

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090133 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.04.15

(51) Int. Cl. *A61L 27/38* (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.06.22

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСПЛАНТИРУЕМОЙ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

(31) 17177756.8

(32) 2017.06.25

(33) EP

(86) PCT/EP2018/066819

(87) WO 2019/002148 2019.01.03

(71) Заявитель:
КО,ДОН АГ (DE)

(72) Изобретатель:

Роэль Джульетта, Капс Кристиан,
Эшен Клаудиа (DE)

(74) Представитель:

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способу получения хрящевой ткани посредством отбора и выбора хондроцитов или сфероидов и ее применению в качестве фармацевтической композиции, лекарственного средства, трансплантата. В частности, изобретение относится к маркерам для идентификации хондроцитов, пригодных для получения хрящевой ткани, в частности, для целей трансплантации.

A1

202090133

202090133

A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСПЛАНТИРУЕМОЙ ХРЯЩЕВОЙ ТКАНИ

Настоящее изобретение относится к способу получения хрящевой ткани путем отбора и выбора хондроцитов или сфероидов и к ее применению в качестве фармацевтической композиции, лекарственного средства или трансплантата. В частности, изобретение относится к маркерам для идентификации хондроцитов, пригодных для получения хрящевой ткани, в частности, для целей трансплантации.

Хотя суставный хрящ характеризуется примечательной сопротивляемостью, однако эта ткань не обладает или обладает только в очень незначительной степени способностью к самовосстановлению и регенерации, не подвергнутые лечению повреждения могут повлечь за собой, например, остеоартрит. Такой низкий потенциал самопроизвольной регенерации привел к развитию методов клеточной терапии, как, например, аутологичная трансплантация хондроцитов (АСТ), чтобы добиться функционального и безболезненного устранения дефектов суставных хрящей. Существует большая потребность в способах восстановления хрящей, например, у молодых активных пациентов с травматическими повреждениями или даже с симптомами дегенерации хрящей, или для лечения хрящевых дефектов.

Биохимическим и молекулярным исследованиям хондроцитов человека препятствовала целая череда факторов, таких, как недостаточное наличие ткани человека в сочетании с очень малым количеством клеток, предназначенных для биопсии, ограниченной способностью к пролиферации и фенотипической нестабильности культивированных хондроцитов.

Хондроцит (хрящевая клетка) – это клетка, происходящая из хондробластов и присутствующая в хрящевой ткани. Вместе с межклеточными веществами (внеклеточным матриксом (EZM)) хондроциты образуют основные компоненты хряща, в частности, суставного хряща.

Уже известно трехмерное культивирование, например, хрящевых клеток человека на подложке из агарозы посредством имитирования определенных процессов эмбрионального развития, так что возникают клеточные скопления, которые по своему статусу дифференциации превосходят монослойные клетки и обладают, например, свойствами, подобными свойствам хряща. Эти свойства, отражающие по возможности точно нативную ткань суставного хряща, характеризуются экспрессией коллагена II (основного структурного протеина внеклеточного матрикса стекловидного хряща), протеогликанов, например, аггрекана и внутриклеточного специфичного хондроцитного протеина S100.

Кроме того желательно, чтобы экспрессия коллагена I, который в фазе размножения клеток неизбежно регулируется в сторону увеличения в монослойной культуре, снова снижалась в скоплении клеток, поскольку данный протеин не содержится в нативном суставном хряще. Образующие таким образом скопления клеток (сфероиды) применяются заявителем с 2002 года при лечении и терапии вызванных повреждением дефектов хряща у молодых пациентов. С этой целью у пациента отбирается собственная ткань суставного хряща, а именно проводится биопсия стекловидного хряща, происходящего из участка здорового хряща. В результате ферментативного переваривания хрящевой ткани с помощью раствора коллагеназы находящиеся в хрящевой ткани хрящевые клетки (хондроциты) отделяются и размножаются в стандартных условиях клеточной культуры в склянках для клеточной культуры (монослойной культуры) в присутствии аутологичной сыворотки, и создается достаточное количество хондроцитов для получения трансплантируемой хрящевой ткани. Размножившиеся клетки образуют клеточные скопления, так называемые сфероиды, которые способны к трансплантации. Однако полученные таким образом клеточные скопления ограничены в своем статусе дифференциации и в большинстве случаев показывают относительно слабую локальную экспрессию важного коллагена II и несущественный синтез протеогликанов при относительно сильной экспрессии нежелательного коллагена I. Для дополнительного повышения дифференциации таких клеточных скоплений имеется возможность обогащения питательной среды определенными биоактивными веществами. К ним относятся прежде всего неоднократно описанные в литературе факторы роста TGF- β 1 – 3 и аскорбиновая кислота L (витамин C) в качестве кофактора для синтеза коллагена. Однако такая биохимическая стимуляция часто оказывается, во-первых, недостаточной для дифференцирования хрящевых клеток в трехмерном скоплении клеток настолько, чтобы возникали типичные хрящевые конструкции и, во-вторых, оспаривается возможность использования факторов роста, таких, как TGF- β , в частности, применение в клинике на человеке.

Культивирование человеческих клеток в виде трехмерных клеточных скоплений, например, в виде сфероидов, уже описано для клинического применения на человеке, например, в виде аутологичного хрящевого трансплантата в DE 100 13 223, в котором сообщается о способе для получения *in vitro* трехмерных хрящевых и костных тканей из костных, хрящевых или мезенхимных стволовых клеток. При этом клетки культивировали сначала в монослойной культуре и затем в суспензии настолько долго, пока не образовалось клеточное скопление, содержавшее по меньшей мере 40 об.% внеклеточного матрикса, в котором содержались дифференцированные клетки.

Данным способом клеточные скопления получают в результате того, что клетки культивируют в течение по меньшей мере 1 – 2 недель в сосудах для клеточных культур с покрытием из агарозы.

В US 7, 887, 843 B2 раскрыт способ получения *in vitro* трехмерной хрящевой и костной ткани, при этом трансплантируемые сфероиды из костных, хрящевых или мезенхимальных стволовых клеток получали в результате того, что 1×10^5 клеток культивировали на протяжении не менее двух недель.

Анндерер и др. (Anderer et al., Journal of Bone and Mineral Research (2002), New York, NY, US, т. 17, № 8, стр. 1420 – 1429) также раскрыли способ получения *in vitro* трехмерной хрящевой ткани. Согласно этому способу 1×10^5 или 2×10^5 хондроцитов культивируют в течение 5 суток, 2 недель, 1, 2 и 3 месяцев для получения сфероидов.

Описанные в уровне техники и полученные *in vitro* хрящевые ткани не имеют таких профилей экспрессии незаменимых матричных протеинов, таких как коллаген тип II, которые схожи с профилями в нативных тканях. Более того, состав внеклеточного матрикса (ECM), образуемого *in vitro* хондрацитами, заметно отличается от такового в нативной хрящевой ткани. Однако состав ECM имеет решающее значение для биологической функциональности хряща, например, для допустимой механической нагрузки. Поэтому отмечается потребность в новых способах получения хрящевой ткани, а также для контроля за качеством.

«Трансплантируемая хрящевая ткань» означает получение *ex-vivo* или с помощью способа *in vitro*, при этом полученная ткань по существу соответствует нативной ткани или является идентичной ей. В смысле данного изобретения трансплантируемая хрящевая ткань соответствует по существу нативной ткани, например, в части экспрессии или профиля экспрессии внеклеточного матрикса, например, в части экспрессии или профиля экспрессии структурных протеинов или протеидов, таких, как коллаген тип II и/или протеин S100 и/или тканевые специфичные протеогликаны, например, хрящевые специфичные протеогликаны, такие, как агрекан. Детекция экспрессии или профилей экспрессии может осуществляться, например, гистологически или иммуногистологически.

