICALS INC) 27.03.2003, формула, примеры 1-4	1-8
A	US 6861234 A (MANNKIND CORPORATION) 01.03.2005, с.9	1-8
A	SU 944580 A (КИРОВСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПЕРЕЛИВАНИЯ КРОВИ) 23. 07.1982, формула, с.1	1-8
A	WO 2006051405 A (UNIV CAMBRIDGE TECH et al.) 18.05.2006, формула, примеры	1-8
A	KR 20060015604 A (MONOQUANT PTY LTD) 17.02.2006, формула, пример 1	1-8

☐ последующие документы указаны в продолжении графы С.

☐ данные о патентах-аналогах указаны в приложении

* Особые категории ссылочных документов:

A документ, определяющий общий уровень техники и не считающийся особо релевантным

E более ранняя заявка или патент, но опубликованная на дату международной подачи или после нее

L документ, подвергающийся сомнению притязание (я) на приоритет, или который приводится с целью установления даты публикации другого ссылочного документа, а также в других целях (как указано)

O документ, относящийся к устному раскрытию, использованию, экспонированию и т.д.

P документ, опубликованный до даты международной подачи, но после даты испрашиваемого приоритета

T более поздний документ, опубликованный после даты международной подачи или приоритета, но приведенный для понимания принципа или теории, на которых основывается изобретение

X документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает новизной или изобретательским уровнем, в сравнении с документом, взятым в отдельности

Y документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска; заявленное изобретение не обладает изобретательским уровнем, когда документ взят в сочетании с одним или несколькими документами той же категории, такая комбинация документов очевидна для специалиста

& документ, являющийся патентом-аналогом

Дата действительного завершения международного поиска: 28 января 2008 (28.01.2008)

Дата отправки настоящего отчета о международном поиске: 13 марта 2008 (13.03.2008)

Наименование и адрес ISA/RU

ФГУ ФИПС

РФ, 123995, Москва, Г-59, ГСП-5, Бережковская наб., 30,1

Факс:(499) 243-3337

Уполномоченное лицо:

О. Колонтаевская

Телефон № (495)730-7675

Форма PCT/ISA/210 (второй лист)(апрель 2007)