



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 56085

(13) A

(51) 7 A01N1/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ПРЕПАРАТУ СУСПЕНЗІЇ КЛІТИН ПЛАЦЕНТИ

1

2

(21) 2002118871

(22) 08 11 2002

(24) 15 04 2003

(46) 15 04 2003, Бюл. № 4, 2003 р.

(72) Лобинцева Галина Степанівна, Гладких Юрий Васильович, Лобинцев Дмитро Валерійович, Гладких Володимир Юрійович

(73) Лобинцева Галина Степанівна, Гладких Юрий Васильович, Лобинцев Дмитро Валерійович, Гладких Володимир Юрійович

(57) 1 Спосіб одержання препарату суспензії клітин плаценти, який передбачає промивання отриманої плацентарної тканини шляхом перфузування через пупкову вену фізіологічним розчином, подрібнення плацентарної тканини, багатоетапне заморожування до -196°C в розчині, який містить криоконсервант, занурення і зберігання у рідкому азоті, який відрізняється тим, що отриману плацентарну тканину спочатку промивають стерильним фізіологічним розчином з антибіотиком, потім здійснюють перфузію, відокремлюють від плаценти хоріон і амніотичну оболонку, а також значні кровоносні судини, після подрібнення плацентарну тканину гомогенізують у фізіологічному розчині до одержання сметаноподібної маси, до гомогенату додають 10-20% розчин диметилсульфоксиду (ДМСО) на розчині Хенкса, перемішують, розливають у поліетиленові ампули, заморожують із наступним зануренням у рідкий азот.

2 Спосіб одержання препарату суспензії клітин плаценти по п. 1, який відрізняється тим, що плацентарну тканину отримують від породіль і

жінок, що надійшли на добровільне переривання вагітності, сироватка крові яких дає негативний результат при тестуванні на гепатити В і С, вірус імунodefіциту, сифілісу, токсоплазмоз, цитомегаловірус, хламідії, мікоплазму, уреаплазму, краснуху, вірус простого герпесу.

3 Спосіб одержання препарату суспензії клітин плаценти по п. 1, який відрізняється тим, що промивання плацентарної тканини стерильним фізіологічним розчином з антибіотиком повторюють тричі.

4 Спосіб одержання препарату суспензії клітин плаценти по п. 1, який відрізняється тим, що при подрібненні плацентарну тканину розрізають на окремі фрагменти розміром 3-5 см, потім фрагменти плаценти подрібнюють у ножовому гомогенізаторі МРW-324, а потім - у скляному гомогенізаторі Поттера.

5 Спосіб одержання препарату суспензії клітин плаценти по п. 1, який відрізняється тим, що 10-20% розчин диметилсульфоксиду на розчині Хенкса додають до гомогенату в співвідношенні 1 : 0,8-1,2.

6 Спосіб одержання препарату суспензії клітин плаценти по п. 1, який відрізняється тим, що замороження здійснюють у програмному заморожувачі зі швидкістю $0,6 - 1,2^{\circ}\text{C/хв}$ до $-30 - -42^{\circ}\text{C}$, із ініціюванням процесу кристалотворення при температурі $-3,5 - -4,5^{\circ}\text{C}$, потім із швидкістю $10 - 12^{\circ}\text{C/хв}$ до $-90 - -110^{\circ}\text{C}$ із наступним зануренням у рідкий азот.

Винахід відноситься до медицини і косметології, а саме до створення імунобіологічних препаратів і лікувально-профілактичних косметичних засобів.

Відомий спосіб одержання біологічно активного тканинного препарату з плаценти тварини (див. патент Росії № 2148408, МПК 5A 61K 35/50, дата публікації 2000 05 10), який передбачає відмивку плаценти очищеною водою, отримання гомогенату плаценти, гемоліз тканин в очищеній воді, перше тонке подрібнення тканин в роторно-пульсацийному апараті, обеззараження і окислен-

ня 3%-ним розчином перекису водоводу, повторну обробку полупродукту в роторно-пульсацийному апараті, фільтрацію і отримання готового продукту.

Недоліком такого способу є обмежена сфера його використання по перше через необхідність використання препарату безпосередньо після приготування.

Згідно проведених власником цього патенту досліджень, використання такого препарату передбачається лише для певних тварин.

(13) A

(11) 56085

(19) UA

Метод обеззараження препарату з використанням 3%-ного розчину перекису водню змінює його рН, що також обмежує сферу його використання.

