



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 46673

(13) A

(51) 6 A01N1/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДВИДАЄТЬСЯ ПІД
ВІДПОВІДАЛЬНІСТЬ
ВЛАСНИКА
ПАТЕНТУ

(54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН ЛЮДИНИ

1

2

(21) 2002010343

(22) 14 01 2002

(24) 15 05 2002

(46) 15 05 2002, Бюл. № 5, 2002 р

(72) Лобинцева Галина Степанівна

(73) Лобинцева Галина Степанівна

(57) Спосіб кріоконсервування гемопоетичних клітин людини, що включає додавання до суспензії клітин кріопротектора, багатоетапне заморожування з наступним відтаюванням, який відрізняється тим, що застосовують концентрації

кріопротектора 0,4 - 1,45 мол/л, заморожування здійснюють в три етапи, при цьому на першому етапі заморожування здійснюють з швидкістю 0,7 - 1,2°C/хв до мінус 8,5 - мінус 10,5°C з застосуванням сидінгу при температурі мінус 3,5 - мінус 4°C, на другому етапі - зі швидкістю 1,0 - 4,5°C/хв до мінус 30 - мінус 40°C, при цьому після другого етапу здійснюють температурну зупинку при мінус 30 - мінус 40°C протягом 3 - 5 хв, а на третьому етапі - зі швидкістю 10 - 12°C/хв до мінус 130 - мінус 196°C

Винахід відноситься до біології та медицини і може бути використаний для кріоконсервування гемопоетичних клітин людини

Відомий спосіб кріоконсервування тромбоцитів (дивись заявку Росії 99126524/14, МПК А01N1/02, дата публ. заявки 2001 08 27) який передбачає кріоконсервування у гофрованих алюмінієвих контейнерах з видаленням надлишку плазми центрифугуванням і наступним ресуспендуванням суспензії і додаванням кріопротектора, в якому підготовку до консервування здійснюють у полімерному контейнері, який поміщають у дюралевий пенал-холдер, а заморожування проводять до температури -80°C, зберігання здійснюють у цій же тарі

Недоліком даного способу є те, що зазначений режим заморожування травматичний для гемопоетичних клітин людини тому, що швидке зниження температури викликає зріст великих кристалів, які порушують оболонки клітин. Це призводить до зменшення періоду збереження та зменшення кількості життєздатних клітин після періоду збереження

Відомий спосіб кріоконсервування та підготовки до трансфузії гемопоетичних клітин кордової крові, (див. патент України № 42599 МПК А01N1/00, А01N1/02 В, А61K35/14) що включає розведення цільної крові стабілізатором крові у співвідношенні 4 : 1, видалення еритроцитів, виділення надстою клітинної зависі, додавання рівного об'єму кріоконсерванта на основі полівінілпіролідону з подальшим програмним заморожуванням

та розморожуванням суміші в якій видалення еритроцитів проводять після розведення цільної кордової крові стабілізуючим розчином, обробкою розведеної кордової крові розчином гідроксietил-крохмалю для осадження еритроцитів, після чого осад видаляють, вільний від еритроцитів надстій клітинної зависі концентрують, а кріоконсервант додають до концентрату клітинної зависі

Недоліком даного способу є його багатоетапність, що ускладнює спосіб та погіршує умови стерильності. Невизначений режим заморожування гемопоетичних клітин людини не дозволяє отримати прийнятні результати тому, що життєздатність клітин забезпечується лише у вузькому інтервалі зниження температури. Це призводить до зменшення періоду збереження та зменшення кількості життєздатних клітин після періоду збереження

Відомий спосіб кріоконсервування кісткового мозку (див. патент Росії № 2144290, МПК А01N1/02, дата публ. 2000 01 20) який здійснюють шляхом поетапного заморожування в присутності криозахисного розчину, при якому суспензію кліток, залиту в м'який однократного використання контейнер до заповнення на 10 - 30%, розміщений у металевому пеналі, що забезпечує товщину шару суспензії 6 - 8 мм, на першому етапі поміщають у рідкий холодоагент із температурою мінус 26 - 30°C і витримують 15 - 25хв, на другому етапі поміщають у сховище-холодильник з температурою мінус 40 - 50°C

Недоліком зазначеного способу є те що зазна-

(13) A

(11) 46673

(19) UA

чений режим заморожування травматичний для гемопоетичних клітин людини тому що температура зберігання за способом -40 , -50°C недостатня для довготривалого зберігання гемопоетичних клітин людини. Все це призводить до зменшення періоду збереження та зменшення кількості життєздатних клітин після періоду збереження.

