



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК
A61K 35/50 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/0797 (2010.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013105782/10, 12.02.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.02.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 12.02.2013

(45) Опубликовано: 20.07.2014 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 20080131966 A1, 05.06.2008 . US 20080131410 A1, 05.06.2008 . RU 2468818 C2, 10.12.2012 . EP 2359877 A1, 24.08.2011 . RU 2392314 C2, 20.06.2010

Адрес для переписки:

117574, Москва, Новоясеневский пр-кт, 22, корп.
1, кв. 298, Федоровой В.С.

(72) Автор(ы):

Терских Василий Васильевич (RU),
Васильев Андрей Валентинович (RU),
Воротеляк Екатерина Андреевна (RU),
Риппа Александра Леонидовна (RU),
Давыдова Дарья Александровна (RU),
Калинкина Марина Алексеевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Российская Федерация, от имени которой
выступает МИНИСТЕРСТВО
ПРОМЫШЛЕННОСТИ И ТОРГОВЛИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(Минпромторг России) (RU)**(54) КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ КЛЕТОЧНО-ЗАМЕСТИТЕЛЬНОЙ ТЕРАПИИ ДЕФЕКТОВ МЯГКИХ ТКАНЕЙ**

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии и медицины. Предложена композиция, содержащая стволовые клетки из амниотической жидкости человека с фенотипом CD73+/CD90+/CD105+/CK19+, питательную среду, эритропоэтин, эпидермальный фактор роста и коллаген, взятые в эффективном количестве. Изобретение позволяет повысить пролиферативный потенциал и жизнеспособность клеток, обеспечив одновременно цитопротекторный эффект в отношении клеток

трансплантата и стимуляцию миграции и пролиферации собственных клеток пациента, а также существенно снизить концентрацию инъектируемых клеток и активизировать васкуляризацию и регенерацию в месте дефекта и может быть использовано в терапии для устранения врожденных и приобретенных дефектов мягких тканей, возникающих в результате травм, после удаления опухолей, врожденных заболеваний, возрастных изменений или иных повреждений. 2 табл., 4 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 35/50 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/0797 (2010.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2013105782/10, 12.02.2013**

(24) Effective date for property rights:
12.02.2013

Priority:

(22) Date of filing: **12.02.2013**

(45) Date of publication: **20.07.2014** Bull. № 20

Mail address:

**117574, Moskva, Novojasenevskij pr-kt, 22, korp. 1,
kv. 298, Fedorovoj V.S.**

(72) Inventor(s):

**Terskikh Vasilij Vasil'evich (RU),
Vasil'ev Andrej Valentinovich (RU),
Voroteljak Ekaterina Andreevna (RU),
Rippa Aleksandra Leonidovna (RU),
Davydova Dar'ja Aleksandrovna (RU),
Kalinkina Marina Alekseevna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Rossijskaja Federatsija, ot imeni kotoroj
vystupaet MINISTERSTVO
PROMYSHLENNOSTI I TORGOVLI
ROSSIJSKOJ FEDERATsII (Minpromtorg
Rossii) (RU)**

(54) **COMPOSITION FOR CELL-REPLACEMENT THERAPY OF SOFT TISSUE DEFECTS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: composition is proposed which comprises stem cells of human amniotic fluid with the phenotype CD73+/CD90+/CD105+/CK19+, nutrient medium, erythropoietin, epidermal growth factor, and collagen taken in an effective amount.

EFFECT: invention enables to increase the proliferative potential and viability of the cells, while simultaneously providing cytoprotective effect on the cells of

the transplant and stimulation of migration and proliferation of patient's own cells, and also to reduce significantly the concentration of injectable cells and to activate vascularisation and regeneration at the defect site and can be used in therapy for elimination of congenital and acquired defects of soft tissue arising as the result of injuries, after removal of tumors, congenital diseases, age-related changes or other damages.

2 tbl, 4 ex

RU 2 522 816 C1

RU 2 522 816 C1

Изобретение относится к области биотехнологии и регенеративной медицины, в частности к биомедицинским клеточным продуктам, и может быть использовано для устранения врожденных и приобретенных дефектов мягких тканей, возникающих в результате травм, после удаления опухолей, врожденных заболеваний, возрастных изменений или иных повреждений.

