

URZĄD PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ POLSKIEJ

DOKUMENT PATENTOWY

Na podstawie przepisów ustawy z dnia 30 czerwca 2000 r. Prawo własności przemysłowej (Dz.U. z 2013r. poz. 1410) został udzielony na rzecz:

STEM CELLS SPIN SPÓŁKA AKCYJNA, Wrocław, Polska

PATENT
NR 216716

NA WYNAŁAZEK PT.

Nowe zastosowanie homogenatu z komórek macierzystych wyprowadzonych z rosnącego poroża jeleniowatych (Cervidae)

*przedstawiony w opisie patentowym
włączonym do niniejszego dokumentu*

Patent trwa od dnia: **2011-01-24**

Warszawa, dnia **2014 -06- 09**

Z upoważnienia Prezesa

E. Głowacka
Ełzbieta Głowacka
ST INSPEKTOR

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **216716**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **393720**

(22) Data zgłoszenia: **24.01.2011**

(51) Int.Cl.

A01N 1/00 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61K 35/36 (2006.01)

(54) **Nowe zastosowanie homogenatu z komórek macierzystych wyprowadzonych z rosnącego poroża jeleniowatych (Cervidae)**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

30.07.2012 BUP 16/12

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.05.2014 WUP 05/14

(73) Uprawniony z patentu:

**STEM CELLS SPIN SPÓŁKA AKCYJNA,
Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

MAREK BOCHNIA, Wrocław, PL

MAREK CEGIELSKI, Wrocław, PL

WOJCIECH DZIEWISZEK, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Rafał Witek

PL 216716 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowe zastosowanie homogenatu komórkowego otrzymanego w wyniku rozbicia komórek należących do linii komórek macierzystych MIC-1 wyprowadzonej z rosnącego poroża jeleniowatych (Cervidae).

Ze stanu techniki znane są własności tkanki poroża jeleniowatych rozpoznawanej jako najszybciej rosnąca postać kości wśród tkanek ssaczy. Podejmowano próby wykorzystania własności wzrostowych tkanki przede wszystkim poprzez izolację czynników wzrostu. Zgłoszenie WO 2004/112806 ujawnia kompozycję do leczenia zaburzeń neuronalnych sporządzoną w oparciu o markery czynnika wzrostu pozyskiwane z poroża jeleniowatych. W 2005 r. Twórcy przedmiotowego wynalazku rozpoczęli badania procesów wzrostu poroża u jelenia szlachetnego (*Cervus elafus*). W toku przeprowadzonych eksperymentów, z rosnącego poroża jelenia szlachetnego wyprowadzono linię komórek macierzystych MIC-1. Stabilną linię komórkową zdeponowano w DSMZ pod numerem DSM ACC2854. W 2006 roku dokonano zgłoszenia patentowego P. 378963, którego przedmiotem jest nowa linia komórek macierzystych o symbolu MIC-1 z rosnącego poroża jeleniowatych (Cervidae), zastosowania tkanki z końcowych bocznych fragmentów wzrastającego poroża jeleniowatych do produkcji stabilnej linii komórek macierzystych, a także zastosowania tych komórek do rekonstrukcji ubytków kostnych i chrzęstnych u ludzi i zwierząt. Ze stanu techniki znane jest zgłoszenie P. 390 272 dostarczające homogenat komórkowy otrzymany w wyniku rozbicia komórek należących do linii komórek macierzystych MIC-1 wyprowadzonej z rosnącego poroża jeleniowatych (Cervidae), a także jego zastosowanie do wytwarzania preparatu do pielęgnacji i/lub leczenia skóry.

Przedmiotem wynalazku jest nowe zastosowanie homogenatu komórkowego otrzymanego w wyniku rozbicia komórek należących do linii komórek macierzystych MIC-1 wyprowadzonej z rosnącego poroża jeleniowatych (Cervidae) zdeponowanej w DSMZ pod numerem DSM ACC2854 do wytwarzania preparatu do regeneracji tkanki wybranej spośród tkanki mięśniowej, nerwowej i nabłonkowej.

