



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 38/18 (2023.05); C12N 5/00 (2023.05)

(21)(22) Заявка: 2023101769, 25.01.2023

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 25.01.2023

Дата регистрации:
 21.09.2023

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 25.01.2023

(45) Опубликовано: 21.09.2023 Бюл. № 27

Адрес для переписки:
 656049, г. Барнаул, пр. Ленина, 61, ФГБОУ ВО
 "Алтайский государственный университет",
 ЦРТПТТУИС

(72) Автор(ы):

Халимов Руслан Ильхомович (RU),
 Омелько Николай Александрович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 образовательное учреждение высшего
 образования "Алтайский государственный
 университет" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2748234 C2, 21.05.2021. RU
 2651521 C1, 19.04.2018. CN 108546671 A1,
 18.09.2018. US 20210245074 A1, 12.08.2021.
 KUMAR A, et. al. The polysaccharide chitosan
 facilitates the isolation of small extracellular
 vesicles from multiple biofluids. *J Extracell
 Vesicles*. 2021 Sep;10(11):e12138. doi: 10.1002/
 jev2.12138. CASTELLANO J.J. et. al. LncRNA
 (см. прод.)

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОЧИЩЕННЫХ СЫВОРОТОК КУЛЬТУРАЛЬНЫХ, ОБЕДНЁННЫХ ФАКТОРАМИ РОСТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно к получению компонентов питательных сред для культур клеток эукариот. Предложен способ получения очищенных культуральных сывороток крови,

обедненных микровезикулами, и содержащих пониженное количество факторов роста и прочих биологически активных молекул. 2 ил., 2 пр., 1 табл.

(56) (продолжение):

Quantification from Extracellular Vesicles Isolated from Blood Plasma or Conditioned Media. *Methods Mol Biol*. 2021;2348:285-304. doi: 10.1007/978-1-0716-1581-2_20.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 38/18 (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
C12N 5/02 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
A61K 38/18 (2023.05); C12N 5/00 (2023.05)

(21)(22) Application: **2023101769, 25.01.2023**

(24) Effective date for property rights:
25.01.2023

Registration date:
21.09.2023

Priority:

(22) Date of filing: **25.01.2023**

(45) Date of publication: **21.09.2023** Bull. № 27

Mail address:
**656049, g. Barnaul, pr. Lenina, 61, FGBOU VO
"Altajskij gosudarstvennyj universitet",
TSRTPTTUIS**

(72) Inventor(s):

**Khalimov Ruslan Ilkhomovich (RU),
Omelko Nikolaj Aleksandrovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe
obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego
obrazovaniya "Altajskij gosudarstvennyj
universitet" (RU)**

(54) **METHOD OF PRODUCING PURIFIED CULTURED BLOOD SERUM DEPLETED IN GROWTH FACTORS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to the production of components of nutrient media for eukaryotic cell cultures.

EFFECT: obtaining a method of producing purified

cultured blood serum depleted in microvesicles and containing a reduced amount of growth factors and other biologically active molecules.

1 cl, 2 dwg, 2 ex, 1 tbl

RU 2 803 918 C1

RU 2 803 918 C1

Изобретение относится к области биотехнологии, а именно получению компонентов питательных сред для культур клеток эукариот. Предложен способ получения очищенных культуральных сывороток крови, обедненных микровезикулами, и содержащих пониженное количество факторов роста и прочих биологически активных молекул. Предлагаемый способ включает добавление к образцам сыворотки раствора хитозана, предпочтительно с молекулярной массой не менее 200 кДа, в 1% (масс./об.) растворе уксусной кислоты, инкубацию смеси от 1 до 3 часов при 4°C, нейтрализацию, центрифугирование и сбор супернатанта, представляющего собой сыворотку, обедненную микровезикулами и содержащимися в них факторами роста.

