



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **155352** (13) **U**
(51) МПК (2024.01)**C12N 5/074** (2010.01)**C12N 5/077** (2010.01)**A61K 9/00****A61K 35/28** (2015.01)**A61K 35/51** (2015.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2023 01486	(72) Винахідник(и): Злацька Альона Василівна (UA), Гордієнко Інна Михайлівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 06.04.2023	(73) Володілець (володільці): ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "ГУД ЦЕЛЛС", вул. Івана Крамського, 9, м. Київ, 03115 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 22.02.2024	
(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 21.02.2024, Бюл.№ 8	

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ КОМПЛЕКСНОГО БІОТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОДУКТУ, ЩО МІСТИТЬ ПОЗАКЛІТИННІ ВЕЗИКУЛИ ВІД ТРЬОХ ТИПІВ КЛІТИН-ПРОДУЦЕНТІВ, ДЛЯ ВІДНОВЛЕННЯ ДЕФЕКТІВ М'ЯКИХ ТКАНИН**(57) Реферат:**

Спосіб одержання комплексного біотехнологічного продукту, що містить позаклітинні везикули від трьох типів клітин-продуцентів, для відновлення дефектів м'яких тканин, за яким одержують мезенхімальні стромальні/стовбурові клітин методами механічної та ферментативної обробки чи методом експлантів. Для одержання мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин виконують їх виділення з жирової тканини, ліпоаспірату та/або біоптату шкіри, мультипотентних мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин з пупкового канатика та мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня, отриманих із пульпи зуба, волосяного фолікула, біоптату слизової піднебіння. Виконують обробку та ізоляцію одержаних клітин, виконують культивування in vitro з метою експансії МСК ЖТ, МСК ПК та МСК-ПНГ. Здійснюють первинне виділення МСК ЖТ, МСК ПК та МСК-ПНГ ферментативним способом або способом експлантів, застосовуючи додатковий спосіб селекції необхідної популяції клітин МСК-ПНГ поміщенням первинної популяції клітин у фібриновий гель, та їх культивування до необхідної кількості з наступним кріоконсервуванням та/або пасируванням для подальшого виготовлення біотехнологічного безклітинного продукту на основі їх секретому. Створюють майстер-банк отриманих культур клітин шляхом кріоконсервування необхідної кількості клітин на ранніх пасажах, отримують секретом клітин-продуцентів для біотехнологічного продукту, очищують отримане середовище секретому клітин-продуцентів, поєднують безклітинне кондиційне середовище отриманого від культивованих МСК ЖТ, МСК ПК та МСК-ПНГу попередньо визначеній пропорції.

UA 155352 U

Корисна модель належить до галузі біотехнології та медицини, а саме - клітинної терапії, пульмонології, неврології, урології, хірургії, гінекології, стоматології. Спосіб може бути використаний як комплексний засіб для проведення терапії для пригнічення тривалих запальних процесів, відновлення деструктивних змін у тканинах внаслідок механічного, інфекційного пошкодження або вікових змін, подолання післяопераційних ускладнень, відновлення іннервації тканин та органів, регенерації тканини легень, подоланні бронхіальної астми, наслідків перенесеного ковіду-19, хронічного обструктивного запалення легень та ін. патології дихальної системи. Запропонований біотехнологічний продукт застосовується виключно під контролем чи рекомендаціями лікаря-фахівця відповідного профілю шляхом місцевих ін'єкцій, інгаляцій, аплікаційного нанесення та ін.

Аналогами запропонованого способу одержання біотехнологічного продукту на основі екзосом, отриманих від різних типів стовбурових клітин-продуцентів для регенерації пошкоджених м'яких тканин, є:

Винахід [Патент KR 20190028677A, Південна Корея], який захищає спосіб отримання екзосом з підвищеним вмістом факторів росту, що включає культивування стовбурових клітин в середовищі, що включає епітеліальний фактор росту, фактор росту фібробластів або їх комбінацію та саму популяцію очищених екзосом на колонках, як основу фармацевтичної композиції для вирішення проблем шкіри обличчя. Серед стовбурових клітин-продуцентів екзосом в даному патенті описані МСК ПК, МСК ЖТ та МСК кісткового мозку, які перед отриманням кондиційного середовища для виділення екзосом культивують у безсироватковому середовищі ДМЕМ із додаванням рекомбінантних факторів росту. Недоліком даного методу є застосування рекомбінантних факторів росту як ксеногенного елемента, а також спосіб очищення екзосом на колонках, що несе за собою ризик низького виходу очищених екзосом та є придатним підходом для промислового виробництва.

