



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

- (45)** Дата публикации и выдачи патента
2020.05.29
- (21)** Номер заявки
201690838
- (22)** Дата подачи заявки
2014.10.24
- (51)** Int. Cl. **C12N 5/0775** (2010.01)
C12N 5/0789 (2010.01)
A61K 35/12 (2015.01)
A61K 35/16 (2015.01)
A01K 67/027 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИЯ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК С ПОНИЖЕННОЙ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ, ЕЕ ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ

- (31)** **13190120.9**
- (32)** **2013.10.24**
- (33)** **EP**
- (43)** **2016.08.31**
- (86)** **PCT/EP2014/072911**
- (87)** **WO 2015/059300 2015.04.30**
- (71)(73)** Заявитель и патентовладелец:
НЁРОПЛАСТ БЕХЕР Б.В. (NL)
- (72)** Изобретатель:
Мюнтер Де Йоханнес Петрус Йозеф Мария (NL), Ланг Эккехард (DE), Волгерс Эрик Харлес Мария Йосеф, Хан Де Петрус Теодорус (NL)
- (74)** Представитель:
Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)

- (56)** GB-A-2343679
WO-A2-2008036374
WO-A2-2007085210
DIMITRIOS DAVALOS ET AL: "Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease", SEMINARS IN IMMUNOPATHOLOGY, SPRINGER, BERLIN, DE, vol. 34, no. 1, 31 October 2011 (2011-10-31), pages 43-62, XP019988748, ISSN: 1863-2300, DOI: 10.1007/S00281-011-0290-8 page 52 - page 53 page 56, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1
R.A. KÖLL ET AL: "RheoSorb: A Specific Adsorber for Fibrinogen Elimination in Clinical Situations with Impaired Rheology", ARTIFICIAL ORGANS, vol. 26, no. 2, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 145-151, XP055105535, ISSN: 0160-564X, DOI: 10.1046/j.1525-1594.2002.06880.x page 150, right-hand column, paragraph 2 - page 151, left-hand column, paragraph 2

HIRST C.F. ET AL: "Production of plasma selectively depleted in fibrinogen by affinity chromatography", JOURNAL OF CLINICAL PATHOLOGY, BMJ PUBLISHING GROUP, GB, vol. 44, no. 4, 1 April 1991 (1991-04-01), pages 306-308, XP008145410, ISSN: 0021-9746, DOI: 10.1136/JCP.44.4.306 page 306, left-hand column

JOHANNES P.J.M. DE MUNTER ET AL: "Autologous stem cells in neurology: is there a future?", JOURNAL OF NEURAL TRANSMISSION; BASIC NEUROSCIENCES, GENETICS AND IMMUNOLOGY, PARKINSON'S DISEASE AND ALLIED CONDITIONS, ALZHEIMER'S DISEASE AND ADOLESCENT PSYCHIATRY RELATED DISORDERS, BIOLOGICAL PSYCHIATRY, BIOLOGICAL CHILD AND ADOLESCENT PSYCHIAT, vol. 120, no. 1, 23 November 2012 (2012-11-23), pages 65-73, XP035157329, ISSN: 1435-1463, DOI: 10.1007/S00702-012-0913-9, the whole document

KARINA T. WRIGHT ET AL: "Concise Review: Bone Marrow for the Treatment of Spinal Cord Injury: Mechanisms and Clinical Applications", STEM CELLS, vol. 29, no. 2, 24 February 2011 (2011-02-24), pages 169-178, XP055103329, ISSN: 1066-5099, DOI: 10.1002/stem.570, the whole document

RIORDAN NEIL H. ET AL: "Cord blood in regenerative medicine: do we need immune suppression?", JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 5, no. 1, 30 January 2007 (2007-01-30), page 8, XP021024939, ISSN: 1479-5876, DOI: 10.1186/1479-5876-5-8 page 6

US-A1-2002058289
MOVIGLIA G.A. ET AL: "Autoreactive T cells induce in vitro BM mesenchymal stem cell transdifferentiation to neural stem cells", CYTOTHERAPY, ISIS MEDICAL MEDIA, OXFORD, GB, vol. 8, no. 3, 1 May 2006 (2006-05-01), pages 196-201, XP009088084, ISSN: 1465-3249, DOI: 10.1080/14653240600735958, cited in the application, the whole document

- (57)** Данное изобретение относится к области клеточной терапии, конкретнее - к терапии с трансплантацией стволовых клеток. Предлагаются способы и композиции для повышения эффективности терапии с трансплантацией стволовых клеток путем снижения воспалительной активности трансплантата стволовых клеток. В частности, предлагается способ получения трансплантата стволовых клеток с пониженной воспалительной активностью, включающий этап суспендирования композиции, содержащей стволовые клетки, в плазме, из которой удален фибриноген, и/или в плазме, из которой удалены фибриноген и С-реактивный белок.

Область техники, к которой относится изобретение

Данное изобретение относится к области клеточной терапии, конкретнее - к терапии путем трансплантации стволовых клеток. Предлагаются способы и композиции для повышения эффективности терапии путем трансплантации стволовых клеток, а именно предлагаются средства и способы снижения воспалительной активности трансплантатов стволовых клеток. Также предлагаются средства и способы получения трансплантата стволовых клеток с пониженной воспалительной активностью.

Уровень техники

Способность тканей и органов к регенерации на протяжении жизни организма обеспечивается присутствием в тканях стволовых клеток. В процессе гомеостаза изношенные клетки претерпевают запрограммированную смерть (апоптоз) и замещаются клетками, происходящими от стволовых клеток. В результате деления стволовых клеток образуются новые стволовые клетки и клетки, которые, получив соответствующие молекулярные сигналы, дифференцируются в зрелые клетки данной ткани.