Ткань, из которой выделяют хондроциты, выбирается, например, из мышечно-скелетной ткани, скелетной ткани, хряща, костей, мениска, межпозвонкового диска, костного мозга, сустава или сухожилий. При этом полученная способом согласно изобретению трансплантируемая хрящевая ткань схожа с нативной тканью в части состава и экспрессии белков (см. выше).

В нативной ткани суставного хряща в состав внеклеточного матрикса входит вода в количестве от около 60 до 80% от сырого веса хрящевой ткани. Высокое содержание воды

важно для допустимой механической нагрузки на хрящевую ткань и вместе с протеогликанами существенно для обеспечения «эффекта губки». Наряду с водой в природном хрящевом суставе содержатся структурные белки или белки матрикса, такие, как коллагены, протеогликаны и не коллагеновые протеины. При этом на долю структурных макромолекул приходится от около 20 до 40% от сырого веса хрящевой ткани сустава.

В нативной хрящевой ткани сустава на долю коллагена приходится 60%, на долю протеогликанана – 25-35% и на долю не коллагенового протеина и гликопротеина – 15-20% от сухого веса хряща. Количество коллагена типа II составляет от около 90 до 95% от общего содержания коллагена в нативной хрящевой ткани сустава.

В нативной хрящевой ткани сустава человека содержится от около 1 до 5% хрящевых клеток (хондроцитов) от объема ткани. При этом хрящевые клетки являются незаменимыми продуцентами матричных молекул функциональной нативной ткани.

Существует большая потребность в производстве хондроцитов, обладающих достаточным качеством и являющихся способными образовывать приемлемую трансплантируемую хрящевую ткань, соответствующую нативной ткани, в результате чего возможно ожидать терапевтический успех. Такой терапевтический успех в значительной степени определяется качеством трансплантируемой хрящевой ткани.

Поэтому задача состоит в получении улучшенной трансплантируемой хрящевой ткани, в частности, обладающей улучшенными свойствами, в частности, достаточным качеством, такими, как идентичность с нативными хондроцитами и качественно улучшенными сфероидными, в результате чего можно было бы получить высококачественные трансплантаты, в частности, для успешного лечения и терапии дефектов суставного хряща.

Неожиданно авторами изобретения были идентифицированы маркеры в выделенных хондроцитах, которые обеспечивали достаточное качество при получении трансплантируемой хрящевой ткани. Маркеры согласно изобретению позволяют, в частности, определить идентичность хрящевых клеток («маркеры идентичности»), выделенных хондроцитов в культуре по отношению к нативным хондроцитам.

Подходящая идентичность хрящевых клеток позволяет в свою очередь получать приемлемую трансплантируемую хрящевую ткань, так как, с одной стороны, может быть получена достаточная хрящевой внеклеточный матрикс и, с другой стороны, может быть обеспечено улучшенное лечение дефектов суставного хряща.

Согласно другому варианту выполнения маркеры по изобретению позволяют определять степень чистоты или загрязнения выделенных хондроцитов или сфероидов

(«маркеры чистоты»).

Упомянутые выше маркеры обеспечивают достаточное качество и вследствие этого являются «маркерами качества».

Поэтому изобретение относится к способу отбора хондроцитов или сфероидов для получения трансплантируемой хрящевой ткани, при этом определяют по меньшей мере один маркер качества, или маркер идентичности, или маркер чистоты.

Способ согласно изобретению для отбора хондроцитов или сфероидов для получения трансплантируемой хрящевой ткани включает в себя первый этап, на котором хондроциты размножают в монослойной культуре (см. выше, в так называемой двухмерной растущей культуре), и второй этап, на котором происходит слияние в сфероиды (см. выше, так называемое трехмерное культивирование), в результате чего хондроциты объединяются в сфероиды, которые могут быть подвергнуты селекции.

Согласно предпочтительному варианту выполнения маркер качества, или маркер идентичности, или маркер чистоты выбирается из группы KAL1, CRTAC1, NRN1 или EBF3, которые (который) могут (может) быть определены (определен) *in vitro*.

Согласно предпочтительному варианту осуществления маркеры качества или маркеры идентичности выбирают из группы KAL1, CRTAC1, и/или маркерами чистоты являются EBF3, NBN1. В частности, синовиальные клетки являются нежелательными примесями, которые могут быть определены маркером чистоты EBF3 *in vitro*. Такие примеси снижают качество хондроцитов и сфероидов.

Согласно другому предпочтительному варианту выполнения наряду с приведенным выше маркером может применяться согласно изобретению так называемый маркер потенциала, который позволяет предсказать активность и способность к восстановлению получаемой трансплантируемой хрящевой ткани из сфероидов. Такими маркерами потенциала согласно изобретению являются предпочтительно протеогликаны, в частности, предпочтительно агреканы (ACAN).

Таблица 1. Маркерные гены согласно изобретению

Маркер	Доступ №	Обозначение	Функции для определения качества и отбора
CRTAC1	NM_018058	кислый белок 1 хряща (CRTAC1) Homo sapiens, транскрипт, вариант 1-я мРНК	Хондрогенный маркер идентификации для сфероидов
NRN1	NM_001278710	нейронин 1 (NRN1) Homo sapiens, транскрипт, вариант 2-я мРНК	Хондрогенный маркер чистоты для сфероидов
KAL1 (ANOS1)	NM_000216	аносмин 1 (ANOS1) Homo sapiens, мРНК	Хондрогенный маркер идентичности для монослойной культура
EBF3	NM_001005463	ранний В-клеточный фактор 3 (EBF3), Homo sapiens, мРНК	Хондрогенный маркер чистоты для сфероидов

ACAN	NM_001135	агрекан (ACAN), Homo sapiens, транскрипт, вариант 1, мРНК	Маркер потенциала для сфероидов.
------	-----------	---	----------------------------------

Соответствующие последовательности ДНК однозначно определяются через номер доступа (например, NCBI).

Определение маркеров согласно изобретению *in vitro* проводится предпочтительно посредством определения генной экспрессии таких маркеров, а также уровня генной экспрессии в выделенных хондроцитах и получаемых сфероидах, которые, например, обычно вступают в полимеразную цепную реакцию (PCR, в частности, количественную ПЦР (qPCR)), см. примеры.

Согласно изобретению маркеры указывают на генную экспрессию, повышенную или пониженную генную экспрессию в способе согласно изобретению, вследствие чего подтверждается пригодность в качестве маркеров.

Согласно другому предпочтительному варианту выполнения определение генной экспрессии или уровня генной экспрессии может происходить также в присутствии и в сравнении с эталонными генами и их генной экспрессией или с уровнем генной экспрессии. Это позволяет нормализовать генную экспрессию и ее количественную оценку при помощи программного обеспечения, см. Michael W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, Nucleic Acids Research, 2001, т. 29, № 9.

Таблица 2. Эталонные гены согласно изобретению

Эталонный ген	Доступ №	Обозначение	Функции при тестировании на качество и отбор
B2M	NM_004048	бета-2-микроглобулин (B2M), Homo sapiens мРНК	Эталонный ген
TOP1	NM_003286	топоизомераза (ДНК) I (TOP1), Homo sapiens мРНК	Эталонный ген

Соответствующие последовательности ДНК однозначно идентифицируются через номер доступа (например, NCBI).

