

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490909** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.08.27

(22) Дата подачи заявки
2022.10.21

(51) Int. Cl. *C12N 5/077* (2010.01)
A61K 35/32 (2015.01)
C12N 5/0735 (2010.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
C12N 5/0789 (2010.01)

(54) **КОНСТРУИРОВАНИЕ СТРАТИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

(31) **63/360,710**

(32) **2021.10.21**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/047381**

(87) **WO 2023/069683 2023.04.27**

(71) Заявитель:
ЭММАУС ЛАЙФ САЙЕНСИЗ, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Олива Вилана Хуан, Отгай Дзюн (US)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение в целом относится к получению и применению клеточных пластов. Получение может включать культивирование множества стволовых клеток на поверхности для культивирования клеток контейнера в культуральной среде, добавление в контейнер среды для дифференцировки и ингибитора Rho-киназы (ROCK), причем среду для дифференцировки и ингибитор ROCK добавляют с интервалом до 2 дней друг от друга, и открепление от поверхности для культивирования клеток клеточного пласта, образованного клетками, дифференцированными из стволовых клеток. В соответствии с альтернативным вариантом, применение ингибитора ROCK для снятия центробежного натяжения может быть заменено или дополнено удалением краев клеточного пласта.

A1

202490909

202490909

A1

КОНСТРУИРОВАНИЕ СТРАТИФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ПЛАСТОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно § 119(е) главы 35 Свода законов США на основании предварительной заявки на патент США с серийным номером 63/360,710, поданной 21 октября 2021 года, содержание которой полностью включено в настоящее описание посредством ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Сообщалось о работах, выполненных в отношении клеточных пластов. В европейском патенте № 2266500, например, обсуждается искусственная ткань или пласт, способные выдерживать операции по имплантации, и их получение из клеток, происходящих из частей организма, отличных от миокарда.

[0003] В европейском патенте № 1857126, как утверждается, предложен «способ получения культивируемого клеточного пласта по п. 1, который включает стадию культивирования по меньшей мере одного типа клеток, выбранных из группы, состоящей из: хондроцитов, хондропрогениторных клеток, клеток, происходящих из синовиальной оболочки, стволовых клеток, происходящих из синовиальной оболочки, остеобластов, мезенхимальных стволовых клеток, клеток, происходящих из жировой ткани, и стволовых клеток, происходящих из жировой ткани, на подложке для культуры клеток, имеющей поверхность подложки, покрытую термочувствительным полимером, имеющим верхнюю или нижнюю критическую температуру растворения в диапазоне от 0 °С до 80 °С в воде, и после этого включающий стадии: (1) доведения температуры культуральной среды до температуры, большей, чем верхняя критическая температура растворения, или меньшей, чем нижняя критическая температура растворения; (2) приведения культивируемого клеточного пласта в тесный контакт с носителем; и (3) открепления культивируемого клеточного пласта вместе с носителем». Параграф [0013].

[0004] Sato с соавт. в публикации *Regenerative Medicine* (2019) 4, заявляют, что: «Современные регенеративные способы лечения хрящевой ткани не являются полностью эффективными при лечении остеоартрита коленного сустава (ОАКС). Мы разработали хондроцитарные пласты для аутологичной трансплантации, протестировали их в доклинических исследованиях *in vitro* и *in vivo* и сообщили, что трансплантация хондроцитарных пластов способствовала восстановлению гиалинового хряща в моделях у крыс, кроликов и карликовых свиней. Тем не менее, об аутологичной трансплантации хондроцитарных пластов у людей еще не сообщалось. В этой публикации мы сообщаем о нашей комбинированной терапии, в которой за традиционным хирургическим лечением ОАКС следует аутологичная трансплантация хондроцитарного пласта для восстановления хряща». Реферат.

[0005] Thorp с соавт. в публикации *Cells* 2021, 10, 643, заявляют следующее: «Дефекты суставного хряща представляют собой провоцирующий фактор для будущего остеоартрита (ОА) и прогрессирования дегенеративного заболевания суставов. Несмотря на многочисленные клинически доступные способы лечения, которые успешно позволяют обеспечить кратковременное уменьшение боли и восстановление ограниченной подвижности, современные способы лечения не обеспечивают надежную регенерацию нативного гиалинового хряща или остановку дегенерации хряща в местах этих дефектов. Новые способы терапии, направленные на устранение ограничений современных клинических способов регенерации хряща, все больше фокусируются на аллогенных клетках, в частности, мезенхимальных стволовых клетках (МСК), в качестве мощных, объединенных и доступных источников клеток, которые демонстрируют способность к детерминации хондрогенной линии дифференцировки. Инновационные подходы к тканевой инженерии с применением аллогенных МСК направлены на разработку трехмерных (3D) хондрогенно дифференцированных конструкций для прямой и немедленной замены гиалинового хряща, улучшения интеграции с местными тканями участка и оптимизации исходов лечения. Среди новых технологий тканевой инженерии достижения в области тканевой инженерии клеточных пластов предлагают многообещающие возможности для достижения как гиалиноподобной дифференцировки *in vitro*, так и эффективной трансплантации, основанных на контролируемых трехмерных клеточных взаимодействиях и сохраненных молекулах клеточной адгезии». Реферат.

[0006] Несмотря на различные сообщения, в данной области техники все еще существует потребность в новых инженерных технологиях, связанных с получением клеточных пластов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В аспекте способа в настоящем изобретении предложен способ получения клеточного пласта с применением стромальных клеток жировой ткани, стволовых клеток костного мозга или стволовых клеток пуповины. Способ в одном из вариантов реализации включает следующие стадии: а) приведение поверхности для культивирования клеток в контакт с внеклеточным матриксом, чтобы обеспечить клеткам прикрепление к поверхности; б) посев клеток на поверхность для культивирования клеток, находящуюся в контакте с внеклеточным матриксом; в) добавление к клеткам химически определенной культуральной среды; г) культивирование клеток при заданной температуре в стандартной атмосфере; д) мониторинг роста клеточного пласта из клеток до получения заданного контрольного значения; е) конструирование клеточного пласта с применением механической обработки или обработки клеточного пласта, в результате чего получают клеточный пласт.

[0008] Согласно другому варианту реализации настоящего изобретения предложен способ получения клеточного пласта, включающий: культивирование множества стволовых клеток на поверхности для культивирования клеток контейнера в культуральной среде, добавление в контейнер среды для дифференцировки и ингибитора Rho-киназы (ROCK), причем среду для дифференцировки и ингибитор ROCK добавляют с интервалом до 2 дней друг от друга, и открепление от поверхности для культивирования клеток клеточного пласта, образованного клетками, дифференцированными из стволовых клеток.

[0009] В еще одном варианте реализации предложен способ получения клеточного пласта, включающий: культивирование множества стволовых клеток на поверхности для культивирования клеток контейнера в культуральной среде, дифференцировку стволовых клеток в среде для дифференцировки, удаление клеток, которые достигают до вступления в контакт со стенкой контейнера, и открепление от поверхности для культивирования

клеток клеточного пласта, образованного клетками, дифференцированными из стволовых клеток.

