

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043591**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.05

(51) Int. Cl. *A61N 1/02* (2006.01)

(21) Номер заявки
202000147

(22) Дата подачи заявки
2020.06.02

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК

(43) 2021.12.31

(96) 2020000045 (RU) 2020.06.02

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

(56) K. RADWANSKI et al. Cryopreserved ECP-treated lymphocytes maintain apoptotic response and anti-proliferative effect. J Clin Apher. 2015 Jun; 30(3): 154-161, весь текст, особенно разделы Cell Collection and ECP Treatment и Cryopreservation and Thawing

C. POCHON et al. Cryopreservation as a way to maintain extracorporeal photopheresis regimen for GvHD treatment while circumventing patient temporary inability to undergo apheresis. Bone Marrow Transplant. 2017 Jan; 52(1): 167-170, весь текст, особенно с. 167, левая колонка

H. BARCELO et al. A practical cryopreservation and staining protocol for immunophenotyping in population studies. Curr Protoc Cytom. 2018 Apr; 84(1): e35, весь текст, особенно раздел BASIC PROTOCOL 1

УСС А.Л. и др. Криоконсервирование клеток человека. Медицинская панорама, 2003; № 2(27): 38-42, весь текст

EP-A1-2641623
RU-C1-2508924

(72) Изобретатель:
**Васильева Вера Алексеевна,
Камельских Денис Владимирович,
Капранов Николай Михайлович,
Никифорова Ксения Александровна,
Давыдова Юлия Олеговна, Петинати
Наталия Арнольдовна, Дризе Нина
Иосифовна, Кузьмина Лариса
Анатольевна, Гальцева Ирина
Владимировна, Гапонова Татьяна
Владимировна (RU)**

(57) Изобретение относится к области медицины, а именно трансфузиологии и трансплантологии, может применяться для профилактики и лечения как острой, так и хронической реакции трансплантата против хозяина, отторжения при трансплантации аллогенных органов и терапии кожных Т-клеточных лимфом, а также ряда аутоиммунных заболеваний. Описан способ получения криоконсервированных моноклеарных клеток, включающий выделение концентрата моноклеарных клеток и проведение экстракорпорального фотофереза, при этом концентрат моноклеарных клеток после фотофереза делят на дозы (образцы) в количестве, необходимом для проведения курса терапии, подвергают программному замораживанию до -70°C с последующей криоконсервацией в жидком азоте. Технический результат заключается в разработке способа обработки и получения моноклеаров, который обеспечивает их долгое хранение, возможность отсроченного введения криоконсервированных клеток без потери клинического эффекта процедуры ЭКФ, с возможностью управления процессом апоптоза.

B1

043591

**043591
B1**

Изобретение относится к области медицины, а именно трансфузиологии и трансплантологии, иммунологии и может быть использовано для профилактики и лечения реакции трансплантат против хозяина, отторжения при трансплантации аллогенных органов, кожных Т-клеточных лимфом, а также ряда аутоиммунных заболеваний.

Одним из применяемых в настоящее время способов лечения и профилактики вышеперечисленных заболеваний является экстракорпоральный фотоферез (фотоферез, ЭКФ) - введение в организм реципиента обработанных моноклеарных клеток.

Экстракорпоральный фотоферез многоступенчатая циклическая процедура, в которой моноклеары, полученные методом афереза периферической крови пациента, после применения фотосенсибилизатора 8-метоксипсоралена (8-МОП) в концентрации 60-400 нг/мл подвергаются облучению ультрафиолетом А (1-2 Дж/см²) и затем возвращаются пациенту.

Механизм этого воздействия ещё до конца не изучен, однако установлено, что ЭКФ инициирует апоптоз моноклеаров в кровеносной системе реципиента. Апоптоз моноклеаров подразделяется на ранний и поздний. Процесс апоптоза характеризуется активированными каспазами в цитоплазме. При раннем апоптозе целостность поверхностной мембраны не нарушена, а при позднем - имеет место фрагментация поверхностной мембраны. Именно клетки, находящиеся в поздней стадии апоптоза, индуцируют созревание дендритных клеток, превращая их в активные антигенпрезентующие клетки (АПК), взаимодействие Т-клеток с которыми приводит к активации Т-регуляторных лимфоцитов.

