

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) 025532

(13) B1

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента

**2017.01.30**

**(51)** Int. Cl. C12N 5/00 (2006.01)

**(21)** Номер заявки

**201000425**

**(22)** Дата подачи заявки

**2008.10.03**

**(54) СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ КЛЕТОК-ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ ИЗ ЧЕЛОВЕЧЕСКОЙ ПУПОВИНЫ**

**(31)** 103843

**(32)** 2007.10.04

**(33)** РТ

**(43)** 2010.10.29

**(86)** PCT/IB2008/054067

**(87)** WO 2009/044379 2009.04.09

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:

**ЛАБОРАТОРИО МЕДИНФАР-  
ПРОДУТОС ФАРМАСЕУТИКОС,  
С.А. (РТ)**

**(72)** Изобретатель:

**Ганшаш Соарес Рита Изабел,  
Баптиста Коэльо Мария Констанса,  
Силва Сантош Жоржи Мигел,  
Мартинш Жозе Пауло, Басто Вера  
Александра, Эстилита Монтейро Да  
Круз Педро, Соареш Да Круз Эльдер  
Жуаким (РТ)**

**(74)** Представитель:

**Поликарпов А.В., Борисова Е.Н. (RU)**

**(56)** WEISS MARK L ET AL.: "Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease." STEM CELLS (DAYTON, OHIO) MAR 2006, vol. 24, no. 3, March 2006 (2006-03), pages 781-792, XP002463574, ISSN: 1066-5099, page 782, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 2, page 785, left-hand column, last paragraph, page 787, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column

CAN ALP ET AL.: "Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells." STEM CELLS (DAYTON, OHIO) NOV 2007, vol. 25, no. 11, 9 August 2007 (2007-08-09), pages 2886-2895, XP002521370, ISSN: 1549-4918, Retrieved from the Internet: URL: <http://stemcells.alphamedpress.org/cgi/reprint/25/11/2886.pdf> cited in the application published online page 2892, right-hand column, paragraph 3 - page 2893, right-hand column, paragraph 2

LU LU-LU ET AL.: "Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials", HAEMATOLOGICA, FONDAZIONE FERRATA STORTI, ROME, IT, vol. 91, no. 8, 1 August 2006 (2006-08-01), pages 1017-1026, XP009110905, ISSN: 0390-6078, page 1024, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1, page 1025, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1

B1

025532

**(57)** Настоящее изобретение относится к оптимизированному и упрощенному способу выделения и консервации клеток-предшественников из человеческой пуповины. Помимо воспроизводимости и 100%-ной надежности в показателях числа переработанных проб данный способ дает в результате большое и определенное число клеток-предшественников, являющихся в своем большинстве клетками, полученными после одной фазы прикрепления и роста/размножения ex vivo (таким образом дающей фенотип клетки), за более короткий период, чем это было описано ранее в предшествующем уровне техники. При помощи этого способа за 9 суток после непосредственного замораживания фракции клеток и после одной фазы роста/размножения большинства клеток ex vivo (конец P0) можно получить примерно  $8,6(\pm 0,1) \times 10^5$  клеток/г переработанной пуповины. В свою очередь, характеристики клеток позволяют, например, через 35 суток получить в среднем  $7,7 \times 10^{15}$  клеток с фенотипом предшественников из 100% переработанных проб пуповины. Данный способ, поскольку он является простым, функциональным и на 100% надежным, можно осуществлять согласно правилам организации производства и контроля качества лекарственных средств (GMP) в лабораториях, специализирующихся на клеточной терапии человека. Кроме того, данный способ имеет применения в фармацевтических, косметических и биотехнологических областях.

025532  
B1

### Техническая область изобретения

Целью настоящего изобретения является оптимизированный и упрощенный способ выделения и консервации клеток-предшественников из матрикса человеческой пуповины.

Под "клеткой-предшественником" в настоящем изобретении подразумевается тип клетки, способной прикрепляться и расти/размножаться на поверхности в определенной ростовой среде, где большинство клеток в культуре экспрессирует маркеры клеточной поверхности CD44, CD73, CD90 и CD105, и большинство клеток имеет лишь остаточную экспрессию маркеров клеточной поверхности CD14, CD31, CD34 и CD45, где большинство клеток способно претерпевать вплоть до 18 фаз роста/размножения, сохраняя постоянный коэффициент удвоения приблизительно 1,7/24 ч, постоянную фибробластоподобную морфологию и способность к частичной или окончательной дифференцировке в специализированные клетки, такие как остеобlastы, хондроциты, адипоциты, кардиомиоциты и глиальные/нервные клетки.

Объект настоящего изобретения добавляет к существующему уровню техники способ, который является надежным, обеспечивающим 100%-ную эффективность в отношении обработанных образцов ткани, и более эффективным в отношении числа стволовых клеток, выделенных в расчете на массу пуповины и затраченное время.

Технические инновации, которые представляют собой основу данного изобретения, по существу, состоят в разделении процесса выделения клеток на три независимых фазы выделения клеток и в оптимизации нескольких технических параметров на всем протяжении протокола. Такие параметры, таким образом, были либо не упомянуты, либо не определены в предшествующем уровне техники.

Данный способ трехфазного выделения основан на последовательном выделении диссоциированных клеток из трех разных независимых источников на протяжении процесса выделения.

Фаза 1 - выделение первой совокупности клеток, которые способны прикрепляться к поверхности колбы для культивирования клеток, где проводят реакцию расщепления ткани. Прикрепление происходит сразу после завершения периода инкубации, связанной с расщеплением, причем колбу выдерживают неподвижно в горизонтальном положении в течение периода 30 мин при комнатной температуре и все еще в присутствии раствора для расщепления. Прикрепленные клетки затем инкубируют в условиях культивирования, и они растут и размножаются до тех пор, пока конфлюентность не достигает почти 100%.

Фаза 2 - выделение второй совокупности клеток из супернатанта, который получают в результате центрифугирования раствора для расщепления после Фазы 1. Эти клетки затем инкубируют в условиях культивирования и клетки, способные прикрепляться к поверхности колбы для культивирования клеток, растут и размножаются до тех пор, пока конфлюентность не достигает почти 100%.

Фаза 3 - выделение третьей совокупности клеток из осадка, полученного в результате центрифугирования на Фазе 2. Эти клетки можно непосредственно криоконсервировать без прикрепления, роста и размножения.

Техническими параметрами, оптимизированными на всем протяжении протокола, являются: 1 - тип механической манипуляции и исходное распределение фракций пуповины, 2 - присутствие или отсутствие сгустков крови в сосудах пуповины, 3 - тип ферmenta(ов), отдельное или комбинированное действие и концентрация(ии) ферmenta(ов) в растворе для расщепления, 4 - состав раствора для расщепления, 5 - изменение pH в ходе реакции расщепления, 6 - период/время инкубации, 7 - тип перемешивания (умеренное или энергичное), 8 - тип инкубационной атмосферы (сухая или влажная) и 9 - плотность клеток во время криоконсервации.

Комбинация трехфазного способа для выделения диссоциированных клеток с оптимизацией вышеупомянутых технических аспектов обеспечила способ, более подходящий для применения в клеточной терапии, основанной на введении клеток. Это происходит благодаря надежности данного способа (100%-ная эффективность) и высоким выходам клеток, полученным за относительно короткий период времени. Кроме того, методология криоконсервации также была оптимизирована для того, чтобы максимизировать жизнеспособность клеток для дальнейшего применения.

Посредством вновь разработанного способа можно получать выходы приблизительно  $8,6(\pm 0,1) \times 10^5$  клеток/г переработанной пуповины из 100% образцов переработанной пуповины за девять суток после прямого замораживания фракции клеток и после двух независимых одиночных фаз прикрепления и роста/размножения ex vivo (конец P0) большинства клеток, что является беспрецедентным фактом в свете предшествующего уровня техники. Такая эффективность дает возможность получения из одной пуповины (средняя длина 35 см) в совокупности  $3,0 \times 10^9$  клеток. В свою очередь, характеристики клеток позволяют получать из 100% переработанных фрагментов пуповины, например, за 35 суток (конец P6) в среднем  $7,7 \times 10^{15}$  клеток, используя постоянный инокулум  $5,0 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup>, за 6 пассажей. В итоге такая эффективность дает примерно 56%-ное сокращение времени, необходимого для получения того же самого числа клеток посредством аналогичных протоколов, существующих в предшествующем уровне техники. Согласно тому, что было описано ранее, для того, чтобы получить количества около  $1,0 \times 10^{15}$  клеток с использованием аналогичного исходного инокулума, потребовалось бы минимум 80 суток (Harris et al., 2006; Can and Karahuseyinoglu, 2007).

Данный новый способ, несмотря на то, что он был конкретно разработан для клеточной терапии, также подходит для создания банков клеток, подлежащих применению в протоколах генотерапии, являющихся основой фармацевтических и косметических композиций, для генерации клеток для продукции молекул или молекулярных соединений, для получения клеточных слоев для подложек культуры клеток и для получения линий клеток посредством генетической манипуляции.

#### **Предшествующий уровень техники**

Клетка-предшественник (столовая, эмбриональная, недифференцированная или примитивная) представляет собой тип клетки со способностью к самообновлению в течение значительного периода времени и, прежде всего, со способностью либо к частичной, либо к окончательной дифференцировке в другие типы более специализированных клеток.

Несмотря на огромный потенциал к дифференцировке эмбриональных клеток-предшественников, их применение для исследования и/или терапии является противоречивым и вызывало серьезные этические вопросы и вопросы безопасности. Таким образом, исследование в этой области было сфокусировано на идентификации и оценке альтернативных неэмбриональных стволовых клеток, таких как клетки, полученные из костного мозга, надкостницы, губчатой кости, жировой ткани, синовиальной области, скелетной мышцы, пульпы молочных и постоянных зубов и слизистой обонятельной области (Bartog and Murphy, 2004; Roisen et al., 2001). Уже было продемонстрировано, что клетки, выделенные из этих тканей, имеют способность к дифференцировке, среди прочего, в хондроциты, адипоциты, остеобласты, миобlastы, кардиомиоциты, астроциты и теноциты как *in vitro*, так и *in vivo* (Carvalhal et al., 2007; Majumdar et al., 1998; Pittenger et al., 1999). Такие клетки-предшественники, выделенные из неэмбриональных источников и способные к дифференцировке в негематопoэтические специализированные клетки, происходящие из трех зародышевых листков (эндодермы, мезодермы и эктодермы), называются мезенхимными стволовыми клетками.

Главные ограничения для применения мезенхимных клеток-предшественников возникают во время клинической практики, именно во время сбора клеток. Сбор мезенхимных клеток неизменно включает инвазивные для донора методики, такие как хирургические процедуры, которые (подобно, например, сбору стволовых клеток из костного мозга) даже могут включать общую анестезию. Кроме того, поскольку мезенхимные стволовые клетки являются редкими, конечное число полученных клеток обычно является недостаточным.

