

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201500099** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2016.05.31

(51) Int. Cl. **C12N 5/078** (2010.01)
C12N 5/0789 (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2014.11.27

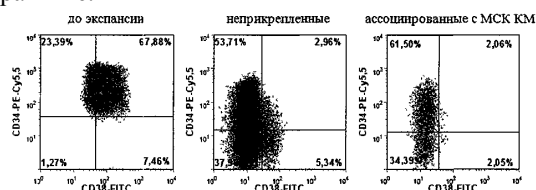
(54) СПОСОБ ЭКСПАНСИИ EX VIVO КРОВЕТВОРНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

(96) **2014/EA/0097 (BY) 2014.11.27**

(71) Заявитель:
**ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ
"РЕСПУБЛИКАНСКИЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ
ЦЕНТР ТРАНСФУЗИОЛОГИИ
И МЕДИЦИНСКИХ
БИОТЕХНОЛОГИЙ" (BY)**

(72) Изобретатель:
**Петёвка Наталья Васильевна, Васина
Елена Викторовна, Костюнина
Виктория Сергеевна (BY)**

(57) Изобретение относится к области клеточной биотехнологии. Предложен способ экспансии кроветворных клеток пуповинной или периферической крови на монослое культуры стромальных клеток костного мозга. Сокультивирование проводят в бессывороточной среде с ростовыми факторами при +37°C во влажной атмосфере воздуха с 5% CO₂ в течение 5-6 дней. Изобретение позволяет увеличить количество кроветворных стволовых клеток и миелоидных предшественников до 20-80 раз, 20-50% которых ассоциированы с монослоем. Способ позволяет сохранить и умножить кроветворные клетки с характеристиками долговременно и кратковременно репопулирующих костный мозг без изменения соотношения субпопуляций предшественников миелоидного ряда. Высокая жизнеспособность культур, а также исключение реагентов и клеток ксеногенного происхождения позволяет использовать способ в клинической практике.



A1

201500099

201500099

A1

Способ экспансии *ex vivo* кроветворных клеток человека

Предполагаемое изобретение относится к области клеточной биотехнологии, а более конкретно, к способу экспансии *ex vivo* кроветворных клеток и может быть использовано как в научных целях, так и в медицине для восстановления кроветворения у пациентов после высокодозной химиотерапии.

Трансплантацию кроветворных клеток проводят пациентам с гематологическими и онкологическими заболеваниями для восстановления кроветворения после высокодозной химиотерапии. Источником трансплантата могут быть костный мозг, периферическая кровь после мобилизации стволовых клеток, а так же пуповинная кровь. Наличие стволовых кроветворных клеток в трансплантате подтверждается содержанием клеток, одновременно экспонирующих поверхностные кластеры дифференцировки CD34 и CD45 или содержанием клеток, способных к колониеобразованию *in vitro* в полужидкой среде (колониеобразующие единицы, КОЕ). При этом положительным прогностическим фактором приживления трансплантата является наличие в нем не менее 2×10^6 CD34-положительных (CD34⁺) клеток в расчете на килограмм веса пациента. Низкое содержание CD34⁺ клеток в трансплантате приводит к длительному периоду постхимиотерапевтической цитопении и связанным с ней опасным для жизни пациентов осложнениям. В то время как основным ограничителем для использования кроветворных клеток костного мозга являются показатели иммунологической совместимости, для таких источников как пуповинная кровь, а в ряде случаев и аутологичная периферическая кровь, главным ограничителем остаётся недостаток кроветворных клеток в заготовленном трансплантате.

Проблему можно преодолеть размножением (экспансией) кроветворных клеток в условиях *ex vivo*. При этом технология экспансии должна обеспечивать оптимальное сохранение и пропорциональное умножение популяций CD34⁺ кроветворных клеток (как недифференцированных так и более поздних кроветворных предшественников всех миелоидных ростков кроветворения), способных к миграции в костный мозг, ассоциации со стромальным микроокружением и полноценному восстановлению кроветворения.

Известен ряд публикаций, в которых описаны способы увеличения *ex vivo* количества кроветворных клеток в суспензионной культуре с использованием сочетаний стимуляторов и ингибиторов клеточного деления и дифференцировки [1, 2]. В данных способах для регуляции пролиферации и дифференцировки кроветворных клеток используют большое количество дорогостоящих рекомбинантных факторов, многие из

которых (IL-3, IL-11, G-CSF, GM-CSF) стимулируют не только деление клеток, но и их преждевременное созревание, что снижает их потенциал восстановления кроветворения. Главным недостатком экспансии кроветворных клеток в суспензионной культуре (без использования стромального монослоя) является отсутствие сигналов к синтезу молекул адгезии, необходимых для последующего приживления клеток в костном мозге после трансплантации [3].

Известны способы экспансии кроветворных клеток костного мозга с использованием монослоя стромальных клеток, поддерживающего кроветворение. Авторами Jing D., Fonseca A.V., Alakei N показано, что поверхность стромального монослоя является главным местом пролиферации кроветворных клеток костного мозга *in vitro*, тогда как компартмент под слоем стромальных клеток имитирует нишу для сохранения ранних неделящихся стволовых клеток [4]. Теми же авторами показано, что кроветворные клетки, ассоциированные с монослоем стромальных клеток, экспрессируют более высокий уровень молекул адгезии и имеют более подходящие для трансплантации характеристики (более высокую миграционную способность и способность к самовоспроизведению, меньшую дифференцированность) [3].

Известен способ экспансии кроветворных клеток с использованием монослоя стромальной клеточной линии ксеногенного происхождения, в котором экспансию CD34⁺ клеток пуповинной крови человека производят в бессывороточной среде, где для формирования монослоя используют линию стромальных клеток костного мозга мыши OP9 [5].