[0010] В некоторых вариантах реализации стволовые клетки представляют собой стромальные клетки жировой ткани, стволовые клетки костного мозга, мезенхимальные стволовые клетки или стволовые клетки пуповины. В некоторых вариантах реализации клетки, дифференцированные из стволовых клеток, представляют собой хондроциты или остеобласты.

[0011] В некоторых вариантах реализации среду для дифференцировки и ингибитор ROCK добавляют с интервалом до 2 дней друг от друга. В некоторых вариантах реализации ингибитор ROCK добавляют в течение 24 часов после добавления среды для дифференцировки. В некоторых вариантах реализации указанный ингибитор ROCK выбран из группы, состоящей из Y-27632, Y-33075 и H-1152. В некоторых вариантах реализации ингибитор ROCK добавляют до достижения концентрации от 1 мкМ до 20 мкМ.

[0012] В еще одном варианте реализации предложен способ восстановления хряща у пациента, у которого имеется поврежденный или нездоровый хрящ, включающий имплантацию части клеточного пласта, полученного способом, описанным в настоящей заявке, в то место в организме пациента, где находится поврежденный или нездоровый хрящ.

[0013] В еще одном варианте реализации предложен способ лечения остеоартрита или остеохондрального дефекта у пациента, у которого имеется остеоартрит, включающий имплантацию части клеточного пласта, полученного способом, описанным в настоящей заявке, в то место в организме пациента, где находится поврежденная или нездоровая ткань, связанная с остеоартритом, или где находится остеохондральный дефект.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0014] На **ФИГ. 1** показаны различные протоколы для конструирования клеточных пластов. Методика также может быть применена для конструирования

недифференцированных многослойных клеточных пластов и многослойных клеточных пластов, содержащих остеобласты.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0015] Термин «клеточный пласт» означает пластоподобные кластеры клеток, которые были выращены до конфлюэнтности и которые могут быть откреплены от поверхности культуральной посуды как один пласт (монослой) или как многослойный клеточный пласт (от 2 слоев и более).

[0016] Термины «химически определенная культуральная среда» или «химически определенная среда» означают питательную среду, подходящую для культивирования *in vitro* клеток человека или животных, в которой известны все химические компоненты. Стандартные среды для культивирования клеток (не химически определенные) обычно состоят из базовой среды с добавлением сыворотки животных в качестве источника питательных веществ и других неопределенных факторов.

[0017] Термин «хондроцитарный клеточный пласт» означает клеточный пласт, содержащий хондроциты. Хондроциты являются единственными клетками, обнаруживаемыми в здоровом хряще. Они продуцируют и поддерживают хрящевой матрикс, который состоит в основном из коллагена и протеогликанов.

[0018] Термины «дифференцировка» или «дифференцировка клеток» означают процесс, в котором клетка изменяется от одного типа к другому, часто к более специализированному типу.

[0019] Термин «стромальные клетки жировой ткани» означает мультипотентные клетки-предшественники, обнаруживаемые в жировой ткани у взрослых.

[0020] Термин «стволовые клетки костного мозга» означает мультипотентные клетки-предшественники, обнаруживаемые в костном мозге у взрослых.

[0021] Термин «стволовые клетки пуповины» означает мультипотентные клетки-предшественники, обнаруживаемые в пуповине.

[0022] Термин «мезенхимальные стволовые клетки» означает мультипотентные стволовые клетки взрослого организма, которые присутствуют во множестве тканей, включая пуповину, костный мозг и жировую ткань. Мезенхимальные стволовые клетки могут самообновляться путем деления и могут дифференцироваться во множество тканей, включая кость, хрящ, мышечные и жировые клетки и соединительную ткань.

[0023] Термин «остеобластный клеточный пласт» означает клеточный пласт, содержащий остеобласты. Остеобласты представляют собой специализированные мезенхимальные клетки, которые синтезируют костный матрикс и координируют минерализацию скелета.

[0024] «Ингибитор ROCK» представляет собой ингибитор Rho-ассоциированной протеинкиназы, содержащей домен coiled-coil (ROCK). Неограничивающие примеры ингибиторов ROCK включают Y-27632 ((1*R*,4*r*)-4-((*R*)-1-аминоэтил)-*N*-(пиридин-4-ил)циклогексан-1-карбоксамид; CAS №: 129830-38-2), Y-33075 ((*R*)-4-(1-аминоэтил)-*N*-(1*H*-пирроло[2,3-*b*]пиридин-4-ил)бензамид; CAS №: 199433-58-4), H-1152 ((*S*)-4-метил-5-((2-метил-1,4-дiazепан-1-ил)сульфонил)изохинолин; CAS №: 451462-58-1) и белумосудил (2-[3-[4-(1*H*-индазол-5-иламино)хиназолин-2-ил]фенокси]-*N*-пропан-2-илацетамид; CAS №: 911417-87-3).

[0025] В некоторых вариантах реализации ингибитор ROCK, применяемый в настоящей заявке, выбран из Y-27632, Y-33075, H-1152 или белумосудила. В некоторых вариантах реализации ингибитор ROCK, применяемый в настоящей заявке, выбран из Y-27632, Y-33075 или H-1152. Ингибитор ROCK, применяемый в настоящей заявке, выбран из Y-27632 или Y-33075.

[0026] Термин «бессывороточные культуральные среды» означает среды, которые не содержат богатую питательными веществами и факторами роста сыворотку, полученную из крови животных. В бессывороточных средах применяют синтетические или очищенные ингредиенты для обеспечения питательных веществ и факторов роста, которые поддерживают рост и выживание клеток в культуре.

[0027] Термин «стволовые клетки» означает клетки с потенциалом развития во множество различных типов клеток в организме. Они служат в качестве системы восстановления для

организма. Существует два основных типа стволовых клеток: эмбриональные стволовые клетки и стволовые клетки взрослого организма. Стволовые клетки отличаются от других клеток в организме тремя способами: они могут делиться и обновлять сами себя в течение длительного времени; они не специализированы, поэтому они не могут выполнять специфические функции в организме; они имеют потенциал превращения в специализированные клетки, такие как мышечные клетки, клетки крови и клетки нейронов, в качестве неполного списка.

[0028] Термин «ксеносвободные культуральные среды» означает среды, которые не содержат какого-либо ингредиента, который либо представляет собой ткань или биологическую жидкость животного (включая человека), либо выделен или очищен из ткани или биологической жидкости животного. Они могут содержать рекомбинантные животные или не животные белки, в том числе белки, продуцируемые в линиях клеток животных или с применением ферментации.

[0029] Термин «ксеногенные соединения» означает соединения из тканей или клеток, принадлежащих индивидуумам другого биологического вида.

