

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037412**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.03.25**

(51) Int. Cl. **C12N 5/0775 (2010.01)**

(21) Номер заявки  
**201790025**

(22) Дата подачи заявки  
**2015.07.14**

---

(54) **СОЗДАНИЕ БАНКА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ИЗ  
ОБЪЕДИНЕННЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК НЕСКОЛЬКИХ ДОНОРОВ  
КОСТНОГО МОЗГА**

---

(31) **14177312.7**(32) **2014.07.16**(33) **EP**(43) **2017.05.31**(86) **PCT/EP2015/066083**(87) **WO 2016/008895 2016.01.21**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ИОГАНН ВОЛЬФАНГ ГЁТЕ-  
УНИВЕРСИТЕТ, ФРАНКФУРТ АМ  
МАЙН; ДРК БЛУТСПЕНДЕДИНСТ  
БАДЕН-ВЮРТЕМБЕРГ-ХЕССЕН  
ГТМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:  
**Бадер Питер, Кучи Селим, Кучи  
Зирафете, Бёниг Хальфард (DE)**

(74) Представитель:  
**Лыу Т.Н., Угрюмов В.М., Гизатуллина  
Е.М., Глухарёва А.О., Дементьев  
В.Н., Карпенко О.Ю., Клюкин В.А.,  
Строкова О.В., Христофоров А.А.  
(RU)**

(56) **WO-A1-2011064733**

О RINGDEN ET AL.: "Pooled MSCs for treatment of severe hemorrhage", BONE MARROW TRANSPLANTATION, vol. 46, no. 8, 1 August 2011 (2011-08-01), pages 1158-1160, XP055140414, ISSN: 0268-3369, DOI: 10.1038/bmt.2010.262, cited in the application, abstract

KHUSHNUMA COOPER ET AL.: "Establishment of a Mesenchymal Stem Cell Bank", STEM CELLS INTERNATIONAL, vol. 108, no. 10, 1 January 2011 (2011-01-01), pages 792-8, XP055140441, ISSN: 1687-966X, DOI:10.1016/j.trsl.2009.07.006, the whole document

THIRUMALA SREEDHAR ET AL.: "Manufacturing and banking of mesenchymal stem cells", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, INFORMA HEALTHCARE, UK, vol. 13, no. 5, 1 May 2013 (2013-05-01), pages 673-691, XP009180144, ISSN: 1744-7682, DOI:10.1517/14712598.2013.763925 [retrieved on 2013-01-23] the whole document

SIMONE DAL POZZO ET AL.: "High recovery of mesenchymal progenitor cells with non-density gradient separation of human bone marrow", CYTOTHERAPY, vol. 12, no. 5, 1 September 2010 (2010-09-01), pages 579-586, XP055140438, ISSN: 1465-3249, DOI:10.3109/14653241003709660, abstract

---

(57) Настоящее изобретение относится к улучшенной композиции мезенхимальных стромальных клеток (MSC) и способу ее получения. Настоящее изобретение относится к новой стратегии выделения MSC из мононуклеарных клеток костного мозга (BM-MNC) путем объединения BM-MNC от неродственных (третьей стороны) доноров костного мозга. Композиция MSC, изготовленная согласно методике в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется стабильной пролиферативной способностью и повышенным иммуносупрессорным потенциалом по сравнению с композицией MSC от отдельных доноров или пулом отдельных MSC, полученных от нескольких доноров. MSC, полученные в соответствии с настоящим изобретением, особенно полезны для медицинских применений, таких как лечение болезни "трансплантат против хозяина" (GvHD) у реципиентов с трансплантатами кроветворных стволовых клеток, больных аутоиммунными нарушениями, и в качестве клеточной терапии в регенеративной медицине.

---

**B1****037412****037412 B1**

### Область техники

Настоящее изобретение относится к улучшенной композиции мезенхимальных стромальных клеток (MSC) и способу ее получения. Настоящее изобретение относится к новой стратегии выделения MSC из мононуклеарных клеток костного мозга (BM-MNC) путем объединения BM-MNC нескольких неродственных (третьей стороны) доноров костного мозга. Композиция MSC, изготовленная по методике в соответствии с настоящим изобретением, характеризуется стабильной пролиферативной способностью и повышенным иммуносупрессорным потенциалом по сравнению с препаратами MSC отдельного донора или пулом отдельных MSC, полученных от нескольких доноров. MSC, полученные в соответствии с настоящим изобретением, особенно полезны для медицинских применений, таких как лечение болезни "трансплантат против хозяина" (GvHD) у реципиентов с трансплантатами кроветворных стволовых клеток, больных с аутоиммунными нарушениями, и в качестве клеточной терапии в регенеративной медицине.

### Сущность изобретения

Мезенхимальные стромальные клетки (MSC) с момента их открытия в 1970-е годы Friedenstein et al. были глубоко исследованы в отношении их иммуномодуляторного и регенеративного потенциала, как *in vitro*, так и *in vivo*. В последнее десятилетие был достигнут значительный прогресс в выяснении плеiotропной функции MSC, несмотря на отсутствие уникального маркера клеточной поверхности для их идентификации и последующего выделения. Для обеспечения сравнения эффекта клинически используемых MSC различных изготовителей Международным обществом клеточной терапии был предложен набор фенотипических и функциональных критериев для определения MSC. Отсутствие антигенов HLA II класса и костимулирующих молекул на поверхности MSC, паракринная секреция обширного спектра молекул с иммуномодуляторным потенциалом, а также легкость возможного их выделения из многих тканей делает их весьма привлекательным источником в стратегиях клеточной терапии для широкого диапазона клинических состояний, таких как повреждения тканей, воспалительные процессы и аутоиммунные нарушения. Однако для всех этих клинических применений существует необходимость наличия в нужный момент большого числа имеющихся в готовом виде MSC.

На сегодняшний день большинство клинических исследований проводили с использованием мезенхимальных стромальных клеток (MSC), полученных от одного донора костного мозга. Поскольку эффекты препаратов MSC заметно варьируют от донора к донору, результаты, полученные в этих исследованиях, были в большой степени неоднородными. Кроме того, авторы настоящего изобретения и другие исследователи показали, что MSC демонстрируют широкую гетерогенность не только от донора к донору, но также и внутри популяции на клональном уровне. Такая существенная гетерогенность представляет главное препятствие в разработке клинических протоколов изготовления, которые могут быть использованы для воспроизводимого создания продуктов MSC с эквивалентной терапевтической эффективностью.

Процесс выделения человеческих мезенхимальных стромальных клеток из образцов костного мозга описывается в патенте США № 5486359. Было разработано антитело, связывающееся с мезенхимальными стромальными клетками, для очистки MSC от аспирационных материалов костного мозга или материала измельченной кости. Образцы костного мозга отделяют через градиент фиколла и фракцию с низкой плотностью используют для выделения стволовых клеток. Согласно патенту США № 5486359 культивировали клетки в нормальной среде в течение 1 дня на пластике для культуры ткани с целью обеспечения адгезии стволовых клеток. Затем среду заменяли и клетки культивировали до конfluence, при этом среду меняли каждые 4 дня для получения MSC.

В международной заявке WO 2012/048093 раскрывается выделение получаемых из костного мозга MSC от отдельных доноров. В международной заявке WO 2012/048093 раскрывается, что препараты MSC, получаемые от одного донора, могут быть размножены для клинических препаратов.

Известно, что возможно объединение препаратов MSC после их получения из отдельных фракций мононуклеарных клеток костного мозга неродственных доноров костного мозга или костных образцов для лечения угрожающего жизни кровотечения у больного миелофиброзом, перенесшего аллогенную трансплантацию кроветворных стволовых клеток (O Ringden and J LeBlanc, Bone Marrow Transplantation, 2011; 46:1158-1160). В этом исследовании отдельные клинические препараты MSC, полученные от двух разных доноров, объединяли для усиления вероятности ответа.

Ввиду описанного выше известного уровня техники в клинической практике все еще существует потребность в получении клинических препаратов MSC с предсказуемой пролиферацией, иммуносупрессорным потенциалом и минимальной вариабельностью между партиями. Таким образом, задача настоящего изобретения заключается в обеспечении процесса получения/выделения MSC из образцов костного мозга с улучшенными характеристиками.

Вышеупомянутая задача решается в первом аспекте с помощью препарата мезенхимальных стромальных клеток (MSC), содержащего MSC, выделенные из мононуклеарных клеток костного мозга (BM-MNC), характеризующегося тем, что указанный препарат MSC является hTERT-негативным и полигенным. Согласно предпочтительным вариантам осуществления указанные MSC являются MSC млекопитающих, предпочтительно человека.

Термин "моногенный" при использовании в контексте описания образца или композиции клеток относится к тем клеткам, которые происходят из общего источника или имеют одинаковый генетический

фон. Термин "полигенный", с другой стороны, относится к композиции клеток, происходящих из разных источников и имеющих разные генетические фоны. В контексте настоящего изобретения термин "полигенный препарат MSC" означает композицию, содержащую MSC с различными генетическими фонами, например MSC, которые получены по меньшей мере от двух генетически отличающихся доноров костного мозга.

В контексте описываемого в настоящем документе настоящего изобретения термины "мезенхимальные стромальные клетки" и "мезенхимальные стволовые клетки" следует понимать как синонимические описания одной и той же фракции мультипотентных клеток, выделенной из образцов костного мозга.

Для минимизации междонорной вариабельности в отношении их аллосупрессивного потенциала авторы настоящего изобретения разработали уникальную трехстадийную методику для создания GMP-совместимого, бессывороточного MSC-Master Cell Bank из объединенных моноклеарных клеток костного мозга (BM-MNC) от 8 здоровых доноров третьей стороны: (i) выделение смешанных полигенных и криоконсервирование отдельных BM-MNC от 8 здоровых доноров третьей стороны в полном соответствии с разрешением регионального Комитета по этике и Хельсинской декларацией, (ii) получение MSC из объединенных BM-MNC после оттаивания и криоконсервирования во флаконах и (iii) оттаивание образцов MSC для их бессывороточного размножения и создания "имеющихся в готовом виде" клинических доз. Таким образом, авторы настоящего изобретения разработали удивительно эффективный протокол для создания клинических препаратов MSC с постоянным более высоким аллосупрессивным потенциалом и постоянной пролиферативной способностью по сравнению с MSC, полученными от отдельных доноров костного мозга. Таким образом, данный протокол обеспечивает клинических исследователей клиническими MSC однородного качества для лечения болезни "трансплантат против хозяина" и других воспалительных нарушений. Несмотря на существенные предварительные затраты, данный протокол обеспечивает стабильность, воспроизводимость и надежность в иммуносупрессорной характеристике клинических MSC.

Следующий вариант осуществления относится к препарату MSC в соответствии с настоящим изобретением, который дополнительно характеризуется тем, что указанные MSC являются TERT-негативными. TERT представляет собой обратную транскриптазу теломеразы (сокращенно TERT или hTERT у людей), которая является каталитической субъединицей фермента теломеразы, вместе с РНК-компонентом теломеразы (TERC), содержащей наиболее важную единицу комплекса теломеразы, необходимую для поддержания пролиферативной способности иммортализованных клеток. Показали, что препарат MSC в соответствии с настоящим изобретением содержит MSC, которые не являются иммортальными, что согласовывается с отсутствием экспрессии hTERT.

Согласно одному дополнительному предпочтительному варианту осуществления настоящее изобретение относится к препарату MSC, описываемому в настоящем документе, при этом указанный препарат MSC содержит

- (a) по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 95% CD73+ клеток, наиболее предпочтительно по меньшей мере 98%, и/или
- (b) по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 95% CD90+ клеток, наиболее предпочтительно по меньшей мере 98%, и/или
- (c) по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 95% CD105+ клеток, наиболее предпочтительно по меньшей мере 98%, и/или
- (d) по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 95% HLA I класса+ клеток, наиболее предпочтительно по меньшей мере 98%, и/или
- (e) менее 10%, предпочтительно менее 1% CD45+ клеток, наиболее предпочтительно менее 0,1%, и/или
- (f) менее 10%, предпочтительно менее 1% CD14+ клеток, наиболее предпочтительно менее 0,5%, и/или
- (g) менее 10%, предпочтительно менее 1% CD34+ клеток, наиболее предпочтительно менее 0,5%, и/или
- (h) менее 10%, предпочтительно менее 5% HLA-DR+ клеток, наиболее предпочтительно менее 1%.