Известен также способ экспансии кроветворных клеток с использованием монослоя клеток человека не костномозгового происхождения, в котором для поддержания экспансии CD34⁺ клеток костного мозга использованы кадаверные эндотелиальные клетки головного мозга человека [6]. В известном способе за семь дней культивирования только 10% кроветворных клеток ассоциировалось с монослоем. Во всех вышеперечисленных способах для получения стромального монослоя использовали ксеногенную телячью эмбриональную сыворотку, которая является источником чужеродных антигенов, способствующих развитию патологических иммунных реакций после трансплантации.

Среди известных источников стромальных клеток для формирования монослоя наиболее привлекательными являются мезенхимные стромальные клетки костного мозга (МСК КМ) человека. МСК КМ являются частью естественного микроокружения кроветворных клеток, взаимодействие с ними позволяет сохранить целевые рецепторы адгезии и хоуминга. Существуют методы экспансии кроветворных клеток в присутствии монослоя МСК КМ, однако в большинстве способов для его получения также используют

ксеногенную телячью эмбриональную сыворотку или сыворотку крови лошади [3, 4, 7-9]. В некоторых случаях, чтобы избежать при длительном сокультивировании избыточной пролиферации стромальных клеток монослоя, его предварительно облучают [9], или обрабатывают антимиотогенами [10], что приводит к невозможности дальнейшего клинического использования кроветворных клеток, оставшихся ассоциированными с монослоем после экспансии.

Экспансия во всех вышеперечисленных способах суспензионного культивирования, или сокультивирования на стромальном монослое длится от 7 до 14 дней. После длительной экспансии большинство кроветворных клеток теряет способность к ассоциации со стромальным монослоем. В работе Robinson N, [8] при общем увеличении CD34⁺ клеток пуповинной крови в 8 раз только 1% кроветворных клеток был ассоциирован с монослоем МСК КМ. Кроме того, культивирование свыше 7 дней способствует смещению субпопуляционного состава миелоидных предшественников в сторону увеличения предшественников гранулоцитарно-моноцитарного ряда и относительного уменьшения эритроидных и мегакариоцитарных предшественников [10, 11].

Таким образом, известные способы экспансии кроветворных клеток способствуют утере необходимых молекул адгезии на большей их части, смещению субпопуляционного состава предшественников миелопоэза, либо используют клеточные линии или сыворотки ксеногенного происхождения.

Известен способ экспансии мононуклеарных клеток пуповинной крови в присутствии монослоя мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани до достижения монослоя, добавление суспензии пкМНК к монослою ММСК, культивирование в течение 72 часов при концентрации O₂ в среде 5%, отбор непрекрепленных пкМНК и замену среды, продолжение культивирования ММСК с прикрепившимися к ним пкМНК в течение 7 дней при концентрации O₂ в среде 5%. [12]

Полученные по этому способу, ассоциированные с МСК жировой ткани мононуклеары пуповинной крови, содержат менее 40% CD34⁺ клеток, не охарактеризованы по их общему приросту, составу миелоидных предшественников, имеют низкую жизнеспособность (78±15%) и культивированы в присутствии сыворотки ксеногенного происхождения, что может препятствовать их клиническому применению.

Задачей предполагаемого изобретения является создание способа эффективной сбалансированной экспансии кроветворных клеток без использования реагентов ксеногенного происхождения, при котором ассоциированная с монослоем стромальных клеток субпопуляция будет максимально сохранена и приумножена.

Поставленная задача решается тем, что способ экспансии *ex vivo* кроветворных клеток человека включает предварительное культивирование стромальных клеток из костного мозга пациента в питательной среде с 5% сыворотки крови человека группы АВ(IV) до монослоя, добавление к монослою суспензии CD34⁺ клеток крови, совместное культивирование в бессывороточной среде с комбинацией факторов роста SCF (50-100 нг/мл), Flt3-лиганд (Flt3L) (50-100 нг/мл), TPO (20-30 нг/мл) или SCF (50-100 нг/мл), Flt3L (50-100 нг/мл), IL-3 (5-15 нг/мл) в течение 3-х дней при 37°C и 5% CO₂, добавление половинного объёма бессывороточной среды с факторами роста и продолжение сокультивирования в течение 1-2 дней, добавление половины первоначального объёма бессывороточной среды и культивирования в течение 1 дня, открепление ассоциированных кроветворных и стромальных клеток и объединение их с неприкрепленными клетками. В качестве источника CD34⁺ клеток крови используется периферическая или пуповинная кровь человека. В качестве источника стромальных клеток используются мезенхимные стромальные клетки, эндотелиальные клетки, коммитированные в остеогенном направлении мезенхимные стромальные клетки, либо смесь вышеуказанных популяций клеток костного мозга.

Использование для получения стромального монослоя любых адгезивных клеток костного мозга, а еще лучше – смеси клеток, полученных различными методами, стимулирует сохранение на кроветворных клетках целевых молекул адгезии, с помощью которых кроветворные клетки смогут закрепиться в костномозговой нише. Экспериментально нами установлено, что при использовании МСК КМ, полученных различными способами, высокий процент (20-50%) кроветворных клеток ассоциирует с монослоем после их 20-40-кратной экспансии. Добавление факторов SCF и Flt3-лиганда, стимулирует активность тирозинкиназ, способствует пролиферации стволовых кроветворных клеток в культуре. Тромбопоэтин (TPO) или интерлейкин-3 (IL-3) в комбинации с SCF и Flt3L также синергично стимулируют пролиферацию кроветворных клеток. Синергичный эффект производят также ростовые факторы, секретлируемые стромальными клетками монослоя, что позволяет ограничиться в данном способе добавлением комбинации всего трёх факторов. Экспериментально определено, что добавление комбинации данных факторов в вышеуказанных концентрациях на 0-й и 3-й день сокультивирования приводит к пропорциональной пролиферации ранних и более поздних олиго-, би- и унипотентных предшественников миелоидного роста кроветворения, в том числе и способных к ассоциации со стромальным микроокружением, по истечении 5-6 дней. Также подтверждено, что добавление

бессывороточной среды без факторов роста за день до прекращения культивирования увеличивает пролиферацию клеток за счет разбавления накопленных метаболитов и пополнения питательных веществ. Способ не включает использование реагентов ксеногенного происхождения, что позволяет применять его в клинической практике.