В качестве альтернативы, были описаны ткани пуповины как возможные источники клеток-предшественников взрослых (Romanov et al., 2003). Например, известно, что кровь пуповины является богатым источником клеток-предшественников, но, главным образом, гематопoэтической природы (линии крови). Поскольку мезенхимные стволовые клетки присутствуют в крови пуповины в ограниченных количествах, попытки выделить данные клетки из этой ткани привели к некоторому разочарованию, и даже в самых успешных попытках с использованием очень больших количеств крови не была превышена 60%-ная доля успешных попыток относительно общего числа переработанных образцов ткани. И в итоге все еще сохранялись сомнения относительно источника выделенных клеток, то есть, была ли действительно источником клеток или кровь другая эмбриональная ткань (Chul-Wan et al., 2003; Biebackefal., 2004).

В других сообщениях описано выделение мезенхимных стволовых клеток из других составных тканей пуповины, значительно более богатых по мезенхимной природе, чем кровь пуповины. Некоторые примеры этих методик основаны на матриксе пуповины, также известном как вартонов студень (Purchio et al., 1998; Mitchell et al., 2003; Davies et al., 2004; Wang et al., 2006); вене пуповины (Romanov et al., 2003; Auger et al., 2005), артериальных тканях (Kadner et al., 2004); или на других выстилающих тканях, таких как амиотическая мембрана (Phan et al., 2004).

Подробный анализ показывает, что описанные протоколы являются тем или иным образом ограничивающими в отношении природы полученных клеток или скорее неточными в отношении доли успешных попыток и эффективности по числу выделенных клеток. На самом деле ограничивающая природа этих протоколов неизменно приводила к потере фенотипического разнообразия выделенных популяций клеток, главным образом из-за ненеобходимого сосредоточения внимания на конкретных тканях или на географических положениях в структуре пуповины. Кроме того, неизменно сохранялась неопределенность относительно действительного числа стволовых клеток, которое можно было бы получить в итоге.

Таким образом, например, протокол Cell Research Corporation, который основан единственно на амиотической мемbrane как источнике мезенхимных стволовых клеток, дает клетки, уже предрасположенные к эндотелиальной линии (Phan et al., 2004).

Кроме того, ни один из описанных до сих пор способов не продемонстрировал эффективность в единицах числа успешных переработанных образцов ткани для того, чтобы быть достаточно надежным для применения в протоколах клеточной терапии. Другими словами, несмотря на то, что доля успешных попыток выделения мезенхимных клеток из матрикса пуповины выше, чем из крови пуповины, или даже из костного мозга, вплоть до настоящего времени отсутствует способ, который гарантируют 100%-ную долю успешных попыток для выделения в единицах числа переработанных образцов ткани так, чтобы конечный результат был достаточно надежным для применений в клеточной терапии (Deryl & Weiss,

2008).

Кроме того, введение необязательных стадий структурной манипуляции, таких как экстракция сосудов пуповины (Purchio et al., 1998; Mitchell et al., 2003; Davies et al., 2004; Wang et al., 2006) или механическая мацерация (Seyda et al., 2006), делает существующие протоколы сложными для стандартизации и воспроизведения, никогда не гарантируя достаточного числа клеток для применения в клеточной терапии.

Кроме того, избыточное манипулирование с тканью индуцирует дифференцировку клеток, которая является нежелательной, если есть желание сохранить фенотип клеток-предшественников (Gardner et al., 2000; Claes et al., 2002; Cullinane et al., 2003).

Протоколы, основанные на самих пупочных сосудах, также показывают ограничения. Эти протоколы включают сложные экстракции артерий или пупочной вены и ограничивают потенциал дифференцировки мезенхимных стволовых клеток до субэндотелиальных и эндотелиальных линий (Romanov et al., 2003; Auger et al., 2005; Kadner et al., 2004; Sarugaser et al., 2005).

Наконец, не менее сложными являются протоколы, которые основываются на вартоновом студне (WJ) в качестве источника мезенхимных стволовых клеток. Эти сообщения не являются согласующими, также способствуя отсутствию определения и критериев прикладных методологий. Таким образом, в то время как Purchio et al., 1998; Mitchell et al., 2003 и Wang et al., 2006 проводят сложную и едва ли воспроизводимую исходную экстракцию сосудов, перерабатывая остающуюся ткань для выделения клеток, Davies et al., 2004 также удаляют сосуды пуповины, но, вместо использования остающейся ткани для выделения клеток, они перерабатывают ткань, все еще прикрепленную вокруг сосудов, отбрасывая первую. Тем не менее, все авторы единодушны в утверждении о том, что их протоколы основаны исключительно на WJ (Purchio et al., 1998; Mitchell et al., 2003; Davies et al., 2004; Wang et al., 2006). Расхождение между этими протоколами не оправдано, и избыточная манипуляция с существующими тканями в любом из этих двух протоколов подрывает желательные эффексы на поддержание фенотипа предшественника и, вследствие этого, в целом ставит под угрозу применение выделенных клеток-предшественников в службах по выделению и криоконсервации для населения.

В предшествующем уровне техники явно отсутствует способ, основанный на простом, надежном и определенном протоколе, таком, что его можно воспроизвести с гарантией действенности и эффективности. Как только мезенхимные стволовые клетки становятся применимыми в клеточной терапии, необходимо убедиться в отношении пациента в том, что способ, используемый для выделения клеток, даст и необходимое качество, и количество данного терапевтического агента. Принимая во внимание отсутствие в предшествующем уровне техники гарантит, представленных описанными до настоящего времени протоколами, предусматривается, что настоящее изобретение удовлетворит потребность в способе с приведенными выше характеристиками.

#### **Общее описание изобретения**

Подразумевается, что настоящее изобретение добавит к существующему уровню техники способ селекции для выделения из человеческой пуповины клеток-предшественников со специфическими мезенхимными характеристиками, основанный на стратегии селекции через специфическое расщепление коллагена, вещества-основы матрикса пуповины (вартонова студня).

Высвобождение клеток происходит без механического манипулирования с исходной тканью, тем самым обеспечивая сохранение интактности исходного фенотипа и поддержание жизнеспособности клеток. Под "механическим манипулированием" в настоящем изобретении подразумевается мацерация и/или измельчение любых тканей в субамниотической, межсосудистой и околососудистой областях пуповины; и/или экстракция сосудов пуповины; и/или любое другое механическое воздействие, которое может затрагивать стабильность и, вследствие этого, фенотип и жизнеспособность клеток, присутствующих в матриксе пуповины (вартонова студня).

Помимо отсутствия механического манипулирования, введение трех независимых фаз для выделения диссоциировавших клеток и оптимизация нескольких технических параметров на протяжении данного процесса делают способ простым, функциональным, на 100% надежным в показателях эффективности и высокоэффективным в единицах числа полученных клеток относительно времени. В результате данный способ можно применять в службах, занимающихся клеточной терапией, а также для криоконсервации мезенхимных стволовых клеток, происходящей в результате выделения для будущего аутологичного применения.

Результат введения последовательного трехфазного способа выделения клеток и оптимизации индивидуальных технических характеристик, до сих пор либо не упомянутый, либо описанный неопределенным образом в предшествующем уровне техники, оценили согласно общим выходам клеток, полученным после введения каждой переменной. Общие выходы клеток соответствуют малой доле клеток, которая непосредственно замораживается в парообразной фазе жидкого азота без подвергания фазе прикрепления и роста/размножения, плюс две совокупности клеток, выделенные ранее из первой фазы прикрепления/селекции сразу после расщепления ткани, и из второй фазы прикрепления/селекции сразу после центрифугирования продукта расщепления. Обе этих совокупности подвергают одной фазе прикрепления и роста/размножения и криоконсервируют, как только соответствующие культуры достигают мак-

симальной конфлюентности, до какого-либо пассажа (конец Р0).

Под "пассажем (Р)" в настоящем изобретении подразумевается повторный посев, которому предшествует трипсинизация прикрепленных клеток, после того как прикрепленные клетки достигли конфлюентности (плотности клеток) почти 100% на ростовой поверхности из-за их роста/размножения в определенной ростовой среде так, чтобы одновременно увеличить поверхность для прикрепления и роста, а также общий объем ростовой среды для того, чтобы инициировать новую фазу роста/размножения.

Под "максимальной конфлюентностью" в настоящем изобретении подразумевается поверхность для роста культуральной подложки, однородно покрытая одним слоем клеток.

Тремя последовательными фазами выделения, составляющими данный трехфазный способ, являются:

Фаза 1 - выделение первой совокупности клеток, которые способны прикрепляться к поверхности колбы для культивирования клеток, где проводят реакцию расщепления ткани, все еще в присутствии раствора для расщепления.

Фаза 2 - выделение второй совокупности клеток, полученной в результате центрифугирования раствора для расщепления, которые способны к прикреплению к поверхности другой колбы для культивирования клеток в растворе, состоящем из супернатанта и культуральной среды.

Фаза 3 - выделение третьей совокупности клеток из осадка, образующегося в результате центрифугирования в Фазе 2. Эти клетки непосредственно криоконсервируют без прикрепления и роста/размножения.

В свою очередь, оптимизированными техническими параметрами являются:

1 - размер исходных фрагментов ткани, подлежащих использованию в реакции расщепления, поддержание постоянной доли массы ткани (г), площади поверхности дна колбы для расщепления ( $\text{см}^2$ ), объема для расщепления (мл) и общего объема сосуда (мл), равным примерно 1:2:2:37, учитывая, что фрагмент человеческой пуповины длиной 1 см весит примерно 1 г. После удаления амниотической мембраны тестировали несколько способов фракционирования: низкое (фрагменты 5 см); среднее (фрагменты 2,5 см); высокое (0,3 см отрезки) и измельченная ткань. Все виды фракционирования проводили с помощью скальпеля и образцы перерабатывали с использованием точно тех же самых условий. Установили, что наилучшие выходы в отношении общего числа клеток в конце Р0/массу пуповины/время получали при использовании фрагментов 2,5 см.

2 - присутствие или отсутствие сгустков крови в сосудах ткани (1 вена и 2 артерии): известно, что лизис эритроцитов является токсичным, снижающим жизнеспособность клеток *in vitro*. Поэтому сравнивали выходы клеток при проведении расщепления в присутствии или в отсутствие сгустков крови. В последнем случае использовали скальпель для осуществления продольных разрезов в кровеносных сосудах для получения отверстия, из которого могли бы быть удалены сгустки. Установили, что сгустки крови имели отрицательный эффект на общие выходы клеток.

3 - природа ферmenta(ов), концентрация и индивидуальное или комбинированное действие ферментов, используемых на стадии расщепления ткани: тестировали непосредственное прикрепление клеток к колбе для культивирования в присутствии культуральной среды без расщепления и, следовательно, в отсутствие ферментов; и диссоциацию ткани посредством одного фермента: 0,075% (мас./об.) коллагеназы II или 2,0% (мас./об.) проназы. Поскольку применение одной коллагеназы II было наиболее эффективным подходом, этот фермент затем объединяли с другими ферментами, конкретно с трипсином 0,125% (мас./об.) (в присутствии или в отсутствие EDTA (этилендиаминететрауксусная кислота, 0,260 mM), с одной гиалуронидазой 0,5% (мас./об.) и с гиалуронидазой 0,5% (мас./об.), объединенной с проназой 2,0% (мас./об.). Наилучшие выходы в отношении общего числа клеток в конце Р0/массу пуповины/время были получены посредством объединенного действия коллагеназы II 0,075% (мас./об.) с трипсином 0,125% (мас./об.). Кроме того, когда концентрацию коллагеназы II изменяли (0,0375, 0,075 и 0,15% мас./об.), поддерживая концентрацию трипсина равной 0,125% (мас./об.), в присутствии 0,260 mM EDTA, подтвердили, что концентрация коллагеназы II 0,075% (мас./об.) давала наилучшие результаты при поддержании на постоянном уровне ранее оптимизированных условий.