Согласно одному дополнительному варианту осуществления препарат MSC содержит

- (a) по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 95% CD73+ клеток, наиболее предпочтительно по меньшей мере 98%, и
- (b) по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 95% CD90+ клеток, наиболее предпочтительно по меньшей мере 98%, и
- (c) по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 95% CD 105+ клеток, наиболее предпочтительно по меньшей мере 98%.

Дополнительно препарат MSC в соответствии с настоящим изобретением может содержать

- (e) менее 10%, предпочтительно менее 1% CD45+ клеток, наиболее предпочтительно менее 0,1%, и
- (f) менее 10%, предпочтительно менее 1% CD14+ клеток, наиболее предпочтительно менее 0,5%, и
- (g) менее 10%, предпочтительно менее 1% CD34+ клеток, наиболее предпочтительно менее 0,5%.

Задача настоящего изобретения, более того, решается с помощью *in vitro* способа выделения мезен-

химальных стромальных клеток, при этом способ включает объединение образцов костного мозга, полученных по меньшей мере от двух генетически отличающихся доноров, с получением пула клеток образцов, а затем выделение мезенхимальных стромальных клеток из указанного пула клеток образцов.

Процесс получения или выделения MSC из образцов костного мозга в соответствии с настоящим изобретением включает стадию объединения костного мозга или фракции моноклеарных клеток, полученной из костного мозга, от генетически отличающихся доноров. Таким образом, по меньшей мере два генетически отличающихся образца костного мозга или генетически отличающихся фракции BM-MNC объединяют в способе в соответствии с настоящим изобретением. Важным является то, что способ в соответствии с настоящим изобретением включает объединение генетически отличающихся образцов BM на стадии, на которой образцы BM все еще содержат смесь различных типов клеток. Таким образом, предпочтительно объединение генетически отличающихся образцов BM-MNC выполнять перед очисткой или размножением фракции MSC из указанных образцов. Объединение клеток перед выделением MSC обеспечивает препараты MSC с неожиданно улучшенным аллосупрессивным потенциалом.

Согласно одному варианту осуществления способ в соответствии с настоящим изобретением включает стадии:

(a) обеспечение ряда образцов костного мозга, полученных по меньшей мере от двух генетически отличающихся доноров;

(b) объединение указанных образцов костного мозга с получением пула клеток образцов;

(c) необязательно культивирование указанного пула клеток образцов и

(d) выделение из указанного пула клеток образцов, полученного на стадии (b), указанных мезенхимальных стромальных клеток.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления способ включает стадии обеспечения ряда образцов костного мозга, полученных по меньшей мере от двух генетически отличающихся доноров, выделения фракции моноклеарных клеток из образцов костного мозга, объединения указанных образцов моноклеарных клеток костного мозга с получением пула BM-MNC, необязательно культивирования указанного пула BM-MNC и выделения из указанного пула BM-MNC указанных мезенхимальных стромальных клеток. Следует учитывать, что все дополнительные специальные вариации способа в соответствии с настоящим изобретением, описываемого в настоящем документе выше и ниже, эквивалентны предпочтительным вариантам осуществления данной методики, которая включает стадию выделения BM-MNC из образцов костного мозга.

Термин "пул клеток образцов" в контексте настоящего изобретения относится к смеси полученных из костного мозга клеток с различным генетическим фоном. Таким образом, пул клеток образцов в соответствии с настоящим изобретением является полигенным. Наиболее предпочтительно пул клеток образцов в соответствии с настоящим изобретением характеризуется тем, что MSC составляют всего лишь незначительный процент, предпочтительно менее 80%, предпочтительно 70, 60, 50, 40, 30, 20 и наиболее предпочтительно менее 10%, еще более предпочтительно менее 5%, менее 1%, наиболее предпочтительно менее 0,1%.

Используемый в настоящем документе термин "генетически различный" указывает на то, что существует по меньшей мере одно различие на геномном уровне между донорами костного мозга/субъектами. Костный мозг может быть собран у 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или больше доноров. Наиболее предпочтительным является применение образцов 4-8 разных доноров.

Термин "образец костного мозга" в соответствии с настоящим изобретением может означать аспирационный материал либо костного мозга, либо костных фрагментов, таких как фрагменты губчатой кости. Согласно предпочтительному варианту осуществления образцом костного мозга является аспирационный материал костного мозга. Специалисту в данной области известно, как собирать образец костного мозга. Указанные образцы костного мозга в соответствии с настоящим изобретением согласно одному предпочтительному варианту осуществления содержат смесь различных типов клеток. Например, каждый из указанных образцов костного мозга содержит по меньшей мере одну фракцию неадгерентных клеток и по меньшей мере одну фракцию адгерентных клеток. Согласно одному особенно предпочтительному варианту осуществления указанным образцом костного мозга является образец или фракция моноклеарных клеток костного мозга (BM-MNC). BM-MNC получают из костного мозга.

В контексте настоящего изобретения термин "фракция моноклеарных клеток костного мозга" (также называемая в настоящем документе "BM-MNC") включает B-, T- и NK-лимфоциты, ранние миелоидные клетки и весьма небольшое количество эндотелиальных клеток-предшественников, кроветворных стволовых/клеток-предшественников и/или мезенхимальных стромальных клеток.

Согласно предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения указанным образцом костного мозга является образец костного мозга млекопитающего, а указанной мезенхимальной стромальной клеткой является мезенхимальная стромальная клетка млекопитающего. Более предпочтительно является то, что указанным образцом костного мозга является образец костного мозга человека, а указанной мезенхимальной стромальной клеткой является мезенхимальная стромальная клетка человека.

Согласно следующему варианту осуществления настоящее изобретение относится к описываемому

ранее процессу выделения MSC, при этом способ дополнительно включает стадию (а) экстрагирования моноклеарных клеток костного мозга (BM-MNC) из каждого указанного образца костного мозга с получением образцов BM-MNC, и при этом на стадии (b) указанные образцы BM-MNC объединяют с получением указанного пула клеток образцов. Как упоминалось выше, фракция/образец BM-MNC содержит всего лишь небольшое количество MSC. Таким образом, согласно одному предпочтительному варианту осуществления настоящего изобретения указанные образцы BM-MNC, подлежащие объединению, характеризуются процентным отношением мезенхимальной стромальной клетки к общему количеству клеток в указанном образце менее 80%, предпочтительно 70, 60, 50, 40, 30, 20 и наиболее предпочтительно менее 10%, еще более предпочтительно менее 5%, менее 1%, наиболее предпочтительно менее 0,1%.

В контексте описываемого в настоящем документе настоящего изобретения согласно всем его вариантам осуществления и аспектам особенно предпочтительным является то, что указанные образцы костного мозга (или образцы BM-MNC) получают по меньшей мере от трех, более предпочтительно по меньшей мере от четырех, более предпочтительно по меньшей мере от пяти, более предпочтительно по меньшей мере от шести, более предпочтительно по меньшей мере от семи и наиболее предпочтительно по меньшей мере от восьми генетически отличающихся доноров. Другими словами, препарат клеток MSC и способ их получения согласно одному особенно предпочтительному варианту осуществления включает объединение по меньшей мере трех, более предпочтительно по меньшей мере четырех, более предпочтительно по меньшей мере пяти, более предпочтительно по меньшей мере шести, более предпочтительно по меньшей мере семи и наиболее предпочтительно по меньшей мере восьми генетически отличающихся клеточных образцов.

Способы выделения BM-MNC из образца костного мозга, в частности аспирационного материала костного мозга, хорошо известны специалисту в данной области. Однако согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения предпочтительным является то, что BM-MNC выделяют из образца костного мозга с использованием разделения клеток в градиенте плотности, таком как градиент фиколла.

При объединении полученный пул клеток образцов в соответствии с настоящим изобретением используют для выделения и очистки MSC. Способы выделения MSC из образцов костного мозга или BM-MNC также хорошо известны в уровне техники.

Предпочтительным способом в соответствии с настоящим изобретением является отделение адгерентных клеток от неадгерентных путем простого удаления плавающих клеток с помощью аспирации клеточной культуральной среды из контейнера для культуры через регулярные промежутки времени. Путем замены среды несколько раз фракция неадгерентных клеток постоянно снижается, тогда как фракция адгерентных MSC продолжает расти до конfluence. Этими адгерентными клетками являются MSC.

Таким образом, предпочтительным согласно одному варианту осуществления является то, что стадия (d) способа в соответствии с настоящим изобретением включает стадию удаления, по меньшей мере один раз, неадгерентных клеток из культуры указанного пула клеток образцов; или при этом после культивирования указанного пула клеток образцов используют по меньшей мере один выявляемый поверхностный маркер или антитело для очистки указанных MSC.

В качестве дополнения, способ в соответствии с настоящим изобретением может включать дополнительную стадию либо хранения указанных выделенных мезенхимальных стромальных клеток, либо размножения указанных выделенных мезенхимальных стромальных клеток.

Согласно одному дополнительному аспекту настоящее изобретение относится к способу получения клинических препаратов MSC. Данный способ включает стадии упомянутого выше способа для выделения MSC, но дополнительно включает размножение выделенных MSC, пока не будет получено применимое в клинике количество MSC. Размножение MSC в соответствии с настоящим изобретением может следовать сразу же за выделением MSC, или в качестве альтернативы выделенные MSC хранятся посредством криоконсервирования, затем размораживаются аликвоты клеток для начала процесса размножения. В уровне техники известно, как размножать MSC, и это в качестве примера объясняется в разделе "Примеры" в настоящей заявке.

Другой аспект настоящего изобретения относится к клеточной композиции, содержащей образцы костного мозга по меньшей мере от двух генетически отличающихся доноров костного мозга. В качестве альтернативы клеточная композиция в соответствии с настоящим изобретением может содержать BM-MNC по меньшей мере от двух генетически отличающихся доноров костного мозга. Таким образом, клеточная композиция в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно является полигенной.

Согласно одному варианту осуществления клеточную композицию в соответствии с настоящим изобретением получают путем объединения по меньшей мере двух моногенных и генетически отличающихся образцов костного мозга перед выделением и/или размножением фракции стволовых клеток, содержащейся в указанных образцах костного мозга. Таким образом, посредством объединения клеточная композиция становится полигенной.

Согласно одному предпочтительному варианту осуществления указанными образцами костного мозга являются образцы моноклеарных клеток костного мозга.

Согласно варианту осуществления данный аспект относится к клеточной композиции в соответствии с настоящим изобретением, получаемой способом, включающим стадии:

(a) получение по меньшей мере двух образцов костного мозга, при этом каждый из образцов от генетически отличающегося донора костного мозга,

(b) выделение из каждого из указанных образцов костного мозга фракции мононуклеарных клеток костного мозга с получением моногенных образцов мононуклеарных клеток костного мозга и

(c) объединение указанных моногенных образцов мононуклеарных клеток костного мозга, полученных из каждого образца костного мозга, с получением полигенной клеточной композиции.

Следует понимать, что в контексте настоящего изобретения термин "фракция мононуклеарных клеток костного мозга" включает стандартную клеточную композицию, известную для данной клеточной фракции, полученной из костного мозга. В связи с этим предпочтительным является то, что указанные образцы моногенных мононуклеарных клеток объединяют перед осуществлением следующей стадии очистки или размножения клеток, предпочтительно перед выделением или очисткой из них любых MSC.

Согласно следующему аспекту настоящего изобретения относится к применению смеси мононуклеарных клеток костного мозга, полученных по меньшей мере от двух генетически отличающихся доноров костного мозга, в способе выделения мезенхимальных стромальных клеток.

Следующий аспект относится к применению клеточной композиции, описываемой ранее в настоящем документе, в способе очистки/выделения мезенхимальных стромальных клеток.

