



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **81390** (13) **C2**

(51) **МПК (2006)**

A61K 35/14

A61P 9/00

A61P 25/00

A61P 1/00

C12N 5/08

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ НЕРЕСТРИКТОВАНИХ СОМАТИЧНИХ СТОVBУРОВИХ КЛІТИН (USSCS) ДЛЯ ВИГОТОВЛЕННЯ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ

1

2

(21) 2003044039

(22) 03.11.2001

(24) 10.01.2008

(86) PCT/EP01/12768, 03.11.2001

(31) 60/245 168

(32) 03.11.2000

(33) US

(72) ВЕРНЕТ ПІТЕР

(73) КУРІОН ФЕРАПЬЮТИКС АГ

(56) ERICES A ET AL: "Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood." BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 109, no. 1, April 2000 (2000-04), pages 235-242, XP002205332 ISSN: 0007-1048

ALFONSO Z Z C & FRASER J K: "Osteoblast precursor cells are found in the low- density fraction of umbilical cord blood." BLOOD, vol. 94, no. 10 Suppl. 1 Part 2, 15 November 1999 (1999-11-15), page 161b XP002231452 Forty-first Annual Meeting of the American Society of Hematology; New Orleans, Louisiana, USA; 3-7 December 1999 ISSN: 0006-4971

GUTIERREZ-RODRIGUEZ M ET AL: "Characterization of the adherent cells developed in Dexter-type long-term cultures from human umbilical cord blood." STEM CELLS, vol. 18, no. 1, January 2000 (2000-01), pages 46-52, XP002231492 ISSN: 1066-5099

SIRCHIA G & REBULLA P: "Placental/umbilical cord blood transplantation." HAEMATOLOGICA, vol. 84, no. 8, August 1999 (1999-08), pages 738-747, XP002226904 ISSN: 0390-6078

SANCHEZ-RAMOS J R ET AL: "Expression of neural markers in human umbilical cord blood." EXPERIMENTAL NEUROLOGY, vol. 171, no. 1, September 2001 (2001-09), pages 109-115, XP002226905 ISSN: 0014-4886

GOODWIN H S ET AL: "Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers." BIOLOGY OF BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION, vol. 7, no. 11, November 2001 (2001-11), pages 581-588, XP008012375 ISSN: 1083-8791

WERNET P ET AL: "Detection of unrestricted multipotential stem cells in human cord blood." BLOOD, vol. 98, no. 11 Part 1, 16 November 2001 (2001-11-16), page 550a XP002226906 43rd Annual Meeting of the American Society of Hematology; Orlando, Florida, USA; 7-11 December 2001 ISSN: 0006-4971

(57) 1. Застосування нерестрикованих соматичних стовбурових клітин (USSCs) для виготовлення лікарських засобів для лікування судинних захворювань, кардіальних хвороб або хвороб гладких м'язів, захворювань печінки, цукрового діабету типу 1, захворювань нервової системи, хвороби Паркінсона або гематологічних захворювань, причому нерестриковані соматичні стовбурові клітини (USSCs) виділені із пуповинної крові, плацентарної крові і/або зразків крові немовляти і вони є:

(i) негативними щодо CD45 і CD14 поверхневих антигенів;

(ii) позитивними щодо CD13, CD29, CD44, CD49e антигенів;

(iii) викликають експресію YB1, AML-1, RUNX-1 і фібруліну-2;

(iv) не викликають експресію гіалуронан-синтази, фібромодуліну і 1NFLS.

2. Застосування за п.1, причому лікарський засіб додатково містить in vitro диференційоване потомство вказаних USSCs.

(13) **C2**

(11) **81390**

(19) **UA**

Даний винахід стосується соматичної стовбурової клітини, безлічі стовбурових клітин, лікарського препарату, що містить стовбурову клітину відповідно до даного винаходу, і способу очищення, посіву та унікальної диференціації-потенціалу стовбурової клітини за даним винаходом.

Хоча стовбурові клітини постійно самозаміщаються, вони в основному є повільно циклюючими. Склалася думка, що ці клітини активізують транскрипторну підсилювальну клітинну популяцію (на проміжних стадіях диференціювання) з обмеженою самопідтримувальною здатністю до зростання кількості клітин, що пройшли диференціювання. Останнім часом виявляється інтерес до розміщення стовбурових клітин в організмі дорослої людини, тому в існуючій літературі показане використання ряду маркерів-замінників (наприклад, описані реакції, що формують колонії клітин, для гематопоїетичної лінії диференціації).

Ряд патентів США, наприклад, [US 5,486,359; 5,591,625; 5,736,396; 5,811,094; 5,827, 740; 5,837,539; 5,908,782; 5,908,784; 5,942,225; 5,965,436; 6,010,696; 6,022,540; 6,087,113; 5, 858,390; 5, 804,446; 5, 846,796; 5,654,186; 6,054,121; 5,827,735; 5, 906,934] стосуються мезенхімних стовбурових клітин (MSC), які можуть бути диференційовані в декілька клітин-попередників, наприклад, м'язові клітини-попередники, клітини-попередники сполучних тканин або овальні клітини. М'язові клітини-попередники далі диференціюються в кардіальні, скелетні клітини, а також клітини гладких м'язів, при цьому клітина-попередник сполучної тканини може диференціюватися в кістку, хрящоподібну тканину і жир. Овальні клітини можуть диференціюватися в клітини печінки, підшлункової залози [Grompe et al., 2001].

Присутність негематопоїетичних стовбурових клітин в пуповинній крові є предметом дискусії [Mayant et al., 2000, Marechi et al., 2001]. Німецька патентна заявка [DE 198 03267] була першим документом, у якому були описані остеобластичні клітини-попередники та утворення кісткової тканини з пуповинної крові людини.

Однак використання цих мезенхімних клітин-попередників в існуючому рівні техніки часто обмежене через те, що вони занадто еволюціонували у розвитку, щоб їх можна було успішно використовувати як засіб для генерування органів або тканин. Іншими словами, цілком ймовірно, вони занадто детерміновані і спеціалізовані, щоб забезпечити генерування органа або тканини.

Технічною задачею даного винаходу є створення стовбурової клітини, яка здатна диференціюватися в різні клітини-попередники, наприклад, мезенхімні клітини, нервові клітини, клітини крові або ендотеліальні клітини.

Ще однією технічною задачею даного винаходу є створення стовбурової клітини, яка позбавлена недоліків ембріональних стовбурових клітин.

Було виявлено, що соматичні стовбурові клітини, ідентифіковані як нові, здатні вирішити зазначені вище технічні задачі. Соматична стовбурова клітина, відповідно до даного винаходу, утворюється з умбілікатної пуповинної крові, крові плаценти і/або крові новонародженої дитини, при цьому дана соматична стовбурова клітина, маючи відмітні ознаки, здатна диференціюватися в мезенхімні стовбурові клітини або клітини-попередники, стовбурові клітини або клітини-попередники гематопоїетичних ліній диференціації, нервові стовбурові клітини або клітини-попередники, ендотеліальні стовбурові клітини або печінкові клітини-попередники. Дані клітини являють собою клітину попередника гематопоїетичної лінії диференціації, мезенхімні стовбурові клітини, а також нервові стовбурові клітини. Ця унікальна багатифункціональна здатність і технологія розмноження цих нерестриктованих соматичних стовбурових клітин (USSC), похідних пуповинної крові (CB) або у вигляді таких соматичних стовбурових клітин, або у вигляді детермінованих клітин (клітин, здатних диференціюватися в одному напрямку) чітко відповідно до протоколів диференціації дозволяє уточнити відбір характеристик, забезпечити стандартизацію та використання для виробництва і впровадження терапії на основі стовбурової клітини у напрямках медицини, що спеціалізуються на регенерації органів і тканин.

На Фіг.1 подана фотомікрограма первинної культури USSC. Клітини розміщуються на чашці Петрі при низькій щільності.

На Фіг.2 подана фотомікрограма отриманої при злитті культури USSC.

На Фіг.3 поданий аналіз, виконаний із застосуванням активованого флюоресценцією аналізатора клітин (FACS) для антигену CD45 культури в пробірці.

На Фіг.4 поданий аналіз, виконаний із застосуванням активованого флюоресценцією аналізатора клітин (FACS) для ембріонного маркера SSEA4.

На Фіг.5 поданий аналіз, виконаний із застосуванням активованого флюоресценцією аналізатора клітин (FACS) для HLA-класу I (A, B, C), HLA DR і CD14.

На Фіг.6 подана кінетична схема, виконана із застосуванням активованого флюоресценцією аналізатора клітин (FACS) для поверхневого маркера CD34.

На Фіг.7 подана фотомікрограма клітини USSC після індукції нейроналу.

На Фіг.8 показано, що клітини USSC відповідно до винаходу виявляють експресію nestin, antinestin імунофарбування маркера нервової стовбурової клітини.

На Фіг.9 показані USSC, що генерують клітини нейронної лінії диференціації.

На Фіг.10 показані USSC, що генерують клітини гліальної лінії диференціації.

На Фіг.11 показані утворення мінералізованих "вузликів" після остеогенної індукції і після фарбування червоним алізарином (B).

На Фіг.12 показане фарбування Alcian Blue (бідо-блакитний) USSC-похідної культури, що осіла на стінках пробірки (або у вигляді гранул).

На Фіг.13 показане фарбування (колаген, тип II) (зелений) культур USSC після хондрогенної диференціації.

На Фіг.14 показана ліпогенна диференціація культур USSC, виявлених Oil Red-фарбуванням (темно-червоним).