Найближчим аналогом є винахід [Патент US 2017/0121685A1, США], який захищає спосіб отримання екзосом від мезенхімальних стовбурових клітин та саму популяцію очищених екзосом як фармацевтичної композиції для лікування запальних процесів. Отримують екзосоми від культивованих мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини шляхом фільтрації через фільтр пропускною здатністю пор не менше 3 кДа, або шляхом ультрацентрифугування. Щонайменше 20 % отриманої популяції екзосом згідно з патентом характеризується розміром 150-300 нм, молекулярною вагою 3 кДа, експресією маркера тромбоспондин-1 (TSP-1). Даний тип екзосом рекомендовано застосовувати для терапії запальних станів кишечника, хвороби Крона, ревматоїдного артриту]. Недоліком даного методу є використання лише одного типу клітин-продуцентів, що значно обмежуватиме ефективність застосування даного підходу. Описана популяція екзосом в патенті має розміри від 150-300 нм, що не входить в межі визначення екзосом від 50-150 нм. Описаний спосіб очищення екзосом шляхом фільтрації може призводити до втрати позаклітинних везикул меншого діаметра та молекулярної ваги.

В основу корисної моделі поставлено задачу, яка полягає у розробці способу одержання комплексного біотехнологічного продукту із значним вмістом біологічно активних речовин широко спектра дії, для стимуляції ефективного відновлення пошкоджених клітин, перешкоджанню загибелі клітин, індукції власних стовбурових клітин організму до проліферації та заміщення втрачених, вираженої протизапальної та нейропротекторної дій, покращення іннервації та кровопостачання периферичних органів та тканин, та має відповідати низці вимог: безпека, якісний склад, вирішення декілька проблем одночасно, стабільність, доступність.

Поставлену задачу вирішують тим, що спосіб одержання комплексного біотехнологічного продукту, що включає позаклітинні везикули від трьох типів клітин-продуцентів, для відновлення дефектів м'яких тканин, включає етапи, за яким :

одержують мезенхімальні стромальні/стовбурові клітин методами механічної та ферментативної обробки чи методом експлантів,

згідно з корисною моделлю,

для одержання мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин виконують їх виділення з жирової тканини, ліпоаспірату та/або біоптату шкіри, мультипотентних мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин з пупкового канатика та мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня, отриманих із пульпи зуба, волосяного фолікула, біоптату слизової піднебіння,

виконують обробку та ізоляцію одержаних клітин,

виконують культивування in vitro з метою експансії МСК ЖТ, МСК ПК та МСК-ПНГ,

здійснюють первинне виділення МСК ЖТ, МСК ПК та МСК-ПНГ ферментативним способом або способом експлантів, застосовуючи додатковий спосіб селекції необхідної популяції клітин МСК-ПНГ поміщенням первинної популяції клітин у фібриновий гель, та їх культивування до

необхідної кількості з наступним кріоконсервуванням та/або пасируванням для подальшого виготовлення біотехнологічного безклітинного продукту на основі їх секретому, створюють майстер-банк отриманих культур клітин шляхом кріоконсервування необхідної кількості клітин на ранніх пасажах,

5 отримують секретом клітин-продуцентів для біотехнологічного продукту, очищують отримане середовище секретому клітин-продуцентів, поєднують безклітинне кондиційне середовище отриманого від культивованих МСК ЖТ, МСК ПК та МСК-ПНГ у попередньо визначеній пропорції.

10 Корисною моделлю передбачено, що культивування МСК ЖТ та МСК ПК здійснюють у ростовому середовищі α -MEM з 10 % фетальної бичачої сироватки, 10 нг/мл основного фактора росту фібробластів (bFGF), 2мМ стабільного глутаміну та 1 % розчину антибіотика/антимікотика при 37 °C, 5 % CO₂, 5 % O₂ та 95 % вологості в CO₂-інкубаторі.

15 Також запропонованим способом передбачено, що культивування МСК-ПНГ здійснюють у ростовому середовищі α -MEM з 5 % фетальної бичачої сироватки, 5 нг/мл основного фактора росту фібробластів (bFGF), 10 нг/мл епідермального фактора росту (EGF), 1 % інсулін-трансферин-селену, 2 мМ стабільного глутаміну, антибіотиків/антимікотиків на культуральних флаконах з додатковим покриттям желатином/колагеном чи ін. компонентів позаклітинного матриксу.

20 Крім того, у способі враховано, що очищення отриманого кондиційного середовища (секретому) виконують шляхом диференційного центрифугування, ультрацентрифугування та фільтрації через 0,22 мкм нейлоновий фільтр для очищення від клітин, дебрису та апоптотичних тілець.