4 - состав раствора для расщепления: тестировали несколько составов ферментативного раствора для расщепления, а именно: Alpha-Mem, дополненный 20% FBS (фетальная телячья сыворотка) и 1% пенициллин/стрептомицин; физиологический буферный раствор, например, HBSS (балансированный солевой раствор Хэнкса), дополненный EDTA, более конкретно: 186 мг/мл  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 400 мг/мл KCl, 60 мг/мл  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 200 мг/мл  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 8000 мг/мл NaCl, 350 мг/мл  $\text{NaHCO}_3$ , 90 мг/мл  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1000 мг/мл глюкозы и 76 мг/мл (0,260 mM) EDTA; приведенный ранее раствор HBSS, дополненный 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ; 25 mM HEPES буфер, дополненный 5 mM  $\text{CaCl}_2$ . Физиологический буферный раствор (HBSS), дополненный 0,260 mM EDTA, давал наилучшие выходы.

5 - мониторинг изменения pH в ходе реакции расщепления: pH отслеживали на протяжении процесса расщепления, и заметили подкисление среды. В среднем, при использовании комбинированного действия коллагеназы II 0,075% (мас./об.) с трипсином 0,125% (мас./об.) в солевом растворе Хэнкса (HBSS), дополненном 0,260 mM EDTA, исходный pH составлял 7,2, снижаясь до 6,4 после 4 ч инкубации и до 5,9

после 16 ч. Подкисление среды может объяснить отсутствие эффективности при выделении клеток после длительных периодов инкубации (16 ч). Несмотря на то, что после длительных периодов инкубации наблюдаются более полные расщепления, подкисление среды становится вредным для жизнеспособности клеток. Следовательно, pH раствора представляет собой параметр, который следует принимать во внимание при планировании периодов инкубации, и он никогда не должен быть ниже 6,4, когда он становится вредным для эффективности способа при определении подсчетом жизнеспособных выделенных клеток. Несмотря на то, что после 16 ч наблюдали более полные расщепления, обнаружили, что более длительные периоды имели отрицательное влияние на жизнеспособность клеток и приводили к значительному подкислению среды.

6 - период/время инкубации для реакции расщепления: тестировали несколько периодов инкубации (2, 4, 6 и 16 ч). Заключили, что инкубация 4 ч давала наилучшие выходы.

7 - тип перемешивания (умеренное или энергичное) на протяжении периода инкубации реакции расщепления: инкубацию проводили на водяной бане с орбитальным перемешиванием либо с умеренной, либо с интенсивной скоростью колебаний, составляющей 100 колебаний в минуту (кол./мин) и 140 колебаний в минуту (кол./мин) соответственно. Умеренное перемешивание 100 кол./мин приводило к лучшим результатам в показателях выхода клеток.

8 - атмосфера инкубации ферментативного расщепления (сухая или влажная): инкубацию проводили при 37°C в двух разных средах: влажной и сухой. Для этого теста образцы ткани параллельно перерабатывали либо в погруженном орбитальном шейкере, где теплообмен происходил как через воду, так и через насыщенный воздух, либо в сухой камере, где теплообмен происходил через сухой воздух. Инкубация в сухой камере давала лучшие выходы клеток.

9 - эффект плотности клеток в эффективности криоконсервации клеток после того, как они были подвергнуты одной фазе прикрепления и роста/размножения: 1 мл клеточных суспензий замораживали в конце Р0 в парообразной фазе жидкого азота при разных плотностях (клеток/мл) в растворе, состоящем из 10% диметилсульфоксида (DMSO) и 90% фетальной телячей сыворотки (FBS). Жизнеспособность клеток после размораживания (жизнеспособные клетки/общее число клеток) и выход клеток (жизнеспособные клетки, подсчитанные после размораживания/жизнеспособные клетки, подсчитанные до криоконсервации) определяли для каждого (набора) условий. Полученные результаты показали, что плотность клеток  $3 \times 10^6$  клеток/мл с наибольшей вероятностью обеспечивает должные сохранность и выход жизнеспособных клеток после криоконсервации при тестируемых условиях.

В общем, и принимая во внимание описанные выше оптимизации, данное изобретение основано на способе селекции для выделения клеток-предшественников из человеческой пуповины, где из каждой пуповины устраняется кровь, и она транспортируется в лабораторию в физиологическом буферном растворе, содержащем глюкозу и антибиотики, всегда в стерильной среде, предпочтительно при комнатной температуре, если переработка производится в пределах 48 ч. Для более длительных периодов хранения целесообразна температура от 2 до 8°C.

Следующие стадии, включающие переработку пуповины и выделение клеток-предшественников, проводят в ламинаре с вертикальным током при стерильных условиях.

Во-первых, амниотическую мембрану, которая представляет собой выстилающую структуру, которая находилась в контакте с воздухом во время сбора ткани, и, таким образом, является более чувствительной к микробному загрязнению, снимают, и пуповину промывают новым солевым раствором.

В общем, для того, чтобы выделить желательные клетки-предшественники, данный способ начинают с фрагментов желательного размера, полученных в результате оптимизированного фракционирования ткани, которое не включает механическое манипулирование с тканями, включая какую-либо экстракцию внутренних структур органа, за исключением сгустков крови в сосудах пуповины, при необходимости.

Высвобождение клеток из пуповины стимулируют ферментативным расщеплением, направленным на матрикс пуповины, соблюдая установленное пропорциональное соотношение между массой ткани (г), поверхностью колбы для расщепления, в которой заключена ткань ( $\text{cm}^2$ ), объемом раствора для расщепления (мл) и общим объемом колбы для расщепления (мл), составляющее приблизительно 1:2:2:37, принимая во внимание то, что фрагмент пуповины длиной 1 см имеет массу в среднем 1 г.

Для того чтобы приступить к ферментативному расщеплению, используют специфическую комбинацию ферментов в специфических концентрациях в растворе с определенным составом на протяжении периода инкубации при конкретном минимальном pH и равным образом определенных типа встряхивания и инкубационной атмосфере.

Выделение диссоциированных клеток происходит за три фазы, где в первой фазе выделяют совокупность клеток, которые способны прикрепляться к поверхности колбы для культивирования клеток, в которой проводят реакцию расщепления ткани. Прикрепление происходит сразу после завершения периода инкубации для расщепления, причем колба стоит неподвижно в

горизонтальном положении в течение периода времени от 10 до 120 мин, предпочтительно 30 мин, при комнатной температуре. Во второй фазе выделяют новую совокупность клеток из супернатанта, который образуется в результате центрифугирования раствора для расщепления после Фазы 1. Как в фазе

1, так и в фазе 2 клетки инкубируют в культуральных условиях, и, как только они приобретают способность прикрепляться к поверхности колбы для культивирования клеток, подвергают одной фазе роста/размножения, пока конфлюентность не достигает примерно 100%. Наконец, в Фазе 3 совокупность клеток выделяют из осадка, образующегося в результате центрифугирования в Фазе 2, и непосредственно криоконсервируют без подвергания какому-либо циклу прикрепления и роста/размножения.

Последовательное выделение клеток и все другие оптимизированные факторы, описанные ранее, были оптимизированы так, чтобы данный способ имел 100% действенность и максимальную эффективность в показателях числа выбранных и выделенных клеток. В свою очередь, полученную популяцию клеток можно идентифицировать по клеткам, способным прикрепляться и расти/размножаться на поверхности и в определенной ростовой среде, где большинство клеток в культуре экспрессируют маркеры клеточной поверхности CD44, CD73, CD90 и CD105, и большинство клеток представляют лишь остаточную экспрессию маркеров клеточной поверхности CD14, CD31, CD34 и CD45, где большинство клеток способны проходить через вплоть до 18 фаз роста/размножения, сохраняя постоянный коэффициент удвоения приблизительно 1,7/24 ч, постоянную фибробластоподобную морфологию и способность к частичной или окончательной дифференцировке в специализированные клетки, такие как остеобlastы, хондроциты, адипоциты, кардиомиоциты и глиальные клетки.

Кроме того, в настоящем изобретении рассматривается оптимизация плотности клеток (число клеток/объем) для криоконсервации клеток, которые проходят через цикл прикрепления и роста/размножения, с целью максимизации эффективности в показателях жизнеспособности клеток для будущего применения.

Посредством данного нового способа с использованием каждого образца пуповины после непосредственного замораживания клеточной фракции и после двух независимых фаз прикрепления и роста/размножения *ex vivo* (конец Р0) за девять суток можно получить выходы, составляющие примерно  $8,6(\pm 0,1) \times 10^5$  клеток/грамм пуповины, что является беспрецедентным фактом в свете предшествующего уровня техники. Такая эффективность дает возможность получения из одной пуповины (средняя длина после сбора 35 см, приблизительно 35 г) всего  $3,0 \times 10^9$  клеток. В свою очередь и поскольку выделенные мезенхимные стволовые клетки типично имеют коэффициент удвоения 1,7/24 ч, с использованием постоянного инокулума  $5,0 \times 10^5$  клеток/ $\text{cm}^2$  на протяжении 7 циклов (6 пассажей, Р6) прикрепления и роста/размножения в колбе для культивирования клеток с ростовой поверхностью  $175 \text{ cm}^2$  за 35 суток можно получить в среднем  $7,7 \times 10^{15}$  клеток. Это дает 56%-ный выигрыш во времени, необходимом для достижения того же самого количества клеток с использованием аналогичных протоколов, описанных в предшествующем уровне техники, где для того, чтобы достичь того же самого числа клеток с использованием того же самого постоянного исходного инокулума  $5,0 \times 10^5$  клеток/ $\text{cm}^2$ , потребовалось бы 80 суток (Harris et al., 2006; Can and Karahuseyinoglu, 2007).

Несмотря на то, что данный новый способ был разработан главным образом для применения в протоколах клеточной терапии, он также подходит для других целей, таких как создание банков клеток, протоколы генотерапии, фармакологические и косметические композиции, продукция молекул или молекулярных соединений, продукция клеточных слоев для подложки культуры клеток и для получения линий клеток посредством генетической манипуляции.

#### **Краткое описание графических материалов**

Фиг. 1 - результаты проточной цитометрии с клетками, происходящими из матрикса пуповины. Клетки подвергали иммуномечению с использованием антител против CD44, связанных с РЕ или FITC (97% позитивных клеток), CD73 (99% позитивных клеток), CD90 (97% позитивных клеток) и CD105 (95% позитивных клеток), всех позитивных маркеров мезенхимных клеток стромы.