Korzystnie, preparat stosowany jest w postaci kropli do oczu, maści ocznej, preparatu do wstrzykiwań lub preparatu do nasączenia spongostanu.

Korzystnie, skład kropli do oczu obejmuje w 1 ml homogenat w ilości 10 j.m./ml 50 mg lub 10 j.m./ml 25 mg oraz substancje pomocnicze.

Korzystnie, substancje pomocnicze wybrane są z grupy obejmującej alkohol poliwinylowy, sodu wodorofosforan, sodu dwuwodorofosforan, chlorek sodu, chlorek benzalkoniowy, wodę. Korzystnie, maść oczna zawiera homogenat w ilości 10 j.m./ml 50 mg. Korzystnie, preparat do wstrzykiwań zawiera homogenat w ilości 10 j.m./ml 100 mg. Korzystnie, preparat do nasączenia spongostanu zawiera homogenat w ilości 10 j.m./ml 100 mg.

Przedmiot wynalazku uwidoczniona na figurach, na których fig. 1 przedstawia wpływ homogenatu komórek MIC-1 na proliferację: fibroblastów (F), miocytów (M), chondrocytów (CH), hepatocytów (H).

Fibroblasty-homogenatMIC-1 (F+HMIC-1), miocyty-homogenatMIC-1 (M+HMIC1), chondrocyty-homogenatMIC-1 (CH+HMIC1), hepatocyty-homogenatMIC-1 (H+HMIC1), fig. 2 przedstawia powierzchnię uszkodzenia w pikselach po zastosowaniu kropli o stężeniu 0,5 min komórek/ml preparatu, fig. 3 przedstawia powierzchnię uszkodzenia w pikselach po zastosowaniu kropli o stężeniu 0,5 min komórek /ml preparatu, fig. 4a przedstawia odsłonięty nerw po 12 tygodniach doświadczenia, fig. 4b przedstawia nerw wypreparowany, widoczne szwy łączące wszczep z kikutami, fig. 4 przedstawia, fig. 5 przedstawia grupę kontrolną, 12 tygodni, wszczep nerwu kulszowego szczura, fig. 6 przedstawia grupę kontrolną 12 tygodni, wszczep nerwu kulszowego szczura, fig. 7 przedstawia grupę eksperymentalną 12 tygodni, obwodowa regeneracja wszczepu, fig. 8 przedstawia grupę eksperymentalną 12 tygodni, obwodowa regeneracja wszczepu, fig. 9 przedstawia grupę eksperymentalną 12 tygodni, włókna nerwowe w centrum wszczepu, fig. 10 przedstawia długość drogi (cm) i czas bezruchu (sekundy) myszy podczas 180 sekundowej wideo rejestracji, fig. 11a przedstawia obraz mięśnia bezpośrednio po uszkodzeniu, fig. 11b przedstawia obraz mięśnia po 14 dniach stosowania homogenatu, fig. 11c przedstawia obraz mięśnia bezpośrednio po uszkodzeniu, fig. 11d przedstawia obraz mięśnia po 14 dniach stosowania podłoża, fig. 12a przedstawia zwierzę z grupy eksperymentalnej: obraz nieomal niezmiennego mięśnia szkieletowego - końcowy etap, gojenia, fig. 12b przedstawia grupę eksperymentalną, w pełni zregenerowany mięsień szkieletowy - przekrój podłużny. Przebyte urazy potwierdzają pojedyncze jądra zlokalizowane w centralnych częściach włókien mięśniowych, fig. 13a przedstawia grupę kontrolną, widoczne są miotuby oraz tworząca się blizna po przebyłym zmiążdzeniu mięśnia, fig. 13b

przedstawia zwierzę z grupy kontrolnej - uszkodzony mięsień z regeneracją - w centrum widoczna blizna z tkanką resorbcyjną i komórkami olbrzymimi. Przedmiot wynalazku przedstawiają poniższe przykłady.