Однако после повреждения или инфекции клетки в поврежденной или инфицированной ткани претерпевают некроз и высвобождаются вещества, сигнализирующие об опасности или присутствии патогенного агента (DAMP или PAMP, соответственно). Эти сигнальные механизмы вызывают воспалительную реакцию в месте повреждения или инфекции. В процессе воспалительной реакции ткани в печени образуются белки острой фазы воспаления, которые поступают в плазму крови.

Белки острой фазы воспаления, включая фибриноген и С-реактивный белок, активируют систему комплемента, макрофаги и клетки приобретенного (адаптивного) иммунитета. Воспаление стимулирует систему гемостаза, мобилизует и активирует клетки, обеспечивающие врожденный и приобретенный иммунитет; в результате инициируется свертывание крови, ликвидируются поврежденные и зараженные инфекционными агентами клетки. В итоге воспаление прекращается, восстанавливается гомеостаз, в претерпевшей повреждение ткани клеточный ущерб компенсируется клетками - потомками стволовых клеток. Если повреждение клеток превысило некоторые пределы или если инфекция стала хронической, уровень белков острой фазы воспаления в плазме крови остается повышенным и воспаление усугубляется, что приводит к избыточному отложению амилоида (образованию бляшек) и коллагена (образованию рубцовой ткани), из-за чего существенно ухудшается функционирование пораженной ткани/органа.

Больным с некоторыми раковыми заболеваниями крови или костного мозга, например с множественной миеломой или лейкозом, помогает лечение путем трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

При аллогенной трансплантации, то есть когда гемопоэтические стволовые клетки берут у донора, иммунную систему реципиента предварительно разрушают путем лучевой или химиотерапии. Пересадка чужих (донорских) гемопоэтических клеток для восстановления кроветворения у реципиента остается потенциально опасной процедурой из-за реакции "трансплантат против хозяина", ведущей к тяжелым осложнениям. Реакция "трансплантат против хозяина" представляет собой воспалительный процесс, при котором присутствующие в трансплантате провоспалительные клетки и агенты, например лимфоциты и белки острой фазы воспаления, атакуют клетки реципиента. Это происходит даже в тех случаях, когда донор и реципиент имеют одинаковые белки главного комплекса гистосовместимости (МНС), поскольку иммунная система распознает также другие, минорные различия между белками клеточной поверхности донора и реципиента. Кроме того, в результате воздействия на иммунную систему реципиента излучением или химиотерапевтическими препаратами перед трансплантацией стволовых клеток в костном мозге скапливается много омертвевших клеток, что усиливает реакцию "трансплантат против хозяина".

Гибель клеток и воспаление - основные движущие факторы повреждения тканей после таких поражений центральной нервной системы, как, например, инсульт, и при нейродегенеративных заболеваниях. Повреждения центральной нервной системы, в том числе ишемический инсульт, травмы головного и спинного мозга, представляют серьезную проблему здравоохранения во всем мире. Как ишемические, так и травматические поражения центральной нервной системы приводят к хронической недееспособности и снижению ожидаемой продолжительности жизни. На сегодняшний день посттравматические дефекты центральной нервной системы, например, после повреждений спинного и/или головного мозга по существу не лечатся и лежащие в их основе гистологические нарушения не ликвидируются.

Большинство нейродегенеративных заболеваний - это спорадические состояния, характеризующиеся прогрессирующей утратой клеток в нервной системе. Примерами нейродегенеративных заболеваний являются болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз и рассеянный склероз. По оценкам Всемирной организации здравоохранения нейродегенеративные заболевания станут второй из ведущих причин смерти, опередив раковые заболевания. Существующие в настоящее время методы лечения нейродегенеративных заболеваний направлены на ослабление симптомов, облегчение боли и улучшение двигательной способности. Однако до сих пор доступные больным с нейродегенеративными расстройствами терапевтические подходы дают лишь симптоматическое лечение, ослабляя проявления заболевания и отсрочивая наступление стадий тяжелой недееспособности.

Привлекательным подходом к лечению заболеваний и расстройств нервной системы представляются терапевтические методы, основанные на трансплантации стволовых клеток, для восстановления ней-

рогенеза и функционального выздоровления. Также многообещающими являются терапевтические методы, основанные на трансплантации стволовых клеток, для восстановления васкуляризации при лечении ишемических заболеваний и расстройств.

Стволовые клетки, взятые у плода, например эмбриональные стволовые клетки, обладают огромным регенеративным потенциалом (Hentze H. et al., *Trends in Biotechnology* 25: 24-32, 2007). Однако их использование имеет ряд существенных недостатков, в том числе возможность отторжения трансплантата из-за аллогенной природы его клеток-потомков и возможность образования тератом в тех случаях, когда перед трансплантацией предназначенные для нее клетки должным образом не отдифференцированы.

Эмбриональные стволовые клетки нужно выращивать в культуре и, следовательно они подвержены риску контакта с ксеногенным материалом или загрязнения преждевременно истощенными клетками (Mannello F. and Tonti GA, *Stem Cells* 25: 1603-1609, 2007). Кроме того, биология стволовых клеток и закономерности их развития изучены еще слабо, и это не позволяет считать их достаточно безопасными для применения в медицинских целях.

Для лечения раковых заболеваний крови или костного мозга наиболее эффективна аллогенная трансплантация стволовых, происходящих из костного мозга или периферической крови. Для лечения заболеваний и расстройств центральной нервной системы наиболее многообещающей считается аутологичная трансплантация стволовых клеток взрослого организма, преимущественно гемопоэтических стволовых клеток и мезенхимальных стволовых клеток, происходящих из костного мозга или периферической крови (Sykova E. et al., *Cell Transplant* 15: 675-687, 2006).

В строме костного мозга имеются гетерогенные популяции мультипотентных клеток, включая гемопоэтические стволовые клетки и мезенхимальные стволовые клетки, способные к самообновлению и дифференцировке в клетки различных типов и тканей гемопоэтического и мезенхимального ростков дифференцировки, соответственно.

