



(51) МПК  
*C12N 5/0775* (2010.01)  
*C12N 5/0797* (2010.01)  
*A61L 27/38* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2014105337/10, 14.02.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 14.02.2014

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 14.02.2014

(45) Опубликовано: 27.01.2015 Бюл. № 3

(56) Список документов, цитированных в отчете о  
 поиске: WO 2009101214 A1, 20.08.2009 . US  
 20070092550 A1, 26.04.2007 . EP 2089073 B1,  
 07.09.2011 . RU 2242190 20.12.2004 C2

Адрес для переписки:

127486, Москва, Бескудниковский б-р, 59А,  
 ФГБУ "МНТК "Микрохирургия глаза" им. акад.  
 С.Н. Федорова" Минздрава России, патентно-  
 лицензионный отдел

(72) Автор(ы):

Борзенко Сергей Анатольевич (RU),  
 Желтоножко Александра Александровна  
 (RU),  
 Комах Юрий Алексеевич (RU),  
 Арбуханова Патимат Магомедовна (RU),  
 Сабурова Ирина Николаевна (RU),  
 Репин Вадим Сергеевич (RU),  
 Колокольцова Тамара Дмитриевна (RU),  
 Кошелева Настасья Владимировна (RU),  
 Зурина Ирина Михайловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
 учреждение "Межотраслевой научно-  
 технический комплекс "Микрохирургия  
 глаза" имени академика С.Н. Федорова"  
 Министерства здравоохранения Российской  
 Федерации (RU)

(54) СПОСОБ ПОДГОТОВКИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР В ВИДЕ СФЕРОИДОВ ДЛЯ  
 ФОРМИРОВАНИЯ БИОИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ПЕРЕДНИХ СЛОЕВ ИСКУССТВЕННОЙ  
 РОГОВИЦЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, офтальмологии и биотехнологии. Предложен способ подготовки клеточных культур в виде сфероидов для формирования передних слоев искусственной роговицы, включающий

использование кусочков лимба. Изобретение может использоваться для конструирования передних слоев искусственной роговицы с целью компенсации поврежденных тканей роговицы глаза. 1 пр.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C12N 5/0775* (2010.01)  
*C12N 5/0797* (2010.01)  
*A61L 27/38* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: 2014105337/10, 14.02.2014

(24) Effective date for property rights:  
14.02.2014

Priority:

(22) Date of filing: 14.02.2014

(45) Date of publication: 27.01.2015 Bull. № 3

Mail address:

127486, Moskva, Beskudnikovskij b-r, 59A, FGBU  
"MNTK "Mikrokhirurgija glaza" im. akad. S.N.  
Fedorova" Minzdrava Rossii, patentno-litsenzionnyj  
otdel

(72) Inventor(s):

**Borzenok Sergej Anatol'evich (RU),  
Zheltonozhko Aleksandra Aleksandrovna (RU),  
Komakh Jurij Alekseevich (RU),  
Arbukhanova Patimat Magomedovna (RU),  
Saburina Irina Nikolaevna (RU),  
Repin Vadim Sergeevich (RU),  
Kolokol'tsova Tamara Dmitrievna (RU),  
Kosheleva Nastas'ja Vladimirovna (RU),  
Zurina Irina Mikhajlovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe  
uchrezhdenie "Mezhotraslevoj nauchno-  
tekhnicheskij kompleks "Mikrokhirurgija glaza"  
imeni akademika S.N. Fedorova" Ministerstva  
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (RU)**

(54) **METHOD OF PREPARING CELLULAR CULTURES IN FORM OF SPHEROIDS FOR FORMATION OF BIOLOGICALLY ENGINEERED CONSTRUCTION OF FRONT LAYERS OF ARTIFICIAL CORNEA**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to field of medicine, ophthalmology and biotechnology. Claimed is method of preparing cellular structures in form of spheroids for formation of front layers of artificial

cornea, which includes application of parts of limbus.

EFFECT: invention can be applied for construction of front layers of artificial cornea in order to compensate damaged tissues of eye cornea.

1 ex

RU 2 539 831 C1

RU 2 539 831 C1

Изобретение относится к области медицины, в частности к офтальмологии, и может быть использовано для формирования биоинженерной конструкции передних слоев искусственной роговицы на основе тканевого матрикса и культивированных клеток лимбальной зоны глазного яблока.