Фиг. 2 - результаты проточной цитометрии с клетками, происходящими из матрикса пуповины. Клетки подвергали иммуномечению с использованием антител против антигенов, известных как негативные маркеры мезенхимной линии, связанных с РЕ или FITC: CD14, моноцитная линия (менее 1% позитивных клеток), CD34, специфичен для гематopoэтической линии (1,2% позитивных клеток), CD31, эндотелиальный маркер (1% позитивных клеток) и CD45 (1,1% позитивных клеток), панлейкоцитарный маркер.

Фиг. 3 - эффект плотности клеток на эффективность криоконсервации клеток после прикрепления и роста/размножения клеток: А - жизнеспособность после размораживания (жизнеспособные клетки/общее число клеток x 100%) для разных плотностей клеток. Б - выход клеток (жизнеспособные клетки, выделенные после размораживания / исходное число жизнеспособных замороженных клеток). Наилучшие результаты для протестированных условий (1,5 мл стерильные криопробирки, содержащие 1 мл суспензии клеток и 0,5 мл свободного пространства над суспензией) получали с плотностью клеток  $3 \times 10^6$  клеток/мл.

Фиг. 4 - рост *in vitro* размороженных клеток. Наблюдавшийся коэффициент удвоения составлял 1,7/24 ч, аналогично коэффициенту удвоения, наблюдавшемуся для этих клеток до криоконсервации. Конфлюентность 80-90% наблюдали через 36 ч после размораживания (с заменой среды через 24 ч): А - клетки-предшественники через 12 ч после размораживания до замены среды. Б - клетки-

предшественники через 36 ч после размораживания (замену среды проводили через 24 ч). Масштабная полоска: 100 мкм.

Фиг. 5 - дифференцировка выделенных клеток-предшественников в остеобласти, адipoциты и хондроциты. А - клеточная морфология контрольных клеток (недифференцированных клеток) в нормальной ростовой среде. Б - остеогенная дифференцировка: клетки инокулировали в среду для остеогенной дифференцировки и поддерживали в течение 3 недель до окрашивания щелочной фосфатазой. В - адипогенная дифференцировка: среду для адипогенной дифференцировки добавляли в полностью конфлюентные культуры клеток и клетки поддерживали в течение 3 недель до окрашивания красным масляным О (Oil-O-red). Г - хондрогенная дифференцировка: клетки ресуспендировали и поддерживали в центрифужной пробирке в среде для хондрогенной дифференцировки в течение 4 недель. Затем клетки окрашивали альциановым синим и гематоксилином. Масштабная полоска: 100 мкм.

Фиг. 6 - дифференцировка выделенных клеток-предшественников в кардиомиоциты. А - клеточная морфология контрольных клеток (недифференцированных клеток) в нормальной ростовой среде, Alpha-Mem, дополненной 10% FBS и 1% пенициллин/стрептомицин. Б - клеточная морфология после кардиомиогенной дифференцировки. В - контрольные клетки (недифференцированные клетки), меченные DAPI и антителом против тропонина Т, специфического маркера кардиомиоцитов. Наблюдаются только ядра, меченные DAPI. Г - дифференцированные клетки, меченные DAPI и антителом против тропонина Т. Можно наблюдать и ядра, меченные DAPI, и цитоскелет, меченный тропонином Т.

Фиг. 7 - дифференцировка выделенных клеток-предшественников в глиальные/нервные клетки. А - клеточная морфология контрольных клеток (недифференцированных клеток) в нормальной ростовой среде, Alpha-Mem, дополненной 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Б - клеточная морфология после дифференцировки в глиальные/нервные клетки. В - контрольные клетки (недифференцированные клетки), меченные DAPI и антителом против β-тубулина III, специфичного белка нейронов. Наблюдаются только ядра, меченные DAPI. Г-дифференцированные клетки, меченные DAPI и антителом против β-тубулина III. Можно наблюдать и ядра, меченные DAPI, и цитоскелет, меченный β-тубулином III.

#### **Подробное описание изобретения**

Перед применением данного способа человеческую пуповину следует отделить от крови и транспортировать в лабораторные помещения в стерильном закрытом резервуаре либо в сухом состоянии, либо предпочтительно погруженную в стерильный раствор, содержащий 186 мкг/мл  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 400 мкг/мл KCl, 60 мкг/мл  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 200 мкг/мл  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 8000 мкг/мл NaCl, 350 мкг/мл  $\text{NaHCO}_3$ , 90 мкг/мл  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2000 мкг/мл глюкозы и 1% эквимолярную смесь пенициллина и стрептомицина, предпочтительно при комнатной температуре, если переработка происходит в пределах 72 ч периода времени, или при 2-8°C, предпочтительно при 4°C, если переработка происходит в пределах периода времени от 48 до 144 ч после сбора, без или предпочтительно со стерильным физиологическим раствором, таким как HBSS. Данный физиологический раствор может быть дополнен питательными веществами и антибиотиками, например, 1 г/л глюкозы, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

Данный способ следует осуществлять в стерильном окружении, например, внутри ламинара. Пуповину промывают 3 раза сбалансированным солевым раствором Хенкса (HBSS) и амниотическую мембрану, окружающую пуповину, удаляют с помощью стерильного пинцета.

Пуповину затем поперечно фракционируют с помощью скальпеля на фрагменты длиной примерно 2,5 см. Принимая во внимание среднюю плотность человеческой пуповины (близкую к 1 г/см), каждый фрагмент соответствует примерно 2,5 г ткани.

В случае присутствия в этих фрагментах сгустков крови, их следует удалить с помощью скальпеля. На следующих стадиях каждую группу из семи фрагментов массой 2,5 г, не содержащих сгустков крови, обрабатывают независимо.

Клетки получают в результате диссоциации каждой группы из 7 фрагментов, проведенной в стерильной и запечатанной колбе, содержащей раствор для расщепления с забуференным pH, путем комбинированного действия коллагеназы II в концентрации 0,075% (масса/общий объем при расщеплении) с трипсином в концентрации 0,125% (масса/общий объем при расщеплении), поддерживая постоянное соотношение между массой ткани, площадью поверхности дна колбы, объемом, в котором происходит расщепление, и общим объемом колбы примерно 1:2:2:37, и где колбу инкубируют при определенных условиях времени инкубации, температуры, условий нагревания, окружающей влажности и встряхивания; более конкретно, начиная с группы из 7 фрагментов пуповины, не содержащих сгустков крови, каждый из которых имеет длину 2,5 см (2,5 г); используя объем раствора для расщепления 35 мл, в невентилируемой и закупоренной колбе для культивирования, такой как T<sub>175</sub>, с общим объемом 650 мл и свободным объемом над раствором 615 мл минус погруженный объем 7 фрагментов при расщеплении; и где раствор для расщепления, за исключением ферментов, состоит из 186 мкг/мл  $\text{CaCl}_2$  раствор ·2 $\text{H}_2\text{O}$ , 400 мкг/мл KCl, 60 мкг/мл  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 200 мкг/мл  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 8000 мкг/мл NaCl, 350 мкг/мл  $\text{NaHCO}_3$ , 90 мкг/мл  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1000 мкг/мл глюкозы и 76 мкг/мл (0,260 mM) EDTA; поддерживая pH 6,4 или выше; и где ферментативную реакционную смесь инкубируют в течение 4 ч; при постоянной температуре 37°C; в закрытом сухом инкубаторе; при перемешивании при постоянной скорости 100 колебаний·мин<sup>-1</sup>

(кол./мин).

Выделение клеток, полученных в результате диссоциации ткани, проводят в трех фазах (трехфазный способ).

В первой фазе клетки выделяют из диссоциированной ткани, более конкретно в результате статичной горизонтальной инкубации колбы, где расщепление происходит в течение периода времени от 5 до 300 мин, предпочтительно 30 мин, при комнатной температуре. Надосадочную жидкость, полученную в результате расщепления, переносят посредством пипетки, избегая засасывания какой-либо нерасщепленной ткани, в центрифужную пробирку объемом 50 мл. Любую нерасщепленную ткань отбрасывают. В этот момент в колбу для расщепления добавляют 35 мл базальной культуральной среды, дополненной дезоксирибонуклеозидами, рибонуклеозидами, глутамином, антибиотиками и 10% фетальной телячей сыворотки (FBS). Невентилируемую крышку колбы заменяют вентилируемой крышкой, содержащей фильтр, и колбу для расщепления инкубируют при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 7% CO<sub>2</sub>. Следует проводить замены всей культуральной среды каждые 72 ч для стимуляции роста клеток, которые прикрепляются по время периода инкубации в горизонтальном положении (период селекции), пока не достигается максимальная поверхностная конфлюентность.

В второй фазе выделения клетки выделяют в результате центрифугирования надосадочной жидкости, являющейся результатом расщепления, в центрифужной пробирке объемом 50 мл при 350 g в течение 10 мин при комнатной температуре. После центрифугирования 35 мл супернатанта переносят в статичную колбу для культивирования (T<sub>175</sub>) с вентилируемой крышкой, содержащей фильтр; и добавляют 35 мл базальной культуральной среды, дополненной дезоксирибонуклеозидами, рибонуклеозидами, глутамином, антибиотиками и 10% фетальной телячей сыворотки (FBS). Колбу затем инкубируют при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 7% CO<sub>2</sub> и всю культуральную среду заменяют каждые 72 ч для того, чтобы стимулировать прикрепление и рост/размножение клеток, пока не достигается максимальная поверхностная конфлюентность.

Популяции клеток, полученные в первой и во второй фазе, криоконсервируют после первого цикла прикрепления и роста/размножения (конец P0). Эта манипуляция заключается в прямой криоконсервации в парообразной фазе жидкого азота смеси 0,5 мл суспензии клеток, содержащей желательное общее количество клеток, и того же самого объема раствора фетальной телячей сыворотки (FBS), содержащего 10% диметилсульфоксида (DMSO), для получения конечной концентрации приблизительно 3×10<sup>6</sup> клеток/мл в 1,5 мл стерильном криососуде, содержащем, следовательно, 1,0 мл суспензии клеток и 0,5 мл свободного объема.

Третья и конечная фаза выделения клеток состоит в прямой криоконсервации клеточного осадка, полученного посредством описанного ранее центрифугирования надосадочной жидкости, являющейся результатом расщепления, ресуспендированного в 2 мл раствора, состоящего из фетальной телячей сыворотки (FBS), содержащей 10% диметилсульфоксида (DMSO), с использованием морозильника с контролируемой скоростью при скорости снижения температуры 1°C/min<sup>-1</sup> вплоть до -80°C в стерильном криососуде объемом 2,5 мл, содержащем 2 мл суспензии клеток и 0,5 мл свободного объема.

Криоконсервированные клетки можно восстанавливать всякий раз, когда это необходимо, посредством процесса быстрого размораживания на водяной бане при 37°C. Данные клетки затем ресуспенсируют в культуральной среде при той же самой температуре с кратностью разведения 1:10. Последующие циклы роста можно проводить с использованием плотностей инокулюма от 5,0×10<sup>3</sup> до 2,0×10<sup>4</sup> клеток/cm<sup>2</sup> с заменой всей среды каждые 72 ч. Клетки обычно демонстрируют коэффициент удвоения 1,7/24 ч.

