



(12) **Wirtschaftspatent**

Teilweise bestätigt gemäß § 18 Absatz 1
Patentgesetz

(19) **DD** (11) **140 476 B1**

4(51) **C 12 N 5/00**
A 01 N 1/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

(21)	WP C 12 N / 208 912 1	(22)	07.11.78	(45)	07.05.86
				(44)	05.03.80

(71)	Institut für Wirkstoffforschung, 1136 Berlin, Alfred-Kowalke-Straße 4, DD
(72)	Oehme, Peter, Prof. Dr.; Hackensellner, Hans-Alois, Prof. Dr.; Matthes, Gert, Dr.; Jentzsch, Klaus-Dieter, Dr.; Krause, Winfried, Dr.; Jakubke, Hans-Dieter, Prof. Dr. Dipl.-Chem., DD

(54)	Verfahren zur Erhöhung der Stabilität tieftemperaturkonservierter lebender Zellen
------	--

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Erhöhung der Stabilität von tieftemperaturkonservierten lebenden Zellen, insbesondere Blutzellen, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Zellen unmittelbar nach ihrer Gewinnung und bis zu 24 Stunden vor dem Einfrieren in einer mit Selenverbindungen in Konzentrationen zwischen 1,0 und 10,0 µg/1 000 ml und/oder weiteren Zusatzstoffen, insbesondere antioxydativ wirksamen Verbindungen, versetzten 37°C warmen Konservierungslösung suspendiert, danach in einem kryoprotektiven Medium eingefroren, in flüssigen Stickstoff überführt und darin bis zum Bedarf gelagert werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Konservierungslösung Seleno-Methionin, vorzugsweise in der Konzentration von 2,0 bis 2,5 µg/1 000 ml, zugegeben wird.
3. Verfahren nach Punkt 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der Konservierungslösung eine Kombination von Natrium-Selenit, vorzugsweise in der Konzentration von 1,8 bis 2,2 µg/1 000 ml, und Tokopherol (Vitamine E), vorzugsweise in der Konzentration von 11 bis 13 µg/1 000 ml, zugegeben wird.

Anwendungsgebiet

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Verbesserung der Konservierung von Zellen bei tiefen Temperaturen (Tieftemperaturkonservierung) im Sinne einer Erhöhung der Membranstabilität der vital eingefrorenen Zellen mit dem Effekt der Erhaltung der funktionellen und strukturellen Integrität. Die Erfindung ist nutzbringend überall dort einsetzbar, wo lebensfähige Zellen über lange Zeit aufbewahrt und vorrätig gehalten werden sollen, insbesondere in Zell- und Blutbanken.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bekannt ist die Tieftemperaturkonservierung von isolierten Zellen für nahezu unbegrenzte Zeit. Hierzu werden die Zellen in einem kryoprotektiven Medium (physiologisches Medium unter Zusatz eines Gefrierschutzstoffes, wie z. B. Dimethylsulfoxid oder Glycerin) suspendiert, definiert mit einer bestimmten Kühlrate abgekühlt, gefroren und bei tiefen Temperaturen (unter -80°C bis -100°C, am besten in flüssigem Stickstoff) gelagert. Auf diese Weise können z. B. rote Blutzellen durch Anwendung der „Low-glycerol-rapid-freezing-technique“ (KRIJNEN et al., 1964) oder der „High-glycerol-slow-freezing-technique“ (HUGGINS, 1964) aufbewahrt werden. Eine Tieftemperaturkonservierung ohne Zusatz von Kryoprotektiva in das Suspensionsmedium besitzt nur einen bedingten Erfolg, da nur ein geringer Prozentsatz der Zellen die Prozedur überlebt. Bekannt ist weiterhin die Vorbehandlung des Spenderorganismus mit Natriumselenit (DD-WP 157 591) mit dem Ziel einer Erhöhung der Widerstandsfähigkeit von biologischem Material gegenüber Gefrier-/Tau-Schädigungen. Dieser auf einer Stimulierung der Synthese des Enzyms Glutathionperoxydase in der Zelle beruhende Mechanismus setzt jedoch eine mehrtägige Behandlung des Spenderorganismus voraus und grenzt damit die praktische Nutzung, insbesondere bei der Gewinnung von Transfusions- und Transplantationsmaterial von lebenden Spendern erheblich ein.