На Фіг.15 подана фотомікрограма культур USSC перед і після міогенної диференціації.

На Фіг.16 подана імуноцитохімія повільно діючого міозину після азацитидин-обробки.

На Фіг.17 показаний фенотип овальної клітини USSC-похідних.

На Фіг.18 подані тривалість існування інтеграції культур USSC після ін'єкції в паренхіму печінки SCID-миші.

Соматичні стовбурові клітини, відповідно до даного винаходу, можуть бути виділені і очищені декількома способами, що включають операції виділення шляхом градієнта щільності, застосування факторів росту культури клітин, що прилипають, і субкультур, як описано у прикладі 1. Після утворення конфлюентного клітинного шару процес зростання для одержання клітини, відповідно до даного винаходу, звичайно постійно контролюється за допомогою фібробластоїдної морфології і фенотипного аналізу з використанням антитіл, спрямованих проти поверхневих антигенів CD13 (позитивний), CD14 (негативний), CD45 (негативний), а також CD29 (позитивний; див. приклад 2).

Соматична стовбурова клітина, відповідно до даного винаходу, вступає в негативну реакцію з маркерами, призначеними для мічення гематопоіетичних ліній диференціації, наприклад, CD45, і, отже, відрізняється від гематопоіетичних стовбурових клітин, які також можуть бути виділені з плацентарної пуповинної крові. CD14 являє собою ще один поверхневий антиген, який може бути виявлений на USSC. Стовбурова клітина, за даним винаходом, характеризується наявністю набору антигенів, що присутні на поверхні клітини. Такими антигенами є CD13, CD29, CD44 і CD49e. Препарати USSC додатково характеризуються наявністю mRNA-транскрипторів для певних рецепторних молекул, подібно до рецептора (EGF-R) фактора епідермального росту, рецептора альфа (PDGF-RA) тромбоцит-похідного фактора росту, а також подібно до рецептора (IGF-R) фактора росту інсуліну. Дані клітини, як правило, виявляють експресію факторів, наприклад, YB1 (фактор 1 транскрипції Y-бокс), Runx1 (фактор 1 транскрипції, що належить до карликового зростання), і AML1C (фактор транскрипції гострої лейкемії, що має відношення до спинного або кісткового мозку), як було визначено при RT-PCR (RT-полімераза-ланцюжкової реакції). Проте препарати USSC, як правило, негативні щодо транскриптів для фактора Cart-1 хондрогенної транскрипції та нейральных маркерів, таких як, наприклад, нейрофіламент, синаптофізин, тирозингідроксилаза (TH) і гліальний фібрилярний кислотний протеїн (GFAP).

Таблиця 1; Дослідження зразків транскрипції USSC методом RT-PCR (RT-полімераза-ланцюжкової реакції).

Результати RT-PCR, отримані обумовленими олігонуклеотидними праймерами і mRNA з USSC і позитивною контрольною групою mRNA з інших тканин, типу кісткової, хрящеподібної, мозкової або одноядерних клітин пуповинної крові.

Найменування	Результат PCR USSC	
PDGFR альфа	+	+
IGFR	+	+
Нейрофіламент	-	-
CD105	+	
GFAP	-	
Синаптофізин	-	
Тирозингідроксилаза	-	
YB1	+	
Runx1	+	+
AML1C	+	+
BMPR II	+	+
Колаген, тип I	+	+
Cart-1	-	
Хондроадерин	-	+
CD49e	+	+

RNA-експресія препаратів USSC і MSC-похідні кісткового мозку (Caplan, 1991) були піддані безпосередньому порівнянню методом використання мікроматриць Affimetrix GeneChip™ для визначення кількісних ознак. Транскрипт гена Fibulin-2 (номер у банку генів - X82494) був виявлений у USSC на високих рівнях експресії, але не у MSC. Раніше одержання Fibulin-2 було продемонстроване у фібробластах (Pan et al., 1993). Аналіз Northern blot (нозерн-блотінг) mRNA з тканин різних людських органів знайшов добрий транскрипт 4. 5-kb у тканинах серця, плаценти і яєчника (Zhang et al., 1994). Протеїн локалізували на світлому мікроскопічному рівні у людському зародку строком 4-10 тижнів, використовуючи поліклональні антитіла. Fibulin-2 був виявлений головним чином у нейропителиї, спинномозкових вузлах і периферійних нервах (Miosge et al., 1996).

У тваринній моделі пацюка міофібробласти печінки пацюка (rMF) були локалізовані разом з Fibulin-2. Ці клітини розташовувалися в ділянці воріт органів, у стінках центральних вен і лише місцями у паренхімі (в основних функціонуючих елементах внутрішніх органів). На ранніх стадіях фіброзу rMF виявляли у межах рубців, що розвиваються. На більш пізніх стадіях rMF був причиною виникнення великої кількості клітин, зосереджених у межах рубця (Knittel et al., 1999). На моделі іншої тварини протеїн Fibulin-2 миші виявляє свою експресію в процесі епітеліально-мезенхімальної трансформації у матриці закладення ендокарда під час формування серця ембріона. Fibulin-2 також був синтезований клітинами-попередниками формування гладкого м'яза судин дуги аорти, що розвиваються, і коронарними ендотеліальними клітинами, що

розвиваються з клітин нервового гребінця та епікардіальних клітин, відповідно (Tsuda et al., 2001).

Транскрипти гена Hyaluronan Synthase (D84424), гена Fibromodulin (U05291) і транскрипт 1NFLS (WO3846) не були виявлені в USSC, однак були виявлені тільки на високих рівнях MSC. Аналізи Northern blot (норзен-блотінг) засвідчили, що Hyaluronan Synthase скрізь виявляє експресію в людських тканинах (Itano and Kimata, 1996). Продукт цього ензиму - Hyaluronan виконує різні функції, включаючи заповнення порожнин, змащення суглобів, а також забезпечення діафрагми, через яку можуть мігрувати клітини (Hall et al., 1995). Фібромодулін належить до сімейства малих інтерстиціальних протеогліканів. Протеїн дуже поширений у тканинах при найбільшому зосередженні в суглобових хрящах, сухожиллях і зв'язках (Sztrolovics et al., 1994). Транскрипт 1NFLS був клонований з печінки людського ембріона.

Ген CD24 (L33930) виявляє експресію на дуже низькому рівні у USSC, у порівнянні з рівнями експресії у MSC. CD24 виявляє експресію у багатьох клітинах В-лінії диференціації, а також на дозрілих гранулоцитах (гранулоцитах доношених немовлят) (Van der Schoot et al., 1989).

У порівнянні з MSC соматичні клітини за даним винаходом відрізняються джерелом тканини, з якого вони впрошуються. Крім того, USSC характеризуються експресією людського лейкоцитозного антигену класу I (HLA-клас I). У порівнянні з соматичними стовбуровими клітинами за даним винаходом раніше описані MSC, що вирощувалися з кісткового мозку і м'язової тканини, виявляють дуже високі рівні антигену HLA-класу I на поверхні їхніх клітин. Клітина за даним винаходом також виявляє експресію етапного специфічного раннього антигену (SSEA4), (див Фіг.4).

За звичай соматична стовбурова клітина, відповідно до винаходу, має форму клітини фібробластоїда і розростається за типом щільного зчеплення.

У переважному прикладі здійснення винаходу соматична стовбурова клітина (USSC), відповідно до винаходу, присутня у безлічі сумішах, що являють собою попередників інших соматичних стовбурових клітин, наприклад, гематопоїетичну лінію диференціації, що, переважно, виявляє експресію AC133 і CD34, соматичні стовбурові клітини мезенхімальних попередників, соматичні стовбурові клітини нейрональних попередників і їх комбінації. Даний приклад здійснення має перевагу, оскільки він має високий регенерувальний потенціал, що базується на здатності диференціюватися в різні інші соматичні стовбурові клітини або на присутності таких соматичних стовбурових клітин, які зазначені у переважному прикладі здійснення. Переважно, відповідно до даного винаходу, зі стовбурової клітини шляхом диференціації утворюються соматичні стовбурові клітини мезенхімальних попередників або соматичні стовбурові клітини нейрональних попередників.

Відповідно до винаходу створено лікарський засіб (регенерувальна терапія), що включає соматичні стовбурові клітини, які відповідають даному винаходу, а також безліч або суміші соматичних стовбурових клітин за даним винаходом. Лікарський засіб додатково може містити речовини-носії або допоміжні речовини, прийнятні стосовно медичних і фармакологічних вимог. Даний винахід стосується також способу використання USSC або безлічі, або сумішей стовбурових клітин за даним винаходом у генній терапії, заміні органів, тестуванні фармацевтичних засобів, при вирощуванні кровоносних судин в пробірці, у васкулярній терапії, кістковій терапії, при лікуванні гепатиту, панкреатиту і нервових хвороб.

Наприклад, USSC за даним винаходом можуть бути застосовані локально на потрібній ділянці з біоматеріалом або без нього.

Залежно від виду захворювання, доречно локальне або системне приймання USSC. USSC можна приймати безпосередньо або разом з прийнятними носіями чи ад'ювантами. В окремих випадках може бути доцільним додавати додаткові речовини, які сприяють подоланню захворювання. Наприклад, при використанні в ортопедії разом з USSC можуть застосовуватися речовини, що поліпшують регенерацію кісткової тканини.