Найбільш близьким до заявленого за ознаками є спосіб збереження при криогенній температурі тканини (переважно шкіри) ссавців (див патент США № 5891617, МПК A01N001/02, дата публікації 06.04.99 р.), що передбачає занурення зазначеної тканини в розчин криоконсерванта, який являє собою $1,5 - 2,5 \text{ M}$ гліцерин у середовищі Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), перемішування зазначеного розчину криоконсерванта і зазначеної зануреної тканини, внесення зародків льоду в позаклітинний простір криоконсерванта і перфузіюваної тканини, охолодження зазначеної тканини зі швидкістю приблизно $-10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до температури біля -6°C , або проводять заморожування зі швидкістю $-1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до температури біля -8°C , продовжують охолодження при швидкості від $-0,3$ до $-0,02^{\circ}\text{C}$ до температури біля -70°C .

Недоліком зазначеного способу є те, що ініціація кристалоутворення здійснюється шляхом внесення зародків льоду в позаклітинний простір, що ускладнює спосіб та погіршує умови стерильності середовища.

Застосування середовища Dulbecco's Modified Eagle's Medium в більшості країн не дозволено для внутрішнього використання і тому клітини отримані за таким способом не можна використовувати в більшості випадків лікування.

Зазначені режими заморожування травматичні для гемопоетичних клітин людини тому, що швидке зниження температури на першому етапі викликає зріст великих кристалів, які порушують оболонки клітин.

Низька швидкість заморожування на завершувачій стадії охолодження суттєво затягує процес виконання способу. Температура за способом біля 70°C недостатня для довготривалого зберігання гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини.

Завдяки тому, що спосіб передбачає використання великої кількості криопротектора, отримані за способом клітини перед використанням слід відмивати від криопротектора, що ускладнює спосіб та здійснює негативний вплив додаткових дій на клітини.

Зазначені недоліки призводять до зменшення періоду збереження та зменшення кількості життєздатних клітин після періоду збереження.

Завданням винаходу є створення способу криоконсервування гемопоетичних клітин людини в якому шляхом зміни режимів способу криоконсервування, знайдених емпіричним шляхом забезпечується спрощення способу, покращання умов стерильності, збільшення періоду збереження та підвищення кількості життєздатних клітин після періоду збереження.

Для цього спосіб криоконсервування гемопоетичних клітин який передбачає додавання до суспензії клітин криопротектору, багаторічне заморожування з наступним відтаюванням.

Новим в способі є те, що застосовують криопротектор концентрації $0,4 - 1,45 \text{ мол/л}$, заморожування здійснюють в три етапи, при цьому на першому етапі зі швидкістю $0,7 - 1,2^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до $-8,5 - -10,5^{\circ}\text{C}$, із застосуванням сідінгу при температурі $-3,5 - -4^{\circ}\text{C}$, на другому етапі зі швидкістю $1,0 - 4,5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до $-30 - -40^{\circ}\text{C}$, після другого етапу здійснюють температурну зупинку при $-30 - -40^{\circ}\text{C}$ протягом $3 - 5 \text{ хв}$, а на третьому етапі зі швидкістю $10 - 12^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до $-130 - -196^{\circ}\text{C}$.

Внаслідок застосування нової сукупності ознак способу ініціація кристалоутворення здійснюється без додаткового контакту з клітинною суспензією, що спрощує спосіб та покращує умови стерильності середовища. Застосовані в способі середовища дозволено для внутрішнього використання.

Зазначені режими заморожування не травматичні для гемопоетичних клітин людини тому, що емпірично підібраний режим зниження температури не викликає зріст великих кристалів які можуть порушити оболонки клітин.