Таким образом, для успешного проведения профилактики и лечения вышеперечисленных заболеваний моноклеарные клетки должны попадать в кровеносную систему реципиента живыми и начинать апоптоз уже в ней.

Известен способ профилактики и лечения отторжения почечного трансплантата, включающий проведение экстракорпорального фотофереза путем введения после операции фотосенсибилизатора, выделение концентрата моноклеарных клеток, разведение его физраствором с последующим ультрафиолетовым облучением полученной суспензии, возвращение ее в кровеносное русло, отличающийся тем, что первый сеанс фотофереза проводят на 3-4 сутки после трансплантации почки, при этом дополнительно сразу после ультрафиолетового облучения проводят замещение физраствора плазмой крови в том же объеме, а затем осуществляют введение в смесь цитокина - гранулоцит-макрофагального колониестимулирующего фактора в дозе 80-120 нг/мл, затем осуществляют инкубацию полученного состава в течение 90-120 мин, замещают плазму с цитокином физраствором в том же объеме с последующим возвращением полученной суспензии в кровеносное русло, на курс 15 сеансов, причем в первые две недели проводят два сеанса в неделю, последующие шесть недель по одному сеансу в неделю, в течение третьего месяца два сеанса, четвертый, пятый и шестой месяц - по одному сеансу в месяц (патент РФ 2508924).

Недостатком известного решения является невозможность управления процессом апоптоза полученных моноклеаров, невозможность длительного хранения полученных моноклеаров.

Задачей, на решение которой направлено заявляемое изобретение, является разработка способа получения моноклеаров, обработанных ЭКФ, который бы обеспечивал их долгое хранение, а так же возможность управления процессом апоптоза моноклеаров.

Поставленная задача решается путём применения способа получения криоконсервированных моноклеарных клеток, включающего выделение концентрата моноклеарных клеток и проведение экстракорпорального фотофереза. При этом концентрат моноклеарных клеток после фотофереза подвергают программному замораживанию до -70°C с последующей криоконсервацией в жидком азоте.

Термин программное замораживание подразумевает, что замораживание имеет, как правило, три фазы, характеризующиеся разной скоростью заморозки. Первая фаза - охлаждение моноклеаров до температуры начала их кристаллизации (1-4°C ниже нуля) характеризуется предпочтительно быстрым кратковременным снижением температуры (10-20°C в мин). Вторая фаза кристаллизации моноклеаров (4-12°C ниже нуля) характеризуется медленным снижением температуры (0,5-1°C в мин) и предпочтительно наличием, как минимум, одного плато выдержки моноклеаров при постоянной температуре. Предпочтительно плато выдержки моноклеаров делают при температуре на 2-3°C ниже температуры эвтектики, при 6-7°C ниже нуля, в течение 5-8 мин. Третья фаза замораживания характеризуется постепенным, монотонным (около 1°C в мин) снижением температуры (до -70°C).

Применение вышеописанного способа позволяет обеспечить длительное хранение живых моноклеарных клеток с инициированным апоптозом, а также снизить количество погибших при заморозке моноклеаров. Так, при заморозке в жидком азоте погибает порядка 13-20% моноклеарных клеток в результате их повреждения при неконтролируемом выбросе тепла в процессе кристаллизации и при резком снижении температуры клеток. При описанном программном замораживании гибель моноклеаров составляет примерно 2-4%.

На фиг. 1 представлена схема проведения способа.

На фиг. 2 представлен пример цитометрического анализа апоптоза в лимфоцитах.

На фиг. 3 представлено количество лимфоцитов в ранней (А) и поздней (Б) стадиях апоптоза в исследованных лейкоконцентрах.

В качестве материалов, подтверждающих возможность осуществления настоящего изобретения, представляем одну из серий проводившихся экспериментов, согласно схеме, представленной на фиг. 1.

Было отобрано 20 образцов мононуклеаров, полученных от 12 пациентов с хронической РТПХ (пяти больным аферез мононуклеаров проводили от 2 до 4 раз в разные дни с интервалом более 1 недели). В исследование было включено 5 женщин и 7 мужчин. Возраст от 19 до 68 лет (медиана 35 лет). В качестве основного заболевания у 10 пациентов был острый лейкоз, 2 пациента с лимфомой. 11 больным была выполнена трансплантация аллогенных гемопоэтических клеток (алло-ТГСК) от полностью совместимого донора: 5 больным от родственных доноров и 6 больным - от неродственных доноров; 1 пациентке от гаплоидентичного донора.

