

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **043507**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2023.05.29**

**(21)** Номер заявки  
**202000151**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2020.06.02**

**(51)** Int. Cl. *A61K 35/17* (2015.01)  
*A61P 37/00* (2006.01)  
*A01N 1/02* (2006.01)

---

**(54) СПОСОБ ИНДУКЦИИ АНТИГЕН АССОЦИИРОВАННОГО ИММУННОГО ОТВЕТА**

---

**(43)** 2021.12.31

**(96)** 2020000048 (RU) 2020.06.02

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

**Капранов Николай Михайлович,  
Никифорова Ксения Александровна,  
Давыдова Юлия Олеговна, Петинати  
Наталья Арнольдовна, Дризе Нина  
Иосифовна, Кузьмина Лариса  
Анатольевна, Гальцева Ирина  
Владимировна, Гапонова Татьяна  
Владимировна (RU)**

**(56)** RU-C1-2508924  
US-B2-10472606  
Т.В. ПОЛЕЖАЕВА Комбинированные  
криоконсерванты в сохранении функций  
лейкоцитов. Автореф. дисс. на соискание ученой  
степени д.б.н., Санкт-Петербург, 2013, с. 4-7, 31-34  
RU-C1-2416197

**(72)** Изобретатель:  
**Васильева Вера Алексеевна,  
Камельских Денис Владимирович,**

KIM KM, et al. Quality comparison of  
umbilical cord blood cryopreserved with conventional  
versus automated systems. Cryobiology. 2017  
Oct;78:65-69. реферат

---

**(57)** Изобретение относится к области медицины 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. Описан способ индукции антиген ассоциированного иммунного ответа, заключающийся во введении пациенту концентрата мононуклеарных клеток, подвергнутого трёхфазному программному замораживанию до -70°C, где первая фаза - это охлаждение мононуклеаров до температуры начала их кристаллизации, характеризующаяся быстрым кратковременным снижением температуры, вторая фаза - это фаза кристаллизации мононуклеаров, характеризующаяся медленным снижением температуры и наличием, как минимум, одного плато выдержки мононуклеаров при постоянной температуре ниже температуры эвтектики, а третья фаза замораживания характеризуется постепенным, монотонным снижением температуры, с последующей криоконсервацией в жидком азоте. Технический результат: разработан способ обработки и получения мононуклеаров, который обеспечивает их длительное хранение, возможность отсроченного введения криоконсервированных клеток без потери клинического эффекта процедуры, аналогичного ЭКФ.

---

**B1**

**043507**

**043507**

**B1**

Изобретение относится к области медицины 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 борьбы с вышеперечисленными заболеваниями является экстракорпоральный фотоферез (фотоферез, ЭКФ) - введение в организм реципиента особым образом обработанных моноклеарных клеток.

Механизм действия этого метода до конца не изучен, однако установлено, что ЭКФ инициирует апоптоз моноклеаров, завершающийся в кровеносной системе реципиента и предположительно вызывающий иммунный ответ на аутореактивные патогенные лимфоциты.

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 длительного хранения и транспортировки полученных моноклеаров и ограниченная доступность экстракорпорального фотофереза в региональных центрах.

Апоптоз - процесс программируемой, индуцируемой самими клетками гибели, который в отличие от некроза является физиологическим процессом утилизации дефектных клеток. Он подразделяется на ранний и поздний. При раннем апоптозе целостность поверхностной мембраны не нарушена, а при позднем - начинается фрагментация поверхностной мембраны. Именно клетки, находящиеся в поздней стадии апоптоза, индуцируют созревание дендритных клеток, превращая их в активные АПК, взаимодействие Т-клеток с которыми приводит к активации Т-регуляторных лимфоцитов.

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

Задачей, на решение которой направлено заявляемое изобретение, является разработка способа получения моноклеаров, который бы обеспечивал их долгое хранение, а так же возможность задержки моноклеаров в состоянии раннего апоптоза для профилактики и лечения ряда иммунных реакций, а именно - реакции "трансплантат против хозяина", отторжения при трансплантации аллогенных органов, кожных Т-клеточных лимфом, а также ряда аутоиммунных заболеваний путем введения предварительно криоконсервированных моноклеаров, без дополнительной обработки.

Поставленная задача решается путём получения криоконсервированных моноклеарных клеток методом, включающим выделение концентрата моноклеарных клеток и их программное замораживание до  $-70^{\circ}\text{C}$  со следующей за этим криоконсервацией в жидком азоте и с последующим размораживанием и введением реципиенту.