[0030] Химически определенные культуральные среды, применяемые в настоящем изобретении, в типичном случае включают один или более из следующих ингредиентов: вода; порошковая среда; буферные агенты; витамины; липиды; гормоны; белок-носитель/осмотический агент; полиамины; фактор прикрепления; антиоксидант; транспортные белки; факторы роста. В некоторых случаях химически определенные культуральные среды, применяемые в настоящем изобретении, включают один или более из следующих ингредиентов: вода; DMEM/F12 (порошковая среда); бикарбонат натрия или HEPES (буферные агенты); глутамакс (аминокислота); липидный концентрат (липиды); инсулин, гидрокортизон и прогестерон (гормоны); БСА (белок-носитель/осмотический агент); путресцин (полиамин); фетуин (фактор прикрепления); Asc-2-P (антиоксидант); холотрансферрин (транспортный белок); bFGF, EGF, TGF- β 1 (факторы роста). Неограничивающие примеры имеющихся в продаже культуральных сред включают: KT-016; StemFit для мезенхимальных стволовых клеток; набор для

хондрогенной дифференцировки MesenCult-ACF; и среду для дифференцировки OsteoMAX-XF.

[0031] В других случаях химически определенные культуральные среды, применяемые в настоящем изобретении, содержат следующие ингредиенты: воду; DMEM/F12; бикарбонат натрия или HEPES; глутамакс; липидный концентрат. В других случаях химически определенные культуральные среды, применяемые в настоящем изобретении, содержат следующие ингредиенты: инсулин и/или гидрокортизон и/или прогестерон; БСА; путресцин; фетуин; Asc-2-P; холотрансферрин; bFGF и/или EGF и/или TGF- β 1. В других случаях химически определенные культуральные среды, применяемые в настоящем изобретении, содержат следующие ингредиенты: воду; DMEM/F12; бикарбонат натрия или HEPES; глутамакс; липидный концентрат; инсулин и/или гидрокортизон и/или прогестерон; БСА; путресцин; фетуин; Asc-2-P; холотрансферрин; bFGF и/или EGF и/или TGF- β 1. В других случаях химически определенные культуральные среды, применяемые в настоящем изобретении, содержат: воду; DMEM/F12; бикарбонат натрия или HEPES; глутамакс; липидный концентрат; инсулин; гидрокортизон и прогестерон; БСА; путресцин; фетуин; Asc-2-P; холотрансферрин; bFGF, EGF и TGF- β 1.

Получение клеточных пластов

[0032] Клеточные пласты пригодны для регенерации тканей и других терапевтических и коммерческих применений. Распространенной проблемой при получении клеточного пласта является «центробежное натяжение» по краям чашки для культивирования клеток. Центробежное натяжение вызывает спонтанное открепление клеточных пластов от чашки для культивирования клеток, в частности, во время дифференцировки стволовых клеток в хондроциты. Фактически, из-за физического изменения клеточного пласта с приобретением физического свойства эластичности натяжение клеточного пласта у края чашки для культивирования клеток тянет клеточные пласты вверх и к краю.

[0033] В настоящей заявке раскрыто, что центробежное натяжение может быть устранено или предотвращено путем обрезания края клеточного пласта или добавления ингибитора ROCK во время роста или дифференцировки клеток.

[0034] На **ФИГ. 1** проиллюстрированы три различных способа конструирования клеточных пластов (например, хондроцитарных клеточных пластов). Во всех трех примерах («1», «2» и «3») для дифференцировки стволовых клеток (например, стромальных клеток жировой ткани) может быть применен набор для хондрогенной дифференцировки MesenCult™-ACF. В «1», обычном способе, клеточные пласты спонтанно открепляются от чашки для культивирования клеток из-за центробежного натяжения. Через несколько дней после начала дифференцировки клеточные пласты открепляются, и указанный клеточный пласт нельзя применять для лечения.

[0035] В способе «2» применяют способ согласно настоящему изобретению. Когда края клеточных пластов начинают открепляться, например, через 4–6 дней после начального состояния дифференцировки, края обрезают, чтобы открепить их от стенки чашки для культивирования клеток. Клеточный пласт оставляют в состоянии покоя почти в отсутствие культуральной среды, чтобы края клеточных пластов прикрепились к поверхности для культивирования клеток (в течение приблизительно 20 минут). Затем в чашку для культивирования клеток добавляют среду для дифференцировки (MesenCult™-ACF для хондрогенной дифференцировки) и конструируют хондроцитарный клеточный пласт в течение периода до 21 дня после первого дня дифференцировки.

[0036] В способе «3» среду для дифференцировки (например, набор для хондрогенной дифференцировки MesenCult™-ACF) дополняют ингибитором ROCK (например, Y-27632 при 10 мкМ или выше, Y-33075 или H-1152 при 1 мкМ или выше). Дифференцировка клеток наблюдается через 1 день после начальной обработки ингибитором ROCK Y-33075 и через 2 дня после начальной обработки ингибитором ROCK Y-27632 и H-1152. При применении данного способа клеточные пласты не открепляются и формируются за 2 недели, при этом время дифференцировки сокращается на 33%. Было обнаружено, что белумосудил не индуцирует дифференцировку стволовых клеток.

[0037] Таким образом, согласно одному варианту реализации настоящего изобретения предложен способ получения клеточного пласта. В одном из вариантов реализации способ включает культивирование множества клеток на поверхности для культивирования клеток контейнера в культуральной среде и удаление клеток, которые дорастают до вступления в

контакт со стенкой контейнера, таким образом, что образуется подходящий клеточный пласт.

[0038] В некоторых вариантах реализации клетки представляют собой стволовые клетки, которые могут быть дифференцированы и образовывать пласт дифференцированных клеток. Соответственно, в одном из вариантов реализации способ включает культивирование множества стволовых клеток на поверхности для культивирования клеток контейнера в культуральной среде, дифференцировку стволовых клеток в среде для дифференцировки, удаление клеток, которые дорастают до вступления в контакт со стенкой контейнера, и открепление от поверхности для культивирования клеток клеточного пласта, образованного клетками, дифференцированными из стволовых клеток.

[0039] Удаление клеток на крае или, в соответствии с альтернативным вариантом, обрезка краев могут быть выполнены с помощью механического инструмента, такого как нож. В некоторых вариантах реализации край обрезают, когда он соприкасается со стенкой чашки для культивирования клеток. В некоторых вариантах реализации край обрезают, когда он начал сворачиваться после соприкосновения со стенкой. В некоторых вариантах реализации край обрезают до его контакта со стенкой, например, на расстоянии 1 мм, 2 мм, 3 мм, 4 мм, 5 мм, 6 мм, 7 мм, 8 мм, 9 мм или 10 мм от стенки.

[0040] В другом варианте реализации для ингибирования центробежного натяжения применяют ингибитор ROCK. Приведенный в качестве примера способ включает культивирование множества клеток на поверхности для культивирования клеток контейнера в культуральной среде и добавление ингибитора ROCK в среду таким образом, что образуется подходящий клеточный пласт. Также такой способ может быть применен для дифференцировки стволовых клеток и образования пласта дифференцированных клеток. Соответственно, согласно одному варианту реализации способ включает культивирование множества стволовых клеток на поверхности для культивирования клеток контейнера в культуральной среде, добавление в контейнер среды для дифференцировки и ингибитора Rho-киназы (ROCK), причем среду для дифференцировки и ингибитор ROCK добавляют с интервалом до 2 дней друг от друга, и

открепление от поверхности для культивирования клеток клеточного пласта, образованного клетками, дифференцированными из стволовых клеток.

[0041] Эти два способа можно комбинировать. То есть, если край клеточного пласта достигает стенки контейнера, указанный край можно обрезать, при этом в среду также добавляют ингибитор ROCK.