25 Перевагами наведеного способу є наявність унікального складу продукту, що включає комбінацію позаклітинних везикул, отриманих від культивованих аутологічних/алогенних МСК ЖТ, МСК ПК та МСК-ПНГ, що несуть в собі значну кількість біологічно активних речовин, широкого спектра дії. Одержаний склад дозволяє максимально швидко та всесторонньо відновити пошкодження м'яких тканин, дистрофічно-деструктивні зміни у тканинах, знизити рівень запальних процесів та відновити іннервацію.

30 Запропонована корисна модель пояснюється за допомогою доданих креслень, на яких зображено:

На Фіг. 1 зображена типова морфологія мультипотентних мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин пупкового канатика (А), мультипотентних мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин жирової тканини (Б), мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня (В) в культурі *in vitro*. (фазово-контрастна мікроскопія, масштабний відрізок 100 мкм).

35 На Фіг. 2 наведена кількісна характеристика готового біотехнологічного продукту на основі комплексу екзосом, отриманих від різних типів стовбурових клітин, для регенерації пошкоджених м'яких тканин. А - концентрація позаклітинних везикул в розчині готового продукту, результати Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) (NanoSight LM10), Б - розподіл позаклітинних везикул у розчині за розміром, результати Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).

40 Здійснюють первинне виділення мультипотентних мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин з жирової тканини, ліпоаспірату та/або біоптату шкіри, мультипотентних мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин з пупкового канатика та мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня отриманих із пульпи зуба, волосяного фолікула, біоптату слизової піднебіння, різними методами механічної та ферментативної обробки чи методом експлантів. Біологічний матеріал отримують за добровільною згодою донора, після проходження всіх необхідних інфекційних скринінгів та збору анамнезу в умовах операційної/маніпуляційної під місцевою (локальною) або системною анестезією. Транспортування анатомічного матеріалу/біоптату з операційної/маніпуляційної в біотехнологічну лабораторію здійснюють на холоді (+4...+8 °C) в спеціальних термоізоляційних контейнерах протягом не більше 72 годин з моменту забору матеріалу. Ізоляція клітин проводять після обробки анатомічного матеріалу/біоптату механічним способом, ферментативним або їх комбінацією, наприклад біоптат піддають дисоціації за допомогою суміші розчинів протеолітичних ферментів, наприклад, 0,2 % колагенази ІА, пронази, диспази, ДНКазі і/або їх суміші при температурі +4...+40 °C і, можливо, при постійному помішуванні на шейкері-інкубаторі при 1-1000 об./хв., протягом необхідного часу (від 5 хв до 24 годин).

Культивування *in vitro* для експансії МСК ЖТ, МСК ПК та МСК-ПНГ.

Таблиця

Імунофенотип мультипотентних мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин жирової тканини, пупкового канатика та мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня після експансії в культурі *in vitro*

	CD73	CD90	CD105	CD34	CD45	HLA-DR	Nestin
МСК ЖТ	99,23	96,20	94,85	0,01	0,21	0,05	-
МСК ПК	99,35	99,17	98,77	0,03	0,01	0,50	-
МСК-ПНГ	99,70	98,19	97,34	0,15	0,18	0,15	99,62
Норма	>80	>80	>80	0-40	<5	<5	>8

Примітки: МСК ЖТ - мультипотентні мезенхімальні стромальні/стовбурові клітини жирової тканини, МСК ПК - мультипотентні мезенхімальні стромальні/стовбурові клітини пупкового канатика, МСК-ПНГ - мультипотентні мезенхімальні стромальні/стовбурові клітини-похідні нервового гребеня.

Здійснюють первинне виділення МСК ЖТ, МСК ПК та МСК-ПНГ ферментативним способом або способом експлантів, застосовуючи додатковий спосіб селекції необхідної популяції клітин МСК-ПНГ поміщенням первинної популяції клітин у фібриновий гель, та їх культивування до необхідної кількості з наступним кріоконсервуванням та/або пасируванням для подальшого виготовлення біотехнологічного безклітинного продукту на основі їх секретому. Культивування МСК ЖТ та МСК ПК здійснюють у ростовому середовищі α -MEM з 10 % фетальної бичачої сироватки, 10 нг/мл основного фактора росту фібробластів (bFGF), 2 mM стабільного глутаміну та 1 % розчину антибіотика/антимікотика при 37 °C, 5 % CO₂, 5 % O₂ та 95 % вологості в CO₂-інкубаторі. Культивування МСК-ПНГ здійснюють у ростовому середовищі α -MEM з 5 % фетальної бичачої сироватки, 5 нг/мл основного фактора росту фібробластів (bFGF), 10 нг/мл епідермального фактора росту (EGF), 1 % інсулін-трансферин-селену, 2 mM стабільного глутаміну, антибіотиків/антимікотиків на культуральних флаконах з додатковим покриттям желатином/колагеном чи ін. компонентів позаклітинного матриксу.