Пример 1. Оптимизация типа/количества механических манипуляций и размера фрагментов

Тип механической манипуляции и размер исходных фрагментов ткани оптимизировали, поддерживая постоянную долю массы ткани (г), площади поверхности дна колбы для расщепления (cm<sup>2</sup>), расщепляющего объема (мл) и общего объема колбы (мл) приблизительно 1:2:2:37, принимая во внимание то, что фрагмент человеческой пуповины длиной 1 см имеет массу примерно 1 г. После удаления амниотической мембранны тестировали несколько типов фракционирования пуповины: низкое (фрагменты 5 см); среднее (фрагменты 2,5 см); высокое (фрагменты 0,3 см) и измельченная ткань. Все фракционирования проводили с помощью скальпеля, и образцы перерабатывали с использованием точно одних и тех же условий. Установили, что наилучшие выходы в единицах общего числа клеток в конце P0/массу пуповины/время были получены при использовании фрагментов 2,5 см. табл. 1 дает качественное обобщение полученных результатов.

Таблица 1. Оптимизация фрагментации: выход клеток

низкая (5 см)	средняя (2,5 см)	высокая (0,3 см)	Измельченная
+	++	+	-

Обозначения: +++ = превосходный, ++ = очень хороший, + = хороший, - = приемлемый, - = плохой, 0 = безуспешное (выделение)

Пример 2. Оптимизация в отношении присутствия или отсутствия сгустков крови в сосудах пуповины (1 вена и 2 артерии).

Известно, что лизис эритроцитов является токсичным, снижающим жизнеспособность клеток *in vitro*. Поэтому сравнили выходы клеток при проведении расщепления в присутствии или в отсутствие сгустков крови. Для последнего эксперимента сгустки крови удаляли с помощью скальпеля. Установили, что сгустки крови имели отрицательный эффект на выход в показателях общего числа клеток в конце РО/массу пуповины/время. табл. 2 дает качественное обобщение полученных результатов.

Таблица 2. Сгустки крови: эффекты на выход клеток

Присутствие	Отсутствие
-	++

Обозначения: +++ = превосходный, ++ = очень хороший, + = хороший, - = приемлемый, - = плохой, 0 = безуспешное (выделение)

Пример 3. Оптимизация в отношении природы фермента, индивидуального или комбинированного действия фермента и концентрации фермента в растворе для расщепления

Для того, чтобы максимизировать выходы в единицах числа клеток с желательными характеристиками, выделенных из исходной ткани, выбрали два исходных подхода в отношении ферментативного расщепления: прямое прикрепление клеток к культуральной колбе в присутствии культуральной среды без расщепления и, следовательно, в отсутствие ферментов; и диссоциацию ткани одним ферментом: 0,075% (мас./об.) коллагеназы II или 2,0% (мас./об.) проназы.

Поскольку использование одной коллагеназы II было наиболее эффективным подходом, этот фермент затем объединяли с другими ферментами, конкретно с трипсином 0,125% (мас./об.) (в присутствии или в отсутствие EDTA 0,260 mM), с одной гиалуронидазой 0,5% (мас./об.) и с гиалуронидазой 0,5% (мас./об.), объединенной с проназой 2,0% (мас./об.).

Для этих тестов использовали оптимальный размер фрагментов 2,5 см и поддерживали постоянное соотношение массы ткани (г), площади поверхности дна колбы ( $\text{cm}^2$ ), расщепляющего объема (мл) и общего объема колбы (мл) приблизительно 1:2:2:37.

Результаты показали, что наилучшие выходы в единицах общего числа клеток в конце РО/массу пуповины/время были получены комбинированным действием коллагеназы II 0,075% (мас./об.) с трипсином 0,125% (мас./об.). Кроме того, когда концентрацию коллагеназы II изменяли (0,0375, 0,075 и 0,15% мас./об.), поддерживая концентрацию трипсина 0,125% (мас./об.) в присутствии 0,260 mM EDTA, установили, что концентрация коллагеназы II 0,075% (мас./об.) давала наилучший результат. Табл. 3 дает качественное обобщение этих результатов.

Таблица 3. Природа фермента, комбинированное действие и концентрация: эффекты на выход клеток

	Без фермента	Проназа (2,0%)	Кол II (0,0375%)	Кол II (0,075%)	Кол II (0,150%)
Без фермента	0	--	-	+	--
Трипсин (0,125%)	X	X	+	+	--
Трипсин (0,125%) + EDTA (0,260 mM)	X	X	X	++	X
Гиалурони- даза (0,5%)	X	X	X	+	X
Проназа (2,0%) + Гиалурони- даза (0,5%)	X	X	X	+	X

Обозначения: +++ = превосходный, ++ = очень хороший, + = хороший, - = приемлемый, - = плохой, 0 = безуспешное (выделение).

Пример 4. Оптимизация химического состава ферментативного раствора

Протестирували несколько составов ферментативного раствора для расщепления, а именно: Alpha-Mem, дополненный 20% FBS и 1% пенициллин/стрептомицин; физиологический буферный раствор, например, HBSS, дополненный EDTA, более конкретно 186 мг/мл  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 400 мг/мл KCl, 60 мг/мл  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 200 мг/мл  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 8000 мг/мл NaCl, 350 мг/мл  $\text{NaHCO}_3$ , 90 мг/мл  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1000

мг/мл глюкозы и 76 мг/мл (0,260 mM) EDTA; предыдущий раствор HBSS, дополненный 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM HEPES буфер, дополненный 5 mM CaCl<sub>2</sub>.

Для этих тестов сохраняли ранее оптимизированные условия, а именно комбинацию ферментов, состоящую из коллагеназы II 0,075% (мас./об.) и трипсина 0,125% (мас./об.).

Наилучшие результаты были получены для физиологического буферного раствора (HBSS), дополненного 0,260 mM EDTA. Табл. 4 дает качественное обобщение полученных результатов.

Таблица 4. Композиция ферментативного раствора: эффекты на выход клеток

Alpha-Mem +	HBSS +	HBSS +	25 mM HEPES
20% FBS +	0,26 mM EDTA	5 mM CaCl <sub>2</sub>	+ 5 mM CaCl <sub>2</sub>
1% пен./стреп.			

Кол II (0,075%)	+	--	++	-	+
Трипсин (0,125%)					

Обозначения: +++ = превосходный, ++ = очень хороший, + = хороший, - = приемлемый, - = плохой, 0 = безуспешное (выделение).

Пример 5. Оптимизация времени инкубации и изменения pH при ферментативном расщеплении

Тестировали несколько периодов инкубации: 2, 4, 6 и 16 ч. Из полученных результатов наилучшим периодом инкубации было 4 ч. Несмотря на то, что через 16 ч наблюдали более полные расщепления, обнаружили, что более длительные периоды имели отрицательное влияние на жизнеспособность клеток и приводили к значительному подкислению среды. Табл. 5 дает качественное обобщение полученных результатов.

Таблица 5. Время инкубации и pH ферментативного расщепляющего раствора: эффекты на выход клеток

	2 ч	4 ч	6 ч	16 ч
Кол II (0,075%)				
+ Трипсин (0,125%)	+	++	-	+
в HBSS + 0,26 mM EDTA	(pH 6,9)	(pH 6,4)	(pH 6,1)	(pH 5,9)

Обозначения: +++ = превосходный, ++ = очень хороший, + = хороший, - = приемлемый, - = плохой, 0 = безуспешное (выделение).

Пример 6. Оптимизация способа перемешивания (умеренное по сравнению с энергичным) в ходе расщепления

Инкубацию ферментативного раствора для расщепления проводили на водяной бане с орбитальным перемешиванием либо с умеренной (100 кол./мин), либо с высокой (140 кол./мин) скоростью встряхивания. Умеренное перемешивание при 100 кол./мин приводило к лучшим результатам в показателях выхода клеток. Табл. 6 дает качественное обобщение полученных результатов.

Таблица 6. Скорость встряхивания: эффекты на выход клеток

100 кол./мин	140 кол./мин
++	+

Обозначения: +++ = превосходный, ++ = очень хороший, + = хороший, - = приемлемый, - = плохой, 0 = безуспешное (выделение).

Пример 7. Оптимизация атмосферы инкубации во время ферментативного расщепления (сухая по сравнению с влажной)

Инкубацию ферментативного раствора для расщепления проводили при 37°C в двух разных средах: влажной и сухой. Для этого теста образцы ткани перерабатывали параллельно либо в погруженном орбитальном встряхивателе, где теплообмен происходил как через воду, так и через насыщенный воздух, либо в сухой камере, где теплообмен происходил через сухой воздух. Инкубация в сухой камере давала лучшие выходы клеток. Табл. 7 дает качественное обобщение полученных результатов.

Таблица 7. Инкубационная среда: эффекты на выход клеток

Водяная баня	Сухая камера
++	+++

Обозначения: +++ = превосходный, ++ = очень хороший, + = хороший, - = приемлемый, - = плохой, 0 = безуспешное (выделение).

Пример 8. Оптимизация плотности клеток во время криоконсервации

Для оценки эффекта плотности клеток на выход клеток после криоконсервации клетки заморажива-

ли в конце Р1 в парообразной фазе жидкого азота при разных плотностях, варьирующих от  $1 \times 10^6$  до  $10 \times 10^6$  клеток/мл, в криопробирках объемом 1,5 мл, содержащих 0,5 мл суспензии клеток и тот же самый объем раствора, состоящего из FBS (90%) и DMSO (10%).

Клетки криоконсервировали в течение минимум 30 суток и затем размораживали помещением криопробирок на водяную баню, поддерживаемую при 37°C. Оттаявшие клетки ресуспендировали в 10 мл культуральной среды, ранее нагретой до 37°C. Подсчитывали общее число клеток и число жизнеспособных клеток и затем инокулировали их в колбах для культивирования ткани (NUNC) при кратности разведения 1:10.

Через 24 ч среду заменяли на свежую среду и клетки поддерживали, как описано выше.

Для определения оптимальной плотности клеток для криоконсервации определяли жизнеспособность клеток после размораживания (жизнеспособные клетки/общее число клеток) и выход клеток (жизнеспособные клетки, подсчитанные после размораживания/жизнеспособные клетки, подсчитанные до криоконсервации) для каждого условия. Полученные результаты показали, что плотность клеток  $3 \times 10^6$  клеток/мл с наибольшей вероятностью обеспечивала надлежащее сохранение и выход жизнеспособных клеток после криоконсервации при протестированных условиях (1,5 мл криопробирки, содержащие 1 мл суспензии клеток и 0,5 мл свободное пространство).

Отслеживали способность размороженных клеток к росту *in vitro*. Клетки типично демонстрировали коэффициент удвоения 1,7 удвоений в сутки, аналогичный значению, наблюдаемому до криоконсервации (фиг. 4).

