



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **48629** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61N 2/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЗБАГАЧЕННЯ МАГНЕТИЧНО ОЧИЩЕНИХ CD34 ПОЗИТИВНИХ СТОVBУРОВИХ ГЕМОПОЕТИЧНИХ КЛІТИН

1

2

(21) u200910399

(22) 14.10.2009

(24) 25.03.2010

(46) 25.03.2010, Бюл.№ 6, 2010 р.

(72) КЛИМЕНКО СЕРГІЙ ВІКТОРОВИЧ, МІШАРІНА
ЖАННА АНАТОЛІЇВНА, БАЛАН ВАЛЕНТИНА ВО-
ЛОДИМИРІВНА, БЕБЕШКО ВОЛОДИМИР ГРИГО-
РОВИЧ

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "НАУКОВИЙ ЦЕНТР
РАДІАЦІЙНОЇ МЕДИЦИНИ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ
НАУК УКРАЇНИ"

(57) Спосіб збагачення магнетично очищених CD34 позитивних стовбурових гемопоетичних клітин, який полягає у стимуляції проліферативної активності магнетично очищених CD34 позитивних стовбурових гемопоетичних клітин, який **відрізняється** тим, що використовують сироватку кордової крові для підвищення ефективності колонієутворення магнетично очищених CD34 позитивних стовбурових гемопоетичних клітин для застосування у трансплантації.

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема гематології, онкології та трансплантології, і може бути використана для збагачення очищених CD34 позитивних стовбурових гемопоетичних клітин для аутологічної трансплантації.

Відомий спосіб підготовки аферезного продукту або аспірату кісткового мозку для проведення аутологічної трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин, який базується на використанні системи магнетично-активованого сортування клітин [1, 2]. За цього способу, до суміші клітин, частина з яких несе на своїй поверхні антиген, наприклад CD34, додається маркер - антитіло, в даному випадку анти CD34 антитіло, що поєднано з магнітною часткою. Антитіло з'єднується з антигеном надаючи, таким чином, клітині магнітного маркеру. При здійсненні процедури селекції на апараті для магнетичної сепарації клітинна суміш проходить скрізь колонку з феромагнітним матріксом. Циклічна робота клітинного сортеру дозволяє періодично генерувати в колонці потужне магнітне поле. Мічені клітини затримуються в колонці, немічені - проходять скрізь неї без затримки, що сприяє сепарації клітинної суміші. Демагнітизація колонки вивільняє клітини інтересу окремою фракцією. При проведенні CD34 позитивної селекції для здійснення аутологічної трансплантації стовбурових гемопоетичних клітин метод дозволяє досягти чистоти фракції CD34+ клітин до 95,7% зі збереженням загальної кількості CD34+ клітин у 69,5% від вихідного [3].

Недоліком цього способу передтрансплантаційної підготовки клітинної суміші є зниження ефективності колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників в кінцевому продукті, порівняно з вихідним. Внаслідок такої особливості способу, під час проведення аутологічної трансплантації очищених CD34 позитивних стовбурових гемопоетичних клітин відбувається відстрочене приживлення трансплантату та затримується імунологічне відновлення пацієнта, що призводить до підвищення частоти інфекційних ускладнень [4].

Найбільш близьким до заявленого способу є спосіб збагачення гемопоетичних клітин-попередників, отриманих з різних джерел [5], за якого супернатант, отриманий після культивування мононуклеарів кордової крові, пропонується використовувати для підвищення ефективності колонієутворення клітин периферичної та кордової крові. Даний спосіб, прийнятий за прототип, є аналогічним заявленому лише за технологією та устаткуванням, яке використовується для збагачення клітин попередників у зразках периферичної та кордової крові, але передбачає використання супернатанту культури мононуклеарів кордової крові замість сироватки кордової крові, та не конкретизує сферу застосування щодо магнетично очищених CD34 позитивних стовбурових гемопоетичних клітин.

Основною задачею способу, який заявляється, є вдосконалення процедури аутологічної трансплантації магнетично очищених CD34 позитивних

(13) **U**
(11) **48629**
(19) **UA**

стовбурових гемопоетичних клітин. Прискорення приживлення трансплантату магнетично очищених CD34 позитивних стовбурових гемопоетичних клітин можливе за умов підвищення його проліферативної активності.