На фиг. 1 представлен внешний вид совместной культуры CD34⁺ клеток периферической крови и аутологичных МСК КМ человека на третий (А) и шестой (Б) дни. Видны темные веретеновидные МСК КМ и темные круглые кроветворные клетки, ассоциированные с МСК КМ, а так же светлые круглые неприкрепленные кроветворные клетки.

На фиг. 2 представлено распределение (%) бурстобразующих единиц эритроцитов (БОЕ-Э), колониеобразующих единиц гранулоцитов (КОЕ-Г), макрофагов (КОЕ-М), бипотентных колониеобразующих единиц гранулоцитов-макрофагов (КОЕ-ГМ) и олигопотентных колониеобразующих единиц эритроцитов, гранулоцитов, моноцитов и мегакариоцитов (КОЕ-ГЭММ) среди неприкрепленных и ассоциированных со стромальным монослоем клеток периферической крови после шести дней экспансии.

На фиг. 3 представлен субпопуляционный состав уни-, би- и олигопотентных предшественников миелоидного ряда, выявленный КОЕ-тестом в объединенной популяции неприкрепленных и ассоциированных со стромальным монослоем клеток периферической крови после экспансии в сравнении с аналогичным составом предшественников костного мозга, не подвергавшихся экспансии. Числовые значения отражают усредненное процентное содержание бурстобразующих и колониеобразующих единиц эритроцитов (БОЕ-Э+КОЕ-Э), колониеобразующих единиц гранулоцитов (КОЕ-Г), макрофагов (КОЕ-М), бипотентных колониеобразующих единиц гранулоцитов-макрофагов (КОЕ-ГМ) и олигопотентных колониеобразующих единиц эритроцитов, гранулоцитов, моноцитов и мегакариоцитов (КОЕ-ГЭММ).

На фиг. 4 представлен дот-плот анализ распределения кластеров дифференцировки CD34 и CD41 на неприкрепленных (А) и ассоциированных с МСК КМ (Б) кроветворных клетках периферической крови, после экспансии.

На фиг. 5 представлено содержание КОЕ мегакариоцитов в фракциях клеток периферической крови до и после экспансии.

На фиг. 6 представлен дот-плот анализ распределения кластеров дифференцировки CD34 и CD45 на клетках образца пуповинной крови до (А) и после экспансии (Б)

На фиг. 7 представлен дот-плот анализ распределения кластеров дифференцировки CD34 и CD38 на неприкрепленных (Б) и ассоциированных со стромальным монослоем (В)

кроветворных клетках пуповинной крови после экспансии в сравнении с распределением до экспансии (А)

На фиг. 8 представлены бурстобразующие эритроидные колонии (БОЕ-Э) и смешанные колонии олигопотентных миелоидных предшественников гранулоцитов, эритроцитов, моноцитов и мегакариоцитов (КОЕ-ГЭММ), полученные в результате LTC-IC-теста кроветворных клеток пуповинной крови, ассоциированных со стромальным монослоем.

Осуществление способа.

Все процедуры (действия) проводят в стерильных условиях.

В качестве источника клеток для монослоя используют мезенхимные стромальные клетки (МСК), эндотелиальные клетки, коммитированные в остеогенном направлении МСК, либо смесь вышеуказанных популяций клеток костного мозга. Культуру эндотелиальных клеток получают по протоколу Martin-Ramirez [13], коммитированные в остеогенном направлении МСК как описано в работе Космачевой С.М. [14]. Все перечисленные методы получения культур стромальных клеток выполняются с модификацией: вместо телячьей эмбриональной сыворотки используют 5% сыворотки крови человека группы АВ(IV), полученной как описано Игнатенко С.И., 2012 [15]. Стромальные клетки после первого субкультивирования засевают для получения монослоя в питательной среде с добавлением 5% сыворотки крови человека группы АВ(IV). Перед внесением кроветворных клеток питательную среду меняют на бессывороточную среду StemSpan H3000 (StemCell Technologies, Канада) или другую, предназначенную для культивирования кроветворных клеток, в количестве 200 мкл/см². Обогащенную CD34⁺ клетками фракцию получают из лейкоцитарного концентрата или мононуклеарной фракции периферической, либо пуповинной крови человека с помощью набора для положительной иммуномагнитной сепарации (EasySep StemCell Technologies, Канада, или MACS, Myltenyi Biotec, Германия) согласно инструкции производителя с модификациями: вместо 2% телячьей эмбриональной сыворотки используют сывороточный альбумин человека в концентрации 0,5%. Оценку эффективности сепарации и экспансии проводят после подсчета клеток и исследования экспрессии поверхностных маркеров CD34 и CD45 методом проточной цитометрии.

На монослой стромальных клеток костного мозга засевают полученные после сепарации CD34⁺ клетки пуповинной крови в концентрации 5 тыс. клеток/см² или периферической крови в концентрации 10 тыс. клеток/см². Сокультивирование проводят при 37°C и 5% CO₂ в бессывороточной среде с добавлением комбинации факторов роста SCF (50-100

нг/мл), Flt3L (50-100 нг/мл), TPO (20-30 нг/мл) или SCF (50-100 нг/мл), Flt3L (50-100 нг/мл), IL-3 (5-15 нг/мл). На 3 день добавляют ½ от первоначального объема бессывороточной среды с факторами роста (100 мкл/см²) и продолжают культивирование 1-2 дня. На 4-5 день добавляют ½ (100 мкл/см²) от первоначального объема бессывороточной среды без факторов роста и культивирование продолжают еще 1 день. Ассоциированные кроветворные и стромальные клетки открепляют с помощью 0,25% раствора трипсин-ЭДТА (Invitrogen, США) и объединяют с неприкрепленными клетками.