**Пример 9. Выделение клеток-предшественников из человеческой пуповины с использованием разработанного способа**

После получения разрешений от Комитетов по этике организаций, где были отобраны пуповины, и информированного согласия от матерей, отбирали несколько пуповин после родов. Пуповины отделяли от плаценты, освобождали от крови и транспортировали в лабораторные помещения в стерильной закрытой колбе, содержащей стерильный физиологический раствор, HBSS, дополненный питательными веществами и антибиотиками, например, 1 г/л глюкозы, 100 U/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

Транспортировку в лабораторные помещения проводили при комнатной температуре. Способ осуществляли в стерильной среде внутри ламинара.

Каждую пуповину промывали 3 раза сбалансированным солевым раствором Хенкса (HBSS) и амиотическую мемброну, окружающую пуповину, удаляли стерильным пинцетом.

Каждую пуповину затем поперечно фракционировали с помощью скальпеля на фрагменты 2,5 см. Принимая во внимание среднюю линейную плотность человеческой пуповины (1 г/см), каждый фрагмент соответствует примерно 2,5 г ткани. В этих фрагментах идентифицированные сгустки крови удаляли с помощью скальпеля. Каждую группу из семи фрагментов массой 2,5 г, освобожденных от сгустков крови, обрабатывали независимо.

Клетки получали в результате диссоциации каждой группы из 7 фрагментов, проведенной в стерильном и закупоренном сосуде, содержащем раствор для расщепления с забуференным pH, путем комбинированного действия коллагеназы II в концентрации 0,075% (масса/общий объем расщепляющего раствора) с трипсином в концентрации 0,125% (масса/общий объем расщепляющего раствора), поддерживая постоянное соотношение между массой ткани, площадью поверхности дна колбы, объемом для расщепления и общим объемом колбы, равное примерно 1:2:2:37. Данную колбу инкубировали при определенных периодах времени, температуре, среде нагревания, влажности окружающей среды и встряхивания; более конкретно, начиная с группы из 7 отрезков пуповины, не содержащих сгустков крови, каждый из которых имеет массу приблизительно 2,5 г, используя объем расщепляющего раствора 35 мл; в невентилируемой, закупоренной колбе для культивирования, такой как T<sub>175</sub>, с общим объемом 650 мл и свободным объемом над раствором во время расщепления 615 мл минус погруженный объем 7 фрагментов при расщеплении; и где раствор для расщепления состоит, за исключением ферментов, из 186 мг/мл CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 400 мг/мл KCl, 60 мг/мл KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 200 мг/мл MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 8000 мг/мл NaCl, 350 мг/мл Na-HCO<sub>3</sub>, 90 мг/мл NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1000 мг/мл глюкозы и 76 мг/мл (0,260 mM) EDTA; поддерживая pH 6,4 или выше. Данную ферментативную реакционную среду инкубировали в течение 4 ч при постоянной температуре 37°C в закрытом сухом инкубаторе, при перемешивании с постоянной скоростью 100 колебаний·мин<sup>-1</sup> (кол./мин).

Выделение клеток, полученных в результате диссоциации ткани, проводили в три фазы.

В первой фазе клетки выделяли из диссоциированной ткани, более конкретно в результате статического горизонтального инкубирования колбы, где расщепление происходит в течение периода времени от 5 до 300 мин, предпочтительно 30 мин, при комнатной температуре. Надосадочную жидкость, являющуюся результатом расщепления, переносили посредством пипетки, избегая какой-либо нерасщепленной ткани, в центрифужную пробирку объемом 50 мл. Всю нерасщепленную ткань отбрасывали. В этот момент в колбу для расщепления добавляли 35 мл базальной культуральной среды, дополненной дезоксирибонуклеозидами, рибонуклеозидами, глутамином, антибиотиками и 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS). Невентилируемую крышку колбы заменяли вентилируемой крышкой, содержащей фильтр,

и колбу для расщепления инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 7% CO<sub>2</sub>. Замены всей культуральной среды проводили каждые 72 ч в течение 7 суток для стимуляции роста клеток, которые прикреплялись по время инкубации в горизонтальном положении, пока не достигалась поверхностная конфлюентность клеток.

Во второй фазе выделения клетки выделяют в результате центрифугирования центрифужной пробирки 50 мл при 350 g в течение 10 мин при комнатной температуре и посредством переноса надосадочной жидкости после центрифугирования объемом 35 мл в статичную колбу для культивирования, такую как T<sub>175</sub>, с вентилируемой крышкой, содержащей фильтр; добавления в эту колбу для культивирования 35 мл базальной культуральной среды, дополненной дезоксирибонуклеозидами, рибонуклеозидами, глутамином, антибиотиками и 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS); инкубирования этой колбы для культивирования при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 7% CO<sub>2</sub>; и замены культуральной среды каждые 72 ч для того, чтобы стимулировать прикрепление и рост/размножение клеток, пока не достигается максимальная конфлюентность.

Популяции клеток, полученные в первой и во второй фазе, подвергали криоконсервации в конце первого цикла роста (конец P0). Эта манипуляция заключается в прямой криоконсервации в парообразной фазе жидкого азота смеси 0,5 мл суспензии клеток, содержащей желательное общее количество клеток, и того же самого объема раствора фетальной телячьей сыворотки (FBS), содержащей 10% диметилсульфоксида (DMSO), для получения конечной концентрации приблизительно  $3 \times 10^6$  клеток/мл в стерильном криососуде объемом 1,5 мл, содержащем 1,0 мл суспензии клеток и 0,5 мл свободного объема.

Третья и заключительная фаза выделения клеток из диссоциированной ткани состояла в прямой криоконсервации клеточного осадка, полученного путем центрифугирования надосадочной жидкости, являющейся результатом расщепления, с использованием морозильника с контролируемой скоростью при скорости снижения температуры 1°C·мин<sup>-1</sup> вплоть до -80°C, где клетки ресусцинировали в 2 мл раствора фетальной телячьей сыворотки (FBS), содержащей 10% диметилсульфоксида (DMSO), в стерильном криососуде объемом 2,5 мл, содержащем 2 мл суспензии клеток и 0,5 мл свободного объема.

Криоконсервированные клетки восстанавливали через 31 сутки посредством процесса быстрого размораживания на водяной бане при 37°C. Данные клетки затем ресусцинировали в культуральной среде при такой же температуре с кратностью разведения 1:10. Последующие стадии роста можно проводить с использованием плотностей инокулюма от  $5,0 \times 10^3$  до  $2,0 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> с заменой всей среды каждые 72 ч. Клетки типично демонстрируют скорость роста 1,7 удвоений в сутки в течение 18 пассажей.

#### Пример 10. Сертификация мезенхимного фенотипа выделенных клеток-предшественников

Помимо способности прикрепляться и пролиферировать в селективной культуральной среде для мезенхимных клеток-предшественников выделенные клетки характеризовали в конце P1 посредством проточной цитометрии.

Когда клетки достигали конфлюентности от 80 до 90% в конце P1, культуральную среду удаляли и поверхность клеток промывали фосфатным буфером (без Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>). Добавляли трипсин в концентрации 0,25% и, как только клетки отделялись от поверхности колбы, добавляли 2 объема культуральной среды. Суспензию клеток затем центрифугировали в течение 10 мин при 350 g и надосадочную жидкость отбрасывали. Осадок, содержащий клетки, ресусцинировали в блокирующем растворе (0,2% BSA (бычий сывороточный альбумин) в dPBS (забуференный фосфатом физиологический раствор Дульбекко)) с достижением конечной концентрации клеток от  $2 \times 10^6$  до  $10 \times 10^6$  клеток/мл. После периода инкубации 10 мин при комнатной температуре по 100 мкл суспензии клеток добавляли в каждую пробирку, содержащую первичные антитела, коньюгированные с флуоресцентным маркером, фикоэритрином (PE) или флуоресцеинизотиоционатом (FITC). Суспензию клеток встряхивали, инкубировали во льду и защищали от света в течение 20-40 мин. После этого периода в каждую пробирку добавляли по 1,5 мл dPBS, клетки ресусцинировали и центрифугировали в течение 5 мин при 350 g. Надосадочную жидкость отбрасывали и осадок, содержащий клетки, ресусцинировали в 500 мкл параформальдегида в концентрации 1%.

Суспензию клеток хранили при 4°C до дальнейшего применения. Проточную цитометрию проводили в FACScalibur от BD Biosciences с определением поверхностных антигенов CD44, CD73, CD90 и CD105 в качестве позитивных маркеров мезенхимных клеток. Для этого использовали первичные антитела, коньюгированные с FITC или с PE (фиг. 1). Исследовали присутствие негативных маркеров поверхностных антигенов CD14, CD31, CD34 и CD45. Они являются специфичными для гематопоэтической (CD34), моноцитарной (CD14), эндотелиальной (CD31) и панлейкоцитарной (CD45) линий, и все эти антитела были коньюгированы с FITC (фиг. 2). Как и ожидалось, было показано, что основное большинство выделенных мезенхимных клеток являются позитивным в отношении CD44, CD73, CD90 и CD105 и негативным или только в остаточной степени позитивным в отношении негативных маркеров, ссылка на которые приведена выше.

**Пример 11. Демонстрация фенотипа выделенных клеток как клеток-предшественников: остеогенная дифференциация**

Согласно подробному описанию данного изобретения клетки-предшественники, выделенные из фрагментов человеческой пуповины, показывали способность к дифференцировке в разные типы специализированных клеток. В этом примере продемонстрированы способности этих клеток к дифференциации в остеобласти.

Клетки инокулировали в РЗ в плотности  $2,0 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> в среду для остеогенной дифференциации, содержащую базальную среду альфа-МЕМ (с дезоксирибонуклеотидами, рибонуклеотидами и ультраглутамином), дополненную 10% фетальной телячьей сыворотки (FBS), 10 мМ р-глицерофосфата, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 50 мкг/мл аскорбат-2-фосфата, 100 нМ дексаметазона (Hung et al., 2002).

Всю среду заменяли 2 раза в неделю в течение 3 недель, после чего применяли протоколы специфического окрашивания с использованием ализарина красного и щелочной фосфатазы, и они оба были позитивными. При окрашивании ализарином красным среду аккуратно отсасывали из колбы для культивирования ткани и клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 10 мин при комнатной температуре.

Клетки промывали PBS и инкубировали со специфическим окрашивающим раствором, ализарином красным S, 40 мМ, pH 4,2 в течение 15 мин при комнатной температуре. Раствор ализарина красного S удаляли, и клетки тщательно промывали водой (Kotobuki et al., 2006).

В случае теста со щелочной фосфатазой (Sigma-Aldrich), клетки также фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки промывали PBS, погружали в 2,5 мл раствора цитрата и оставляли инкубироваться в течение 30 с.

Затем раствор цитрата удаляли, клетки промывали деионизированной водой (milliQ) и инкубировали с окрашивающим раствором, нейтральным красным, в течение 2 мин. Данный раствор затем удаляли и клетки тщательно промывали водой (Shim, et al., 2004). Данный тест был позитивным в отношении остеогенной дифференциации (фиг. 5).