В принципі способи, відомі щодо застосування MSC, можуть бути аналогічним шляхом використані й щодо USSC. На додаток слід сказати, що використання стовбурових клітин описане, наприклад, у такій літературі: [B. I. Strauer et al. "Intracoronare humane autologe Strammzelltransplantation zur Myocardreeneration nach Herzinfarkt", Dtsch. med. Wochenschr. 2001; 126:932-938; Quarto R. et al. "Repair of Large Bone Defects with the Use of Autologous Bone Marrow Stromal Cells", N. Engl. J. Med. 2001; 344:385-386; Vacanti C. A. "Brief Report: Replacement of an Avulsed Phalanx with Tissue-Engineered Bone", N. Engl. J. Med. 2001; 344:1511-1514, May 17, 2001; Hentz V. R. "Tissue-Engineering for Reconstruction of Thumb", N. Engl. J. Med. 2001; 344:1547-1548; Brittberg M. "Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation", N. Engl. J. Med. 1994; 331:889-895, Oct. 6, 1994; Freed C R. "Transplantation of Embryonic Dopamine Neurons for Severe Parkinson's Disease", N. Engl. J. Med. 2001; 344:710-719; Shin'oka T. "Transplantation of a Tissue-Engineered Pulmonary Artery", N. Engl. J. Med. 2001; 344:532-533; Shapiro A. M. "Islet Transplantation in Seven Patients with Type I Diabetes Mellitus Using a Glucocorticoid-Free Immunosuppressive Regimen", N. Engl. J. Med. 2000; 343:230-238.

Викладені у даних документах ознаки включені в матеріали заявки шляхом посилання.

Далі наводиться більш детальний опис стовбурових клітин, що відповідають даному винаходу.

Стовбурові клітини, відповідно до даного винаходу, являють собою клітини, що прилипають, які мають оболонку, форма якої нагадує форму клітини фібробластоїда, і два або три ядра (див Фіг.1), отримані після трипсин-EDTA-обробки і

повторного посіву при наявності відповідних умов вмісту культури (приклад 1), причому спостерігається швидке поширення до утворення злиттів розтягнутої по довжині морфології (Фіг.2). На Фіг.1 подана фотомікрограма основної культури USSC. Клітини, посіяні за низької щільності, демонструють фібробластоподібну морфологію USSC. Ці клітини можуть бути легко вирощені більш ніж на 14 пасажах культури. На Фіг.2 подана фотомікрограма злиття культури USSC. Через майже повністю злитий шар клітин USSC проглядається паралельна орієнтація клітин.

Фенотип поверхневого маркера первинного шару клітин, що прилипають, а також усіх похідних, отриманих у наступних пасажах, є і залишається негативним для маркера CD45. На Фіг.3 поданий аналіз, виконаний із застосуванням активованого флюоресценцією аналізатора клітин (FACS) для антигену CD45 культури в пробірці. CD45, характерний антиген маркера для гематopoїетичної клітини, майже не виявляється в USSC з пізніх пасажів (Фіг.3 на 48,54 і 82-й день).

Після застосування методу А щодо культури в пробірці (приклад 1) препарати USSC стають позитивними стосовно до етапного специфічного раннього антигену 4 (SSEA4) і виявляють гомогенну експресію ембріонального маркера. На Фіг.4 поданий аналіз, виконаний із застосуванням активованого флюоресценцією аналізатора клітин (FACS) для ембріонального маркера SSEA4. Клітини, що розмножилися відповідно до методу А (приклад 1), дуже активно виявляють експресію етапного специфічного раннього антигену 4 (SSEA4). У той самий час культури USSC залишаються негативними стосовно експресії поверхневого антигену HLA-класу I (Фіг.5A). Експресії антигену HLA DR (Фіг.5B), а також CD14 (Фіг.5C) негативні. На Фіг.5 поданий аналіз, виконаний із застосуванням активованого флюоресценцією аналізатора клітин (FACS) для HLA-класу I (A, B, C), HLA DR і CD14. Культури USSC за даним винаходом після розмноження в пробірці залишаються негативними для антигенів HLA-класу I (панель A). Ці клітини залишаються також негативними для HLA DR (панель B) і CD 14 (панель C) поверхневих антигенів, характерних для антигендемонструючих клітин (HLA DR) і моноцитів (CD14).

На Фіг.6 подана кінетична схема, виконана із застосуванням активованого флюоресценцією аналізатора клітин (FACS) для поверхневого маркера CD34. USSC вирощували в H5100/PEI протягом більш 10 пасажів.

На Фіг.7 подана фотомікрограма клітини USSC після індукції нейроналу. Протягом цього періоду розвитку культури спостерігалася значне зростання експресії антигену CD34. Стосовно маркера CD34 гематopoїетичної стовбурової клітини Фіг.6 підтверджує, що у пасажі 3 жодної позитивної клітини CD34 не може бути виявлено до 54-го дня. Навпаки, у сьомому пасажі на 82-й день з'являється нова позитивна субпопуляція CD34.3 іншого боку, якщо такі позитивні попередники як CD34 і/або FIK1 були вирощені в цитокін-культивованому середовищі,

характерному для гематopoїетичної диференціації, розвивалися типові змішані або гематopoїетичні колонії попередників (CFU-GM і BFU-E) клітин червоних та білих кров'яних тілець, порівнянні з гематopoїетичними клітинами - попередниками CD45⁺ (приклад 9).

Якщо одноклітинні клітини пуповинної крові, еліміновані для CD14, вирощують у середовищі з високим вмістом глюкози, вони виявляють властивості, характерні для нейральних стовбурових клітин. На Фіг.7 подана фотомікрограма клітин USSC після індукції нейроналу. USSC, за даним винаходом, культивовані у модифікованому за способом Дюльбекко середовищі Голка з високим вмістом глюкози, демонструють астроцит-подібну морфологію. На Фіг.7 показаний приклад такої культивованої клітини, що демонструє гліальну морфологію, отриману в культурі після 13 днів (приклад 6). USSC після вирощування з PEI виявляє експресію nestin-маркера нейральної стовбурової клітини. Перше спостереження показує, що nestin-фарбування найменш виявляється після того, як клітини стимульовані речовинами для введення нейралу, наприклад, смолоподібною кислотою (RA), основним фактором росту фібробласта, фактором росту нерва (bFGF) β (NGF- β) (McKay, 1997).

На Фіг.8 показано, що клітини USSC, відповідно до винаходу, виявляють експресію nestin-маркера нервової стовбурової клітини. USSC (A) були інкубовані у середовищі H5100/PEI протягом 7 днів і піддавалися antinestin-стандартній імуногістохімічній обробці. Клітини (B) були інкубовані у середовищі H5100/PEI протягом 7 днів, наступних за 9 днями індукції RA, bFGF і NGF у H5100. Слід зазначити, що інтенсивність nestin-фарбування знижується порівняно з інтенсивністю зростання клітин при умовах (A).

Подальше дослідження цих клітин виявляє також експресію характеристик протеїнів для нейральних клітин, наприклад, γ -аміномасляної кислоти (GABA, Фіг.9B), тирозингідроксилази (Фіг.9B), синаптофізину (Фіг.9D), нейрофіламенту (Фіг.9F) або типових гліальних антигенів, подібних до галактоцереброзидів (GalC, Фіг.10B) та гліальних фібрилярних кислотних протеїнів (GFAP, Фіг.10D). На Фіг.9 показані USSC, за даним винаходом, що генерують клітини нейронної лінії диференціації. USSC, за даним винаходом, вирощувалися протягом 7 днів у H5100/PEI і витримувалися протягом 27 днів на H5100, що містить RA, bFGF, NGF. Після стандартних протоколів фіксації були застосовані нейрональні специфічні антитіла. Показані контрастні за фазою фотографії (A, C, D), флуоресцентні фотографії (B, D, F) тих самих препаратів, що й при A, C, D. DNA-барвник DAPI (блакитний) використовують для фарбування клітинних ядер. Подвійна імуофлуоресцентна фотографія (B) виконана з використанням анти-GABA (червоний), антитирозингідроксилази (TH, зелений). (D) Фарбування (зелене) антисинаптофізину. (F) Виявляється специфічне забарвлення (червоне) антинейрофіламенту нейрона. Проти різних підтипів нейрофіламенту був використаний

коктейль з антитіл. На Фіг.10 показані USSC, за даним винаходом, що генерують клітини гліальної лінії диференціації. Клітини піддавалися такому ж впливу умов клітинної культури, який продемонстрований на Фіг.9. DAPI - блакитний. (A, C) -фотографії фазової контрастності. (B) відповідає тим самим клітинам, що показані під позначкою (A) і які піддавалися анти-GalC-імунному фарбуванню (червоний). (D) відповідає тим самим клітинам, що показані під позначкою (C) з фарбуванням антигліальним фібрилярним кислотним протеїном (GFAP, червоний).

Однак, якщо описані вище універсальні стовбурові клітини узяті з будь-якого з пасажів росту і внесені в DAG (дексаметазон, аскорбінова кислота, β -гліцеролфосфат), що містять умови культивування, або у фібронектин, що містить середовище, диференціація виникає уздовж остеогенної лінії диференціації (приклад 3). Як показано у таблиці 2, кісткові специфічні маркерні гени (алкалінфосфатаза, остеокальцин, колаген типу I) вільно вводяться і виявляються за допомогою RT-PCR.

RT-PCR-дослідження у процесі остеогенної диференціації USSC

	Контрольний	День 7	День 14
β -актин (поз., контрольн.)	+	+	+
Алкалінфосфатаза	-	На 14-й день хондрогенної + стимуляції виявляють експресію три характерних гена-маркера при проходженні хондрогенезу.	+
Колаген, тип II	-		+
Остеокальцин	+		+

Три гена-маркера остеогенної диференціації виявляються у зрослій mRNA-експресії на 7 день уведення DAG. β -актин служить за позитивний контроль.