[0042] В некоторых вариантах реализации ингибитор ROCK добавляют после (начального) добавления среды для дифференцировки. В некоторых вариантах реализации ингибитор ROCK добавляют перед начальной средой для дифференцировки. В некоторых вариантах реализации добавление обоих осуществляют с интервалом 2 дня, 24 часа, 18 часов, 12 часов, 8 часов, 6 часов, 4 часа, 2 часа или 1 час друг от друга. В конкретном варианте реализации ингибитор ROCK добавляют в течение 24 часов после добавления среды для дифференцировки.

[0043] В некоторых вариантах реализации указанный ингибитор ROCK выбран из группы, состоящей из Y-27632, Y-33075 и H-1152. В некоторых вариантах реализации указанный ингибитор ROCK выбран из группы, состоящей из Y-27632 и Y-33075.

[0044] В некоторых вариантах реализации конечная концентрация ингибитора ROCK в среде составляет от 1 мкМ до 500 мкМ. В некоторых вариантах реализации конечная концентрация составляет по меньшей мере 1 мкМ, 2 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 15 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ, 40 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 200 мкМ или 500 мкМ. В некоторых вариантах реализации конечная концентрация не превышает 5 мкМ, 10 мкМ, 15 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ, 40 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 200 мкМ или 500 мкМ.

[0045] В некоторых вариантах реализации конечная концентрация Y-27632 в среде составляет от 10 мкМ до 500 мкМ. В некоторых вариантах реализации конечная концентрация составляет по меньшей мере 10 мкМ, 15 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ, 40 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 200 мкМ или 500 мкМ. В некоторых вариантах реализации конечная концентрация не превышает 30 мкМ, 40 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 200 мкМ или 500 мкМ.

[0046] В некоторых вариантах реализации конечная концентрация Y-33075 в среде составляет от 1 мкМ до 500 мкМ. В некоторых вариантах реализации конечная

концентрация составляет по меньшей мере 1 мкМ, 2 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 15 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ, 40 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 200 мкМ или 500 мкМ. В некоторых вариантах реализации конечная концентрация не превышает 5 мкМ, 10 мкМ, 15 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ, 40 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 200 мкМ или 500 мкМ.

[0047] В некоторых вариантах реализации конечная концентрация Н-1152 в среде составляет от 1 мкМ до 500 мкМ. В некоторых вариантах реализации конечная концентрация составляет по меньшей мере 1 мкМ, 2 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ, 15 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ, 40 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 200 мкМ или 500 мкМ. В некоторых вариантах реализации конечная концентрация не превышает 5 мкМ, 10 мкМ, 15 мкМ, 20 мкМ, 30 мкМ, 40 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ, 200 мкМ или 500 мкМ.

[0048] В некоторых вариантах реализации определяют количество посеянных клеток, что полезно для определения продолжительности дифференцировки. В некоторых вариантах реализации клетки, посеянные в культуральную среду, будь то стволовые клетки или дифференцированные клетки, начинают с относительно высокой плотности. Например, начальная плотность клеток может находиться в диапазоне от 1000 клеток/см² до 15 000 клеток/см², или находиться в диапазоне от 2000 клеток/см² до 15 000 клеток/см², или находиться в диапазоне от 3000 клеток/см² до 15 000 клеток/см², или находиться в диапазоне от 5000 клеток/см² до 15 000 клеток/см², или находиться в диапазоне от 7000 клеток/см² до 15 000 клеток/см². В некоторых вариантах реализации начальный посев варьирует от 26 000 клеток/см² до 104 000 клеток/см². В некоторых вариантах реализации начальный посев варьирует от 10 500 клеток/см² до 550 000 клеток/см².

[0049] Способом согласно настоящему изобретению могут быть культивированы различные типы клеток. В одном варианте реализации изобретения клетки представляют собой стволовые клетки, такие как стромальные клетки жировой ткани, стволовые клетки костного мозга, мезенхимальные стволовые клетки и стволовые клетки пуповины. Во время выполнения способа стволовые клетки могут быть дифференцированы, например, в хондроциты или остеобласты.

[0050] В некоторых вариантах реализации среда для дифференцировки включает ингредиенты (например, среда для дифференцировки Osteomax-XF (Millipore-Sigma,

Берлингтон, штат Массачусетс)), которые способствуют дифференцировке стволовых клеток в остеобласты. В некоторых вариантах реализации среда для дифференцировки включает ингредиенты (например, набор для хондрогенной дифференцировки MesenCult™-ACF (Stem Cell, Ванкувер, Канада)), которые способствуют дифференцировке стволовых клеток в хондроциты.

[0051] В некоторых вариантах реализации полученный клеточный пласт представляет собой однослойный клеточный пласт. В некоторых вариантах реализации полученный клеточный пласт представляет собой многослойный клеточный пласт. В некоторых вариантах реализации клеточный пласт содержит от 2×10^6 до 20×10^6 клеток на клеточный пласт, или от 4×10^6 до 10×10^6 клеток на клеточный пласт, или от 5×10^6 до 7×10^6 клеток на клеточный пласт. В некоторых вариантах реализации количество клеток от посева до сбора клеточного пласта увеличивается по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз. В некоторых вариантах реализации количество клеток от посева до сбора клеточного пласта увеличивается не более чем в 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 раз.

[0052] Культивируемый недифференцированный клеточный пласт, полученный (например, от 4 до 10 дней) с применением способа согласно настоящему изобретению, обычно экспрессирует фенотип исходных стволовых клеток, такой как CD73, CD105, Oct3/4.

[0053] Культивируемый клеточный пласт, полученный с применением способа согласно настоящему изобретению, как правило, экспрессирует фенотип хондроидной ткани. В таких случаях культивируемый недифференцированный клеточный пласт обычно экспрессирует наследственные характеристики, такие как SOX9 и Oct3/4, и по мере дифференцировки клеточных пластов клетки экспрессируют специфические маркеры, которые являются характеристиками хондроцитарной ткани, такие как коллаген II (ColII), агрекан (ACAN), секретлируемый кислый белок с высоким содержанием цистеина (SPARC), которые относятся к образованию матрикса и являются характеристиками остеобластной ткани, такие как остеокальцин (BGLAP), и в случае всех клеточных пластов характеризуются отсутствием HLA-DR.

[0054] Культивируемый клеточный пласт, полученный с применением способа согласно настоящему изобретению, обычно сконструирован из одного типа клеток, стромальных клеток жировой ткани или клеток, происходящих из жировой ткани, но стратифицированные клеточные пласты могут быть сконструированы с клетками из следующего неограничивающего списка: хондроциты, хондропрогениторные клетки, стволовые клетки, происходящие из синовиальной оболочки, мезенхимальные стволовые клетки, клетки, происходящие из жировой ткани, и стволовые клетки, происходящие из жировой ткани.

[0055] Полученный клеточный пласт, как было отмечено, обладает превосходными биологическими свойствами. Например, клеточный пласт после открепления от поверхности для получения культуры клеток не сжимается более чем на 25% в любом продольном направлении. В некоторых испытаниях недифференцированный клеточный пласт сжимался на 25,6%, хондроцитарный клеточный пласт на 6% и остеобластный клеточный пласт на 8%. В некоторых вариантах реализации полученный клеточный пласт не сжимается более чем на 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 12%, 10%, 8% или 5% в любом продольном направлении.