В короткий термін між отриманням препарату та його використанням неможливо провести повноцінну перевірку інфекційного забруднення отриманого препарату.

Відомий спосіб одержання біологічно активного тканинного препарату з плаценти (див. патент Росії № 2080118, МПК 5А 61К 35/50, дата публікації 1997 05 27), який передбачає використання плацентарної тканини людини, віддалення з плаценти хоральної пластинки разом з великими судинами і амніотичною оболонкою, подрібнення плацентарної тканини і наступне використання препарату безпосередньо після приготування.

Недоліком такого способу є обмежена сфера його використання по перше через необхідність використання препарату безпосередньо після приготування.

Для забезпечення курсу лікування потрібно декілька введень препарату обсягом 3 - 7 грам, що перевищує обсяг отриманого препарату з плаценти.

В короткий період між отриманням препарату та його використанням неможливо провести повноцінну перевірку інфекційного забруднення отриманого препарату.

Відомий спосіб одержання біологічно активного тканинного препарату з плаценти (див. патент України № 30808 А, дата публікації 15 12 2000, номер бюлетеня 7), відповідно до якого плацентарну тканину перфузують через пупкову вену фізіологічним розчином, подрібнюють плацентарну тканину на фрагменти розміром 3 x 2, здійснюють заморожування тканини до -196°C в розчині, який містить 10% концентрацію диметилсульфоксиду (далі ДМСО) і додатково 10% поліетиленоксиду м м 400 (далі ПЕО м м 400), а заморожування роблять із швидкістю 1 - $2^{\circ}\text{C}/\text{хвил}$ до 0°C , потім із швидкістю 5 - $6^{\circ}\text{C}/\text{хвил}$ до -10°C , а далі витримують при -10°C протягом 1,5 - 2 годин, після чого занурюють у рідкий азот, де зберігають протягом одного місяця.

Недоліком даного способу є те, що перфузування плацентарної тканини через пупкову вену фізіологічним розчином протягом 10 хвилин не забезпечує її достатнього очищення і призводить до зниження якості кінцевого продукту.

Суттєвим недоліком даного способу є те, що композицію криопротекторів, запропоновану для криоконсервування, не можна вважати прийнятною оптимальною з погляду теоретичних основ криоушкодження і криозахисту біологічних об'єктів. Криопротектор ДМСО є речовиною, що проникає усередину клітин, і у силу своєї хімічної природи здійснює сильний вплив на рідку фазу, створюючи водневі зв'язки з молекулами води, зв'язується з іонними компонентами при зниженні температури і здійснюють вплив на процес зародкування кристалів льоду і формування його структури. Проникність його через мембрану клітин набагато вища, чим у ПЕО м м 400, який у основному, є не проникаючою у клітини речовиною.

Криопротекторна дія ПЕО м м 400 пов'язана зі

зневоднюванням клітин і утворенням асоціативних молекулярних зв'язків із водневими зв'язками. Утворюють комплекси з металами, що призводить до зниження концентрації солей у середовищі заморожування і зменшує можливість виникнення осмотичного шоку в біологічних структурах при заморожуванні.

Обидві ці речовини застосовуються в криобіології, проте при спільному використанні їх, криопротектор ДМСО швидше проникне усередину клітини й установиться концентраційна рівновага між усередині і позаклітинного вмісту, проте ПЕО м м 400, знаходячись у позаклітинному середовищі, буде витягати воду з клітини, тим самим збільшуючи концентрацію ДМСО усередині клітини, що викликають необоротні зміни біологічних і ліпідних взаємодій і призведе до ослаблення впливу ліпідів, що стабілізує, на структурні і функціональні білки.

Результатом такого впливу буде зниження життєздатності клітин при заморожуванні.

Запропонований режим охолодження клітин припускає повільне охолодження до 0°C , це можна пояснити необхідністю захисту клітин від температурного шоку, проте подальше збільшення швидкості заморожування до 5 - $6^{\circ}\text{C}/\text{хвил}$ призведе до виникнення переохолодження в зразках що заморожуються, що, без додаткової ініціації кристалотворення, викликає загибель клітин.

Третій етап запропонованого способу - витримання 1,5 - 2 годин при температурі -10°C . При даній температурі, навіть якщо відбулася кристалізація, навколо клітин і клітинних мембран є не замерзла рідка фаза, у якій знаходяться концентровані розчини солей і криопротектора, у таких умовах багато реакцій можуть пришвидшуватися. Змінюється рН середовища, полярність і йонна сила розчинів, наслідком цього може бути активація або гальмування процесів кислотно-лужного каталізу, інактивація ферментів, руйнація клітинних мембран, що також здійснить негативний вплив на біологічні об'єкти що заморожуються.

