



УКРАЇНА

(19) UA (11) 42599 (13) A

(51) 7 A01N1/00, 1/02, A61K35/14

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ТА ПІДГОТОВКИ ДО ТРАНСФУЗІЇ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН КОРДОВОЇ КРОВІ

(21) 2001042650

(22) 19 04 2001

(24) 15 10 2001

(33) UA

(46) 15 10 2001, Бюл. № 9, 2001 р

(72) Перехрестенко Петро Михайлович, Глухенька Галина Тимофіївна, Калиниченко Тетяна Олексівна, Алгазінова Маргарита Костянтинівна, Настенко Олена Петрівна

(73) ІНСТИТУТ ГЕМАТОЛОГІЇ ТА ТРАНСФУЗІОЛОГІЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ, UA

(57) 1 Спосіб кріоконсервування та підготовки до трансфузії гемопоетичних клітин кордової крові, 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 (ПВП) з подальшим програмним заморожуванням та розморожуванням суміші, який відрізняється тим, що видалення еритроцитів проводять після розведення цільної кордової крові стабілізуючим розчином, обробкою розведеної кордової крові розчином гідроксietилкрохмалю

для осадження еритроцитів, після чого осад видаляють, вільний від еритроцитів надстій клітинної зависі концентрують, а кріоконсервант додають до концентрату клітинної зависі

2 Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що видалення еритроцитів проводять шляхом введення в препарат крові розчину гідроксietилкрохмалю в розчині хлориду натрію в воді для ін'єкцій при співвідношенні компонентів, в грамах на літр розчину

гідроксietилкрохмаль	60,0-100,0
натрію хлорид	9,0
вода	решта,

при співвідношенні розчину крові до розчину гідроксietилкрохмалю, що дорівнює 3:1, витримки суміші до повного осадження еритроцитів та подальшого зняття надстою, що містить гемопоетичні клітини

3 Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що концентрування клітинної зависі проводять шляхом її центрифугування та видалення верхнього шару зависі, вільного від клітин

Винахід відноситься до області консервування живих тканин людини, зокрема крові, яка може бути застосована в клінічній практиці для лікування різних захворювань

Відомий спосіб кріоконсервування та підготовки до трансфузії гемопоетичних клітин кордової крові, що полягає у введенні у цільну кордову кров кріоконсерванту - 20% розчину диметилсульфоксиду (ДМСО) у співвідношенні 1:1, подальшого програмного заморожування та розморожування препарату крові

Спосіб вимагає складної підготовки розморожених клітин кордової крові до трансфузії шляхом багаторазового відмивання клітин від ДМСО з одночасним вилученням гемолізату еритроцитів (Vilmer et al. HLA-mismatched cord blood transplantation in a patient with advanced leukemia // Transplantation, 1992, 53, № 5, p. 1155-1157)

Використання у цьому способі як кріоконсерванту ендоецелюлярної дії - ДМСО, що має значну токсичність, чинить негативну дію як на розморожені гемопоетичні клітини - строк їх збереження

без структурно-функційних змін не перевищує 20-30 хв, так і на організм людини, який роблять трансфузію. Крім цього, необхідність багаторазового відмивання клітин гіпертонічним розчином глюкози до ізотонічного вмісту ДМСО також негативно впливає на збереження гемопоетичних клітин кордової крові, які підготовлені до трансфузії. Місткість збережених клітин в таких препаратах становить 75-78 %

Найбільш близьким до способу, що пропонується, є спосіб кріоконсервування та підготовки до трансфузії гемопоетичних клітин кордової крові шляхом введення у цільну кордову кров стабілізатору крові, наступного центрифугування цільної крові для вилучення плазми, введення у нефракціоновану кров рівного об'єму кріоконсерванту, у якості якого використовується водний розчин низькомолекулярного полівінілпіролідону (ПВП), глюкози та лактози, програмного заморожування клітинної зависі, з наступним розморожуванням для трансфузії, вилученням гемолізату еритроцитів, шляхом центрифугування розведеної сольовим

(19) UA (11) 42599 (13) A

розчином низькомолекулярного ПВП розмороженої клітинної зависі з подальшим вилученням надстою, та ресуспендуванням клітин, що залишилися, у раніш вилученій кордовій плазмі (пат. України № 30014 А)

Спосіб усуває негативну дію ДМСО та забезпечує підвищення місткості збережених клітин кордової крові у розмороженій зависі до 85-91%, але не усуває складності приготування розмороженої крові перед трансфузією, яка включає цілий ряд операцій вилучення гемолізату еритроцитів шляхом центрифугування розведеної сольовим розчином низькомолекулярного ПВП розмороженої клітинної зависі, подальше вилучення надстою, ресуспендування клітин, що залишилися, у раніш вилученій кордовій плазмі. Складність підготовки препарату крові до трансфузії викликана необхідністю її фракціонування перед трансфузією

