

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **042411**(13) **B1**

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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.02.10**

**(21)** Номер заявки  
**201791233**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.11.30**

**(51)** Int. Cl. *C12N 5/0775* (2010.01)  
*C12N 5/02* (2006.01)  
*A61K 38/18* (2006.01)  
*A61K 35/28* (2015.01)  
*A61P 17/02* (2006.01)

---

**(54) МАТЕРИАЛ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, КУЛЬТУРАЛЬНАЯ СРЕДА,  
КОНДИЦИОНИРОВАННАЯ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ, И КОМПОЗИЦИЯ,  
СОДЕРЖАЩАЯ ЕЕ**

---

**(31)** 2014148251

**(32)** 2014.12.01

**(33)** RU

**(43)** 2017.09.29

**(86)** PCT/RU2015/000831

**(87)** WO 2016/089252 2016.06.09

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ  
ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ  
"Т-ХЕЛПЕР КЛЕТОЧНЫЕ  
ТЕХНОЛОГИИ" (RU)**

**(72)** Изобретатель:  
**Соколов Анатолий Андреевич,  
Колесникова Антонина Ивановна,  
Довгий Андрей Игоревич (RU)**

**(74)** Представитель:  
**Нилова М.И. (RU)**

**(56)** RU-C1-2292212  
WO-A1-2011052818  
WO-A1-2014039429  
WO-A2-2008060374

---

**(57)** Аспекты изобретения относятся к новой линии мезенхимальных стволовых клеток (hb-MSC), культуральной среде, кондиционированной линией hb-MSC и различным композициям hb-MSC. Композиция hb-MSC может включать кондиционированную среду, содержащую смесь факторов VEGF, GRO/KC, TGF-β1 и TGF-β2; и приемлемый носитель, при этом композиция содержит по меньшей мере 760 пг/мл VEGF и по меньшей мере 150 пг/мл GRO/KC. Предложена также кондиционированная среда для терапевтического использования, содержащая: культуральную среду, кондиционированную множеством незембриональных мезенхимальных стволовых клеток, при этом кондиционированная среда содержит (а) по меньшей мере 760 пг/мл VEGF и (b) по меньшей мере 150 пг/мл GRO/KC. Также описаны способы применения клеток hb-MSC, кондиционированной среды и их композиций.

---

**042411 B1**

**042411 B1**

### Область техники

Композиции и способы, соответствующие вариантам осуществления изобретения, в целом, относятся к, по меньшей мере, области клеточной биологии, молекулярной биологии и медицины. Более конкретно, варианты осуществления изобретения относятся к стволовым клеткам, культуральной среде, кондиционированной стволовыми клетками, способам получения культуральной среды, кондиционированной стволовыми клетками, а также способам применения стволовых клеток и культуральных сред, кондиционированных стволовыми клетками.

### Уровень техники

Мезенхимальные стволовые клетки, или MSC, являются мультипотентными стромальными клетками, которые способны дифференцироваться в мезенхимальные клетки различных типов, например, адипоциты, хондроциты и остециты. MSC обладают большим потенциалом для самообновления при сохранении их мультипотентности. MSC костного мозга в настоящее время применяются в клинических исследованиях для различных видов терапии. Процедуры выделения, очистки и размножения MSC в культуре хорошо известны в данной области техники. MSC можно культивировать с использованием бусин, в монослойных (т.е. двумерных) или трехмерных системах. Эти стандартные способы обеспечивают рост MSC в условиях, близко схожих с их физиологическими условиями среды. Было документально подтверждено, что поведение MSC может меняться в условиях *in vivo* и *in vitro*. Отличия между разными линиями MSC, как правило, были связаны с различиями в способах выделения и условиях культивирования *in vitro*. Например, изменения условий культивирования могут повлиять на поведение клеток *in vitro*, включая воздействие на экспрессию маркеров клеточной поверхности. Экспрессирование специфических маркеров на поверхностях клеток может быть использовано для дифференцировки различных клеточных линий или для подтверждения происхождения клеточной линии.

Все клетки (включая MSC) в процессе культивирования продуцируют биологические продукты. Например, как известно, в процессе культивирования MSC продуцируют более 200 уникальных белков. Конкретные биологические продукты, которые продуцируются MSC в процессе культивирования, могут быть использованы для характеристики этих клеток и выявления отличий между различными MSC. Тем не менее, даже когда используются MSC из одного и того же источника, различия в способах выделения и условиях культивирования *in vitro* могут влиять на и изменять продуцирование секретируемых биологических продуктов. Разумеется, также известно, что отклонения от идеальных условий культивирования клеток может привести к ухудшению функционирования клеток и гибели культуры.

### Сущность изобретения

В соответствии с одним аспектом настоящего изобретения представлена уникальная линия мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга крыс линии Вистар, которая имеет одну или более определенных характеристик. Например, когда  $0,7 \times 10^6$  клеток высевает в флакон площадью  $75 \text{ см}^2$  и культивируют в течение по меньшей мере 96 ч, линия мезенхимальных стволовых клеток может: (a) продуцировать по меньшей мере 4,5 мМ лактата в течение 24 ч после замены среды; (b) продуцировать по меньшей мере 150 пг/мл GRO/KC в течение 24 ч после замены среды; (c) клетки продуцируют менее чем 250 пг/мл OPG через 24 ч после замены среды; или (d) клетки продуцируют менее чем 80 пг/мл TGF- $\beta 3$  через 24 ч после замены среды. В соответствии с другим аспектом, когда  $0,7 \times 10^6$  клеток высевает в флакон площадью  $75 \text{ см}^2$  и культивируют в течение по меньшей мере 150 ч: (e) pH культуральной среды снижается до уровня ниже 7,0 в течение 24 ч после замены культуральной среды; или (f) pH культуральной среды снижается по меньшей мере на 0,4 единицы в течение 24 ч после замены культуральной среды по сравнению с pH культуральной среды в отсутствие клеток. Культуральная среда может представлять собой культуральную среду RPMI-1640 в присутствии 5%  $\text{CO}_2$ . Кроме того, те же стволовые клетки могут удваивать свою популяцию по меньшей мере один раз при pH ниже 7,05. Линия стволовых клеток также может характеризоваться положительной экспрессией маркеров CD29 и CD44 и отрицательной экспрессией маркеров CD11b и CD45.

Отдельный аспект настоящего изобретения относится к кондиционированной среде, которая может быть получена за счет поддержания множества уникальных стволовых клеток в культуральной среде в течение определенного периода кондиционирования. В одном аспекте культуральная среда представляет собой RPMI-1640 в присутствии 5%  $\text{CO}_2$ . Клетки могут поддерживаться в культуральной среде в различных условиях, в том числе при атмосферной концентрации  $\text{CO}_2$  или в гипоксических условиях. В соответствии с аспектами настоящего изобретения период кондиционирования может изменяться. Например, период кондиционирования может составлять по меньшей мере 12 ч, или он может представлять собой период времени, достаточный для того, чтобы кондиционированная среда содержала по меньшей мере 150 пг/мл GRO/KC. В другом аспекте настоящего изобретения кондиционированная среда может содержать по меньшей мере одно из следующего: (a) по меньшей мере 500 пг/мл GRO/KC; (b) по меньшей мере 4000 пг/мл VEGF; (c) менее чем 250 пг/мл OPG; или (d) менее чем 80 пг/мл TGF- $\beta 3$ .

Другой аспект настоящего изобретения относится к композиции, которая содержит уникальную линию стволовых клеток или культуральную среду, кондиционированную уникальными клетками. Композиция может также включать в себя приемлемый носитель. Носитель может включать жидкость, крем,

аэрозоль, лосьон, мазь или гидрогель, но не ограничиваясь этим. В некоторых аспектах настоящего изобретения композиция может быть обработана для того, чтобы удалить некоторые или все стволовые клетки. В другом аспекте композиция может включать кондиционированную среду, которая содержит менее чем 250 пг/мл OPG или менее чем 80 пг/мл TGF- $\beta$ 3.

В соответствии с аспектами настоящего изобретения уникальная линия стволовых клеток, кондиционированная среда или композиция могут быть введены субъекту посредством инъекции, имплантации или с помощью местного нанесения. В соответствии с другими аспектами настоящего изобретения клетки, кондиционированная среда или композиция могут быть нанесены на шовный материал, перевязочный материал, вязаную сетку, имплант, стент, трансплантат, влажную салфетку или периодонтальную прокладку или другие устройства-аппликаторы. Клетки, кондиционированная среда или композиция имеют разнообразные виды применения, включая, например, лечение ожогов, уход за кожей, для ангиогенеза и васкулогенеза, репарацию, косметические средства, воспаление тканей, бактериальные инфекции, лечение ран, при диабете, фармацевтические и офтальмологические виды применения, снижение рубцевания, стимулирование роста волос, для иммунотерапии и иммунокоррекции, трансплантации органов, кожи, костного мозга, для лечения органов или тканей, или для лечения других заболеваний как человека, так и животных.

### Краткое описание чертежей

Указанные выше и/или другие аспекты настоящего изобретения станут более очевидными из подробного описания примеров вариантов его осуществления со ссылкой на прилагаемые чертежи, на которых:

- фиг. 1 показывает анализ проточной цитометрии маркеров клеточной поверхности hb-MSC, включая тип маркера и относительный процент маркеров;
- фиг. 2 показывает окрашенные красителем Гимза хромосомы из hb-MSC при Пассаже № 9 (p9);
- фиг. 3 показывает электрофореграммы PCR-анализа hb-MSC и контролей;
- фиг. 4 показывает сравнение ран через девять дней после обработки культуральной средой RPMI-1640 и композицией hb-MSC;
- фиг. 5 показывает относительную скорость закрытия ран, обработанных культуральной средой RPMI-1640 и композицией hb-MSC у мышей;
- фиг. 6 показывает изменение pH во времени для среды RPMI-1640, среды, кондиционированной gb-MSC, и среды, кондиционированной hb-MSC;
- фиг. 7 показывает изменение концентрации лактата (мМ) в процессе культивирования клеток hb-MSC и gb-MSC.