Die Überlebensfähigkeit tieftemperaturkonservierter Zellen ist wesentlich abhängig von der Zellenart, dem gewählten kryoprotektiven Zusatz sowie der Art des Gefrier-/Tau-/Regimes. Durch den Vorgang der Tieftemperaturkonservierung, speziell des Gefrier-/Tau-Prozesses, unterliegen die Zellen Veränderungen, die zu einer Beeinträchtigung der Stabilität der Membranen und damit der Überlebensfähigkeit der Zellen führen können (PERSIDSKY, 1971; MERYMAN, 1974). So findet z. B. im Laufe einer nachfolgenden hypothermen oder normothermen Lagerung gefrierkonservierter Erythrozyten eine fortschreitende Hämolyse sowie ein vermehrter Ausstrom von Kaliumionen aus den Erythrozyten statt (ROWE, 1973; AKERBLUM, 1974; VALERI, 1975). Insgesamt läßt sich feststellen, daß die bekannten Methoden zur Tieftemperaturkonservierung lebender Zellen nicht allen Anforderungen genügen. Das betrifft insbesondere die mangelnde Stabilität von Erythrozyten während der hypothermen Lagerung nach vorangegangener Tieftemperaturkonservierung, was sich für Blutbanken als nachteilig erweist.

Ziel der Erfindung

Das Ziel der Erfindung besteht darin, die Membranstabilität der Zellen vor und während der Tieftemperaturkonservierung zu erhöhen und diesen Effekt praktisch nutzbar zu machen.

Es liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu entwickeln, mit dem die Stabilität der Zellen durch geeignete Zusätze zum Suspensionsmedium erhöht werden kann.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Erfindungsgemäß wird der Konservierungslösung vor dem Zusatz der zu konservierenden Zellen eine geeignete Selenverbindung, vorzugsweise eine Seleno-Aminosäure oder eine Kombination von Natriumselenit (Na_2SeO_3) und weitere Zusatzstoffe, vorzugsweise Vitaminen, in einer Konzentration von 1,0–10,0 µg/1 000 ml zugefügt. Hierzu wird im ersten Falle die Seleno-Aminosäure, z. B. Seleno-Methionin, in einer Konzentration von 2,0–2,5 µg/1 000 ml, im zweiten Falle Natriumselenit in einer Konzentration von 1,8–2,2 µg/1 000 ml und das Vitamin, z. B. Tokopherol (Vitamin E), in einer Konzentration von 11–13 µg/1 000 ml zugesetzt. Nach vollständiger Lösung dieser Wirkstoffe werden die Zellen, die in gebräuchlicher Weise gewonnen, gewaschen und abzentrifugiert werden, der Konservierungslösung zugegeben und mit dieser bis zu maximal 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe des kryoprotektiven Mediums, das ebenfalls diese Wirkstoffe oder Wirkstoffkombinationen enthält, und einer entsprechenden Inkubationszeit zur Gefrierschutzverteilung erfolgt unter Wahrung einer geeigneten Abkühlrate die Überführung in flüssigen Stickstoff (-196°C) zur Lagerung über verschieden lange Zeiträume. Bei Bedarf erfolgt das Auftauen der dem flüssigen Stickstoff entnommenen Zellen durch Einstellen der Konservierungsbehälter in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C.

Bei einer Überprüfung der strukturellen und funktionellen Integrität der Zellen läßt sich eindeutig nachweisen, daß das erfindungsgemäß durchgeführte Verfahren den Anteil überlebender Zellen im Vergleich zu gleichartigen Zellsuspensionen, die auf gleiche Weise, jedoch ohne Zusatz der Wirkstoffe zur Konservierungslösung, eingefroren wurden, deutlich erhöht bzw. den Anteil geschädigter Zellen deutlich herabsetzt. Diese Steigerung des Überlebens von Zellen in einem Medium verspricht überall dort bedeutende ökonomische Auswirkungen, wo lebende Zellen zum Zweck ihrer Wiederverwendung, insbesondere für die Rückübertragung auf gleichartige Organismen, im lebensfähigen Zustand zur Verfügung stehen müssen, wie insbesondere in Zell- und Blutbanken.

