

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040451**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.03

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

(21) Номер заявки
201900455

(22) Дата подачи заявки
2019.09.27

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

(43) **2021.03.31**

(56) **BY-C1-17447**

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

UA-U-69879

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

BY-C1-20789

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

UA-U-89267

RU-C1-2707281

CN-A-109609461

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).

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.

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

(57) Изобретение относится к области медицины, а именно к области диагностики и разработке новых методов лечения злокачественных опухолей лимфоидной природы. Способ выделения и культивирования клеток злокачественных лимфоидных опухолей включает забор пробы тела опухоли в стерильные пробирки с охлажденной от 0 до 4°C питательной средой с компонентом, ингибирующим развитие бактерий, механическое измельчение материала тела опухоли до получения частиц с размером, не превышающим 100 мкм, промывку их фосфатно-солевым буфером, наслаивание клеток на раствор фиколла в соотношении 10 мл раствора фиколла и 15 мл клеточного субстрата; центрифугирование в две стадии с минимальной скоростью разгона и остановки, где первую стадию проводят в течение 30 мин со скоростью 650 об/мин, с последующим отбором клеточного субстрата, а вторую стадию - в течение 10 мин со скоростью 1200 об/мин, и последующую инкубацию культуры клеток в термостате при температуре 37°C в среде 5% CO₂ и 95% влажности воздуха. Разработан способ культивирования и хранения злокачественных лимфоидных клеток, более дешевый при его осуществлении, обеспечивающий жизнедеятельность и развитие хранимой культуры в течение длительного срока.

040451
B1

040451
B1

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

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 0,5-4 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 22-37°C; 4) после указанного первого периода времени снижение указанной температуры в контейнере до 0,1-10°C с одновременным сохранением указанного давления на 0,5-4 атм выше давления окружающей среды; 5) сохранение указанного контейнера при указанной более низкой температуре и при давлении на 0,5-4 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 22-37°C. Осуществление указанного способа позволяет снизить апоптоз клеток.

К недостаткам известного способа относятся

использование для хранения сложного оборудования, а именно контейнера сложной конструкции, которая с одной стороны обеспечивала бы 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 процесс их жизнедеятельности.

Известен способ выделения и размножения опухолевых клеток, описанный в патенте США № 5529903. Способ выделения и размножения раковых клеток с помощью центрифугирования с использованием центрифуги Naemonetics 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 200000 клеток на 100 мкл на лунку. В течение всего периода культивирования его постоянно газировали 5% CO₂ при 37°C. Опухолевые 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 опухолевых 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 выделения и культивирования клеток злокачественных лимфоидных опухолей более дешевого при его осуществлении, не требующего сложного оборудования для хранения и обеспечивающего жизнедеятельность и развитие хранимой культуры в течение длительного срока.

Поставленная задача решается путем применения способа выделения и культивирования клеток злокачественных лимфоидных опухолей с помощью центрифугирования. Способ заключается в заборе пробы тела опухоли, механическом измельчении полученного материала до получения частиц размером до 100 мкм, подготовке материала к центрифугированию, центрифугировании и инкубации 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 превышающего 10 мин, со скоростью, не превышающей 1200 об/мин, с минимальной скоростью разгона и остановки.

Применение стерильных пробирок с охлажденной до 0-4°C питательной средой с ингибирующим развитие бактерий компонентом, центрифугирование в две стадии, где первая стадия проводилась при малых оборотах, а вторая при высоких в течение 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 течение длительного, до одного месяца, времени.

Для приготовления органных культур использовались биопсии опухолей лимфоидной природы, полученные в ФГБУ "НМИЦ гематологии" Минздрава России 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 - волосатоклеточный лейкоз.

Забор биологического материала производился во время операций и биопсий в стерильные пробирки с охлажденной до 4°C средой (со средой ДМЕМ + стрептомицин + пенициллин). Пробирки в асептических условиях хранились при температуре 2-4°C. Далее материал транспортировался в лабораторию при постоянном охлаждении 4°C в сроки, не превышающие 72 ч. Первичные культуры получали путем механической обработки биопсийного материала с помощью специального фильтра, представляющего собой сито с размером отверстий 100 мкм 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 раствор фиколла и 15 мл опухолевый субстрат.

Проводилось центрифугирование в течение примерно 30 мин, 650 об/мин, 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 мин, 1200 об/мин, с минимальной скоростью разгона и остановки, проводилось с целью минимизировать риски повреждения клеток. В результате повторного центрифугирования необходимый субстрат оседал на дно пробирки, остальная часть удалялась. Последовательно добавлялись среда RPMI-1640 с глутамином, содержащая 10% бычьей сыворотки 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 37°C и 5% CO₂, предварительно оценивался процент живых клеток путем подсчета в аппарате.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ выделения и культивирования клеток злокачественных лимфоидных опухолей, включающий забор пробы тела опухоли в стерильные пробирки с охлажденной от 0 до 4°C питательной средой с компонентом, ингибирующим развитие бактерий, механическое измельчение материала тела опухоли до получения частиц с размером, не превышающим 100 мкм, промывку их фосфатно-солевым буфером, наслаивание клеток на раствор фиколла в соотношении 10 мл раствора фиколла и 15 мл клеточного субстрата; центрифугирование в две стадии с минимальной скоростью разгона и остановки, где первую стадию проводят в течение 30 мин со скоростью 650 об/мин, с последующим отбором клеточного субстрата, а вторую стадию - в течение 10 мин со скоростью 1200 об/мин, и последующую инкубацию культуры клеток в термостате при температуре 37°C в среде 5% CO₂ и 95% влажности воздуха.