Поставлена задача запропонованого способу розв'язується шляхом додавання сироватки кордової крові до очищених CD34 позитивних стовбурових гемопоетичних клітин, заготовлених для проведення трансплантації. Біологічно активні речовини, що містяться в сироватці кордової крові стимулюють очищені CD34 позитивні стовбурові гемопоетичні клітини до проліферації, внаслідок чого відбувається підвищення ефективності колонієутворення цих клітин. Очікуваний клінічний ефект від використання суміші очищених CD34 позитивних стовбурових гемопоетичних клітин та однокрупної, за системою АВ0, сироватки кордової крові реалізуватиметься скороченням строків приживлення трансплантату, прискоренням імунологічного відновлення пацієнта та зниження частоти інфекційних ускладнень аутологічної трансплантації.

Проведене нами дослідження підтвердило із високою статистичною значущістю, що сироватка кордової крові, додана до суміші селекціонованих CD34 позитивних стовбурових гемопоетичних клітин стимулює їх проліферативну активність та підвищує ефективність колонієутворення. Забір пуповинної крові здійснювали під час пологів у здорових жінок віком від 21 до 32 років у сухі стерильні пробірки. Кров центрифугували при 1500об. впродовж 10 хвилин, відбирали сироватку, заморожували та зберігали при температурі -20°C для подальшого використання. Після курсу хіміотерапії хворим на онкогематологічну патологію проводилася мобілізація стовбурових гемопоетичних клітин за допомогою колонієстимулюючого фактору та лейкоцитаферез. Клітинну суміш кріоконсервували за вмісту DMSO 10% в рідкому азоті при тем-

пературі -196°C згідно загальноновизнаної методики. Після швидкого розморожування та відмивання клітинної суміші від DMSO у 0,5% розчині альбуміну людини в PBS/EDTA буфері (Myltiniy Biotec, Німеччина), проводили позитивну селекцію CD34+ клітин за використання анти CD34 антитіл (клон AC 101) з магнітною міткою та інструменту CliniMACS згідно інструкцій виробника (Myltiniy Biotec). Селекція здійснювалась в автоматичному режимі під контролем мікропроцесору. Фракція CD34 позитивних клітин об'ємом 45мл вивільнялася в окремий мішок. Вміст CD34 позитивних клітин в кінцевій суміші за даними імунофенотипування перевищував 50%. Для підтвердження ефективності способу, що пропонується, порівнювали результати культивування магнетично очищених CD34 позитивних клітин та магнетично очищених CD34 позитивних клітин з додаванням сироватки кордової крові із розрахунку 1мл сироватки на 4×10^6 клітин. Культуральні дослідження проводили в стерильних чашках Петрі (d-35мм), в які вносили живильне середовище RPMI-1640, 20% фетальну телячу сироватку (Serva, США), рекомбінантний гранулоцитарно-макрофагальний фактор у концентрації 30нг/мл (Sigma, США), 3,3% агар (Merk, Німеччина), антибіотики (пеніцилін і стрептоміцин по 50од/мл, Фармак, Україна), суміш магнетично очищених CD34 позитивних клітин (щільність посіву 1×10^6 на 1мл) та, паралельно, те саме, але з додаванням до суміші магнетично очищених CD34 позитивних клітин того ж самого хворого сироватки кордової крові (щільність посіву 1×10^6 на 1мл). Культивування проводили в умовах абсолютної вологості при 5% концентрації CO_2 і температурі 37°C протягом 14 днів. У таблиці 1 наведені значення ефективності колонієутворення готових до аутологічної трансплантації магнетично очищених CD34 позитивних клітин, та магнетично очищених CD34 позитивних клітин збагачених сироваткою кордової крові.