Przykład 1. **Badania *in vitro***

W badaniach *in vitro* wykazano m.in., że substancje zawarte w welwecie oraz w ekstrakcie z poroża jelenia stymulują proliferację fibroblastów, komórek śledziony oraz hematopoetycznych komórek macierzystych. Uwzględniając również obecność w porożu mięśniówki naczyń krwionośnych, przebadano oddziaływanie homogenatu komórek porožogennych na fibroblasty (tkanki łączna i nabłonkowa), komórki mięśni gładkich (tk. mięśniowa), chondroblasty (tk. łączna), hepatocyty (tk. nabłonkowa) i komórki nerwowe (tk. nerwowa).

Do badań użyto następujących referencyjnych linii komórkowych: mysie embrionalne fibroblasty (linia 3T3Balb) i ludzkie miocyty z aorty płodowej (UASMC). Pierwotną hodowlę chondroblastów wprowadzono z mechanicznie rozdrobnionych fragmentów chrząstki małżowiny usznej królika (samica rasy białej kalifornijskiej o wadze ok. 4 kg.). Do założenia, natomiast, hodowli pierwotnych hepatocytów oraz neuronów użyto fragmentów narządów pobranych z noworodka szczura (Wistar), które mechanicznie rozdrobniono i inkubowano w Sooth Muscle Growth Medium (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD, USA). Miocyty były hodowane w medium Sooth Muscle Growth Medium 2, natomiast pozostałe linie komórkowe w DMEM (Biowhittaker, Lonza, Verviers, Belgium) z dodatkiem 10% bydlęcej surowicy płodowej i 1% roztworu L-glutaminy, penicyliny i streptomycyny (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Germany). Hodowle były prowadzone w 37°C i w wilgotnej atmosferze zawierającej 5% CO₂. Czas potrzebny do uzyskania 70% konfluencji w butelce hodowlanej (75 cm²) wynosił dla: miocytów i neuronów - 5 dni, fibroblastów i chondroblastów - 10 dni, a dla hepatocytów - 21 dni. Badane komórki były usuwane z butelek hodowlanych za pomocą roztworu 0,25% trypsyna-EDTA (Sigma-Aldrich Chemie) i wysiewane w ilości 1 x 10⁵ komórek/dolek na płytkę 12 dołkową. Po 24 godzinach zmieniano medium i dodawano zhomogenizowaną zawiesinę komórek MIC-1 - homogenat w dawce 0,2 jednostki (jedna jednostka biologiczna to homogenat uzyskany z 1 000 000 komórek MIC-1). Płytki inkubowano 120 godzin. Po tym czasie komórki fotografowano i określano ich liczbę za pomocą testu kolorymetrycznego SRB (w teście kolorymetrycznym SRB określa się ilość związanego przez żywe komórki barwnika - sulforodaminy B). Komórki utrwalono 50% kwasem trój chlorooctowym, a następnie barwiono 0,4% roztworem SRB w 1% kwasie octowym przez 30 minut. Niezwiązany barwnik usuwano przez płukanie w 1% kwasie octowym, a barwnik związany z białkami komórek ekstrahowano 10 mM niezbuforowanym roztworem Tris. Gęstość optyczną roztworu (OD) odczytano w czytniku płytkowym Elx 800 (Bio-Tek, Instruments, Inc., USA) przy długości fali 562 nm. Kontrolę odczytu stanowiło samo medium podane opisanej procedurze. Wszystkie odczynniki do testu zostały zakupione w firmie Sigma.

Do oceny istotności różnic pomiędzy poszczególnymi grupami uzyskanych wyników zastosowano test t-Studenta, za istotną statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$. Wszystkie analizy statystyczne zostały przeprowadzone przy użyciu programu Statistica 7.1 StatSoft Polska.