Недавно проведенные доклинические исследования возможности терапевтического использования трансплантации стволовых клеток для лечения больных с ишемическим инсультом, а также с травматическими поражениями головного или спинного мозга показали, что введенные интратекально гемопоэтические стволовые клетки, и/или мезенхимальные стволовые клетки, или их клетки-потомки, по всей видимости, проникают в поврежденную нервную ткань и в образуемую глиальными клетками рубцовую ткань (Alison M.R., *Journal of Pathology* 217: 141-143, 2009), выделяют трофические факторы (Caplan A.I. and Dennis J.E., *Journal of Cellular Biochemistry* 98: 1076-1084, 2006), способны дифференцироваться в функциональные нейроны (Zeng R. et al., *Spine* 36: 997-1005, 2011), способствуют формированию синаптических связей (Bareyre F.M., *Journal of Neurological Sciences* 265: 63-72, 2008) и в результате участвуют в перестройке нервных сетей, ведущей к функциональному улучшению состояния больного (Kwon B.K. et al., *Experimental Neurology* 248C: 30-44, 2013).

В ранних работах по пересадке стволовых клеток использовались трансплантаты костного мозга, которые получали путем одно- или двукратного центрифугирования материала, извлекаемого при биопсии костного мозга (WO2007125420), после центрифугирования брали желтовато-серый слой между эритроцитами и плазмой (BC-слой). Этот слой содержит гетерогенные популяции клеток, имеющих ядро, значительную часть которых составляют участвующие в работе иммунной системы клетки, способствующие воспалительной реакции. При аллогенной трансплантации таких провоспалительных клеток для восстановления кроветворения нередко развивается реакция "трансплантат против хозяина", о которой говорилось выше. При аутологичной трансплантации таких клеток в поврежденную ткань центральной нервной системы тоже возможны негативные или даже катастрофические для ожидаемого результата эффекты (Le Blanc K.L. et al., *Scandinavian Journal of Immunology* 57: 11-20, 2003; Spaggiari G.M. et al., *Blood* 107:1484-1490, 2006; Adams R.A. et al., *Journal of Experimental Medicine* 204: 571-582, 2007; Assmus B. et al., *Journal of the American College of Cardiology* 55: 1385-1394, 2010; Beck K.D. et al., *Brain* 133: 433-447, 2010). Кроме того, при центрифугировании в градиенте плотности используются химические агенты, которые нужно удалять из предназначенного к трансплантации материала, то есть необходим дополнительный этап промывания, чтобы получить конечный продукт, пригодный для трансплантации.

Отделение стволовых клеток и клеток-предшественников от клеток других типов, содержащихся в материале, получаемом при биопсии тканей, по их физическим свойствам, например плотности и скорости седиментации, технически весьма трудно. Ограничения в отделении стволовых клеток и клеток-предшественников от клеток других типов преодолеваются путем применения моноклональных антител, специфично связывающихся с белками клеточной поверхности, например белками кластера дифференцировки (CD-белками). В настоящее время для отбора (как положительного, так и отрицательного) клеток определенных типов из гетерогенных клеточных популяций применяются методы иммуноадсорбции и проточной цитометрии с использованием указанных моноклональных антител на магнитных частицах или меченых флуоресцентными агентами.

Для положительного отбора желаемых клеток применяют методы с использованием меченых антител, специфично связывающихся с этими клетками. Ненужные клетки остаются не мечеными, и их удаляют. Когда такой отбор проведен, от выявленных клеток надо "отсоединить" антитела с помощью под-

ходящего растворителя. В связи с этим стволовые клетки, предназначенные для трансплантации, подвергаются воздействию сред, которые могут негативно влиять на клеточную дифференцировку и в результате на эффективность трансплантата.

В последнее время трансплантаты стволовых клеток, используемые в исследованиях на животных и людях с целью улучшения нервной ткани и сосудов, в большинстве случаев получали путем положительного отбора клеток, несущих на своей поверхности специфические белки, с последующим культивированием отобранных клеток для увеличения их количества. Однако нет надежных доказательств того, что прошедшие положительный отбор клетки на деле обладают способностью дифференцироваться в функциональные нейроны и что они выделяют трофические факторы, необходимые для полного восстановления нервной системы.

Результаты интракраниальной или интрацеребральной трансплантации стволовых клеток, полученных путем положительного отбора, весьма различны, и положительные их эффекты ограничены. Причины такой ненадежности главным образом в том, что остается неизвестным, действительно ли в получаемом трансплантате присутствуют нужные стволовые клетки, способные оказать благотворное действие, или же нужные стволовые клетки теряют свой терапевтический потенциал в процессе предшествующей трансплантации обработки и культивирования, которые занимают, как правило, более 72 ч после биопсии костного мозга.

Для отрицательного отбора используются меченые антитела, специфично связывающиеся с ненужными для предстоящей трансплантации клетками в составе материала, полученного при биопсии. Нужные клетки остаются не мечеными, и их собирают.

В работе Moviglia G.A. et al. (Cytotherapy 8: 196-201, 2006) предлагается комбинация антител против CD3, CD4, CD19, CD38, CD66b и гликофорина-A для избирательного обогащения мезенхимальных стволовых клеток, а также комбинация антител против CD14, CD16, CD19, CD56 и гликофорина-A для отбора CD3+-клеток методом розеткообразования для экспериментов *in vitro*.

В заявке на патент США № 2002058289 описывается обработка суспензий клеток, происходящих из костного мозга, антителами, специфичными в отношении CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11b, CD15, CD16, CD19, CD20, CD21, CD22, CD24, CD33, CD38, CD56, CD66b и гликофорина-A для избирательного обогащения материала, получаемого при биопсии костного мозга, мезенхимальными клетками-предшественниками.

В патентной публикации WO02089726 описывается способ получения гомогенных препаратов гемопозитических стволовых клеток с использованием сочетания проточной элютриации и мечения ненужных клеток антителами на магнитных частицах. В этом способе предполагается культивирование получаемых обогащенных клеточных популяций и использование красителей, связывающихся с клеточной мембраной, для подтверждения типа клеток; из-за этого способ нельзя использовать для терапевтических применений.