Пример 1. Экспансия *ex vivo* CD34⁺ кроветворных клеток периферической крови на монослой аутологичных МСК пациента с множественной миеломой.

Культуру МСК различной степени зрелости получали параллельно двумя методами: прямой адгезией клеток разведенного в 5-10 раз питательной средой MEM-α аспирата цельного костного мозга и адгезией мононуклеарной фракции клеток костного мозга [16]. Стромальные клетки объединяли после первого субкультивирования и рассевали для получения монослоя.

Иммуномагнитную CD34⁺ сепарацию лейкоконцентрата периферической крови пациента проводили с помощью набора EasySep производства StemCell Technologies, содержание CD34⁺ кроветворных клеток в клеточной смеси после сепарации составило 91%. Полученные CD34⁺ кроветворные клетки периферической крови высевали на монослой аутологичных МСК КМ в концентрации 10⁴ клеток/см² и культивировали в бессывороточной среде Stem Span (StemCell Technologies) в присутствии факторов роста SCF 100 нг/мл, Flt-3 ligand 100 нг/мл и TPO 25 нг/мл, 200 мкл/см². На 3 день добавляют ½ от первоначального объема бессывороточной среды с факторами роста) и продолжают культивирование 2 дня. На 5 день добавляют еще 100 мкл/см² бессывороточной среды без факторов роста и культивирование продолжают еще 1 день. На фигуре 1 представлена фазово-контрастная микроскопия культуры на 3-й день перед повторным добавлением ростовой среды с факторами роста и на 6-й день.

К 6-му дню культивирования более 60% кроветворных клеток экспрессировало CD34, общее количество кроветворных клеток увеличилось в 18,5 раз, из них CD34⁺ клеток - в 13,4 раза. Около 41% кроветворных клеток были ассоциированы с монослоем МСК КМ. В таблице 1 представлено распределение поверхностных кластеров дифференцировки стволовых кроветворных клеток, полученное методом проточной цитометрии. Как видно из таблицы 1, среди ассоциированных с монослоем МСК КМ кроветворных клеток было больше несущих маркеры стволовых, в сравнении с неприкрепленными кроветворными клетками.

Таблица 1.

Фенотип стволовых кроветворных клеток	Содержание клеток до экспансии, %	Содержание клеток в субпопуляциях после экспансии, %	
		неприкрепленные кроветворные клетки	кроветворные клетки, ассоциированные со стромальными
CD34 ⁺ CD90 ⁺	0,1	0,19	0,42
CD34 ⁺ CD33 ⁻	0,28	0,5	8,5
CD34 ⁺ CD38 ⁻	0,05	7	13

Пример 2. Экспансия *ex vivo* CD34⁺ кроветворных клеток периферической крови пациента с множественной миеломой на монослое МСК КМ здорового донора.

Экспансию CD34⁺ клеток пациента с множественной миеломой проводили на монослое МСК КМ здорового донора. Субпопуляционный состав олиго-, би- и унипотентных предшественников миелоидного ряда исследовали методом колониеобразующего теста (КОЕ-тест) в полужидкой среде с цитокинами MethoCult Classic H4434 (StemCell Technologies, Канада) в соответствии с инструкцией производителя. Состав и количество колониеобразующих единиц определяли среди кроветворных клеток пациента до и после экспансии.

Общее количество КОЕ после экспансии увеличивалось в 4,5 раза. Как неприкрепленные, так и ассоциированные с монослоем МСК КМ кроветворные клетки содержали в своем составе олиго-, би- и унипотентные предшественники миелоидного ряда, однако распределение отдельных типов предшественников в культуре было неравномерным (фиг.2). Около 80% всех эритроидных предшественников находилось среди неприкрепленных клеток, в то время как 50% КОЕ-ГМ были ассоциированы с МСК КМ. В объединённой смеси неприкрепленных и ассоциированных с монослоем МСК КМ клеток субпопуляционный состав предшественников различных ростков кроветворения совпадал с исходным распределением КОЕ в костном мозге пациента (фиг.3).

К 6-му дню экспансии количество ранних мегакариоцитарных предшественников с фенотипом CD34⁺CD41⁺ увеличивалось в 72,1 раза, при этом среди ассоциированных с МСК КМ кроветворных клеток процент CD34⁺CD41⁺ был в 5,7 раз выше (фиг.4). Дополнительно содержание предшественников тромбоцитарного ростка кроветворения исследовали КОЕ-тестом в среде MegaCult (StemCell Technologies, Канада), предназначенной для детекции колоний мегакариоцитов. Содержание КОЕ

мегакариоцитов среди кроветворных клеток, ассоциированных с МСК КМ, было больше, чем среди неприкрепленных кроветворных клеток (фиг.5).

Как видно из примера 1 и 2 наряду с сохранением ранних недифференцированных клеток, заявляемый метод экспансии позволяет пропорционально умножить популяции ранних и более поздних олиго-, би- и унипотентных кроветворных предшественников всех миелоидных ростков кроветворения. Стромальный монослой является основным местом образования мегакариоцитарных предшественников, в то время как основной пул эритроидных предшественников обнаруживается среди неприкрепленных кроветворных клеток.

Пример 3. Экспансия *ex vivo* кроветворных клеток пуповинной крови на монослой МСК КМ здорового донора.