### Подробное описание

В дальнейшем в этом документе разные примеры вариантов осуществления настоящего изобретения будут объяснены со ссылкой на прилагаемые чертежи. Аспекты настоящего изобретения могут быть воплощены в различных формах без ограничения вариантами осуществления, изложенными в этом документе. Следует понимать, что любые заголовки или подзаголовки, используемые в данном описании, приводятся только для удобства и никоим образом не ограничивают объем или значение формулы изобретения. И, наконец, следует иметь в виду, что, как используется в настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

Один вариант осуществления настоящего изобретения относится к новой линии мезенхимальных стволовых клеток (далее в этом документе линия "hb-MSC"). Образец линии hb-MSC депонирован во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПИМ) с регистрационным номером Н-154. Клеточная линия депонирована под названием MSCR05P09. Экспрессия маркеров клеточной поверхности линии hb-MSC согласуется с экспрессией маркеров мезенхимальной стволовой клетки.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к среде, кондиционированной с помощью hb-MSC, и способу ее получения. Кондиционированная среда содержит бесчисленное множество биологических продуктов, небольших молекул и экзосом, способных проявлять множество биологических функций.

Дополнительный вариант осуществления относится к композиции hb-MSC. Композиция hb-MSC может включать: (1) hb-MSC, среду, кондиционированную культурой hb-MSC, или любую их комбинацию; и (2) приемлемый носитель, hb-MSC, среду, кондиционированную культурой hb-MSC, и композицию hb-MSC можно использовать в любом агрегатном состоянии, доставлять с помощью любого метода, известного из уровня техники, и использовать в различных видах применения.

Клетки пассировали *in vitro*, используя культуральную среду. Пригодная среда включает RPMI-1640, среду Игла, модифицированную по способу Дульбекко (DMEM), среду Хэмса F12, среду Искова, среду МакКоя, но не ограничивается ими, или любую другую среду, которая содержит достаточно питательных веществ для роста клеток. Такую среду можно приготовить или получить из коммерческих источников.

Лишение мезенхимальных клеток предпочтительной для них среды роста, как правило, приводит к снижению или остановке пролиферации клеток, потере адгезии к пластику и/или изменению клеточной

морфологии. Одной из важных переменных, связанных с ростом клеток, является pH среды в процессе клеточной пролиферации. Как правило, стволовые клетки не растут (или снижают скорость пролиферации), когда условия в культуре отклоняются от физиологического pH. По этой причине культуральная среда, как правило, действует в качестве буфера при культивировании клеток. Все клетки продуцируют или требуют добавления в воздух небольших количеств  $\text{CO}_2$  для роста и выживания. В некоторых примерах культуральной среды растворенный  $\text{CO}_2$  находится в равновесии с ионами бикарбоната, используя реакцию  $\text{CO}_2$ /бикарбонат для создания pH среды.  $\text{CO}_2$  свободно растворяется в среде и вступает в реакцию с водой с образованием угольной кислоты. По мере того как клетки метаболизируют и продуцируют больше  $\text{CO}_2$ , pH среды уменьшается. Оптимальный диапазон pH от 7,2 до 7,4 может поддерживаться путем добавления к среде бикарбоната натрия ( $\text{NaHCO}_3$ ) и регулирования уровня  $\text{CO}_2$  в атмосфере над средой. Буферная емкость среды определяется по количеству  $\text{NaHCO}_3$ . Обычно, для достижения оптимального pH, к среде, в которой буферная емкость создается добавлением от 1,2 до 2,2 г/л  $\text{NaHCO}_3$ , в атмосферу над средой добавляется 5% дополнительного  $\text{CO}_2$ . В качестве другого примера, чтобы достичь оптимального pH в среде, в которой буферная емкость создается добавлением 3,7 г/л  $\text{NaHCO}_3$ , в атмосферу над средой добавляется 10% дополнительного  $\text{CO}_2$ . Если количество дополнительного  $\text{CO}_2$  недостаточно, то pH среды не может поддерживаться на надлежащем уровне, что может привести к ухудшению функционирования клеток.

Клеточная культуральная среда может также включать дополнительные компоненты, такие как витамины, факторы роста, гормоны, белки, сахара и/или антиоксиданты, в качестве необходимых для обеспечения конкретной клеточной культуры. Следует иметь в виду, что может быть добавлена сыворотка, такая как эмбриональная бычья сыворотка (FBS). Например, 10% дополнительной FBS может быть добавлено к среде, или может быть добавлена плазма крови в том же количестве, как и животная сыворотка. Альтернативно, клетки могут также поддерживаться и размножаться в культуре при отсутствии дополнительной сыворотки и/или дополнительной плазмы крови. Среда, кондиционированная клетками, также может быть использована вместо или в дополнение к культуральной среде.

Линия hb-MSC может быть выделена из костного мозга крыс линии Вистар. Способ выделения линии hb-MSC, как правило, включает, по меньшей мере: (1) получение Пассажа 1 клеток из первичных клеток костного мозга крысы; (2) посев p1 мезенхимальных стволовых клеток крыс в пригодный культуральный флакон; (3) первый этап инкубации, в котором клетки инкубируют при первой заданной концентрации  $\text{CO}_2$ , в течение первого периода времени инкубации; (4) второй этап инкубации, в котором клетки инкубируют при второй заданной концентрации  $\text{CO}_2$ , в течение второго периода времени инкубации; (5) сбор hb-MSC. Первичные стволовые клетки костного мозга крыс извлекают из костного мозга большеберцовой или бедренной кости крыс линии Вистар согласно хорошо известным методам. После извлечения клеток клеточный осадок можно ресуспендировать, высевать на пластиковые флаконы для культуры ткани и инкубировать в культуральной среде (например, RPMI-1640, дополненной 10% FBS) при 37°C во влажной атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ . Прилипающие клетки, выращенные до приблизительно 70% конфлюэнтности, названы Пассажем № 1 (p1). В одном варианте осуществления изобретения первая заданная концентрация  $\text{CO}_2$  может быть установлена в соответствии с предписанной концентрацией  $\text{CO}_2$  для буферной емкости среды, которая, как правило, определяется производителем среды. Например, первая заданная концентрация  $\text{CO}_2$  может составлять 5%, когда для культуры используют среду RPMI-1640. В том же варианте осуществления изобретения вторая заданная концентрация  $\text{CO}_2$  может быть снижена, по меньшей мере, на 50% от концентрации  $\text{CO}_2$ , предписанной для буферной емкости среды, которая, как правило, определяется производителем среды. Для среды RPMI-1640 предписанная концентрация  $\text{CO}_2$  составляет 5%. Таким образом, в соответствии с одним вариантом осуществления указанного способа вторая заданная концентрация  $\text{CO}_2$  должна быть установлена ниже 2,5%. В другом варианте осуществления изобретения вторая заданная концентрация может быть установлена к атмосферной концентрации  $\text{CO}_2$  (т.е. приблизительно 0,03%  $\text{CO}_2$ ). Специалисту в данной области будет понятно, что если вторая заданная концентрация  $\text{CO}_2$  в культуре увеличивается, то может потребоваться увеличение второго периода времени инкубации (например, может потребоваться один или более дополнительных пассажей) для того, чтобы выделить линию hb-MSC.

В одном варианте осуществления изобретения первый период времени инкубации может составлять от нуля до четырех клеточных пассажей. Следует понимать, что, когда первый период времени инкубации составляет ноль пассажей, то первый этап инкубации пропускается полностью. В другом варианте осуществления первый период времени инкубации является периодом между количеством часов, необходимым для достижения одного удвоения популяции (например, около 20-48 ч) до примерно 700 ч культивирования. В одном варианте осуществления изобретения второй период времени инкубации может составлять от одного до восьми клеточных пассажей. В дополнительном варианте осуществления второй период времени инкубации представляет собой период между количеством часов, необходимым для достижения одного удвоения популяции (например, около 20-48 ч) до примерно 2500 ч культивирования. Например, клетки могут подвергаться четырем пассажам в атмосфере 0,03%  $\text{CO}_2$  в RPMI-1640 с 10% FBS. Специалисту в данной области будет понятно, что при необходимости концентрацию  $\text{CO}_2$  можно регулировать в процессе любой стадии инкубации.

"Пассаж" следует понимать как перераспределение клеток, с разбавлением или без разбавления, из одного культурального флакона в другой культуральный флакон, содержащий свежую культуральную среду. Например, один клеточный пассаж может включать: (1) посев клеток на поверхность культурального флакона (например, приблизительно  $2,0 \times 10^6$  клеток на  $175 \text{ см}^2$  площади поверхности); (2) добавление культуральной среды (например, RPMI-1640); (3) установление определенной атмосферы  $\text{CO}_2$ ; (4) помещение культурального флакона в термостат с установленной соответствующей температурой (например,  $37^\circ\text{C}$ ); (5) поддержание клеток в культуральном флаконе в течение заданного периода времени ("заданного периода культивирования") (6) смену культуральной среды на свежую, необходимую для роста клеток; и (7) отделение и пересев клеток. Для каждого пассажа клетки поддерживают в культуральной среде, где предварительно заданный период культивирования находится в диапазоне времени приблизительно 30-700 ч. В одном варианте осуществления изобретения заданный период культивирования составляет менее 96 ч. В другом варианте осуществления изобретения заданный период культивирования находится в диапазоне приблизительно от 96 до 168 ч. В еще одном дополнительном варианте осуществления изобретения предварительно заданный период культивирования составляет более 168 ч. Кроме того, предварительно заданный период культивирования может основываться на контроле конfluэнции клеток. В одном варианте осуществления изобретения предварительно заданный период культивирования составляет время, необходимое клеткам для достижения приблизительно 50% конfluэнции. В другом варианте осуществления клетки пассируют после достижения от около 50 до 70% конfluэнции. В дополнительном варианте осуществления клетки пассируют после достижения приблизительно 70% конfluэнции.