Основной проблемой при восстановлении структурной и функциональной целостности поврежденных мягких тканей является дефицит ткани для трансплантации, опасность отторжения и некроза, а также недостаточный регенеративный потенциал и низкая активность собственных клеточных элементов данного типа тканей у пациентов.

Известные средства для клеточной терапии дефектов мягких тканей в подавляющем большинстве направлены на коррекцию возрастных изменений кожи (морщины, стрии, рубцы). Они позволяют лишь временно улучшить состояние кожи, поскольку не приводят к количественному увеличению у пациента собственных жизнеспособных и функционирующих фибробластов и других мезенхимальных клеток в зоне лечения.

Средства для клеточно-заместительной терапии, которые способны замещать значительную потерю мягких тканей, например восполнять обширные посттравматические или послеоперационные дефекты, на сегодняшний день практически отсутствуют.

Сдерживающим фактором в получении эффективных средств для регенерации мягких тканей является высокая уязвимость клеточных компонентов и маловыраженный регенеративный эффект. Помимо этого, не решена проблема значимой стимуляции васкуляризации после трансплантации клеточного продукта и его защиты от неблагоприятных воздействий раневого микроокружения (протеаз, ишемии, неорганизованного внеклеточного матрикса), приводящих к преждевременной гибели клеточного компонента и сокращению времени терапевтического действия на раневой процесс.

Известна композиция филлера для мягких тканей, предназначенная для облегчения или лечения повреждения кожи вследствие механических или физиологических причин, которая содержит от 1×10^7 до 8×10^7 клеток/мл аутологичных клеток дермального происхождения и от 10 до 100 мг/мл коллагена в качестве эффективного ингредиента (Патент RU 2396084, А61К 35/36, опубл. 10.08.2010).

Недостатком известной композиции является невысокий пролиферативный потенциал клеток дермального происхождения, клетки быстро разрушаются и гибнут в местах инъекций и, кроме того, не индуцируют васкуляризацию, необходимую для формирования соединительной ткани при повреждениях. Вследствие этого данная композиция обеспечивает лишь временный косметический эффект и не предназначена для восполнения обширных дефектов мягких тканей посттравматического, послеоперационного или иного характера.

Известна композиция для мезотерапии, содержащая смесь аллогенных фибробластов, полученных из пуповины новорожденного, и аутологичных фибробластов из кожи собственно пациента в соотношении 1:1 в количестве 1-5 млн клеток в 5 мл (Патент RU 2308957, А61К 35/36, опубл. 27.10.2007).

Недостатком известной композиции является непродолжительность ее терапевтического действия, а также невозможность регенерации обширных дефектов тканей. Это связано с тем, что композиция представлена в форме суспензии для инъекций, которая быстро распределяется в тканях и инактивируется под воздействием факторов иммунной системы, протеаз и других неблагоприятных агентов. Кроме того, композиция не способна стимулировать васкуляризацию, необходимую для формирования мягких

тканей при повреждениях.

Известен биотрансплантат для коррекции дефектов мягких тканей, представляющий собой суспензию клеток аутологичной культуры фибробластов в 0,9% растворе хлорида натрия в концентрации $0,6-3,0 \times 10^6$ в 1 мл биотрансплантата, интегрированных на фармацевтически приемлемой биосовместимой биodeградируемой измельченной до размера 100-200 мкм бесклеточной матрице в растворе фармацевтически приемлемого биосовместимого биodeградируемого препарата гиалуроновой кислоты, при этом объемное соотношение аутологичной культуры фибробластов, бесклеточной матрицы и препарата гиалуроновой кислоты составляет 4:1:1 соответственно, а в качестве фармацевтически приемлемой биосовместимой биodeградируемой бесклеточной матрицы используют препарат «Сайметра», представляющий собой переработанную донорскую кожу человека, лишенную клеток и структурных иммуноспецифических белков, основу которого составляет коллаген и эластин, представленный в виде инъекционной формы (Патент RU 2428996, А61К 35/36, опубл. 20.09.2011).