Технический результат - оптимизация процесса получения сывороток, обедненных везикулярными факторами роста, позволяющая сократить затраты времени и часов работы дорогостоящего оборудования.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Микровезикулы представляют собой гетерогенную совокупность биологических структур, связанных мембранами. Такие структуры имеют билипидный слой, и они могут находиться внутри клетки или во внеклеточном пространстве. Размер микровезикул составляет от приблизительно 20 до 1000 нм. Являясь фрагментами клеточной мембраны, микровезикулы сохраняют характерный отрицательный заряд за счет разницы в концентрации ионов внутри и снаружи везикулы.

Экзосомы представляют собой микроскопические внеклеточные везикулы диаметром от 30 до 100 нм с билипидным слоем, выделяемые в межклеточное пространство клетками различных тканей и органов. Экзосомы отличаются от других везикул тем, что образуются во внутриклеточном пространстве и затем секретируются клеткой. Белковый состав экзосом во многом отражает их происхождение из эндосом и несколько различается в зависимости от типа клеток, в которых они образуются (RU 2748234 C2).

Микровезикулы и экзосомы могут выделяться большинством видов клеток и содержатся во многих биологических жидкостях, включая плазму крови. Значительная биологическая активность, связанная с входящими в их состав факторами паракринной регуляции, обуславливает интерес исследователей к данной группе субклеточных структур. В связи с этим существенная часть работ, составляющих текущий уровень техники, связана со сбором микровезикул или экзосом для их дальнейшего использования. В этом случае источником микровезикул зачастую служат кондиционированные культуральные среды, т.е. среды для культур клеток, в которых были предварительно прокультивированы клетки, выделяющие микровезикулы. Сбор микровезикул, как правило, проводится с помощью одного из четырех основных методов, описанных в таблице 1, либо их сочетаний, когда одни методы являются подготовительными перед использованием других.

40

45

Таблица 1 – Существующие способы выделения экзосом и микровезикул, а также их ограничения (по RU 2 748 234 C2)

Способ	Примеры	Ограничения
Ультра-центрифугирование	Дифференциальное центрифугирование; Центрифугирование в градиенте плотности.	Масштабируемость; Сложная эксплуатация; Дороговизна приборов.
Осаждение полимером	Осаждение полиэтиленгликолем.	Совместное осаждение полимера, а также белковых загрязнений.
Иммуноаффинный захват	Захват на основе антител к белкам.	Отсутствие стандартов; Совместное осаждение загрязняющих антител; Дороговизна реактивов.
Поточная фильтрация	Последовательная фильтрация.	Необходимость дополнительных стадий для дальнейшей очистки экзосом.

Вместе с тем существует обратная потребность - в получении обедненных экзосомами биологических субстанций. К таковым относятся, например, сыворотки крови лошадей, используемые в качестве бедного факторами роста заменителя сывороток крови эмбрионов крупного рогатого скота. Подобные сыворотки могут применяться, например, в протоколах дифференциации миосателлитных клеток, где целенаправленно создается обедненная среда, вызывающая клеточный ответ. В настоящее время накоплен достаточный объем данных, позволяющих судить о том, что от концентрации микровезикул в сыворотке зависит ее воздействие на поведение и фенотип культивируемых клеток (DOI: 10.3402/jev.v3.24783).

Сложившаяся ситуация делает поиск новых способов получения обедненных сывороток перспективным направлением исследований. Использование полимеров для их осаждения имеет ряд преимуществ, основное из которых - наименьшая зависимость от приборной базы учреждения, в котором реализуется соответствующий протокол. Так, при использовании ультрацентрифугирования необходимо проводить его на специальных дорогостоящих марках центрифуг, обеспечивающих ускорение свыше 100 000 g в течение не менее чем 1 часа, зачастую при постоянном охлаждении, а иммуноаффинный захват требует организации в учреждении работы с антителами.

Известен способ осаждения микровезикул полиэтиленгликолем, либо его смесью с протамином (DOI: 10.3892/ijmm.2016.2759). В указанной работе авторы собирали микровезикулы из культуральной среды и биологических жидкостей, в которой выращивали стволовые клетки. Осаждение проводили при помощи добавления раствора полиэтиленгликоля или смеси полиэтиленгликоля с протамином к культуральной среде в соотношении 1:4 и выдерживания в течение ночи при 4°C с последующим центрифугированием при 1 500 g в течение 30 минут. Подобным образом теоретически возможно удалять микровезикулы не только из культуральных сред, но и из сывороток, а также других растворов, содержащих микровезикулы, и нуждающихся в очистке от них.