Линию hb-MSC можно выделить посредством культивирования клеток в любом количестве измерений (D). Например, клетки можно культивировать, используя бусинки (0D), монослой (2D) или 3D подложки. Линию hb-MSC можно также выделить, используя разные системы. Линию hb-MSC можно выделить, используя систему открытых флаконов или систему закрытых флаконов или их комбинацию. В одном варианте осуществления изобретения, линию hb-MSC можно выделить, используя систему закрытых флаконов. В системе закрытых флаконов флакон для культивирования клеток закрыт непроницаемой крышкой, которая может предотвратить доступ дополнительного  $\text{CO}_2$ . В другом варианте осуществления изобретения линию hb-MSC можно выделить, используя открытый флакон в камере для культивирования клеток, что позволяет контролировать концентрацию  $\text{CO}_2$ . В отдельном варианте осуществления линию hb-MSC можно выделить в флаконе, закрытом газопроницаемой мембраной в камере для культивирования клеток, что позволяет контролировать концентрацию  $\text{CO}_2$ . Специалисту в данной области техники будет понятно, что различные методы культивирования клеток, описанные выше, приведены только в качестве примеров и не могут быть использованы для ограничения объема притязаний. Специалисту в данной области техники также будет понятно, что процедуры, периоды инкубации, периоды культивирования, среды, сыворотки или концентрации  $\text{CO}_2$  и другие переменные могут требовать изменений с учетом поведения клеток в процессе культивирования.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения относится к уникальной линии hb-MSC. Экспрессия маркеров клеточной поверхности может быть использована для подтверждения мезенхимальной природы этой линии. Маркеры клеточной поверхности могут быть идентифицированы с использованием любого подходящего способа, включая, например, проточную цитометрию. Как описано в Примере 4 и показано на фиг. 1, способ получения hb-MSC не приводит к изменению поверхностных маркеров hb-MSC, что может привести к выводу о том, что hb-MSC демонстрируют поверхностные маркеры, согласующиеся с маркерами мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крыс.

На фиг. 2 показаны окрашенные красителем Гимза хромосомы из hb-MSC при Пассаже № 9 (p9), тогда как на фиг. 3 показаны результаты анализа полимеразной цепной реакции (ПЦР). Гены COX-1 и VN1R1 были использованы в качестве маркеров для митохондриальных и ядерных ДНК крыс, соответственно. При Пассаже № 9 кариотип является нормальным диплоидом (т.е.  $2n=42$ ). Как описано в Примере 1 ниже, анализ ПЦР клеточной линии подтвердил, что это крысиные клетки. Специалисту в данной области будет понятно, что клетки могут подвергаться любому количеству пассажей, при условии, что анализ кариотипа подтверждает генетическую стабильность клеток.

Линия hb-MSC существенно отличается от других линий стволовых клеток, полученных от крыс, что может быть подтверждено при помощи ряда различных способов характеристики. Мезенхимальные стволовые клетки крыс, полученные в стандартных условиях, культивируют, чтобы показать различия между обычными мезенхимальными стволовыми клетками крыс и уникальной линией hb-MSC. Линия обычных мезенхимальных стволовых клеток, подготовленная для целей настоящего сравнения, была названа линией gb-MSC. Для получения линии gb-MSC, p1 мезенхимальных клеток крыс пассировали согласно стандартным условиям, известным из уровня техники, как описано в Примере 2.

В Примере 7 (и на фиг. 6) показано отличие между pH среды линии hb-MSC и линией gb-MSC, что может быть использовано для установления отличий между этими двумя линиями. В другом сравнении линию hb-MSC можно отличить от линии gb-MSC по общей концентрации лактата в культуре. Еще один способ отличить линию hb-MSC от линии gb-MSC состоит в сравнении различных факторов, обнаруживаемых в среде, кондиционированной каждой соответствующей линией, как описано в Примере 8 (и по-

казано в табл. 3). Конечно, линия hb-MSC может также быть охарактеризована с помощью других способов, известных специалисту в данной области техники.

Варианты осуществления настоящего изобретения также относятся к клеткам или клеточным линиям, отличным от hb-MSC. Клеточные линии могут включать адипоциты, хондроциты, остециты и другие клетки. Способы дифференцировки в адипоциты, хондроциты, остециты хорошо известны в данной области техники. Способы генетической модификации стволовых клеток также хорошо известны. Линии стволовых клеток, полученные из генетически модифицированных hb-MSC или любых клеточных линий, дифференцированных от генетически модифицированных hb-MSC, также входят в объем настоящего изобретения. Специалисту в данной области техники будет понятно, что различные способы, характеризующие hb-MSC, представлены только для иллюстративных целей. Варианты осуществления hb-MSC не должны удовлетворять каждому из различных описанных способов характеристики, и некоторые варианты осуществления могут удовлетворять только одному или более способам, раскрытым в настоящем описании.

Один из вариантов осуществления настоящего изобретения относится к культуральной среде, кондиционированной hb-MSC, именуемой далее "hb-MSC кондиционированной средой". В одном варианте осуществления изобретения кондиционированная среда может быть получена путем: (1) посева множества hb-MSC в соответствующий флакон; (2) обеспечения культуральной среды; (3) поддержания hb-MSC в культуральной среде в течение периода кондиционирования; и (4) сбора кондиционированной среды. Период кондиционирования может составлять часы, дни или даже недели, в течение которых питательная среда обогащается биологическими продуктами. При необходимости (например, когда среда кондиционирована таким образом, что биологические продукты, такие как факторы роста, белки и везикулы, достигают желательных уровней в среде), кондиционированная среда может быть собрана. Например, кондиционированная среда может быть собрана после культивирования hb-MSC в течение 3, 6, 24, 30, 48, 54, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312 или 366 ч, или спустя некоторые другие периоды времени. Кондиционированная среда, полученная при культивировании hb-MSC, может быть обработана в стерильных условиях и простерилизована, если это необходимо. Специалисту в данной области будет понятно, что сбор кондиционированной среды до прикрепления клеток к флакону, используемому для культуры, приведет к удалению клеток вместе с питательной средой, что может быть не желательным в зависимости от применения. В одном варианте осуществления hb-MSC могут быть повторно использованы для кондиционирования дополнительной среды путем добавления культуральной среды к hb-MSC после удаления кондиционированной среды. Специалисту в данной области будет понятно, что количество повторного использования клеток зависит от количества часов, используемых для кондиционирования среды, а также от конфлюэнтности клеток. Следует иметь в виду, что hb-MSC среду собирают через различные периоды времени (например, каждые 3, 6, 24, 30, 48, 54, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 264, 288, 312 или 366 ч, или какой-либо другой период времени), кондиционированная среда, собранная путем повторного использования hb-MSC в пределах одного пассажа, или среды, собранной от разных пассажей hb-MSC, могут быть объединены с целью получения единой hb-MSC кондиционированной среды.

Среды, кондиционированные любой клеткой, могут включать различные биологические продукты, секретированные, выведенные, выделенные или полученные иным путем в процессе культивирования. Например, кондиционированная среда может включать биологические продукты, такие как факторы роста, противовоспалительные факторы, сигнальные факторы, гормоны, регуляторные факторы, ферменты, везикулы, включая экзосомы или любые другие соединения. Способ культивирования клеток и pH среды может влиять на тип и количество биологических продуктов, выделенных клетками. Кроме того, следует понимать, что концентрация клеток, посеянных изначально, может повлиять на количество биологических продуктов, присутствующих в кондиционированной среде. Также будет понятно, что добавление дополнительной сыворотки будет влиять на исходную концентрацию факторов в среде до кондиционирования, поскольку сыворотка содержит определенные количества различных биологических продуктов. Измерение концентрации этих факторов в среде, кондиционированной hb-MSC, показывает, что эта среда значительно отличается от среды, кондиционированной gb-MSC. Коммерчески доступные анализы могут быть использованы для измерения концентрации факторов, продуцируемых клетками (например, анализы, доступные от EMD Millipore или Eve Technologies). Следует иметь в виду, что точное измерение будет зависеть от пар антител, используемых в анализах, и, таким образом, детектируемая концентрация факторов может изменяться в зависимости от способа анализа или используемой техники измерений. В Примере 8 описано сравнение концентраций факторов линий gb-MSC и hb-MSC в определенные периоды времени.

В одном варианте осуществления кондиционированная среда может быть получена путем поддержания hb-MSC при концентрации CO<sub>2</sub>, предварительно заданной для буферной емкости среды, которая, как правило, определяется производителем среды. Для сред RPMI-1640 предварительно заданная концентрация CO<sub>2</sub> составляет 5%. В другом варианте кондиционированная среда может быть получена путем поддержания hb-MSC при концентрации CO<sub>2</sub>, сниженной не менее чем на 50% от концентрации CO<sub>2</sub>, предварительно заданной для буферной емкости среды, которая, как правило, определяется производи-

телем среды. В другом варианте осуществления изобретения кондиционированная среда может быть образована путем поддержания hb-MSC при атмосферной концентрации  $\text{CO}_2$  (т.е. 0,03%  $\text{CO}_2$ ).

В одном варианте осуществления изобретения кондиционированная среда может быть образована путем поддержания hb-MSC при атмосферной концентрации  $\text{O}_2$  (т.е. 17%). В другом варианте осуществления изобретения кондиционированная среда может быть образована путем поддержания hb-MSC при концентрации  $\text{O}_2$ , сниженной ниже 10%. В другом варианте осуществления кондиционированная среда может быть образована путем поддержания hb-MSC при концентрации  $\text{O}_2$ , сниженной ниже 2%. Использование пониженной концентрации  $\text{O}_2$  (гипоксические условия) может быть применено, например, для имитации среды костного мозга *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления кондиционированная среда может быть использована в концентрированном виде. Например, кондиционированная среда может быть сконцентрирована в 1-100 раз с использованием любого известного из уровня техники способа. Требующиеся приемлемые концентрации будут зависеть от применения кондиционированной среды.