Die Erfindung wird nachfolgend an einem Ausführungsbeispiel erläutert:

Vollblut gesunder Spender wird im Verhältnis 4:1 mit ACD-AG-Stabilisatorlösungen I-III (Tab. 1) versetzt, der in der ersten Versuchsgruppe Seleno-Methionin in einer Konzentration von $0,226 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$, in der zweiten Versuchsgruppe Natriumselenit in einer Konzentration von $0,2 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ und Tokopherol in einer Konzentration von $1,2 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$ zugeführt wurde. Die dritte Versuchsgruppe dient als Kontrolle und enthält keine Wirkstoffe in der ACD-AG-Stabilisatorlösung. Zur Inkubation werden die Konservenflaschen mit dem Konservenblut für 3 Stunden bei 37°C aufbewahrt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Konservenblut zentrifugiert, der Plasmaüberstand verworfen und die verbliebenen Erythrozyten langsam im Verhältnis 1:1 mit den glyzerinhaltigen Konservierungslösungen I-III (Tab. 2) vermischt und für 30 min zur Gefrierschutzverteilung bei 25°C gehalten. Zur Gefrierkonservierung wird das Konservenblut dann in Zentrifugengläser ($\varnothing 20 \text{ mm}$, Länge 100 mm) überführt und direkt in flüssigen Stickstoff (-196°C) getaucht. Nach 24 Stunden oder später erfolgt das Auftauen durch Einstellen der Zentrifugengläser in ein 37°C -Bad. Nach dreimaligem Waschen der Erythrozyten wird der Gehalt an freiem Hämoglobin im Überstand geprüft und die Hämolyserate
$$\left(\text{Hämolysate, in \%} = \frac{\text{Hämoglobin (mg/100 ml) im Überstand}}{\text{Hämoglobin (mg/100 ml) vor dem Gefrieren}} \times 100 \right)$$

bestimmt. Nach der Tieftemperaturkonservierung ist die Hämolyserate in Versuchsgruppe I (Zusatz von Seleno-Methionin) und Versuchsgruppe II (Zusatz von Natriumselenit und Tokopherol) statistisch signifikant geringer als in Versuchsgruppe III (Kontrollgruppe). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 1: Zusammensetzung der verwendeten ACD-AG-Stabilisatorlösungen (Angaben in g/l)

Substanz	Stabilisatorlösung		
	I	II	III
Glukose · H ₂ O	25,0	25,0	25,0
Natriumzitat · 2 H ₂ O	13,2	13,2	13,2
Zitronensäure · H ₂ O	4,8	4,8	4,8
Adeninsulfat	0,46	0,46	0,46
Guanosin	0,71	0,71	0,71
Natriumselenit	-	$2,0 \cdot 10^{-6}$	-
Tokopherol	-	$1,2 \cdot 10^{-5}$	-
Seleno-Methionin	$2,26 \cdot 10^{-6}$	-	-

Tabelle 2: Zusammensetzung der verwendeten Konservierungslösungen (Angaben in g/l)

Substanz	Konservierungslösung		
	I	II	III
Glyzerol	360,0	360,0	360,0
Sorbitol	30,0	30,0	30,0
Natriumchlorid	60,0	60,0	60,0
Natriumselenit	—	$2,0 \cdot 10^{-6}$	—
Tokopherol	—	$1,2 \cdot 10^{-5}$	—
Seleno-Methionin	$2,26 \cdot 10^{-6}$	—	—

Tabelle 3: Hämolyserate tieftemperaturkonservierter Erythrozyten unter Verwendung von Wirkstoffzusätzen (n = 5)

Versuchsgruppe	Hämolysate (%)
I	3,34 ^{*)}
II	3,85 ^{*)}
III	8,33

^{*)} Statistisch signifikant im Vergleich zu Versuchsgruppe III ($p < 0,05$)