Аферез мононуклеаров проводили на клеточном сепараторе SpectraOptia (Terumo ВСТ, Япония/США) в режиме сбора мононуклеаров (МНК) со следующими параметрами процедуры: соотношение кровь/антикоагулянт -12:1; настройка сбора (collection preferred) - 40. В результате было обработано от 0,8 до 1,7 от объема циркулирующей крови (ОЦК) (медиана 1,19), медиана времени процедуры - 180 мин (120-250 мин), медиана объема полученного продукта афереза составила 85 мл (60-120 мл).

Образцы для исследования отбирались непосредственно после афереза мононуклеаров (группы 1.1. и 1.2.), до (группа 1.3) и после ЭКФ (группы 2.1. и 2.2). Образцы 1.1 и 1.2. отбирали из контейнера (системы для сбора мононуклеаров (Spectra Optia Collection Set 10110, TerumoВСТ, Япония/США) во встроенный в систему контейнер для отбора проб. В оставшийся лейкоконцентрат добавляли изотонический раствор хлорида натрия до достижения общего объема продукта 300 мл., после чего в условиях ламинарного шкафа 2 класса биологической безопасности (Nuairе, NU-481-400E, США) производили отбор образца 1.3 и пробы для контроля параметров продукта на гематологическом анализаторе (Sysmex КХ-21n, Япония) перед облучением: количество лейкоцитов в продукте составило $1,9 \cdot 10^{10}$ (медиана $5,85 \cdot 10^9$), гематокрит - 0,2-2,1% (медиана 0,8%).

Далее, продукт переливали в специальный контейнер для облучения с последующим удалением воздуха из него. После, в условиях сниженного освещения, в продукт добавляли 8-МОП (МЕТОХ-SALENE S.A.L.F SpA, Италия) в дозе 200 нг/мкл и инкубировали в течение 5 мин.

Затем осуществляли облучение на аппарате Macogenic G2 (Macopharma, Франция) согласно рекомендациям производителя: продолжительность облучения составила от 546 до 682 с (медиана 606 с) в дозе 2 Дж/см². После облучения производили отбор образцов 2.1 и 2.2. Часть образцов анализировались сразу (группы 1.1. и 2.1.), а часть замораживали согласно описанной выше программе. Мононуклеары замораживали в холодном растворе полиглюкина с добавлением 10% диметилсульфоксида. Замороженные клетки хранили при температуре не менее 2-х суток. Размораживание осуществляли при 37°C и отмывали средой RPMI1640 с 10% человеческой инактивированной сывороткой IV группы.

Пробу 1.3 замораживали согласно описанной выше программе. После размораживания добавляли 8-МОП в дозе 20 нг/мкл и в последующем облучали на аппарате Macogenic G2 (параметры облучения не менялись).

После разморозки анализировали группы 1.2. и 2.2. Часть образцов из каждой группы проанализировали до и после 48-часового культивирования, чтобы проверить изменение уровня апоптоза в динамике.

Поскольку разные популяции лейкоцитов уходят в апоптоз с различной скоростью на протяжении нескольких суток, 5 образцов были прокультивированы для определения динамики изменения уровня раннего и позднего апоптоза с течением времени. Культивирование проводили в среде RPMI1640 с добавлением 10% человеческой инактивированной сыворотки IV группы, 2 мМ глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Клетки рассаживали по 10^6 на 1 мл в 24-ячеечные планшеты. Мононуклеары культивировали в течение 2-х суток при температуре 37°C и 5% CO₂. Счет клеток производился в камере Горяева после окраски генцианвиолетом на 3% уксусной кислоте или 0,5% трипановым синим.

Для оценки апоптоза клеток использовали набор FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I ("BD Biosciences", США), включающий аннексин V FITC и пропидия йодид (PI). Для отделения лейкоцитов использовали анти-CD45 APC-Cy7 моноклональные антитела (клон 2D1). Для окрашивания брали около $0,2 \times 10^6$ клеток, отмывали 1 мл среды RPMI1640 с 10% человеческой инактивированной сывороткой IV группы. Осадок ресуспензировали в 100 мкл аннексин-связывающего буфера и вносили антитела согласно инструкции к набору. Инкубировали 20 мин при комнатной температуре. После этого добавляли к образцу еще 400 мкл аннексин-связывающего буфера и проводили цитометрический анализ с помощью проточного цитофлюориметра BD FACSCanto II ("BD Biosciences", США).