Задача винаходу полягає у створенні способу криоконсервування та підготовки до трансфузії гемопоетичних клітин кордової крові, який, шляхом зміни послідовності операцій криоконсервування та застосування операції виділення еритроцитів шляхом обробки цільної кордової крові розчином спеціального складу, введення додаткової операції концентрування клітинної зависі, забезпечив би зменшення кількості операцій підготовки клітинної зависі до трансфузії після розморожування

Вирішення задачі полягає у способі криоконсервування та підготовки до трансфузії гемопоетичних клітин кордової крові, що включає розведення цільної крові стабілізатором крові у співвідношенні 4:1, виділення еритроцитів, виділення надстою клітинної зависі, додавання рівного об'єму криоконсерванту на основі ПВП з подальшим програмним заморожуванням та розморожуванням суміші, в якому, відповідно до винаходу, виділення еритроцитів проводять після розведення цільної кордової крові стабілізуючим розчином, обробкою розведеної кордової крові розчином на основі гідроксietилкрохмалю, після чого осад видаляють, вільний від еритроцитів надстій клітинної зависі концентрують, а криоконсервант додають до концентрату клітинної зависі

Виділення еритроцитів проводять шляхом введення в розчин цільної крові плазмозамінювача - гідроксietилкрохмалю (з середньою молекулярною масою - 450000 та молекулярним заміщенням, що дорівнює 0,7), в розчині хлориду натрію в воді для ін'єкцій (ізотонічному розчині), при співвідношенні компонентів розчину в грамах на літр розчину

гідроксietилкрохмаль	60,0-100,0
натрію хлорид	9,0
вода	решта,

при співвідношенні розчину крові до розчину плазмозамінювача, що дорівнює 3:1, витримки суміші до повного осадження еритроцитів та подальшого розділення надстою, що містить гемопоетичні клітини і осад еритроцитів. Повне осадження еритроцитів, як правило, проходить за 30-50 хвилин

Концентрування клітинної зависі проводять шляхом її центрифугування та видалення верхнього шару зависі - вільного від клітин

Препарат кордової крові після розморожування готовий для трансфузії. Відомі способи криоконсервування кордової крові, які включають фракціо-

нування крові перед заморожуванням. Це, наприклад, спосіб, що описаний в патенті США № 5004581, в якому попереднє фракціонування проводили шляхом диференційного центрифугування у градієнті щільності гіпак-фікоглу, спосіб, що описаний у роботі Harris D T et al Collection, separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation // Bone Marrow Transplant, 1994, 13, p 135-143, в якому попереднє фракціонування проводили шляхом осадження еритроцитів кордової крові 3%-ним розчином желатини. Низький вихід мононуклеарних клітин в розморожених препаратах крові у порівнянні з вихідними даними свідчить про те, що застосування тільки операції попереднього фракціонування крові недостатньо для усунення складностей при приготуванні розмороженого препарату крові для трансфузії з одночасним досягненням високих показників виходу мононуклеарних клітин після розморожування

Для криоконсервування використовували відомий криоконсервант, що вміщує водний розчин низькомолекулярного ПВП, глюкози та лактози у співвідношенні компонентів розчину, об %

низькомолекулярний ПВП	17-20
глюкоза	10-11
лактоза	4-5
вода	решта

Для розведення кордової крові використовували відомий препарат для стабілізації препаратів крові - "Глюцир", що має склад в грамах на літр розчину

натрію гідроксид (дво-заміщений) для ін'єкцій	20
глюкоза в перерахунок на безводну	30
вода для ін'єкцій	решта до 1 літра

Для видалення еритроцитів використовували плазмозамінюючий препарат "Стабізол", що має склад 500 мл препарату включає гідроксietилкрохмаль - 30,00 г, хлориду натрію - 4,50 г, води для ін'єкцій решта - до 500 мл

Використання препаратів для осадження еритроцитів зі вмістом гідроксietилкрохмалю меншим за 60 г/л призводить до неповного осадження еритроцитів, а більш за 100 г/л призводить до значної втрати гемопоетичних клітин

Використання препаратів зі вмістом гідроксietилкрохмалю в межах концентрацій, що пропонуються, дозволяє досягнути повного осадження еритроцитів, та позитивно впливає на гемопоетичні клітини препарату крові. Зміна концентрації в межах діапазону, що пропонується, обумовлює швидкість осадження еритроцитів

Описаний склад відомий як плазмозамінювач і раніше не використовувався для осадження еритроцитів