5 Разработки в области создания биоинженерных конструкций искусственной роговицы являются одними из самых перспективных для решения проблемы дефицита донорских роговиц. Материал для создания биоинженерных конструкций тканевых матриц искусственных роговиц должен обладать прозрачностью, биосовместимостью, биоинертностью, адгезивностью, заданной стабильностью к биodeградации, иметь  
10 определенную пористость, высокую прочность на разрыв и эластичность.

Помимо выбора каркасной биополимерной конструкции, существует проблема ее заполнения клеточными элементами. Лимбальная зона глазного яблока является источником стволовых/прогениторных эпителиоидных и мезенхимальных клеток роговицы. Однако они, при длительном культивировании в монослое, меняют свой  
15 фенотип, теряют функциональные характеристики и становятся неспособными к заселению трехмерного матрикса. В настоящее время клеточные технологии находятся на этапе перехода на 3D культивирование. Технология культивирования 3D сфероидов из клеток лимбальной зоны трупного глаза человека позволяет длительно и полноценно  
20 сохранять фенотип и функциональные свойства специализированных клеток роговицы и может быть использована для создания биоинженерной конструкции передних слоев искусственной роговицы на базе тканевого матрикса из спидроина.

Авторам не известны аналоги способов подготовки клеточных культур в виде сфероидов для формирования передних слоев искусственной роговицы.

25 Задачей изобретения является способ подготовки клеточных культур в виде сфероидов для формирования передних слоев искусственной роговицы, созданной на основе тканевого матрикса и функционально дифференцированных клеток.

Техническим результатом, достигаемым при использовании изобретения, является возможность использования технологии 3D культивирования стромальных и эпителиоидных клеток лимбальной зоны на основе сфероидных технологий для  
30 конструирования передних слоев искусственной роговицы, с целью полной или частичной компенсации поврежденных тканей роговицы.

Технический результат достигается тем, что в способе подготовки клеточных культур в виде сфероидов для формирования передних слоев искусственной роговицы, изолированные кусочки лимба переносятся в чашки Петри диаметром 100 мм в раствор  
35 Хенкса (NaCl 80,0 г/л, KCl 4,0 г/л, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 1,0 г/л, MgCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O 1,0 г/л, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 0,9 г/л, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,6 г/л, глюкоза 10,0 г/л, CaCl<sub>2</sub> 1,4 г/л, феноловый красный 2,0 г/л) с антибиотиками (пенициллин 250000 международных единиц и стрептомицин 200,0 мг), тщательно отмываются, механически измельчаются с помощью ножниц, ферментативно диссоциируются в 0,25% растворе трипсина, центрифугируются,  
40 высеваются в пластиковые чашки Петри в высокой плотности (100000 клеток/мл) в полную ростовую среду следующего состава: DMEM 445 мл; F12 445 мл; L-глутамин 1,5 г; пенициллин 250000 международных единиц; стрептомицин 200,0 мг; инсулин-трансферрин-селенит ×100 10 мл; сыворотка крови эмбрионов коров 100 мл (из расчета на 1000 мл раствора), культивируются со сменой среды каждые 2-3 дня, после второго  
45 пассажа клетки снимаются с чашек Петри с помощью растворов версена (натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты) и 0,25%-ного трипсина, центрифугируются, высеваются в концентрации 300000 клеток/мл на агарозные планшеты, помещенные в лунки 12-луночных культуральных планшетов в полной ростовой среде, культивируются

в термостатируемой камере прибора Cell-IQ (Chip Man Technologies, Финляндия) в стандартных условиях (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), тканевые матриксы заселяются 7-дневными сфероидными, сфероиды снимаются с агарозных планшетов полной ростовой средой, пассивно осаждаются в центрифужных пробирках по 15 мл, ресуспендируются в 200 мкл той же среды, переносятся по 300 единиц на тканевые матриксы, через 30 мин в лунки планшетов с клетками добавляется полная ростовая среда до 1 мл, накрываются планшеты специальной крышкой и помещаются в термостатируемую камеру прибора Cell-IQ (Chip Man Technologies, Финляндия) и культивируются в стандартных условиях (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

Изобретение поясняется следующим примером.