Задача настоящего изобретения также решается с помощью мезенхимальной стромальной клетки, получаемой способом выделения/очистки MSC, описываемым в настоящем документе выше.

В настоящем документе описываются препараты MSC или MSC предпочтительно для применения в медицине. MSC, как правило, используют в самых разнообразных медицинских применениях. Без ограничения следующими примерами, MSC в соответствии с настоящим изобретением предпочтительно применяют в лечении аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз, сахарный диабет 1 типа, ревматоидный артрит, увеит, аутоиммунное заболевание щитовидной железы, воспалительное заболевание кишечника (IBD), склеродермия, болезнь Грейвса, волчанка, болезнь Крона, аутоиммунное лимфопролиферативное заболевание (ALPS), демиелинизирующее заболевание, аутоиммунный энцефаломиелит, аутоиммунный гастрит (AIG) и аутоиммунные гломерулярные заболевания. В частности, препарат MSC в соответствии с настоящим изобретением используют в лечении болезни "трансплантат против хозяина" (GVHD).

Однако в контексте описываемого в настоящем документе настоящего изобретения препараты MSC применимы при любом регенеративном или аутоиммунном заболевании, предпочтительно при преходящем, рецидивирующем или ремиттирующем. Другие клинические применения препаратов MSC в соответствии с настоящим изобретением включают при заживлении ран, язве роговицы, инсульте или при облегчении приживления в трансплантации аллогенных стволовых клеток.

Клеточная терапия, включающая введение MSC, основывается, например, на следующих стадиях: сбор содержащей MSC ткани (костного мозга), выделение и размножение MSC согласно описываемым в настоящем документе способам и введение MSC субъекту/больному с биохимической или генетической манипуляцией или без таковой.

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта при необходимости этого, включающему стадию введения терапевтической дозы препарата MSC, получаемого в соответствии с настоящим изобретением.

Терапевтическая доза для аутоиммунного заболевания или болезни "трансплантат против хозяина" может содержать от приблизительно  $1 \times 10^5$  клеток/кг до приблизительно  $1 \times 10^7$  клеток/кг. Согласно другому варианту осуществления терапевтическая доза составляет от приблизительно  $1 \times 10^6$  до приблизительно  $5 \times 10^6$  клеток/кг. Согласно другому варианту осуществления терапевтическая доза составляет от приблизительно  $2 \times 10^6$  до приблизительно  $8 \times 10^6$  клеток/кг. Согласно другому варианту осуществления терапевтическая доза составляет приблизительно  $2 \times 10^6$  клеток/кг или приблизительно  $2 \times 10^6 \pm$  приблизительно 10%, приблизительно 20% или приблизительно 30% клеток/кг. Согласно другому варианту осуществления терапевтическая доза составляет приблизительно  $8 \times 10^6$  клеток/кг или приблизительно  $8 \times 10^6 \pm$  приблизительно 10%, приблизительно 20% или приблизительно 30% клеток/кг и включает в себя любые количества или диапазоны между ними. С учетом препарата MSC в соответствии с настоящим изобретением число мезенхимальных стромальных клеток, подлежащих введению, зависит от ряда факторов, в том числе от возраста, массы и пола больного, подлежащего лечению заболевания, а также от его степени и тяжести.

MSC в соответствии с настоящим изобретением могут быть введены с помощью ряда процедур. MSC могут быть введены системно, например внутривенным, внутриартериальным или внутривентральным введением. Мезенхимальные стромальные клетки могут быть введены с помощью прямой инъекции в орган или ткань при необходимости этого. Мезенхимальные стромальные клетки могут быть нанесены местно. Мезенхимальные стромальные клетки могут быть нанесены непосредственно на ткань при необходимости этого в ходе хирургической процедуры.

Мезенхимальные стромальные клетки в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы в лечении, облегчении или предупреждении любого заболевания или нарушения, которое может быть облегчено, вылечено или предупреждено посредством ангиогенеза. Таким образом, например, мезенхимальные стромальные клетки могут быть введены животному для лечения заблокированных артерий, в том числе артерий в конечностях, т.е. плечах, ногах, руках и ступнях, а также в шее или в различных органах. Например, мезенхимальные стромальные клетки могут быть использованы для лечения заблокированных артерий, которые питают головной мозг, с лечением или предупреждением таким образом инсульта. Также мезенхимальные стромальные клетки могут быть использованы для лечения кровеносных сосудов в эмбриональных и постнатальных рогамицах и могут быть использованы для обеспечения формирования гломерулярной структуры. Согласно другому варианту осуществления мезенхимальных стромальных клеток могут быть использованы в лечении ран, как внутренних, так и внешних, а также в лечении кожных язв, образуемых на стопах, руках, ногах или плечах, в том числе без ограничения кожных язв, вызванных заболеваниями, такими как сахарный диабет и серповидноклеточная анемия.

Более того, поскольку ангиогенез вовлекается в имплантацию эмбриона и формирование плаценты, мезенхимальные стромальные клетки могут быть использованы для обеспечения имплантации эмбриона и предупреждения невынашивания.

Кроме того, мезенхимальные стромальные клетки могут быть введены нерожденному субъекту, в том числе людям, для обеспечения развития сосудистой системы у нерожденного субъекта.

Согласно другому варианту осуществления мезенхимальных стромальных клеток могут быть введены субъекту, рожденному или нерожденному, для обеспечения хрящевой резорбции и формирования костей, а также для обеспечения корректного морфогенеза пластинок роста.

Мезенхимальные стромальные клетки могут быть генетически сконструированы с одним или несколькими полинуклеотидами, кодирующими терапевтическое средство. Полинуклеотиды могут быть доставлены в мезенхимальные стромальные клетки с помощью соответствующего носителя экспрессии. Носители экспрессии, которые могут быть использованы для генетического конструирования мезенхимальных стромальных клеток, включают в себя без ограничения ретровирусные векторы, аденовирусные векторы и векторы на основе аденоассоциированного вируса. MSC в соответствии с настоящим изобретением могут быть, например, генетически сконструированы с надэкспрессией TERT и, таким образом, с иммортализацией клеток.

Также препарат MSC в соответствии с настоящим изобретением или мезенхимальная стромальная клетка могут быть применены в трансплантации стволовых клеток.

Кроме того, обеспечивается применение препарата MSC или MSC в соответствии с настоящим изобретением в получении остеозамещающего материала.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу получения медикамента, содержащего мезенхимальные стромальные клетки, включающему стадии способа согласно любому из описываемых в настоящем документе способов выделения/очистки MSC.

Согласно другому варианту осуществления MSC в соответствии с настоящим изобретением или получаемые способами в соответствии с настоящим изобретением могут дифференцироваться в остеобласты, адипоциты и/или хондроциты при соответствующих условиях культивирования, таких как соответствующие условия индуцирования клеточной дифференцировки, например при культивировании в соответствующей индуцирующей среде, такой как среда, индуцирующая остеогенез, адипогенез и хондрогенез соответственно. Согласно одному варианту осуществления соответствующие условия культивирования и соответствующие индуцирующие среды являются такими, как определено в примерах. Согласно другому варианту осуществления примеры приемлемых условий и сред раскрываются в Aubin J. E. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J. Cell Biochem.* (1999) 72(3):396-410 (в отношении остеогенеза); Falconi D, Oizumi K, Aubin J E. Leukemia inhibitory factor influences the fate choice of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells.* (2007) 25(2):305-312 (в отношении адипогенеза) и Zhang S, Uchida S, Inoue T, Chan M, Mockler E, Aubin J E. Side population (SP) cells isolated from fetal rat calvaria are enriched for bone, cartilage, adipose tissue and neural progenitors. *Bone.* (2006) 38(5):662-670 (в отношении хондрогенеза).

Согласно одному аспекту настоящее изобретение относится к набору для осуществления способа в соответствии с настоящим изобретением, содержащему одно или более из следующих: культуральная среда и инструкции по ее применению. Согласно другому варианту осуществления настоящее изобретение может обеспечивать набор, содержащий образец выделенных мезенхимальных стромальных клеток в соответствии с настоящим изобретением и необязательно культуральную среду и/или инструкции для применения в экспериментах и/или в трансплантации.

Препарат мезенхимальных стромальных клеток (MSC), описываемый в настоящем документе, более того, характеризуется тем, что содержит MSC, выделенные из моноклеарных клеток костного мозга (BM-MNC), но являющиеся полигенными и обладающие по меньшей мере одной из следующих характеристик:

(а) повышенная экспрессия p21 по сравнению с экспрессией p21 в моногенных MSC (полученных от отдельных доноров),

(b) пониженная экспрессия p53 по сравнению с экспрессией p53 в моногенных MSC (полученных от отдельных доноров) и/или

(c) пониженная экспрессия с-тус по сравнению с экспрессией с-тус в моногенных MSC (полученных от отдельных доноров).

Эти характеристики могут быть использованы как альтернативные или дополнительные структурные особенности, отличающие описываемый препарат MSC в соответствии с настоящим изобретением от известных из уровня техники препаратов. Согласно одному варианту осуществления препарат MSC в соответствии с настоящим изобретением содержит MSC с повышенной экспрессией p21 по сравнению с экспрессией p21 в моногенных MSC (полученных от отдельных доноров). MSC в соответствии с настоящим изобретением, в качестве дополнения или в качестве альтернативы, могут характеризоваться пониженной экспрессией p53 по сравнению с экспрессией p53 в моногенных MSC (полученных от отдельных доноров).

Настоящее изобретение согласно одному варианту осуществления относится к препарату MSC, при этом указанные MSC, в качестве дополнения или в качестве альтернативы, характеризуются пониженной экспрессией с-тус по сравнению с экспрессией с-тус в моногенных MSC (полученных от отдельных доноров).

Согласно конкретным вариантам осуществления указанное повышение экспрессии p21 является по меньшей мере 2-кратным, предпочтительно по меньшей мере 3-кратным, более предпочтительно по меньшей мере 4-кратным; и/или при этом указанное понижение экспрессии p53 является по меньшей мере 10-кратным, предпочтительно по меньшей мере 20-кратным; и/или при этом указанное понижение экспрессии с-тус является по меньшей мере 10-кратным, предпочтительно по меньшей мере 20-кратным и наиболее предпочтительно не выявляется.

Предпочтительные препараты MSC в соответствии с настоящим изобретением содержат MSC со всеми упомянутыми выше характеристиками (a)-(c). Выделенные MSC в соответствии с настоящим изобретением содержат по меньшей мере одну человеческую MSC с хромосомной транслокацией между хромосомами 5 и 9, что может быть использовано в качестве дополнительной характеристики MSC в соответствии с настоящим изобретением. Предпочтительно MSC обладают характеристиками (a) и (b), (a) и (c) или (b) и (c). Наиболее предпочтительно указанные MSC обладают характеристиками (a), (b) и (c). Также предпочтительным является препарат MSC, в котором указанное различие в экспрессии p21, p53, с-тус и/или hTERT наблюдается между MSC в соответствии с настоящим изобретением и моногенными MSC, полученными от отдельных доноров.

Далее настоящее изобретение будет описываться следующими примерами со ссылкой на прилагаемые графические материалы и последовательности, при этом без ограничения ими. Для целей настоящего изобретения все ссылочные материалы, упоминаемые в настоящем документе, включены посредством ссылки во всей своей полноте.

#### Согласно графическим материалам

На фиг. 1 представлен сбор костного мозга и отделение мононуклеарных клеток костного мозга. А) Костный мозг собирали от 8 здоровых доноров третьей стороны под общей анестезией путем билатеральной аспирации из гребня подвздошной кости. В) Образцы костного мозга собирали в мешки и антикоагулировали с помощью 7-12% ACD-A и 7-12 международных единиц гепарина на 1 мл аспирационного материала костного мозга. С) Мононуклеарные клетки костного мозга обогащали от аспирационного материала костного мозга путем центрифугирования в градиенте плотности фиколла (GE Healthcare, Munich, Germany) с использованием процесса Sepax II NeatCell (Biosafe, Switzerland). D) BM-MNC дважды промывали и ресуспендировали в криосреде, состоящей из 10% DMSO/5% HSA/X-vivo. E) Мешки, содержащие BM-MNC от каждого донора костного мозга в криосреде, замораживали в паровой фазе жидкого азота до применения.

