

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201900455** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.03.31

(51) Int. Cl. *C12N 5/09* (2010.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.09.27

(54) **СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ**

(96) **2019000108 (RU) 2019.09.27**

(71) Заявитель:
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
"НАЦИОНАЛЬНЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ГЕМАТОЛОГИИ" МИНИСТЕРСТВА
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
(ФГБУ "НМИЦ ГЕМАТОЛОГИИ"
МИНЗДРАВА РОССИИ) (RU)**

(72) Изобретатель:
**Бабаева Фатима Эльшановна,
Липатова Анастасия Валерьевна,
Кочетков Дмитрий Владимирович,
Кравченко Сергей Кириллович,
Чумаков Пётр Михайлович,
Джулакян Унан Левонович (RU)**

(74) Представитель:
Бахтияров М.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к области медицины, а именно к области диагностирования и разработке новых методов лечения злокачественных опухолей. Описан способ выделения и культивирования клеток злокачественных опухолей с помощью центрифугирования, заключающийся в заборе пробы тела опухоли, механическом измельчении полученного материала до получения частиц размером не превышающим 100 мкм, подготовке материала к центрифугированию, центрифугирование и последующая инкубация в термостате при температуре 37°C в среде 5% CO₂ и 95% влажности воздуха, при этом забор пробы производился в стерильные пробирки с охлажденной до 0-4°C питательной средой с ингибирующим развитие бактерий компонентом, центрифугирование проводилось в две стадии, где первая стадия проводилась в течение времени не превышающем 30 мин со скоростью не более 650 об/мин, с минимальной скоростью разгона и остановки с последующим отбором опухолевого субстрата, вторая стадия на протяжении времени не превышающем 10 мин со скоростью не превышающей 1200 об/мин, с минимальной скоростью разгона и остановки. Технический результат: разработан способ хранения клеток злокачественных образований более дешёвый при его осуществлении и обеспечивающий жизнедеятельность и развитие хранимой культуры в течении длительного срока.

A1

201900455

201900455

A1

СПОСОБ ВЫДЕЛЕНИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

Изобретение относится к области медицины, а именно к области диагностирования и разработке новых методов лечения злокачественных опухолей.

Известен способ консервации клеток, образующих ядро, а именно способ снижения апоптоза хранящихся клеток и к охлажденной композиции, содержащей клетки, где клетки находятся в контейнере. Способ включает: 1) хранение клеток, образующих ядро, в контейнере; 2) добавление газа в указанный контейнер таким образом, чтобы давление внутри контейнера достигало 0,5 атм - 4 атм выше давления окружающей среды, где указанный газ представляет собой или включает газ ксенона; 3) сохранение указанного давления в указанном контейнере в продолжение первого периода времени, в течение которого температура в указанном контейнере равна 22°C-37°C; 4) после указанного первого периода времени снижение указанной температуры в контейнере до 0,1°C-10°C с одновременным сохранением указанного давления на 0,5 атм - 4 атм выше давления окружающей среды; 5) сохранение указанного контейнера при указанной более низкой температуре и при давлении на 0,5 атм - 4 атм выше давления окружающей среды в течение второго периода времени, где указанный второй период времени больше чем указанный первый период времени; и 6) после указанного второго периода времени, снижение давления в указанном контейнере до давления окружающей среды и повышение температуры в указанном контейнере до

22°C-37°C. Осуществление указанного способа позволяет снизить апоптоз клеток.

К недостаткам известного способа относится:

- использование для хранения сложного оборудования, а именно контейнера сложной конструкции, которая с одной стороны обеспечивала герметичность контейнера при избыточном давлении, а с другой стороны обеспечивала бы подачу газовой смеси для консервации;
- использование для консервации смеси среды с инертным газом, что усложняет и делает более дорогим процесс консервации и хранения;
- способ консервирует клетки. А не обеспечивает их процесс жизнедеятельности.