В патенте США № 5087570 описывается способ получения композиции гемопозитических клеток путем комбинирования положительного и отрицательного отбора. Этот способ базируется на использовании антител к антигену Sca-1, который свойствен клоногенным клеткам - предшественникам тимоцитов и Т-клеток костного мозга у мышей. Но для выделения человеческих гемопозитических клеток антитела против Sca-1 бесполезны.

В патенте США № 5137809 описывается способ и набор для идентификации и анализа ростков дифференцировки и стадий созревания гемопозитических клеток. В этом способе используются сперва моноклональные антитела (CD45), меченные флюорохромом, которые связываются со всеми лейкоцитами в образце, а затем вторые моноклональные антитела (CD15, CD16, CD10, CD34, CD20, CD19, CD14, CD3, CD11b), меченные вторым флюорохромом, которые связываются с субпопуляциями лейкоцитов. Отбор клеток ведется путем проточной цитометрии.

В исследованиях аутологичной трансплантации у животных и человека использовались стволовые клетки, полученные путем отрицательного отбора, при котором удаляли клетки типов, участвующих во врожденном и приобретенном иммунитете (макрофаги, лимфоциты, гранулоциты и др.) и клетки эритроидного ряда (эритробласты, эритроциты). Как показали исследования, в которых использовались такие трансплантаты стволовых клеток, благотворный эффект их все еще ограничен, что препятствует дальнейшему клиническому применению.

Используя животные модели, а именно мышей с экспериментально вызванным повреждением спинного мозга, авторы данного изобретения подтвердили, что трансплантаты стволовых клеток, полученные путем отрицательного отбора для удаления клеток иммунной системы и эритроидного ряда, при интракраниальной трансплантации обладают ограниченной эффективностью. Терапевтическая эффективность этих трансплантатов стволовых клеток невысока из-за присутствия в них таких типов клеток или компонентов, которые обладают провоспалительной способностью.

По указанным выше причинам существует неудовлетворенная на сегодняшний день потребность в трансплантатах стволовых клеток, не имеющих провоспалительной способности при аллогенной или аутологичной трансплантации, что в итоге повысило бы эффективность терапии путем трансплантации стволовых клеток.

Раскрытие изобретения

Указанные выше задачи решаются данным изобретением, предлагающим способ получения трансплантатов стволовых клеток, например, из таких тканевых образцов, как материал, получаемый при биопсии, с пониженной воспалительной активностью. Этот способ включает этап суспендирования стволовых клеток в плазме крови, из которой удалены провоспалительные белки, например фибриноген и С-реактивный белок.

В одном из более предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемый способ включает дополнительный этап удаления провоспалительных клеток из трансплантата стволовых клеток. Стволовые клетки получают предпочтительно из костного мозга, периферической крови и/или пуповинной крови

В другом своем воплощении данное изобретение относится к композиции, содержащей стволовые клетки, для использования в качестве трансплантата с пониженной воспалительной активностью, из которой удалены провоспалительные белки. В одном из более предпочтительных воплощений данное изобретение относится к композиции, содержащей стволовые клетки, для использования в качестве трансплантата, из которого также удалены клетки, обладающие провоспалительной способностью. Композиции, содержащие стволовые клетки, по данному изобретению пригодны для регенерации нервной ткани и сосудов и для восстановления кровотока.

Данное изобретение относится также к способу для восстановления или улучшения нервной ткани, сосудов и кровеносной ткани у индивида путем введения ему трансплантата, содержащего композицию со стволовыми клетками по данному изобретению. Применение этого способа предполагает аутологичную либо аллогенную трансплантацию стволовых клеток.

Данным изобретением также предлагаются способы и композиции для повышения эффективности терапии, включающей трансплантацию стволовых клеток, путем снижения воспалительной активности трансплантата, содержащего композицию со стволовыми клетками по данному изобретению. Говоря конкретнее, данным изобретением предлагается способ получения трансплантата стволовых клеток с пониженной воспалительной активностью, включающий этап суспендирования композиции, содержащей стволовые клетки, в плазме крови, лишенной фибриногена, и/или в плазме крови, лишенной фибриногена и С-реактивного белка.

Осуществление изобретения

Используя животную модель повреждения спинного мозга, авторы данного изобретения обнаружили, что определенные белки, присутствующие в плазме костного мозга, отрицательно влияют на эффективность стволовых клеток, получаемых из костного мозга, при использовании их в качестве трансплантата, в частности при аутологичной интратекальной трансплантации у животных.

Это отрицательное влияние, по-видимому, обусловлено присутствием в плазме костного мозга белков острой фазы воспаления - фибриногена и С-реактивного белка. Удаление этих двух белков путем фильтрации с последующим (при необходимости) удалением клеток, обладающих провоспалительной способностью, приводит к значительному повышению эффективности получаемого трансплантата стволовых клеток по сравнению с эффективностью трансплантата стволовых клеток, при получении которого удаляли только клетки с провоспалительной способностью.

На основании этих результатов был сделан вывод, что использование трансплантатов стволовых клеток, из которых удалены провоспалительные клетки (например, макрофаги, дендритные клетки, лимфоциты и гранулоциты) и белки острой фазы воспаления (например, фибриноген и С-реактивный белок), превосходят по эффективности трансплантации использование известных в данной области техники трансплантатов стволовых клеток.

В одном из своих предпочтительных воплощений данное изобретение относится к способу повышения эффективности трансплантатов стволовых клеток, в котором из трансплантата стволовых клеток удаляют фибриноген и С-реактивный белок. При необходимости из трансплантата удаляют также провоспалительные клетки.

Термин "повышенная эффективность трансплантата" относится к способности трансплантата, в частности трансплантата стволовых клеток, восстанавливать поврежденную ткань, в частности нервную ткань.