При концентруванні клітинної зависі об'єм, що видаляється, встановлюється візуально по границі зміни кольору. Експериментально встановлено, що він коливається в межах 60-67%

Приклад 1. Заготівлю крові проводили з пуповинної вени материнського кінця пуповини з використанням системи для взяття крові, що з'єднана з пляшками об'ємом 250 мл зі стерильним розчином "Глюцир". Кордову кров змішували у співвідношенні 4:1, після чого додавали "Стабізол" у спів-

відношенні 1 частина розчину на 3 частини розведеної крові та витримували 30 хвилин. Вільний від осаджених еритроцитів надстій обережно знімали та центрифугували (1200 об/хв - 10 хв). Вільний від клітин об'єм центрифугату видаляли, а залишок - концентровані клітини - змішували з рівним об'ємом криоконсерванту на основі ПВП. Клітинну завись з криоконсервантом розливали у металеві контейнери ємкістю 75-160 мл та заморожували відповідно до загальноприйнятого програмного заморожування. Розморожування проводили на водяній бані при температурі $40 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ протягом 35 ± 5 секунд. За допомогою системи для переливання крові клітинну завись з контейнеру переливали у стерильну пляшку ємкістю 100-250 мл.

Підготовка до трансфузії препарату крові, консервованого способом, що пропонується, не потребує ніяких операцій, крім розморожування.

Для збереження чистоти експерименту одночасно нами був відтворений спосіб криоконсервування та підготовки до трансфузії гемопоетичних клітин кордової крові відповідно до прототипу.

Приклад 2. Заготівлю крові проводили з пуповинної вени материнського кінця пуповини, з використанням системи для взяття крові, що з'єднана з пляшками об'ємом 250 мл з стерильним розчином "Глюціор". Кордову кров змішували з "Глюціором" у співвідношенні 4:1. Суміш центрифугували при

1200 об/хв - 20 хвилин та випучали плазму, яку піддавали заморожуванню та зберігали у холодильнику при $-(20-30)^{\circ}\text{C}$. Клітинну завись, вилучену від плазми, змішували з криоконсервантом у співвідношенні 1:1 та розливали у металеві контейнери ємкістю 160 мл. Металеві контейнери з клітинною зависсю заморожували відповідно до загальноприйнятого програмного заморожування. Розморожування проводили на водяній бані при температурі $40 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ протягом 35 ± 5 секунд. За допомогою системи для переливання крові клітинну завись з контейнеру переливали у стерильну пляшку ємкістю 250 мл та додавали до неї рівний об'єм соляного розчину 6% низькомолекулярного ПВП, суміш центрифугували при 1200 об/хв - 15 хвилин, вилучали надстій, що вміщує гемолізат еритроцитів, а клітини, що залишилися, ресуспендували у виділеній на попередньому етапі та розмороженій плазмі.

Оцінку життєздатності клітин проводили методом суправітального забарвлення 1% водним розчином еозину та підрахунком абсолютного вмісту ядровмісних і мононуклеарних клітин.

Аналізу піддавали заготовлену для консервації кордову кров та клітинну завись, що була криоконсервована та підготована для трансфузії за способом, що пропонується, та способом за прототипом. Одержані результати зведені в таблицю.

Таблиця

Показчик	Приклад 2		Приклад 1	
	Вихідні дані	Препарат, готовий до трансфузії	Вихідні дані	Препарат, готовий до трансфузії
Життєздатність, %	$96,6 \pm 0,41$	$88,2 \pm 0,30$	$92,0 \pm 0,61$	$89,1 \pm 0,82$
Кількість ядровмісних клітин, 10^8	$3,19 \pm 0,23$	$2,65 \pm 0,20$	$2,93 \pm 0,22$	$2,78 \pm 0,44$
Кількість мононуклеарів, 10^8	$1,29 \pm 0,06$	$1,19 \pm 0,82$	$1,46 \pm 0,09$	$1,40 \pm 0,1$

Дані, що наведені в таблиці, засвідчують зниження процента життєздатності клітин в зразках, що готувалися способом за прототипом, до 91%, порівняно з вихідними даними, а у зразках, що готувалися способом, який пропонується - тільки до 97%. При цьому збереженість як ядровмісних клітин в цілому, так і мононуклеарних клітин після розморожування препарату крові, що консервована

за способом, який пропонується, значно перевищує такі показники препарату "за прототипом".

Якщо прийняти вихідні дані за 100%, то збереженість ядровмісних клітин в цілому після консервування способом, що пропонується, складає 94% порівняно з 83% - при консервуванні "за прототипом", а збереженість мононуклеарів - 96% і 92%, відповідно.

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2002 р. Формат 60х84 1/8
Обсяг _____ обл.-вид арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180
(044) 268-25-22