[0056] Клеточные пласты, полученные с применением способа согласно настоящему изобретению, представляют собой многослойные клеточные пласты. Многослойные клеточные пласты обычно состоят из по меньшей мере двух слоев, при этом верхний предел не определяется. В настоящем изобретении были получены клеточные пласты с 11 слоями, среднее количество составляет 6 слоев.

[0057] В приведенном в качестве примера аспекте предложен способ получения однослойных клеточных пластов или многослойных клеточных пластов. Получают поверхность для культивирования клеток (например, чашку для культивирования), но поверхность уже предварительно обработана белками внеклеточного матрикса. Внеклеточный матрикс приводят в контакт с поверхностью для культивирования клеток, чтобы обеспечить клеткам прикрепление к поверхности. Поверхность для культивирования клеток не обрабатывают сывороткой, полимером или не модифицируют иным образом. Клетки высевают на поверхность для культивирования клеток с

определенной плотностью, как описано. К клеткам добавляют химически определенную культуральную среду, которую заменяют с заданными интервалами до тех пор, пока клетки не достигнут конfluence. С этого момента применяют химически определенную культуральную среду для дифференцировки клеток. Клетки культивируют при предварительно заданной температуре (например, 37 °C) в стандартной атмосфере (например, 5% CO₂). Рост клеточного пласта контролируют, как правило, с помощью значений коэффициента пропускания, измеряемых в динамике, и/или путем визуального осмотра с использованием инвертированного микроскопа.

[0058] Для недифференцированных многослойных клеточных пластов и для остеобластных многослойных клеточных пластов смена культуральной среды может быть единственным требованием. В некоторых случаях конструирование многослойных клеточных пластов включает обрезание края клеточных пластов или обработку клеточных пластов ингибитором ROCK (например, ингибитором Rock Y-27632, Y-33075), особенно когда клеточный пласт становится более «эластичным» и подвергается действию центробежных сил, тянущих клеточный пласт и приводящих к его откреплению (**ФИГ. 1**). Обрезание краев клеточных пластов или применение ингибитора ROCK ослабляет центробежные силы, которые тянут и открепляют клеточный пласт во время культивирования.

[0059] Ингибиторы ROCK 1 и 2 (например, Y-27632 и Y-33075) успешно применяли при конструировании хондроцитарных многослойных клеточных пластов. Дифференцировка клеток началась через 1 и 2 дня для Y-33075 и Y-27632 соответственно, и она является дозозависимой. Применение ингибитора ROCK 2, H-1152, индуцировало дифференцировку клеток, но он менее эффективен, чем Y-27632 и Y-33075. Напротив, белумосудил не индуцирует дифференцировку клеток и токсичен для клеток в зависимости от дозы, вызывая гибель клеток.

[0060] Сбор клеточных пластов может быть выполнен после получения заданного контрольного значения (например, коэффициента пропускания). Сбор как правило осуществляют с применением механических средств. Другими словами, механический сбор обычно не включает температурную обработку (например, низкотемпературную

обработку), ферментативные методы, применение электрочувствительной, фоточувствительной, рН-чувствительной, магнитной поверхности. Механический сбор включает подъем клеточного пласта с помощью механического инструмента (например, пинцета) после наложения мембраны на клеточный пласт или без наложения мембраны. Часто собранный клеточный пласт переносят на носитель (например, полученный из поливинилидендифторидной пленки) перед дальнейшим применением, таким как применение для реконструкции ткани (например, хряща), либо клеточный пласт можно пересадить непосредственно на ткань (например, роговицу).

Терапевтические применения клеточных пластов

[0061] Клеточные пласты, полученные с применением способа согласно настоящему изобретению, можно применять при реконструкции ткани. Клеточные пласты можно применять, например, для восстановления/регенерации хряща, кости или костно-хрящевого комплекса. Многослойные хондроцитарные клеточные пласты часто имеют конкретное применение из-за высоких уровней экспрессии генов и белков, связанных с хондрогенезом, а также генов и белков, связанных с клеточной адгезией. Такие многослойные клеточные пласты также способны секретировать определенные факторы, которые играют роль в регенерации хряща. Реконструкция ткани с применением многослойных хондроцитарных клеточных пластов также может применяться для лечения остеоартрита, при котором происходит разрушение хряща и субхондральной кости.

[0062] В одном варианте реализации предложен способ восстановления хряща у пациента с поврежденным или нездоровым хрящом. Указанный способ включает имплантацию части клеточного пласта, полученного способом согласно настоящему изобретению, в то место в организме пациента, где находится поврежденный или нездоровый хрящ.

[0063] Также в еще одном варианте реализации предложен способ лечения остеоартрита или остеохондрального дефекта у пациента, у которого имеется остеоартрит, включающий имплантацию части клеточного пласта, полученного способом согласно настоящему изобретению, в то место в организме пациента, где находится поврежденная или нездоровая ткань, связанная с остеоартритом, или где находится остеохондральный дефект.

[0064] В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает хирургическое лечение пациента для удаления поврежденного или нездорового хряща или остеохондрального дефекта перед имплантацией.

[0065] Клетки могут представлять собой аутологичные клетки или аллогенные клетки. В некоторых вариантах реализации клеточный пласт содержит хондроциты.

[0066] Способы получения клеточных пластов согласно настоящему изобретению снижают стоимость получения, учитывая, что указанные способы являются более воспроизводимыми и приводят к получению пригодных для применения клеточных пластов с гораздо большей частотой. Например, при применении настоящих способов получение клеточных пластов, которые можно применять в способе лечения, обычно происходит в от 60 процентов до 100 процентов случаев. Часто получение пригодных для применения клеточных пластов происходит в от 70 процентов до 100 процентов случаев, от 80 процентов до 100 процентов случаев или от 90 процентов до 100 процентов случаев.

[0067] Учитывая, что стоимость использования предприятия, соответствующего требованиям Надлежащей производственной практики (НПП), обычно составляет приблизительно 50 000 долларов США в неделю, и что получение может занимать порядка нескольких месяцев (например, 1 месяц, два месяца, три месяца или шесть месяцев), эта повышенная воспроизводимость может сэкономить от 50 000 долларов США до 500 000 долларов США при разработке продукта в виде клеточных пластов. В определенных случаях это может сэкономить от 50 000 долларов США до 1 000 000 долларов США, от 50 000 долларов США до 1 500 000 долларов США или от 50 000 долларов США до 2 000 000 долларов США. Сумма экономии рассчитывается с использованием методов, обсуждаемых в статье Ham et al. "What does cell therapy manufacturing cost? A framework and methodology to facilitate academic and other small-scale therapy manufacturing costings" *Cytotherapy*, Vol. 22, Issue 7, July 2020, pages 388-397, которая включена в настоящую заявку для всех целей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение клеточных пластов

[0068] Человеческие стромальные клетки жировой ткани (ASC) были приобретены в компании RoosterBio, Inc. (RoosterBio, Inc., Фредерик, штат Мэриленд). Человеческие ASC применяли для следующих экспериментов. Человеческие ASC выращивали до пассажа 4 или 5 в культуральном флаконе T75 (USAScientific, Окала, штат Флорида), применяя RoosterNourish™-MSC-XF (RoosterBio, Inc., Фредерик, штат Мэриленд) или применяя Stem Fit для мезенхимальных стволовых клеток (Ajinomoto, Токио, Япония).

