



УКРАЇНА

(19) UA (11) 6221 (13) U

(51) 7 A01N1/00, A01N1/02, A61K35/14

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИДІЛЕННЯ "СТОВБУРОВИХ" ТА КЛІТИН-ПОПЕРЕДНИКІВ ГЕМОПОЕЗУ ПУПОВИННОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ

1

2

(21) 20041109455

(22) 18.11.2004

(24) 15.04.2005

(46) 15.04.2005, Бюл. № 4, 2005 р.

(72) Гладких Юрій Васильович, Лобинцева Галина Степанівна, Калиниченко Тетяна Олексіївна

(73) ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ

(57) Спосіб виділення "стовбурових" та клітин-попередників гемопоезу пуповинної крові людини, що включає процедуру вилучення еритроци-

тів зі складу зразка шляхом вільного осадження еритроцитів в градієнті колоїдного розчину, який містить модифікований рідкий желатин, який відрізняється тим, що виділення здійснюють в замкненій системі з застосуванням двоступеневої системи забору периферійної крові, як модифікований рідкий желатин використовують плазмозамінний розчин "Гелофузин", а осадження еритроцитів здійснюють при температурі 20-22°C протягом 45-60 хвилин.

Корисна модель відноситься до біології та медицини і може бути використана в якості підготовки до кріоконсервування „стовбурових“ та клітин-попередників гемопоезу пуповинної крові людини.

Відомий спосіб виділення фракції ядровмісних клітин пуповинної крові двоступеневим методом [Almici C., Carlo-Stella C., Wagner J. E., Rezzoly V. Density separation and cryopreservation of umbilical cord blood cells: evaluation of recovery in short- and long-term cultures// Acta Haematologica. - 1996. - 95, №3. -4. - P.171-175], який передбачає проведення седиментації еритроцитів крізь шар роігеліну (Eutagel) у комплексі з сепарацією на градієнті щільності фікол/гіпака ($\rho=1,077\text{г/мл}$).

Недоліком даного способу є те, що собівартість седиментації гетерогенної клітинної популяції з використанням центрифугування в градієнті щільності фікол/гіпака є досить високою. Крім того, в зв'язку з наявністю ендотоксинів в розчинах даних речовин, які залишаються на поверхні клітин, відсутність ефективних технологій відмивання, багатоступеневість, громіздкість проведення процедури сепарації унеможливорює застосування такої технології для щоденного використання, особливо при підготовці зразків до клінічного застосування.

Відомий спосіб одержання вільної від еритроцитів клітинної суспензії пуповинної крові

[Jansen K. C., Hashmi R., Hashmi N. et al. Red blood cells reduction of cord blood cells using ammonium chloride lysis procedure // Blood. - 1995. - 86, №10 (suppl. 1). - P. 356a], який по суті є методом лізису еритроцитів за допомогою розчину хлориду амонію (NH_4Cl) з послідуочим відмиванням клітин за допомогою буферного розчину та центрифугування без зменшення об'єму суспензії.

Недоліком даного способу є необхідність введення в склад суспензії клітин пуповинної крові інвазивної речовини хлориду амонію, що веде за собою необхідність проведення процедури відмивання клітин. Така процедура не дозволяє одержати прийнятні для клінічного використання результати, в зв'язку з тим, що неможливо мати впевненість в повному вилученні даної речовини зі складу суспензії. Крім того, метод є багатоступеневим, його виконання неможливе в замкненій системі, при цьому не відбувається зменшення об'єму суспензії для заморожування, що є суттєвими недоліками при створенні широкомасштабних запасів пуповинної крові для клінічного застосування.

Відомий спосіб виділення фракції лейкоцитарного шару пуповинної крові [Ademokun A. J., Chapman C., Dunn J. et al. Umbilical cord blood collection and separation for haematopoietic progenitor cell banking// Blood. -1996.- 88, №11

(19) UA (11) 6221 (13) U

(suppl. 1). - P. 409a], який є методом простого центрифугування з використанням трьохступеневої системи стерильних мішків для розділення цільної пуповинної крові на три фракції ("Buffy coat"- лейкоцитарний шар, шар еритроцитів та плазма). Така методика дозволяє сконцентрувати у зменшеному в два рази об'ємі „стовбурові“ клітини пуповинної крові при дотриманні повної стерильності.