**Пример 12. Демонстрация фенотипа выделенных клеток как клеток-предшественников: адипогенная дифференциация**

Для того чтобы клетки дифференцировались в адипоциты, клетки высевали в РЗ в плотности  $2,0 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup> в базальную среду альфа-МЕМ (с дезоксирибонуклеотидами, рибонуклеотидами и ультраглутамином), дополненную 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, и поддерживали в этой культуральной среде. При достижении конфлюентности данную среду заменяли на среду для адипогенной дифференциации, которая состояла из DMEM-LG с 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 10 мкг/мл инсулина, 200 мкМ индометацина, 0,5 мМ изобутил-1-метилксантина и 1 мкМ дексаметазона (Shih et al., 2005).

Всю среду заменяли 2 раза в неделю в течение 3 недель, после чего проводили анализы специфического окрашивания масляным красным O, и подтверждали адипогенную дифференциацию. Для этого культуральную среду аккуратно удаляли из колб для культивирования ткани (NUNK) посредством отсасывания и клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 10 минут при комнатной температуре. Данные клетки затем промывали PBS и инкубировали с фильтрованным раствором масляного красного O (2:3) в течение по меньшей мере 10 мин при комнатной температуре. Раствор масляного красного O затем удаляли и клетки тщательно промывали водой (Do, et al., 2006). Данный тест был положительным в отношении адипогенной дифференциации (фиг. 5).

**Пример 13. Демонстрация фенотипа выделенных клеток как клеток-предшественников: хондрогенная дифференциация**

Для хондрогенной дифференциации клетки ресуспендировали в РЗ до конечной плотности  $1,1 \times 10^6$  клеток/мл и помещали в коническую пробирку объемом 15 мл для того, чтобы обеспечить образование хондросфер. Использованная культуральная среда представляла собой среду для хондрогенной дифференциации, состоящую из DMEM-LG с 1% FBS, 6,25 мкг/мл инсулина, 10 нг/мл TGFβ1 (трансформирующий фактор роста бета-1) и 50 мкМ аскорбат-2-фосфата (Shih et al., 2005).

Всю среду заменяли дважды в неделю в течение 4 недель с особой осторожностью так, чтобы не повредить хондросферы, после чего проводили анализы специфичного окрашивания альциановым синим и гематоксилином и подтверждали хондрогенную дифференциацию. Для этого всю среду удаляли из пробирки отсасыванием и хондросферы промывали PBS. Затем хондросферы погружали в агар и замораживали в парообразной фазе жидкого азота.

С помощью микротома агар нарезали на срезы ткани толщиной 5 мкм. Эти срезы окрашивали 1%-ным альциановым синим и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре и затем промывали PBS. Препараты, зафиксированные на предметном стекле микроскопа, пропускали через раствор гематоксилина и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Гематоксилин удаляли посредством окончательной стадии промывки с помощью PBS (Okada, et al., 2005). Данный тест давал положительный результат в отношении хондрогенной дифференциации (фиг. 5).

**Пример 14. Демонстрация фенотипа выделенных клеток как клеток-предшественников: кардиомиогенная дифференциация**

Кардиомиогенная дифференциация происходила в течение 18-суточного периода, на протяжении которого использовали разные культуральные среды (Lee et al., 2004). Клетки высевали в плотности 3000 клеток/см<sup>2</sup> на 16-луночные предметные стекла с камерами, покрытые орнитином. Клетки высевали в среде C0, которая состояла из базальной среды альфа-МЕМ (с дезоксирибонуклеотидами, рибонуклеотидами и ультраглутамином), дополненной 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Через двадцать четыре часа после посева данную культуральную среду заменяли другой средой (средой C1), которая состояла из DMEM-LG, дополненной 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамина, 10 нг/мл β-FGF (фактор роста фибробластов бета) и 10 мкМ 5-азацитидина. Через двадцать четыре часа после посева клеток в среду C1 производили вторую замену среды на среду C2. Среда C2 состояла из базальной среды DMEM-LG, дополненной 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамина и 10 нг/мл β-FGF. Клетки поддерживали в среде C2 в течение двух недель с заменами среды каждые 72 ч.

Параллельно контрольные (недифференцированные) клетки высевали в плотности 5000 клеток/см<sup>2</sup> и поддерживали в среде 0. После периода дифференцировки проводили иммунофлуоресцентные анализы с первичными антителами против типичного мышечного белка, сердечного тропонина Т, специфичного для кардиомиоцитов. Для того чтобы локализовать клетки для этого анализа, клеточные ядра окрашивали флуорохромом DAPI, специфичным для нуклеиновых кислот. Как и ожидалось, только клетки, подвергнутые протоколу кардиомиогенной дифференцировки, уже показывающие типичную морфологию кардиомиоцитов, давали флуоресцентный сигнал (фиг. 6Г).

**Пример 15. Демонстрация фенотипа выделенных клеток как клеток-предшественников: нейрогенная/gliальная дифференциация**

Нейрогенная дифференциация происходила в течение 12-суточного периода, на протяжении которого использовали разные культуральные среды (Lee et al, 2004). Клетки высаживали в плотности 3000 клеток/см<sup>2</sup> на 16-луночные предметные стекла с камерами, покрытые орнитином. Клетки высевали в культуральную среду (среда N1), состоящую из базальной среды IMDM (среда Дульбекко, модифицированная по способу Исков), дополненной 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамина (Sigma), 5 нг/мл β-FGF, 0,5 мкМ ретиноевой кислотой и 1 mM 2-меркаптоэтанола.

Через трое суток после посева среду N1 заменяли средой N2, содержащей базальную среду IMDM, дополненную 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамина, 1 mM циклического аденоzinмонофосфата (цАМФ) и 100 мкМ аскорбат-2-фосфата.

Через трое суток после посева среду N2 заменяли средой N3, содержащей базальную среду IMDM, дополненную 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамина, 1 mM циклического аденоzinмонофосфата (цАМФ) и 10 мкМ гидрокортизона.

Наконец, через 3 суток после посева среду N3 заменяли средой N4, состоящей из базальной среды IMDM, дополненной 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 2 mM L-глутамина, 20 нг/мл FGF-1, 10 нг/мл SHH, 10 нг/мл NGF (фактор роста нервов), 25 нг/мл витронектина, 100 мкМ аскорбат-2-фосфата, 100 мкМ изобутилметилксантината, 10 мкМ форсколина и 20 нМ PMA.

Параллельно контрольные (недифференцированные) клетки высевали в плотности 5000 клеток/см<sup>2</sup> и поддерживали в среде N0 (смотрите протокол кардиомиогенной дифференцировки).

После периода дифференциации проводили иммунофлуоресцентные анализы с первичными антителами против β-тубулина, типа III, специфичного для нервных клеток. Для того чтобы локализовать клетки для данного анализа, клеточные ядра окрашивали флуорохромом DAPI, специфичным для нуклеиновых кислот. Как и ожидалось, только клетки, подвергнутые протоколу нейрогенной/gliальной дифференцировки, уже показывающие типичную глиальную морфологию (фиг. 7Б), давали флуоресцентный сигнал (фиг. 7Г).

**Ссылки**

- Auger F. A., Germain L., Remy-Zolghadri M. and C. J. Hayward (2005). Method of isolating cells from umbilical cord. WO2005001081.
- Barry F. P. and J. M. Murphy (2004) Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 36:568-584.
- Can A. and S. Karahuseyinoglu (2007). Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells* (on line – [www.StemCells.com](http://www.StemCells.com)); DOI:10.1634/stemcells.2007-0417.
- Carvalhal A. V., Lima, C., Basto V., Cunha C., Escada P., Cruz P. and H. Cruz (2007). Adult human neuronal stem/progenitor cells from the olfactory epithelium and olfactory lamina propria, isolation method, proliferation and differentiation in serum free culture medium and utilization for transplantation. WO2007020611.
- Claes L., Eckert-Hubner K. and P. Augat (2002). The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J. Orthop. Res.* 20:255-266.
- Cullinane D. M., Salisbury K. T., Alkhiary Y., Eisenberg S., Gerstenfield L. and T. A. Einhorn (2003). Effects of local mechanical environment on vertebrate tissue differentiation during repair: does repair recapitulate development? *J. Exp. Biol.* 206:2459-2471.
- Chul-Won H. A., Yoon-Sun Y. and Y. Sung-Eun (2003) Isolation and culture-expansion methods of mesenchymal stem/progenitor cells from umbilical cord blood, and differentiation method of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem/progenitor into various mesenchymal tissues. WO 03070922.
- Davies J. E., Dolores B., Raúl S., Morris H. and A. D. S. Lickorish (2004). Progenitor cells from Wharton's jelly of human umbilical cord. WO2004072273.
- Deryl L. T. and M. L. Weiss (2008). Concise review: Wharton's jelly-derived cells are a primitive stromal cell population. *Stem Cells*, 26:591-599.
- Do M., Jeong H., Choi B., Hunter L., Langley S., Pazmany L. and P. Trayhurn (2006). Inflammatory gene expression patterns revealed by DNA microarray analysis in TNF- $\alpha$ -treated SGBS human adipocytes. *Yonsei Medical Journal*, Vol. 47, №5, 729-736.
- Gardner T. N., Stoll T., Marks L., Mishra S. and M. K. Tate (2000). The influence of mechanical stimulus on the pattern of tissue differentiation in a long bone fracture – a FEM study. *J. Biomech.* 33:415-425.

Harris I. R., Messina D. J., Kihm A. and A. Seyda (2006). Postpartum cells derived from umbilical cord tissue, and methods of making and using the same. WO2006/071794.

Hung S.-C., Chen N.-J., Hsieh S.-L., Li H., Ma H.-L. and W.-H. Lo (2002). Isolation and Characterization of Size-Sieved Stem Cells from Human Bone Marrow. *Stem Cells* 20:249-258

Kadner A., Zund G., Maurus C., Breymann C., Yakariski S., Kadner G., Turina M. and S. P. Hoerstrup (2004). Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 25:635-641.

Kotobuki N., Kawagoe D., Nomura D., Katou Y., Muraki K., Fujimori H., Goto S., Ioku K. and H. Ohgushi (2006). Observation and quantitative analysis of rat bone marrow stromal cells cultured *in vitro* on newly formed transparent  $\beta$ -tricalcium phosphate. *J. Mat. Sci.: Mat. Med.* 17:33-41.

Lee O. K., Kuo T. K., Chen W. M., Lee K. D., Hsieh S. L. and T. H. Chen (2004). Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*, 103:1669-1675.

Majumdar M. K., Thiede M. A. and J. D. Mosca (1998). Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell Physiol* 176:57-66.

Mitchell K. E., Weiss M. L., Mitchell B. M., Martin P., Davis D., Morales L., Helwig B., Beerenstrauch M., Abou-Easa K., Hildreth T. and D. Troyer (2003). Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells* 21:50-60, 2003.

Nanaev A. K., Kohnen G., Milovanov A. P., Domogatsky S. P. and P. Kaufmann (1997). Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. *Placenta* 18:53-64.

Okada A., Shiomi T., Aoki Y. and M. Fujiwara (2005). Phenytoin stimulates chondrogenic differentiation in mouse clonal chondrogenic EC cells, ATDC5. *J. Toxicol. Sci.*, Vol. 30, № 3, 145-156.

Phan T. T. and I. J. Lim (2006). Isolation of stem/progenitor cells from amniotic membrane of umbilical cord. WO2004019357.

Pittenger M. F., Mackay A. M. and C. B. Beck (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.