В одном варианте осуществления аккуратно собранная кондиционированная среда дополнительно обрабатывается для добавления/удаления и/или концентрирования/разбавления специфических биологических продуктов. Следует выбирать такие способы, используемые для выделения и очистки продукта, чтобы сохранялась оптимальная биологическая активность. Например, желательной может быть очистка фактора роста, регуляторного фактора, пептидного гормона, антитела, экзосомы или любого другого желательного биологического соединения. Такие способы включают гель-хроматографию, ионный обмен, металло-хелатную аффинную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ), хроматографию с гидрофобным взаимодействием или центрифугирование, но не ограничиваются ими. В другом варианте осуществления изобретения экзосомы или любые другие везикулы, присутствующие в кондиционированной среде, могут быть сконцентрированы в кондиционированной среде или удалены из нее. В другом варианте осуществления изобретения кондиционированная среда может быть лиофилизированной. Лиофилизированная кондиционированная среда может быть восстановлена с использованием любого приемлемого разбавителя, включая, без ограничения, физиологический раствор, забуференный фосфатом физиологический раствор, среду для культивирования клеток, кондиционированную среду для культивирования клеток, воду или их смеси. Кондиционированная среда может быть восстановлена в той же концентрации, что и исходная кондиционированная среда. В отдельном варианте осуществления лиофилизированная кондиционированная среда может быть восстановлена в более концентрированной форме по сравнению с исходной кондиционированной средой с коэффициентом концентрации в интервале от 1 до 100.

Линия hb-MSC может быть использована для кондиционирования широкого спектра культуральных сред. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда может быть также обогащенной дополнительной эмбриональной сывороткой и/или плазмой крови. В одном варианте осуществления среда кондиционируется в присутствии 20% FBS. В другом варианте среда кондиционируется в присутствии 10% FBS. В другом варианте среда кондиционируется в присутствии 7% FBS. В другом варианте среда кондиционируется в присутствии 3% FBS. В альтернативном варианте осуществления среда кондиционируется в отсутствие FBS. В других вариантах осуществления после того, как клетки достигли определенного значения конfluэнции, пониженная концентрация сыворотки или бессывороточная среда могут быть использованы в качестве замены для образования низкосывороточной или бессывороточной кондиционированной среды.

Другие варианты осуществления настоящего изобретения относятся к композиции hb-MSC. Композиция hb-MSC может содержать hb-MSC, hb-MSC кондиционированную среду или их комбинацию. Композиция hb-MSC также может содержать приемлемый носитель. Общее количество hb-MSC кондиционированной среды в композиции hb-MSC может изменяться от 0,00001 до 99,99% по объему.

Варианты осуществления композиции hb-MSC могут содержать hb-MSC кондиционированную среду в комбинации с hb-MSC, hb-MSC или другими клетками, выбранными, исходя из применения/назначения среды. Например, клетки, которые могут быть добавлены к композиции hb-MSC, могут включать аутологичные клетки, аллогенные клетки или ксеногенные клетки. В другом варианте осуществления изобретения композиция hb-MSC может содержать hb-MSC или hb-MSC кондиционированную среду в комбинации с любой другой кондиционированной средой или любой комбинацией кондиционированной среды в любом желательном соотношении. Композиция hb-MSC может также содержать hb-MSC или hb-MSC кондиционированную среду в комбинации со средой, кондиционированной аутологичными клетками, аллогенными клетками или ксеногенными клетками. В другом примере hb-MSC кондиционированная среда может комбинироваться со средой, кондиционированной мезенхимальными стволовыми клетками человека.

Композиция hb-MSC должны быть свободна от загрязнения бактериями, вирусами, микоплазмами и грибами. В одном варианте осуществления это может быть достигнуто путем стерильных условий обработки в процессе культивирования клеток и обработки. В другом варианте осуществления изобретения композиция hb-MSC содержит фармацевтические консерванты для обеспечения уровня антимикробной активности. В некоторых вариантах осуществления изобретения консерванты могут ограничить вторич-

ные бактериальные, грибковые или амебные инфекции, вызванные загрязнением растворов. В других вариантах осуществления изобретения добавление консервантов продлевает срок годности hb-MSC или hb-MSC кондиционированной среды, предотвращая биodeградацию и поддерживая активность. В неограничивающем примере консерванты могут включать детергенты, окислители, хелатирующие агенты или метаболические ингибиторы, включая пентавалентную сурьму, четвертичные аммониевые и ртутьорганические соединения. Примеры консервантов включают тимеросол, крезолы, формалин, бензалконийхлорид или бензиловый спирт.

В еще одном дополнительном варианте композиция hb-MSC может быть дополнена противовоспалительными агентами, антибактериальными агентами, анальгетиками, противогрибковыми препаратами, бактерицидами, дезинфицирующими средствами, витаминами, солнцезащитными средствами, антибиотиками, средствами для борьбы со свободными радикалами, антиосаждающими агентами, подщелачивающими или подкисляющими агентами, ароматизаторами, поверхностно-активными веществами, эксципиентами, натуральными продуктами и экстрактами из натуральных продуктов. Добавки могут включать органические небольшие молекулы, металлоорганические соединения, полимеры, неорганические соли, белки, факторы роста, хемокины, ДНК, РНК или ферменты. В других вариантах осуществления изобретения среда может быть дополнена сахарами, белками, инсулином, сигнальными белками или любыми дополнительными небольшими молекулами, в том числе красителями, ароматизаторами, подсластителями. Дополнительные вещества могут также содержать небольшие количества добавок, таких как вещества, усиливающие изотоничность и химическую стабильность.

Специалисту в данной области техники понятно, что приемлемый носитель для композиции hb-MSC может включать, например, жидкость, крем, аэрозоль, лосьон, мазь или гидрогель. Эти носители могут быть основаны на добавлении: водных эксципиентов (включая культуральные среды), неводных эксципиентов, масел, стандартных жировых веществ, обычных гелеобразующих агентов, буферов, загустителей, суспендирующих агентов, эмульгаторов, увлажняющих агентов, смягчительных средств, гидрофильных или липофильных активных веществ. Количества этих разных ингредиентов будут изменяться в зависимости от применения композиция hb-MSC или желательного эффекта. Конечно, любому специалисту в данной области техники будет понятно, что "приемлемый носитель" может включать смесь двух или более носителей и/или других ингредиентов. Композиция hb-MSC, раскрытая в данном документе, может быть использована для разных целей, включая любые исследования, диагностические, терапевтические или коммерческие цели, но не ограничивается ими. Композиция hb-MSC может быть использована для лечения широкого спектра состояний, включая, например, лечение ожогов, уход за кожей, для улучшения ангиогенеза, васкулогенеза, регенерацию, косметические средства, воспаление тканей, бактериальные инфекции, заживление ран, при диабете, фармацевтические и офтальмологические виды применения, снижение рубцевания, стимулирование роста волос, для иммунотерапии и иммунотерапии, трансплантации органов, кожи, костного мозга, или для лечения органов или тканей, или для лечения других состояний как человека, так и животных.

Использованный в данном документе термин "лечение" охватывает вылечивание, ремедиацию, улучшение, снижение тяжести или сокращение времени течения заболевания, расстройства или состояния, или любого параметра или его симптомов. Следует иметь в виду, что hb-MSC или hb-MSC кондиционированная среда могут быть использованы для того же или аналогичного назначения, что и композиция hb-MSC.

Композиция hb-MSC может также быть использована для дерматологического или косметического применения, в пищевых добавках или кормовых добавках для животных, для культивирования клеток и в фармацевтической промышленности. Композиция hb-MSC может быть использована для профилактического лечения, в ответ на острые травмы или для лечения хронических травм. В одном варианте осуществления композиция hb-MSC может быть использована для лечения заболеваний или болезненных состояний человека. В другом варианте лечение может включать ветеринарные применения. В одном варианте осуществления композиция hb-MSC может быть с успехом использована в лечении ран, в том числе кожных ран, переломов костей, язвы желудка, диабетической язвы, поджелудочной железы, печени, почек, селезенки, травмы кровеносных сосудов и других внутренних или внешних ран, а также лечения ожогов. Например, композиция hb-MSC может быть использована для местного применения для активации и/или ускорения заживления ран, как описано в Примере 5 и показано на фиг. 4 и 5. В другом варианте осуществления изобретения композиция hb-MSC может быть использована для лечения ран, которые бы в противном случае потребовали хирургического иссечения или дренажа. Например, композиция hb-MSC может предусматриваться для увеличения перфузии раневой ткани.

Композиция hb-MSC может быть использована в косметическом лечении кожи, в том числе при лечении морщин, межбровных морщин, рубцевания или для заживления других кожных заболеваний, таких как заболевания, вызванные вредными эффектами, индуцированными ультрафиолетовым светом, и нормального старения.

Доставка композиции hb-MSC может быть осуществлена любым известным в данной области способом. Например, некоторые варианты осуществления изобретения для такой доставки могут быть сайт-специфическим, местным, пероральным, назальным, внутривенным, подкожным, внутрикожным, транс-



дермальным, внутримышечным или внутривенным введением. В дополнительном варианте осуществления композиция hb-MSC может быть разработана для использования в контролируемых, медленно высвобождающих носителях.

Следует понимать, что фактические предпочтительные количества, способы введения и интервалы введения композиции hb-MSC в определенном случае будут изменяться в зависимости от определенной композиции, подлежащей использованию, сформированных конкретных композиций, способа введения, конкретного повреждения и пациентов, подлежащих лечению. Дозы для каждого конкретного случая можно определить с использованием обычных расчетов, например, с помощью соответствующего обычного фармакологического протокола. Врачи и разработчики рецептов, специалисты в данной области определения доз фармацевтических соединений, смогут определить соответствующие дозы. Композиция hb-MSC может быть использована в любой форме. Например, композиция hb-MSC может иметь форму таблеток, капсул, кожных пластырей, ингаляторов, глазных капель, капель в нос, ушных капель, жидкостей для промывания, суппозитория, лосьонов, кремов, мазей, инъекций, гелей, гидрогелей, тонких пленок, порошков, сыворотки, бальзамов, крем-основ, лицевых масок, средств для ухода за губами, солнцезащитных средств, средств по уходу за волосами, таких как шампуни, кондиционеры, включая кондиционеры глубокого действия и процедуры по уходу за волосами, а также форму средств для очищения кожи, отшелушивателей, компактных тональных средств или любую другую форму, известную специалисту в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция hb-MSC может быть использована для покрытия швов, медицинского оборудования или имплантированных устройств. В другом варианте осуществления изобретения композиция hb-MSC может комбинироваться с шовными, перевязочными материалами, имплантатами, стентами, трансплантатами или применяться в периодонтальных введениях. Композиция hb-MSC может также быть использована во влажных салфетках. Композиция hb-MSC может также добавляться в качестве заполнителя для ран или добавляться к существующим ранозаполняющим композициям для ускорения заживления ран. В другом варианте осуществления изобретения композиция hb-MSC может также добавляться в тени для век, плотным средствам макияжа, компактным средствам макияжа или другим косметическим средствам.