Недоліком зазначеного способу є травматичність для „стовбурових“ клітин та клітин-попередників гемопоезу процедури жорсткого центрифугування, яка є основним моментом, який забезпечує в даному випадку розділення цільної крові на шари, що призводить до втрати цих клітин як в момент виконання самої процедури, так і при подальшому їх заморожуванні-відтаюванні в наслідок втрати природної резистентності. Крім того, внаслідок такої сепарації неминуча кількісна втрата „стовбурових“ та клітин-попередників гемопоезу, які механічно потрапляють в шар еритромаси під дією чинників жорсткого центрифугування. Розділення шарів білих клітин та еритроцитів в замкненій системі без використання допоміжних градієнтів розчинів по закінченню центрифугування є кропіткою процедурою, при якій навіть невелике взбавування веде до змішування шарів клітин і, в наслідок цього, потребує повтору всієї процедури.

Найбільш близьким за ознаками до способу, що заявляється, є спосіб, при якому процедура сепарації клітин пуповинної крові проводиться в присутності 3% розчину желатину при $t +4^{\circ}\text{C}$ [Harris D. T., Schumacher M. J., Rychlik S. et al. Collection, separation, and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation// Bone Marrow Transplant. - 1994. - В13. - P. 135-143].

Недоліком зазначеного способу є необхідність в додатковому приготуванні та стерилізації 3% розчину желатину, що випускається у порошковій формі. Це ускладнює процес приготування суспензії гемопоетичних клітин пуповинної крові до криоконсервування, а також сприяє дорожчання процесінгу. Другим суттєвим недоліком способу є те, що процес ведуть при $+4^{\circ}\text{C}$. В цих умовах розчин желатину різко збільшує свою в'язкість що відповідно суттєво уповільнює процес седиментації клітин та впливає на повноту розділення внаслідок чого підвищується відсоток втрат ядровмісних клітин в процесі підготовки суспензії.

Завданням розробки є створення способу виділення гемопоетичних клітин пуповинної крові, в якому шляхом виконання способу в замкненій системі з застосуванням двоступеневої системи забору, застосуванням нової речовини та емпірично підібраних режимів здійснення способу забезпечується покращення умов стерильності способу, прискорення осадження еритроцитів, збільшення виходу ядровмісних клітин та загалом забезпечується спрощення способу, який є простим в використанні, не зв'язаний з використанням складної апаратури та технологій і є прийнятним для створення довгострокових банків „стовбурових“ та клітин-попередників гемопоезу пуповинної крові, під час виконання процедури використову-

ються сертифіковані МОЗ України розчини одно-разові матеріали та обладнання, при якому шляхом зміни колоїдного розчину для прискореного осадження еритроцитів, забезпечується спрощення способу, покращення умов стерильності, збільшення виходу ядровмісних клітин, а також мононуклеарів, до складу яких входять „стовбурові“ та клітини-попередники гемопоезу.

Спосіб передбачає здійснення процесу вилучення еритроцитів зі складу зразка шляхом вільного осадження еритроцитів в градієнті колоїдного розчину, який містить 4% модифікованого рідкого желатину.

Новим в способі є застосування з метою прискореного „спонтанного“ осадження еритроцитів колоїдного плазмозамінного розчину ГЕЛОФУЗИН, який містить 4% модифікованого рідкого желатину (і який дозволено МОЗ України для внутрішньовенного застосування), зміна температурного режиму. Процес здійснюють в замкненій двохступеневій системі для забору крові (в якості якої може бути застосована, наприклад замкнена двохступенева система для забору крові HEMOCON (HELM PHARMACEUTICALS GMBH), яка сертифікована МОЗ України для клінічного використання). А осадження еритроцитів здійснюють при температурі $20-22^{\circ}\text{C}$ протягом 45-60 хвилин.

З метою концентрації „стовбурових“ та клітин-попередників гемопоезу пуповинної крові в зразках після видалення більшості еритроцитів використовується процедура обережного центрифугування з метою зменшення об'єму зразка в 2-3 рази.

Застосування нової сукупності ознак способу виділення гемопоетичних клітин пуповинної крові людини з використанням готового стерильного розчину (ГЕЛОФУЗИН®), який містить рідкий желатин і який дозволено МОЗ України для внутрішньовенного застосування, здійснення процедури без додаткового контакту з клітинною суспензією, тобто в замкненій системі веде до спрощення способу, покращення умов стерильності, що робить спосіб зручним та цілком прийнятним при клінічному застосуванні. Зміна температурного режиму сепарації призводить до ефекту прискорення процедури седиментації, збільшення збереженості та клітинності зразка для криоконсервування.

Зазначені етапи виділення та концентрації не призводять до травмування для гемопоетичних клітин та відповідають вимогам економічності при створенні банків гемопоетичних клітин, завдяки зменшенню об'ємів, що зберігаються.

Для порівняння прототипу та запропонованого способу здійснювали обидва способи на зазначених нижче прикладах 1-10.