[0069] Стволовые клетки пуповины (UCSC) и стволовые клетки костного мозга (BMSC) были приобретены в компании RoosterBio, Inc (RoosterBio, Inc., Фредерик, штат Мэриленд). UCSC и BMSC выращивали до пассажа 3 в культуральном флаконе, предварительно обработанном витронектином (0,25 мкг/см²).

[0070] ASC высевали при 1,05, 2,6, 5,2, 11,3, 22,1 и 55×10^4 ASC на см² в 35-мм культуральную чашку (Corning, Корнинг, штат Нью-Йорк). ASC культивировали в культуральных средах RoosterNourish™-MSC-XF (RoosterBio, Inc., Фредерик, штат Мэриленд) или StemFit для мезенхимальных стволовых клеток (Ajinomoto, Токио, Япония). Все сконструированные клеточные пласты были многослойными, когда их собирали. Недифференцированные клеточные пласты из ASC (ASCCS): ASC культивировали в RoosterNourish™-MSC-XF. Культуральные среды заменяли каждые 2 дня, до 12 дней от дня первоначального посева. Многослойные недифференцированные клеточные пласты были сконструированы и собраны независимо от начального посева клеток. Клеточный пласт, сконструированный с начальным посевом при $1,05 \times 10^4$ ASC на см², через 12 дней.

[0071] ASC высевали при $11,3 \times 10^4$ ASC на см² в 35-мм культуральную чашку (Corning, Корнинг, штат Нью-Йорк). ASC культивировали в культуральных средах RoosterNourish™-MSC-XF (RoosterBio, Inc., Фредерик, штат Мэриленд) или StemFit для мезенхимальных стволовых клеток (Ajinomoto, Токио, Япония). Все сконструированные клеточные пласты были многослойными, когда их собирали.

[0072] Недифференцированные клеточные пласты из ASC (ASCCS): ASC культивировали в RoosterNourish™-MSC-XF. Культуральные среды заменяли каждые 2 дня, до 10 дней от дня первоначального посева. Тот же протокол применяли, когда ASC культивировали в StemFit.

[0073] Остеобластный клеточный пласт: ASC культивировали в RoosterNourish™-MSC-XF до тех пор, пока клетки не достигали конfluence. С этого дня ASC культивировали в среде для дифференцировки Osteomax-XF (Millipore-Sigma, Берлингтон, штат Массачусетс). Культуральные среды заменяли каждые 3 дня, до 17 дней от дня первоначального посева.

[0074] Хондроцитарный клеточный пласт: ASC культивировали в RoosterNourish™-MSC-XF до тех пор, пока клетки не достигали конfluence. С этого дня ASC культивировали с помощью набора для хондрогенной дифференцировки MesenCult™-ACF (Stem Cell, Ванкувер, Канада). Культуральные среды заменяли каждые 2 дня, до X дней от дня первоначального посева, в зависимости от способа, применяемого для конструирования клеточного пласта.

[0075] Для выполнения конструирования применяли один из двух способов: 1) Чтобы прекратить центробежное натяжение, края клеточных пластов обрезали, и клеточный пласт оставляли в состоянии покоя почти в отсутствие культуральной среды (MesenCult™-ACF для хондрогенной дифференцировки), чтобы края клеточных пластов прикрепилась к поверхности для культивирования клеток, в течение 20 минут. В чашку для культивирования клеток добавляли среду для дифференцировки (MesenCult™-ACF для хондрогенной дифференцировки) и конструировали хондроцитарный клеточный пласт в течение периода до 21 дня после первого дня дифференцировки. 2) Применяли ингибитор ROCK Y-27632 при 10 мкМ или ингибитор ROCK Y-33075 при 1 мкМ с первого дня дифференцировки. При применении этого способа клеточные пласты не откреплялись и образовались за 2 недели, сократив на 33% время дифференцировки.

Пример 2. Осмотр клеточных пластов

[0076] Для конструирования клеточных пластов применяли человеческие стромальные клетки жировой ткани. Клетки высевали при $11,3 \times 10^4$ ASC на см². Для культивирования

и конструирования клеточных пластов применяли химически определенные культуральные среды. Для оценки времени сбора применяли устройство, измеряющее коэффициент пропускания сконструированного клеточного пласта. Общий транскриптом клеточных пластов анализировали с помощью микрочипа, и данные подтверждали с помощью ПЦР в реальном времени и иммуногистохимии.

[0077] Недифференцированные ASCCS конструировали за 10 дней с применением химически определенной культуральной среды. ASCCS, дифференцированные в хондроциты (обработанные ингибитором ROCK от 1 до 20 мкМ), хондроциты и остеобласты также конструировали с применением химически определенной и свободной от продуктов животного происхождения культуральной среды за 14, 21 и 14 дней соответственно. Коэффициент пропускания ASCCS измеряли в динамике с момента достижения клетками конfluence до сбора клеточных пластов. Коэффициент пропускания уменьшался в динамике для всех клеточных пластов с разной скоростью. Кроме того, значение коэффициента пропускания было ниже для остеобластных клеточных пластов по сравнению с другими клеточными пластами, что подтверждало их визуальное наблюдение.

[0078] Механический сбор клеточных пластов был простым процессом благодаря прочному межклеточному соединению и стратификации клеточных пластов. С помощью количественной ПЦР в реальном времени и ИГХ подтвердили идентичность клеточных пластов: CD19-, CD45R-, HLA-DR-, HLA-, CD29+, CD73+, CD105+ для недифференцированных клеточных пластов; костный белок, содержащий гамма-карбоксиглутаминовую кислоту, присутствовал в остеобластном клеточном пласте; коровый белок агрекана, кислый секретлируемый белок, богатый цистеином, и коллаген типа II присутствовали в хондроцитарном клеточном пласте. Дифференцировку также подтверждали окрашиванием клеточного пласта с применением ализаринового синего (для хондроцитарного клеточного пласта) и ализаринового красного (остеобластный клеточный пласт). РНК, проанализированная с помощью микрочипа, может предоставить подробную информацию о транскриптоме клеточного пласта, подтверждающую наличие белков, участвующих в межклеточном соединении (например, коннексинов).