Największy wzrost proliferacji otrzymano dla fibroblastów i miocytów, ponieważ ich liczba wzrosła o odpowiednio 32% i 28%. W hodowli chondroblastów z homogenatem komórek MIC-1 nastąpiło zwiększenie ich liczby o 19% w porównaniu do chondroblastów hodowanych bez dodatku homogenatu. Podobnie obserwowano stymulujący wpływ homogenatu na hepatocyty, których liczba wzrosła o 16% w porównaniu do hepatocytów niepoddanych jego działaniu (fig. 1). Różnice te były każdorazowo statystycznie istotne. Dla neuronów nie obserwowano przyrostu liczby komórek podczas hodowli z dodatkiem homogenatu. Po 120-godz. inkubacji wszystkich typów komórek z homogenatem nie wykazują one cech starzenia się (obkurczanie) jak ma to miejsce w przypadku komórek bez udziału homogenatu.

Mezenchymalne komórki macierzyste (MSC) wprowadzone do uszkodzonej tkanki uczestniczą w jej regeneracji. Po kilku tygodniach od podania pozostaje ich niewielka ilość, dlatego uważa się, że za regenerację odpowiadają wydzielane przez MSC czynniki modulujące mikrośrodowisko w miejscu uszkodzenia i indukujące w ten sposób przeżycie i proliferację endogennych komórek gospodarza. Do wymienionych czynników należą białka regulujące: hematopoezę, angiogenezę, gojenie ran, odpowiedź immunologiczną oraz mobilizację i proliferację hematopoetycznych komórek macierzystych. Podobny mechanizm obserwowaliśmy po podaniu porožogennych komórek macierzystych do ubytku chrząstki ucha oraz kości żuchwy królika. W odbudowanych tkankach obecne były skupiska niezróżnicowanych komórek macierzystych, które z czasem ulegały apoptozie. Także badania *in vitro* potwierdzają wpływ MSC na przeżycie i funkcje wydzielnicze innych komórek. Udział komórek MIC-1 w regeneracji uszkodzonych tkanek oraz opisany stymulujący wpływ substancji zawartych w porożu na proliferację

komórek i przyspieszenie gojenia się złamań skłonił nas do zbadania wpływu homogenatu komórek MIC-1 na różne typy komórek *in vitro*. Uzyskane wyniki wskazują na znaczną stymulację proliferacji fibroblastów i mioblastów przez homogenat komórek MIC-1 oraz mniejszy wpływ na proliferację chondroblastów i hepatocytów. Jedynie dla neuronów nie obserwowano przyrostu ich liczby podczas hodowli z dodatkiem homogenatu. Tym niemniej przeżywalność komórek przedłużyła się trzykrotnie, a neurony oprócz zwiększenia swoich rozmiarów wykształciły gęstą sieć wzajemnych połączeń. Hodowla komórek z dodatkiem homogenatu komórek porożogennych stwarza, tym samym, nowe możliwości na polu medycyny regeneracyjnej, dając możliwość pozyskania odpowiedniej ilości materiału do uzupełnienia ubytków wszystkich tkanek.

Przykład 2. Badania *in vivo*.