В рамках настоящего изобретения «отбор» означает, что, например, отбрасываются те хондроциты или сфероиды, в которых отсутствует экспрессия генов маркеров согласно изобретению или имеется сравнительно низкая экспрессия этих генов или низкий уровень экспрессии этих генов по сравнению с другими хондроцитами или сфероидами. Средний специалист может различить более выраженную генную экспрессию и слабо выраженную генную экспрессию у одного или нескольких хондроцитов/сфероидов и отобрать такие хондроциты или сфероиды, соответственно.

Поэтому согласно другому предпочтительному варианту осуществления после размножения следует отбирать и выбирать такие выделенные хондроциты и полученные из них сфероиды, которые характеризуются следующими соотношениями генной

экспрессии к одному или обоим эталонным генам (R), а именно B2M и/или TOP1 :

$$\text{CRTAC1} / R > 0,003$$

$$\text{NRNI} / R \geq 0,1$$

$$\text{KAL1} / R > 1,0$$

$$\text{EBF3} / R \leq 0,4$$

$$\text{ACAN} / R \geq 0,29.$$

Другими предпочтительными соотношениями являются:

$$\text{CRTAC1} / R \geq 0,006, \text{ в частности, } \geq 0,009 \text{ и } \geq 0,012$$

$$\text{NRN1} / R \geq 0,2, \text{ в частности, } \geq 0,3 \text{ и } \geq 0,4$$

$$\text{KAL1} / R \geq 2,0, \text{ в частности, } \geq 3,0 \text{ и } \geq 4,0$$

$$\text{EBF3} / R \leq 0,3, \text{ в частности, } \leq 0,2 \text{ и } \leq 0,1$$

$$\text{ACAN} / R \geq 0,39, \text{ в частности, } \geq 0,49 \text{ и } \geq 0,59.$$

Приведенные значения считаются приемлемыми пороговыми значениями.

Поэтому изобретение относится к способу отбора хондроцитов или сфероидов для получения трансплантируемой хрящевой ткани, причем маркеры согласно изобретению определяют в сравнении с эталонным геном.

Согласно другому предпочтительному варианту выполнения в ходе проводимых определений маркера чистоты EBF3 доля синовиальных клеток в качестве примеси в выделенных сфероидах является по сравнению с общим числом клеток меньшей или равной 9%, в частности, меньшей или равной 5%.

Способ согласно изобретению позволяет производить отбор хондроцитов и сфероидов, которые специально выбирают для трансплантируемой хрящевой ткани. Это объясняется особыми свойствами маркеров согласно изобретению, а именно маркеров качества, или маркеров идентичности, или маркеров чистоты. Следовательно, выбираются такие хондроциты и сфероиды, которые обладают специфичной генной экспрессией, и соответствующие генные продукты могут быть детектированы, например, посредством PCR.

Поэтому изобретение относится к выделенным хондроцитам или выделенным и полученным сфероидом, производимым способом согласно изобретению. Кроме того, оно относится к трансплантируемой хрящевой ткани, в частности, в виде средства или лекарственного препарата или фармацевтической композиции с содержанием таких хондроцитов или сфероидов, в частности, для применения в лечении дефектов суставного хряща и/или при аутологичной трансплантации хондроцитов.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления изобретения трансплантируемую хрящевую ткань вводят пациенту с помощью аппликатора (см. EP

2345450 B1 (со. fix 150 заявителя) или DE 102009025347 A1). Предпочтительно трансплантируемую хрящевую ткань хранят в виде фармацевтической композиции, содержащей физиологический раствор с другими вспомогательными и добавочными веществами.

Приводимые ниже фигуры и примеры служат для пояснения изобретения, не ограничивая его.

Пример 1

Выделение хрящевых клеток (хондроцитов) при биопсии хряща и культивирование клеток

Специфичные для хряща клетки (хондроциты) были выделены при биопсии хряща посредством ферментативного переваривания с применением коллагеназы (350 единиц/мл). Ферментативное переваривание длилось от 4 до 6 часов и проводилось при 37°C. Проводили биопсию хряща мышелока коленного сустава бедренной кости. После ферментативного переваривания хондроциты центрифугировали, промыли, подсчитали и выселили в склянки для тканевых культур вместе со средой клеточной культуры (альфа MEM / Ham's F 12 1 : 1, 1% глутамина) и аутологичной сывороткой (10 – 15%-я сыворотка человека). Для разрастания клетки культивировали *in vitro* в течение 7 – 38 суток при 37 °C в двухмерной культуре разрастания (монослой). Замена клеточной культурной среды производилась через каждые 3 – 6 суток. Если клеточные культуры сливались, то с помощью папаина клеточную культуру пересеивали и распределяли по нескольким склянкам для культивирования.

По достижении достаточного количества клеток в монослойной культуре выселили по 200 000 клеток на лунку в пластинах с микротитрами, покрытых слоем 2%-ой агарозы. Клетки объединились и образовали трехмерную круглую структуру (сфероид). Во время культивирования сфероидов регулярно заменяли среду клеточной культуры (альфа MEM / Ham's F12 1 : 1; 1%-ый глутамин), которая была разбавлена 10%-ой аутологичной сывороткой (через 3 – 6 суток). Трехмерное культивирование продолжалось от 14 до 42 суток.

После культивирования сфероидов был подготовлен трансплантат из хрящевых клеток для доставки и имплантации, причем сфероиды накапливали в лекарственной основе (0,9%-ая NaCl) и затем перемещали в систему для нанесения со.fix 150 или шприц.

Таким образом, приготовление трансплантатов из хрящевых клеток состоит из фазы культивирования в монослой для размножения выделенных хондроцитов и фазы трехмерного культивирования для объединения хондроцитов в сфероиды. Трансплантат из хрящевых клеток предназначен для аутологичного применения, т. е. для имплантации в

колени того же пациента.

Пример 2

а) Выделение РНК

Хрящевые клетки культивировали до момента получения сфероидов в двухмерной разрастающейся культуре (монослой) и затем посредством ферментного раствора (папаина) отделяли от дна склянки с клеточной культурой и от клеточной ассоциации. 1×10^6 этих хрящевых клеток было отобрано из клеточной суспензии для проверки на идентичность и перемещено в реакционный сосуд, в то время как оставшиеся клетки были использованы для последующего приготовления сфероидов. Подходящие для проверки монослойные клетки были отделены центрифугированием и клеточный осадок лизировали в соответствующем буфере для лизиса (PeqGOLD, Peqlab), мгновенно заморозили и хранили до момента выделения РНК при -70°C . Для определения маркера на сфероидах из хрящевых клеток после двухнедельного культивирования с пластины с лунками были отобраны 8 сфероидов, они были промыты физиологическим раствором с фосфатным буфером (PBS) и лизированы посредством соответствующего буферного раствора для лизиса (PeqGOLD, Peqlab). Помещенные в раствор для лизиса сфероиды были механически гомогенизированы для оптимального вскрытия клеток с помощью шприца и полый иглы, при этом сфероиды забирали и возвращали обратно. После этого лизат мгновенно замораживали в жидком азоте и хранили до момента выделения РНК при -70°C .

Извлечение полной РНК из хрящевых клеток-сфероидов и монослойных хрящевых клеток производилось с помощью комплекта reeqGOLD Total RNA фирмы Peqlab или миникомплекта RNeasy Plus фирмы Qiagen с соблюдением инструкции изготовителя. Выделенную РНК элюировали в свободной от нуклеазы воде и хранили до момента синтеза кДНК при -70°C . После выделения РНК определяли количество, качество и целостность РНК с помощью спектрофотометра (NanoDrop, Thermo Scientific) и биоанализатора (Agilent) в соответствии с указаниями изготовителей.