[0079] Различные стратифицированные клеточные пласты были успешно сконструированы с применением человеческих стромальных стволовых клеток жировой ткани с химически определенными культуральными средами. Стромальные клетки жировой ткани сохранили свой дифференцировочный потенциал, а дифференцированные клеточные пласты экспрессировали специфические маркеры целевых тканей. Отсутствие ксенопродуктов и сыворотки животных/человека может снизить потенциальный риск заражения пациентов чужеродными агентами. Кроме того, это повышает воспроизводимость конструирования клеточных пластов за счет устранения вариабельности между партиями сыворотки животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gegg, C.; Yang, F., The Effects of ROCK Inhibition on Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis Are Culture Model Dependent. *Tissue Eng Part A* 2020, 26, (3-4), 130-139.
2. Wang, K. C.; Egelhoff, T. T.; Caplan, A. I.; Welter, J. F.; Baskaran, H., ROCK Inhibition Promotes the Development of Chondrogenic Tissue by Improved Mass Transport. *Tissue Eng Part A* 2018, 24, (15-16), 1218-1227.
3. Thorp, H.; Kim, K.; Kondo, M.; Grainger, D. W.; Okano, T., Fabrication of hyaline-like cartilage constructs using mesenchymal stem cell sheets. *Sci Rep* 2020, 10, (1), 20869.
4. Sato, M.; Yamato, M.; Mitani, G.; Takagaki, T.; Hamahashi, K.; Nakamura, Y.; Ishihara, M.; Matoba, R.; Kobayashi, H.; Okano, T.; Mochida, J.; Watanabe, M., Combined surgery and chondrocyte cell-sheet transplantation improves clinical and structural outcomes in knee osteoarthritis. *NPJ Regen Med* 2019, 4, 4.
5. Kaneshiro, N.; Sato, M.; Ishihara, M.; Mitani, G.; Sakai, H.; Kikuchi, T.; Mochida, J., Cultured articular chondrocytes sheets for partial thickness cartilage defects utilizing temperature-responsive culture dishes. *Eur Cell Mater* 2007, 13, 87-92.
6. Lu, Y.; Zhang, W.; Wang, J.; Yang, G.; Yin, S.; Tang, T.; Yu, C.; Jiang, X., Recent advances in cell sheet technology for bone and cartilage regeneration: from preparation to application. *Int J Oral Sci* 2019, 11, (2), 17.

7. Akahane, M.; Nakamura, A.; Ohgushi, H.; Shigematsu, H.; Dohi, Y.; Takakura, Y., Osteogenic matrix sheet-cell transplantation using osteoblastic cell sheet resulted in bone formation without scaffold at an ectopic site. *J Tissue Eng Regen Med* 2008, 2, (4), 196-201.
8. Ueyama, Y.; Yagyuu, T.; Maeda, M.; Imada, M.; Akahane, M.; Kawate, K.; Tanaka, Y.; Kirita, T., Maxillofacial bone regeneration with osteogenic matrix cell sheets: An experimental study in rats. *Arch Oral Biol* 2016, 72, 138-145.
9. Nakamura, A.; Akahane, M.; Shigematsu, H.; Tadokoro, M.; Morita, Y.; Ohgushi, H.; Dohi, Y.; Imamura, T.; Tanaka, Y., Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. *Bone* 2010, 46, (2), 418-24.
10. Ma, D.; Ren, L.; Liu, Y.; Chen, F.; Zhang, J.; Xue, Z.; Mao, T., Engineering scaffold-free bone tissue using bone marrow stromal cell sheets. *J Orthop Res* 2010, 28, (5), 697-702.
11. Bjare, U., Serum-free cell culture. *Pharmacol Ther* 1992, 53, (3), 355-74.
12. Kimberlin, R. H., Introduction to scrapie and perspectives on current scrapie research. *Prog Clin Biol Res* 1989, 317, 559-66.
13. Wappler, J.; Rath, B.; Laufer, T.; Heidenreich, A.; Montzka, K., Eliminating the need of serum testing using low serum culture conditions for human bone marrow-derived mesenchymal stromal cell expansion. *Biomed Eng Online* 2013, 12, 15.
14. Cimino, M.; Goncalves, R. M.; Barrias, C. C.; Martins, M. C. L., Xeno-Free Strategies for Safe Human Mesenchymal Stem/Stromal Cell Expansion: Supplements and Coatings. *Stem Cells Int* 2017, 2017, 6597815.
15. Mabry, R.; Brasky, K.; Geiger, R.; Carrion, R., Jr.; Hubbard, G. B.; Leppla, S.; Patterson, J. L.; Georgiou, G.; Iverson, B. L., Detection of anthrax toxin in the serum of animals infected with *Bacillus anthracis* by using engineered immunoassays. *Clin Vaccine Immunol* 2006, 13, (6), 671-7.

16. Ryan, E. D.; Kirby, M.; Collins, D. M.; Sayers, R.; Mee, J. F.; Clegg, T., Prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) antibodies in bovine serum and bulk-milk samples. *Epidemiol Infect* 2011, 139, (9), 1413-7.
17. Zabal, O.; Kobrak, A. L.; Lager, I. A.; Schudel, A. A.; Weber, E. L., [Contamination of bovine fetal serum with bovine viral diarrhea virus]. *Rev Argent Microbiol* 2000, 32, (1), 27-32.
18. Knepper, P. A.; Mayanil, C. S.; Goossens, W.; McLone, D. C.; Hayes, E., The presence of transcription factors in fetal bovine sera. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1998, 34, (2), 170-3.
19. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006, 8, (4), 315-7.
20. Murphy, L. B.; Cisternas, M. G.; Pasta, D. J.; Helmick, C. G.; Yelin, E. H., Medical Expenditures and Earnings Losses Among US Adults With Arthritis in 2013. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2018, 70, (6), 869-876.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения клеточного пласта, включающий:
культивирование множества стволовых клеток на поверхности для культивирования клеток контейнера в культуральной среде,
добавление среды для дифференцировки и ингибитора Rho-киназы (ROCK) в указанный контейнер, причем среду для дифференцировки и ингибитор ROCK добавляют с интервалом до 2 дней друг от друга, и
открепление от поверхности для культивирования клеток клеточного пласта, образованного клетками, дифференцированными из стволовых клеток.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанная поверхность для культивирования клеток покрыта внеклеточным матриксом.
3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что указанная культуральная среда представляет собой химически определенную культуральную среду.
4. Способ по любому из пп. 1–3, дополнительно включающий подсчет количества стволовых клеток перед добавлением среды для дифференцировки, причем подсчитанное количество применяют для определения продолжительности дифференцировки.
5. Способ по любому из пп. 1–4, отличающийся тем, что открепление осуществляют с помощью механического инструмента.
6. Способ по любому из пп. 1–5, дополнительно включающий удаление клеток, которые дорастают до контакта со стенкой указанного контейнера.
7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что удаление включает обрезание краев указанного клеточного пласта с помощью механического инструмента.