#### Пример

Первичные культуры эпителиоидных и стромальных клеток получали из тканевых сегментов лимба трупного глаза человека. Изолированные кусочки лимба переносили в 100 мм чашки Петри в раствор Хенкса (NaCl 80,0 г/л, KCl 4,0 г/л, MgSO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 1,0 г/л, MgCl<sub>2</sub>×6H<sub>2</sub>O 1,0 г/л, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×7H<sub>2</sub>O 0,9 г/л, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,6 г/л, глюкоза 10,0 г/л, CaCl<sub>2</sub> 1,4 г/л, феноловый красный 2,0 г/л) с антибиотиками (пенициллин 250000 международных единиц и стрептомицин 200,0 мг), тщательно отмывали, механически измельчали с помощью ножниц и ферментативно диссоциировали в 0,25% растворе трипсина (ПанЭко, Россия). После фильтрации клетки центрифугировали (8 мин, g=100 см<sup>2</sup>/с) и высевали в пластиковые чашки Петри в высокой плотности (100000 клеток/мл) в полную ростовую среду (на 1000 мл раствора: DMEM 445 мл; F12 445 мл; L-глутамин 1,5 г; пенициллин 250000 международных единиц; стрептомицин 200,0 мг; инсулин-трансферрин-селенит ×100 10 мл; сыворотка крови эмбрионов коров (HyClone, США) 100 мл). Культивировали в CO<sub>2</sub> - инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub> и 37°C со сменой среды каждые 2-3 дня, после второго пассажа снимали с чашек Петри с помощью растворов версена (натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты) и 0,25%-ного трипсина, центрифугировали (7 мин, g=100 см<sup>2</sup>/с) и высевали в концентрации 300000 клеток/мл на агарозные планшеты (Microtissues™, США), помещенные в лунки 12-луночных культуральных планшетов (Corning, США) в полной ростовой среде. Культивировали в термостатируемой камере прибора Cell-IQ (Chip Man Technologies, Финляндия) в стандартных условиях (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

Для подсчета количества клеток и их жизнеспособности использовали автоматический счетчик клеток Countess (Invitrogen, США).

Для заселения тканевых матриксов использовали 7-дневные сфероиды из стволовых/прогениторных эпителиоидных и мезенхимальных клеток лимбальной зоны глазного яблока. Сфероиды снимали с агарозных планшетов полной ростовой средой, пассивно осаждали в центрифужных пробирках по 15 мл, ресуспендировали в 200 мкл той же среды, переносили по 300 единиц на тканевые матриксы. Через 30 мин в лунки планшетов с клетками добавляли полную ростовую среду до 1 мл, накрывали планшеты специальной крышкой, помещали в термостатируемую камеру прибора Cell-IQ (Chip Man Technologies, Финляндия) и культивировали в стандартных условиях (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

Таким образом, предлагаемое изобретение позволяет использовать технологию 3D культивирования стволовых/прогениторных эпителиоидных и мезенхимальных клеток лимбальной зоны глазного яблока на основе сфероидных технологий для конструирования передних слоев искусственной роговицы с целью полной или частичной

компенсации поврежденных тканей роговицы.

#### Формула изобретения

Способ подготовки клеточных культур в виде сфероидов для формирования передних  
5 слоев искусственной роговицы, включающий изолирование кусочков лимба, перенос  
в чашки Петри в раствор Хенкса с антибиотиками, тщательное отмывание, механическое  
измельчение с помощью ножниц, ферментативную диссоциацию в 0,25% растворе  
трипсина, центрифугирование, высевание в пластиковые чашки Петри в плотности  
10 100000 клеток/мл в среду, из расчета на 1000 мл раствора, следующего состава: DMEM  
445 мл; F12 445 мл; L-глутамин 1,5 г; пенициллин 250000 международных единиц;  
стрептомицин 200,0 мг; инсулин-трансферрин-селенит  $\times 100$  10 мл; сыворотка крови  
эмбрионов коров 100 мл, культивирование со сменой среды каждые 2-3 дня, снятие с  
15 чашек Петри после второго пассажа клеток с помощью растворов версена и 0,25%-  
ного трипсина, центрифугирование, высевание в концентрации 300000 клеток/мл на  
агарозные планшеты, помещение в лунки 12-луночных культуральных планшетов в  
полной ростовой среде, культивирование в термостатируемой камере прибора Cell-IQ  
при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>, заселение тканевых матриксов 7-дневными сфероидами  
из стволовых эпителиоидных и мезенхимальных клеток лимбальной зоны глазного  
яблока, снятие клеток с подложки с использованием растворов версена и 0,25%-ного  
20 трипсина, центрифугирование, ресуспендирование, доведение до концентрации 600000  
клеток в 200 мкл среды и помещение на тканевые матриксы, помещение в  
термостатируемую камеру прибора Cell-IQ и культивирование при температуре 37°C  
и 5% CO<sub>2</sub>.

25

30

35

40

45