б) Синтез кДНК

Синтез кДНК производился при помощи комплекта Transcriptor First Strand cDNA (Roche) в соответствии с указаниями изготовителя. По каждой пробе транскрибировали 80 нг полной РНК с применением random Hexamer-Primer. В стерильном реакционном сосуде была приготовлена эталонная смесь праймера для реакционного объема 20 мкл. В эталонную смесь праймера были пипетированы следующие дополнительные компоненты: буферный раствор Transcriptor Reverse Transcriptase Reaction, Protector RNase Inhibitor, Deoxynucleotide Mix, Transcriptor Reverse Transcriptase. Реакционные смеси смешали,

центрифугировали и затем инкубировали в термическом устройстве организации циклов. После этого реверсивно транскрибированную кДНК разбавили не содержащей нуклеазу водой до конечной концентрации 1 нг/мкл. Пробы хранились при -20°C до следующего применения в анализах количественной полимеразной цепной реакции (qPCR).

в) qPCR

При анализах посредством количественной полимеразной цепной реакции применялся методика qPCR с прибором II LightCycler® 480 (Roche) при формате с 384 лунками. Праймеры были очищены посредством жидкостной хроматографии высокого разрешения и растворены в свободной от нуклеазы воде до концентрации 10 мкМ. Зонды применяли при концентрации 10 мкМ. Для измеряемых маркеров были предварительно определены заданные условия qPCR в части концентрации праймера и зондов, а также применения добавок. Для всех проб была приготовлена исходная смесь в соответствии с условиями реакции специфичных праймеров. Соответственно, 8 мкл предназначенной для каждого целевого гена специфичной реакционной смеси пипетировали в соответствующее углубление в пластине с 384 лунками и затем добавили 2 мкл пробы кДНК (1 нг/мкл), в результате чего на qPCR пришелся общий объем в 10 мкл.

Анализ рPCR основывался на экспоненциальном росте флуоресцентно маркированных продуктов амплификации полимеразной цепной реакции интересующего гена. Анализ данных qPCR проводился с помощью программного обеспечения LightCycler® с применением программного модуля Advanced Relative Quantification (Roche). Применяемым форматом обнаружения служила так называемая программа Mono Color Hydrolyse Probe/UPL Probe со следующими параметрами: фильтр возбуждения 483 нм, эмиссионный фильтр 533 нм, комбинация фильтров для FAM; данные qPCR были получены с помощью модулей программного обеспечения для относительной количественной оценки и проанализированы. Абсолютные показатели qPCR (значения CP) по соответствующим целевым генам были получены методом Abs Quant/2nd Derivative Max. Показатель CP (точка пересечения или порог цикла) выражает количество циклов полимеразной цепной реакции, которые необходимы для превышения заданного порогового значения флуоресцентного сигнала. Регистрация флуоресцентного сигнала проводилась в конце каждого цикла при 72°C.

Нормализация уровня экспрессии мРНК целевых генов по отношению к эталонным генам проводилась посредством так называемого метода эффективности с применением модуля программного обеспечения Advanced Relative Quantification (Roche). При этом были также замерены два эталонных гена TOP1 и B2M в качестве внутреннего нормализующего контроля по каждой пробе. Экспрессия целевых генов нормировалась по

этим эталонным генам, и нормализованные данные были автоматически представлены в виде целевых/эталонных значений (T/R) модулем программного обеспечения Advanced Relative Quantification. Лежащая в основе этого модуля программного обеспечения математическая модель основана на соотношении между значениями C_p (точки пересечения) целевого гена при сравнении с эталонными генами и учитывает в числе прочего специфичную для праймера эффективность амплификации.

Нормализованные значения экспрессии используют для контроля за качеством трансплантатов из хрящевых клеток. Критические атрибуты качества представляют собой идентичность, чистоту и потенциал, при этом по каждому параметру качества был определен по меньшей мере один специфический маркер, который может измеряться для подтверждения достаточности качества. Нормализованные значения экспрессии маркера должны при этом соответствовать заданным пределам приемлемости для подтверждения достаточности качества. Значение параметров качества основывается на уровнях экспрессии мРНК в монослойных хрящевых клетках (KAL1) или монослойных сфероиде (CRTAC1, NRN1, EBF3, ACAN).

В таблице 3 показано применение описанной селекции для изделий хрящевого трансплантата. В целом было изготовлено 48 изделий хрящевого трансплантата, как было описано, и подвергнуто проверке на идентичность, чистоту (примеси) и потенциал с помощью маркеров согласно изобретению. Все 48 хрящевых трансплантатов соответствовали критериям идентичности в монослое (KAL1) и в сфероиде (CRTAC1). Четыре из 48 хрящевых трансплантатов не соответствовали критерию чистота (примеси) (EBF3, NRN1) и 19 из 48 хрящевых трансплантатов не соответствовали критерию потенциала. В целом 22 из 48 хрящевых трансплантатов не соответствовали критерию качества хрящевых клеток (идентичности, чистоты/примеси или потенциала). Двадцать шесть из 48 хрящевых трансплантатов удовлетворили критерию качества хрящевых клеток (идентичность, чистота/примеси или потенциал), были пригодны для получения трансплантируемой хрящевой ткани и были отобраны.

Таблица 3. Выбор по заданным пороговым значениям

Пациент, идентификатор	KAL1 уровни мРНК (T/R) в мл клеток	CRTAC1, уровни мРНК (T/R) в сфероиде	NRN1 уровни мРНК в сфероиде	EBF3, уровни мРНК (T/R) в сфероиде	Количество примеси в виде синовиоцитов в сфероиде, %	ACAN, уровни мРНК (T/R)	Пригодные допустимые пределы
	> 1,0	> 0,003	> 0,1	≤ 0,4	≤ 9%	≥ 0,29	Да/нет
2410	19,88	0,99	0,82	0,08	1,80	0,21	Нет
1312	25,97	2,54	1,42	0,08	1,70	0,44	Да
2601	15,07	1,2	0,94	0,07	1,50	0,35	Да
2277	16,17	0,44	0,93	0,05	1,00	0,29	Да