8. Способ по любому из пп. 1–7, отличающийся тем, что указанные стволовые клетки выбраны из группы, состоящей из стромальных клеток жировой ткани, стволовых клеток костного мозга, мезенхимальных стволовых клеток и стволовых клеток пуповины.
9. Способ по любому из пп. 1–8, отличающийся тем, что клетки, дифференцированные из стволовых клеток, представляют собой хондроциты или остеобласты.
10. Способ по любому из пп. 1–9, отличающийся тем, что среду для дифференцировки и ингибитор ROCK добавляют с интервалом до 1 дня друг от друга.
11. Способ по любому из пп. 1–10, отличающийся тем, что ингибитор ROCK добавляют в течение 24 часов после добавления среды для дифференцировки.
12. Способ по любому из пп. 1–11, отличающийся тем, что ингибитор ROCK выбран из группы, состоящей из Y-27632, Y-33075 и H-1152.
13. Способ по любому из пп. 1–12, отличающийся тем, что ингибитор ROCK добавляют до достижения концентрации от 1 мкМ до 20 мкМ.
14. Способ по любому из пп. 1–13, отличающийся тем, что указанный клеточный пласт включает от 5×10^6 до 7×10^6 клеток.
15. Способ по любому из пп. 1–14, отличающийся тем, что указанный клеточный пласт представляет собой многослойный клеточный пласт.
16. Способ по любому из пп. 1–15, отличающийся тем, что указанный клеточный пласт после открепления не сжимается более чем на 20% в любом продольном направлении.
17. Способ получения клеточного пласта, включающий:
культивирование множества стволовых клеток на поверхности для культивирования клеток контейнера в культуральной среде,

дифференцировку указанных стволовых клеток в среде для дифференцировки, удаление клеток, которые достигают до контакта со стенкой указанного контейнера, и

открепление от поверхности для культивирования клеток клеточного пласта, образованного клетками, дифференцированными из указанных стволовых клеток.

18. Способ по п. 17, отличающийся тем, что удаление включает обрезание краев указанного клеточного пласта с помощью механического инструмента.

19. Способ по п. 17 или 18, дополнительно включающий добавление ингибитора Rho-киназы (ROCK) в указанный контейнер, причем среду для дифференцировки и ингибитор ROCK добавляют с интервалом до 2 дней друг от друга.

20. Способ по любому из пп. 17–19, отличающийся тем, что ингибитор ROCK добавляют в течение 24 часов после добавления среды для дифференцировки.

21. Способ по любому из пп. 17–20, отличающийся тем, что ингибитор ROCK выбран из группы, состоящей из Y-27632, Y-33075 и H-1152.

22. Способ по любому из пп. 17–21, отличающийся тем, что ингибитор ROCK добавляют до достижения концентрации от 1 мкМ до 100 мкМ.

23. Способ по любому из пп. 17–22, отличающийся тем, что указанные стволовые клетки выбраны из группы, состоящей из стромальных клеток жировой ткани, клеток, происходящих из костного мозга, мезенхимальных стволовых клеток и стволовых клеток, происходящих из пуповины.

24. Способ по любому из пп. 17–23, отличающийся тем, что клетки, дифференцированные из стволовых клеток, представляют собой хондроциты или остеобласты.

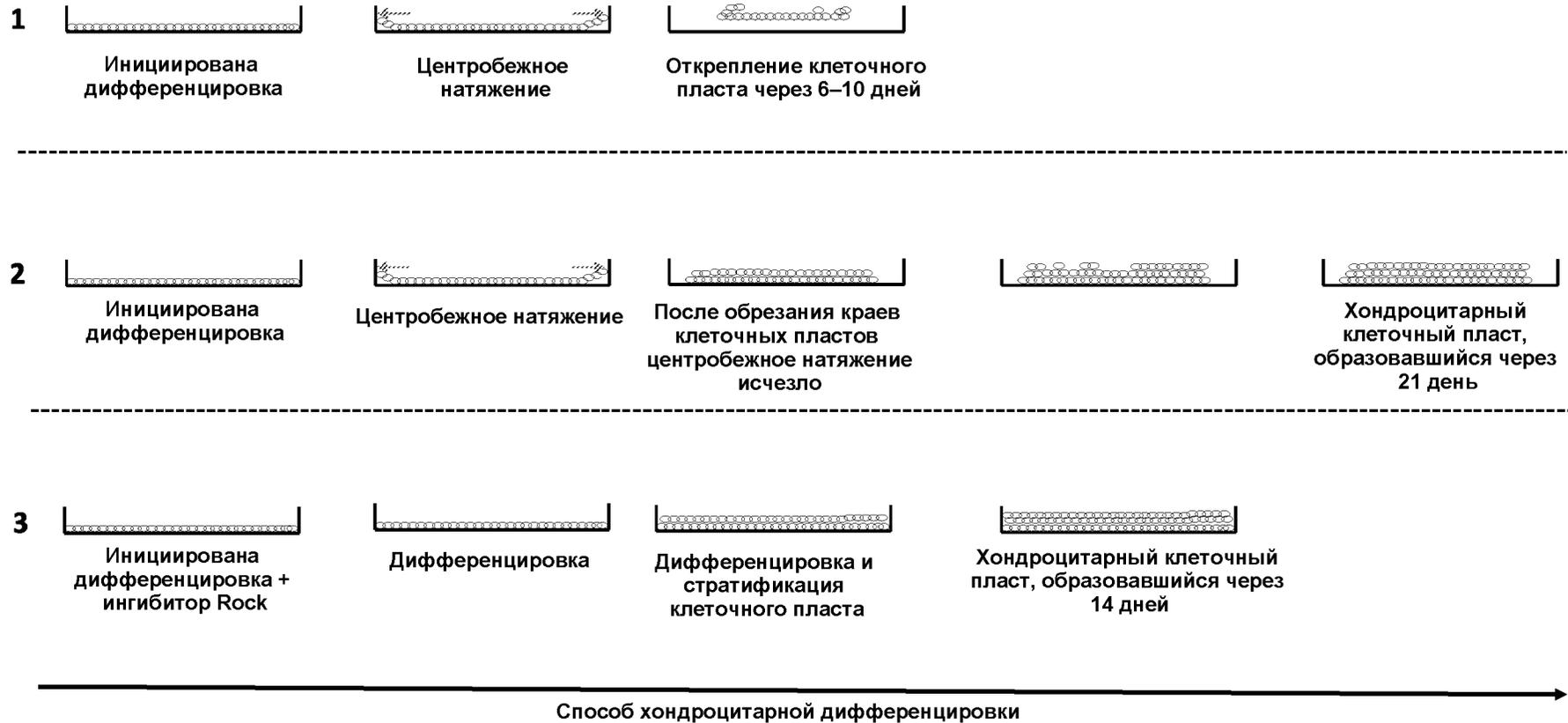
25. Способ восстановления хряща у пациента, у которого имеется поврежденный или нездоровый хрящ, включающий имплантацию части клеточного пласта, полученного способом по любому из пп. 1–24, в то место в организме пациента, где находится поврежденный или нездоровый хрящ.

26. Способ лечения остеоартрита или остеохондрального дефекта у пациента, у которого имеется остеоартрит, включающий имплантацию части клеточного пласта, полученного способом по любому из пп. 1–24, в то место в организме пациента, где находится поврежденная или нездоровая ткань, связанная с остеоартритом, или где находится остеохондральный дефект.

27. Способ по п. 25 или 26, дополнительно включающий хирургическое лечение указанного пациента для удаления поврежденного или нездорового хряща или остеохондрального дефекта перед имплантацией.

28. Способ по любому из пп. 25–27, отличающийся тем, что указанные стволовые клетки представляют собой аутологичные клетки.

29. Способ по любому из пп. 25–28, отличающийся тем, что указанный клеточный пласт содержит хондроциты.



1/1

ФИГ. 1