Достоинством известного биотрансплантата является способность корректировать дефекты мягких тканей, универсальные для соединительной ткани всех органов, а также повышение жизнеспособности инъецируемых клеток и обеспечение их длительного сохранения в поврежденной ткани. Однако данный биотрансплантат не обеспечивает должной васкуляризации и содержит клетки с невысоким регенеративным потенциалом. Использование в биотрансплантате собственных клеток пациента делает затруднительным его применение в случае обширных дефектов мягких тканей.

В патенте RU 2273458 описан клеточный продукт для коррекции дефектов мягких тканей лица и шеи, представляющий собой аутожировой трансплантат, полученный в результате липосакции и содержащий клетки жировой ткани (адипоциты), с добавлением в него фермента супероксид-дисмутазы в концентрации 0,01-0,1 мас.% (Патент RU2273458, А61В 17/00, опубл. 10.04.2006).

Недостатками известной композиций является то, что она не обеспечивает стимуляцию васкуляризации и не поддерживает длительное терапевтическое воздействие. В ней не предусмотрены компоненты, защищающие композицию от неблагоприятного воздействия раневого окружения. Кроме того, в ней отсутствует носитель, поддерживающий жизнеспособность клеточного компонента, а используемые клетки (адипоциты) обладают невысокими регенеративными способностями.

Известна также фармацевтическая композиция для лечения ран на коже и мягких тканях нижней конечности у больного диабетом, содержащая в водном растворе фактор эпидермального роста (EGF) в количестве от 10 до 1000 микрограмм EGF на миллилитр и дополнительно содержащая, по крайней мере, один представитель из группы, состоящей из фибронектина, О-рафинозы, левана и полиэтиленimina (PEI) в количестве от 10 микрограмм до 500 микрограмм на миллилитр, а также один природный изофлавоноид в количестве от 20 до 1000 микрограмм на миллилитр (Патент RU 2289424, А61К 38/18, опубл. 20.12.2006).

Недостатком известной композиции является неустойчивость и ограниченность терапевтического эффекта из-за неэффективной доставки и быстрого разрушения фактора эпидермального роста в зоне дефекта, что диктует необходимость его использования в высоких дозах. Наносимый на рану эпидермальный фактор роста контактирует, в основном, с омертвевшими или вяло регенерирующими тканями диабетической язвы и протеазами, находящимися в ране. Это обуславливает его быстрое разрушение и отсутствие стимуляции здоровых тканей. Кроме того, известная композиция не обеспечивает регенерацию обширных структурных дефектов мягкой

ткани и предназначена для лечения только диабетической стопы.

Известна композиция для заживления раны в случае механических или патологических повреждений или ожогов, содержащая эритропоэтин (ЭПО) и по меньшей мере один гелеобразующий полисахарид, поддающийся разбуханию, в концентрации 0,4-4% мас./мас, выбранный из группы, состоящей из: гидроксипропилцеллюлозы, гидроксиметилцеллюлозы, карбоксиэтилцеллюлозы, карбоксиметилцеллюлозы, которая может быть получена путем смешивания ЭПО в лиофилизированной или суспензированной форме с предварительно разбухшим полисахаридом, имеющим вязкость менее 5000 мПа·с, и инициации полного разбухания, где полностью разбухший полисахарид имеет вязкость 20000-60000 мПа·с, и ЭПО присутствует в концентрации 100-500 МЕ/г гелеобразной композиции, где указанное смешивание ЭПО достигается путем диффузии ЭПО в геле в течение по меньшей мере 24 ч (Патент RU2465003, А61К 38/18, опубл. 27.10.2012).

Недостатком известной композиции является невозможность коррекции обширных структурных дефектов соединительной ткани, длительность лечения и вялость заживления раны, поскольку терапевтическое действие не сопровождается стимуляцией клеточной пролиферации и миграцией. Композиция не содержит живых клеток, и регенерация может идти только за счет собственных клеточных резервов организма.

Наиболее близким аналогом является фармацевтическая композиция, содержащая в мезенхимные стволовые клетки с фенотипом CD13+/CD29+/CD44+, выделенные из амниотической жидкости человека, и культуральную питательную среду (заявка US 2012/0141399, А61К 8/98, опубл. 07.06.2012).