В дополнительных вариантах осуществления изобретения жидкие препараты композиции hb-MSC могут принимать форму, например, растворов, сиропов или суспензий, или быть представлены в виде сухого продукта для восстановления подходящим носителем перед использованием.

В другом варианте осуществления изобретения композиция hb-MSC может быть замороженной в течение заданного периода времени. Кроме того, композиция hb-MSC может быть лиофилизированной и замороженной в течение заданного периода времени. Альтернативно, композиция hb-MSC может быть восстановлена, как описано выше, и заморожена в течение заданного периода времени. Кроме того, композиция hb-MSC может храниться или находиться при температуре в интервале от комнатной температуры (например, около 28°C) и до 0°C. Используемый температурный диапазон не предназначен быть исключительным, и специалист в данной области техники может представить себе альтернативные диапазоны температур, используемые в зависимости от характера применения. В другом варианте осуществления изобретения композицию hb-MSC можно довести до комнатной температуры перед использованием. Кроме того, композиция hb-MSC может быть применена при температуре ниже комнатной температуры.

Альтернативно, композиция hb-MSC может быть использована при температуре выше комнатной температуры в пределах, пока температура не достаточно высока для денатурации биологического материала.

### Примеры

Следующие примеры включены для того, чтобы продемонстрировать некоторые варианты осуществления настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть очевидным, что способы, описанные в примерах ниже, представляют способы, обнаруженные авторами настоящего изобретения, и могут быть рассмотрены как способы для практики определенных вариантов осуществления изобретения. Кроме того, в свете настоящего описания специалистам в данной области техники должно быть понятно, что в приведенные ниже примеры может быть внесен ряд изменений без отступления от сущности и объема настоящего изобретения.

**Пример 1. Определение видовой принадлежности клеток hb-MSC.**

Анализ ПЦР использовали для подтверждения того, что клетки действительно происходят от крыс. Гены COX-1 и VN1R1 использовали для анализа ПЦР митохондриальной и ядерной ДНК, соответственно. Амплификацию гена COX-1 проводили с использованием мультиплексной ПЦР, в то время как амплификацию гена VN1R1 проводили с использованием стандартной PCR. Образцы крови, полученные от 38-летнего мужчины, 32-летней женщины и крысы линии Вистар, использовали в качестве контроля. ДНК была выделена из культуры клеток с использованием коммерчески доступного набора (ПРОБА-ГС-ГЕНЕТИКА ДНК-Технология, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Все праймеры являются коммерчески доступными и были приобретены у Evrogen, LLC. Конкретными праймерами, используемыми для анализа ПЦР были:

**COX1-человеческий:** *f*-TAGACATCGTACTACACGACACG и

*r*'-TCCAGGTTTATGGAGGGTTC.

**COX1-крысиный:** *f*-CGGCCACCCAGAAGTGATCATC и

*r*'-TCCAGGTTTATGGAGGGTTC.

**VN1R1- человеческий:** *f*-TGGTCTGGGCCAGTGGCTCC и

*r*'-GAGTGTTCCTTGTCTGCAGGCA.

**N1R1- крысиный:** *f*-AGAAGAGTTACTGGCCCAAGGGACA и

*r*'-GGGGCTGAACGCTGGGAAGC.

Электрофорез продуктов PCR проводили на 2% агарозном геле, используя электроферетическую систему SubCellGT (Bio-Rad). Гель визуализировали, используя трансиллюминатор ECX-F15.C (Vilber Lourmat). Электрофореграммы показаны на фиг. 3. В частности, на фиг. 3 на дорожках 1-5 показаны пары оснований гена COX1. На дорожке 1 показан результат для ДНК человека, используемый в качестве контроля, в то время как на дорожке 2 показан результат для ДНК крысы, используемый в качестве контроля. На дорожках 3 и 4 показаны результаты для образцов hb-MSC. На дорожке 5 показан отрицательный контроль. На дорожках 7-10 показаны пары оснований гена VN1R1. На дорожке 10 показана смесь контрольных ДНК человека и крысы. На дорожках 9 и 7 представлены результаты для образцов hb-MSC. На дорожке 8 представлен отрицательный контроль. "М" означает дорожку маркера фрагмента ДНК. Электрофорез подтверждает, что hb-MSC были выделены от крыс и не содержат ДНК клеток человека.

Пример 2. Культура gb-MSC.

Мезенхимальные стволовые клетки крыс, полученные в стандартных условиях, культивировали и оценивали для того, чтобы показать отличия между уникальной выделенной линией hb-MSC и обычными мезенхимальными стволовыми клетками крыс (gb-MSC).

Как линию gb-MSC, так и линию hb-MSC выделяли из первичных клеток, извлеченных из костного мозга большеберцовой или бедренной кости крыс линии Вистар. Культивирование всех клеток происходило в условиях GMP. В одном варианте осуществления процедура получения первичных клеток заключается в следующем. Животных подвергали анестезии и умертвляли. В стерильных условиях у каждой крысы иссекали как бедренные, так и большеберцовые кости. Костный мозг был экстрадирован посредством промывки средой MEM-Эрла, дополненной 15% эмбриональной бычьей сывороткой (FBS). Суспензию массы костного мозга диспергировали с помощью пипетки, последовательно фильтровали через сетчатый нейлоновый фильтр 70 мкм и центрифугировали при 200G в течение 10 мин. Супернатант выбрасывали, а осадок клеток ресуспендировали в среде. Клетки от одной крысы высевали на пластиковые флаконы и инкубировали при 37°C во влажной атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. На третий день эритроциты и другие неприкрепленные клетки удаляли и добавляли свежую среду с добавками, чтобы обеспечить дальнейший рост. Прикрепленные клетки, выращенные до 70% конфлюэнтности, были определены как первичные культуры клеток (p1).

Для получения линии gb-MSC p1 мезенхимальных клеток крыс пассировали согласно стандартным условиям, известным из уровня техники и в соответствии с инструкциями, указанными изготовителем для RPMI-1640. Клетки p1 промывали раствором Хэнкса без ионов Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup> (Sigma, USA, H9394-500 мл) и разделяли путем инкубации с 0,25%-ным раствором трипсин-EDTA (Sigma, USA, T4424-100 мл) в течение 5-10 мин при 37°C. Затем для инактивации трипсина добавляли раствор Хэнкса, обогащенный 5% FBS (Sigma, USA, F6765). Клетки центрифугировали при 200G в течение 10 мин, ресуспендировали в 1-2 мл среды RPMI-1640 с добавкой 15% FBS и подсчитывали вручную в гемоцитометрической камере Нойбауэра. Затем клетки высевали в качестве p2 во флаконы площадью 75 см<sup>2</sup> при плотности 1,0×10<sup>6</sup> клеток/флакон, используя среду RPMI-1640 (Sigma, USA, R5886) с добавками 15% FBS (Sigma, USA, F6765), 100 единиц/мл пенициллина-100 мкг/мл стрептомицина (Sigma, USA, P4458), 100 нг/мл амфотерицина (Sigma, USA, A2942), 2 mM L-глутамин (Sigma, USA, G7513), 0,005 мл/мл витаминов (100x) для среды RPMI-1640 (Sigma, USA, R7256) и 0,005 мл/мл аминокислот для среды RPMI-1640 (Sigma, USA, R7131). флакон, имеющий проницаемую стерильную крышку фильтра, инкубировали при 37°C во влажном термостате в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Среду RPMI-1640 (с добавкой 15% FBS) меняли каждые 3 дня в течение 10-14-дневного периода (или по достижении 70% конфлюэнтности). После Пассажа номер 2 (p2) клетки высевали во флаконы площадью 175 см<sup>2</sup> при плотности 2×10<sup>6</sup> клеток/флакон и использовали среду RPMI-1640 с добавкой 10% FBS. Для каждого последующего пассажа клетки высевали аналогичным образом и выращивали до 70% конфлюэнтности. При достижении 70% конфлюэнтности клетки разделяли и вновь высевали в пластиковый культуральный флакон. Пассаж 5 (p5) gb-MSC использовали в качестве сравнения с линией hb-MSC.

Пример 3. Культура hb-MSC.

Для получения линии hb-MSC p1 мезенхимальные стволовые клетки крыс культивировали в соот-

ветствии со следующим способом. Вначале клетки p1 промывали раствором Хэнкса без ионов  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$  (Sigma, USA, H9394-500 мл) и разделяли путем инкубации с 0,25%-ным раствором трипсин-EDTA (Sigma, USA, T4424-100 мл) в течение 5-10 мин при 37°C. Затем для инактивации трипсина добавляли раствор Хэнкса, обогащенный 5% FBS (Sigma, USA, F6765). Клетки центрифугировали при 200G в течение 10 мин, ресуспендировали в 1-2 мл среды RPMI-1640 с добавкой 15% FBS и подсчитывали вручную в гемоцитометрической камере Нойбауэра. Затем клетки высевали в качестве p2 во флаконы площадью 75 см<sup>2</sup> при плотности  $1,0 \times 10^6$  клеток/ флакон, используя среду RPMI-1640 (Sigma, USA, R5886) с добавками 15% FBS (Sigma, USA, F6765), 100 единиц/мл пенициллина-100 мкг/мл стрептомицина (Sigma, USA, P4458), 100 нг/мл амфотерицина (Sigma, USA, A2942), 2 mM L-глутамин (Sigma, USA, G7513), 0,005 мл/мл витаминов (100x) для среды RPMI-1640 (Sigma, USA, R7256) и 0,005 мл/мл аминокислот для среды RPMI-1640 (Sigma, USA, R7131). Флакон, имеющий проницаемую стерильную крышку фильтра, инкубировали при 37°C во влажном термостате в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ . Среда RPMI-1640 с добавкой 15% FBS меняли каждые 3 дня в течение 10-14-дневного периода (или по достижении 70% конфлюэнтности).