Збереження продукту у вигляді фрагментів розміром 3 x 2 см призводить до зниження якості кінцевого продукту. Лише клітини, які знаходяться на поверхні фрагментів внаслідок дифузії отримують достатню кількість ДМСО і внаслідок цього зберігають життєздатність. Решта клітин гинуть.

Використання суспензії клітин плаценти за таким способом після завершення процесу збереження потребує додаткових операцій подрібнення та гомогенізації продукту за прототипом, що ускладнює застосування такого продукту та створює додаткові можливості для забруднення мікрофлорою.

Завданням винаходу є створення способу одержання препарату суспензії клітин плаценти у якому шляхом зміни операцій способу та знайдених емпіричним шляхом режимів, використовуваної сировини, допоміжних речовин, обладнання, та дій з його використанням забезпечується покращення умов збереження клітин плаценти, збільшення періоду збереження та підвищення кількості життєздатних клітин що зберігаються після періоду збереження, що в цілому покращує якісні характеристики отриманого препарату.

Ця задача вирішується тим, що в способі одержання препарату суспензії клітин плаценти, який передбачає промивання отриманої плацентарної тканини шляхом перфузування через пупкову вену фізіологічним розчином, подрібнення тканини плаценти, багатоетапне заморожування до -196°C в розчині, який містить криоконсервант, занурення і зберігання у рідкому азоті, новим є те, що отриману плацентарну тканину спочатку промивають стерильним фізіологічним розчином з антибіотиком, потім здійснюють перфузію, відокремлюють від плаценти хоріон й амніотичну оболонку, а також значні кровоносні судини, після подрібнення плацентарну тканину гомогенізують у фізіологічному розчині до одержання сметанообразної маси, до гомогената додають 10 - 20% розчин криопротектора диметилсульфоксиду (ДМСО) на розчині Хенкса, перемішують, розливають у поліетиленові ампули для наступного замороження та криоконсервування.

Внаслідок використання зазначених ознак способу забезпечується достатнє очищення плацентарної тканини і призводить до підвищення якості кінцевого продукту.

Гомогенізування плацентарної тканини після операції подрібнення покращує наступний процес дифузії ДМСО в клітини тканини внаслідок чого всі клітини отримують достатню кількість ДМСО і внаслідок цього зберігають життєздатність.

Продукт у вигляді гомогенату не потребує додаткових операцій подрібнення та гомогенізації продукту, що зменшує кількість операцій при застосуванні продукту спрощує застосування такого продукту. Зменшення кількості операцій при застосуванні продукту зменшує можливість для забруднення мікрофлорою при здійсненні таких операцій.

Внаслідок застосування зазначеного розчину криопротектора концентраційна рівновага між позаклітинним середовищем і всередині клітин установиться на оптимальному рівні що забезпечить підвищення життєздатності клітин при заморожуванні.

В конкретних варіантах реалізації способу одержання препарату суспензії клітин плаценти плацентарну тканину отримують в породілей і жінок, що надійшли на добровільне переривання вагітності за показниками, сироватка крові яких дає негативний результат при тестуванні на гепатити В і С, вірус імунodefіциту, сифілісу, токсоплазмоз, цитомегаловірус, хламідії, мікоплазму, уреоплазму, краснуху, вірус простого герпеса.

Внаслідок використання зазначених ознак способу покращується якість отриманого препарату.

В конкретних варіантах реалізації способу одержання препарату суспензії клітин плаценти промивання плацентарної тканини стерильним фізіологічним розчином з антибіотиком повторюють тричі.

Внаслідок цього на початковій стадії процесу забезпечується гарантоване очищення полупродукту від мікрофлори, що виключає можливість її розвитку на протязі здійснення способу що також призводить до підвищення якості кінцевого продукту.

В конкретних варіантах реалізації способу

одержання препарату суспензії клітин плаценти при подрібненні плацентарну тканину розрізають на окремі фрагменти розміром 3 - 5см, потім фрагменти плаценти подрібнюють у ножовому гомогенізаторі MPW-324, а потім у скляному гомогенізаторі Поттера.

Внаслідок використання зазначених ознак способу забезпечується рівномірна гомогенізація тканини що додатково покращує наступний процес дифузії диметилсульфоксиду в клітини тканини, внаслідок чого всі клітини отримують достатню кількість диметилсульфоксиду і внаслідок цього кількість життєздатних клітин підвищується.