Однако ближайший аналог не обеспечивает длительность и стабильность терапевтического эффекта, поскольку композиция представляет собой суспензию для инъекций, которая быстро распределяется в тканях и инактивируется под воздействием факторов иммунной системы, протеаз и других неблагоприятных агентов. Кроме того, недостатком ближайшего аналога является невозможность коррекции обширных трехмерных дефектов ткани, поскольку композиция не обеспечивает активизацию васкуляризации в месте дефекта.

Задачей изобретения является создание универсальной композиции на основе стволовых клеток человека, пригодной для коррекции структурно-функциональных дефектов мягких тканей любых размеров и локализации, с улучшенным приживлением и длительными сроками хранения, способной стимулировать васкуляризацию и регенерацию в области дефекта, и тем самым обеспечивающей устойчиво высокий терапевтический эффект.

Технический результат изобретения заключается в повышении пролиферативного потенциала и жизнеспособности клеток композиции, снижении концентрации инъецируемых клеток, активизации васкуляризации и регенерации в месте дефекта.

Технический результат изобретения достигается за счет качественного и количественного состава компонентов, представляющих собой композицию взаимодополняющих по направленности действия, существенно усиливающих пролиферацию и жизнеспособность клеток и стимулирующих васкуляризацию и регенерацию в области дефекта.

Сущность изобретения заключается в следующем: композиция для клеточно-заместительной терапии дефектов мягких тканей содержит стволовые клетки из амниотической жидкости человека в культуральной среде и отличается тем, что дополнительно содержит коллаген, эритропоэтин (ЭПО) и эпидермальный фактор роста (ЭФР), а из клеток амниотической жидкости она содержит стволовые клетки

фенотипа CD73+/CD90+/CD105+/СК19+ при следующей соотношении компонентов в 1 мл:

5	Суспензия стволовых клеток амниотической жидкости человека	5×10 ⁴ -5×10 ⁵ клеток
	Питательная среда	0,01-0,3 мл
	Эритропоэтин	100-500 МЕ
	Эпидермальный фактор роста	5-20 нг
	Коллаген	Остальное до 1 мл

10 Амниотическая жидкость считается в настоящее время оптимальным источником получения нескольких типов клеток, среди которых: мезенхимные стволовые клетки, эпителиоциты и другие популяции амниоцитов. Однако стволовые клетки амниотической жидкости гетерогенны по происхождению и культуральным характеристикам и не все способны поддерживать стволовой статус и жизнеспособность в культуре в течение достаточного времени (Rennie K., Gruslin A., Hengstschlager M., Pei D., Cai J., Nikaido T.,
15 Bani-Yaghoob M. Application of amniotic membrane and fluid in stem cell biology and regenerative medicine. Stem Cells Int. 2012; 2012:721538. doi: 10.1155/2012/721538. Epub 2012 Oct 10).

Изобретательский уровень настоящего изобретения обеспечивается тем, что из
20 стволовых клеток амниотической жидкости была выделена уникальная популяция клеток, одновременно экспрессирующая маркеры мезенхимных стволовых клеток: CD73 (5' -нуклеотидаза), CD90 (Thy-1), CD 105 (Эндоглин) и маркер эпителия - цитокератин-19(СК-19), которая в присутствии коллагена, ЭПО и ЭФР достоверно способна индуцировать быструю эндотелиализацию и васкуляризацию, приводя в
25 результате к регенерации мягких тканей и образованию новых капилляров в области поврежденной ткани. Сочетание коллагена, ЭПО и ЭФР в составе клеточной композиции позволило увеличить ее эффективность, обеспечив одновременно цитопротекторный эффект в отношении клеток трансплантата и стимуляцию регенерации тканей в ране.

Композицию для клеточно-заместительной терапии дефектов мягких тканей
30 применяют путем инъекций в поврежденные ткани или нанесением на поврежденную ткань. Заявленный состав композиции позволяет обеспечить эффективную дозу при более низких концентрациях инъецируемых клеток и факторов роста для индуцирования нового местного кровоснабжения в области дефекта и поддержания быстрого реконструирования ткани.

35 Композиция по изобретению может быть использована для наращивания мягкой ткани в целях исправления или коррекции врожденных аномалий, приобретенных дефектов или косметических дефектов вне зависимости от локализации дефектов или изменений.

Изобретение иллюстрируется следующими примерами.