На фиг. 2 показано создание банка MSC из мононуклеарных клеток костного мозга. А) Мешки, содержащие мононуклеарные клетки костного мозга каждого донора, размораживали при +37°C и после двукратного промывания средой их объединяли в определенном объеме DMEM, дополненной 5% тромбоцитарным лизатом. Все клетки высевали в один 1-уровневый планшет Cell Stack и одиннадцать 2-уровневых планшетов Cell Stack В) Через 72 ч неадгерентную фракцию удаляли, а адгерентные клетки далее культивировали в DMEM, дополненной 5% PL, еще 11 суток с заменой среды каждые трое суток. Как только MSC становились заметными и достигали конfluence 80%, MSC отсоединяли с использованием трипсина (TrypLE) и после промывания их средой дебрисы ресуспендировали в криосреде, состоящей из 10% DMSO/5% HSA/DMEM. С) MSC замораживали в 210 криофлаконах, при этом каждый содержал  $1,5 \times 10^6$  MSC пассажа P1. Авторы настоящего изобретения определяют этот набор флаконов с MSC как банк MSC.

На фиг. 3 показано создание клинических конечных продуктов MSC. А) Три произвольно выбранных криоконсервированных флакона с MSC размораживали через 6-8 недель после изначального их криоконсервирования. В) Их высевали в один 1-уровневый Cell Stack ( $636 \text{ cm}^2$ ) и культивировали с течение 6-7 суток в DMEM, содержащей 10% тромбоцитарный лизат. Среду заменяли каждые трое суток. С) В день

6 или 7 (согласно их конфлюэнтному росту) MSC (в конце P1) отсоединяли с помощью трипсина, промывали и высевали в восемь 2-уровневых Cell Stack при концентрации клеток  $2 \times 10^3$  MSC/1 см<sup>2</sup> и размножали еще неделю. Среда заменяли каждые 3-4 суток и в конце недели (в конце P2) MSC отсоединяли с помощью трипсина, дважды промывали и подсчитывали количество клеток. MSC криоконсервировали и определяли как клинический продукт MSC, который через 2-3 недели подвергали валидации в отношении их пролиферативного, дифференцировочного и аллосупрессивного потенциала.

На фиг. 4 показан фенотип MSC и их дифференцировочный потенциал. А) MSC, полученные путем размножения аликвот из банка MSC, в конце пассажа 2 метили мышиными антителами против иммуноглобулина человека, конъюгированными с флуорохромами, как показано в табл. 1. В) Культивирование MSC в тканеспецифических культуральных средах индуцировало их дифференцировку в адипоциты и остеобласты.

На фиг. 5 представлены кинетические показатели роста MSC от отдельных доноров и конечных продуктов MSC. А) Начальное число  $4,4 \times 10^4$  MSC от каждого донора костного мозга размножали в течение одного пассажа (от начала до конца P2). В то же время MSC всех 8 доноров объединяли и размножали с самого начала до конца P2 (пул MSC), а также 4 аликвоты из банка MSC. В конце пассажа 2 MSC трипсинизировали и вычисляли их количество; ns = не значительное. В) Десять криофлаконов с MSC из банка MSC размораживали и размножали в течение двух пассажей для оценивания их пролиферативного потенциала. Среднее количество клеток всех флаконов с размножаемыми клетками в конце пассажа 2 составляло  $5,3 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$  MSC. С) MSC демонстрировали приблизительно 4 удвоения популяции (PD) на пассаж, Таким образом, совокупное количество PD (CPD) составляло  $8,7 \pm 0,4$  PD. D) Для демонстрации того, что конечные продукты MSC не являются иммортальными клетками, авторы настоящего изобретения оценивали их кинетические показатели роста в ходе 12 пассажей и подсчитывали число PD. Как показано на фигуре, из пассажей 9-12 эти MSC не могли даже удваивать свое количество (n=3).

На фиг. 6 показан аллосупрессивный потенциал MSC, полученных от отдельных доноров, и конечных продуктов MSC. А) MSC пассажей 0-8 от отдельных доноров, а также пул MSC, который получали путем объединения MSC 8 доноров перед размножением (пул MSC), и один конечный продукт MSC (MSC-140) размножали в конце пассажа 2. Затем MSC трипсинизировали, дважды промывали средой и после определения количества и жизнеспособности клеток с помощью трипанового синего их использовали для оценивания их аллосупрессивного потенциала в анализе MLR. В день 6 в клетки добавили BrdU, на следующий день выполняли анализ для оценивания ингибирования пролиферации аллогенных мононуклеарных клеток крови от двух отличающихся по HLA доноров. В) Шесть конечных продуктов MSC (клинические дозы) размораживали и после промывания клетки непосредственно использовали для анализа MLR. Цель данных экспериментов заключалась в выяснении того, способны ли размороженные конечные продукты MSC, как их предоставляют больным, подавлять аллогениндуцированную пролиферацию мононуклеарных клеток от двух доноров аллогенных MNC.

На фиг. 7 представлена генетическая характеристика клинического конечного продукта MSC. А) Нормальная кариограмма клинических конечных продуктов MSC в конце пассажа 2. В) Интерфазные ядра после двухцветной гибридизации набора зондов 5p15 (зеленый) и 5q35 (красный) выявили нормальный диплоидный паттерн для хромосомы 5. С) Интерфазные ядра после трехцветной гибридизации зонда Break Apart MYC показывали почти во всех клетках два сигнала нормального слияния. D) Количество MSC с нормальным диплоидным и анеуплоидным паттерном после двухцветной гибридизации набора зондов 5p15 и 5q35. Общее число анализируемых MSC составляло 396. E) Количество MSC с нормальным диплоидным и анеуплоидным паттерном после трехцветной гибридизации зонда Break Apart MYC для хромосомы 8q24. Общее число анализируемых MSC составляло 356.

На фиг. 8 показана экспрессия трансформирующих генов и химерный анализ конечных продуктов MSC. А) RT-PCR анализ генов, участвующих в клеточной трансформации, в 3 клинических конечных продуктах MSC. Выделяли общую РНК из трех конечных продуктов MSC и MSC от одного донора (контроль). После транскрипции в cDNA ее использовали для количественного выражения экспрессии p21, p53 и c-myc с помощью PCR. В) STR-PCR анализ клинического конечного продукта MSC. Из MSC клинического конечного продукта MSC выделяли ДНК, которую затем использовали для оценивания конкретных участков STR, найденных в ядерной ДНК. Генотипы всех восьми доноров были представлены в конечном продукте MSC, полученном из объединенных MNC.

### Примеры

#### Материалы и способы

#### Сбор сырьевого материала

Костный мозг аспирировали под общей анестезией билатеральной аспирацией из гребня подвздошной кости. Костный мозг антикоагулировали с помощью 7-12% ACD-A и 7-12 международных единиц гепарина на 1 мл аспирационного материала костного мозга.

#### Тестирование инфекционного заболевания

Панель маркеров инфекционного заболевания превышала минимальные требования JACIE и закона Германии о стволовых клетках. Таким образом, как часть обследования доноров искали признак сероне-

гитивной реакции для HiV1/2, антитела против HBc, HBsAg, антитела против HCV, антитела против HTLV1/2 (IgM и IgG для всех), антитела против гепатита А IgM, антитела против токсоплазмы IgM, антитела против EBV IgM, антитела против CMV IgM и ТРНА, а также негативность с помощью NAT для HiV, HAV, HBV, HCV и ParvoB 19; тесты для HiV1/2, антитела против HBc, HBsAg, антитела против HCV, CMV, ТРНА и описываемый NAT повторяли в день процедуры сдачи костного мозга. Все доноры отвечали критериям. Более того, поскольку CMV является резидентным вирусом в клетке, искали негативность для генома CMV в дебрисе костного мозга (Dept. of Virology, Goethe University, и Bioreliance, Glasgow, UK).

#### Оборудование для обработки

Все процессы выполняли в полном соответствии критериям GMP в блоке "чистая зона" (класс А в В) отдела Клеточных терапевтических средств/обработки клеток (GMP), который является частью Донорской службы Красного креста Германии и полностью подчиняется ее системе контроля качества, с официального разрешения государственного правительства (производственная лицензия согласно §20 b/c (сбор и тестирование BM) и §13 (получение и тестирование MSC) закона Германии "О лекарственных средствах").

#### Обработка костного мозга

Мононуклеарные клетки костного мозга обогащали из аспирационного материала костного мозга путем центрифугирования в градиенте плотности фиколла (GE Healthcare, Munich, Germany) с использованием процесса Sepax II NeatCell (Biosafe, Switzerland), как описывается изготовителем. Все соединения выполняли путем сплавления стерильных трубок (TSCD, Terumo, Düsseldorf, Germany) так, что использовался полностью закрытый процесс.

#### Сбор тромбоцитарных концентратов и получение тромбоцитарных лизатов (PL)

В качестве исходного материала для тромбоцитарных лизатов использовали одно- и двухдневные объединенные тромбоциты лейкоцитарной пленки, содержащие приблизительно 10% плазмы в PASIII. Тромбоциты осветляли для клинического применения согласно руководству по пищевым продуктам Германии. Для получения одной партии тромбоцитарного лизата объединяли до 4-6 тромбоцитарных концентратов. Тромбоциты аликвотировали в А в окружении В в стерильных 50 мл пробирках Falcon и сразу же замораживали при -80°C. Отдельные аликвоты размораживали по меньшей мере через 24 ч и центрифугировали в течение 10 мин при 3774×g с тормозом (ускорение 8, тормоз 4). Супернатанты (тромбоцитарные лизаты) собирали и подвергали расширенному тестированию готового продукта, в том числе на отсутствие бактерий (BacTAlert, Biomerieux) и потенциал обеспечения адгезии клеток-предшественников для MSC и размножения MSC.

#### Тестирование тромбоцитарных лизатов

##### а) Потенциал тромбоцитарных лизатов в обеспечении адгезии клеток-предшественников для MSC.

Мононуклеарные клетки костного мозга (BM-MNC) размораживали при 37°C, дважды промывали с помощью DMEM, дополненной 5% PL, и после последнего промывания дебрис ресуспендировали в DMEM, дополненной 5 международными единицами гепарина/мл и 5% или 10% PL. BM-MNC высевали с плотностью  $1,71 \times 10^5 / 1 \text{ см}^2$  и инкубировали в течение 72 ч при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> и влажностью насыщения. Фракцию неадгерентных клеток удаляли, а адгерентные клетки далее культивировали еще 11 суток. Культуральную среду заменяли каждые 3-4 суток. Как только веретенообразные клетки (MSC) достигали конfluenceности при 70-80%, их ферментативно отсоединяли с помощью трипсина и подсчитывали их количество. Данную процедуру выполняли с обеими средами, т.е. с DMEM, дополненными либо 5% PL, либо 10% PL.

##### б) Способность PL размножать MSC.

Характеристики тромбоцитарных лизатов устанавливали как IDM в соответствии со стандартами, изложенными в немецких указаниях, отсутствие бактерий, размножение криоконсервированных аликвот MSC по меньшей мере в 2 раза за 7 суток. Для создания клинических протоколов MSC использовали только тромбоциты, отвечающие этим критериям.