На Фіг.11 показані утворення мінералізованих "вузликів" після остеогенного введення і після фарбування червоним алізарином (B). Остеогенна диференціація шарів USSC, що майже злилися, була індукована шляхом додавання дексаметазону, аскорбінової кислоти і β -гліцеролфосфату в середовище культури H5100. На 10-й день стимуляції з'являються характерні кісткові вузлики (11A). Мінеральне відкладення цих вузликів може бути продемонстроване за допомогою фарбування червоним алізарином (11B). В умовах остеогенної індукції клітини за даним винаходом піддаються повній остеогенній диференціації, як продемонстровано акумуляцією мінералізованої кістки в окремих вузликах (Фіг.11A), які можуть бути пофарбовані червоним алізарином (Фіг.11B). Як альтернатива, акумуляція гідроксіапатиту у культурі клітини може бути виявлена після 6 днів фарбування за von Kossa.

На підставі отриманих результатів стає очевидним, що пуповинна кров містить дуже ранні стовбурові клітини, які до останнього часу не виявлялися і можуть розмножуватися в дуже великих кількостях. Крім того, дані клітини можуть бути індуковані для диференціації в MSC, а звідти в остеобласти, як вже було продемонстровано на

Фіг.11A. Після закінчення індукції DAG може бути досягнута наступна диференціація до одержання мінералізованих кісткових вузликів, як показано на Фіг.11B за допомогою фарбування червоним алізарином.

Рухомість клітин за даним винаходом навіть вище, ніж це було продемонстроване хондрогенною диференціацією після культивування у середовищі DMEM з високим вмістом глюкози, що включає дексаметазон, пролін, натрійпіруват, ITS+Premix і TGF- β 1 (Johnstone et al., 1998). За станом на 0 і 14-й день експериментів, що стосуються даних диференціації, клітини були зібрані та проаналізовані за допомогою RT-PCR (Таблиця 3, приклад 4).

Таблиця 3

RT-PCR-дослідження у процесі хондрогенної диференціації USSC

	Контрольний	День 14
β -актин (поз., контрольний)	+	Таблиця 2
Колаген, тип II	-	+
Хондроадерин	-	+

Результати даних досліджень переконливо демонструють позитивну активацію Cart-1, фактора специфічної хондрогенної транскрипції через 14 днів після хондрогенної стимуляції. Крім того, були активізовані mRNA-транскрипти для двох типових суглобових екстраклітинних протеїнів (колаген типу II і хондроадерин). Крім того, клітини за даним винаходом явно створили екстраклітинні протеогліканові молекули, типові для хондроцитозної диференціації, як показано за допомогою фарбування Alcian Blue (блідо-блакитний). На Фіг.12 показане фарбування Alcian Blue USSC-похідної культури, що осіла на стінках пробірки (або у вигляді гранул). USSC вирощували під культурою осадження у середовищі хондрогенної диференціації. По закінченні 6 днів жодної більш менш значної кількості протеогліканів (PG) як характерних маркерів хондрогенної диференціації не було виявлено методом фарбування Alcian Blue (панель A). Навпаки, PG легко виявлялися, на що вказувала поява забарвлення блакитного/зеленого кольору (панель B).

При цьому присутність суглобово-специфічного колагену типу II могла бути продемонстрована на протеїновому рівні. На Фіг.13 показане забарвлення (колаген, тип II) (зелене) культур USSC після хондрогенної диференціації.

USSC культивували у середовищі хондрогенної диференціації. Експресія екстраклітинного матричного протеїнового

колагену типу II була продемонстрована на 14-й день методом флуоресцентної мікроскопії з використанням первинного антитіла антиколагену типу II і FITC антимишиного вторинного антитіла (Fig.13B).

Подальша рухомість нерестрикованої стовбурової клітини у даному випадку показана шляхом диференціації таких культур, попередньо вирощених відповідно до протоколу PEI, у жирові клітини з більш високими концентраціями дексаметазону (приклад 5). На Fig.14 показані жирові клітини, які можуть бути специфічно Oil Red-пофарбовані в темно-червоний колір (Сигма). Адипоцити характеризуються високою кількістю міжклітинних везикул і специфічним забарвленням Oil Red у червоний колір.

Крім того, USSC після культивування протягом 24 годин у H5100 з $10\mu\text{M}$ 5'-азацитидину, а потім з 100нг/мл bFGF виявляє переконливе підтвердження очевидності м'язової диференціації. Зміна у м'язовій морфології супроводжується експресією повільно діючого міозину (Fig.15 і 16). Крім того, поява проліферації типових овальних кліток регулярно спостерігається у пізніх пасажах (Fig.17), коли PEI-індуковані USSC субклонуються з CD34⁺-популяції, поданої на Fig.6 (приклад 8). Дані клітини у різному ступені виявляють, регульовану експресію ферментної дипептидил-пептидази IV, яка означає, що такі овальні клітини можуть далі диференціюватися в клітини печінки.

USSC, вирощені в пробірці, виживають і залишаються життєздатними після ін'єкції в регенерувальні печінки SCID-мишей з 50% частковою резекцією печінки, а також в неампутовані печінки, беручи до уваги, що одноклітинні клітини, похідні пуповинної крові, не можуть бути виявлені навіть при трансплантації 25-кратної кількості клітин. На Fig.18 подані тривалість існування та інтеграція культур USSC після ін'єкції в паренхіму печінки SCID-миші. Fig.18A: Червоне флуоресцентне забарвлення через 7 днів після трансплантації вказує на тривалість існування та інтеграцію людських USSC з мітками PKH26 за даним винаходом в тканину печінки миші (без резекції). Навпаки, після трансплантації одноклітинних клітин - похідних пуповинної крові (MNC) ніякої червоної флуоресценції, що вказує на інтеграцію людських MNC, виявлено не було. Fig.18B: кріосекція тканини печінки миші відповідної A: Світла мікрограма трансмісії тканини печінки миші з інтегрованими людськими USSC.

Оскільки попередник клітин печінки та панкреатичних β -острівкових клітин один і той самий, такі СВ-похідні овальні клітини можуть бути диференційовані в інсулінвиробляючі β -острівкові клітини, перетворюючи їх у корисний інструмент для клітинної терапії хворих діабетом або пацієнтів з печінковою недостатністю.

На додаток до зазначених очевидних клінічних застосувань, будь-які з добре вивчених і належним чином узаконених стандартизованих компонентів вирощених стовбурових клітин і їхніх попередників можуть бути використані для контролюючих і визначальних дій, а також для досягнення

результатів на молекулярному і клітинному рівні, одержаних від нових фармакологічних засобів і, нарешті, для заміни новими методами досліджень ряду експериментальних досліджень на тваринах.

Отже належним чином стандартизовані стовбурові клітини і диференційовані клітини, одержані з культур людської пуповинної крові, описані в даному документі, можуть бути використані як оціночний тестовий реагент у фармакологічній і біологічній галузях промисловості.

Препарати USSC при певних відповідних умовах утримування культури забезпечують вирощування численних колоній різних гематопоеїтичних ліній диференціації, забезпечуючи очевидність того, що дані клітини можуть активізувати кровотворення.

За певних умов культурне середовище з різними концентраціями VEGF, Flt 3L, SCGF (фактор росту стовбурової клітини) і метилцелюлози дані клітини розвивають змішані колонії клітин, позитивних також і щодо маркерів FLK1+ і AC133+, Tie1 і Tie2. Відповідно до подальшої диференціації був розроблений профіль маркера, характерний для ендотеліальних клітин при негативному AC133, CD31⁺, CD54⁺, VWF⁺, VE-Catherin⁺.

У даному описі заявляється про очевидну користь таких ендотеліальних клітин для вирощування в пробірці автологічних і алогенних кровоносних судин для лікування васкулярних хвороб.

У той самий час цілком зрозуміло, що дані генеровані в пробірці і гомогенно вирощені попередники та їхні диференційовані клітини будуть служити на рівні клонування дуже важливим інструментом визначення ролі специфічних генів і їхніх похідних у клітинній біології та наступних методах використання у медицині на основі терапій на клітинному або молекулярному рівні.

Лише незначної кількості даної унікального типу клітини досить, щоб генерувати велике число клітин USSC, що розростаються шляхом прилипання, які відповідають даному винаходу, і більш диференційованої мезенхімальної стовбурової клітини для одержання прийнятних з погляду медицини регенеративних типів клітин.

Одним із зовсім нових аспектів у даній галузі знань є той факт, що такі попередники можуть асиметрично розвиватися у двох або більше типах клітин, що істотно відрізняються одна від одної. Це відкриває нову біологічну концепцію Со-компонентної регуляції у функціонально орієнтованій регенерації клітини, що відбувається навіть у пробірці.

Суть наступного застосування даного винаходу полягає у тому, що терапевтичні метода, засновані на використанні такої стовбурової клітини, повинні бути розроблені відповідно до даної концепції і включати не тільки один тип клональної клітини. Далі винахід ілюструється, але не обмежується наступними прикладами здійснення винаходу.

Приклад 1. Колекція пуповинної крові (СВ)

Колекція пуповинної крові в акушерських відділеннях була створена з інформованої згоди матері. Після відторгнення дитини з плацентою пупковий канатик ще усередині матки був двічі перетиснений і вирізаний розміром 7-10 см з пупка. Після дезінфекції канатика пупкова вена була пунктирована і поміщена в колекцію СВ, а саме, у спеціальні судини для колекційних препаратів, що містять цитратфосфатдекстрозу (CPD) як антикоагулянт.