В настоящем документе термин "трансплантат стволовых клеток" относится к композиции, содержащей стволовые клетки и пригодной для введения индивиду путем трансплантации.

Трансплантат стволовых клеток по данному изобретению предпочтительно получают из материала, извлекаемого при биопсии тканей, например из периферической крови, пуповинной крови или костного мозга. Забор костного мозга или периферической крови для использования в терапии, включающей аутологичную или аллогенную трансплантацию стволовых клеток, является обычной практикой, и способы забора биоптатов костного мозга или периферической крови хорошо известны в данной области техники.

Термин "интратекальный" в настоящем документе используется как определение к объектам, вводимым в пространство под паутинной оболочкой головного или спинного мозга или присутствующим в нем, или к действиям, совершаемым в этом пространстве.

Термин "провоспалительная активность/способность" означает способность клеток или иных аген-

тов вызывать процесс воспаления *in vivo*, что характеризуется накоплением провоспалительных цитокинов. Возможности определения провоспалительной способности какого-либо агента хорошо известны специалистам в данной области техники.

В настоящем документе термин "пониженная воспалительная активность" подразумевает, что воспалительная активность данной композиции сравнивается с таковой другой композиции, взятой в качестве референсной. В контексте одного из предпочтительных воплощений данного изобретения пригодной референсной композицией по отношению к композиции, содержащей стволовые клетки в плазме, из которой удалены фибриноген и/или С-реактивный белок, будет композиция, содержащая стволовые клетки, суспендированные в нормальной плазме или в плазме, из которой не удалены фибриноген и/или С-реактивный белок.

Термин "плазма" в настоящем документе относится к жидкому компоненту крови желтоватого цвета, в котором в норме находятся во взвешенном состоянии клетки крови. Плазма составляет до около 55% от суммарного объема крови. Плазма является внутрисосудистой жидкой частью внеклеточной жидкости тела. В состав плазмы входит в основном вода (до 95% объема), в которой содержатся растворенные белки (6-8%) (например, сывороточный альбумин, глобулины и фибриноген), глюкоза, факторы свертывания крови, электролиты (Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , HCO_3^- , Cl^- , etc.), гормоны и диоксид углерода (плазма служит основной средой для транспорта экскретируемых продуктов). Сыворотка - это плазма без факторов свертывания крови. В настоящем документе термины "сыворотка" и "плазма" употребляются взаимозаменяемо, то есть если что-либо сказано о сыворотке, то это относится также к плазме и наоборот.

Воспалительную активность композиции можно определить обычными аналитическими методами, доступными специалистам в данной области техники, например иммунологическими и гистохимическими методами. Также воспалительную активность можно оценить количественно с помощью иммунологических методов в образцах, взятых в месте трансплантации; при этом определяют присутствие таких маркеров воспаления, как цитокины интерлейкин-1 и гамма-интерферон.

В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемая композиция обладает воспалительной активностью, меньшей, чем воспалительная активность композиции, содержащей такие же клетки в плазме или сыворотке, но не лишенной фибриногена и/или С-реактивного белка. В данном контексте "меньше" означает по меньшей мере на 10% меньше, например на 20, 30 или 50% меньше. Предпочтительно воспалительная активность композиции по данному изобретению меньше таковой референсной композиции не менее чем на 40%, например на 30, 20 или 10%, или менее. Наиболее предпочтительно, чтобы воспалительная активность композиции по данному изобретению была близка к нулю или не определялась.

Таким образом, данное изобретение относится также к способу уменьшения воспалительной активности трансплантата стволовых клеток, включающему этап удаления фибриногена и С-реактивного белка из этого трансплантата. Композицию, содержащую стволовые клетки, для использования в качестве трансплантата можно также получить путем ресуспендирования стволовых клеток в сыворотке или плазме, из которых удалены фибриноген и/или С-реактивный белок.

Удаление фибриногена и/или С-реактивного белка можно успешно осуществить путем фильтрации. Таким образом, данное изобретение относится к указанному выше способу, в котором фибриноген и С-реактивный белок удаляют путем фильтрации. В другом воплощении данного изобретения фибриноген и С-реактивный белок удаляют путем центрифугирования в градиенте плотности. В еще одном воплощении данного изобретения фибриноген и С-реактивный белок удаляют путем хроматографии.

Способ по данному изобретению особенно полезен, когда трансплантат стволовых клеток не содержит провоспалительных клеток. Таким образом, данное изобретение относится также к указанному выше способу, включающему дополнительный этап удаления клеток, обладающих провоспалительной активностью, например макрофагов, дендритных клеток, лимфоцитов и гранулоцитов.

Указанные клетки можно удалять путем отрицательного отбора или любым другим методом, известным в данной области техники. Различные этапы способа по данному изобретению можно проводить в любом порядке.

Отрицательный отбор клеток может включать этап контактирования трансплантата стволовых клеток, содержащего множество клеток различных ростков дифференцировки, с антителной композицией, включающей антитела, специфично связывающиеся с антигенами CD235a (гликофорином-А), CD2 и/или CD3, CD14 и/или CD16 и CD19 и/или CD20, для избирательного удаления соответствующих клеток-мишеней - эритроцитов, лимфоцитов, макрофагов, дендритных клеток и гранулоцитов. Указанная антителная композиция включает суспензионную среду, в которой находятся антитела - в основном это забуференный солевой раствор для каждого из антител.

Антитела в составе указанной антителной композиции могут быть помечены магнитным агентом, что обеспечивает избирательное мечение клеток-мишеней, присутствующих в трансплантате стволовых клеток, позволяющее удалить эти клетки, воздействуя на образец магнитным полем.

В настоящем документе предлагается способ избирательного удаления из трансплантата стволовых клеток, полученного из человеческого организма (предпочтительно, но не ограничиваясь указанным здесь, из костного мозга человека) клеток определенных ростков дифференцировки, идентифицируемых

путем распознавания соответствующими антителами специфических эпитопов, предпочтительно (не ограничиваясь перечисленным здесь) эритроцитов, лимфоцитов, макрофагов, дендритных клеток и гранулоцитов.