Приготування клітинної суспензії за прототипом та за запропонованим способом здійснювали паралельно на одних і тих самих зразках пуповинної крові. Цільну пуповинну кров для досліджень брали в однаковій кількості.

В таблицях при описі прикладів під цифрою 1 зазначені досліді, виконані за прототипом, а під цифрою 2 - досліді, виконані за способом, що пропонується.

При проведенні сепарації клітин за прототипом застосовували розчин, який містить желатин в концентрації 3% (до складу розчину входять також глюкоза, кислий цитрат натрію, вода бідестильована). Після приготування, розчин розливали у флакони місткістю 50мл, які герметизували та стерилізували в режимі автоклавування (1,2атм протягом 30хв). Змішування проводили шляхом поступового нашарування розчину желатину на нативну пуповинну кров у співвідношенні розчин/кров =1:1. Після обережного змішування рідин шляхом погойдування, препарат залишали для вільного прискореного осадження еритроцитів при $t +4^{\circ}\text{C}$ на штативі в камері холодильника протягом 45, 55, 60хв. (термін осадження співпадає в першому і другому паралельних прикладах у всій серії експериментів). Потім надосадову рідину за допомогою плазмоексTRACTора переводили в парний мішок і центрифугували в режимі 1200об/хв, протягом 8хв. Після цього вільну від клітин плазму обережно видаляли, клітинний осад ресуспендиювали в плазмі, що залишилась. Після цього проводили підрахунок клітин в суспензії, вивчали їх життєздатність за методом суправітального зафарбовування, а також вивчали клітинний склад суспензії в мазках.

При виконанні прикладів за способом, що пропонується, в порт основного мішка системи для збору крові НЕМОСОН до цільної пуповинної крові обережно додавали колоїдний плазмозамінний розчин, який містить 4% модифікованого рідкого желатину (ГЕЛОФУЗИН), в співвідношенні 1:1. Мішок підвішували на штатив на 45, 55, 60хв. (у відповідності до першого прикладу, термін процедури відстоювання залежить від реологічних якостей конкретного зразка) при температурі $t=(20-22)^{\circ}\text{C}$.

По закінченню процедури відстоювання надосад переводили за допомогою плазмоексTRACTора в другий мішок двухступеневої системи, після чого трубку, яка їх з'єднує перетинали та герметично запаювали. Лейкоконцентрат, який містить гемопоетичні клітини пуповинної крові концентрували шляхом обережного центрифугування в режимі 1200об/хв протягом 8хв при кімнатній температурі. Вільний від клітин надосад обережно видаляли, а клітини ресуспендиювали в надосадовій рідині, яка залишилась.

Вивчення ефективності способу проводили за вищевикладеною при описі прототипу схемою.

При цьому було виявлено, що процент мононуклеарів, що виділені за прототипом, від загального їх вмісту в нативній крові менше, ніж при виділенні за способом, що пропонується. Крім того, при застосуванні методу прототипу втрата ядровмісних клітин в цілому є значно більшою, що буде відбиватись на якості зразка. Життєздатність клітин в суспензії для кріоконсервування залишається незмінною.

Результати, представлені в таблиці 2, свідчать, що осідання еритроцитів за прототипом є набагато повільнішим, і таким чином подовжується процедура седиментації. При цьому надаються умови, які суперечать вільному осадженню еритроцитів: розчин желатину при зниженні тем-

ператури формує телеобразну структуру, котра сприяє як затриманню еритроцитів, так і „змішуванню“ ядровмісних клітин, які мають високу щільність, з такими еритроцитами.

Крім того, при температурі, близькій до нульової, ядровмісні клітини „сенсibiliзуються“ до умов низьких температур, що додатково спричинює зниження їх збереженості при подальшому заморожуванні-відтаюванні.

Бактеріологічний контроль підготовлених за прототипом та за способом, що заявляється, на відсутність бактеріальної та грибової контамінації здійснювали згідно з „Інструкцією з контролю стерильності консервованої крові, її компонентів, препаратів, консервованого кісткового мозку, плазмозамінюючих та консервуючих розчинів, умов їх заготівлі“, 1999р.

Результати бактеріологічного контролю, представлені в таблиці 3, свідчать, що зразки, підготовлені за прототипом мають значно більший відсоток контамінації мікрофлорою, ніж зразки, підготовлені за способом, що заявляється. Це свідчить про збільшення вірогідності порушення стерильності, пов'язану з необхідністю приготування 3 % розчину желатину, а також з необхідністю внесення мішків з матеріалом в холодильну камеру для осадження при температурі $+4^{\circ}\text{C}$.