Виділення одноклітинних клітин з пуповинної крові

Умбілікальна пуповинна кров була акуратно поміщена на розчин фікола (щільність $1,077 \text{ г/см}^3$). Потім було здійснене центрифугування градієнта щільності (450 г, при кімнатній температурі протягом 25 хвилин). Одноклітинні клітини (MNC) інтерфазу були зібрані і двічі промиті у фосфатному буферному фізіологічному розчині, pH 7,3 (PBS).

Генерування шарів фібробластоїдної морфології, що прилипають

Одноклітинні клітини були поміщені при щільності близько 5×10^3 клітин/ см^2 у колби з культурою T25 (Nunc) [A., B., C.]. Для ініціювання росту стовбурових клітин, що прилипають, були використані чотири методи вирощування культури:

A.) СВ-похідні MNC були спочатку культивовані у середовищі Myelocult H5100 (StemCell Technologies, Vancouver/Canada), що містить 10^{-7} М дексаметазону.

B.) СВ-похідні MNC були спочатку культивовані у середовищі Myelocult H5100 (StemCell Technologies, Vancouver/Canada), що містить 10^{-7} М дексаметазону.

C.) В-похідні MNC були спочатку культивовані у середовищі DMEM з низьким вмістом глюкози (Bio-Whittaker) з 30% FCS, що містить 10^{-7} М дексаметазону.

D.) СВ-похідні MNC були поміщені при щільності 5×10^6 /мл у 10 мл середовища Myelocult H5100 (StemCell Technologies, Vancouver/Canada), у 50-мілілітрові колби для вирощування культур (Nunc) без дексаметазону.

Усі культури були інкубовані при 37°C у 5% CO_2 у повністю зволоженій атмосфері і підготовувалися один раз на тиждень шляхом видалення всього середовища з не прилиплими клітинами і додаванням 10 мл свіжого середовища. Після декількох часових стадій клітини, що прилипають, у формі веретена були вилучені шляхом обробки 0,05% трипсину і 0,53 мМ EDTA протягом 2 хвилин, промиті 50% середовищем, що містить сироватку, зібрані центрифугуванням при 780 г і підраховані методом проточної цитометрії або RT-PCR. Через період від двох до трьох тижнів клітини фібробластоїдної морфології, що розрослися і прилипають, становили близько 30% усіх клітинних культур.

Характеристики культури для зростання USSC за даним винаходом

USSC, що відповідають даному винаходу, можуть бути розмножені у середовищі H5100, що містить 10 нг/мл IGF I (фактор росту I, подібний до інсуліну), 10 нг/мл PDGF-BB (тромбоцит-похідний

фактор росту BB) і 10 нг/мл rh-людського EGF (рекомбінантний людський епідермальний фактор росту) (середовище PEI) при щільності від 1×10^4 до 1×10^5 клітин/мл (метод вирощування A). Як альтернативний варіант препарати USSC можуть розмножуватися у середовищах, що забезпечують первинне зростання, A, B і C.

Приклад 2. Визначення імунофенотипу клітин методом цитофторометрії

Щоб визначити імунофенотип USSC, клітини були пофарбовані FITC-кон'югованим анти-CD45 (Becton Dickinson, Coulter), PE-кон'югованим анти-CD14 (PharMingen, Coulter), анти-SSEA-4 (MC-813-70), міченим зображенням козерога F(ab')₂ антимиша IgG+IgM (H+L)-FITC (Coulter), анти-CD10-PE (CALLA, PharMingen), анти-HLA-клас I (Coulter), міченим зображенням козерога F(ab')₂ антимиша IgG+IgM (H+L)-FITC, анти-CD13-PE (Becton Dickinson, Coulter); анти-CD29 (Coulter), анти-CD44 (Coulter), анти-CD49e (Coulter), анти-CD90 (Coulter), анти-HLA-клас II-FITC (Coulter). Клітини були підраховані з використанням EPICS XL (Coulter) або аналізатора FACS (Becton Dickinson).

Приклад 3. Демонстрація потенціалу остеогенної диференціації USSC

USSC, одержані відповідно до прикладу 1, були культивовані у стандартному середовищі до досягнення 70% злиття. Остеогенна диференціація цих клітин була індукована додаванням 10^{-7} М дексаметазону, 50 мкг/мл аскорбінової кислоти і 10 мМ β -гліцерофосфату (Bruder et al., 1994, Jaiswal et al., 1977). На 10-й день стимуляції клітини виявляли осадження фосфату кальцію, в результаті чого утворювалися кісткові вузлики. Мінералізовані кісткові вузлики були виявлені фарбуванням Alizarin Red відповідно до наступної технології:

Клітини культури, що прилипають, двічі промивали за допомогою PBS (фосфат-сольовим буферним розчином), pH 7,3, і фарбували у 5 мл 0,1% розчину Alizarin Red протягом однієї години при кімнатній температурі з подальшою обробкою 0,1% оцтовою кислотою та абсолютним етанолом, також PBS. Фарбування за Alizarin Red і von Kossa кальцію демонструє потенціал мінералізації цих клітин (Stanford et al., 1995, Rundby et al., 1993). Остеогенна диференціація була також продемонстрована RT-PCR з використанням маркерів кістково-специфічної диференціації, остеокальцину (OC), остеопонтину (OP), кістково-специфічної алкалінфосфатази (AP), сіало-протеїнової кістки (BSP), рецептора альфа-тромбоцит-похідного фактора росту (PDGF-Ra), рецептора епідермального фактора росту (EGFR) і колагену типу I.

Приклад 4. Демонстрація потенціалу хондрогенної диференціації USSC

Для хондрогенної диференціації 2×10^5 стовбурові клітини, що прилипають, були поміщені у культуру осадження у 15 мл пропіленових трубках. DMEM з високою концентрацією глюкози, що містить дексаметазон, пролін, натрійпіруват, ITS+Premix і TGF- β використовували як середовище клітинної культури (Johnstone et al., 1998, Yoo et al., 1998). На 7, 14 і 21-й день клітинні

фракції були досліджені за допомогою RT-PCR на суглобну специфічну генну продукцію, що кодує Cart-1, колаген типу II і хондроадерин. Крім того, USSC були застосовані в культурах осадження. По закінченні двох тижнів депарафінізовані зрізи були зафіксовані 4% параформальдегідом протягом 15 хвилин при кімнатній температурі і промиті етанолом. Зрізи були пофарбовані 1% Alcian Blue/3% оцтова кислота, pH 2,5 (Сигма) протягом 5 хвилин і промиті у дистильованій воді. Вони ясно продемонстрували позитивне забарвлення специфічних протеогліканів, як показано забарвленням Alcian Blue (Фіг.12) (Chao, G. et al., 1993). Після 14-денного періоду хондрогенної індукції клітини були зафіксовані відповідно до стандартного протоколу і досліджені методом флуоресцентної мікроскопії (Rosenbaum et al., 1998), демонструючи присутність специфічної екстраклітинної матриці колагену типу II (Фіг.13B).

Приклад 5. Демонстрація потенціалу адипогенної диференціації USSC

40пг/мл PDGFB, 10пг/мл EGF, 10пг/мл IGF. USSC були культивовані в H5100, що містить 10^{-6} М дексаметазону, 50мг/мл аскорбінової кислоти і 10мМ β -гліцерофосфату, результатом чого стала часткова диференціація USSC в адипоцити, що продемонстроване забарвленням Oil Red (Ramirez Zacarias et al., 1992).

Приклад 6. Демонстрація потенціалу нейрогенної диференціації USSC

Виділення клітини і характеристики культури для гліальних клітин

Одноядерні клітини пуповинної крові, одержані описаними вище способами, були еліміновані для одержання клітин CD14+ за допомогою CD14/c використанням системи виділення шляхом магнітного сортування клітин із застосуванням сепараційних колонок VS+, відповідно до інструкції виробника (Miltenyi Biotec, Bergich Gladbach). CD14-еліміновані одноядерні клітини були культивовані при щільності 2×10^6 /мл у 10мл середовища з високим вмістом глюкози (Dulbecco's MEM з 4500г/л глюкози) у колбі T25 для вирощування культури (Nunclon) і інкубовані при 37°C у 5% CO₂ з повністю зволоженою атмосферою. Через 10-15 днів у культурі були виявлені клітини гліальної форми.

Диференціація в нейральні клітини

А) Клітини вирощувалися протягом 7 днів або в одному H5100 середовищі або за присутності 40пг/мл PDGFB, 10пг/мл EGF, 10пг/мл IGF. Клітини були оброблені трипсином і поміщені на чашці Петрі при щільності близько $3,5 \times 10^3$ клітини/см² у посуд для вирощування культури з 24 колодязями на покривному склі, покритому полі-Д-лізіном (PDL) і ламініном (PDL/lam). Після цього нейрональна диференціація була ініційована додаванням таких речовин, як олтрансетриноїдна кислота (10^{-5} М), bFGF (20нг/мл) і NGF- β (50нг/мл).

Флуоресцентна мікроскопія

Після завершення періоду індукції (27 днів) клітини були зафіксовані відповідно до стандартних протоколів (Rosenbaum et al., 1998) і пофарбовані антитілами проти специфічних антигенів. Зразки досліджувалися з використанням

флуоресцентної і просвічувальної оптичної мікроскопії.