2417	52,17	1,20	2,46	0,07	1,60	1,45	Да
2418	40,96	0,54	1,54	0,19	4,30	0,98	Да
2420	13,80	0,92	1,46	0,04	0,80	0,81	Да
2424	3,48	3,14	1,18	0,04	0,90	0,23	Нет
2423	23,67	3,07	1,22	0,05	1,00	0,24	Нет
2294	152,60	0,50	0,87	0,07	1,60	2,22	Да
10540	18,20	0,88	1,80	0,08	1,68	0,89	Да
10541	9,10	0,52	1,38	0,05	1,03	0,96	Да
10542	18,00	0,60	0,86	0,02	0,36	0,25	Нет
10543	6,80	1,66	1,63	0,11	2,51	0,60	Да
10544	37,80	2,09	2,46	0,02	0,49	2,50	Да
10546	42,40	2,83	0,94	0,02	0,54	0,82	Да
10551	6,40	0,22	0,76	0,45	10,04	0,64	Нет
10552	7,50	0,38	1,84	0,02	0,49	0,04	Нет
10561	12,70	1,66	0,73	0,03	0,58	0,27	Нет
10562	6,70	1,94	2,01	0,01	0,11	0,22	Нет
10563	15,70	1,93	1,86	0,04	0,90	0,39	Да
10564	18,50	0,52	0,63	0,03	0,72	0,08	Нет
10566	49,10	2,24	2,40	0,04	0,78	1,34	Да
10567	2,40	0,95	0,57	0,02	0,54	0,19	Нет
10568	34,90	1,20	0,91	0,16	3,57	0,95	Да
10569	18,80	1,12	2,12	0,05	1,14	0,50	Да
10570	2,60	1,04	0,82	0,01	0,18	0,14	Нет
10571	23,90	0,80	1,58	0,01	0,27	0,87	Да
11637	32,90	0,35	1,31	0,18	3,94	4,86	Да
11638	1,30	0,08	0,63	0,60	13,37	0,35	Нет
11662	16,54	0,48	1,63	0,07	1,52	1,55	Да
11664	15,79	0,62	2,13	0,16	3,58	3,60	Да
11665	14,62	0,23	0,94	1,06	23,86	1,03	Нет
10025	3,32	0,55	0,41	0,28	6,21	0,31	Да
10049	31,12	0,13	1,61	0,06	1,28	1,18	Да
10058	4,94	0,28	0,39	0,08	1,86	0,06	Нет
10069	10,05	0,13	0,76	0,02	0,47	0,52	Да
10111	6,27	0,27	0,26	0,36	8,07	0,25	Нет
10112	1,01	0,86	0,21	1,44	32,29	0,04	Нет
10134	Не определено	0,18	0,1	0	0,00	0,29	Да
10138	5,25	0,86	0,52	0,15	3,41	0,07	Нет
10161	3,68	0,64	0,65	0,15	3,27	0,17	Нет
10162	1,79	0,84	Не определено	0,05	1,19	0,06	Нет
10187	1,41	0,37	0,65	0,07	1,50	0,24	Нет
10192	1,59	4,18	0,44	0,34	7,58	0,32	Да
10547	1,93	1,48	1,16	0,01	0,29	0,29	Да
10567	2,39	0,96	0,57	0,02	0,54	0,19	Нет
10570	2,57	1,04	0,82	0,01	0,18	0,14	Нет

ID – идентификатор; T/R = отношение целевого к эталонному.

Пример 3

Получение трансплантируемой хрящевой ткани посредством монослойной культуры размноженных хрящевых клеток заданного качества, здесь: идентичности.

У пациента с подлежащим лечению дефектом хряща из здоровой хрящевой области отобрали для биопсии стекловидный хрящ. В результате ферментативного переваривания хрящевой ткани раствором коллагеназы выделили содержащиеся в хрящевой ткани хрящевые клетки (хондроциты) и размножили в стандартных условиях клеточной

культуры в склянках для клеточной культуры (монослойная культура) в присутствии аутологичной сыворотки так, чтобы не был уровень удвоения популяции (PDL), равный 10, и получили достаточно хондроцитов для приготовления трансплантируемой хрящевой ткани. Часть размножившихся в монослое хрящевых клеток использовали для определения идентичности хрящевых клеток, а остальную часть – для приготовления трансплантируемой хрящевой ткани. Маркеры идентичности хрящевых клеток в монослойной культуре указал на то, что хрящевые клетки присутствуют в культуре этих клеток. Для определения идентичности хрящевых клеток в монослойной культуре общую РНК культивированных в монослое хондроцитов выделили посредством широко применяемых молекулярно-биологических приемов и с помощью обратной транскриптазы транскрибировали в кДНК. С помощью широко применяемой полимеразной цепной реакции определили экспрессию по меньшей мере одного эталонного гена (см. выше, таблица 2) и маркера идентичности “KAL1”. Экспрессию маркера “KAL1” определили по отношению к экспрессии эталонного гена и таким образом выявили нормализованное значение экспрессии гена для маркера идентичности “KAL1”. Экспрессия “KAL1” указала на то, что присутствовали хондроциты достаточного качества (идентичности), необходимого для получения трансплантируемой хрящевой ткани.

Для получения трансплантируемой хрящевой ткани по меньшей мере 100 000 размноженных в монокультуре хондроцитов достаточного качества (идентичности) перевели в сосуд для культивирования в присутствии стандартных питательных сред и аутологичной сыворотки. Сосуд с клеточной культурой не допускает благодаря, например, покрытию из агарозы его донной части прилипание хондроцитов. Через несколько дней хондроциты слиплись и образовали скопления, так называемые сфероиды. Сфероиды культивировали в течение по меньшей мере 1 – 2 недель и образовали хрящевой внеклеточный матрикс (сфероидную культуру). Эта хрящевая ткань (хондроциты достаточного качества (идентичности) и хрящевой внеклеточный матрикс) пригодна для образования замещающей хрящевой ткани после помещения на место дефекта хряща у подлежащего лечению пациента, заполнила дефектное место и выполняла функцию природной хрящевой ткани.

Хрящевая ткань недостаточного качества (идентичности в монослойной культуре) не пригодна для образования замещающей хрящевой ткани и отбраковывается.

Пример 4

Изготовление трансплантируемой хрящевой ткани с помощью находящихся в сфероидной культуре хрящевых клеток заданного качества, здесь, идентичности.

Выделенные в примере 3 и размноженные в монослое хрящевые клетки применили для изготовления трансплантируемой хрящевой ткани.

Как описано в примере 3, размноженные в монослое хондроциты поместили в специальный сосуд для клеточной культуры, в котором не происходило слипания хондроцитов, в результате чего через несколько дней образовались так называемые сфероиды. Сфероиды культивировали на протяжении не менее 1 – 2 недель и образовали хрящевой внеклеточный матрикс из сфероидной культуры.

Маркер идентичности хрящевых клеток в сфероидной культуре указал на то, что хрящевые клетки присутствовали в сфероидной культуре. Для определения идентичности хрящевых клеток в сфероидной культуре выделили с помощью широко применяемых молекулярно-биологических приемов общую РНК части культивируемых в сфероидах хондроцитов и транскрибировали с помощью обратной транскриптазы в кДНК. Посредством широко применяемой полимеразной цепной реакции определили экспрессию, по меньшей мере, одного эталонного гена (см. выше, таблица 2) и маркера идентичности “CRTACI”. Экспрессию “CRTACI” соотнесли с экспрессией эталонного гена и таким образом выявили нормализованное значение экспрессии гена для маркера идентичности “CRTACI”. Экспрессия “CRTACI” указала на то, что в сфероиде присутствовали хондроциты достаточного качества (идентичности), необходимого для трансплантации хрящевой ткани.

Эта хрящевая ткань (хондроциты достаточного качества (идентичности) и хрящевой внеклеточный матрикс) способна образовывать замещающую хрящевую ткань после ее размещения на месте дефекта хряща у подвергаемого лечению пациента, которая заполняет дефект и выполняет функцию естественной хрящевой ткани. Хрящевая ткань недостаточного качества (идентичности в сфероидной культуре) не пригодна для образования замещающей хрящевой ткани и отбраковывается.

Пример 5

Получение трансплантируемой хрящевой ткани посредством находящихся в сфероидной культуре хрящевых клеток заданного качества, здесь, чистоты.

Выделенные в примере 3 и размноженные в монослое хрящевые клетки применялись для получения трансплантируемой хрящевой ткани.

Как описано в примере 3, размноженные в монослое хондроциты поместили в специальный сосуд с культурой клеток, в котором не происходило слипания хондроцитов, в результате чего через несколько дней образовались скопления, так называемые сфероиды. Сфероиды культивировали на протяжении не менее 1 – 2 недель и образовали хрящевой внеклеточный матрикс из сфероидной культуры. Маркер чистоты хрящевых

клеток указал на содержание хрящевых клеток в сфероидной культуре.