#### Создание банка MSC клинических конечных продуктов

##### а) Создание банка MSC.

Мешки, содержащие мононуклеарные клетки костного мозга от каждого донора, размораживали в Plasmatherm при +37°C. Их дважды промывали с помощью DMEM, дополненной 5% PL, путем центрифугирования в течение 10 мин при 400 g и ресуспендировали при определенном объеме DMEM + 5% тромбоцитарный лизат. После данной стадии клеточные суспензии от каждого донора объединяли вместе и подсчитывали количество клеток с помощью устройства для подсчета клеток (Sysmex). Затем пул клеточной суспензии высевали в одиннадцать 2-уровневых Cell Stack (на один 2-уровневый CellStack:  $250 \times 10^6$  BM-MNC/260 мл среды) и в 1 одинарный CellStack (на 1-уровневый CellStack:  $125 \times 10^6$  BM-MNC/130 мл среды). Через 72 ч неадгерентные клетки удаляли с использованием мешков для замены среды (Macopharma, Langen, Germany), а адгерентные клетки культивировали еще 11 суток с DMEM, дополненной 5% PL, до достижения MSC 80-90% конfluenceности. В течение этого периода среду заменяли каждые 3-4 суток. В день 14 перед отсоединением MSC из каждого CellStack брали 5 мл культу-

ральной среды, которую объединяли в стерильную бутылку, подлежащую тестированию на стерильность в отношении аэробных и анаэробных бактерий и грибов. Затем клетки отсоединяли с использованием синтетического TрупLE (Life Technologies, Darmstadt, Germany) и после промывания с помощью DMEM + 5% PL клетки центрифугировали в течение 7 мин при 400×g. Дебрисы ресуспендировали в определенном объеме среды и клетки подсчитывали с трипановым синим в гемоцитометре. Авторы настоящего изобретения получали в целом 320×10<sup>6</sup> MSC пассажа 1. Два миллиона клеток использовали для определения фенотипа посредством проточной цитометрии. Остальные MSC центрифугировали в течение 7 мин при 400×g.

Клетки ресуспендировали в 5% HSA/DMEM, при этом количество MSC доводили до 3×10<sup>6</sup> клеток/мл. Один объем клеточной суспензии медленно смешивали с одним объемом холодной замораживающей среды, содержащей 20% DMSO/5% HSA/DMEM. Таким образом, конечная концентрация MSC составляла 1,5×10<sup>6</sup>/мл клеточной суспензии, тогда как конечная концентрация криосреды составляла 10% DMSO/5% HSA/DMEM. Клетки распределяли в 210 криофлаконов (в каждом 1,5×10<sup>6</sup> MSC пассажа 1), а затем криоконсервировали с использованием программируемого замораживателя Cryoserve (Schöllkrippen, Germany) согласно установленным протоколам. Замороженные флаконы хранили в паровой фазе жидкого азота (Tec-Lab, Idstein, Germany). Кроме того, остальные MSC смешивали с замораживающей средой и тестировали на стерильность (аэробные и анаэробные бактерии и грибки).

#### б) Создание клинических конечных продуктов MSC.

Для создания и валидации клинических конечных продуктов MSC флаконы банка MSC последовательно размораживали в произвольном порядке через 6-8 недель после их криоконсервирования. После оттаивания при 37°C MSC промывали в культуральной среде, содержащей 10% PL, при этом число жизнеспособных клеток определяли с использованием окрашивания трипановым синим в гемоцитометре. Клетки одного флакона банка MSC высевали в один 1-уровневый Cell Stack (636 см<sup>2</sup>) и культивировали с DMEM, дополненной гепарином (5 международных единиц/мл среды) и PL 10% (об./об.). Среду заменяли в день 4, а в день 6-7 клетки отсоединяли с использованием TрупLe, а затем далее высевали в восемь 2-уровневых Cell Stack (каждый 1,272 см<sup>2</sup>) как пассаж два с плотностью 2×10<sup>3</sup> клеток/см<sup>2</sup>. Процедуру повторяли как для пассажа 1 и в день 6-7 MSC собирали. После промывания с помощью 0,5% HSA/0,9% NaCl жизнеспособные MSC подсчитывали с помощью окрашивания трипановым синим. Затем клинические MSC ресуспендировали в криосреде (0,9% NaCl с 5% HSA и 10% DMSO) как MSC конечного пассажа 2 и распределяли в 4-7 криомешков, содержащих 4,2-5,5×10<sup>7</sup> MSC в каждом в объеме 45 мл замораживающей среды. Образцы криоконсервировали с использованием программируемого замораживателя Cryoserve (Schöllkrippen, Germany) с использованием установленных протоколов и хранили в паровой фазе жидкого азота (Tec-Lab, Idstein, Germany).

#### Тесты для контроля качества

Все тесты выполняли с размороженными конечными продуктами MSC без размножения в состоянии, в котором их вводят больным для клинического применения.

#### а) Подсчет клеток и жизнеспособность размороженных MSC.

Подсчет всех клеток выполняли с использованием гемоцитометра Neubauer. Жизнеспособность MSC оценивали с использованием окрашивания трипановым синим.

#### б) Фенотипическая характеристика.

Проточный цитометрический анализ выполняли с использованием минимальных критериев ISCT для MSC. С целью определения фенотипа размороженных MSC авторы настоящего изобретения окрашивали их следующими конъюгированными с флуорохромом мышиными моноклональными антителами против иммуноглобулина человека, представленными в табл. 1.

Таблица 1. Антитела, используемые для определения фенотипа MSC

Антитела	Компания	№ по каталогу	Клон	Изотип
IgG1 FITC	BioLegend	400109	МОРС-21	IgG1
IgG2a FITC	BioLegend	400209	МОРС-173	IgG2a
IgG1 PE	BioLegend	400113	МОРС-21	IgG1
IgG1 PerCP	BioLegend	400147	МОРС-21	IgG1
CD45 FITC	BioLegend	304005	HI30	IgG1
CD34 FITC	BioLegend	343603	561	IgG2a
CD14 FITC	BioLegend	325603	HCD14	IgG1
HLA-DR FITC	BioLegend	307603	L243	IgG2a
CD90 FITC	BioLegend	328107	5E10	IgG1
CD73 PE	BioLegend	344003	VB-CD73.3	IgG1
CD105 PE	BioLegend	323205	43A3	IgG1
Раствор пропидиума йодида (PI) для окрашивания	BD Pharmingen	556463		

## d) Оценивание аллосупрессивного потенциала конечных продуктов MSC.

Для тестирования иммуносупрессорного эффекта конечных продуктов MSC на контролируруемую аллоантигеном реакцию авторы настоящего изобретения использовали реакцию смешанных лимфоцитов (MLR). Мононуклеарные клетки периферической крови (PB-MNC) от здоровых неродственных доноров выделяли с использованием градиента фикола (плотность 1,077, Biochrom KG, Berlin, Germany), дважды промывали с помощью PBS и ресуспендировали в RPMI-1640 с 10% FBS (Invitrogen). PB-MNC от 2 неродственных доноров культивировали в черных 96-луночных планшетах в течение 6 суток, либо отдельно (контрольная группа), либо смешанными с летально облученными (30 Гр) конечными продуктами MSC третьей стороны, при отношении MSC:PB-MNC 1:1 ( $1 \times 10^5$  MSC: $1 \times 10^5$  PB-MNC). Авторы настоящего изобретения оценивали шесть конечных продуктов MSC непосредственно после оттаивания, а также MSC от всех восьми доноров, чьи BM-MNC объединяли и использовали в качестве источника для получения основного банка MSC в соответствии с настоящим изобретением. Все MLR выполняли в трех повторностях в 96-луночном планшете. В день 6 клетки инкубировали с 5-бром-2'-дезоксифосфатом (BrdU) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) в течение 24 ч. На следующий день измеряли относительные световые единицы (RLU/s) с помощью люцинометра 1420 Multilabel Counter Victor 3 (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Germany). Уровни пролиферации PB-MNC определяли в день 7 с использованием анализа с BrdU. Ингибиторный эффект конечных продуктов MSC на пролиферацию аллогенных MNC вычисляли как процентное отношение с использованием следующей формулы:

$$100 - \left[ \frac{\text{пролиферация аллогенных PB-MNC в присутствии MSC}}{\text{пролиферация PB-MNC без MSC}} \times 100 \right].$$

## e) Определение старения конечных продуктов MSC in vitro.

Для демонстрации того, что конечные продукты MSC не являются иммортальными клетками, авторы настоящего изобретения оценивали их кинетические показатели роста за 12 пассажей. При каждом пассаже среду заменяли каждые 3-4 суток и отделение MSC с помощью TgypLE выполняли согласно их пролиферативному потенциалу. Для более точного оценивания их кинетических показателей роста авторы настоящего изобретения вычисляли число удвоений популяции (PD) с использованием следующей формулы: PD для каждой подкультуры:  $[\log_{10}(NH) - \log_{10}(NI)] / \log_{10}(2)$ ; при этом NH = количество собранных клеток, NI = количество инокулированных клеток.

## f) Дифференцировочный потенциал конечных продуктов MSC.

Для исследования дифференцировочного потенциала в ходе адипогенеза и остеогенеза конечные продукты MSC пассажа 2 размораживали и непосредственно культивировали в соответствующих тканеспецифических индуцирующих средах согласно инструкциям изготовителя (Miltenyi Biotec GmbH).

## Адипогенез

Для образования адипоцитов ряд размороженных MSC довели до  $5 \times 10^4$  клеток/1 мл среды NH AdipoDiff. Затем 1,5 мл такой клеточной суспензии культивировали в 35 мм чашках для культивирования клеток при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> и влажностью >95%. Среду заменяли каждые третьи сутки, и через 2-3 недели начинали появляться большие вакуоли. В день 30 адипоциты округлялись и наполнялись липидными каплями, которые авторы настоящего изобретения окрашивали с помощью липофильного красного красителя Oil Red O (Millipore, Schwalbach, Germany).

## Остеогенез

Вкратце, концентрацию размороженных MSC довели до  $3 \times 10^4$  клеток/1 мл среды NH OsteoDiff. Затем 1,5 мл такой клеточной суспензии культивировали в 35 мм чашках для культивирования клеток при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> и влажностью >95%. Среду заменяли каждые третьи сутки. В день 10 остеобласты можно было идентифицировать морфологически по их кубоидальному внешнему виду и по их ассоциации с заново синтезированным костным матриксом. Эти клетки визуализировали путем окрашивания щелочной фосфатазы (Sigma, Deisenhofen, Germany), поскольку коммитированные остеогенные клетки экспрессируют высокие уровни этого фермента. В результате данного окрашивания остеобласты выглядят как темно-пурпурные окрашенные клетки. Тканеспецифические окрашивания оценивали с использованием микроскопа Olympus IX71, оснащенного камерой Soft Imaging System F-View II, и программного обеспечения обработки изображений cellSens Dimension.

## g) Генетический анализ клинических конечных продуктов MSC. RT-PCR анализ экспрессии трансформирующих генов клинических конечных продуктов MSC.

Экстрагировали РНК с использованием набора RNeasy (Qiagen) с последующей обратной транскрипцией с 1 мкг общей РНК с использованием Verso cDNA Kit (Thermo Scientific) со случайными гексануклеотидами согласно инструкциям изготовителя соответственно. Для генов c-myc, p21, p53 и GAPDH выполняли PCR в режиме реального времени на Eppendorf Realplex с использованием Quanti Tect SYBRE green qPCR master Mix (Qiagen). Выявление транскрипции генов hTERT и ABL выполняли на Biorad MyiQ Cycler с использованием смеси Absolute qPCR ROX (Thermo Scientific). Олигонуклеотиды приобретали в Eurofins MWG. Праймерные последовательности и условия PCR, за исключением определенных периодов активации реакционной смеси, были опубликованы с подробностями в другом месте.

## h) Интерфазная флуоресцентная гибридизация in situ (FISH).

Анализ интерфазной FISH выполняли согласно протоколам изготовителя с использованием следующих зондов для хромосом 5 и 8: двухцветный зонд для хромосомы 5p15 (hTERT) и 5q35 (NSD1, Kreatech, Amsterdam, NL), а также трехцветный зонд Break Apart для хромосомы 8q24 (MYC, Kreatech, Amsterdam, NL). Оценивание сигналов гибридизации выполняли на автоматизированной системе подсчета точек (Applied Spectral Imaging, Edingen/Neckarhausen, Germany). Для каждого зонда сканировали и классифицировали >300 ядер с использованием порога 5%.