Приклад 7. Демонстрація потенціалу диференціації у міоцитозних лініях диференціації 1×10^4 USSC культивували у середовищі H5100 (StemCell Technology), доповненому 41нг/мл PDGFB, 10нг/мл EGF, 10нг/мл IGF при 37°C, 5% CO₂ доти, доки не досягали майже 70% злиття. Після цього клітини інкубували з 10мМ 5'-азацидину (Сигма) протягом 24 годин, двічі промивали PBS і культивували у середовищі H5100, доповненому 100нг/мл bFGF (Сигма). Через 1 тиждень морфологія клітин у середовищі диференціації змінилася (Фіг.15). Через 10 днів клітини були оброблені трипсином і перенесені у покриті фібронектином предметні стекла з лунками для імунофарбування.

Імуногістохімія

Клітини були зафіксовані 5% формальдегідом/PBS протягом 15 хвилин і двічі промиті в PBS, pH 7,3. Використовуючи стандартний протокол, клітини інкубували антискелетним міозин-(повільним)- специфічним первинним антитілом (клон NOQ 7.5,4D, 1:400) (фарбування у зелений колір) і первинним антитілом анти-CD13 (фарбування у червоний колір) або моноклональним антискелетним міозин-первинним антитілом (клон MY-32,1:4000). Забарвлення виявлялося позитивним для USSC, культивованих відповідно до характерних особливостей культури (Фіг.16).

Приклад 8.

Людські клітини USSC, а також одноядерні клітини, похідні пуповинної крові (MNC) були марковані червоним забарвленням PKH26 RED Fluorescent Cell Linker Kit (за допомогою набору для клітинних досліджень) (Сигма, PKH26-GL). 2×10^5 USSC і 5×10^6 MNC були введені в паренхіму печінки SCID-миші з та без 50%-ї ампутації печінки. Через 7 днів після трансплантації була одержана повна регенерація тварин з частковою ампутацією печінки. Тканина печінки була досліджена методом флуоресцентної мікроскопії або кріо-зрізу (секції) на наявність маркованих червоним забарвленням людських клітин (Фіг.8).

Приклад 9. Демонстрація потенціалу диференціації USSC в гематопоїєтичному ланцюзі диференціації

Три різних препарати USSC (USSC^{кв55} у середовищі DMEM, що містить 30% FCS; USSC^{кв55} у середовищі H5100, що містить дексаметазон; USSC^{кв55} у середовищі MesenCult, що містить PEI), які зростають на відповідному живильному середовищі протягом відповідних періодів зростання (пасажі від 5 до 8), були висіяні у 250мл (2×10^4 - 2×10^5 клітин) клітинної суспензії на трьох абсолютно однакових чашках з 24 лунками у гематопоїєтичному специфічному культурному середовищі (Methocult 4434). Колонії більш ніж з 50 клітин були підраховані і класифіковані як похідні клітини-попередників гранулоцита/макрофага (CFU-GM), раннього еритроїда (BFU-E) або мультипотента (CFU-GEMM) відповідно до встановлених критеріїв. Формування клону у різних культурах помітно розпочиналося з першого тижня спостережень і

тривало до трьох тижнів при умовах диференціації. Попередники USSC розвивали численні колонії різних клітинних ліній диференціації, забезпечуючи очевидність того, що дані клітини можуть активізувати гемопоєз.

Приклад 10. Молекулярні метода дослідження нерестриктованих соматичних стовбурових клітин і продукти їх наступної диференціації

Праймери PCR (полімеразно-ланцюжкової реакції) для ампліфікації специфічних cDNA-последностей з остеокальцину, остеопонтину, кісткового сіало-протеїну, алкаліфосфатази, PDGFR α - і EGF-рецептора були селекціоновані з різних відповідних екзонів з тим, щоб набути здатності розрізняти їх за розміром відповідним чином генерованих фрагментів DNA.

За допомогою клонування в pCRL1-вектор (Invitrogen/USA) і подальшої трансформації в E. coli-штам TOP 10F відповідні специфічні cDNA-клони були одержані та охарактеризовані за допомогою циклового секвенування на автоматичному секвенаторі (Applied Biosystems).

RT-PCR-реакції були здійснені у два етапи. 200нг загального числа RNA клітин спочатку були піддані реверсивному транскрибуванню з використанням 10 U AMV реверсивної транскриптази (Promega, Mannheim), 1,5мол 3'-ген-специфічних праймерів, 1 mM dNTP і буферного розчину (Promega, Mannheim), що подається, в обсязі 20 μ л протягом 1 години при температурі 50°C. PCR-реакція була здійснена з використанням 2 μ л cDNA з використанням 1 U HotStarTaq DNA-полімерази, буферного розчину і Q-розчину (Quagen, Hilden), 1,5 mM dNTP і 20пмол 3'- і 5'-генспецифічного праймера. PCR-реакція була здійснена при операції ініціювання протягом 15хв. при 95°C, при проведенні 37 циклів при 94°C протягом 30 секунд, при 56°C протягом 30 секунд, при 68°C протягом 1 хвилини, а остаточна операція полімеризації здійснювалася протягом 5 хвилин при 68°C.

Таблиця 4: PCR-праймери для ампліфікації специфічних cDNA-последностей.

У таблиці подані последності 3'- і 5'-праймера досліджуваних генів і передбачувана довжина PCR-фрагмента в бр.

Таблиця 4

Найменування	5'-праймер-послед.	3'-праймер-послед.	bp
PDGFR альфа	acacgtgagattacgaatgtg	caacacgtgtgtgattctcag	251
IGFR	cgagtgagagaatctgcgg	gaccnaggcgtagtttag	272
EGFR	tgccacaacacagtgctgt	ccacataattacggggacac	205
Нейрофіламент	attcgcgcgcagctgaag	ccctgtgagaggaatgtc	265
GFAP	ctctccctggctcgaatgc	ctctcgataactggccg	871
Синаптофізин	ccctgcagaacaatgaccgag	ccctgtgcccatagtcgc	516
Тирозингідроксилаза	caacttcgcgcagttctcg	ctgtccagcacgtcgatgg	387
YB1	gggtgagagggcagcaaatgt	agggttggaactgtgttc	279
Runx1	gcaagctgaggagcg	gaccgacaacactgaatgc	296
AML1c	gagctcttcagagagaatgc	gaccgacaacactgaatgc	453
Cart-1	ggagacgtgcgaatgag	ggtagctgtcagctcttgc	560
CD105	ctgtccactggacacagg	atggcagctgtgtgtgttg	411
Колаген, тип I	gagacaatgagattgcaagg	aaccactgtccactctgg	441
Колаген, тип II	tttcacagctcaagatgttc	cttcagcacctgtctacca	377
Остеокальцин	agtcagacaaggtgcagc	ggccgtagaagcccgat	231
Алкаліфосфатаза	cttcgagaagctcaacacca	cgttgtctgagctaccatcc	454
Бетаактин	gagaaatctgtccaccacac	ctcgtgagagatcttcac	340

Посилання

Bolder S., Fink DJ., and Caplan AI. (1994). Mesenchymal stem cells in bone formation, bone repair, and skeletal regeneration therapy

/Мезенхімальні стовбурові клітини у формуванні кістки, виправленні кістки і скелетної регенераційної терапії/. J. Cell. Biochem. 56; 284.

Caplan, AI., Mesenchymal stem cells /Мезенхімальні стовбурові клітини (1991)/. Orthop, Res. 9: 641-50.

Grompe, M and Finegold MJ. Liver Stem Cells /Стовбурові клітини печінки, /р. 455 - 497 from Stem Cell Biology/ з біології стовбурової клітини, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Grompe, M. and Finegold MJ. Liver stem cells /Стовбурові клітини печінки, р. 455-497 from Stem Cell Biology/ з біології стовбурової клітини, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Hall, C. L.; Yang, B.; Yang, X.; Zhang, S.; Turley, M.; Samuel, S.; Lange, L. A.; Wang, C; Curpen, G. D.; Savani, R. C; Greenberg, A. H.; Turley, E. A.: Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation /Надлишкова експресія hyaluronan-рецептора RHAMM перетворює, а також потрібна для H-ras-перетворення/. Cell 82: 19-26,1995. Itano, N.; Kimata, K. Expression cloning and molecular characterization of HAS protein, a eukaryotic hyaluronan synthase /Експресійне клонування і молекулярна характеристика HAS-протеїну, синтез еукаріотичного hyaluronan/. J. Biol. Chem. 271: 9875-9878, 1996.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro /Остеогенна диференціація очищених, вирощених на культурі в пробірці людських мезенхімальних стовбурових клітин./ J. Cell Biochem. 1997 Feb; 64(2):295-312.

Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells /Хондрогенез в пробірці мезенхімальних клітин-попередників, похідних кісткового мозку/. Exp. Cell Res. 1998 Jan. 10; 238(1):265-72.

Knittel T, Kobold D, Piscaglia F, Saile B, Neubauer K, Mehde M, Timpl R, Ramadori G. Localization of liver myofibroblasts and hepatic stellate cells in normal and diseased rat livers: distinct roles of (myo-)fibroblast subpopulations in hepatic tissue repair /Локалізація печінкових міофібробластів і печінкових клітин зірчастої структури у нормальній і хворій печінці пацієнта: особлива роль (міо-) фібробластових субпопуляцій у поліпшенні будови тканини печінки/. Histochem Cell Biol., 1999 Nov.; 112(5):387-401.

Kritzik M.R. and Sarvetnick N. Pancreatic Stem Cells /Панкреатичні стовбурові клітини, р. 499 - 513 з біології стовбурової клітини/ from Stem Cell Biology, CoJd Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Haematologica 2001 Oct.; 86(10): 1099-100. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood /Виділення людських мезенхімальних стовбурових клітин: кістковий мозок у порівнянні з пуповиною кров'ю/.