Недостатком метода является существенная длительность, которая может привести к распаду или повреждению микровезикул и привести к высвобождению их компонентов в жидкую фазу обрабатываемого раствора, что препятствует его обеднению факторами

роста. Также потенциальным недостатком является использование полиэтиленгликоля, который не может подвергаться биоразложению в условиях клеточных культур, а потому будет присутствовать в образцах в дальнейшем и требует включения в протокол дополнительных этапов для очистки.

5 Известен способ ускоренного сбора микровезикул с применением полиэтиленгликоля (патент RU 2750928 C1) путем предварительного центрифугирования. В изобретении образцы кондиционированной клеточной среды сначала центрифугировали при 5 000 g в течение 30 минут при 4°C, затем собирали надосадочную жидкость и
10 центрифугировали при 17 000 g в течение 1,5 часов при 4°C. Осадок после второго центрифугирования ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере и инкубировали в течение часа с раствором полиэтиленгликоля в соотношении 1:1. После инкубации полиэтиленгликоль с микровезикулами осаждали центрифугированием при 1 500 g в течение 30 минут при 4°C.

Одним из недостатков указанного метода является использование в качестве
15 субстрата для выделения микровезикул ресуспендированного осадка, полученного после дробного центрифугирования. Поскольку центрифугирование проводится при относительно небольших ускорениях, существует риск неполного осаждения из раствора микровезикул малого размера. Авторами было проведено качественное подтверждение присутствия микровезикул размером менее 100 нм после выделения, однако не было
20 дано количественной оценки их содержания. Вместе с тем необходимость центрифугирования образцов при 17 000 g накладывает ограничения на учреждения, не обладающие достаточно мощным оборудованием. Также в качестве недостатка можно рассматривать значительное количество полиэтиленгликоля в конечном образце, связанное с использованием полиэтиленгликоля в соотношении 1:1 при концентрации
25 вплоть до 32%.

Известен способ RU 2 748 234 C2, заключающийся в предварительной очистке кондиционированной среды путем центрифугирования при 500 g в течение 5 минут и
30 фильтрования через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Подготовленную среду смешивали с иммобилизованными на магнитных частицах полимерами, включая хитозан, сульфат целлюлозы и полиэтиленгликоль, инкубировали в течение 5 часов при 4°C, отделяли магнитные частицы и элюировали солевым буфером в течение ночи при 4°C.

Недостатком способа является необходимость обеспечения подложки для
иммобилизации экзосом-связывающих лигандов, что делает чрезвычайно кропотливыми подготовку к выделению, равно как и сам процесс сбора микровезикул. Кроме того,
35 использование в качестве подложки магнитных частиц делает необходимым наличие в лаборатории магнитного сепаратора. Расширение перечня оборудования, необходимого для постановки методики, является во многих случаях нежелательным. Несмотря на кажущийся недостаток, связанный с длительностью метода, следует
40 обратить внимание, что основная часть процесса происходит уже после разделения микровезикул и среды, что делает его теоретически пригодным для получения обедненных сывороток.

Наиболее близким к заявляемому решению, по лежащему в основе принципу, является способ, предполагающий связывание микровезикул с раствором хитозана и
последующим центрифугированием (DOI: 10.1002/jev2.12138). Использовали хитозан с
45 молекулярной массой 60-120 кДа и степенью деацетилирования 75% в виде раствора в 1% уксусной кислоте с нейтрализацией гидроксидом натрия или без таковой. В указанной работе выделение микровезикул достигается следующим образом. Биологическую жидкость либо кондиционированную культуральную среду очищали путем

последовательного центрифугирования при 4°C при 3 000 g и 17 000 g в течение 5 и 15 минут, соответственно. К очищенной таким образом от крупного дебриса среде добавляли хитозан, после чего инкубировали при комнатной температуре в течение часа. Затем смесь центрифугировали при 12 000 g в течение 15 минут при 4°C и отмывали осадок хитозана с микровезикулами фосфатно-солевым буфером.