#### Документация

Перед созданием клеточного банка MSC клинические образцы для тестирования и клинические образцы для выпуска, процесс официально валидировали в мелкомасштабных культурах, на основании чего формально определяли инструкции изготовителя (SOP), протоколы партии, инструкции и протоколы тестирования, а также описания. Лицензию на производство для клеточного банка MSC, а также для клинического образца для применения в клинических испытаниях получали от государственного правительства. Требования по качеству устанавливали после получения официальных консультативных заключений от Федерального агентства по лекарственным средствам, институт Пауля Эрлиха.

#### Статистический анализ

Статистическую значимость анализировали с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Значимость оценивали с использованием критерия Стьюдента. Р-значение менее 0,05 считали статистически значимым.

Пример 1. Сбор костного мозга от 8 здоровых доноров третьей стороны и выделение BM-MNC.

После получения письменного информированного согласия у каждого донора костного мозга собирали до 250 мл дополнительного аспирационного материала костного мозга с целью создания банка MSC с одобрения местного Комитета по этике в полном соответствии с Хельсинской декларацией. В общей сложности от 8 доноров авторы настоящего изобретения получали 1,66 л костного мозга. Для выделения мононуклеарных клеток костного мозга с помощью градиента фиколла авторы настоящего изобретения использовали аппарат Sepax, как показано на фиг. 1. Абсолютное количество BM-MNC на 1 мл костного мозга после данной процедуры выделения составляло  $3,3 \times 10^6 \pm 6,3 \times 10^5$  клеток. Общее количество BM-MNC, которые получали от восьми доноров, после двух стадий промывания составляло  $9,86 \times 10^9$ . Эти клетки ресуспендировали в криосреде и распределяли в мешки, которые замораживали с использованием программируемого замораживателя, а затем хранили в паровой фазе жидкого азота до применения.

Пример 2. Получение мезенхимальных стромальных клеток из мононуклеарных клеток костного мозга - формирование банка MSC.

Для создания банка MSC мононуклеарные клетки костного мозга от 8 доноров размораживали, промывали и объединяли в DMEM, дополненной 5% PL. Для определения оптимальной концентрации тромбоцитарного лизата для адгезии клеток-предшественников MSC авторы настоящего изобретения культивировали BM-MNC с обеими концентрациями PL 5% и 10%. Полученные результаты демонстрировали, что концентрация 5% тромбоцитарного лизата является намного более эффективной в стимуляции BM-MNC и получении MSC, чем концентрация 10% PL (фиг. 2A). Кроме того, авторы настоящего изобретения выясняли, какая из этих двух концентраций PL лучше для клинического размножения MSC. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что концентрация 10% PL значительно более эффективна для размножения MSC, чем 5% PL (фиг. 2B). Более того, в обоих случаях нефилтрованные тромбоцитарные лизаты были более эффективными для создания и размножения MSC, чем филтрованные (фиг. 2C). Эти предварительные эксперименты обеспечили условия для создания банка MSC. Таким образом, авторы настоящего изобретения размораживали BM-MNC от каждого донора и после двукратного промывания объединяли их вместе, а затем культивировали в течение 14 суток, как описывается в разделе "Способы". Авторы настоящего изобретения из  $9,89 \times 10^9$  BM-MNC смогли получить  $3,2 \times 10^8$  MSC пассажа 1. Данные MSC экспрессировали типичные маркеры для MSC, такие как CD73, CD90 и CD105, но были негативными в отношении маркеров кроветворных клеток, например CD14, CD34, CD45. Они не экспрессировали антигены HLA II класса, но экспрессировали высокие уровни антигенов HLA I класса. Согласно окрашиванию трипановым синим жизнеспособность этих MSC перед замораживанием составляла  $95 \pm 5\%$ .

Общее количество MSC распределяли в 210 криофлаконов с содержанием  $1,5 \times 10^6$  MSC P1 в каждом и окончательно замораживали в газообразной фазе жидкого азота до применения. Авторы настоящего изобретения назвали данный набор флаконов банком MSC.

Пример 3. Создание и валидация клинических конечных продуктов MSC.

а) Размораживание флаконов из банка MSC.

Для получения и тестирования клинических конечных продуктов MSC в отношении их пролиферативного, дифференцировочного и аллосупрессивного потенциала авторы настоящего изобретения размораживали три произвольно выбранных флакона с MSC из банка в соответствии с настоящим изобретением через 6-8 недель после их криоконсервирования. Среднее количество клеток, восстановленных из трех размороженных флаконов, составляло  $1,39 \times 10^6$  жизнеспособных клеток/флакон (диапазон  $1,23 \times 10^6 - 1,48 \times 10^6$ ), тогда как жизнеспособность составляла  $95,25\%$  (диапазон  $93,45\% - 96,9\%$ ). В среднем, размно-

жение этих MSC за 2 недели до конца пассажа 2 позволило получить  $470 \times 10^6$  жизнеспособных MSC (диапазон  $420-548 \times 10^6$  MSC). Эти образцы замораживали в мешках до применения и называли клиническими конечными продуктами MSC.

b) Иммунофенотипирование конечного продукта MSC и его дифференцировочный потенциал.

MSC клинического конечного продукта в конце пассажа 2 были негативными по кроветворным маркерам CD45, CD14, CD34 и не экспрессировали HLA-DR. Однако они экспрессировали высокие уровни типичных маркеров MSC, таких как CD73, CD90 и CD105. Также они были способны дифференцироваться в остеобласты и адипоциты в тканеспецифических средах (фиг. 4).

d) Кинетические показатели пролиферации и старение MSC.

Для демонстрации обоснования объединения мононуклеарных клеток костного мозга от 8 доноров с целью создания банка MSC в соответствии с настоящим изобретением авторы настоящего изобретения сравнивали *in vitro* рост MSC от 8 отдельных доноров с ростом объединенных MSC от каждого донора в P2 и 4 конечных продуктов MSC в том же пассаже (фиг. 5A). Как и ожидали, MSC от каждого донора костного мозга демонстрировали различные кинетические показатели роста, варьирующие от  $0,3 \times 10^6$  (у донора 7) до  $1,7 \times 10^6$  MSC (у донора 5). Средние кинетические показатели пролиферации продукта MSC, полученного из объединенных BM-MNC от 8 доноров, составляли  $1,0 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$  MSC, что неожиданно хорошо коррелировалось с количеством MSC, полученных из пула отдельных MSC от 8 доноров -  $1,1 \times 10^6$ . Более интересно, что оба значения очень хорошо коррелировались со средним количеством MSC, полученным при размножении 4 конечных продуктов MSC в пассаже,  $1,085 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$  MSC. Данные результаты доказывают предположение авторов настоящего изобретения о том, что путем объединения BM-MNC можно получить "среднее арифметическое" хорошо и плохо пролиферирующихся MSC.

Для тестирования вероятности того, что каждый конечный продукт MSC из банка MSC обладает почти одинаковым пролиферативным потенциалом, авторы настоящего изобретения анализировали его при размножении десяти аликвот из банка MSC от P0 до конца пассажа 2 для клинического применения. Как показано на фиг. 5B, среднее количество клеток всех размножаемых конечных продуктов в конце пассажа 2 составляло  $5,3 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$  MSC, что указывает на высокооднородный пролиферативный потенциал конечных продуктов. Подобным образом количество удвоений популяции в P1 и в конце пассажа 2 было почти такое же (4,3 PD/пассаж), а совокупное количество PD не превышало значения 9 ( $8,7 \pm 0,4$ ). Для тестирования того, что MSC не являются иммортальными, авторы настоящего изобретения размножали 3 конечных продукта MSC из банка MSC в соответствии с настоящим изобретением за 12 пассажей. Как показано на фиг. 5D, от пассажа 5 до 12 MSC претерпевали репликативное старение, и число PD быстро снижалось, указывая на то, что эти клетки действительно стареют и не пролиферируют до бесконечности.

e) Аллосупрессивный потенциал MSC, выделенных от отдельных доноров, и конечные продукты MSC в реакции смешанных лимфоцитов (MLR).

Показали, что MSC проявляют аллосупрессивные свойства либо *in vitro*, либо *in vivo*. Для проверки предположения авторов настоящего изобретения о том, что MSC, полученные из пула BM-MNC от 8 доноров, могут обладать более высоким аллосупрессивным потенциалом, чем средний аллосупрессивный потенциал MSC, полученных от отдельных доноров, авторы настоящего изобретения использовали в MLR размноженные MSC пассажа 2 от 8 отдельных доноров, а также пул MSC, который получали путем объединения MSC от 8 доноров перед размножением (пул MSC), и один конечный продукт MSC (полученный из пула MNC, полученного из банка MSC - MSC-140). Как и ожидалось, аллосупрессивный потенциал отдельных MSC был очень однородным, т.е. эти MSC ингибировали совершенно по-разному индуцированную аллоантигеном пролиферацию MNC крови от двух отличных по HLA доноров. Этот эффект варьировал от 20% (у доноров 1 и 8) до приблизительно 80% ингибирования (у доноров 2 и 3) (фиг. 6A). Аллосупрессивный потенциал MSC, полученных из пула MSC от 8 доноров (пула MSC), равнялся среднему ингибиторному потенциалу MSC от 8 доноров вместе (среднее 8 доноров). Однако аллосупрессивный потенциал образца размноженных MSC-140 из банка MSC в соответствии с настоящим изобретением значительно превышал таковой у пула MSC и средний аллосупрессивный потенциал MSC от 8 доноров вместе ( $P < 0,001$ ,  $P < 0,01$  соответственно). С целью оценивания того, являлись ли клинические продукты MSC в соответствии с настоящим изобретением после оттаивания однородными в отношении подавления аллореакции, авторы настоящего изобретения размораживали 6 дополнительных флаконов с MSC и непосредственно тестировали в анализе MLR, поскольку их вводят больным *in vivo*. Как показано на фиг. 6B, все эти 6 клинических продуктов MSC демонстрировали постоянный аллосупрессивный эффект *in vitro*, что указывает на их очень однородный потенциал в подавлении аллореакции. Средний аллосупрессивный потенциал при отношениях мишени к эффектору, используемых в настоящем документе, составлял  $52 \pm 8,7\%$ .

Пример 4. Генетическая характеристика клинических конечных продуктов MSC.

Поскольку *in vitro* культура, как правило, может быть источником хромосомных aberrаций культивируемых клеток, авторы настоящего изобретения выясняли, подвергаются ли таким изменениям клини-

ческие конечные продукты MSC в соответствии с настоящим изобретением. Хромосомный анализ 25 митозов MSC с разрешением приблизительно 350-400 бэнд демонстрировал нормальное число хромосом (эуплоидию) во всех из них (фиг. 7А). Однако с использованием разрешения приблизительно 300 бэнд авторы настоящего изобретения обнаружили транслокацию между коротким плечом хромосомы 5 и коротким плечом хромосомы 9 при 4 из 25 анализируемых митозов. Точки разрыва располагались в бэнде 5p13 и 19p13.3. Анализ флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) с использованием двухцветного зонда для хромосомы 5p15 (hTERT) и 5q35 (NSD1), а также трехцветного зонда Break Apart для хромосомы 8q24 демонстрировал, что большая часть клинических конечных продуктов MSC из банка MSC в соответствии с настоящим изобретением обладает нормальным диплоидным паттерном обеих хромосом (фиг. 7В, С). Интерфазные ядра после двухцветной гибридизации набора зондов 5p15 (зеленый) и 5q35 (красный) указывали на то, что 97,2% клеток демонстрировали нормальный диплоидный паттерн хромосомы 5, и только приблизительно 2,8% показывали тетраплоидный паттерн гибридизации (фиг. 7D). Подобным образом интерфазные ядра после трехцветной гибридизации зонда Break Apart MYC (фиг. 7С) показывали у 97% MSC два сигнала нормального слияния для хромосомы 8q24, а у 3% MSC тетраплоидный паттерн сигнала (фиг. 7Е). Таким образом, хромосомные aberrации *in vitro* происходят в очень небольшой фракции MSC.