Зазначені переваги, призводять до збільшення періоду збереження та збільшення кількості життєздатних клітин після періоду заморожування.

Для порівняння прототипу та запропонованого способу здійснювали спосіб за прототипом та запропонованим на зазначених нижче прикладах 1 - 64. В прикладах здійснювали такі:

Незалежно від джерела одержання (кістковий мозок, кордова кров, ембріональна печінка, периферична кров) приготування клітинної суспензії за прототипом та запропонованим способом здійснювали однаково.

В таблиці 1 зазначені режими виконання прикладів 1 - 8 за прототипом. При підготовці клітин до низькотемпературного консервування за прототипом, в отриману завісь клітин, що призначені для криоконсервування, через ін'єкційну голку по краплі додавали такий же об'єм криоконсерванта, який являв собою $1,5 - 2,5 \text{ моль/л}$ гліцерину у середовищі Dulbecco's Modified Eagle's Medium при легкому перемішуванні завісі шляхом похитування пробірки.

За допомогою шприцу через ін'єкційну голку гемопоетичні клітини розливали по 1 мл в поліетиленові криоампули об'ємом $1,8 \text{ мл}$ фірми Nunc (CryoStore Boxes).

Криоампули герметично закривали кришками і маркували. Заморожування здійснювали при різних режимах зазначених в Таблиці 1. Заморожування гемопоетичних клітин за прототипом виконували за допомогою програмного заморожувача, який дозволяє варіювати швидкість зниження температури на різних етапах. Для ініціалізації кристалоутворення додатково вносили в криоампули зародки льоду в позаклітинний простір криоконсерванта і клітин.

Зберігали криоконсервовані гемопоетичні клітини в низькотемпературному сховищі при -70°C протягом двох місяців.

Процедуру відмивання клітин від криопротектора здійснювали шляхом додавання розчину, який містить удвічі меншу концентрацію криопротектора, розчин центрифугували при швидкості 2000 об/хв протягом 10 хв . Потім надосади знімали, ще раз додавали удвічі меншу концент-

рацію кріопротектора, повторювали процес центрифугування. Над осадок знімали, до осадку додавали розчин фізіологічного розчину, до досягнення початкового об'єму суспензії.

В таблиці 2 зазначені режими виконання прикладів 9 - 64 за запропонованим способом.

В прикладах 9 - 22, таблиця 2а використовували гемопоетичні клітини ембріональної печінки, в прикладах 23 - 36, таблиця 2б гемопоетичні клітини кордової крові, в прикладах 37 - 50, таблиця 2с гемопоетичні клітини периферичної крові, в прикладах 51-64, таблиця 2д гемопоетичні клітини кістяного мозку.

Підготовка клітин до низькотемпературного консервування за запропонованим способом.

Кріопротектор диметилсульфоксид (далі ДМСО) - 7,0 моль/л концентрації розводили до 0,8 і 2,9 моль/л концентрації, а потім додавали до клітин у співвідношенні 1 : 1 до одержання 0,4 - 1,45 моль/л кінцевих концентрацій. В отриману завісь клітин, що призначені для кріоконсервування, через ін'єкційну голку по краплині додавали такий же об'єм 0,4 - 1,45 моль/л диметилсульфоксиду (далі ДМСО) при легкому перемішуванні завісі шляхом похитування пробірки.

За допомогою шприцу через ін'єкційну голку гемопоетичні клітини розливали по 1мл в поліетиленові кріоампули об'ємом 1 - 1,8мл фірми Nunc (CryoStore Boxes). Кріоампули герметично закривали кришками і маркували.

Заморожування гемопоетичних клітин виконували за допомогою програмного заморозувача, який дозволяє варіювати швидкість зниження температури на різних етапах кріоконсервування і автоматично здійснювати ініціювання процесу кристалізації (сідінг) за певної температури, шляхом разового пропуску рідкого азоту через відповідну трубку.

При заморожуванні клітинної суспензії в ампулах використовували спеціальні укладки, в які вставляли контейнери вертикально і укладку розміщували в теплообмінну камеру заморозувача на відповідному пристрої, що виконує ініціацію кристалізації.