Экспансию CD34⁺ кроветворных клеток пуповинной крови проводили на монослой МСК КМ здорового донора в бессывороточной среде StemSpan с добавлением факторов роста SCF 100 нг/мл, Flt-3 ligand 100 нг/мл и TPO 25 нг/мл так же, как в примере 1. К 6-му дню культивирования общее количество клеток увеличивалось в 42,7±10,4 раза, CD34⁺ клеток в 29,4±14,2 раза и КОЕ в 53,4±28,1 раз (n=4), относительное содержание CD34⁺ клеток уменьшалось (фиг. 6) в среднем с 74±18% до 45±12% (n=7). После экспансии 25% кроветворных клеток пуповинной крови ассоциировало с монослой МСК КМ. Данная фракция содержала 24±20% от всех CD34⁺ клеток (n=5) и 16±5% от всех КОЕ (n=5). Возрастало количество кроветворных клеток, несущих кластеры дифференцировки, характерные для ранних стволовых клеток (CD34⁺CD38⁻). Среди ассоциированных со стромальным монослой кроветворных клеток их доля также была больше в сравнении с неприкрепленными кроветворными клетками (фиг. 7).

Клетки, способные к долговременному восстановлению кроветворения выявляли *in vitro* в КОЕ-тесте после предварительного культивирования в среде MyeloCult (StemCell Technologies, Канада), в течение 5 недель (стандартный LTC-IC-тест [17]). При анализе LTC-IC-тестом неприкрепленных кроветворных клеток после экспансии, наблюдали образование мелких колоний гранулоцитарно-макрофагального ростка. В популяции кроветворных клеток, ассоциированных с монослой, кроме гранулоцитарно-макрофагальных выявлялись эритроидные и смешанные колонии КОЕ-ГЭММ (фиг. 8), что свидетельствует о сохранении в данной популяции ранних стволовых кроветворных клеток, долговременно репопулирующих костный мозг. Количество выявляемых в LTC-IC-тесте колоний на 1 тыс. кроветворных клеток до и после сокультивирования достоверно не отличалось и составляло в среднем 18±11,5 и 16,2±14,1 соответственно (n=3).

Экспансия кроветворных клеток пуповинной крови по описываемому способу способствовала сохранению высокой жизнеспособности как кроветворных клеток, так и МСК КМ (табл. 2). Количество клеток в апоптозе определялось методом проточной цитометрии по флуоресцентному окрашиванию клеток на Ann-5 и 7AAD. Содержание апоптотических клеток как в раннем (Ann-5⁺ 7AAD⁻), так и в позднем апоптозе (Ann-5⁺ 7AAD⁺) было незначительным как среди МСК КМ, так и среди кроветворных клеток.

Таблица 2

Жизнеспособность клеток пуповинной крови и МСК КМ после шестидневного совместного культивирования.

	МСК КМ	Пуповинная кровь
Живые клетки, %	92±6	97,6±0,4
Ранний апоптоз, Ann ⁺ 7AAD ⁻ , %	4,1±3,4	1,8±0,8
Поздний апоптоз, Ann ⁺ 7AAD ⁺ , %	4,0±2,8	0,5±0,4

Таким образом, заявляемый способ экспансии кроветворных клеток на монослое стромальных клеток КМ позволяет решить поставленную задачу значительного прироста CD34⁺ кроветворных клеток (10-43 раз) и колониобразующих предшественников (5-80 раз) как пуповинной, так и периферической крови. Сохранение высокого удельного содержания ассоциированных со стромальным монослоем CD34⁺ клеток и КОЕ при высоком их общем приросте и сохранении субпопуляционного состава отличает данный способ экспансии от способов, описанных ранее. Высокая жизнеспособность культур, а так же исключение реагентов и клеток ксеногенного происхождения позволяет использовать способ в клинической практике.

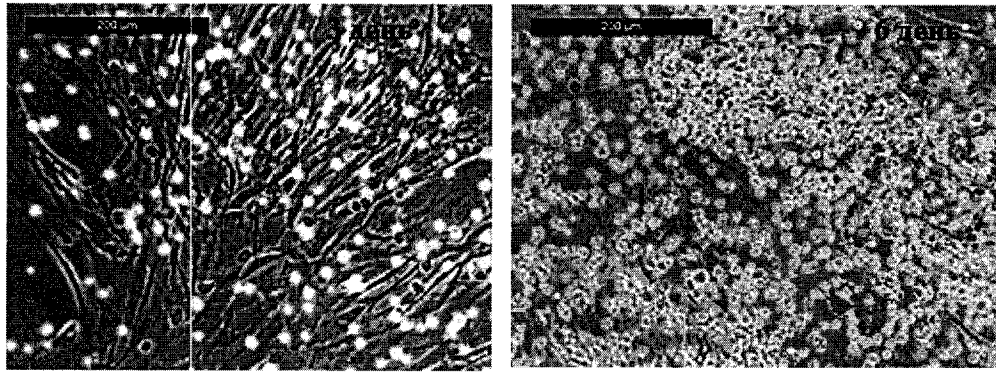
Источники информации, принятые во внимание при оформлении заявки:

1. Патент РФ RU 2360965, МПК C12N 5/08, опубл. 10.07.2009 г.
2. Патент США US 7723106, МПК C12N 5/00, опубл. 25.05.2010 г.
3. Alakel N., Jing D., Muller K. et al. // Exp Hematol. – 2009. – Т. 37 (4). – С. 504-513.
4. Jing D., Fonseca A.V., Alakel N., et al. // Haematologica. – 2010. – Т. 95 (4). – С. 542-550.
5. Патент РФ RU 2469086, МПК C12N 5/0789, опубл. 19.12.2011 г.
6. Патент США US 6642049, МПК C12N 5/0789, опубл. 04.11.2003 г.

