

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: прекратил действие, но может быть восстановлен (последнее изменение статуса: 16.05.2019)
Полшина: учтена за 6 год с 20.06.2017 по 19.06.2018

(21)(22) Заявка: 2012125282/10, 19.06.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента: 19.06.2012

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 19.06.2012

(45) Опубликовано: 27.10.2013 Бюл. № 30

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2391397 C2, 10.06.2010. RU 2087146 C1, 20.08.1997.

Адрес для переписки:
129226, Москва, пр-кт Мира, 171, кв.19,
Н.Ф. Давиденко

(72) Автор(ы):

**Бочарова Ирина Владимировна (RU),
Вишнякова Хава Сафудолова (RU),
Гергерт Владислав Яковлевич (RU),
Егоров Егор Евгеньевич (RU),
Ерохин Владислав Всеволодович (RU),
Дупатов Алексей Юрьевич (RU),
Поселов Алексей Львович (RU),
Поселов Лев Евгеньевич (RU),
Ярыгин Константин Никитич (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное учреждение "Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза" Российской академии медицинских наук (RU)(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА У МЫШЕЙ ЛИНИИ C57BL/6(н-2^b)

(57) Реферат:

Изобретение относится к области ветеринарии и клеточных технологий. Предложен способ лечения экспериментального туберкулеза легких у мышей с использованием трансплантации стволовых клеток путем введения в хвостовую вену мышей один раз в неделю суспензии стволовых клеток, выделенных из костей мышей гибридов, резистентных к туберкулезу, с генотипом "к" в области Н-2Е. 3 табл.

Изобретение относится к области ветеринарии, а именно к способу лечения экспериментального туберкулеза легких у животных с использованием клеточных биотехнологий.

Известен способ лечения экспериментального туберкулеза легких у животных [SU 1727840, А1, А61К 35/39, 23.04.1992], заключающийся в том, что гомогенат замороженной ксеногенной поджелудочной железы размораживают до 37°С в течение 1,5 ч и вводят однократно подкожно в дозе 0,2-0,3 мл.

Недостатком способа является его относительно низкая эффективность лечения. Известен также способ [RU 2436582, С1, А61К 31/7036, А61Р 31/06, 20.12.2011], согласно которому животному вводят стрептомицин, обработанный 0,15±0,05%-ным раствором формалина при 40,0±2,0°С в течение 5-7 суток в суточной дозе 25 мг/кг веса животного внутримышечно.

Недостатком этого способа также является его относительно низкая эффективность лечения.

Кроме того, известен способ получения стимулированных дендритных клеток для индукции иммунного ответа против туберкулеза, также [RU 2401664, С1, А61К 39/00, С12Н 5/0784, 20.10.2010], основанный на заборе у пациента незрелых дендритных клеток, их культивирования ex vivo для созревания и формирования аллостимуляторной активности, при этом, клетки дополнительно собирают антигеном и вводят их той же пациенту для формирования адаптивного иммунитета, а при культивировании ex vivo незрелых дендритных клеток в культуральную среду вводят фрагментированную аллогенную двуцепочечную геномную ДНК с фрагментами, размером 200-6000 п.о. в количестве 5 мкг/мл среды.

Этот способ также характеризуется относительно низкой эффективностью лечения.

Кроме указанных направлений в способах лечения туберкулеза в последние годы разработаны и способы, основанные на применении клеток костномозгового происхождения для лечения туберкулезного процесса у человека и животных.

Одним из таких подходов является клеточная терапия стволовыми клетками, которая, с одной стороны, может позволить скорректировать несостоятельность иммунитетных больных туберкулезом, а, с другой стороны, способствовать регенерации поврежденных тканей организма. Тем не менее, в современной клинической практике клеточная трансплантация редко используется для лечения инфекционных заболеваний и, в частности, туберкулеза. Отчасти это может быть связано с недостаточно изученными механизмами терапевтического действия стволовых клеток, а также с определенными методическими трудностями, связанными с получением и стандартизацией клеточного материала.

Также важной проблемой остается проявление реакции «трансплантат против хозяина».