Purchio A. F., Naughton B. A. and J. San Roman (1998). Production of cartilage tissue using cells isolated from Wharton's jelly. WO199801779.

Roisen F. J., Klueber K. M., Lu C. L., Hatcher L. M., Dozier A., Shields C. B. and S. Maguire (2001) Adult human olfactory stem cells. Brain Res. 890:11-22.

Romanov Y. A., Svintsitskaya V. A. and V. N. Smirnov (2003). Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. Stem Cells 21:105-110.

Seyda A. and A. Gosiewska (2006). Postpartum cells derived from umbilical cord tissue, and methods of making, culturing, and using the same. WO2006101548.

Shih D. T.-B., Lee D.-C., Chen S.-C., Tsai R.-Y., Huang C.-T., Tsai C.-C., Shen E.-Y. and W.-T. Chiu (2005). Isolation and Characterization of Neurogenic Mesenchymal Stem Cells in Human Scalp Tissue. Stem Cells 23:1012-1020.

Shim W. S. N., Jiang S., Wong P., Tan J., Chua Y. L., Tan Y. S., Sin Y. K., Lim C. H., Chua T., Teh M., Liu T. C. and E. Sim (2004). Ex vivo differentiation of human adult bone marrow stem cells into cardiomyocyte-like cells. Biochem. Biophys. Res. Com. 324:481-488.

Wang H. S., Hung S. C., Peng S. T., Huang C. C., Wei H. M., Guo Y. J., Fu Y. S., Lai M. C. and C. C. Chen (2006). Mesenchymal stem cells in he Wharton's jelly of the umbilical cord, Stem Cells 22:1330-1337.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ выделения клеток-предшественников из ткани человеческой пуповины, включающий стадии, на которых:

а) берут часть пуповины, из которой была удалена амниотическая мембрана, где эта часть пуповины была поперечно разделена, но не подвергалась механическому манипулированию и не содержит сгустков крови;

б) расщепляют указанную часть пуповины с помощью раствора для ферментативного расщепления, содержащего коллагеназу и трипсин, в первой колбе в условиях, достаточных для высвобождения только указанных клеток-предшественников из указанной части пуповины, то есть при pH 6,4 или выше в течение 2-16 ч при перемешивании с получением раствора, содержащего высвобожденные клетки-предшественники; и затем

в) собирают клетки-предшественники в трех фазах выделения, где

первая фаза выделения включает статичное выдерживание указанной первой колбы, в которую помещен раствор, содержащий высвобожденные клетки-предшественники, в течение периода времени по меньшей мере от 5 до 300 мин после указанной стадии расщепления для облегчения прикрепления первой группы клеток-предшественников к указанной первой колбе; последующее удаление оставшегося раствора, содержащего неприкрепившиеся высвобожденные клетки-предшественники, из указанной первой колбы; последующее размножение указанной первой группы клеток-предшественников, прикрепленных к первой колбе, при культивировании в увлажненной атмосфере, содержащей CO<sub>2</sub>, до достижения максимальной поверхностной конфлюентности; и затем сбор указанной первой группы клеток-предшественников;

вторая фаза выделения включает центрифугирование оставшегося раствора, содержащего неприкрепившиеся высвобожденные клетки-предшественники, удаленного из указанной первой колбы, с образованием надосадочной жидкости и осадка, содержащих подлежащие выделению клетки; последующее перемещение указанной надосадочной жидкости во вторую колбу, которая является статичной для облегчения прилипания второй группы клеток-предшественников к указанной второй колбе; последующее размножение указанной второй группы клеток-предшественников, прикрепленных ко второй колбе, при культивировании в увлажненной атмосфере, содержащей CO<sub>2</sub>, до достижения максимальной поверхностной конфлюентности; и затем сбор указанной второй группы клеток-предшественников; и

третья фаза выделения включает сбор третьей группы клеток-предшественников из указанного осадка;

причем на всех трех фазах выделения получают клетки-предшественники, которые могут подвергаться дифференцировке в остеобласти, хондроциты, адипоциты, кардиомиоциты и нервные клетки.

2. Способ по п.1, где указанная часть пуповины поперечно разделена на фрагменты длиной приблизительно 2,5 см каждый.

3. Способ по любому из пп.1, 2, где указанный раствор для ферментативного расщепления содержит 0,0375-0,075% коллагеназы II (мас./об.) и 0,125% трипсина (мас./об.).

4. Способ по любому из пп.1-3, где указанная колба имеет размеры, обеспечивающие соотношение между массой ткани пуповины (г), площадью поверхности дна указанной первой колбы ( $\text{см}^2$ ), объемом указанного раствора для ферментативного расщепления (мл) и общим объемом указанной первой колбы (мл), равное приблизительно 1:2:2:37.

5. Способ по любому из пп.1-4, где перемешивание на стадии расщепления осуществляется со скоростью примерно 100 колебаний·мин<sup>-1</sup> в сухой атмосфере.

6. Способ по любому из пп.1-5, где расщепление осуществляют в течение примерно 4 ч.

7. Способ по любому из пп.1-6, где указанную первую группу клеток-предшественников, собранную на первой стадии выделения, перед сбором размножают при культивировании в течение одного цикла размножения и/или культивируют до конфлюентности во время указанного размножения.

8. Способ по любому из пп.1-7, где указанную вторую группу клеток-предшественников, собранную на второй стадии выделения, перед сбором размножают при культивировании в течение одного цикла размножения и/или культивируют до конфлюентности во время указанного размножения.

9. Способ по любому из пп.1-8, где выделяют по меньшей мере  $8 \times 10^5$  клеток-предшественников в расчете на грамм взятой пуповины.

10. Способ по любому из пп.1-9, дополнительно включающий стадию криоконсервации указанных выделенных клеток-предшественников.

11. Выделенная популяция клеток-предшественников, полученная из ткани пуповины способом по любому из пп.1-10, где указанные клетки-предшественники сохраняют способность дифференцироваться в остеобласты, хондроциты, адипоциты, кардиомиоциты и нервные клетки, включая глиальные клетки, а также сохраняют способность дифференцироваться по меньшей мере в один дополнительный тип клеток, выбранный из группы, состоящей из

гладкомышечных клеток, клеток скелетных мышц, теноцитов, фибробластов, клеток волосяных фолликулов, клеток эндокринных желез и клеток эпителия, где клетки эпителия выбраны из группы, состоящей из

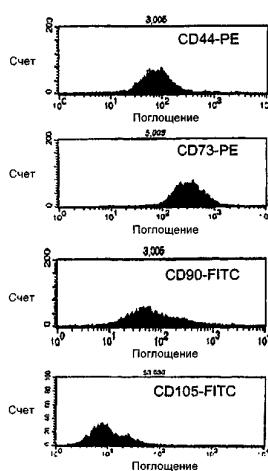
эпителиальных клеток конъюнктивы, кожных эпителиальных клеток, эпителиальных клеток роговицы, эпителиальных клеток сетчатки, эпителиальных клеток печени, эпителиальных клеток почки, эпителиальных клеток поджелудочной железы, эпителиальных клеток тонкой кишки, эпителиальных клеток толстой кишки, эпителиальных клеток мочевого пузыря, эпителиальных клеток матки, эпителиальных клеток глотки и эпителиальных клеток горлани.

12. Фармацевтическая или косметическая композиция, содержащая выделенную популяцию клеток-предшественников по п.11 и фармацевтически или косметически приемлемый носитель.

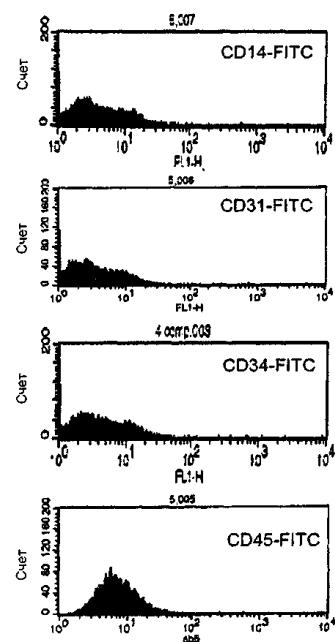
13. Способ лечения патологического состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение указанному субъекту композиции, содержащей клетки-предшественники, полученные способом по любому из пп.1-10.

14. Способ по п.13, где указанную композицию вводят посредством системного введения.

15. Способ по п.13 или 14, где указанное патологическое состояние представляет собой иммуномодуляторное расстройство или опухоль.



Фиг. 1



ФИГ. 2

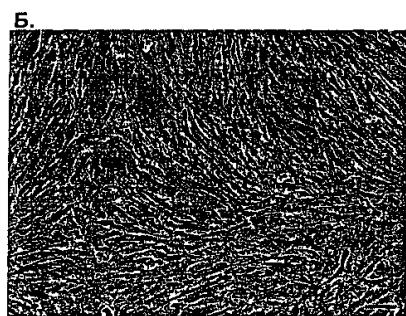
A.



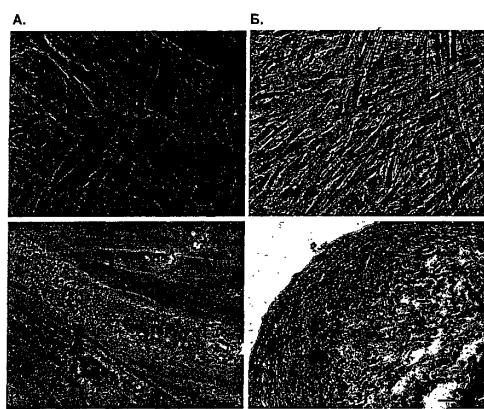
Б.



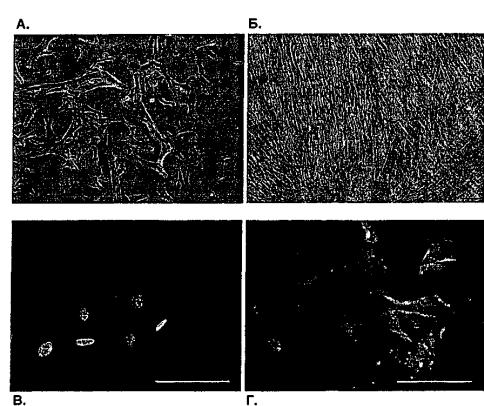
ФИГ. 3



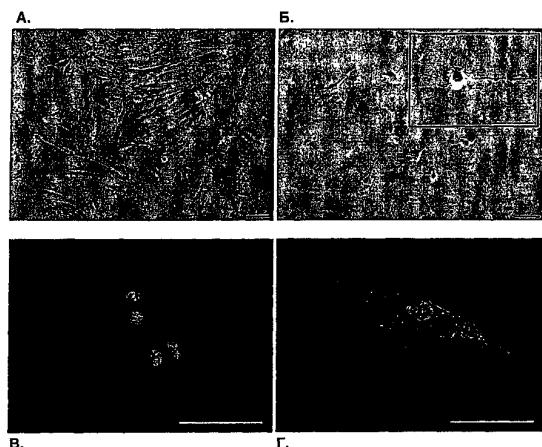
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Евразийская патентная организация, ЕАПО  
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2