В конкретних варіантах реалізації способу одержання препарату суспензії клітин плаценти 10 - 20% розчин диметилсульфоксиду на розчині Хенкса додають до гомогената в співвідношенні 1 0,8 - 1,2.

Запропонований інтервал співвідношення гомогената до розчину диметилсульфоксиду на розчині Хенкса, оснований на отриманих імперичних даних і забезпечує оптимальні умови для початку наступного процесу замороження.

В конкретних варіантах реалізації способу одержання препарату суспензії клітин плаценти замороження здійснюють у програмному заморожувачі зі швидкістю 0,6 - 1,2 $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до $-30 - 42^{\circ}\text{C}$, із ініціюванням процесу кристалізацію при температурі - мінус 3,5 - 4,5 $^{\circ}\text{C}$, потім із швидкістю 10 - 12 $^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до $-90 - 110^{\circ}\text{C}$ із наступним зануренням у рідкий азот.

Запропонований режим охолодження клітин забезпечує оптимальну швидкість заморожування без температурного шоку і одночасно гарантовану і оптимальну ініціацію кристалізацію, що суттєво зменшить негативний вплив операцій заморожування на біологічні об'єкти.

Для порівняння прототипу та запропонованого способу здійснювали спосіб за прототипом та запропонований на зазначених нижче прикладах 1 - 14. В прикладах здійснювали такі дії.

Для приготування препарату за прототипом та запропонованим способом використовували плацентарну тканину, отриману в породілей і жінок, що надійшли на добровільне переривання вагітності за показниками, сироватка крові яких дає негативний результат при тестуванні на гепатити В і С, вірус імунodefіциту, сифілісу, токсоплазмоз, цитомегаловірус, хламідії, мікоплазму, уреоплазму, краснуху, вірус простого герпеса.

При виконанні прикладу способу за прототипом отриману плацентарну тканину перфузували через пупкову вену фізіологічним розчином, подрібнювали плацентарну тканину на фрагменти розміром 3 x 2, здійснювали заморожування тканини до -196°C в розчині, який містить 10% концентрацію ДМСО і додатково 10% поліетиленоксиду м м 400 (далі ПЕО м м 400), а заморожування здійснювали із швидкістю 1 - 2 $^{\circ}\text{C}/\text{хвил}$ до 0°C , потім із швидкістю 5 - 6 $^{\circ}\text{C}/\text{хвил}$ до -10°C , а далі витримували при -10°C протягом 2 годин, після чого занурювали у рідкий азот, де зберігали протягом одного місяця.

В прикладах 1 - 14 за запропонованим способом плацентарна тканина, отримана під час родів, зроблених за допомогою кесарева перетину, або

простагландинового переривання вагітності за показниками, тричі промивалася стерильним фізіологічним розчином з антибіотиком (канаміцин 30 ед/мл), в асептичних умовах робили відділення плаценти від хоріона й амніотичної оболонки, а також від значних кровоносних судин

Очищену плацентарну тканину ще раз промивали за допомогою перфузії стерильним фізіологічним розчином через пупочний канатик, після чого розрізали на окремі фрагменти розміром 3 - 5 см

Фрагменти плацентарної тканини подрібнювали у ножовому гомогенізаторі MPW-324, а потім у скляному гомогенізаторі Поттера у фізіологічному розчині до одержання сметанообразної маси. До гомогената в співвідношенні 1:1 додавали 10 - 20% криопротектора диметилсульфоксида (ДМСО) на розчині Хенкса, перемішували, розливали у поліетиленові ампули обсягом 4,5 мл, які герметизували, маркували і заморожували у програмному заморозувачі зі швидкістю 0,6 - 1,2°C/хв до -30 - 42°C, із ініціюванням процесу кристалізації при температурі - мінус 3,5 - 4,5°C, потім із швидкістю 10 - 12°C/хв до -90 - 110°C із наступним зануренням у рідкий азот

У Таблиці 1 зазначені режими виконання запропонованого способу, а в Таблиці 2 подані результати, отримані при порівняльному дослідженні препаратів, отриманих по режиму, описаному в прототипі і по запропонованому способу (в прикладах 1 - 14)

У препаратах отриманих за способом прототипом через місяць і у препаратах в прикладах 1 - 14 через шість місяців після криоконсервування визначали рівень гормонів і білків за допомогою