Анализ экспрессии генов p53, p21 и Myc в 3 клинических конечных продуктах MSC демонстрировал 2-5-кратное усиление экспрессии p21, приблизительно 6-10-кратное снижение экспрессии гена p53 и отсутствие экспрессии протоонкогена c-myc (фиг. 8А). Наиболее важным является то, что, ввиду поведения старения MSC из банка в соответствии с настоящим изобретением, авторы настоящего изобретения показали, что ни один из 3 конечных продуктов MSC не экспрессировал hTERT (данные не показаны).

Поскольку MSC из банка в соответствии с настоящим изобретением получали из пула BM-MNC от 8 доноров третьей стороны, после получения MSC авторы настоящего изобретения заинтересовались относительным вкладом каждого донора. Химерный анализ с помощью STR-PCR с использованием серий генетических маркеров демонстрировал вклад 8 доноров в различных пропорциях в клинический конечный продукт MSC (фиг. 8В). В принципе, процентное отношение вклада в клинический продукт коррелировало с пролиферативным потенциалом MSC, полученных от отдельных доноров, т.е. MSC, которые по отдельности размножались лучше, обнаруживались также в более высоких пропорциях в конечном продукте MSC.

Пример 5. Клинические случаи больных, получавших лечение препаратами MSC в соответствии с настоящим изобретением.

Больной 1, дата рождения 26.03.1999 г.

Нарушение: большая талассемия.

После получения трансплантации стволовых клеток у больного развивались асцит, отек суставов, экссудативный перикардит, вызванные иммунологическим полисерозитом, возможно, в связи с болезнью "трансплантат против хозяина" (GvHD). Однократное введение MSC в соответствии с настоящим изобретением прошло без осложнений. При одновременном лечении диуретиками асцит, отек суставов и экссудативный перикардит прошли.

Больной 2, дата рождения 20.12.2009 г.

Нарушение: тяжелый агранулоцитоз.

В день +12 после терапии стволовыми клетками (SCT) у больного возникла острая молниеносная GvHD кожи (IV степени), которая не контролировалась даже с помощью 2 мг/кг стероида и 55 мг/кг микофенолата мофетила в сутки. 22.11.2012 г. ребенок получил MSC в соответствии с настоящим изобретением.

После терапии MSC GvHD медленно, но устойчиво проходила, до полного прекращения через 28 суток после введения MSC. Ребенок перенес MSC очень хорошо и показал отсутствие вирусной, бактериальной или грибковой инфекции через 30 суток после введения.

Больной 3, дата рождения 25.03.2010 г.

Нарушение: острый лимфобластный лейкоз.

SCT осуществляли 16.10.12 г. от неидентичного в отношении HLA родственного донора. Уже в день +14 после SCT отмечали первые признаки GvHD в кишечнике. Немедленно начали терапию микофенолата мофетилем и стероидом. Это приводило к относительному улучшению симптомов. На день +35 после SCT, однако, GvHD II степени в кишечнике сохранялась, несмотря на длительное введение стероида.

В связи с этим было принято решение об усилении иммуносупрессорной терапии путем введения MSC в соответствии с настоящим изобретением. Введение MSC прошло без осложнений 21.12.12 г. В течение 30 суток после введения SCT не проявлялись какие-либо инфекции. На 15.01.2013 г. не наблюдали никаких признаков GvHD в кишечнике больного, и сохранилась только лишь умеренная GvHD кожи, которая не требовала какого-либо лечения.

Больной 4, дата рождения 25.03.1999 г.

Нарушение: острый миелолейкоз.

SCT осуществляли 19.09.12 г. от неидентичного в отношении HLA родственного донора.

Через 5 месяцев после трансплантации стволовых клеток у больного развились клинические симптомы синдрома Стивенса-Джонсона. Поскольку больной на момент регистрации данных принимал не-

сколько медицинских препаратов, которые ассоциировались с развитием данной клинической картины, соответствующие медицинские препараты (вориконазол, пенициллин, котримоксазол) были отменены. В связи с выявлением аденовирусной инфекции было решено не проводить иммуносупрессорную терапию глюкокортикоидами. У больного также развивались типичные вызванные GvHD поражения кожи, которые, вероятно, стимулировались синдромом Стивенса-Джонсона. Таким образом, начали иммуносупрессорную терапию с помощью CSA. Для ослабления воспалительных явлений вводили MSC в соответствии с настоящим изобретением. Такое введение MSC хорошо переносилось. Также несколько раз в сутки применяли содержащий глюкокортикоид крем. При данной терапии наблюдали почти полное заживление вызванных GvHD поражений кожи.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. In vitro способ выделения мезенхимальных стромальных клеток (MSC), включающий объединение образцов костного мозга, полученных по меньшей мере от двух генетически отличающихся доноров, с получением пула клеток образцов, а затем выделение мезенхимальных стромальных клеток из указанного пула клеток образцов.

2. Способ по п.1, включающий стадии:

(a) обеспечение ряда образцов костного мозга, полученных по меньшей мере от двух генетически отличающихся доноров;

(b) объединение указанных образцов костного мозга с получением пула клеток образцов;

(c) необязательно культивирование указанного пула клеток образцов и

(d) выделение из указанного полученного на стадии (b) пула клеток образцов указанных мезенхимальных стромальных клеток.

3. Способ по п.1 или 2, при котором указанным образцом костного мозга является образец костного мозга млекопитающего, а указанной мезенхимальной стромальной клеткой является мезенхимальная стромальная клетка млекопитающего; предпочтительно при котором указанным образцом костного мозга является образец костного мозга человека и указанной мезенхимальной стромальной клеткой является мезенхимальная стромальная клетка человека.

4. Способ по любому из пп.1-3, при котором указанными образцами костного мозга являются образцы мононуклеарных клеток костного мозга.

5. Способ по любому из пп.1-4, при котором указанные образцы костного мозга получают по меньшей мере от трех, более предпочтительно по меньшей мере от четырех, более предпочтительно по меньшей мере от пяти, более предпочтительно по меньшей мере от шести, более предпочтительно по меньшей мере от семи и наиболее предпочтительно по меньшей мере от восьми генетически отличающихся доноров.

6. Способ по любому из пп.1-5, дополнительно включающий стадию либо хранения указанных выделенных мезенхимальных стромальных клеток, либо размножения указанных выделенных мезенхимальных стромальных клеток.

7. Композиция мезенхимальных стромальных клеток (MSC) для заживления ран или для лечения аутоиммунных заболеваний, язвы роговицы, инсульта или для облегчения приживления в трансплантации аллогенных стволовых клеток, содержащая MSC, выделенные из мононуклеарных клеток костного мозга (BM-MNC), причем указанная композиция MSC является hTERT-негативной и полигенной, причем композиция MSC является получаемой способом по любому из пп.1-6.

8. Композиция MSC по п.7, при этом указанная композиция MSC содержит

(a) по меньшей мере 95% CD73+ клеток, 1 и/или

(b) по меньшей мере 95% CD90+ клеток, 1 и/или

(c) по меньшей мере 95% CD 105+ клеток, 1 и/или

(d) по меньшей мере 95% HLA I класса+ клеток, 1 и/или

(e) менее 1% CD45+ клеток, и/или

(f) менее 1% CD14+ клеток, и/или

(g) менее 1% CD34+ клеток, и/или

(h) менее 5% HLA-DR+ клеток.

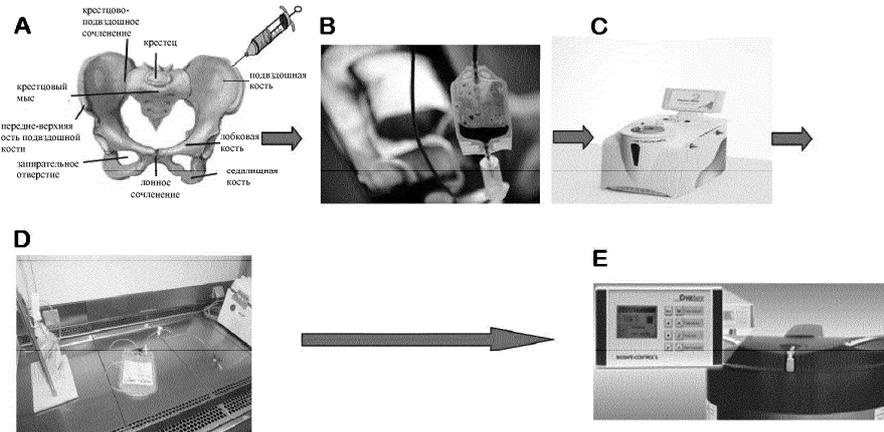
9. Композиция MSC по п.8, содержащая (a), (b) и (c) и/или (e), (f) и (g).

10. Клеточная композиция для заживления ран или для лечения аутоиммунных заболеваний, язвы роговицы, инсульта или для облегчения приживления в трансплантации аллогенных стволовых клеток, содержащая образцы костного мозга по меньшей мере от двух генетически отличающихся доноров костного мозга, причем каждый из указанных образцов костного мозга содержит по меньшей мере одну фракцию неадгерентных клеток и по меньшей мере одну фракцию адгерентных клеток.

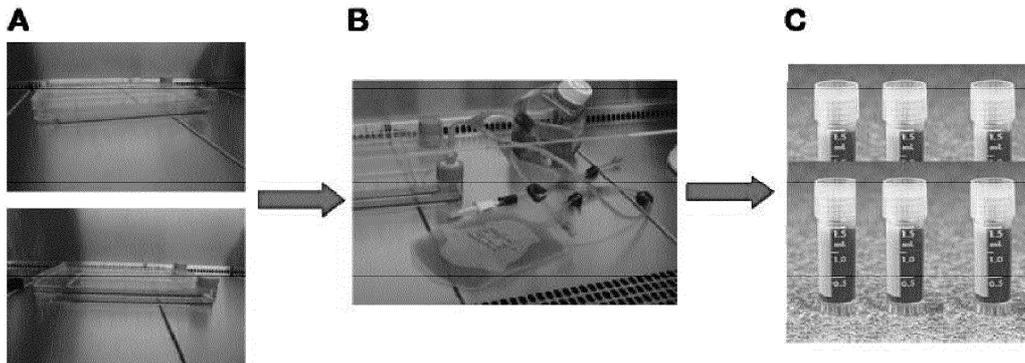
11. Применение смеси мононуклеарных клеток костного мозга, полученных по меньшей мере от двух генетически отличающихся доноров костного мозга, где каждый из указанных образцов костного мозга содержит по меньшей мере одну фракцию неадгерентных клеток и по меньшей мере одну фракцию адгерентных клеток, или клеточной композиции по п.10 в способе выделения мезенхимальных

стромальных клеток.

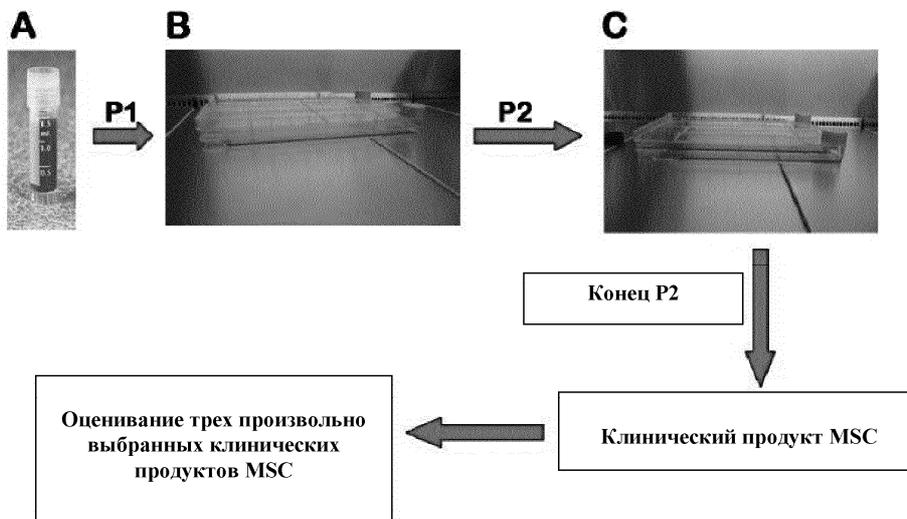
12. Композиция MSC по любому из пп.7-9 или клеточная композиция по п.10, где аутоиммунные заболевания выбирают из рассеянного склероза, сахарного диабета 1 типа, ревматоидного артрита, увеита, аутоиммунного заболевания щитовидной железы, воспалительного заболевания кишечника (IBD), склеродермии, болезни Грейвса, волчанки, болезни Крона, аутоиммунного лимфопролиферативного заболевания (ALPS), демиелинизирующего заболевания, аутоиммунного энцефаломиелита, аутоиммунного гастрита (AIG), аутоиммунного гломерулярного заболевания и предпочтительно болезни "трансплантат против хозяина" (GvHD).