После Пассажа номер 2 (p2) клетки высевали во флаконы площадью 175 см<sup>2</sup> при плотности  $2 \times 10^6$  клеток/флакон и использовали среду RPMI-1640 с добавкой 10% FBS. Выращивание культур продолжали при 37°C во влажном термостате в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ . После третьего Пассажа (p3), клетки пассировали при пониженной концентрации  $\text{CO}_2$ . Для снижения концентрации  $\text{CO}_2$  культуральный флакон закрывали крышкой в атмосферных условиях и инкубировали при 37°C. Добавку  $\text{CO}_2$  во всех последующих пассажах не использовали. Как описано выше, добавляли свежую среду RPMI-1640, обогащенную 10% FBS, и меняли каждые 3 или 4 дня в течение приблизительно 14 дней. Для каждого пассажа клетки высевали и выращивали аналогичным образом до 70% конфлюэнтности. При достижении 70% конфлюэнтности клетки разделяли и вновь высевали в пластиковый культуральный флакон. Пассаж 9 (p9) hb-MSC сравнивали с gb-MSC. ПЦР-анализ (ООО "НаноДиагностика", Россия) подтвердил отсутствие загрязнения hb-MSC бактериями, вирусами, микоплазмами или грибами.

Линию hb-MSC сохраняли с использованием среды 10% DMSO и 50% FBS при температуре жидкого азота и концентрации от  $3,0 \times 10^6$  до  $5,0 \times 10^6$  клеток в ампулах емкостью 2 миллилитра (мл).

Пример 4. Характеристика hb-MSC проточной цитометрией.

Эксперимент проточной цитометрии проводили для определения маркеров клеточной поверхности линий hb-MSC и gb-MSC. Для целей этого эксперимента 50 мкл соответствующего антитела добавляли к 100 мкл клеточной суспензии. Суспензию перемешивали вихревым способом в течение периода в пять секунд (BioVortexV1, BioSan) и выдерживали при температуре +4°C в течение периода 30 мин при отсутствии света. После инкубации смесь разбавляли 500 мкл физиологического раствора и дважды отмывали путем центрифугирования для удаления избытка реагентов. Каждое центрифугирование проводили при 400G в течение 10 мин (ELMI). В каждом образце анализировали по меньшей мере 10000 отсчетов. Результаты проанализировали с использованием аналитической программы WinMDI 2.7, они показаны на фиг. 1. Суммарный анализ поверхностных маркеров, экспрессированных линиями gb-MSC и hb-MSC, представлен в табл. 1 ниже.

Таблица 1  
Поверхностные маркеры линий gb-MSC и hb-MSC

| Маркер клеточной поверхности | Линия hb-MSC | Линия gb-MSC |
|------------------------------|--------------|--------------|
| <b>CD29</b>                  | 95,0 %       | 94,6 %       |
| <b>CD44</b>                  | 94,8 %       | 98,7 %       |
| <b>CD11b</b>                 | <3 %         | <3 %         |
| <b>CD45</b>                  | <3 %         | <3 %         |

Типичные мезенхимальные клетки костного мозга крыс демонстрируют положительную экспрессию маркеров CD44, CD29 и отрицательную экспрессию маркеров CD45 и CD11b. Как показано в табл. 1 выше, линия hb-MSC демонстрирует поверхностные маркеры, согласующиеся с маркерами мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крыс. Это показывает, что способ получения hb-MSC не приводит к изменению поверхностных маркеров клеток.

Пример 5. Морфометрическое изучение закрытия ран.

Морфометрическое исследование было предпринято, чтобы следить за процессом заживления ран у лабораторных мышей. Все эксперименты на животных были проведены на кафедре ветеринарной хирургии Московской государственной академии ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина. Белые лабораторные мыши в возрасте от 3 до 5 месяцев весом около 22-25 г были использованы для всех экспериментов. В общей сложности в каждом эксперименте было использовано шесть мышей. Все разрезы приблизительно 0,5 см в диаметре были выполнены на только что побритой области лопатки каждого анестезированного животного. После выполнения разреза животных отсортировали в контроль-

ную и выборочную группы, состоящие из трех мышей в каждой группе. Каждая рана была сфотографирована для получения ее цифровых морфометрических параметров. Спустя тридцать минут после выполнения разреза, каждую рану обработали каплей объемом 50 мкл либо RPMI-1640, либо композиции hb-MSC. В данном примере, композиция hb-MSC включала кондиционированную среду hb-MSC как описано в Примере 8, при этом кондиционированную среду, отбираемую в каждый из различных периодов кондиционирования (96, 144, 192, 216, 240, 264 и 288 ч), собирали в одну емкость. Композиция также содержала бензалконий хлорид (БЕК) в качестве консерванта, и Triton X-100 в качестве поверхностно-активного вещества. Размер раны измеряли один раз в день в течение 15 дней. Композицию hb-MSC и RPMI-1640 применяли к каждому животному в соответствующих группах один раз в день после оценки раны. Цифровые изображения, показывающие сравнение процесса заживления ран, обработанных композицией hb-MSC и средой RPMI-1640, представлены на фиг. 4. На фиг. 4 показана мышь из контрольной группы (обработанная RPMI-1640) на 1-й день обработки и та же мышь на 9-й день обработки. На фиг. 4 также показана мышь из выборочной группы (обработанная композицией hb-MSC) на 1-й день обработки и та же мышь на 9-й день обработки. Эффект лечения ран среднего размера с использованием композиции hb-MSC в сравнении с RPMI-1640 проиллюстрирован на фиг. 5.

Пример 6. Терапевтический эффект композиции hb-MSC.

Для того, чтобы оценить терапевтический эффект композиции hb-MSC, проводили опыты на различных животных, в том числе собаках (65+), кошках (80+), лошадях (40+), сельскохозяйственных животных (25+), грызунах (200+) и пернатых (15+). Композицию hb-MSC использовали для лечения широкого круга состояний у вышеуказанных субъектов. В данном примере использовали такую же композицию hb-MSC как описано в Примере 5. Это: 1) использование при заживлении ран, включая места разреза после хирургических вмешательств; 2) лечение ожогов, включая химические ожоги; 3) язвы, включая диабетические язвы; 4) свищи; 5) воспаление тканей или бактериальные инфекции, в том числе гнойные воспаления, конъюнктивит, кератит, мастит, флегмоны, гастрит и дерматит; 6) использование в ортопедии, включая переломы костей; и 7) лечение различных состояний тканей, включая кожу, связки и мышечную ткань. При проведении опытов доставка композиции hb-MSC осуществлялась следующими способами: местным нанесением, перорально, назально, внутривенным, подкожным, внутрикожным, трансдермальным, внутримышечным или внутрибрюшинным введением. Кроме того, композиция hb-MSC наносилась с использованием стерильных салфеток, в форме аэрозоля и прямым приложением к пораженной области (включая использование доильных стаканов). Композиция hb-MSC была эффективна при лечении всех вышеперечисленных состояний, демонстрируя улучшенное регенерирующее действие, ускорение процессов заживления ран, значительное снижение воспаления и локальной колонизации бактерий, антимикробное действие, улучшение ангиогенеза и васкулогенеза, снижения рубцевания ткани и восстановления волосных фолликулов на поврежденном участке. Значительное регенерирующее действие, наблюдавшееся в этих опытах, было совместимо с результатами заживления ран у мышей, описанным в Примере 5. Во всех случаях животные оставались здоровыми после обработки композицией hb-MSC. Во всех случаях оценивали токсичность, раздражение, сенсибилизацию и биоаккумуляцию. Исследования крови показали, что в течение 30 дней после введения композиции hb-MSC все отслеживаемые показатели всех животных оставались в пределах нормального диапазона значений. Гистологические исследования печени, почек, легких, селезенки, кишечника и мягких тканей не продемонстрировали никаких признаков острой или хронической токсичности при использовании композиции hb-MSC. Также не было зарегистрировано случаев аллергических реакций, инфекций или других негативных побочных эффектов. Взяты вместе, эти эксперименты показывают, что композиция hb-MSC может быть использована для безопасного и эффективного лечения широкого спектра состояний как человека, так и животных, в том числе для лечения ожогов, в уходе за кожей, для улучшения ангиогенеза и васкулогенеза, репарации органов и тканей, в косметических средствах, при воспалении тканей, бактериальных инфекциях, для лечения ран, при диабете, для фармацевтических и офтальмологических видов применения, снижения рубцевания, стимулирования роста волос, иммунотерапии и иммунокоррекции, трансплантации органов, кожи, костного мозга, для лечения органов или тканей, или для лечения других заболеваний.

Пример 7. Анализ культуральных сред, кондиционированных линиями клеток hb-MSC и hb-MSC.

Для сравнения влияния hb-MSC и hb-MSC на культуральную среду девять (9) отдельных флаконов площадью 75 см<sup>2</sup> засевали каждой клеточной линией при плотности  $0,7 \times 10^6$  клеток/флакон. Клетки пасировали в RPMI-1640/10% FBS в присутствии 5% CO<sub>2</sub> в термостате при 37°C. Клеточные флаконы закрывали газопроницаемыми крышками. Всего было проанализировано 9 периодов времени: 24, 48, 96, 144, 192, 216, 240, 264 и 288 ч. В каждом заданном периоде времени анализировали один флакон с клетками. Среду заменяли во всех остающихся флаконах через три дня (72 ч), пять дней (120 ч), семь дней (168 ч), а затем ежедневно. Концентрацию лактата и pH среды измеряли в каждом из девяти периодов. За исключением измерения через 48 ч, периоды были выбраны таким образом, что измерение проводили через 24 ч после замены среды. Лактат измеряли с использованием биохимического анализатора, в трех повторениях, с помощью набора для определения лактата от SPINREACT. Уровень pH измеряли с помощью электронного pH-метра (METTLER TOLEDO InLab Versatile Pro). В каждом из периодов также измеряли количество клеток, и клетки проходили, по меньшей мере, одно удвоение популяции при pH

ниже 7,05.