В одном из более предпочтительных воплощений данного изобретения трансплантат стволовых клеток обрабатывают антительной композицией, содержащей антитела, способные связываться с антигенами CD3, CD14, CD19 и CD235a. Эти антитела могут быть помечены магнитным агентом, что обеспечивает избирательное мечение клеток-мишеней, присутствующих в трансплантате стволовых клеток, позволяющее удалить эти клетки, воздействуя на образец магнитным полем.

В одном из предпочтительных воплощений способа по данному изобретению нежелательные клеточные популяции удаляют из всего объема трансплантата стволовых клеток с помощью специфичных магнитно меченных антител. В одном из еще более предпочтительных воплощений данного изобретения эти антитела включают (не ограничиваясь перечисленным здесь) антитела, специфичные к CD2 и/или CD3, - для удаления Т-лимфоцитов; антитела, специфичные к CD19 и/или CD20, - для удаления В-лимфоцитов; антитела, специфичные к CD14 и/или CD16, - для удаления гранулоцитов, моноцитов, дендритных клеток и макрофагов. В другом воплощении данного изобретения используются антитела, специфичные к CD235a и/или гликофору-А, - для удаления эритроцитов.

Данное изобретение также относится к трансплантату стволовых клеток, получаемому описанным выше способом. Этим способом получают трансплантаты стволовых клеток, не содержащие фибриногена и С-реактивного белка. Данное изобретение, в частности, относится к описанному выше трансплантату стволовых клеток, из которого удалены клетки с провоспалительной активностью.

В настоящем документе выражения "удаление", "лишенный", "не содержащий", "в котором нет/отсутствуют" относятся к снижению количества белка или количества клеток в трансплантате стволовых клеток по данному изобретению по меньшей мере на 90% или 99% по сравнению с количеством белка или клеток в биоптате ткани, например костного мозга. В плазме крови концентрация фибриногена составляет от 1,5 до 4 г/л. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемый трансплантат содержит менее 0,4 г/л фибриногена. В одном из более предпочтительных воплощений данного изобретения препарат плазмы, пригодный для использования по данному изобретению, содержит менее 40 мг/л фибриногена, например менее 4 мг/л. В одном из еще более предпочтительных воплощений данного изобретения препарат, содержащий стволовые клетки, для использования по данному изобретению содержит менее 0,4 г/л фибриногена, например менее 40 мг/л или менее 4 мг/л.

В плазме крови концентрация С-реактивного белка у разных индивидов может быть различной, варьируя, как правило, в пределах от 10 до 100 мг/л. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемые трансплантаты содержат менее 10 мг/л С-реактивного белка. В одном из более предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемые трансплантаты содержат менее 1 мг/л С-реактивного белка.

В плазме крови содержание лимфоцитов составляет от 1000 до 4000 клеток в 1 микролитре. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемые трансплантаты содержат менее 400 лимфоцитов в 1 микролитре. В одном из более предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемые трансплантаты содержат менее 40 лимфоцитов в 1 микролитре. В плазме крови содержание гранулоцитов составляет от 2500 до 7500 клеток в 1 микролитре. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемые трансплантаты содержат менее 750 гранулоцитов в 1 микролитре. В одном из более предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемые трансплантаты содержат менее 75 гранулоцитов в 1 микролитре. В плазме крови содержание дендритных клеток и макрофагов составляет от 10 до 800 клеток в 1 микролитре. В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемые трансплантаты содержат в итоге менее 80 дендритных клеток или макрофагов в 1 микролитре. В одном из более предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемые трансплантаты содержат менее 8 дендритных клеток или макрофагов в 1 микролитре.

В одном из своих предпочтительных воплощений данное изобретение относится к описанному выше способу, которым получают трансплантат стволовых клеток, пригодный для регенерации кроветворной ткани. Такой трансплантат стволовых клеток, в частности, пригоден для восстановления кроветворения. Таким образом, данным изобретением также предлагается способ восстановления кроветворения у индивида с помощью описанного в настоящем документе трансплантата стволовых клеток.

В другом своем предпочтительном воплощении данное изобретение относится к описанному выше способу, которым получают трансплантат стволовых клеток, пригодный для регенерации ткани сосудов. Такой трансплантат стволовых клеток, в частности, пригоден для восстановления васкуляризации. Таким образом, данным изобретением также предлагается способ восстановления васкуляризации у индивида с помощью описанного в настоящем документе трансплантата стволовых клеток.

В одном из особенно предпочтительных своих воплощений данное изобретение относится к описанному выше способу, которым получают трансплантат, пригодный для регенерации нервной ткани. Такой трансплантат стволовых клеток, в частности, пригоден для восстановления нейрогенеза. Таким образом, данным изобретением также предлагается способ восстановления нейрогенеза у индивида с

помощью описанного в настоящем документе трансплантата стволовых клеток.

Трансплантация стволовых клеток по данному изобретению может быть аутологичной (реципиенту вводят его собственные клетки) или аллогенной (реципиенту вводят клетки донора). В одном из предпочтительных воплощений данного изобретения предлагаемый клеточный трансплантат является аутологичным. В другом воплощении данного изобретения предлагаемый трансплантат стволовых клеток является аллогенным.

Данное изобретение в широком смысле охватывает процесс обогащения и выделения человеческих стволовых клеток и клеток-предшественников для терапевтического использования по различным показаниям, предпочтительно включающий создание композиции, пригодной для введения путем инъекции и содержащей клетки, происходящие из крови, пуповинной крови или костного мозга. Специалисту в данной области техники известны пределы возможностей таких композиций или способов в отношении объема продукта, количества и качества содержащихся в нем клеток.

Примеры

Пример 1. Получение трансплантата человеческих стволовых клеток.