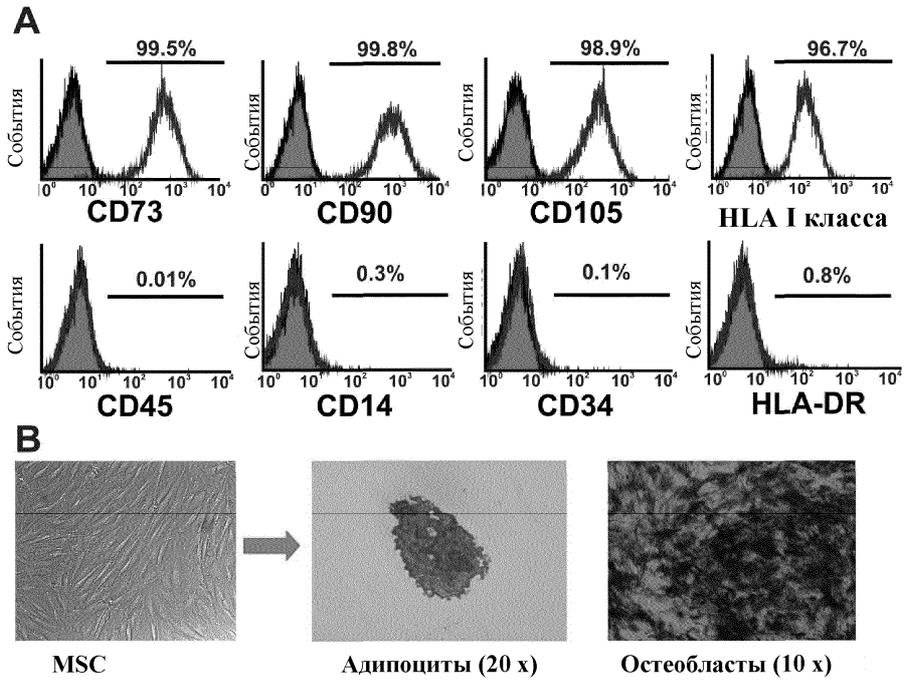
Фиг. 1



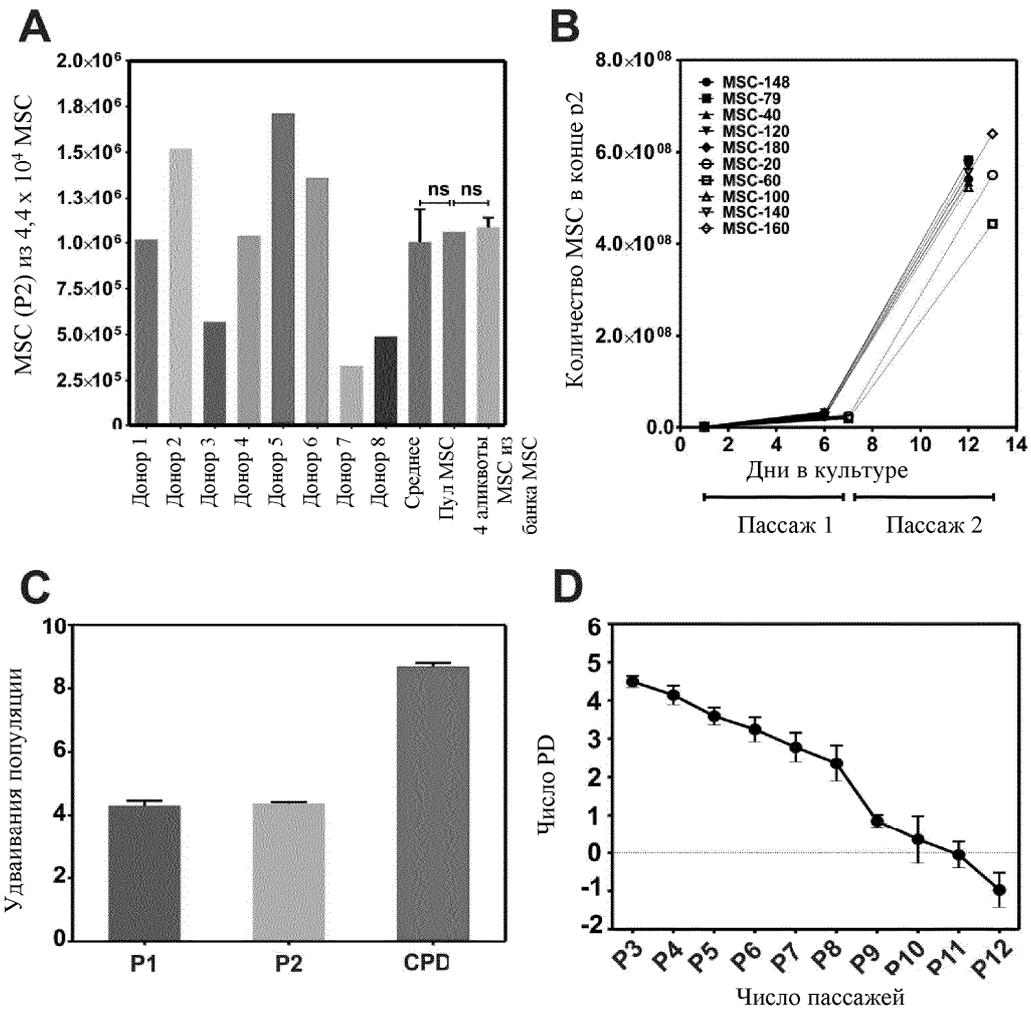
Фиг. 2



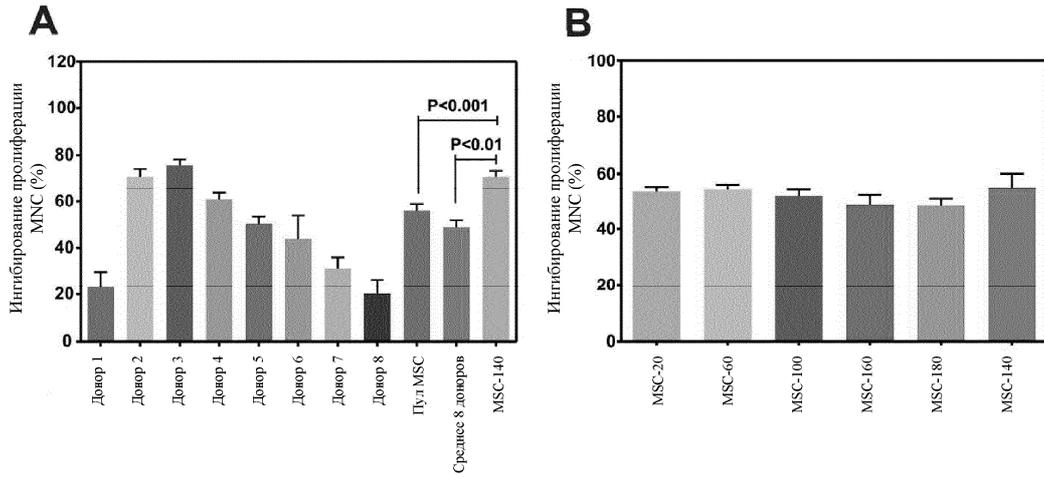
Фиг. 3



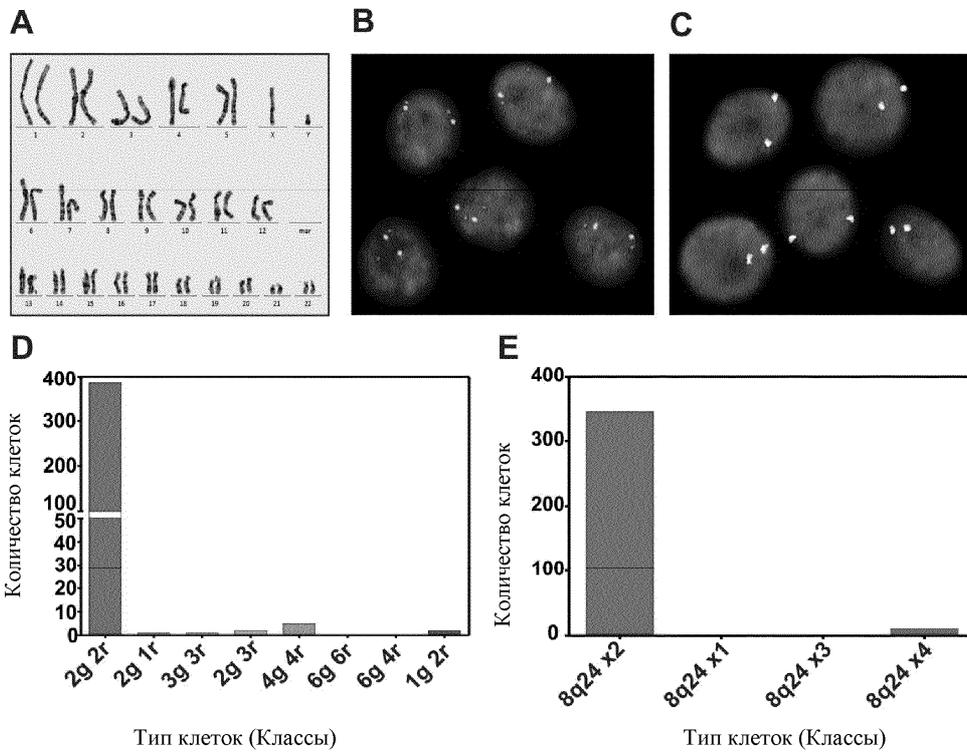
Фиг. 4



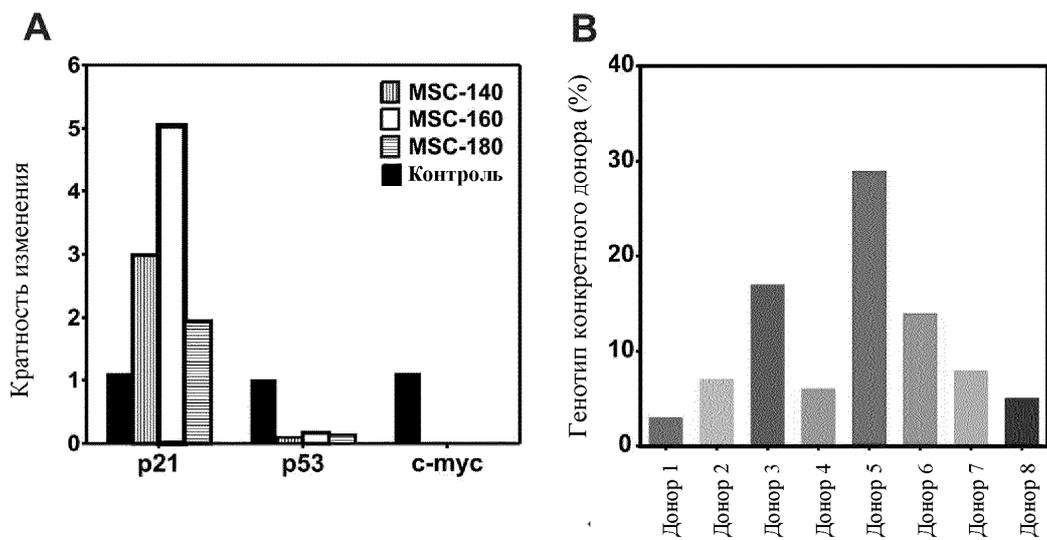
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