Tkanka nabłonkowa (rogówka). Do badań użyto 12 królików, młodych 8 mm samic, rasy białej Nowozelandzkiej, o wadze od 2,5 do 2,9 kg. Podczas doświadczenia zwierzęta przebywały w indywidualnych klatkach z nieograniczonym dostępem do wody i pożywienia, w cyklu 12 godzin światła: 12 godzin ciemności. Przed rozpoczęciem eksperymentu oczy wszystkich królików zbadano, aby wykluczyć istniejące nieprawidłowości rogówki, spojówki oraz pozostałych struktur przedniego odcinka gałki (komory przedniej, tęczówki). Przeprowadzono próbę fluoresceinową (ocena w filtrze kobaltowym odcinka przedniego po uprzednim podaniu 2% roztworu fluoresceiny do worka spojówkowego) i badanie w lampie szczelinowej - odchyłań od normy nie stwierdzono. U każdego zwierzęcia jedno oko było badane, a drugie oko stanowiło kontrolę. Erozję nabłonka rogówki wykonywano w następujący sposób: po miejscowym znieczuleniu Sol. Alcaine (chlorowodorek proxymetakainy 5mg/ml, Alcon) uszkażono nabłonek rogówki obu oczu każdego królika przez aplikację krążka o średnicy 3 mm, wykonanego z bibułki Whatmana nr 1, nasączonego w n-heptanolu (Sigma-Aldrich). Krążek nakładano na środek rogówki i pozostawiony na 30 sekund. Po jego usunięciu oko płukano izotonicznym roztworem wodnym 0,9% NaCl. W czasie eksperymentu, u 6 królików, każdorazowo do prawego oka (oko badane), podawano 3 razy dziennie w równych odstępach czasu (co 8 godz.) aż do ostatniego dnia, homogenat o stężeniu 0,5 jednostki/ml (krople nr 1) (3 oczy) i 0,25 jednostki /ml (krople nr 2) (3 oczy) w ilości 3 kropli. Jedna jednostka biologiczna to homogenat uzyskany z 1 000 000 komórek MIC-1, co odpowiada 1 mg masy komórkowej umieszczonej w 100 mg wody destylowanej. Do oka lewego, stanowiącego kontrolę, podawano w tym samym schemacie i ilości podłoże. U kolejnych 6 królików stosowano homogenat w postaci maści o stężeniu takim samym jak w przypadku kropli maść nr 1 i 2, podawane w tym samym schemacie stosując do każdego oka grudkę maści wielkości ziarna pieprzu. Ocenie podlegało uszkodzenie rogówki i szybkość jej gojenia się w badanej grupie (2 x 6) w porównaniu do kontroli. Aby ocenić szybkość gojenia się rany oczu królików były zabarwane 2% roztworem fluoresceiny i badane z przerwą 10 h pomiędzy wytworzeniem erozji rogówki, a początkiem pomiarów. Czas ten koresponduje z fazą opóźnienia w procesie gojenia ran rogówki obserwowanych *in vivo*. Oczy badano przy użyciu lampy szczelinowej, wykonywano próbę fluoresceinową oraz zdjęcia (dokumentacja fotograficzna) rogówek w grupie badanej i kontrolnej. Zdjęcia wykonywano podczas każdego badania, jak również, co dwie godziny przez pierwsze 10 godzin po urazie. Powierzchnię uszkodzenia rogówki mierzono w pikselach, analizując rozmiar uszkodzenia za pomocą programu komputerowego Adobe Photoshop CS4 Extended. Uzyskane wyniki uśredniano -oceniając zmniejszanie się powierzchni rany w czasie. Eksperyment kończono z uzyskaniem 100% zamknięcia każdej rany rogówki w obu grupach - badanej i kontrolnej. Wyniki zebrano w tabeli 1 oraz fig. 2 przedstawiającej powierzchnię uszkodzenia w pikselach po zastosowaniu kropli o stężeniu 0,5 min komórek /ml preparatu. Tabela 2 i fig. 3 przedstawia dane dla powierzchni uszkodzenia w pikselach po zastosowaniu maści o stężeniu 0,5 min komórek /ml preparatu.

Tabela 1

	Oko prawe		Oko lewe	
1	2	3	4	5
czas	średnia	SD	średnia	SD
0				

Ciąg dalszy tabeli 1

1	2	3	4	5
10	195735	11690	197212	4883
24	178169	10004	316094	15551
48	15175	981	95291	5462
72	0		19987	1885
82	0		0	

Tabela 2

Czas	Oko prawe		Oko lewe	
	Średnia	SD	Średnia	SD
0				
10	196968	11639	201174	8293
24	169675	12902	292304	13688
48	16110	4860	92942	12295
72	0		19133	2534
82	0		0	

We wszystkich oczach, do których podawano preparat (krople lub maść) z homogenatem MIC-1, proces gojenia przebiegał znacznie szybciej. W pierwszej dobie po zabiegu nie obserwowano też zwiększenia obszaru uszkodzenia rogówki. Wygojenie następowało tu przed upływem 72 godz. obserwacji. Korzystny wpływ obu preparatów był zbliżony. Preparaty o niższym stężeniu homogenatu wykazywały obniżoną o ok. 1/3 skuteczność.