40 Пример 1. Получение композиции для клеточно-заместительной терапии дефектов мягких тканей.

Технология получения композиции по изобретению состоит из следующих основных этапов: получение популяции стволовых клеток, культивирование клеток в питательной среде, смешивание всех компонентов композиции с последующей расфасовкой готового
45 продукта.

Получение популяции стволовых клеток (СК) из амниотической жидкости.

Клетки выделяют из амниотической жидкости центрифугированием (10 мин, 1100 об/мин) и культивируют в среде α -MEM (Gibco) с добавлением 15% ES-FBS (HyClone), 1% глутамина (Invitrogen), 18% Chang B и 2% Chang C (Irvine Scientific), 1% пенициллина/

стрептомицина (Sigma) при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Пассирование проводят 1:3 на 2-3 сут, когда клетки достигают монослоя.

Выявление маркеров и идентификация клеток.

5 Полученные клетки идентифицируют по морфологическим характеристикам и иммунофенотипу.

Анализ клеток проводят следующим образом.

Морфологический анализ.

Морфологические характеристики СК амниотической жидкости оценивают визуально с помощью фазово-контрастного микроскопа (Olympus, СКХ31).

10 Иммунофенотипический анализ.

Экспрессию поверхностных антигенов клеток АЖ (7 пассаж) оценивают на проточном цитофлуориметре (Becton Dickinson FACSCalibur). Клетки трипсинизируют и окрашивают связанными с флуоресцеин изито-ционатом (FITC) или фикоэритрином (PE) антителами против CD73, CD90, CD 105, цитокератина 19 (BD Pharmingen или Mil-
15 lipore или Abcam) или неконъюгированные антитела против тех же антигенов со вторыми антителами Alexa Fluor 488 (Molecular Probes). Контролем служат FITC-или PE-связанные иммуноглобулины тех же изотипов и/или пробы без первых антител.

По результатам морфологического анализа выявлена однородная по фенотипу клеточная популяция. Стволовые клетки амниотической жидкости представляют собой
20 вытянутые фибробластоподобные клетки. Проточная цитофлуориметрия показала, что 92-99% клеток положительны по маркерам CD73, CD90, CD 105 и цитокератину 19 (т.е. культура обладает уникальными свойствами стволовых клеток амниотической жидкости).

Для внесения в композицию клеток используется среда ДМЕМ с предварительно внесенными в нее факторами роста ЭФР и ЭПО - далее среда ДМЕМ ФР. Для
25 приготовления среды ДМЕМ ФР в стандартную среду ДМЕМ с глутамином вносят ЭФР и ЭПО в конечной концентрации 80 нг/мл и 800 МЕ соответственно. ДМЕМ ФР может храниться в холодильной камере при +4°C не более 7 суток.

30 Коллагеновый гель «Коллост» поставляется производителем в стерильном виде в шприцах.

За 1 час до начала приготовления композиции шприцы с коллагеновым гелем помещают в термостат при 37°C для расплавления. После этого в стерильных условиях
гель выдавливают из шприцов в необходимом количестве (3/4 от конечного объема композиции) в стеклянные или пластиковые флаконы и смешивают с суспензией клеток.

35 Для внесения в композицию допускаются только клетки, прошедшие тестирование на отсутствие инфекционных агентов и с нормальным кариотипом.

Клетки СК амниотической жидкости снимают с культурального флакона обычным способом, при помощи смеси растворов трипсина и Версена (1:1). Концентрацию и
40 общее количество подсчитывают при помощи камеры Горяева, клетки отмывают от остатков трипсина центрифугированием и ресуспендируют в среде ДМЕМ ФР объемом, составляющим 1/4 от конечного объема композиции, и содержащей МСКЭ в концентрации 8×10^5 кл/мл. Полученную суспензию смешивают с расплавленным коллагеновым гелем. Затем композицию помещают при температуре +22°C на 1 час
45 для застывания геля.

В результате получают композицию следующего состава:

Суспензия стволовых клеток

амниотической жидкости человека

2×10^5 клеток

Питательная среда	0,25 мл
Эритропоэтин	200 МЕ
Эпидермальный фактор роста	20 нг
Коллаген	0,75 мл

5 Пример 2. Оценка пролиферативного потенциала композиции для клеточно-заместительной терапии дефектов мягких тканей.