Цитометрический анализ включал в себя выделение лимфоцитов, основываясь на высоком показателе экспрессии антигена CD45 и низких показателях прямого и бокового светорассеяния этих клеток, с последующим определением количества клеток на ранней и поздней стадиях апоптоза. Клетками на ранних стадиях апоптоза считались те, что связывались только с аннексином V, а на поздних стадиях - и с аннексином V, и с PI

Пример определения количества клеток на стадиях раннего и позднего апоптоза представлен на фиг. 2.

Статистический анализ данных проводили с помощью GraphPad Prism 6. Проверку нормальности распределения выполняли с использованием критерия Шапиро-Уилка. Сравнение полученных данных осуществляли с помощью парного критерия Уилкоксона с поправками на множественное сравнение. Значимыми признавались отличия при $p < 0,05$.

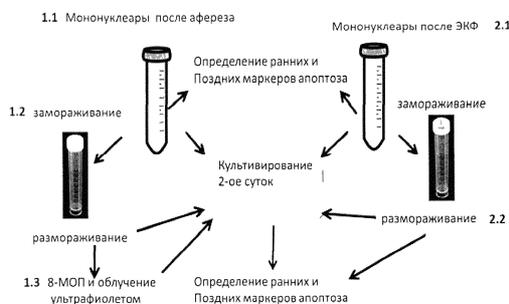
Сравнение доли лимфоцитов в поздней стадии апоптоза между различными группами показало, что до культивирования в лейкоконцентрах подвергшихся замораживанию и размораживанию (группы 1.2., 1.3. и 2.2.) количество клеток было достоверно больше, чем в контрольной группе (образец 1.1.) и в группе образцов сразу после ЭКФ (2.1.). Доля клеток в ранней стадии апоптоза также была выше в образцах после размораживания как до, так и после ЭКФ (группы 1.2. и 2.2) по сравнению с образцами контрольной группы (1.1) и группы, после ЭКФ, но без криоконсервирования (2.1). При этом в образцах группы 1.3, доля клеток в ранней стадии апоптоза была достоверно ($p < 0,05$) выше по сравнению с группой сразу после ЭКФ (2.1). (фиг. 3А)

После культивирования количество клеток в ранней стадии апоптоза во всех группах достоверно не изменялось, количество же клеток на поздней стадии апоптоза достоверно повышалось во всех группах, кроме контрольной (1.1) ($p < 0,001$), в ней оно не изменялось. Причём лучшие результаты наблюдали в группе 1.3, т.е в группе, где ЭКФ проводили после размораживания мононуклеаров.

Учитывая данные нашей работы, а также ранее выполненные исследования по данным литературы можно сказать, что процент лимфоцитов в поздней стадии апоптоза через 2-е суток культивирования сопоставим при проведении ЭКФ, а также при проведении ЭКФ с последующим криоконсервированием лейкоконцентрата. Таким образом, учитывая отсутствие зависимости эффекта ЭКФ от количества облучаемых и переливаемых пациенту клеток, обоснованным является проведение сбора мононуклеаров, выполнение их экстракорпорального фотооблучения, и в дальнейшем разделение фотооблученных мононуклеаров на несколько доз как для криоконсервирования, так и для возврата незамороженного продукта пациенту.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения криоконсервированных мононуклеарных клеток, включающий выделение концентрата мононуклеарных клеток и проведение экстракорпорального фотофереза, отличающийся тем, что концентрат мононуклеарных клеток с инициированным апоптозом после экстракорпорального фотофереза делят на дозы (образцы), затем подвергают программному замораживанию до -70°C с последующей криоконсервацией в жидком азоте.



Фиг. 1

Пример цитометрического анализа апоптоза лимфоцитов в образцах лейкоконцентрата. Л - Отрицательный контроль (клетки без обработки и заморозки); Б - положительный контроль (клетки после ЭКФ, без замораживания); В - клетки, подвергнутые ЭКФ после замораживания и размораживания; Г - клетки, подвергнутые ЭКФ, а затем замороженные и размороженные