Известен способ выделения и размножения раковых клеток, описанный в патенте США № 5529903. Способ выделения и размножения раковых клеток с помощью центрифугирования с использованием центрифуги Haemonetics V50, которая снабжена байпасом, в случае двух пациентов с различными типами опухолей (рак предстательной железы, меланома) была извлечена клеточная фракция соответственно 120 мл крови. Лейкоциты из клеточной фракции отбирали в пробирку со средой для культивирования клеток (RPMI 1640) и исследовали следующим образом. Клетки культивировали в течение ночи в стандартных условиях (37°C, 5% CO₂, 95% влажность воздуха). В качестве среды использовали RPMI 1640 с 10% эмбриональной сыворотки теленка с добавлением антител, специфичных к В- и Т-клеткам (гамма-специфические антитела к CD 8-, CD 25-, IL-2- и ИФН), и с добавлением

пептида, ингибирующего макрофаги, в следующих концентрациях: анти-ИФН: 100 мкг / 500 мл среды анти-CD 25: 100 мкг / 500 мл среды анти-CD 8: 1 мг / 500 мл среды. макрофаг-ингибирующий пептид (MIP): 50 мг / 500 мл среды. Партию распределяли по планшетам для микротитрования с соответственно 200 000 клеток на 100 мкл на лунку. В течение всего периода культивирования его постоянно газировали 5% CO₂ при 37 °С. Раковые клетки были четко видны после деления в виде клонов через четыре дня в фазово-контрастном микроскопе.

К недостаткам известного способа относится недостаточный срок культивации (жизни раковых клеток) всего в четыре дня, что по нашему мнению объясняется повреждением клеток в результате механических повреждений при центрифугировании и в результате процессов разложения.

Задача на решение которой направлено заявляемое изобретение является разработка способа хранения клеток злокачественных образований более дешёвого при его осуществления, не требующего сложного оборудования для хранения и обеспечивающего жизнедеятельность и развитие хранимой культуры в течении длительного срока.

Поставленная задача решается путём применения способа выделения и культивирования клеток злокачественных опухолей с помощью центрифугирования. Способ заключается в заборе пробы тела опухоли, механическом измельчении полученного материала до получения частиц размером до 100 микрон, подготовке материала к центрифугированию, центрифугирование и инкубацией в термостате при температуре 37°С, в среде

5% CO₂ и 95% влажности воздуха. При этом забор пробы производился в стерильные пробирки с охлажденной до 0-+4 °С питательной средой с ингибирующим развитие бактерий компонентом. Центрифугирование проводилось в две стадии где первая стадия проводилась в течении времени не превышающем 30 мин, со скоростью не более 650 оборотов в мин, с минимальной скоростью разгона и остановки с последующим отбором опухолевого субстрата. Вторая стадия на протяжении времени не превышающем 10 мин, со скоростью не превышающем 1200 оборотов\мин, с минимальной скоростью разгона и остановки.

Применение в стерильных пробирок с охлажденной до 0-+4 °С питательной средой с ингибирующим развитие бактерий компонентом, центрифугирование в две стадии где первая стадия проводилась при малых оборотах а вторая при высоких в течении указанных временных интервалов позволяет избежать механических, химических и механохимических повреждений забираемых клеток опухолей, что позволяет избежать их преждевременного апоптоза и позволяет клеткам вести нормальную жизнедеятельность и размножение в течении длительного, до одного месяца, времени.

Для приготовления органных культур использовались биопсии опухолей лимфоидной природы, полученные в ФГБУ НМИЦ Гематологии МЗ РФ в период с мая 2017 года по январь 2019 года, суммарно 42 культуры. Из 42 культур : 21 образец - фолликулярная лимфома (16 из которых фолликулярная лимфома 1-2 цитологического типа, 5 -3А цитологического

типа), 4 образца-лимфома из клеток мантийной зоны, 7 образцов- лимфома из клеток маргинальной зоны, 2 образца- лимфома Беркитта, 3 образца- В-хронический лимфолейкоз, 2 образца – диффузная В-крупноклеточная лимфома, В клеточная лимфома высокой степени злокачественности -2 образца, 1 образец- волосато- клеточный лейкоз.

Забор биологического материала производился во время операций и биопсий в стерильные пробирки с охлажденной до +4 С (со средой ДМЕМ + стрептомицин + пенициллин). Пробирки в асептических условиях хранились при температуре +2-4 С. Далее материал транспортировался в лабораторию при постоянном охлаждении +4 С в сроки, не превышающие 72 часа. Первичные культуры получали путем механической обработки биопсийного материала с помощью специального фильтра, представляющего собой сито с размером отверстий 100 микрон и плоский пластиковый поршень, с помощью которого кусочки опухоли продавливались через него (Cell Strainer). После чего клеточный материал промывался через фильтр с помощью фосфатно-солевого буфера PBS в объеме 15 мл. Далее полученный материал переносился на раствор фиколла с плотностью 1,077 г/см³ в объеме, в соотношении 10 мл раствора фиколла и 15 мл опухолевый субстрат.

Проводилось центрифугирование в течении примерно 30 минут, 650 оборотов в минуту, с минимальной скоростью разгона и остановки. В результате на границе фиколла и опухолевого субстрата, отмечалось так называемое «кольцо опухолевых клеток», которое собиралось с помощью пипетки в отдельную пробирку с добавлением промывочного буфера PBS.