Композицию, полученную по примеру 1, заливают культуральной средой и через 18 ч добавляют 10 мкМ предшественника синтеза ДНК BrdU (Sigma, США). Контролем служат клетки, культивированные на пластике.

10 Фиксацию осуществляют через 24 ч после добавления BrdU. Клетки, культивированные на пластике, снимают 0,25% трипсином/EDTA (Gibco, Invitrogen), далее коллагеновый гель растворяют коллагеназой I типа (Sigma), после чего клетки дважды отмывают PBS и фиксируют ледяным 70° этанолом в течение 30 мин.

15 Затем к суспензии добавляют равный объем 4N HCl и инкубируют еще 30 мин при комнатной температуре. После этого клетки осаждают центрифугированием (5 мин, 1500 об/мин) и ресуспендируют в 0,1М тетраборате натрия (pH 8,5) для нейтрализации кислоты. Затем клетки снова центрифугируют (5 мин, 1500 об/мин), ресуспендируют в 70° этаноле и хранят при -20°С до окрашивания. Окрашивание проводят мышинными антителами против BrdU (Millipore) с последующим выявлением вторичными антителами
20 к мышинным иммуноглобулинам, конъюгированными с флуорохромом Alexa 488 (Molecular Probes).

Подсчет окрашенных (пролиферирующих) клеток проводят с помощью флуоресцентного микроскопа (Olympus, СКХ31).

25 При подсчете доли клеток, включивших BrdU (синтезирующих ДНК), было выявлено, что в композиции доля таких клеток достоверно выше, чем в контроле (24,5±4% - в контроле и 38±5% в композиции).

Таким образом, пролиферативный потенциал клеток амниотической жидкости в составе композиции достоверно увеличивается по сравнению с контролем.

30 Пример 3. Оценка жизнеспособности клеток в составе композиции для клеточно-заместительной терапии дефектов мягких тканей.

Для определения жизнеспособности клеток используют метод TUNEL. Композицию получают по примеру 1 и заливают культуральной средой. В качестве контроля используют клетки, культивированные на пластике. Затем индуцируют апоптоз 300 мМ перекисью водорода в течение 30 минут. После этого клетки изолируют из
35 композиции с помощью коллагеназы, фиксируют 4%-ным раствором параформальдегида, пермеабелизуют протеиназой К.

40 Далее клетки инкубируют с 3%-ным раствором перекиси водорода для ингибирования эндогенной пероксидазной активности, затем с антителами (TdT Enzyme, Br-dUTP) в течение часа при 37°С во влажной камере, после чего промывают и наносят вторые антитела (Anti-BrdU-Biotin mAb), инкубируют в течение часа в темноте.

Окраску визуализируют с помощью диаминобензидина (DAB). Подсчет окрашенных (апоптотических) клеток проводят с помощью фазово-контрастного микроскопа (Olympus, СКХ31).

45 При подсчете доли апоптотических клеток в культуре стволовых клеток амниотической жидкости было выявлено, что в композиции этот показатель меньше, чем в контроле примерно на 30% (0,981±0,08% - в контроле и 0,6013±0,06% в композиции).

Таким образом, жизнеспособность клеток амниотической жидкости в составе

композиции достоверно увеличивается по сравнению с контролем.

Пример 4. Оценка эффективности композиции при репарации дефектов мягких тканей и васкуляризации.

В эксперименте *in vivo* изучалось влияние полученной по примеру 1 композиции на раневое заживление при ее введении в искусственно вызванный дефект мягких тканей - резаную рану. В качестве контроля используют раствор ЭПО и ЭФР в физиологическом растворе в концентрации 200 МЕ и 20 нг/мл соответственно и чистый коллаген без добавок.

Эксперимент проводят на 4-х группах животных (лабораторных мышах): одной опытной и трех контрольных группах по 20 животных в каждой группе. У животных всех исследуемых групп создают искусственный дефект - резаную рану. Для этого под эфирным наркозом мышам выбривают участок кожи на спине, обрабатывают 700 спиртом и вырезают лоскут стандартного размера в среднем 10×10 мм до глубоких слоев фасции.