Аналіз отриманих культур МСК ЖТ, МСК ПК та МСК-ПНГ на відповідність критеріїв визначення, а саме фібробластоподібна морфологія, здатність до формування колоній (колонієутворююча здатність КУО, кожен тип клітин висівають на культуральний пластик з розрахунку 1 клітина на 3-5 см² та культивують в ростовому середовищі з 20 % фетальної бичачої сироватки протягом 14 днів з наступною фіксацією 95 % етанолу, фарбуванням за Романовським-Гімзе, аналізом), здатність до направленої трилінійної диференціації, відповідним фенотипом: наявність більше 85 % клітин в популяції позитивних за маркерами CD105, CD90, CD73 (додатково нестин для МСК-ПНГ) та не більш ніж 3 % клітин несли на поверхні маркери CD34, CD45, HLA-Dr. Проведення інфекційного скринінгу отриманих культур на можливість контамінації мікоплазмою та ін. інфекційними агентами (Фіг. 1, таблиця).

Створення майстер-банку отриманих культур клітин шляхом кріоконсервування необхідної кількості клітин на ранніх пасажах.

Отримання секретому клітин-продуцентів для біотехнологічного продукту. Здійснюють нарощення необхідної кількості клітин-продуцентів. Засів в кількості 10⁶ клітин на культуральний флакон площею 175 см² або мультифлакон площею від 525 см², культивування у ростовому середовищі до досягнення 70-90 % конфлуентності, після чого здійснюють заміну ростового середовища на безсироваткове при подальшому культивуванні протягом 24-72 годин.

Очищення отриманого кондиційного середовища (секретому) шляхом диференційного центрифугування, ультрацентрифугування та фільтрації через 0,22 мкм нейлоновий фільтр для очищення від клітин, дебрису та апоптотичних тілець.

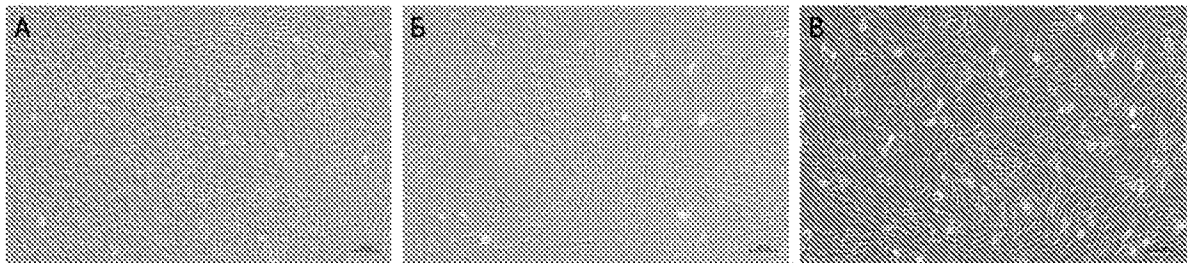
Поєднання безклітинного кондиційного середовища отриманого від культивованих МСК ЖТ, МСК ПК та МСК-ПНГ у певному співвідношенні (від 1:1 до 10:1 і т.д.), фасування у стерильний флакон об'ємом від 1-10 мл та наступним аналізом отриманої партії продукту на предмет кількісного складу (визначення концентрації та розміру наявних позаклітинних везикул на спеціально розробленому для аналізу наночастинок приладі NanoSight) та загального вмісту білка доступними колориметричними та спектрофотометричними методами. (Фіг. 2)

Готовий біотехнологічний безклітинний продукт, що містить позаклітинні везикули, в тому числі і екзосоми, від трьох типів стовбурових клітин, МСК ЖТ, МСК ПК та МСК-ПНГ, для місцевого застосування з метою регенерації пошкоджених м'яких тканин, зняття запалення,