Таким чином, як видно з отриманих результатів, запропонований спосіб має кращі результати збереженості як мононуклеарних клітин, до яких відносяться „стовбурові“ та клітини-попередники гемопоезу, так і ядровмісних клітин в цілому. При цьому використання рідкого стерильного розчину желатину, яким є ГЕЛОФУЗИН, значно спрощує і скорочує процедуру виділення гемопоетичних клітин пуповинної крові. Всі етапи процедури є такими, що беруть клітини від жорстких механічних пошкоджень. Результатом проведення процедури є суттєве зменшення об'ємів зразків пуповинної крові, звільнення їх від основної маси еритроцитів, що суттєво підвищує якість суспензії клітин, а також є економічно вигідним при створенні банків пуповинної крові. Розчин ГЕЛОФУЗИН, який застосовується в якості осаджуючого - сертифікований МОЗ України в якості ефективного плазмозамінного розчину гемодинамічної дії, що дозволяє використовувати виділені способом, що заявляється, гемопоетичні клітини в більшості терапевтичних випадків. Завдяки використанню замкненої системи виділення клітин, одноразових матеріалів, які мають дозвіл для клінічного застосування, як стерильні, нетоксичні, апірогенні, спосіб відповідає умовам стерильності в роботі з консервованою кров'ю, її компонентами, препаратами та вимогам до їх заготівлі.

Зазначені переваги, як показують приклади, призводять до збільшення виділення мононуклеарних клітин, до яких відносять „стовбурові“ та клітини-попередники гемопоезу, а також ядровмісних клітин, що призводить до збільшення клітинності і, таким чином, дози компоненту крові, який є завись гемопоетичних клітин пуповинної крові для кріоконсервування з метою подальшого клінічного застосування.

Таблиця 1

№ прикладу	Спосіб, за яким проведено виділення гемопоетичних клітин 1-прототип, 2-з'явлений спосіб	Клітинність зразка, ($10^9/л$)	Загальна кількість ядровмісних клітин в 20 мл пуловинної крові, (10^6)	Кількість ядровмісних клітин в суспензії в результаті проведення виділення, (10^6)	Відсоток втрати ядровмісних клітин в процесі підготовки суспензії, (%)	Доля виділених мононуклеарів від загальної їх кількості в 20 мл щільної пуловинної крові, (%)	Життєздатність ядровмісних клітин в суспензії пуловинної крові для криоконсервування, (%)
1	2	3	4	5	6	7	8
1	1	15,45	0,3	0,225	25	87	98
	2	15,45	0,3	0,255	15	93	97
2	1	12,25	0,245	0,196	20	88	96
	2	12,25	0,245	0,221	10	92	97
3	1	24,75	0,495	0,391	21	85	98
	2	24,75	0,495	0,436	12	94	98
4	1	11,5	0,23	0,189	18	80	99
	2	11,5	0,23	0,198	14	93	98
5	1	28,2	0,564	0,457	19	83	99
	2	28,2	0,564	0,513	9	95	100
6	1	16,5	0,33	0,274	17	85	96
	2	16,5	0,33	0,294	11	91	96
7	1	10,2	0,204	0,161	21	82	97
	2	10,2	0,204	0,172	16	90	95
8	1	17,65	0,353	0,265	25	80	98
	2	17,65	0,353	0,321	9	98	99
9	1	21,35	0,427	0,333	22	78	96
	2	21,35	0,427	0,384	10	95	95
10	1	18,4	0,368	0,272	26	79	97
	2	18,4	0,368	0,339	8	93	98

Таблиця 2

№ п/п	Спосіб, за яким проведено виділення гемопоетичних клітин	Доля над осадом рідини від загального об'єму суміші пуловинної крові з колоїдним розчином, (%)		
		Через 45 хв відстоювання	Через 55 хв відстоювання	Через 60 хв відстоювання
1	2	3	4	5
1	1	25	35	45
	2	45	48	50
2	1	27	35	43
	2	47	52	55
3	1	20	34	48
	2	55	58	60
4	1	27	38	48
	2	52	57	62
5	1	30	38	47
	2	50	53	55
6	1	25	33	40
	2	55	58	60
7	1	25	35	45
	2	54	60	65
8	1	32	40	47
	2	57	60	62
9	1	30	36	42
	2	58	64	68
10	1	23	33	42
	2	51	55	58

Таблиця 3

№ п/п	Спосіб, за яким проведено виділення гемопоетичних клітин	Кількість зразків, що перевірено на стерильність	Кількість виявлених нестерильних зразків	Відсоток нестерильних зразків
1	2	3	4	5
1	прототип	20	5	25%
2	з'явлений спосіб	250	5	1,25%

Комп'ютерна верстка Н. Лисенко

Підписне

Тираж 28 прим.

Міністерство освіти і науки України

Державний департамент інтелектуальної власності, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ - 42, 01601