Фиг. 6 показывает изменение pH во времени для чистой культуральной среды RPMI-1640, gb-MSC кондиционированной среды и hb-MSC кондиционированной среды, измеренные в процессе сбора клеток, описанных в этом Примере.

Фиг. 7 показывает изменение концентрации лактата (мМ) для линий gb-MSC и hb-MSC в процессе культивирования. Столбцы ошибок обозначают одно стандартное отклонение в концентрации лактата. Представленная ниже таблица на основе данных из фиг. 6 и 7 демонстрирует сравнение разных измерений для gb-MSC и hb-MSC в этом Примере.

Таблица 2  
Методы обнаружения различий между линиями hb-MSC и gb-MSC

| Метод обнаружения различий                                                                                                    | gb-MSC                            | hb-MSC |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------|
| <b>pH сред спустя, по меньшей мере, 150 часов культивирования (в течение 24 часов после замены сред)</b>                      | >7,05 (для всех периодов времени) | <7,0   |
| <b>Максимальное отклонение от pH среды RPMI-1640 (в течение 24 часов после замены сред)</b>                                   | <0,15                             | >0,4   |
| <b>Концентрация лактата в средах спустя, по меньшей мере, 96 часов культивирования (в течение 24 часов после замены сред)</b> | <3 мМ                             | >4 мМ  |
| <b>Количество удвоений популяции при pH ниже 7,05</b>                                                                         | 0                                 | >1     |

Пример 8. Сравнение факторов в средах, кондиционированных клеточными линиями gb-MSC и hb-MSC.

Линии gb-MSC и hb-MSC можно различить при помощи сравнения факторов, продуцируемых каждой линией, когда линия поддерживается в культуральной среде. Для сравнения факторов, продуцируемых hb-MSC и gb-MSC, семь (7) отдельных флаконов площадью 75 см<sup>2</sup> для каждой клеточной линии засеивали при плотности 0,7×10<sup>6</sup> клеток/флакон. Клетки пассировали в RPMI-1640/10% FBS в присутствии 5% CO<sub>2</sub> в термостате при 37°C. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что добавление дополнительной сыворотки будет влиять на исходную концентрацию факторов в среде перед кондиционированием. Клеточные флаконы закрывали газопроницаемыми крышками. Всего было проанализировано 7 периодов времени: 96, 144, 192, 216, 240, 264 и 288 ч. Каждый флакон с клетками анализировали в каждом заданном периоде времени. Среду заменяли во всех остающихся флаконах через три дня (72 ч), пять дней (120 ч), семь дней (168 ч), а затем ежедневно. Периоды были выбраны таким образом, что измерение проводили через 24 ч после замены среды. Анализ факторов проводили с использованием 27-плексной панели цитокиновой матрицы/хемокиновой матрицы крысы от компании Eve Technologies, 3-плексной цитокиновой матрицы TGF-бета и 1-плексной матрицы кости крысы. Конкретные факторы, которые сравниваются в табл. 1, включают интерлейкин-10 (IL-10), интерферон гамма-индуцированный белок 10 (IP10), CXCL1 (GRO/KC), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), остеопротегерин (OPG), трансформирующий ростовой фактор бета 1 (TGF-β1), трансформирующий ростовой фактор бета 2 (TGF-β2), трансформирующий ростовой фактор бета 3 (TGF-β3). Должно быть понятно, что мультиплексные измерения зависят от калибровочной кривой и, таким образом, могут в некоторой степени изменяться, как это понятно обычному специалисту в данной области техники.

Диапазон факторов, наблюдаемых в течение анализируемых периодов времени, приведен в табл. 3 ниже. Должно быть понятно, что концентрация факторов может зависеть от периода времени, в течение которого культивируют клетки и количества клеток во флаконе.

Таблица 3  
Сравнение концентраций факторов gb-MSC и hb-MSC в пг/мл

| Фактор         | gb-MSC         | hb-MSC          |
|----------------|----------------|-----------------|
| <b>IL-10</b>   | от 0 до 12     | от 12 до 38     |
| <b>IP-10</b>   | от 7 до 26     | от 18 до 120    |
| <b>GRO/KC</b>  | от 14 до 100   | от 460 до 5600  |
| <b>VEGF</b>    | от 300 до 2400 | от 760 до 15800 |
| <b>OPG</b>     | от 540 до 3200 | от 0 до 90      |
| <b>TGF-β1</b>  | от 550 до 2600 | от 67 до 2000   |
| <b>TGF- β2</b> | от 520 до 3200 | от 170 до 2900  |
| <b>TGF- β3</b> | от 100 до 610  | от 0 до 40      |

Сравнительный анализ линий gb-MSC и hb-MSC.

Существует ряд способов для того, чтобы отличить линию hb-MSC от линии gb-MSC. Одним из способов отличить две линии является измерение pH культуральной среды в процессе роста клеток. В Примере 7 описано измерение pH культуральной среды (RPMI-1640), кондиционированной линиями gb-MSC и hb-MSC в течение периода, составляющего 288 ч. Перед культивированием был измерен уровень pH RPMI-1640, который составлял приблизительно 7,01. Как и ожидалось, предварительно заданное количество дополнительного CO<sub>2</sub> для RPMI-1640 (т.е. 5%) эффективно буферизировало pH контрольной среды RPMI-1640 до 7,2 в течение длительности всего эксперимента. Уровень pH культуры gb-MSC оставался в диапазоне между приблизительно 7,08 и 7,2 в течение длительности всего эксперимента. Для hb-MSC, однако, pH снизилось от приблизительно 7,2 на 24 ч до приблизительно 6,6 в течение следующих 216 ч, и значение pH оставалось приблизительно 6,6 в течение длительности эксперимента. Спустя 150 ч культивирования уровень pH культуральной среды снизился до уровня ниже 7,0 в течение 24 ч после замены среды. Подобным образом, спустя 150 ч культивирования уровень pH культуральной среды снизился, по меньшей мере, на 0,4 единицы по сравнению с pH RPMI-1640 в течение 24 ч после замены среды. Отличия в pH сред, кондиционированных линиями gb-MSC и hb-MSC, демонстрируют, что эти две линии разные.

Другим способом отличить линию hb-MSC от линии gb-MSC является измерение продуцирования лактата клетками в среде, как описано в Примере 7. Фиг. 7 показывает, что hb-MSC продуцируют лактат в концентрациях, которые превышают концентрации лактата, продуцируемые gb-MSC. После приблизительно 96 ч культивирования hb-MSC продуцируют по меньшей мере 4 mM лактата в течение 24 ч после замены среды и могут продуцировать вплоть до 12,4 mM лактата в течение 24 ч после замены среды. В отличие от этого, концентрация лактата, продуцированного gb-MSC, никогда не превышает 3 mM в течение 24 ч после замены среды. Отличия в концентрации лактата в средах, кондиционированных линиями gb-MSC и hb-MSC, демонстрируют, что эти две линии разные.

Другим способом отличить линию hb-MSC от линии gb-MSC является оценка среды, кондиционированной каждой линией. Для целей этого сравнения среду собирали, как описано в Примере 8. Результаты факторных измерений приведены в табл. 3 выше. Различия в концентрации факторов сред, кондиционированных gb-MSC и hb-MSC, показывают, что эти две линии отличаются.

В общей сложности, методы определения характеристик, описанные выше, приводят к выводу, что линия hb-MSC отличается от линии gb-MSC. Хотя настоящее изобретение было конкретно показано и описано со ссылкой на примерные варианты осуществления изобретения, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что различные изменения в форме и деталях могут быть осуществлены без отступления от сущности и объема настоящего изобретения, как определено прилагаемой формулой изобретения и ее эквивалентами.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Кондиционированная среда для терапевтического использования, содержащая: культуральную среду, кондиционированную множеством неэмбриональных мезенхимальных стволовых клеток, где кондиционированная среда содержит (а) по меньшей мере 760 пг/мл VEGF и (b) по меньшей мере 150 пг/мл GRO/KC.

2. Кондиционированная среда по п.1, где указанная кондиционированная среда содержит менее чем 250 пг/мл OPG и менее чем 80 пг/мл TGF- $\beta$ 3.

3. Кондиционированная среда по п.1, где указанная кондиционированная среда содержит по меньшей мере 8000 пг/мл VEGF.

4. Кондиционированная среда по п.1, где клетки, используемые для кондиционирования среды, происходят из костного мозга, и при этом кондиционированная среда содержит менее чем 50 пг/мл OPG.

5. Кондиционированная среда по п.1, где кондиционированная среда дополнительно содержит по меньшей мере два из IL-10, IP-10, TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2.

6. Кондиционированная среда по п.1, где клетки, используемые для кондиционирования среды, характеризуются положительной экспрессией маркеров CD29 и CD44 и отрицательной экспрессией маркеров CD11b и CD45.

7. Кондиционированная среда по п.1, где по меньшей мере 90% клеток, используемых для кондиционирования среды, демонстрируют кариотип 2n=42.

8. Кондиционированная среда по п.1, где кондиционированная среда кондиционируется множеством неэмбриональных мезенхимальных стволовых клеток, имеющих по меньшей мере одну из следующих характеристик при посеве  $0,7 \times 10^6$  клеток в флакон площадью 75 см<sup>2</sup> и культивировании в течение по меньшей мере 96 ч: (а) клетки продуцируют по меньшей мере 4,5 мМ лактата в течение 24 ч после замены среды; (b) клетки продуцируют по меньшей мере 150 пг/мл GRO/KC в течение 24 ч после замены среды; (с) клетки продуцируют менее чем 250 пг/мл OPG через 24 ч после замены среды; или (d) клетки продуцируют менее чем 80 пг/мл TGF- $\beta$ 3 через 24 ч после замены среды.