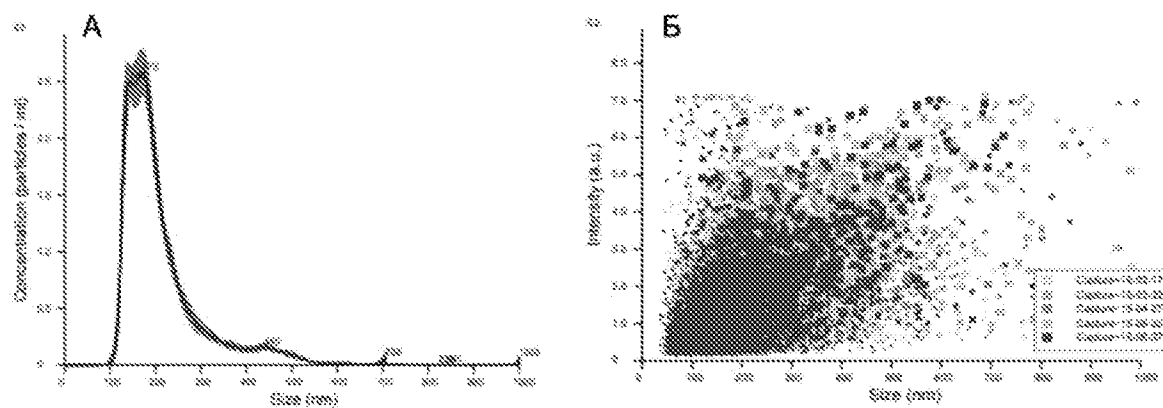
відновлення іннервації, являє собою стерильний прозорий розчин об'ємом від 1 мл, без додавання консервантів, з концентрацією позаклітинних везикул щонайменше 1×10^9 /мл. Продукт стабільний протягом 6 місяців за умови зберігання при -20°C та протягом 14 діб при $+4...+6^\circ\text{C}$. Після відкриття флакона продукт зберігати при $+4...+6^\circ\text{C}$ не більше однієї доби. Не допускати повторних циклів заморозки/розморозки. Продукт транспортують на холоді при $+4...+8^\circ\text{C}$ або в сухому льоді для недопускання розморозки попередньо замороженого продукту.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб одержання комплексного біотехнологічного продукту, що містить позаклітинні везикули від трьох типів клітин-продуцентів, для відновлення дефектів м'яких тканин, за яким одержують мезенхімальні стромальні/стовбурові клітини методами механічної та ферментативної обробки чи методом експлантів, який **відрізняється** тим, що для одержання мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин виконують їх виділення з жирової тканини, ліпоаспірату та/або біоптату шкіри, мультипотентних мезенхімальних стромальних/стовбурових клітин з пупкового канатика та мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня, отриманих із пульпи зуба, волосяного фолікула, біоптату слизової піднебіння, виконують обробку та ізоляцію одержаних клітин, виконують культивування *in vitro* для експансії МСК ЖТ, МСК ПК та МСК-ПНГ, здійснюють первинне виділення МСК ЖТ, МСК ПК та МСК-ПНГ ферментативним способом або способом експлантів, застосовуючи додатковий спосіб селекції необхідної популяції клітин МСК-ПНГ поміщенням первинної популяції клітин у фібриновий гель, та їх культивування до необхідної кількості з наступним кріоконсервуванням та/або пасируванням для подальшого виготовлення біотехнологічного безклітинного продукту на основі їх секретому, створюють майстер-банк отриманих культур клітин шляхом кріоконсервування необхідної кількості клітин на ранніх пасажах, отримують секретом клітин-продуцентів для біотехнологічного продукту, очищують отримане середовище секретому клітин-продуцентів, поєднують безклітинне кондиційне середовище отриманого від культивованих МСК ЖТ, МСК ПК та МСК-ПНГ у попередньо визначеній пропорції.
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що культивування МСК ЖТ та МСК ПК здійснюють у ростовому середовищі α -MEM з 10 % фетальної бичачої сироватки, 10 нг/мл основного фактора росту фібробластів (bFGF), 2mM стабільного глутаміну та 1 % розчину антибіотика/антимікотика при 37°C , 5 % CO_2 , 5 % O_2 та 95 % вологості в CO_2 -інкубаторі.
3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що культивування МСК-ПНГ здійснюють у ростовому середовищі α -MEM з 5 % фетальної бичачої сироватки, 5 нг/мл основного фактора росту фібробластів (bFGF), 10 нг/мл епідермального фактора росту (EGF), 1 % інсулін-трансферин-селену, 2 mM стабільного глутаміну, антибіотиків/антимікотиків на культуральних флаконах з додатковим покриттям желатином/колагеном чи інших компонентів позаклітинного матриксу.
4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що очищення отриманого секретому виконують шляхом диференційного центрифугування, ультрацентрифугування та фільтрації через 0,22 мкм нейлоновий фільтр для очищення від клітин, дебрису та апоптотичних тілець.



Фіг. 1.



Фіг 2.