Таким образом, необходимым условием широкого внедрения способов клеточной терапии туберкулеза является фундаментальное изучение механизмов, контролирующей реакцию «трансплантат против хозяина». Стоит отметить, что успешное внедрение в медицинскую практику методов клеточной терапии зависит, прежде всего, от правильного подбора клеточного материала, который был бы не только адекватен поставленной задаче, но и не вызывал бы иммунного ответа на введение в организм реципиента. Вместе с тем, механизмы взаимодействия трансплантированного клеточного материала с организмом реципиента до сих пор мало изучены. В то же время, отторжение трансплантата может привести к тяжелым осложнениям и даже смерти реципиента.

В настоящем изобретении используется выявленная роль сублокуса главного комплекса гистосовместимости Н-2Е мыши в проявлении положительного эффекта трансплантации мезенхимальных стволовых клеток зараженным микобактериями туберкулеза мышам, что позволяет повысить эффективность лечения туберкулеза легких у животных, который проявляется через объективный фактор увеличения длительности жизни после проведения процедур.

Наиболее близким по технической сущности к предложенному является способ лечения экспериментального туберкулеза у мышей [RU 2391397, С2, А61Р 31/06, 10.06.2010], включающий введение мышам суспензии клеток костного мозга, выделенных из хвостовой кости инбредной линии мышей АКР, резистентной к туберкулезу, в хвостовую вену один раз в неделю в дозе 6 млн. клеток на мышь в течение двух месяцев.

Недостатком способа является относительно высокая сложность, поскольку для его реализации необходима доза в 6 млн. клеток на мышь. Известный способ отличается также относительно узкой областью применения, поскольку терапия проводится только одной инбредной линией АКР.

Требуемый результат заключается в упрощении способа путем снижения дозы вводимых клеток за счет замены их клетками, которые могут культивироваться и более эффективно влиять на выживаемость, а также расширение области применения.

Авторы настоящего изобретения в процессе исследований in vivo и in vitro обнаружено, что в качестве такого средства могут быть использованы специальные гибриды F₁ от определенных рекомбинантных линий мышей для получения нужных сочетаний аллелей в сублокусе Н-2Е главного комплекса гистосовместимости мыши (аллель k).Таким образом, требуемый результат достигается тем, что, в способе лечения экспериментального туберкулеза у мышей линии C57BL/6 (Н-2^b), основанном на трансплантации стволовых клеток путем введения в хвостовую вену мышей один раз в неделю суспензии стволовых клеток, выделенных из костей мышей, резистентных к туберкулезу, согласно изобретению в качестве стволовых клеток используют культивируемые in vitro клеточные культуры мезенхимального происхождения с генотипом "к" сублокусе Н-2Е главного комплекса гистосовместимости, которые выделяют от следующих гибридов мышей: В10.А(5R), В10.S(9R), В10.А, А/Sn и от гибридов между ними и мышами линии АКР: (В10.А(5R)×В10.А) F₁ (В10.S(9R)×В10.А) F₁, (В10.А(5R)×А/Sn) F₁, (В10.S(9R)×А/Sn) F₁, а суспензию стволовых клеток вводят в хвостовую вену зараженным мышам в течение двух недель по одному разу в неделю в дозе 1 млн. клеток.Эффективность трансплантации была подтверждена использованием культивируемых in vitro мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга гибридов F₁ от рекомбинантных линий мышей в условиях in vivo (выживаемость).

Исследования действия стволовых клеток проводились in vivo на мышиной модели активного экссудативно-некротического туберкулеза.

Определялся показатель выживаемости животных (инбредная линия мышей C57BL/6) после заражения их смертельной дозой микобактерий туберкулеза Н₃₇Rv.

Материал и методы.