Tkanka nerwowa (nerw kulszowy). Do badań użyto 8 młodych (2-3 miesięcznych) szczurów rasy Vistar, obu płci, o wadze od 240 do 310 g. Podczas doświadczenia zwierzęta przebywały w dwóch klatkach z nieograniczonym dostępem do wody i pożywienia, w cyklu 12 godzin światła: 12 godzin ciemności. Grupa eksperymentalną zestawiono z 4, a grupę kontrolną z 3 zwierząt (1 szczur padł w czasie doświadczenia - nie wybudził się z narkozy). Zwierzęta operowano w narkozie - znieczulenie ogólne dootrzewnowe: Ketamina z Xylazyna w dawce 75/5mg/kg masy ciała zwierzęcia. Operowano z użyciem mikroskopu operacyjnego, stosując narzędzia mikrochirurgiczne, w warunkach aseptycznych. Po ogoleniu okolicy operowanej i odkażeniu skóry - Octenisept (Schulke&Meyr GmbH, Nordstedt, Germany), okładano ją jałowymi chustami. Cięcie skórne długości ok. 2,5 cm prowadzono wzdłużnie, po stronie zewnętrznej uda. Po rozwarstwieniu mięśni uda, na tępo uwidaczniano nerw kulszowy, leżący pomiędzy mięśniami grupy tylnej i przyśrodkowej mięśni uda oraz trzonem kości udowej. Nerw uwalniano na długości ok. 1,5 cm i wycinano fragment jego pnia o długości 1 cm. Wycięty fragment nerwu wszczepiano ponownie, łącząc kikuty obustronnie - zakładając cztery tj. po dwa niewchłaniające szwy epineuralne 4/0 Nylon Monofilament MEDICO(SHJIAZHUANG)INDUSTRIES AND TRADE CO.,LTD. Pod wszczep podkładano wzdłuż płatek Spongostanu® - wchłaniającej gąbki żelatynowej produkcji Johnson & Johnson Warsaw, Poland, o wymiarach 1x0,5 cm, nasączony homogenatem komórkowym o stężeniu 1 jednostka na 1 ml 0,9% NaCl. Ranę zaszywano jednowarstwowo, skórę odkażano ponownie Octeniseptem i pozostawiano odkrytą. W grupie kontrolnej stosowano Spongostan®, nasączony wyłącznie 0,9% NaCl. Przebieg pooperacyjny u wszystkich wybudzonych zwierząt był prawidłowy. Rany goiły się przez rychłozrost, szwy skórne zdejmowano w siódmej dobie po zabiegu. Zaobserwowano wyraźnie szybsze gojenie się ran w grupie eksperymentalnej. Po upływie dwunastu tygodni zwierzęta uśmiercano przez podanie Tiopentalu w dawce 120 mg/kg. Wypreparowywano mikrochirurgicznie operowany nerw, pobierając jego fragment obejmujący odcinek bliższy, wszczep i odcinek dalszy (fig. 4a i 4b). Pobrany wszczep dzielono na odpowiednie trzy części i umieszczano w 4% roztworze zbuforowanej formaliny. Porównując wyniki z grupy kontrolnej (fig. 5, 6) i eksperymentalnej (fig. 7, 8, 9) zasadnicza różnica zachodzącej regeneracji nerwu w obrębie wszczepu dotyczyła obwodu obszaru pęczków włókien nerwowych w miejscach podłożenia gąbki żelatynowej, nasączonej homogenatem komórkowym MIC-1. W miejscach tych obserwuje się aktywację i pobudzenie komórek nanerwia i zwiększoną