Костный мозг брали у здоровых добровольцев путем аспирации, используя шприц с иглой для аспирации костного мозга с пятью отверстиями; при этом делали два прокола кости и после каждого заполнения шприца иглу перемещали. Всего брали 50 мл костномозговой ткани. Полученный материал центрифугировали, используя автоматический сепаратор клеток Sepax II (Biosafe) при низкой скорости и, соответственно, малой центробежной силе, следуя рекомендациям производителя. В результате получали три фракции. Первая - это плазма, содержащая все растворимые белки, присутствующие в биопсийном материале. Вторая - фракция эритроцитов и тромбоцитов. Третья фракция (BC-слой) содержала ядерные клетки костного мозга, включая гемопоэтические и мезенхимальные стволовые клетки; далее в настоящем документе эта фракция называется композиция стволовых клеток А.

Из фракции плазмы удаляли фибриноген и С-реактивный белок путем фильтрации, используя сорбционную колонку Therasorb (Miltenyi), действующую как специфичный к фибриногену фильтр. Полученную в результате плазму, не содержащую фибриногена и С-реактивного белка, затем использовали для ресуспендирования ядерных клеток костного мозга третьей фракции (композиции стволовых клеток А) в мешках для получения клеток производства компании Miltenyi. Таким образом получали композицию стволовых клеток, которая в настоящем документе называется композицией стволовых клеток В.

На композицию стволовых клеток В воздействовали магнитно мечеными антителами против CD3, CD14, CD19 и CD235a (Miltenyi). Затем мешок с клетками подсоединяли к магнитному сепаратору клеток (CliniMACS plus System, Miltenyi), чтобы получить композицию стволовых клеток, не содержащую эритроцитов, тромбоцитов, лимфоцитов, гранулоцитов, дендритных клеток, макрофагов, фибриногена и С-реактивного белка. Эта композиция стволовых клеток в настоящем документе называется композицией стволовых клеток С.

Композиция стволовых клеток D состоял из композиции стволовых клеток А, ресуспендированного во фракции плазмы, полученной от того же индивида, не подвергавшейся удалению фибриногена и С-реактивного белка. Эта композиция служила в качестве референсной композиции.

Пример 2. Эксперимент по аллогенной трансплантации.

Чтобы сравнить эффективность различных композиций стволовых клеток мы использовали животную модель - крыс с экспериментальным повреждением спинного мозга. Для этой модели брали крыс с дефицитом Т-лимфоцитов. Травматическое компрессионное повреждение спинного мозга вызывали путем раздувания баллонного катетера. Через трое суток животным рядом с этим повреждением спинного мозга вводили интратекально ту или иную композицию стволовых клеток. За подопытными особями наблюдали в течение 35 суток. В этот период у них измеряли массу тела и проводили оценку неврологической патологии в тестах с ходьбой по вращающемуся стержню ("RotaRod", Panlab) и по дорожке в системе CatWalk. По истечении 35-дневного периода животных умерщвляли и проводили гистологическое исследование области повреждения спинного мозга.

На начальной фазе эксперимента крысы получали трансплантаты стволовых клеток, содержавшие композиции стволовых клеток А, В, С и D; контролями служили животные, получавшие нормальную плазму, и интактные особи. Оценивали способность указанных четырех композиций стволовых клеток обеспечить купирование неврологических нарушений после травматического повреждения спинного мозга.

По истечении указанного 35-дневного периода было обнаружено, что степень улучшения неврологических показателей у крыс с экспериментальным повреждением спинного мозга в результате трансплантации стволовых клеток по данному изобретению (композиции стволовых клеток В и С) была гораздо выше, чем у интактных животных и у особей, получавших нормальную плазму или у получавших композиции стволовых клеток А и D. Также у крыс, получавших композицию стволовых клеток С, неврологические показатели улучшились значительно больше, чем у особей, получавших композицию стволовых клеток В.

Таблица 1

Способ оценки	Препарат стволовых клеток(*)				Отрицательный контроль (плазма)	Отрицательный контроль (крысы с повреждением спинного мозга)	Положительный контроль (интактные особи)
	Ф	В	С	D			
По походке (система Catwalk)	+/-	+	++	+/-	-	-	+++
По координации (тест Rotarod)	+/-	+	++	+/-	-	-	+++
Масса тела	+/-	+	++	+/-	-	-	+++
Гистологические данные	+/-	+	++	+/-	-	-	+++

Выполнение теста или состояние у животных с повреждением спинного мозга, служивших отрицательным контролем, брали за 0% (нулевой уровень); у интактных особей - за 100%.

(-) - такое же или худшее выполнение/состояние (от -15 до 5% по сравнению с нулевым уровнем)

(+/-) - почти такое же или несколько лучшее выполнение/состояние (от -15 до 10% по сравнению с нулевым уровнем)

(+) - небольшое улучшение выполнения/состояния (от 5 до 10% по сравнению с нулевым уровнем)

(++) - значительное улучшение выполнения/состояния (от 10 до 40% по сравнению с нулевым уровнем)

(+++)- нормальное выполнение/состояние, как у интактных крыс (от 90 до 100% по сравнению с нулевым уровнем)

Пример 3. Получение трансплантата крысиных стволовых клеток.

Композиции стволовых клеток E, F, G и H получали из материала, взятого у здоровых крыс линии Wistar способом, аналогичным описанному в примере 1 для человеческих клеток. Образец E содержал ядерные клетки костного мозга без плазмы; образец F представлял собой ядерные клетки костного мозга в плазме без фибриногена и С-реактивного белка; образец G - это композиция F, из которого дополнительно удалены эритроциты, тромбоциты, лимфоциты, гранулоциты, дендритные клетки и макрофаги. Образец H - контрольный, соответствующий композиции D человеческих клеток; в нем клетки образца E ресуспендированы в нормальной крысиной плазме, содержащей фибриноген и С-реактивный белок.

Пример 4. Эксперимент по аутологичной трансплантации.