Заморожування клітин виконували за трьох-етапною програмою. На першому етапі від кімнатної температури ($20 \pm 4^\circ\text{C}$) зі швидкістю ($0,7 - 1,2^\circ\text{C}$) на хвилину до (мінус $8,5 - 10,5^\circ\text{C}$), На протязі першого етапу заморожування, при досягненні температури $-3,5 - 4^\circ\text{C}$ здійснювали захолювання (сідінг) одного боку контейнера із клітинною суспензією, шляхом разового пропускання через нього рідкого азоту, завдяки чому, при відповідній температурі автоматично відбувалася ініціація кристалізації.

На другому зі швидкістю - ($1,0 - 4,5^\circ\text{C}$) на 1 хвилину до (мінус $30 - 40^\circ\text{C}$) і на третьому - зі швидкістю $10 - 12^\circ\text{C}$ на 1 хвилину до (мінус $130 - 196^\circ\text{C}$). Конкретні зазначені в таблиці 2. Концентрація кріопротектора складала 0,4 - 1,4 моль/л. Після замороження контейнери за допомогою ліцат вилучали із укладок і переносили в рідкий азот в спеціальне сховище біологічних продуктів (марки СБ-0,5), обладнане чарунками зі змінними

касетами.

Зберігали кріоконсервовані гемопоетичні клітини в низькотемпературному сховищі при мінус $130 - 196^\circ\text{C}$ протягом трьох місяців.

Ефективність режимів зазначених в прикладах оцінювали шляхом перевірки життєздатності клітин, яку оцінювали методом наступного культивування в агаровому середовищі клітин заморожених за режимами зазначеними в прикладах 1 - 8 після двомісячного зберігання, а в прикладах 9 - 64 - після тримісячного зберігання при кінцевій температурі охолодження зазначеної в прикладах. Ефективність методу також оцінювали проведенням бактеріологічного контролю кріоконсервованих гемопоетичних клітин.

Бактеріологічний контроль кріоконсервованих гемопоетичних клітин на відсутність грампозитивної і грамнегативної флори здійснювали згідно «інструкції з контролю стерильності консервованої крові, її компонентів, препаратів, консервування кісткового мозку, кровозамінювачів, консервуючих розчинів та умов їх заготівлі», затвердженої МОЗ України в 1996 р.

З цієї метою сателіт вилучали з низькотемпературного банку і розморожували у водяній бані (плюс $40 \pm 0,5^\circ\text{C}$) і здійснювали скрінінг.

Якісні характеристики отриманих за відомим способом продуктів зазначені в таблиці 1, в конкретних прикладах. Як видно з результатів більшості зразків має контамінацію різними видами мікрофлори, що свідчить про порушення стерильності при внесенні кристалів льоду.

В прикладах 9 - 64 в таблиці 2а, 2б, 2с, 2д зазначено кількість колоній та кластерів (на 10^6 посаджених у культуру клітин) на 8 - 10 добу. Приклади 9 - 64 характеризуються відсутністю грампозитивної і грамнегативної флори в отриманому продукті.

Як видно з отриманих результатів запропонований спосіб має кращі результати збереження клітин.

Ініціація кристалізації в цьому способі здійснюється автоматично без додаткового контакту з клітиною суспензією, що спрощує спосіб та покращує умови стерильності середовища.

Застосовані в способі середовища дозволено для внутрішнього використання і тому клітини отримані за таким способом можна використовувати в більшості випадків лікування.

Зазначені режими заморожування не травматичні для гемопоетичних клітин людини тому, що емпірично підібраний режим зниження температури не викликає ріст великих кристалів які можуть порушити оболонки клітин.

Завдяки тому, що спосіб передбачає використання зменшеної концентрації кріопротектора, отримані за способом клітини можна використовувати зразу після розморожування без відмивання від кріопротектора, що спрощує спосіб та зменшує негативний вплив додаткових дій на клітини.

Зазначені переваги, як показують приклади, призводять до збільшення періоду збереження та збільшення кількості життєздатних клітин після періоду заморожування.

[illegible]

ТОВ "Міжнародний науковий компетет"
вул. Артема, 77, м. Київ, 04050, Україна
(044) 216 – 32 – 71