Pan, T.-C.; Sasaki, T.; Zhang, R.-Z.; Fassler, R.; Timpi, R.; Chu, M.-L: Structure and expression of fibulin-2, a novel extracellular matrix protein with multiple EGF-like repeats and consensus motifs for

calcium binding/Структура та експресія фібуліну-2, нового позаклітинного матричного білка з багатократними EGF-подібними повтореннями і мотиваціями для зв'язування кальцію/. *J. Cell Biol.* 123; 1269-1277, 1993.

Ramirez-Zacarias JL, Castro-Munozledo F, Kuri-Harcuch W. *Histochemistry* 1992 Jul.; 97(6):493-7, Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil Red O /Підрахунок перетворень тваринного жиру і тригліцеридів шляхом забарвлення інтрацитоплазматичних ліпідів у червоний колір з використанням Oil Red O/. Rosenbaum, C., Kluwe, L, Mautner, VF., Friedrich, R.E., Muller, HW., Hanemann, CO. (1998):

Enhanced proliferation and potassium conductance of Schwann cells isolated from NF2 schwannomas can be reduced by quinidine /Прискорена проліферація і провідність калію Schwann-клітин, виділених з NF2-неврином можуть бути зменшені на quinidine/. *Neurobiol. Dis* 5, 55-64.

Rungby J, Kassem M, Eriksen EF, Danscher G. *Histochem J.* 1993 Jun.; 25(6):446-51. The von Kossa reaction for calcium deposits: silver lactate staining increases sensitivity and reduces background.

/Реакція von Kossa для осаджень кальцію: фарбування срібним лактатом підвищує чутливість і зменшує фон/.

Stanford CM, Jacobson PA, Eanes ED, Lembke LA, Midura RJ. *J. Biol Chem* 1995 Apr. 21; 270(16):9420-8. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line /Мінерал апатит, що швидко формується на остеобластній клітинній лінії (UMR 106-01 BSP). ,

Shapiro A.M. J., Lakey J. R.T., Ryan E. A., Korbitt G, S., Toth E., Warnock G. L., Kneteman N. M., Rajotte R. V. *N Engl J Med* 2000 Jul. 27; (343):230-235. Islet Transplantation in Seven Patients with, Type 1 Diabetes Mellitus Using a Glucocorticoid-Free Immunosuppressive Regimen /Острівкові трансплантація Diabetes Mellitus типу 1 семи пацієнтам при використанні імунодепресивного режиму без застосування глюкокортикоїду/.

Sztrolovics, R.; Chen, X.-IM.; Graver, J.; Roughley, P. J.; Korenberg, J. R.: Localization of the human fibromodulin gene (FMOD) to chromosome 1q32 and completion of the cDNA sequence /Локалізація гена людського фібромодуліну (FMOD) у хромосомі 1q32 і закінчення cDNA послідовності/. *Genomics* 23: 715-717, 1994.

Tsuda T, Wang H, Timpi R, Chu ML. Fibulin-2 expression marks transformed mesenchymal cells in developing cardiac valves, aortic arch vessels, and coronary vessels /Мітки Fibulin-2 експресії що перетворили мезенхімальні клітини при розвитку кардіальних клапанів, судини дуги аорти, і коронарної судини/. *Dev Dyn* 2001 Sep.; 222(1):89-100.

Van der Schoot, C. E.; Huizinga, T. W. J.; Gadd, S. K.; Majdic, O.; Wilmans, R; Knapp, W.; von dem Borne, A. E. G.: Identification of three novel Pi-linked proteins on granulocytes /Ідентифікація трьох нових Pi-зв'язаних білків на гранулоцитах/. In: Knapp, W.; Dorken, B.; Gilks, W. R; Rieber, E. P.; Schmidt, R E.; Stein, H.; von dem Borne, A. E. G. K.: *Leukocyte*

Typing IV: White Cell Differentiation Antigens /Антигени диференціації білих кров'яних тілець/. Oxford: Oxford Univ. Press (pub.), 1989. Pp. 887-891.

Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells /Хондрогенний потенціал мезенхімальних клітин-попередників, похідних кісткового мозку людини/. *J. Bone Joint Surg Am.* 1998 Dec; 80(12): 1745-57.

Zhang, R.-Z.; Pan, T.-C; Zhang, Z.-Y.; Mattel, M.-G.; Timpl, R.; Chu, M.-L.: Fibulin-2 (FBLN2): human cDNA sequence, mRNA expression, and mapping of the gene on human and mouse chromosomes /DNA-послідовність людини, mRNA-експресія і картографія гена на хромосомах людини та миші/. *Genomics* 22:425-430, 1994.

Скорочення

DAG	середовище диференціації, що містить дексаметазон, аскорбінову кислоту і β-гліцерофосфат	остеогенної клітини
HLA	людський лейкоцитозний антиген	
MSC	мезенхімальна клітина	стовбурова клітина
PEI	середовище, що містить PDGF-BB, EGF і IGF	
SSEA4	етапно-специфічний антиген 4	ранній
USSC	нерестрикована стовбурова клітина	соматична
PG	протеоглікани.	

SEQUENCE LISTING

<110> KOURION THERAPEUTICS GmbH

<120> Human Cord Blood Derived Unrestricted Somatic Stem Cells (USSC)

<130> 012770wo ME/EM

<140> PCT/EP 01/ 12760

<141> 2001-11-03

<160> 34

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for the PDGFR alpha gene

<400> 1

acagtgaggaga ttaagaatgt g

21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for the PDGFR alpha gene

<400> 2

cacacacagtgt gtgatctctag

20

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for the IGF1R gene

<400> 3

cgagtgaggaga aatctgcggt

19

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for the IGF1R gene

<400> 4

gaccagggtgt tagttttag

19

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for the EGFR gene

<400> 5

tgccacacacc agtgtgtct

18

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for the EGFR gene

<400> 6

ccacataatc acggggacac

20

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for the neurofilament gene

<400> 7

attcgcggtc agcttggaag

19

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for the neurofilament gene

<400> 8

cctggttagga ggcaatgtc

19

<210> 9

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for the GFAP gene

<400> 9

ctctccctgtg ctgaatgc

19

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for the GFAP gene

<400> 10

cctctcgata actggcgg

19

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for the synaptophysin gene

<400> 11

cctgcagac aagtaccgag

20

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for the synaptophysin gene

<400> 12

ccttgctgcc catagtgcg

19

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for the tyrosine hydroxylase gene

<400> 13

caccttcggt cagttctcg

19

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for the tyrosine hydroxylase gene

<400> 14

ctgtccagca cgtcgatgg

19

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for
 the Yb1 gene

 <400> 15
 ggtgagggag cagcaaatgt 20

 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for
 the Yb1 gene

 <400> 16
 aggyttggaa tactgtggtc 20

 <210> 17
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for
 the runx1 gene

 <400> 17
 gcaagctgag gagcggcg 18

 <210> 18
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for
 the runx1 gene

 <400> 18
 gccgcacaaa cotgaagtc 19

 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for
 the ANK1c gene

 <400> 19
 cagtgtctca tgagagaatg c 21

 <210> 20

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for
 the ANK1c gene

 <400> 20
 gaccgacaaa cotgaagtc 19

 <210> 21
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for
 the cart-1 gene

 <400> 21
 ggagacgctg gacaatgag 19

 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for
 the cart-1 gene

 <400> 22
 ggtagctgtc agtccttgcc 20

 <210> 23
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for
 the CD105 gene

 <400> 23
 cctgcacatg gacacagg 18

 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for
 the CD105 gene

 <400> 24
 atggcagctc tgtgtgttg 20

 <210> 25
 <211> 20

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for the collagen typ I gene

<400> 25
ggacacaaatg gattgcaagg

<210> 26
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for the collagen typ I gene

<400> 26
aaccactgct ccactctgg

<210> 27
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for the collagen typ II gene

<400> 27
tttccacaggt caagatggtc

<210> 28
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for the collagen typ II gene

<400> 28
cttcagcacc tgtctcacc

<210> 29
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for the osteocalcin gene

<400> 29
agtcacgcaa aggtgcagc

<210> 30
<211> 18
<212> DNA

20

19

20

20

19

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for the osteocalcin gene

<400> 30
ggccgtgaa ggcgcgat

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for the alkaline phosphatase gene

<400> 31
gttcagaag ctcaacacca

<210> 32
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for the alkaline phosphatase gene

<400> 32
cgtgtcttga gtaccagtc

<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 5' primer for the beta actin gene

<400> 33
gagaaatct tgcaccacac

<210> 34
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: 3' primer for the beta actin gene