9. Кондиционированная среда по п.8, где стволовые клетки, используемые для кондиционирования среды, имеют по меньшей мере две из указанных характеристик.

10. Кондиционированная среда по п.1, где кондиционированная среда кондиционируется стволовыми клетками линии неэмбриональных мезенхимальных стволовых клеток, депонированной во Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) под регистрационным номером Н-154.

11. Кондиционированная среда по п.1, где кондиционированная среда представляет собой комбинацию культуральных сред, кондиционируемых неэмбриональными мезенхимальными стволовыми клетками в течение по меньшей мере двух различных периодов времени.

12. Кондиционированная среда по п.1, где указанную кондиционированную среду дополнительно обрабатывают для удаления из кондиционированной среды по меньшей мере 90% клеток.

13. Кондиционированная среда по п.1, дополнительно содержащая множество неэмбриональных мезенхимальных стволовых клеток, при этом мезенхимальные стволовые клетки имеют по меньшей мере одну из следующих характеристик при посеве  $0,7 \times 10^6$  клеток в флакон площадью 75 см<sup>2</sup> и культивировании в течение по меньшей мере 96 ч: (а) клетки продуцируют по меньшей мере 4,5 мМ лактата в течение 24 ч после замены среды; (b) клетки продуцируют по меньшей мере 150 пг/мл GRO/KC в течение 24 ч после замены среды; (с) клетки продуцируют менее чем 250 пг/мл OPG через 24 ч после замены среды; или (d) клетки продуцируют менее чем 80 пг/мл TGF- $\beta$ 3 через 24 ч после замены среды.

14. Композиция для терапевтического использования, содержащая:  
кондиционированную среду, содержащую смесь факторов VEGF, GRO/KC, TGF- $\beta$ 1 и TGF- $\beta$ 2; и приемлемый носитель,  
при этом композиция содержит по меньшей мере 760 пг/мл VEGF и по меньшей мере 150 пг/мл GRO/KC.

15. Композиция по п.14, где композиция содержит по меньшей мере 150 пг/мл TGF- $\beta$ 2.

16. Композиция по п.14, где композиция содержит по меньшей мере 4000 пг/мл VEGF; по меньшей мере 1000 пг/мл GRO/KC; по меньшей мере 750 пг/мл TGF- $\beta$ 1; и по меньшей мере 250 пг/мл TGF- $\beta$ 2.

17. Композиция по п.14, где композиция дополнительно содержит IL-10 и IP-10.

18. Композиция по п.14, где композицию используют для лечения ожогов, в уходе за кожей, для ангиогенеза, васкулогенеза, для репарации органов и тканей, в косметических средствах, при воспалении тканей, бактериальных инфекциях, для лечения ран, при диабете, для фармацевтических и офтальмологических видов применения, снижения рубцевания, стимулирования роста волос, иммунотерапии и иммунокоррекции, трансплантации органов, кожи, костного мозга или для лечения органов или тканей.

19. Композиция по п.14, дополнительно содержащая консервант и поверхностно-активное вещество.

20. Композиция по п.19, где консервант представляет собой один или несколько из тимеросола, креолов, формалина, бензалконияхлорида или бензилового спирта, и в которой поверхностно-активное

вещество представляет собой Triton X-100.

21. Композиция по п.14, где носитель выбирают из группы, состоящей из жидкости, крема, аэрозоли, лосьона, мази или гидрогеля.

22. Применение композиции по п.14 в терапии.

23. Применение по п.22, где композицию используют для лечения ожогов, в уходе за кожей, для ангиогенеза, васкулогенеза, репарации органов и тканей, в косметических средствах, при воспалении тканей, бактериальных инфекциях, лечении ран, при диабете, для фармацевтических и офтальмологических видов применения, снижения рубцевания, стимулирования роста волос, иммунотерапии и иммунокоррекции, трансплантации органов, кожи, костного мозга или для лечения органов или тканей.

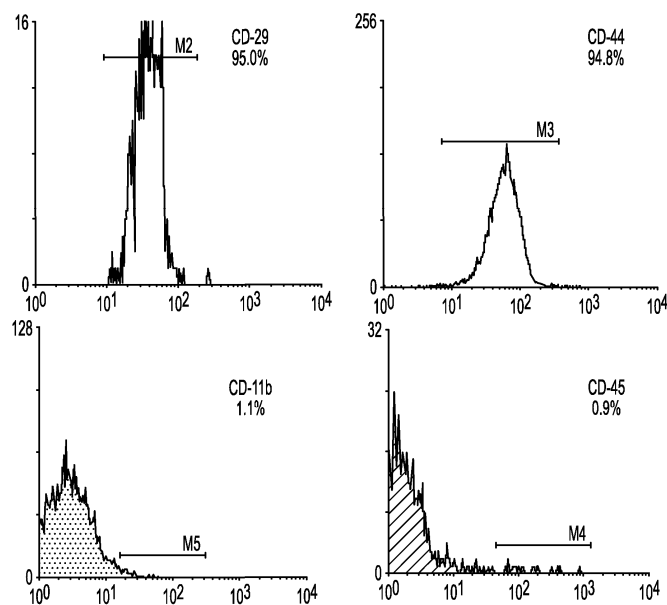
24. Применение по п.22, где композиция предназначена для введения с помощью инъекции, имплантирования или местного нанесения композиции.

25. Кондиционированная среда для терапевтического применения, содержащая: культуральную среду, кондиционированную множеством незембриональных мезенхимальных стволовых клеток, при этом кондиционированная среда содержит по меньшей мере 4000 пг/мл VEGF; по меньшей мере 1000 пг/мл GRO/KC; по меньшей мере 750 пг/мл TGF- $\beta$ 1; и по меньшей мере 250 пг/мл TGF- $\beta$ 2.

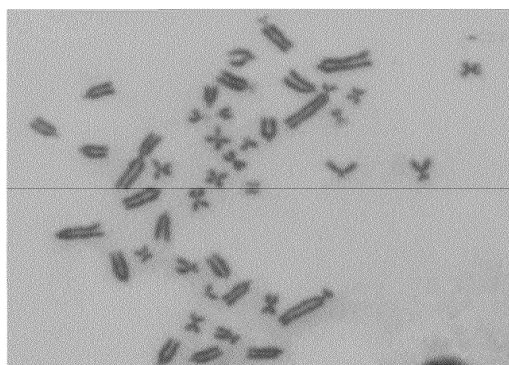
26. Кондиционированная среда по п.25, где клетки, используемые для кондиционирования среды, происходят из костного мозга, и при этом кондиционированная среда содержит менее чем 50 пг/мл OPG.

27. Кондиционированная среда по п.25, где кондиционированная среда дополнительно содержит IL-10 и IP-10.

28. Композиция для терапевтического использования, содержащая: кондиционированную среду по п.25 и приемлемый носитель.

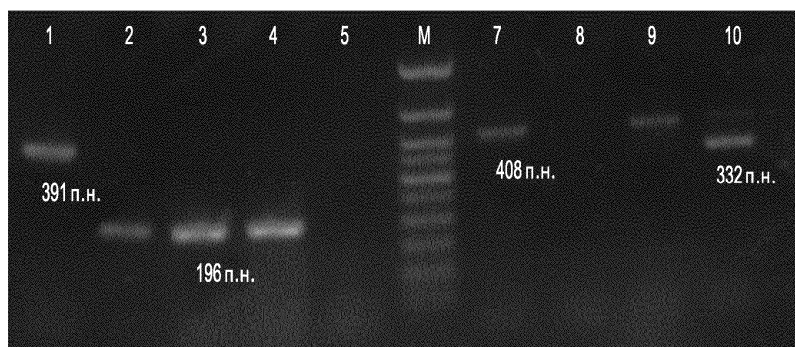


Фиг. 1

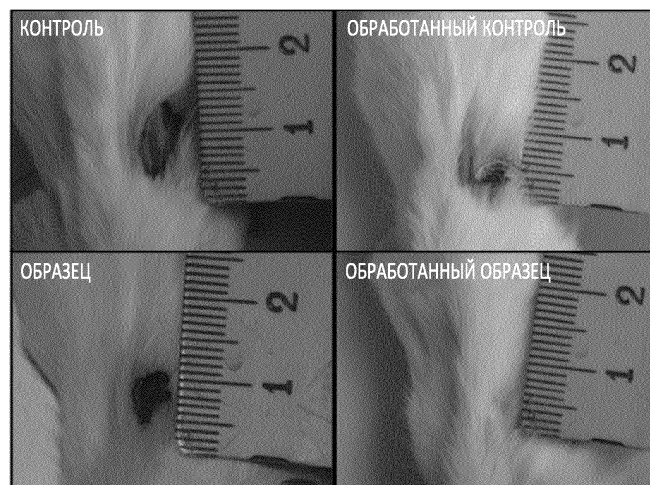


Фиг. 2

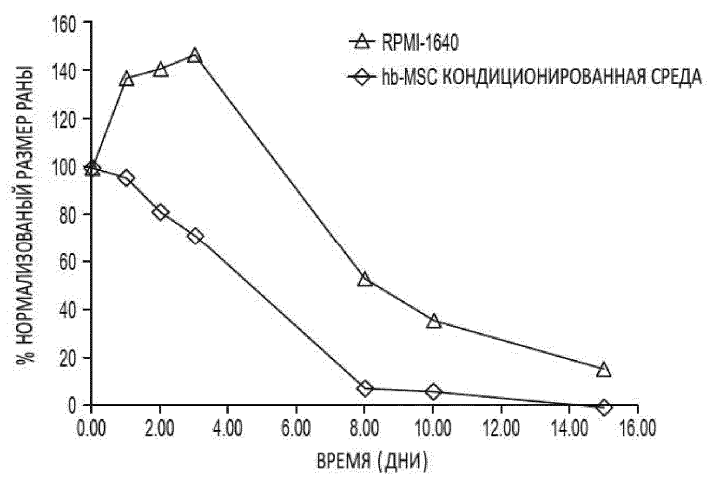




Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5