Клетки костного мозга получали от мышей инбредной линии АКР и рекомбинантных линий В10.А(5R), В10.S(9R), В10.А, А/Sn и гибридов F₁ между ними: (В10.А(5R)×В10.А) F₁, (В10.S(9R)×В10.А) F₁, (В10.А(5R)×А/Sn) F₁, (В10.S(9R)×А/Sn) F₁. Самцов 8-10 недельного возраста выводили из эксперимента разрушением шейного отдела спинного мозга. Стерильно извлекали бедренные кости, освобождали их от мягких тканей. Эпифизы полученных костей отделяли, а диафизы с помощью инсулиновых шприцов стерилизовали ротовой средой, состоящей из DMEM (ПанЭко, РФ), содержащей 15% эмбриональной телячьей сыворотки с подтвержденной способностью поддерживать рост мезенхимных стволовых клеток (БиоЛот, РФ), 40 ед./мл гентамицина (ПанЭко, РФ) и 12 мМ L-глутамина (ПанЭко, РФ). Выделенные из диафизов костей клетки помещали в конические пробирки (содержимое 1 кости в 1 пробирку), содержащие 5 мл ростовой среды, и центрифугировали 10 мин при 400g. Осадок из каждой пробирки слегка ресуспендировали, не добывая образования строго одноклеточной суспензии в ростовой среде, и высевали в 10 см чашки Петри (Costar,CUIA), содержащие 10 мл среды. Содержимое одной пробирки высевали на 3 чашки. Культивирование клеток проводили в специализированном CO₂-инкубаторе (модель 484, ThermoFogma, USA) в атмосфере, содержащей 5% CO₂ и 3% кислорода.Через 24 часа чашки промывали 3 раза полной ростовой средой, смывые клетки удаляли. К оставшимся клеткам добавляли полную ростовую среду, которую меняли каждые три дня. Через 9 дней клетки для снятия с пластика два раза промывали теплым раствором, содержащим 0,25% раствора трипсина (ПанЭко, РФ) в смеси с Версеном (ПанЭко, РФ) в соотношении 1:1 и оставляли для снятия в третьей смене раствора. К снятым клеткам добавляли 10-кратный избыток среды с сывороткой. Эти клетки (мезенхимальные стволовые клетки) отмывали полной ростовой средой, осаждали, подсчитывали количество клеток, ресуспендировали в нужном объеме физиологического раствора и вводили внутривенно зараженным МБТ мышам в количестве 1×10⁶ клеток в 0,3 мл физиологического раствора на мышь. Клетки этой фракции трансплантировали зараженным микобактериями туберкулеза (МБТ) мышам два раза - по одному разу в неделю через 7 дней после заражения.После двух внутривенных трансплантаций первичных клеточных культур от мышей инбредной линии АКР и рекомбинантных линий мышей и их гибридов F₁, было проведено наблюдение за сроками выживаемости зараженных мышей C57BL/6.В таблице 1 приведены генотипы инбредной линии АКР и гибридов F₁, полученных от скрещиваний рекомбинантных линий мышей, использованных в работе.

Генотипы линии АКР и гибридов F ₁ , полученных от скрещиваний рекомбинантных линий мышей.				
Гибриды F ₁	Генотип по Н-2 гибридов F ₁			
	К	А	Е	Д
АКР	k	k	k	k
5R×A/Sn	$\frac{b}{k}$	$\frac{b}{k}$	$\frac{b/k}{k/d}$	$\frac{d}{d}$
5R×В10.А	$\frac{b}{k}$	$\frac{b}{k}$	$\frac{b/k}{k/d}$	$\frac{d}{d}$
9R×A/Sn	$\frac{s}{k}$	s	$\frac{s/k}{k/d}$	$\frac{d}{d}$
9R×В10.А	$\frac{s}{k}$	s	$\frac{s/k}{k/d}$	$\frac{d}{d}$

В таблице 2 приведены сроки гибели зараженных МБТ мышей после трансплантации им первичных клеточных культур, полученных из костного мозга рекомбинантных линий. Как видно из таблицы, статистически достоверной разницы в сроках выживания опытных мышей по сравнению с контролем выявлено не было. Отличие составляла инбредная линия АКР, поскольку введение первичных клеточных культур из ККМ от мышей этой линии значительно увеличивала продолжительность жизни зараженных животных линии C57BL/6 по сравнению с контролем (p<0,0001).

Выживаемость (дни) зараженных мышей линии C57BL/6 после трансплантации им первичных мезенхимальных клеточных культур, полученных из ККМ от линий АКР и рекомбинантных линий мышей					
Контроль	АКР	А/Sn	В10.А	В10.А(5R)	В10.С(9R)
18	38	16	16	18	19
22	42	18	19	20	20
24	42	18	24	20	20
25	42	20	24	21	24
26	42	23	26	22	24
27	42	27	28	24	24
29	44	28	29	28	27
24,4±1,3	41,7±0,68	21,4±1,7	23,7±1,7	21,8±1,2	24,8±1,2
	p<0,0001				

В то же время трансплантация первичных клеточных культур от мышей инбредной линии АКР и от гибридов F₁ (Табл.3) значительно увеличивала сроки жизни опытных мышей по сравнению с контролем. Разница во всех случаях была статистически достоверной. Исключение составляли первичные клеточные культуры мезенхимальных клеток от гибридов (В10.А(5R)×В10.А) F₁, поскольку трансплантация этих клеток зараженным МБТ мышам продляла сроки жизни подопытных мышей не столь значительно по сравнению с контролем.