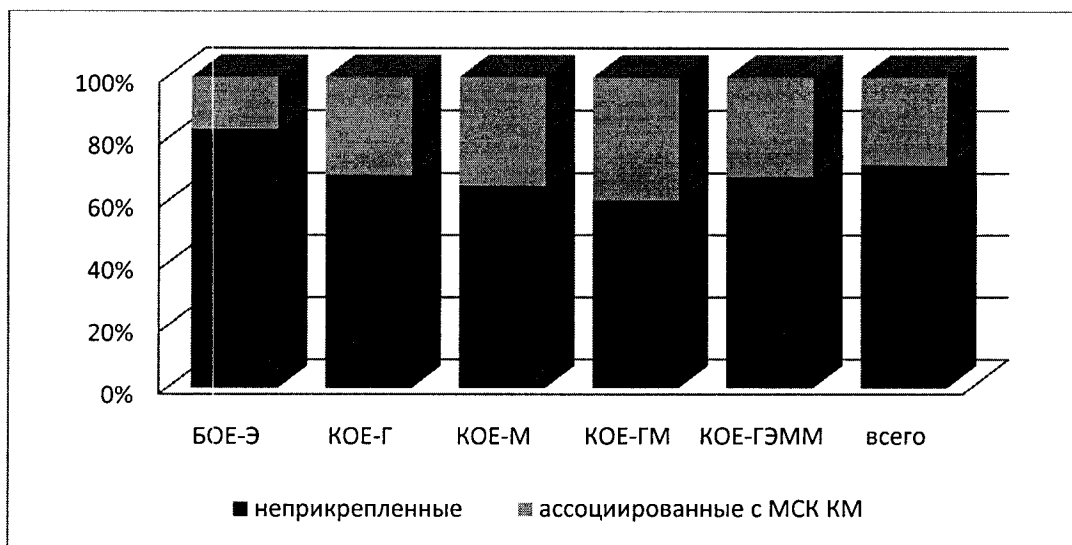
7. De Lima M., McNiece I., Robinson S.N. et al. // *N Engl J Med.* – 2012. – Т. 367 (24). – С. 2305-2315.
8. Robinson S.N., Ng J., Niu T. et al. // *Bone Marrow Transplant.* – 2006. – Т. 37 (4) – С. 359–366.
9. Yamaguchi M., Hirayama F., Kanai M. et al. // *Exp Hematol.* – 2001. – Т. 29 (2). – С.174-182.
10. Петёвка Н.В., Гончарова Н.В., Северин И.Н. и др. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* – 2012. – Т. 7 (1). – С. 40-48.
11. Boiron J., Dazey B., Cailliot C. et al. // *Transfusion.* – 2006. – Т. 46 (11). – С.1934-1942.
12. Патент РФ RU 2525143, МПК C12N 5/02, 5/07, опубл. 10.08.2014 г.
13. Martin-Ramirez J., Hofman M., van den Biggelaar M. et al. // *Nature protocols.* – 2012. - Т. 7 (9). – С. 1709-1715.
14. Космачева С.М., Данилкович Н.Н., Щепень А.В. и др. // *Клеточные технологии в биологии и медицине.* – 2013. – Т. 4. – С. 210-216.
15. Игнатенко С.И., Космачева С.М., Гончарова Н.В. // *Медицина.* – 2012. – Т. 4 – С.90-92.
16. Игнатенко С.И., Космачева С.М., Петевка Н.В., Потапнев М.П. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* - 2010. –Т. 5 (3). – С. 30-31.
17. Human Long-Term Culture-Initiating Cell (LTC-IC). Assay Technical Manual. // http://www.stemcell.com/en/Technical-Resources/db5a9/28412_ltc_ic-H.aspx.

Формула изобретения

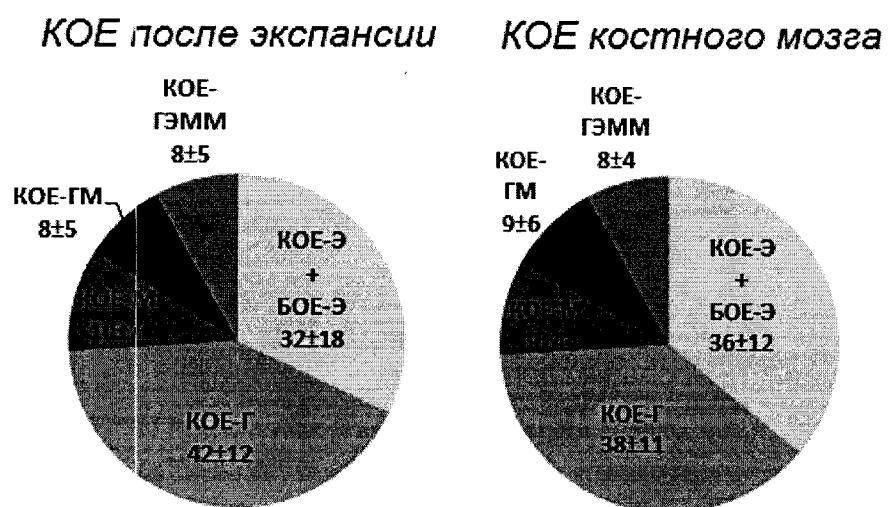
1. Способ экспансии *ex vivo* кроветворных клеток человека, включает предварительное культивирование стромальных клеток из костного мозга пациента в питательной среде с 5% сыворотки крови человека группы АВ(IV) до монослоя, добавление к монослою суспензии CD34⁺ клеток крови, совместное культивирование в бессывороточной среде с комбинацией факторов роста SCF (50-100 нг/мл), Flt-3Ligand (50-100 нг/мл), TPO (20-30 нг/мл) или SCF (50-100 нг/мл), Flt-3Ligand (50-100 нг/мл), IL-3 (5-15 нг/мл) в течение 3-х дней при 37°C и 5% CO₂, добавление половинного объёма бессывороточной среды с факторами роста и продолжение сокультивирования в течение 1-2 дней, добавление половины первоначального объёма бессывороточной среды и продолжение культивирования в течение 1 дня, открепление ассоциированных кроветворных и стромальных клеток и объединение их с неприкрепленными клетками.
2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве источника CD34⁺ клеток крови используют периферическую кровь человека.
3. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве источника CD34⁺ клеток крови используют пуповинная кровь человека.
4. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве стромальных клеток используют мезенхимные стромальные клетки, эндотелиальные клетки, коммитированные в остеогенном направлении мезенхимные клетки, либо смесь вышеуказанных популяций клеток костного мозга.