Несмотря на существенное упрощение и доступность методики, данный способ обладает рядом недостатков, к которым следует относить использование хитозана средней молекулярной массы, что повышает требования к ускорению при центрифугировании. При использовании хитозана другой молекулярной массы могут потребоваться иные условия для формирования осадка.

Целью настоящего изобретения является оптимизация процесса удаления микровезикул из культуральной сыворотки для устойчивого получения продукта, обедненного везикулярными факторами роста, позволяющая сократить затраты времени и часов работы дорогостоящего оборудования.

Для достижения данной цели к образцам сыворотки добавляют раствор хитозана, предпочтительно с молекулярной массой не менее 200 кДа, в 1% (масс/об) растворе уксусной кислоты. Смесь тщательно перемешивают и инкубируют от 1 до 3 часов при 4°C, после чего нейтрализуют до появления опалесценции, предпочтительно добавляя по каплям 5% раствор гидроксида калия или натрия. Опалесцирующую смесь инкубируют дополнительно в течение 30-60 минут, после чего центрифугируют при 12 000 g в течение 20 минут и собирают супернатант, представляющий собой сыворотку, обедненную микровезикулами и содержащимися в них факторами роста.

Поставленная цель достигается следующим образом:

Приготавливают раствор хитозана, предпочтительно с молекулярной массой не менее 200 кДа, в концентрации от 400 до 600 мкг/мл. Для достижения наилучшего результата расчетное количество хитозана закладывают в половинный объем дистиллированной воды (800-1200 мкг/мл), тщательно перемешивают и оставляют данную взвесь при температуре 4°C для набухания на время от 2 до 16 часов. Отдельно подготавливают 2% (масс/об) раствор уксусной кислоты, а именно растворяют ледяную уксусную кислоту в дистиллированной воде из расчета от 0,32 до 0,36 моль (19,2-21,6 г) кислоты на 1 литр воды. Взвесь хитозана доводят 2% раствором уксусной кислоты до конечной концентрации от 400 до 600 мкг/мл, что соответствует разведению в два раза. Возможно приготовление раствора хитозана напрямую путем смешивания сухого вещества с 1% раствором уксусной кислоты (9,6-10,8 г/литр), однако при таком подходе смесь содержит большое количество пузырьков, что, в свою очередь, может затруднять дозирование. Отдельно подготавливают 5% раствор гидроксида калия или натрия массо-объемным способом из сухой щелочи и дистиллированной воды. Раствор хитозана можно приготовить заранее и он остается пригодным для применения как минимум в течение 4 суток.

Образцы обедняемой сыворотки не требуется предварительно очищать фильтрацией или центрифугированием, т.к. хитозан высокой молекулярной массы активно адсорбирует крупные загрязнители, такие, как остатки кровяных телец.

К образцам сыворотки в асептических условиях добавляют полученный раствор хитозана с молекулярной массой не менее 200 кДа, в концентрации от 400 до 600 мкг/мл в соотношении хитозан:сыворотка равном от 1:6 до 1:8. Использование меньшего количества хитозана делает трудным наблюдение образования осадка, в то время как использование большего количества значительно разбавляет сыворотку, что может быть как желательно, так и нежелательно в зависимости от ее дальнейшего

экспериментального применения.

Смесь тщательно перемешивают и инкубируют от 1 до 3 часов при 4°C, после чего в асептических условиях по каплям добавляют 5% раствор гидроксида калия или натрия до появления опалесценции. Опалесценция чаще всего принимает вид тонких белесых волокон у поверхности раствора. При ее появлении добавление щелочи прекращают и оставляют нейтрализованную смесь для дополнительной инкубации на 30-60 минут. После этого смесь центрифугируют при 12 000 g в течение 20 минут и собирают супернатант, представляющий собой сыворотку, обедненную микровезикулами и содержащимися в них факторами роста. Охлаждение смеси при центрифугировании не обязательно, но может быть желательным, если обедненную сыворотку не планируется использовать сразу после получения.