<400> 34
ctcggtgagg atcttcat

18

20

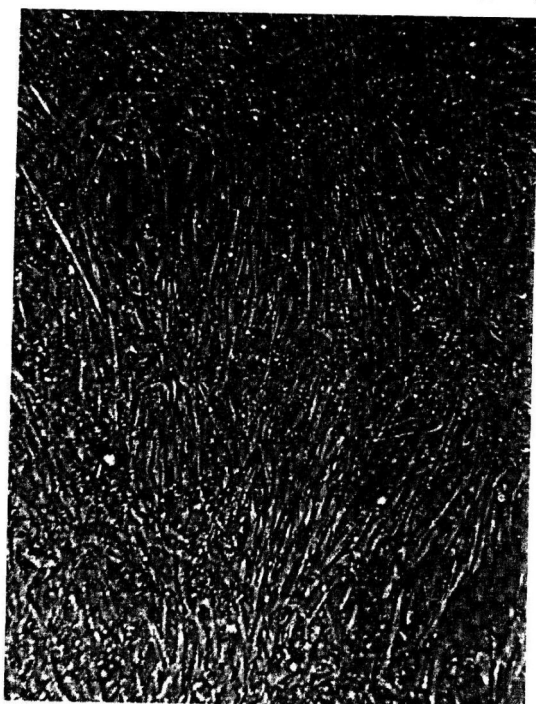
20

20

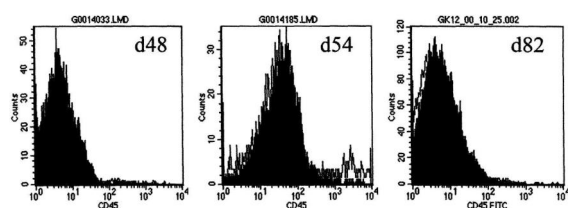
18



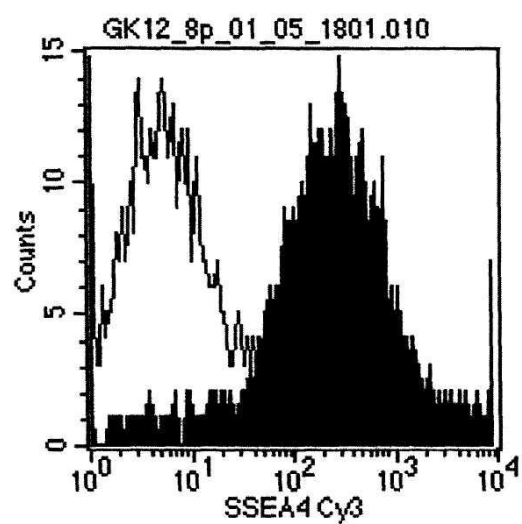
Фиг. 1



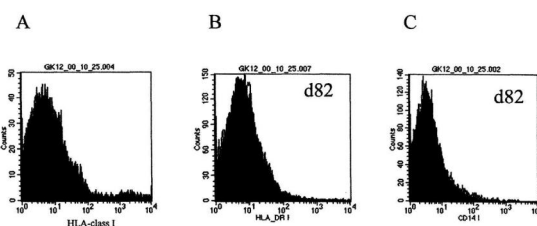
Фиг. 2



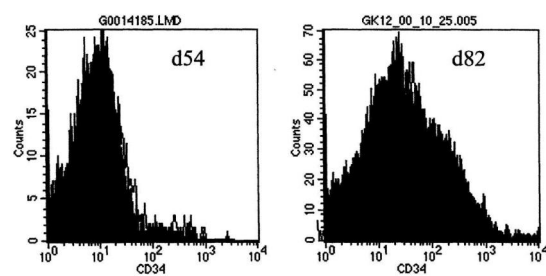
Фиг. 3



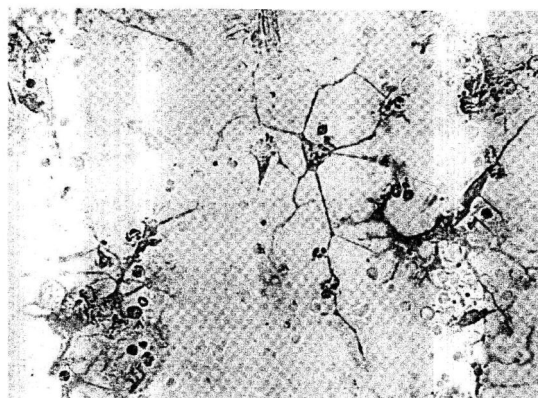
Фиг. 4



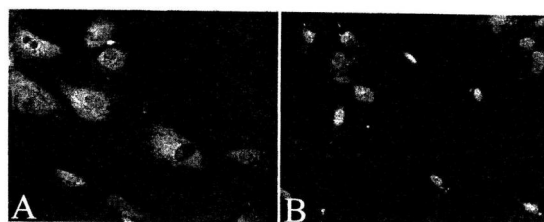
Фиг. 5



Фиг. 6

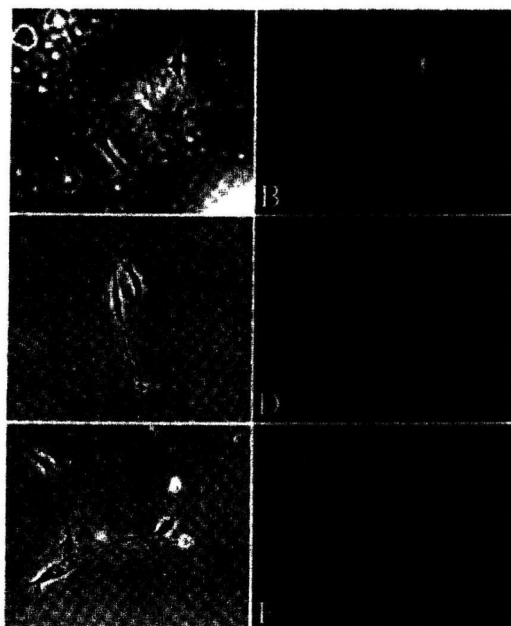


Фиг. 7

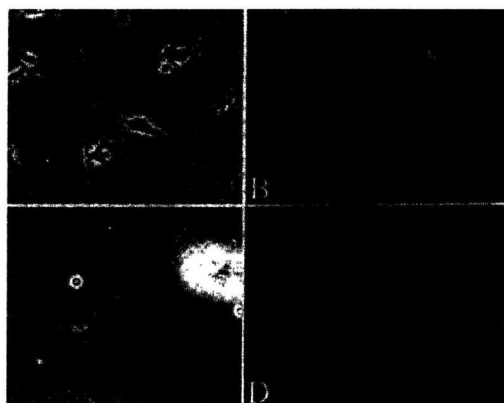


Фиг. 8

31



ФІГ. 9



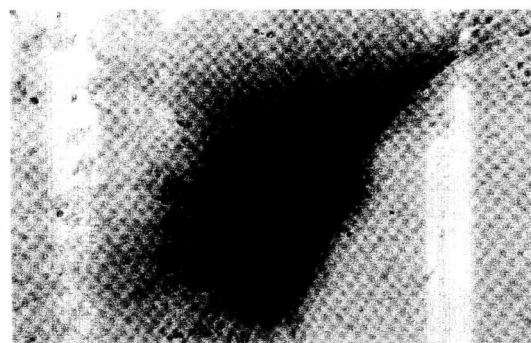
ФІГ. 10



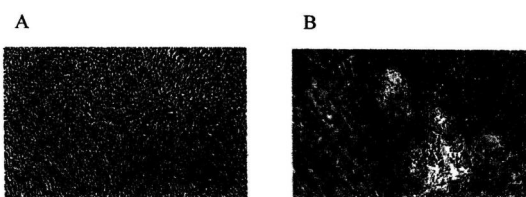
ФІГ. 11A

81390

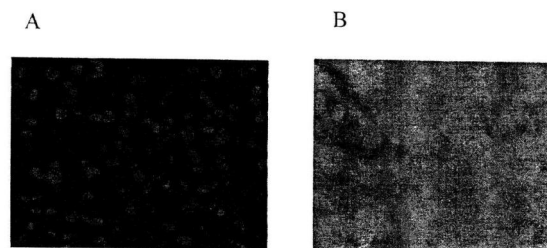
32



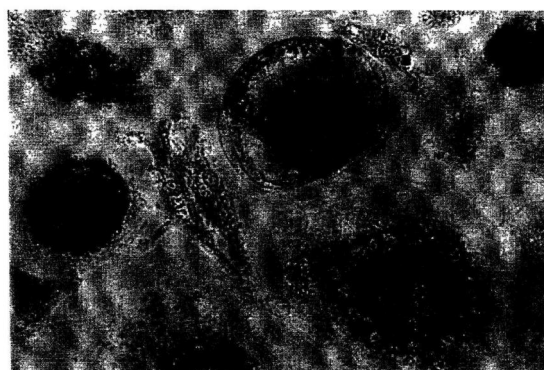
ФІГ. 11B



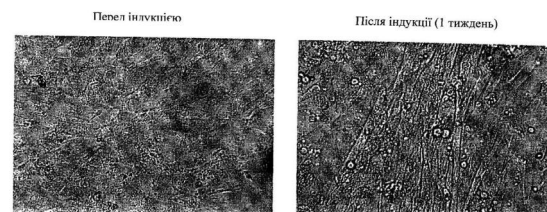
ФІГ. 12



ФІГ. 13

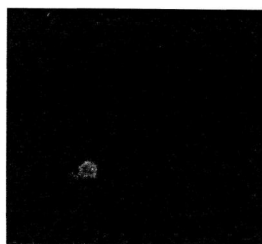


ФІГ. 14



ФІГ. 15

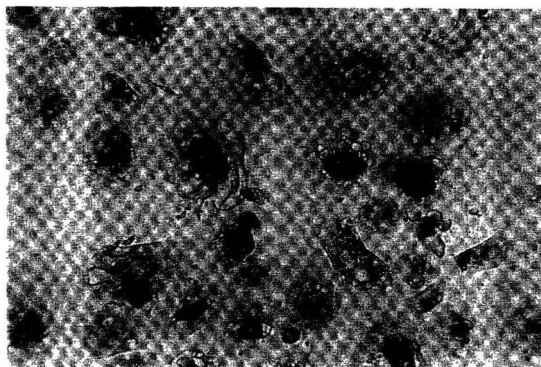
Після індукції



Перед індукцією



ФІГ. 16

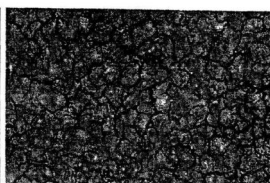


ФІГ. 17

A



B



ФІГ. 18