Для определения чистоты хрящевых клеток в сфероидной культуре выделили с помощью широко применяемых молекулярно-биологических приемов общую РНК части культивируемых в сфероиде хондроцитов и транскрибировали с помощью обратной транскриптазы в кДНК. Посредством широко применяемой полимеразной цепной реакции определили экспрессию по меньшей мере одного эталонного гена (см. выше, таблица 2) и маркера чистоты “NRN1”. Экспрессию “NRN1” определили по отношению к экспрессии эталонного гена и таким образом выявили нормализованное значение экспрессии гена для маркера чистоты “NRN1”. Если уровень экспрессии “NRN1” превышает определенное ранее пороговое значение для чистоты, например, 1,0, то это указывает на то, что в сфероиде присутствуют хондроциты достаточного качества (чистоты), необходимого для трансплантации хрящевой ткани. Если же значение ниже порогового значения, то в сфероиде находятся хондроциты недостаточного качества (чистоты) для трансплантации хрящевой ткани. Эта хрящевая ткань (хондроциты достаточного качества (чистоты) и хрящевой внеклеточный матрикс) пригодна для образования замещающей хрящевой ткани после ее размещения на месте дефекта хряща у подвергаемого лечению пациента, она заполняет дефект и выполняет функцию естественной хрящевой ткани. Хрящевая ткань недостаточного качества (пониженной степени чистоты) не пригодна для образования замещающей хрящевой ткани и отбраковывается.

Пример 6

Получение трансплантируемой хрящевой ткани посредством находящихся в сфероидной культуре хрящевых клеток и определенных примесей в клетках.

Выделенные в примере 3 и размноженные в монослое хрящевые клетки применялись для получения трансплантируемой хрящевой ткани.

Как описано в примере 3, были образованы сфероиды, которые культивировала в течение не менее 1 – 2 недель для получения хрящевой внеклеточного матрикса (культуры сфероидов). Маркер примесей в хрящевых клетках указывал на содержание в клетках примесей в форме синовиальных, костных и/или жировых клеток в сфероидной культуре. Для определения примесей в хрящевых клетках в сфероидной культуре выделили с помощью широко применяемых молекулярно-биологических приемов общую РНК части культивированных в сфероиде хондроцитов и транскрибировали с помощью обратной транскриптазы в кДНК. Посредством широко применяемой полимеразной цепной реакции определили экспрессию по меньшей мере одного эталонного гена (см. выше, таблица 2) и маркера примесей “EBF3”. Экспрессию “EBF3” определили по отношению к экспрессии эталонного гена и выявили нормализованное значение экспрессии гена для маркера

примесей “EBF3”. Если уровень экспрессии “EBF3” составляет менее заданной пороговой величины для примесей, например, 0,8, то это указывает на то, что в сфероиде для трансплантации хрящевой ткани отсутствуют избыточные клеточные примеси в виде синовиоцитов. Если пороговая величина по примеси завышена, то в сфероиде для трансплантации хрящевой ткани присутствуют хондроциты недостаточного качества (с примесью).

Такая хрящевая ткань (хондроциты достаточного качества (примесь) и хрящевой внеклеточный матрикс) пригодна для образования замещающей естественной хрящевой ткани после размещения на месте дефекта хряща у подлежащего лечению пациента, она заполняет дефект и выполняет функцию естественной хрящевой ткани. Хрящевая ткань недостаточного качества (с повышенным содержанием примесей в клетках) не пригодна для образования замещающей хрящевой ткани и отбраковывается.

Пример 7

Получение трансплантируемой хрящевой ткани посредством находящихся в культуре сфероидов хрящевых клеток заданного потенциала.

Выделенные в примере 3 и размноженные в монослое хрящевые клетки применялись для получения трансплантируемой хрящевой ткани.

Как описано в примере 3, были образованы сфероиды, которые культивировали в течение не менее 1 – 2 недель для получения хрящевой внеклеточного матрикса (культуры сфероидов).

Маркер потенциала хрящевых клеток подтвердил, что хрящевые клетки в культуре сфероидов обладают способностью образовывать хрящевой внеклеточный матрикс. Для определения потенциала хрящевых клеток в культуре сфероидов выделили с помощью широко применяемых молекулярно-биологических приемов общую РНК части культивированных в сфероидах хондроцитов и транскрибировали с помощью обратной транскриптазы в кДНК. Посредством обычно применяемой полимеразной цепной реакции определили экспрессию по меньшей мере одного эталонного гена и маркера потенциала “Aggrecan”. Экспрессию этого маркера “Aggrecan” определили по отношению к экспрессии эталонного гена и выявили нормализованное значение экспрессии гена для маркера потенциала “Aggrecan”. Если уровень экспрессии маркера “Aggrecan” превышает заданное пороговое значение потенциала, например, составляет 0,1, то это указывает на то, что в сфероиде для трансплантации хрящевой ткани присутствуют хондроциты достаточного качества (потенциала). Если же значение ниже пороговой величины потенциала, то в сфероиде для трансплантации хрящевой ткани находятся хондроциты недостаточного качества (недостаточный потенциал для образования хрящевой

внуклеточного матрикса). Такая хрящевая ткань (хондроциты достаточного качества (потенциала) и хрящевой внуклеточный матрикс) пригодна для образования замещающей хрящевой ткани после размещения на месте дефекта хряща у подлежащего лечению пациента, она заполняет дефект и выполняет функцию естественной хрящевой ткани. Хрящевая ткань недостаточного качества (потенциала) не пригодна для образования замещающей хрящевой ткани и отбраковывается.

Пример 8

Получение трансплантируемой хрящевой ткани посредством хрящевых клеток заданного качества.

Выделенные в примере 3 и размноженные в монослое хрящевые клетки применялись для получения трансплантируемой хрящевой ткани.

Как описано в примере 3, были образованы сфероиды, которые культивировали в течение не менее 1 – 2 недель для получения хрящевой внуклеточного матрикса (культуры сфероидов).

Для подтверждения высокого качества культур сфероидов для трансплантации и регенерации дефектов суставных хрящей идентичность определяли, как описано в примере 3, с помощью маркера идентичности “KAL1” и маркера идентичности “CRTAC1”, как указано в примере 4. Кроме того определили, как описано в примере 5, маркер чистоты “NRN1” и/или , как описано в примере 6, маркер чистоты “EBF3”. Затем, как описано в примере 7, определяли маркер потенциала “Aggrecan”.

Хрящевая ткань (хондроциты достаточного качества (идентичности) в монослойной культуре и/или в культуре сфероидов, достаточной чистоты и/или с присутствием примесей клеток в приемлемой степени, а также достаточного потенциала, для образования хрящевой внуклеточного матрикса) пригодна для образования замещающей хрящевой ткани после размещения на месте дефекта хряща у подвергаемого лечению пациента, она заполняет дефект и выполняет функцию естественной хрящевой ткани. Хрящевая ткань недостаточного качества (отсутствует идентичность в монослойной культуре и/или в культуре сфероидов, имеется недостаточная чистота и/или отсутствие примеси клеток в недостаточной степени и недостаточный потенциал для образования хрящевой внуклеточного матрикса) не пригодна для образования замещающей хрящевой ткани и отбраковывается.