Термин программное замораживание подразумевает, что замораживание имеет, как правило, три фазы, характеризующиеся разной скоростью заморозки. Первая фаза - охлаждение моноклеаров до температуры начала их кристаллизации ( $1-4^{\circ}\text{C}$  ниже нуля) характеризуется предпочтительно быстрым кратковременным снижением температуры. Вторая фаза - кристаллизации моноклеаров ( $1-10^{\circ}\text{C}$  ниже нуля) характеризуется медленным снижением температуры и, предпочтительно, наличием, как минимум, одного плато выдержки моноклеаров при постоянной температуре. Третья фаза замораживания характеризуется постепенным снижением температуры (до  $-70^{\circ}\text{C}$ ).

Применение вышеописанного способа позволяет обеспечить длительное хранение живых моноклеарных клеток, 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 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 лейкоконцентраатах.

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

Было отобрано 20 образцов моноклеаров, полученных от 12 пациентов (пяти больным аферез моноклеаров проводили от 2 до 4 раз в разные дни с интервалом более 1 недели). В исследовании 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 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, 1.2 и 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. Затем осуществляли облучение образцов 2.1 и 2.2 на аппарате Macogenic G2 (Masorphaгта, Франция) согласно рекомендациям производителя:

продолжительность облучения составила от 546 до 682 с (медиана 606 с) в дозе 2 Дж/см<sup>2</sup>. После облучения производили отбор образцов 2.1 и 2.2. Часть образцов анализировались сразу (группы 1.1 и 2.1), а часть (группы 1.2, 1.3 и 2.2) замораживали согласно описанной выше программе. Мононуклеары замораживали в холодном растворе полиглюкина с добавлением 10% диметилсульфоксида. Замороженные клетки хранили при заданной температуре не менее 2-х суток. Размораживание осуществляли при 37°C и отмывали средой RPMI1640 с 10% человеческой инактивированной сывороткой IV группы.

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 у разных популяции лейкоцитов апоптоз происходит 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<sup>6</sup> на мл в 24-ячеечные планшеты. Мононуклеары культивировали в течение 2-х суток при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. 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 0,2×10<sup>6</sup> клеток, отмывали 1 мл среды RPMI1640 с 10% человеческой инактивированной сывороткой IV группы. Осадок ресуспендировали 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.

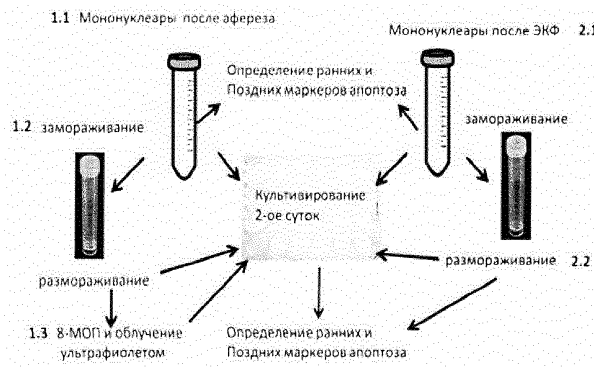
Сравнение доли лимфоцитов в поздней стадии апоптоза между различными группами показало, что до культивирования в лейкоконцetrатах подвергшихся замораживанию и размораживанию (группы 1.2, 1.3 и 2.2) количество клеток было достоверно больше, чем в контрольной группе (образец 1.1) и в группе образцов сразу после ЭКФ (2.1). Доля клеток в ранней стадии апоптоза также была больше 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) больше 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.

Учитывая данные нашей работы, можно сказать, что процент лимфоцитов в поздней стадии апоптоза через 2-е суток культивирования сопоставим при криоконсервировании лейкоконцентрата, проведении ЭКФ, а также при проведении ЭКФ с последующим криоконсервированием лейкоконцентрата. Таким образом, учитывая отсутствие значимой разницы, обоснованным является проведение сбора мононуклеаров, разделение мононуклеаров на несколько доз для криоконсервирования с последующим возвратом продукта пациенту.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ индукции антиген ассоциированного иммунного ответа, заключающийся во введении пациенту концентрата мононуклеарных клеток, подвергнутого трёхфазному программному замораживанию до минус 70°C со следующей за этим криоконсервацией и с последующим размораживанием перед введением пациенту, где программное замораживание включает: первая фаза - это охлаждение мононуклеаров до температуры минус 1-4°C - интервала начала их кристаллизации, характеризующаяся быстрым кратковременным снижением температуры, вторая фаза - это фаза кристаллизации мононуклеаров, характеризующаяся медленным снижением температуры до минус 10°C и наличием, как минимум, одного плато выдержки мононуклеаров при минус 10°C, и третья фаза замораживания, характеризующаяся постепенным, монотонным снижением температуры до минус 70°C, при этом перед замораживанием концентрат мононуклеарных клеток делят на дозы, в качестве криопротектора используют холодный раствор полиглюкина с 10% диметилсульфоксидом.



Фиг. 1