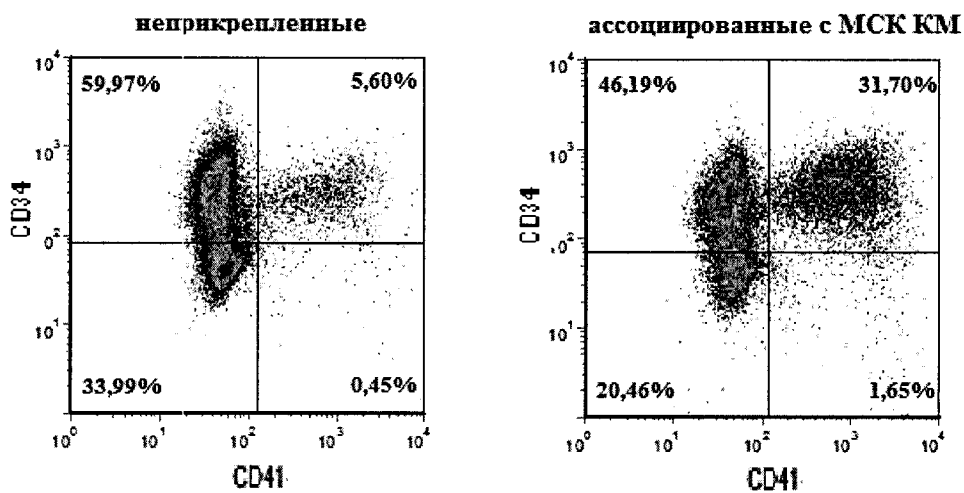
Фиг. 1



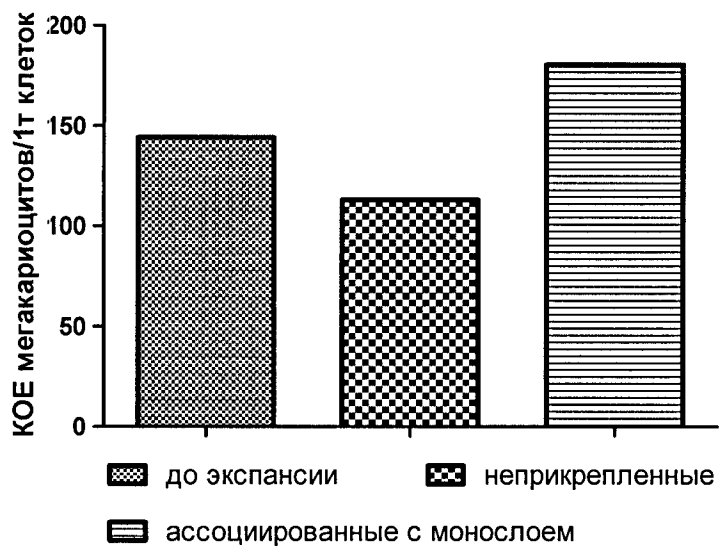
Фиг. 2



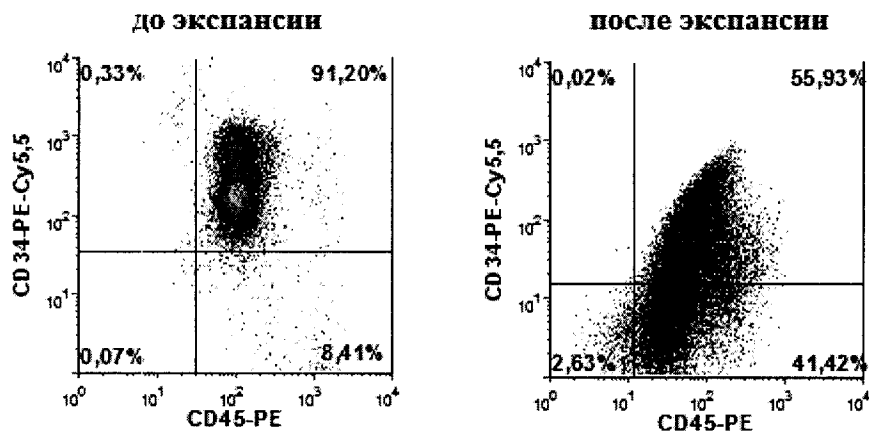
Фиг. 3



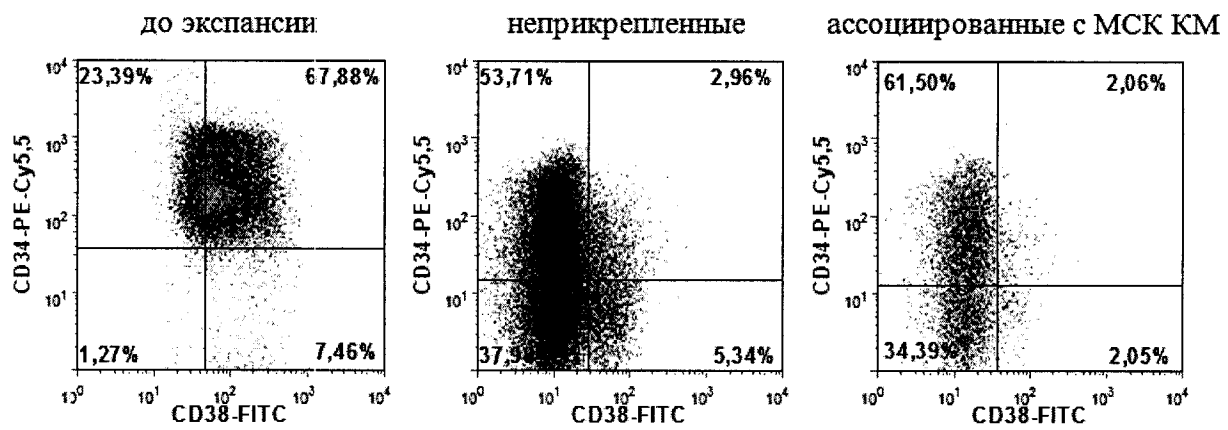
Фиг. 4



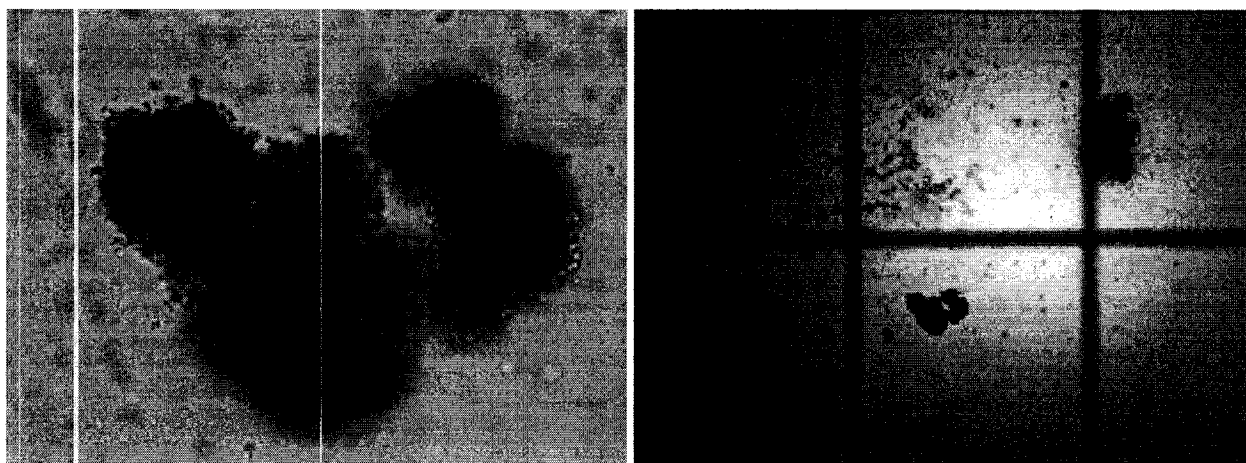
Фиг. 5.



Фиг.6



Фиг. 7



Фиг. 8

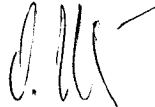
ЕВРАЗИЙСКОЕ ПАТЕНТНОЕ ВЕДОМСТВО

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ
ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42)

Номер евразийской заявки:

201500099

Дата подачи: 27 ноября 2014 (27.11.2014)		Дата испрашиваемого приоритета:	
Название изобретения: Способ экспансии ex vivo кроветворных клеток человека			
Заявитель: ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ "РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ТРАНСФУЗИОЛОГИИ И МЕДИЦИНСКИХ БИОТЕХНОЛОГИЙ"			
<input type="checkbox"/> Некоторые пункты формулы не подлежат поиску (см. раздел I дополнительного листа)			
<input type="checkbox"/> Единство изобретения не соблюдено (см. раздел II дополнительного листа)			
А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:		C12N 5/078 (2010.01) C12N 5/0789 (2010.01)	
Согласно Международной патентной классификации (МПК) или национальной классификации и МПК			
Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:			
Минимум просмотренной документации (система классификации и индексы МПК) C12N 5/078, 5/0789			
Другая проверенная документация в той мере, в какой она включена в область поиска:			
В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ			
Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №	
Y	ПЕТЁВКА Н.В. и др. Пролиферация и дифференцировка предшественников миелоидного ростка кроветворения пуповинной крови человека при экспансии in vitro. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2012, Том VII, №1, с. 40-48	1, 3, 4	