Пример 9

Ретроспективно применили описанный в примере 8 порядок действий в отношении трансплантируемой хрящевой ткани для 20 пациентов, для которых применили хрящевую ткань для регенерации повреждений хряща коленного сустава. Способность

трансплантируемой хрящевой ткани образовать замещающую хрящевую ткань оценили клинически с помощью разработанной оценки восстановления хряща (KOOS – Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score (оценка функции коленного сустава): Roos EM & Lohmander LS, Health and Quality of Life Outcomes 2003, 1 : 64), т.е. по успешности клинического лечения. Помимо этого посредством опроса клиентов определили показатель KOOS соответствующего пациента до начала лечения с применением трансплантируемой хрящевой ткани (базовая величина). Через год после лечения с применением трансплантируемой хрящевой ткани снова определяли путем опроса пациентов показатель KOOS соответствующего пациента. (оценка спустя 1 год последующего наблюдения). Клинический или терапевтический успех достигается в том случае, когда разница (KOOS дельта) между оценкой в результате последующего наблюдения в течение года и базовой величиной составляет по меньшей мере 8 баллов (Roos EM & Lohmander LS, Health and Quality of Life Outcomes 2003, 1 : 64). Если же разница (KOOS дельта) между оценкой в результате последующего наблюдения в течение года и базовой величиной составляет менее 8 баллов, то отсутствует клиническое улучшение в результате лечения, т. е. терапия протекала безуспешно.

Оказалось, что в трансплантируемой хрящевой ткани у 4 из 20 пациентов (5697 – 1607, 5862 – 1311, 6070 – 2413, 6988 – 2423) маркер потенциала “Aggrecan” составлял менее заданного граничного показателя, в то время как идентичность хрящевых клеток могла быть детектирована с помощью маркеров идентичности “KAL1” и “CRTAC1”. Показатели экспрессии были выше заданных граничных значений. Также чистота трансплантируемых хрящевых тканей могла быть определена посредством маркера примесей “EBF3” и подтвердилась; в данном случае значения экспрессии были ниже заданных предельных значений. В соответствии с этим такие четыре трансплантируемые хрящевые ткани свидетельствовали о недостаточном качестве, необходимом для образования замещающей хрящевой ткани, и были отброшены. Это соответствует 20%-му браку (4 из 20 хрящевых тканей, подлежащих трансплантации).

В трансплантируемой хрящевой ткани у 16 из 20 пациентов (6266 – 2601, 6658 – 2420, 7494 – 2284, 8528 – 2286, 9070 – 2709, 9110 – 2294, 5669 – 2263, 9110 – 2294, 6094 – 1312, 6340 – 2277, 6611 – 2418, 8315 – 2434, 8916 – 2440, 8931 – 1126, 8948 – 2706, 8966 – 2441) маркер потенциала “Aggrecan” превысил заданный граничный показатель, идентичность хрящевых клеток могла быть определена по маркерам идентичности “KAL1” и “CRTAC1”. Показатели экспрессии также превысили заданные предельные показатели. Чистота трансплантируемых хрящевых тканей также могла быть определена с помощью маркера примесей “EBF3” и подтверждалась; в данном случае показатели

экспрессии лежали ниже заданных пороговых значений. В соответствии с этим такие 16 трансплантируемых хрящевых тканей свидетельствовали о достаточном качестве, необходимом для образования замещающей хрящевой ткани, и могли применяться для трансплантации. Это свидетельствовало о величине успеха, равной 80% (16 из 20 хрящевых тканей, подлежащих трансплантации).

В соответствии с этим трансплантируемые хрящевые ткани у 4 из 20 пациентов (5697 – 1607, 5862 – 1311, 6070 – 2413, 6988 – 2423) демонстрировали наличие хрящевой ткани недостаточного качества (отсутствовала идентичность в монослойной культуре и/или в культуре сфероидов, недостаточная чистота и/или отсутствие примесей клеток в недостаточной степени и недостаточный потенциал для образования хрящевого внеклеточного матрикса), в то время как трансплантируемые хрящевые ткани у 16 из 20 пациентов (6266 – 2601, 6658 – 2420, 7494 – 2284, 8528 – 2286, 9070 – 2709, 9110 – 2294, 5669 – 2263, 9110 – 2294, 6094 – 1312, 6340 – 2277, 6611 – 2418, 8315 – 2434, 8916 – 2440, 8931 – 1126, 8948 – 2706, 8966 – 2441) были достаточного качества (обеспечена идентичность в монослойной культуре и/или в культуре сфероидов, достаточная чистота и/или отсутствие примесей клеток в достаточной степени и достаточный потенциал для образования хрящевого внеклеточного матрикса).

Что касается клинической или терапевтической успешности лечения, то выяснилось (см. таблицу 4), что у 4 из 20 пациентов (5697 – 1607, 5862 – 1311, 6070 – 2413, 6988 – 2423), у которых ретроспективно была определена хрящевая ткань недостаточного качества, клинического улучшения в результате лечения не произошло. Разница между показателем KOOS после одного года наблюдения и базовой величиной показателя KOOS составила менее 8 баллов, следовательно терапия оказалась безуспешной. Однако выяснилось, что у 16 из 20 пациентов (6266 – 2601, 6658 – 2420, 7494 – 2284, 8528 – 2286, 9070 – 2709, 9110 – 2294, 5669 – 2263, 9110 – 2294, 6094 – 1312, 6340 – 2277, 6611 – 2418, 8315 – 2434, 8916 – 2440, 8931 – 1126, 8948 – 2706, 8966 – 2441), у которых ретроспективно качество трансплантируемой ткани было установлено как достаточное, наблюдалось клиническое улучшение в результате лечения. Разница между показателем KOOS после 1 года наблюдения и показателем KOOS в качестве базовой величины составила по меньшей мере 8 баллов, и терапия была успешной.

Таблица 4. Маркер качества для определения идентичности, чистоты/загрязнения и потенциала у 20 пациентов с известным клиническим терапевтическим результатом (KOOS дельта)

Идентификатор пациента	Общее изменение показателя KOOS после года наблюдения	Уровни мРНК KAL1, основной уровень ML (T/R) (допустимый предел > 1,0)	Уровни мРНК CRTAC1 (T/R) (допустимый предел > 0,003)	Уровни мРНК EBF3 (T/R) (допустимый предел ≤ 0,4)	Уровни мРНК ACAN (T/R) (допустимый предел ≥ 0,29)	Оценка качества: Да/нет
5697 – 1607	-16,91	Не определено	2,63	0,106	0,2194	Нет
5862 – 1311	6,93	Не определено	1,997	0,0252	0,1909	Нет
6070 – 2413	-27,89	Не определено	2,105	0,0321	0,201	Нет
6266 – 2601	23,265	15,07	1,02	0,0678	0,349	Да
6658 – 2420	44,790	13,8	0,925	0,0371	0,8073	Да
6988 – 2423	1,011	23,67	3,069	0,046	0,2427	Нет
7494 – 2284	16,63	13,7	2,773	0,2085	0,7286	Да
8528 – 2286	55,31	98,42	2,071	0,0927	1,392	Да
9070 – 2709	32,59	22,8	1,547	0,0404	0,5935	Да
9110 – 2294	19,17	152,6	0,501	0,0706	2,221	Да
5669 – 2263	20,51	12,05	2,576	0,0669	1,12	Да
9110 – 2294	19,17	152,6	0,501	0,0706	2,221	Да
6094 – 1312	14,00	25,97	2,537	0,0761	0,439	Да
6340 – 2277	15,11	16,17	0,439	0,0459	0,2942	Да
6611 – 2418	17,96	40,96	0,541	0,1905	0,9808	Да
8315 – 2434	41,83	30,29	0,174	0,2405	2,628	Да
8916 – 2440	25,47	19,51	1,513	0,1495	1,613	Да
8931 – 1126	42,23	2,02	1,637	0,123	0,4226	Да
8948 – 2706	42,15	39,52	3,028	0,1408	0,9095	Да
8966 – 2441	9,48	30,05	0,2841	0,0482	0,5464	Да

KOOS – результирующая оценка повреждения и остеоартрита колена.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ отбора хондроцитов для получения трансплантируемой хрящевой ткани, отличающийся тем, что по меньшей мере один маркер идентичности или маркер чистоты, выбранный из группы KAL1, CRTAC1, NRN1 или EBF3, определяют *in vitro*.