Выживаемость (дни) зараженных мышей линии C57BL/6 после трансплантации им первичных мезенхимальных клеточных культур, полученных из ККМ от линий АКР и рекомбинантных линий мышей					
Контроль	АКР	(В10.А(5R)×А/Sn) F ₁	(В10.С(9R)×А/Sn) F ₁	(В10.А(5R)×В10.А) F ₁	(В10.С(9R)×В10.А) F ₁
18	38	28	28	24	32
22	42	28	49	24	33
24	42	28	50	25	34
25	42	42	53	25	35
26	42	56	56	28	39
27	42	57	59	30	43
29	44	57	68	34	46
24,4±1,3	41,7±0,68	42,3±5,4	51,9±4,7	27,1±1,4	37,4±2,0
	p<0,0001*	p<0,0077*	p<0,0001*		p<0,0002*

* - p по сравнению с контролем

Увеличение сроков жизни зараженных мышей линии C57BL/6 после трансплантации им первичных клеточных культур от гибридов F₁ в отличие от родительских рекомбинантных линий, объясняется генетической комплементарией, произошедшей в сублокусе Н-2Е главного комплекса гистосовместимости Н-2 мышине после получения гибридов F₁ в результате чего этот сублокус стал иметь в генотипе аллель "к" в транс-положении и функциональность этого сублокуса была восстановлена (см. таблицу 1). Мыши инбредной линии АКР имеют с сублокусе Н-2Е аллель "к".Таким образом, благодаря усовершенствованию известного способа, достигается требуемый результат, заключающийся в упрощении способа и расширении области применения, что проявляется в уменьшении дозы вводимых стволовых клеток и обеспечивается действием положительного эффекта аллогенной трансплантации первичных клеточных культур мезенхимального происхождения, имеющих генотип Н-2^k (мышь линии АКР и гибриды F₁ от рекомбинантных линий мышей),зараженным мышам линии C57BL/6 (Н-2^b). Помимо этого, при помощи использования специальных гибридов F₁ от рекомбинантных линий мышей, показано, что положительные результаты аллогенной трансплантации контролируются сублокусом Н-2Е главного комплекса гистосовместимости мыши, несущим аллель "к".

Формула изобретения

Способ лечения экспериментального туберкулеза у мышей линии C57BL/6(Н-2^b), основанный на трансплантации стволовых клеток путем введения в хвостовую вену мышей один раз в неделю суспензии стволовых клеток, выделенных из костей мышей, резистентных к туберкулезу, отличающийся тем, что в качестве стволовых клеток используют культивируемые in vitro клеточные культуры мезенхимального происхождения с генотипом "к" в сублокусе Н-2Е главного комплекса гистосовместимости, которые выделяют от следующих гибридов мышей: В10.А(5R), В10.S(9R), В10.А, А/Sn, и от гибридов между ними и мышами линии АКР: (В10.А(5R)×В10.А)F₁, (В10.S(9R)×В10.А)F₁, (В10.А(5R)×А/Sn)F₁, (В10.S(9R)×А/Sn)F₁, а суспензию стволовых клеток вводят в хвостовую вену зараженным мышам в течение двух недель по одному разу в неделю в дозе 1 млн клеток.

ИЗВЕЩЕНИЯ

ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Дата прекращения действия патента: 20.06.2014

Дата публикации: 10.07.2015

НФ4А Восстановление действия патента

Дата, с которой действие патента восстановлено: 10.09.2015

Дата внесения записи в Государственный реестр: 25.08.2015

Дата публикации: 10.09.2015

ММ4А Досрочное прекращение действия патента из-за неуплаты в установленный срок пошлины за поддержание патента в силе

Дата прекращения действия патента: 20.06.2018

Дата внесения записи в Государственный реестр: 06.05.2019

Дата публикации и номер бюллетеня: 06.05.2019 Бюл. №13