Полученная сыворотка обеднена микровезикулами и содержащимися в них факторами роста, однако содержит повышенное количество ацетата натрия или калия, поэтому в случае ее добавления в культуральную среду в количестве более 10% может потребоваться предварительная очистка от солей путем диализа через мембрану с пропускной способностью не менее 3,5 кДа.

Хитозан - природный полиаминосахарид, обладающий широким спектром биологических свойств. Хитозан представляет собой нерастворимую в воде деацетилированную форму хитина. Ацетилирование хитозана обеспечивает его растворимость в полярных растворителях. Присутствие аминогрупп создает на поверхности молекулы хитозана участки с частичным положительным зарядом, которые способны электростатически притягивать к себе микровезикулы, имеющие отрицательный заряд. Это позволяет в ходе инкубирования сыворотки с раствором хитозана адсорбировать микровезикулы на растворенных молекулах хитозана. После нейтрализации раствора 0,2 М раствором щелочи хитозан перестает растворяться и выпадает в осадок в виде волокон, вместе с адсорбированными микровезикулами.

Высокая молекулярная масса хитозана позволяет осадить его из раствора на центрифугах, создающих ускорение до 12 000 g, что намного меньше, чем в установках ультрацентрифугирования (свыше 100 000 g) и позволяет выполнять обеднение сыворотки заявляемым способом без применения ультрацентрифуг.

Таким образом, достигается сокращение числа манипуляций с сывороткой и требования к аппаратному оснащению лабораторий. Кроме того, поскольку нейтрализация хитозана и его перевод в нерастворимую форму производится *in situ*, непосредственно после инкубации хитозана с сывороткой, методику можно адаптировать к хитозану с различной растворимостью, например, полученному из нетрадиционных источников.

Пример применения 1

Подготавливали 5% (об./об.) эмульсию вазелинового масла в воде с добавлением 0,5% (об./об.) ТВИН-20. Искусственно полученная эмульсия использовалась для того, чтобы количество сухого остатка было значительно выше порога обнаружения. К эмульсии добавляли раствор хитозана в концентрации 600 мкг/мл в соотношении 1:6 и инкубировали в течение 3 часов.

После центрифугирования осадок промывали фосфатно-солевым буфером, добавляли гексан и инкубировали в течение 15 минут для растворения вазелинового масла, адсорбированного на волокнах хитозана. Каплю гексана смешивали на предметном стекле с равным объемом спиртового раствора йода и оставляли до полного высыхания. Поскольку вазелиновое масло не является летучим, после высыхания смеси на стекле остаются микроскопические капли, окрашенные в темный цвет растворенным йодом.

На фиг. 1 показаны кристаллы, образовавшиеся после высыхания раствора йода в смеси с гексаном. При этом использовался гексан, полученный после инкубирования с осадком, образовавшимся после адсорбции вазелинового масла из эмульсии. На фиг. 2 показаны кристаллы, образовавшиеся после высыхания раствора йода в смеси с гексаном. При этом использовался гексан, полученный после инкубирования с осадком, образовавшимся после проведения экспериментальных процедур с контрольным образцом дистиллированной воды.

Отдельно собирали супернатант и оценивали сухой остаток на анализаторе влажности A&D MS70 при 60°C. Поскольку вазелиновое масло не может испаряться при данной температуре, метод позволяет количественно измерить его содержание в эмульсии до и после адсорбции капель вазелинового масла с хитозаном. После высушивания масса аликвоты нативной эмульсии снизилась с 3,140 до 0,170 г (5,41% сухого остатка), в то время как масса эмульсии, обработанной хитозаном, снизилась с 3,070 до 0,122 г (3,97% сухого остатка).