Повторное центрифугирование на протяжении примерно 10 минут, 1200 оборотов\мин, с минимальной скоростью разгона и остановки, проводилось с целью минимизировать риски повреждение клеток. В результате повторного центрифугирования, необходимый субстрат оседал на дно пробирки, остальная часть удалялась. Последовательно добавлялись среда RPMI-1640 с глутамином, содержащая 10% бычью сыворотку и антибиотики-пенициллин и стрептомицин в объеме 5-10 мл, с дальнейшим перемешиванием пипеткой и рассадкой во флаконы объемом 40 мл и инкубацией в термостате при температуре 37С и 5% CO₂, предварительно оценивался % процент живых клеток путем подсчета в аппарате.

ФОРМУЛА

Способ выделения и культивирования клеток злокачественных опухолей с помощью центрифугирования, заключающийся в заборе пробы тела опухоли, механическом измельчении полученного материала до получения частиц размером не превышающем 100 микрон, подготовке материала к центрифугированию, центрифугирование и последующая инкубация в термостате при температуре 37 °С, в среде 5% CO₂ и 95% влажности воздуха, отличается тем, что забор пробы производился в стерильные пробирки с охлажденной до 0-+4 °С питательной средой с ингибирующим развитие бактерий компонентом, центрифугирование проводилось в две стадии где первая стадия проводилась в течении времени не превышающем 30 мин, со скоростью не более 650 оборотов в мин, с минимальной скоростью разгона и остановки с последующим отбором опухолевого субстрата, вторая стадия на протяжении времени не превышающем 10 мин, со скоростью не превышающем 1200 оборотов\мин, с минимальной скоростью разгона и остановки.

ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201900455

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

C12N 5/09 (2010.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)

C12N 5/00, C12N 5/09

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
ЕАПАТИС, ESPACENET, GOOGLE;

клетки опухоли, ткани, выделение, культивирование, дифференциальное центрифугирование, центрифугирование в градиенте плотности, инкубация.

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	BY 17447 C1 (ГНУ «ИНСТИТУТ ФИЗИКИ И КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ НАН БЕЛАРУСИ», ГУ «РНЦ ОНКОЛОГИИ И МЕДИЦИНСКОЙ РАДИОЛОГИИ им.Н.Н.АЛЕКСАНДРОВА») 2013.08.30, описание: стр.1, строки 21-23, 31-44.	1
Y	UA 69879 U (ИНСТИТУТ НЕЙРОХИРУРГИИ им. А.П.РОМОДАНОВА АМН УКРАИНЫ), 2012.05.10, описание: стр.4, строки 54-64, стр.5, строки 6-22.	1
A	BY 20789 C1 (УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ «9-Я ГОРОДСКАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ БОЛЬНИЦА») 2017.02.28, реферат, формула.	1
A	UA 89267 U (НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ БИОРЕСУРСОВ И ПРИРОДОПОЛЬЗОВАНИЯ УКРАИНЫ) 2014.04.10, формула, реферат, описание: стр.4, строки 26-38.	1
A	RU 2707281 C1 (АБРАМОВ АЛЕКСАНДР АНДРЕЕВИЧ, ПЕТКЕВИЧ АЛИСА АНТОНОВНА, ПОСПЕЛОВ ВАДИМ ИГОРЕВИЧ) 2018.09.17, реферат, описание: стр.4, строки 5-50, стр.5, строки 1-8.	1
A	CN 109609461 A (NO 2 AFFILIATED HOSPITAL 2ND MILITARY MEDICAL UNIV PLA), 2019.04.12.	1
A	ЧЕШУК В.Е. и др. Изучение чувствительности эксплантатов рака молочной железы к противоопухолевым препаратам. Онкология, 2002, т.4, № 4, с.264 (столбец 2) – стр. 265 (столбец 1).	1
A	GERTLER R. et al. Detection of circulating tumor cells in blood using an optimized density gradient centrifugation. Recent. Results Cancer Res., 2003, т.162, стр. 149-155. doi: 10.1007/978-3-642-59349-9_13.	1

последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

“P” - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета”

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

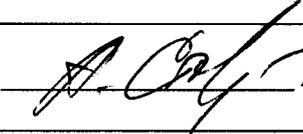
«L» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **20/05/2020**

Уполномоченное лицо:

Заместитель начальника Управления экспертизы –
начальник отдела химии и медицины

 А.В.Чебан