В рану вводят: биофармацевтическую композицию (опытная группа), коллаген (контрольная группа 1), раствор ЭПО и ЭФР (контрольная группа 2) или оставляют раны без лечения (контрольная группа 3).

Проводят измерение размеров раны (длина и ширина) сразу после нанесения и затем каждый день в течение 14 дней. Изменения площади ран выражают в процентах от начальной.

На 3, 7, 10 и 14 день лечения забивают по пять случайно взятых животных из каждой группы.

Биопсии раны фиксируют в забуференном 10%-ном формалине, заключают в парафин и делают срезы на микротоме толщиной 5-7 мкм. Срезы окрашивают гематоксилин-эозином. Полученные препараты (по три от каждого животного) анализируют под прямым световым микроскопом и фотографируют с помощью цифровой фотокамеры. Составляют описание препаратов слепым методом (оператор не знает параметров животного). Для определения плотности сосудов срезы окрашивают антителами против маркеров эндотелия. Результаты исследования представлены в табл.1 и табл.2

Лечение	Количество животных в группе	Площадь раны (в %)				
		До лечения	3 день лечения	7 день лечения	10 день лечения	14 день лечения
Контрольная группа 1 (Коллаген)	20	100	92±6%	60±7%	33±4%	8±5%
Контрольная группа 2 (ЭПО+ЭФР)	20	100	92±5%	65±4%	35±4%	8±3%
Контрольная группа 3 (без лечения)	20	100	90±5%	70±7%	35±6%	7±3%
Опытная группа	20	100	75±4%	43%	24±4%	2,5±3%

Лечение	Число сосудов на 1 мм среза		
	3 день лечения	7 день лечения	14 день лечения
Контрольная группа 1 (коллаген)	27,5±0,2	38,3±0,4	35,4±0,4
Контрольная группа 2 (ЭПО+ЭФР)	31,1±0,5	52,2±0,8	39,1±0,1
Контрольная группа 2 (без лечения)	28,9±0,8	39,0±0,2	35,8±0,3
Опытная группа	37,5±0,4	62,8±0,2	50,0±0,1

Как видно из табл.1 и табл.2, показатели раневого заживления (сокращение площади раны; формирование сосудов) значительно улучшены по сравнению с контрольными группами животных, не получавших лечение композицией.

5 Гистологическое исследование дефекта мягких тканей показало, что при лечении дефектов мягкой ткани композицией по изобретению раньше происходит формирование, созревание и фиброзирование грануляционной ткани, нормализация клеточного состава зоны дефекта, а также происходит стимулирование образования новой системы кровеносных сосудов.

10 На основании анализа гистологических препаратов и данных табл.1 и табл.2 можно заключить, что трансплантация биофармацевтической композиции значительно ускоряет заживление дефекта, приводит к ускорению формирования зрелой стромы и стимулирует васкуляризацию.

15 Эффект ускорения заживления хорошо выражен начиная с ранних сроков ранозаживления, что, вероятно, связано с эффективной стимуляцией собственной регенерации, ускоренным формированием грануляционной ткани, образование новых капилляров и кровеносных сосудов и созданием условий для миграции эпителиального пласта. К 10 суткам на гистологических препаратах отмечается формирование эпителиального пласта. Отмечается интенсивный рост сосудов, на краях дефекта наблюдается формирование придатков кожи.

20 Таким образом, биофармацевтическая композиция, полученная по настоящему изобретению, может быть использована для лечения дефектов мягких тканей.

Формула изобретения

25 Композиция для клеточно-заместительной терапии дефектов мягких тканей, содержащая стволовые клетки из амниотической жидкости человека в питательной среде, отличающаяся тем, что дополнительно содержит коллаген, эритропоэтин и эпидермальный фактор роста, а в качестве клеток амниотической жидкости она содержит стволовые клетки фенотипа CD73+/CD90+/CD105+/CK19+ при следующем содержании компонентов в 1 мл:

30	Суспензия стволовых клеток фенотипа CD73+/CD90+/CD105+/CK19+ амниотической жидкости человека	5×10 ⁴ -5×10 ⁵ клеток
	Питательная среда	0,01-0,3 мл
	Эритропоэтин	100-500 МЕ
35	Эпидермальный фактор роста	5-20 нг
	Коллаген	Остальное до 1 мл

40

45