Таблиця 1

Результати культивування магнетично очищених CD34 позитивних клітин без та зі збагаченням сироваткою кордової крові

Зразок CD34 позитивних клітин	Діагноз хворого	Ефективність колонієутворення CD34 позитивних клітин, кількість колоній/ 1×10^6 експлантованих клітин	Ефективність колонієутворення збагачених CD34 позитивних клітин, кількість колоній/ 1×10^6 експлантованих клітин
Зразок 1	Лімфома	20,1	50,4
Зразок 2	Лімфома	26,7	53,8
Зразок 3	Лімфома	23,5	56,5
Зразок 4	Лімфома	30,2	60,3
Зразок 5	Лімфома	35,8	71,4
Зразок 6	Лімфома	32,5	67,9
Середнє значення		$28,1 \pm 5,8$	$60,1 \pm 8,2^*$

Примітка: * - $p < 0,00005$.

Приклад 1

Хворий Б., 20 років, діагноз лімфома Годжкіна, ІІБ, історія хвороби №111. При порівнянні результатів культивування готових для трансплантації магнетично очищених CD34 позитивних клітин, та

магнетично очищених CD34 позитивних клітин збагачених сироваткою кордової крові визначено, що ефективність колонієутворення становила $23,4 \pm 3,3$ та $53,6 \pm 3,1$ відповідно ($p < 0,0005$).

Приклад 2

Хвора Р., 30 років, діагноз лімфома Годжкіна, ПІА, історія хвороби №229. При порівнянні результатів культивування готових для трансплантації магнетично очищених CD34 позитивних клітин, та магнетично очищених CD34 позитивних клітин збагачених сироваткою кордової крові визначено, що ефективність колонієутворення становила $32,8 \pm 2,8$ та $66,5 \pm 5,7$ відповідно ($p < 0,001$).

Наведені приклади підтверджують високу ефективність способу збагачення магнетично очищених CD34 позитивних клітин за допомогою сироватки кордової крові для підвищення проліферативної активності трансплантату, що дає можливість удосконалити процедуру проведення аутологічної пересадки стовбурових гемопоетичних клітин для лікування хворих на онкогематологічну патологію.

Спосіб може бути використаний для передтрансплантаційної підготовки стовбурових гемопоетичних клітин для проведення аутологічної трансплантації в спеціалізованих онкологічних та гематологічних відділеннях.

Джерела інформації:

1. Пат. 5711871 США, МКИ B03C1/025, B03C1/02, B03C1/00, B01D35/06, G01N33/543, G01N1/34, B01D035/06. Magnetic separation apparatus: Пат. 5711871 США, МКИ B03C1/025, B03C1/02, B03C1/00, B01D35/06, G01N33/543, G01N1/34, B01D035/06. S. Miltenyi (США); Miltenyi

Biotech GmbH. - №487277; Заявл. 07.06.95; Опубл. 27.01.98, НКИ 210/86. - 22 с.

2. Пат. 6468432 США, МКИ B03C1/00, B03C1/005, C12N5/06, B03C1/01, C02F001/48, C02F001/00, B01D027/02, G01N033/53, G01N033/553. Methods of modification of selected cells in a magnetic cell separation column: Пат. 6468432 США, МКИ B03C1/00, B03C1/005, C12N5/06, B03C1/01, C02F001/48, C02F001/00, B01D027/02, G01N033/53, G01N033/553. S. Miltenyi, M. Assenmacher, J. Schmit (США); Miltenyi Biotech GmbH. - №654186; Заявл. 01.09.00; Опубл. 22.10.02, НКИ 210/695. - 28с.

3. Miltenyi S. CD34 + selection: the basic component for graft engineering. Oncologist. - 1997. - Vol.2. - P.410-413.

4. A comparison of CD34 + cell selected and unselected autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma: a case controlled analysis /M. Gandhi, H. Jestice, M. Scott, et al. //Bone Marrow Transplant. - 1999. - Vol.24. - P.369-375.

5. Пат. 22514 Україна /заявитель НЦРМ АМН України. - № 99010349; заявл. 22.01.99; опубл. 15.12.2000, Бюл. №7-11. Пат. 22514 Україна. Спосіб збагачення гемопоетичних клітин-попередників, отриманих з різних джерел /В.Г. Бебешко, І.А. Крячок, Ж.А. Мішаріна, Балан В.В.; НЦРМ АМН України. - №200612330; Заявл. 23.11.06; Опубл. 25.04.07, Бюл. №5. - 4с.