Y	КУЛЕМИНА О.В. и др. Ex vivo экспансия гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови и костного мозга при сокультивировании с мезенхимными стволовыми клетками. Цитология, 2011, Том 53, № 9, с. 736-737	1, 3, 4	
Y	RU 2469086 C1 (ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ "ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР "НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКИХ ПОЛУПРОДУКТОВ И КРАСИТЕЛЕЙ" и др.) 10.12.2012, формула, реферат, с. 2	1-4	
Y	ИГНАТЕНКО С.И. и др. Применение АВ[IV] - сыворотки для наращивания мультипотентных мезенхимных стромальных клеток человека. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия, 2010, Том V, № 3, с. 30-31	1-4	
<input type="checkbox"/> последующие документы указаны в продолжении графы В		<input type="checkbox"/> данные о патентах-аналогах указаны в приложении	
* Особые категории ссылочных документов:			
"А" документ, определяющий общий уровень техники		"Г" более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения	
"Е" более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее		"Х" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности	
"О" документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.		"У" документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории	
"Р" документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета		"&" документ, являющийся патентом-аналогом	
"D" документ, приведенный в евразийской заявке		"L" документ, приведенный в других целях	
Дата действительного завершения патентного поиска:		28 апреля 2015 (28.04.2015)	
Наименование и адрес Международного поискового органа: Федеральный институт промышленной собственности РФ, 125993, Москва, Г-59, ГСП-3, Бережковская наб., д. 30-1. Факс: (499) 243-3337, телетайп: 114818 ПОДАЧА		Уполномоченное лицо:  О.Шанова Телефон № (499) 240-25-91	