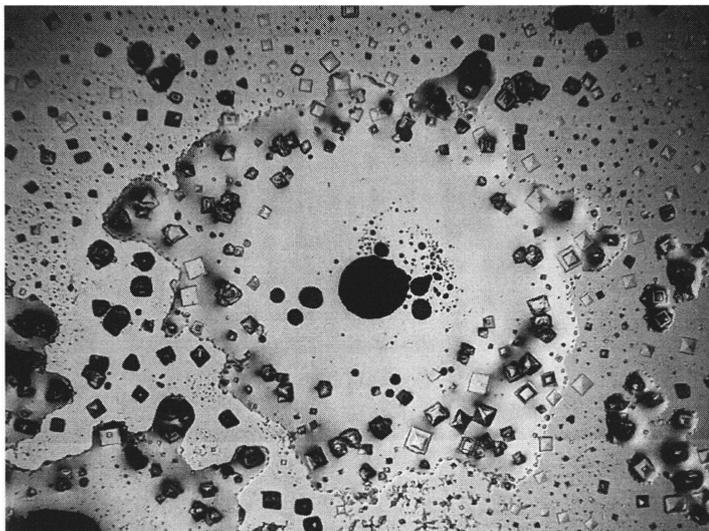
Полученные данные качественно и количественно свидетельствуют, что заявляемый способ позволяет адсорбировать жирорастворимые фракции гетерофазных смесей. Неполная адсорбция связана с отсутствием электростатического взаимодействия между молекулами хитозана и соединений в составе вазелинового масла.

Пример применения 2

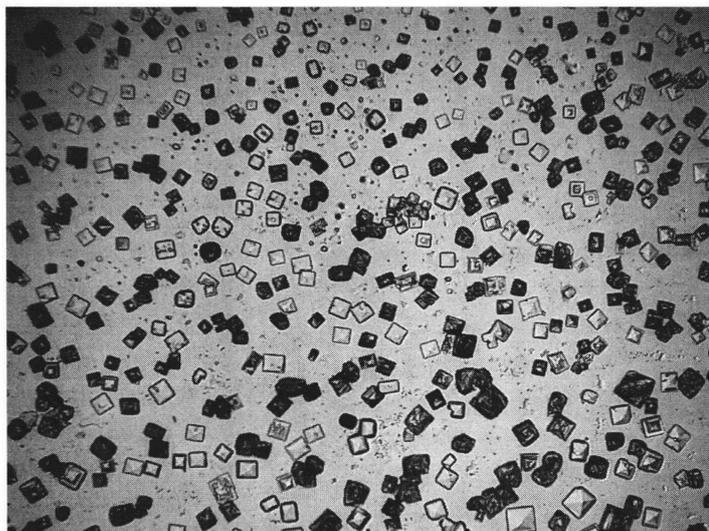
Выделение микровезикул из сыворотки проводили с образцами FBS (эмбриональная телячья сыворотка). К сыворотке добавляли раствор хитозана в концентрации 500 мкг/мл в соотношении 1:8 и инкубировали в течение 1,5 часов. После центрифугирования супернатант сливали, осадок хитозана промывали фосфатно-солевым буфером и гидролизовали избытком 1М раствора соляной кислоты при 80°C в течение 1 часа. Гидролизат охлаждали до комнатной температуры и наблюдали образование на поверхности жирных пятен свободных жирных кислот, что является качественным свидетельством того, что осадок содержал адсорбированные микровезикулы, в состав которых входят мембранные фосфолипиды, гидролизуемые до жирных кислот, глицерина и фосфат-ионов.

(57) Формула изобретения

Способ получения культуральных сывороток, обедненных микровезикулами и везикулярными факторами роста, отличающийся тем, что обеднение производится путем связывания микровезикул раствором хитозана с молекулярной массой не менее 200 кДа, в 1% (масс./об.) растворе уксусной кислоты с последующей нейтрализацией, центрифугированием при не более чем 12 000 g и сбором супернатанта.



Фиг. 1. Кристаллы, образовавшиеся после высыхания раствора йода в смеси с гексаном. Гексан получен после инкубирования с осадком, образовавшимся после адсорбции вазелинового масла из эмульсии. Видны чёрно-коричневые капли не улетучившегося масла. Микроскоп Zeiss Imager.Z1, увеличение x50.



Фиг. 2. Кристаллы, образовавшиеся после высыхания раствора йода в смеси с гексаном. Гексан получен после инкубирования с осадком, образовавшимся после проведения экспериментальных процедур с контрольным образцом дистиллированной воды. Капли масла отсутствуют. Микроскоп Zeiss Imager.Z1, увеличение x50.