В этом примере мы использовали такую же начальную фазу эксперимента, как описано в примере 2, чтобы сравнить эффективность различных полученных в примере 3 композиций, содержащих крысиные стволовые клетки. В качестве животной модели использовали здоровых иммунологически нормальных крыс линии Wistar. У них вызывали травматическое компрессионное повреждение спинного мозга путем раздувания баллонного катетера. Через трое суток крысам рядом с этим повреждением спинного мозга вводили интратекально ту или иную композицию стволовых клеток. За подопытными особями наблюдали в течение 35 суток. В этот период у них измеряли массу тела и проводили оценку неврологической патологии в тестах с ходьбой по вращающемуся стержню ("RotaRod", Panlab) и по дорожке в системе CatWalk. По истечении 35-дневного периода животных умерщвляли и проводили гистологическое исследование области повреждения спинного мозга.

На начальной фазе этого эксперимента крысы получали трансплантаты стволовых клеток, содержавшие композиции стволовых клеток E, F, G и H; контролями служили животные, получавшие нормальную плазму, и интактные особи. Оценивали способность указанных четырех композиций стволовых клеток обеспечить купирование неврологических нарушений после травматического повреждения спинного мозга.

По истечении указанного 35-дневного периода было обнаружено, что степень улучшения неврологических показателей у крыс с экспериментальным повреждением спинного мозга в результате трансплантации стволовых клеток по данному изобретению (композиции стволовых клеток F и G) была гораздо выше, чем у интактных животных или у особей, получавших нормальную плазму, или у получавших композиции стволовых клеток E и H. Также у крыс, получавших композицию стволовых клеток G, неврологические показатели улучшились значительно больше, чем у особей, получавших композицию стволовых клеток F.

Через трое суток после трансплантации брали интратекальную спинномозговую жидкость из места повреждения и исследовали ее на присутствие маркеров воспаления, например гамма-интерферона (γ -IFN), используя набор для твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с крысиным γ -IFN (Pierce Protein Biology Products). Было обнаружено, что у крыс, получавших композиции стволовых клеток E и H, уровень γ -IFN в спинномозговой жидкости был высоким. А у животных, получавших композиции стволовых клеток F и G, он был значительно ниже, чем у особей, получавших композицию стволовых клеток H, - на 30 и 10% соответственно.

Таблица 2

Способ оценки	Препарат стволовых клеток(*)				Отрицательный контроль (плазма)	Отрицательный контроль (крысы с повреждением спинного мозга)	Положительный контроль (интактные особи)
	Ф А	В В	С С	Д Д			
По походке (система Catwalk)	+/-	+	++	+/-	-	-	+++
По координации (тест Rotarod)	+/-	+	++	+/-	-	-	+++
Масса тела	+/-	+	++	+/-	-	-	+++
Гистологические данные	+/-	+	++	+/-	-	-	+++

Выполнение теста или состояние у животных с повреждением спинного мозга, служивших отрицательным контролем, брали за 0% (нулевой уровень); у интактных особей - за 100%.

(-) - такое же или худшее выполнение/состояние (от -15 до 5% по сравнению с нулевым уровнем)

(+/-) - почти такое же или несколько лучшее выполнение/состояние (от -15 до 10% по сравнению с нулевым уровнем)

(+) - небольшое улучшение выполнения/состояния (от 5 до 10% по сравнению с нулевым уровнем)

(++) - значительное улучшение выполнения/состояния (от 10 до 40% по сравнению с нулевым уровнем)

(+++) - нормальное выполнение/состояние, как у интактных крыс (от 90 до 100% по сравнению с нулевым уровнем)

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция гемопоэтических стволовых клеток с пониженной воспалительной активностью для трансплантации стволовых клеток, включающая ядродержащие клетки, включая гемопоэтические и мезенхимальные стволовые клетки и плазму или сыворотку, из которой удалены фибриноген и С-реактивный белок, причем указанные ядродержащие клетки и сыворотка или плазма получены от одного и того же субъекта.

2. Композиция по п.1, из которой дополнительно удалены провоспалительные клетки.

3. Композиция по п.1 или 2, где субъект является человеком.

4. Способ получения *in vitro* композиции гемопоэтических стволовых клеток с пониженной воспалительной активностью по п.1, включающий:

а) получение ядродержащих клеток, включающих гемопоэтические и мезенхимальные стволовые клетки, из образца ткани, взятого у субъекта, где ткань выбирают из группы, состоящей из костного мозга, периферической крови и пуповинной крови;

б) суспендирование указанных ядродержащих клеток в плазме или сыворотке, из которой удалены фибриноген и С-реактивный белок с получением

композиции гемопоэтических стволовых клеток с пониженной воспалительной активностью, где воспалительная активность данной композиции как минимум на 10% ниже чем воспалительная активность композиции, полученной суспендированием ядродержащих клеток в нормальной плазме, содержащей фибриноген и С-реактивный белок,

причем плазму или сыворотку и образец ткани, получают от одного и того же субъекта.

5. Способ по п.4, в котором субъект является человеком.

6. Способ по п.4 или 5, включающий дополнительный этап удаления провоспалительных клеток из композиции, содержащей ядродержащие клетки.

7. Способ по любому из пп.4-6, в котором плазму или сыворотку, не содержащую фибриноген и С-реактивный белок, получают путем фильтрации и/или хроматографии.

8. Применение композиции согласно любому из пунктов пп.1-3 в качестве лекарственного средства для регенерации нервной ткани.

9. Применение по п.8, в котором регенерация ткани направлена на лечение повреждения спинного мозга.

10. Применение по п.9, в котором лекарственное средство предназначено для терапии с аутологичной трансплантацией.

11. Применение композиции согласно любому из пп.1-3 в качестве лекарственного средства для регенерации ткани сосудов.

12. Применение композиции согласно любому из пп.1-3 в качестве лекарственного средства для регенерации гемопоэтической ткани.