2. Способ отбора хондроцитов по п. 1, отличающийся тем, что для получения трансплантируемой хрящевой ткани хондроциты на первом этапе размножают в монослойной структуре, а на втором этапе объединяются в сфероиды.

3. Способ отбора хондроцитов по п. 1 или 2, отличающийся тем, что хондроциты объединяют в сфероиды, и сфероиды выбирают.

4. Способ отбора хондроцитов по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что маркеры идентичности выбирают из группы KAL1, CRTAC1 и/или что маркеры чистоты выбирают из группы NRN1, EBF3.

5. Способ отбора хондроцитов по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что i) хондроциты определяют в монослойной культуре с помощью маркера идентичности KAL1 *in vitro* и/или что ii) хондроциты определяют в сфероидах с помощью по меньшей мере одного маркера идентичности CRTAC1 *in vitro*.

6. Способ отбора хондроцитов по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что дополнительно определяют протеогликаны, в частности, агрекан *in vitro*.

7. Способ отбора хондроцитов по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что маркеры согласно изобретению определяют в сравнении с эталонным геном.

8. Способ отбора хондроцитов по п. 7, отличающийся тем, что определяют по меньшей мере одно соотношение экспрессии гена, выбранное из группы:

$$\text{CRTAC1} / R > 0,003$$

$$\text{NRN1} / R \geq 0,1$$

$$\text{KAL1} / R > 1,0$$

$$\text{EBF3} / R \leq 0,4$$

$$\text{ACAN} / R \geq 0,29.$$

9. Способ отбора хондроцитов по п. 7, отличающийся тем, что определяют по меньшей мере одно соотношение экспрессии гена, выбранное из группы:

$$\text{CRTAC1} / R \geq 0,006, \text{ в частности, } \geq 0,009 \text{ и } \geq 0,012$$

$$\text{NRN1} / R \geq 0,2, \text{ в частности, } \geq 0,3 \text{ и } \geq 0,4$$

$$\text{KAL1} / R > 2,0, \text{ в частности, } \geq 3,0 \text{ и } \geq 4,0$$

$$\text{EBF3} / R \leq 0,3, \text{ в частности, } \leq 0,2 \text{ и } \leq 0,1$$

$$\text{ACAN} / R \geq 0,39, \text{ в частности, } \geq 0,49 \text{ и } \geq 0,59.$$

10. Способ отбора хондроцитов по любому из предыдущих пунктов, отличающийся

тем, что количество синовиоцитов в выделенных хондроцитах после размножения или в полученных сфероиды по сравнению с общим количеством клеток составляет 9% или менее, в частности, 5% или менее.

11. Выделенные хондроциты, полученные способом по любому из пунктов 1 – 10.

12. Выделенные сфероиды, полученные способом по любому из пунктов 1 – 10.

13. Выделенные сфероиды, полученные способом по любому из пунктов 1 – 10, отличающиеся тем, что количество синовиоцитов в сфероиды по сравнению с общим количеством клеток составляет 9% или менее.

14. Трансплантируемая хрящевая ткань, содержащая хондроциты и/или сфероиды по любому из пунктов 10 – 13 или получаемые способом по любому из пунктов 1 – 9.

15. Трансплантируемая хрящевая ткань по п. 14 для применения в лечении дефектов суставного хряща или аутологичной трансплантации хондроцитов.

ИЗМЕНЕННАЯ ПО СТ. 34 РСТ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,
ПРЕДЛОЖЕННАЯ К РАССМОТРЕНИЮ

1. Способ отбора хондроцитов для получения трансплантируемой хрящевой ткани, отличающийся тем, что по меньшей мере один маркер идентичности или маркер чистоты, выбранный из группы KAL1, CRTAC1, NRN1 или EBF3, определяют *in vitro*.

2. Способ отбора хондроцитов для получения трансплантируемой хрящевой ткани, отличающийся тем, что маркеры идентичности выбирают из группы KAL1, CRTAC1 и/или что маркеры чистоты выбирают из группы NRN1, EBF3 и определяют *in vitro*.

3. Способ отбора хондроцитов по п. 1 или 2, отличающийся тем, что для получения трансплантируемой хрящевой ткани хондроциты на первом этапе размножают в монослойной культуре и на втором этапе объединяются в сфероиды.

4. Способ отбора хондроцитов по любому из предшествующих пунктов 1 – 3, отличающийся тем, что хондроциты объединяют в сфероиды и сфероиды выбирают.

5. Способ отбора хондроцитов по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что i) хондроциты определяют в монослойной культуре с помощью маркера идентичности KAL1 *in vitro* и/или что ii) хондроциты определяют в сфероидах с помощью по меньшей мере одного маркера идентичности CRTAC1 *in vitro*.

6. Способ отбора хондроцитов по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что дополнительно определяют протеогликаны, в частности, агрекан *in vitro*.

7. Способ отбора хондроцитов по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что маркеры согласно изобретению определяют в сравнении с эталонным геном.

8. Способ отбора хондроцитов по п. 7, отличающийся тем, что определяют, по меньшей мере, одно соотношение экспрессии гена, выбранное из группы:

$$\text{CRTAC1} / R > 0,003$$

$$\text{NRN1} / R \geq 0,1$$

$$\text{KAL1} / R > 1,0$$

$$\text{EBF3} / R \leq 0,4$$

$$\text{ACAN} / R \geq 0,29.$$

9. Способ отбора хондроцитов по п. 7, отличающийся тем, что определяют, по меньшей мере, одно соотношение экспрессии гена, выбранное из группы:

$$\text{CRTAC1} / R \geq 0,006, \text{ в частности, } \geq 0,009 \text{ и } \geq 0,012$$

$$\text{NRN1} / R \geq 0,2, \text{ в частности, } \geq 0,3 \text{ и } \geq 0,4$$

$$\text{KAL1} / R > 2,0, \text{ в частности, } \geq 3,0 \text{ и } \geq 4,0$$

$$\text{EBF3} / R \leq 0,3, \text{ в частности, } \leq 0,2 \text{ и } \leq 0,1$$

$$\text{ACAN} / R \geq 0,39, \text{ в частности, } \geq 0,49 \text{ и } \geq 0,59.$$

10. Способ отбора хондроцитов по любому из предыдущих пунктов, отличающийся тем, что количество синовиоцитов в выделенных хондрокитах после размножения или в полученных сфероидеях составляет по сравнению с общим количеством клеток 9% или менее, в частности, 5% или менее.

11. Выделенные сфероиды, полученные способом по любому из пунктов 1 – 10.

12. Выделенные сфероиды, полученные способом по любому из пунктов 1 – 10, отличающиеся тем, что количество синовиоцитов в сфероидеях составляет по сравнению с общим количеством клеток 9% или менее.

13. Трансплантируемая хрящевая ткань, содержащая сфероиды по п. 12.

14. Трансплантируемая хрящевая ткань по п. 13 для применения в лечении дефектов суставного хряща или аутологичной трансплантации хондроцитов.