класичного імуноферментного аналізу (див Імуноферментный анализ Нго ТТ, Ленхофф Г (ред.), Москва, "Мир", 1988), робили підрахунок кількості життєздатних клітин шляхом фарбування витальним барвником трипановим синім

Як видно з поданих у таблиці результатів, цілість гормонів і білків у препаратах плаценти, отриманих запропонованим способом набагато вище, чим в отриманих за прототипом

Оцінити кількість клітин у гомогенізованих препаратах плаценти, що заморожували по способу прототипу складно. Матеріал майже весь поданий конгломератами клітин і невеличкої кількості клітин цито- і синцитиотрофобласта

При фарбуванні трипановим синім для підрахунку життєздатних клітин вибирали окремі клітини або невеличкі по 5 - 10 скупчень конгломерати і вважали клітини, що виключають фарбування барвником по 500 клітин на препарат, життєздатними. Неокрашених клітин в препараті, консервованому запропонованим способом, було 75 - 90%

Як показують результати прикладів, підготовлені запропонованим способом препарати плаценти, можуть довгостроково зберігатися без зміни всіх досліджуваних показників і по необхідності використовуватися як вихідний матеріал для потреб трансплантології, медицини, у косметологічній практиці в якості біоматеріалу в біотехнологіях і у фармакології для готування різноманітних фармакопейних препаратів, а також для одержання гормонів, вивірок, амінокислот, ростових чинників, α -фетопротеїну

Таблиця 1

№ приклада	Розмір фрагментів см	Термін гомогенізації, хвилини.	Співвідношення гомогената до розчину кріопротектора %	Концентрація диметилсульфоксида в розчині Хенкса %	Швидкість охолодження °C/хв.	Кінцева температура етапу °C	Температура ініціювання процесу кристалоутворення °C	Швидкість охолодження °C/хв.	Кінцева температура етапу °C
1.	3x3	18	1:0,8	14	1,2	-31	-3,5	10	-92
2.	3x5	20	1:1,2	15	1,1	-30	-4,5	12	-110
3.	3x3	15	1:0,9	12	0,6	-32	-4,2	11	-105
4.	4x4	18	1:0,8	13	1,2	-40	-3,9	12	-90
5.	3x4	16	1:0,9	10	0,7	-35	-4,3	10	-95
6.	3x5	20	1:0,8	20	1,0	-34	-3,7	12	-107
7.	3x4	15	1:1,0	11	0,6	-37	-4,5	11	-91
8.	3x3	17	1:1,1	16	0,8	-42	-3,6	12	-109
9.	3x5	20	1:1,2	20	0,9	-33	-4,1	10	-96
10.	3x4	18	1:1,1	17	0,8	-38	-3,6	12	-110
11.	4x3	19	1:1,0	10	1,0	-40	-4,4	11	-94
12.	3x5	16	1:1,1	19	1,1	-39	-3,8	10	102
13.	3x5	21	1:1,2	18	0,7	-42	-4,3	12	-93
14.	3x3	17	1:0,9	12	0,6	-36	-3,7	11	-110

Таблиця 2

Показник	Приклади														
	прото тип	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Фолікуло- стимулюю- чий гормон , мЕД/л	3,5	11,5	11,6	12,5	11,8	12,2	12	12,4	12,1	12,4	12,3	12,3	12,4	11,7	11,5
Пролактин, мЕД/л	102	278	282	336	294	317	308	331	312	331	322	327	331	291	278
Люталізую- чий гормон, пмоль/л	3	8,3	8,4	10,8	8,9	9,9	9,5	10,6	9,7	10,5	10,2	10,4	10,5	8,8	8,3
Прогестерон , пмоль/л	70	883	850	397	754	558	636	437	601	445	516	478	442	776	883
Естрадіол, пмоль/л	450	5130	5144	5230	5160	5200	5180	5220	5190	5220	5200	5210	5220	5150	5130
Кортизол , пмоль/л	37	66	66	72	68	70	69	72	70	72	71	71	72	67	66
Хоріогоніч- ний гормон мЕД/мл	2600	3800	3840	4500	3980	4270	4159	4440	4210	4430	4330	4388	4440	3950	3800
α - фетопроєїн нг/мл	20	50	51	58	52	55	54	57	55	57	56	57	57	52	50
α ₁ - Мікроглобулін , нг/мл	30	83	83	91	85	88	87	90	87	90	89	89	90	84	83
α ₂ - Мікроглобулін фертильності , нг/мл	250	2950	2990	3550	3110	3354	3250	3500	3300	3490	3400	3454	3490	3083	2950