



# Ontwikkeling van biotine-gelabelde erythrocyten voor toepassing in klinische studies

**Djuna Kroon-de Back**

Unit Transfusiegeneskunde,  
Transfusiearts io, PhD-student  
Sanquin

**Blood and Beyond**

## Waarom een methode om getransfundeerde bloedproducten te kunnen “vervolgen” na transfusie?

- Bepalen van opbrengst van erythrocyten na transfusie & overleving in de tijd
  - Te gebruiken bij validatie nieuwe bewaarmethoden
  - Karakteriseren van getransfundeerde bloedproducten na transfusie
    - Erytrocyt-afbraakmarkers achterhalen

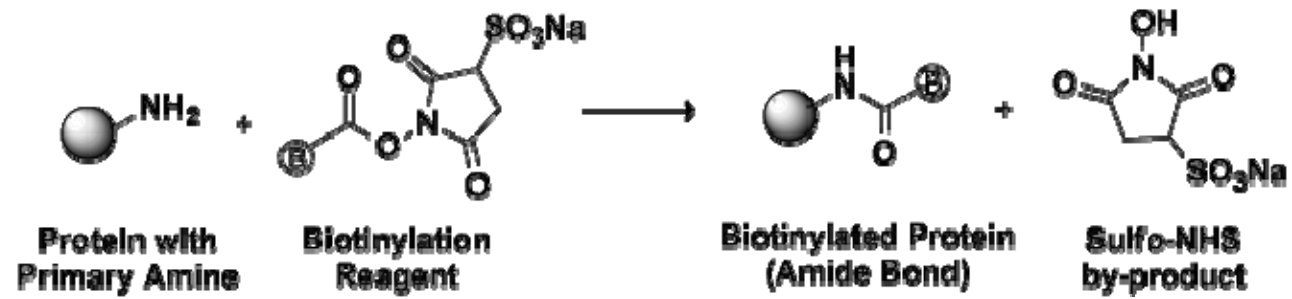
## Uitdaging/ Probleemstelling

- Het kunnen produceren van een standaard gelabeld bloedproduct volgens de richtlijnen voor GPG, ten behoeve van klinisch wetenschappelijk onderzoek en evalueren nieuwe bloedproducten

## Verschillende methoden om getransfundeerde bloedproducten te “vervolgen” na transfusie.

- $^{51}\text{Cr}$
- Minor antigen mismatch
- Biotine labeling

### Protein Biotinylation With Sulfo-NHS Biotin



## Voordelen biotinyleren t.o.v. andere methoden

- Geen mismatch tussen donor en ontvanger nodig voor detectie
  - autologe transfusies mogelijk
- Gemakkelijke detectie en scheiding van gebiotinyleerd product d.m.v. flow cytometrie en scheiding met MACS methode
- Mogelijkheid tot het simultaan transfunderen/ detecteren van verschillende eenheden door producten met oplopende concentraties biotine te labelen

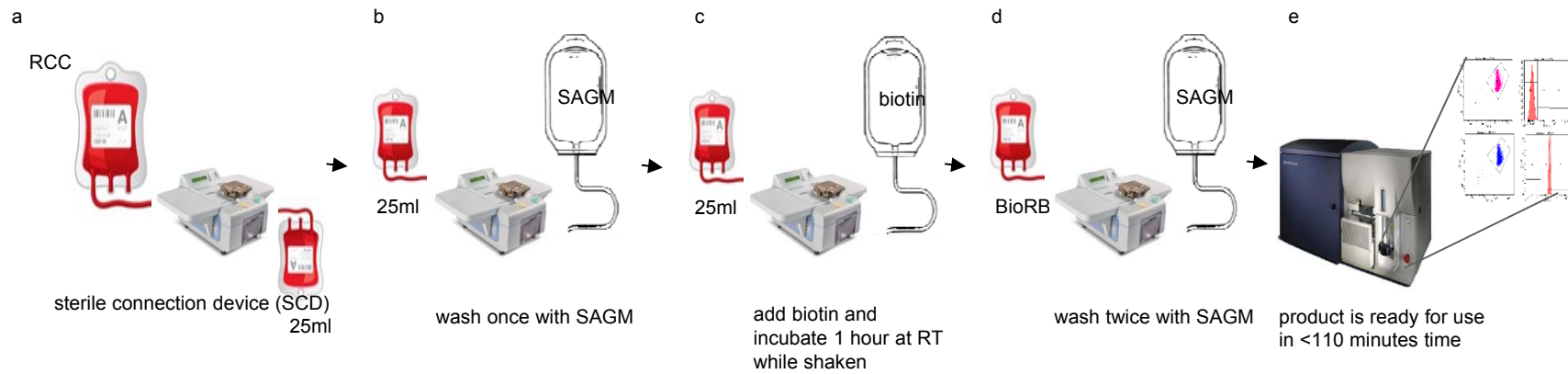


## Hoe erythrocyten te labelen

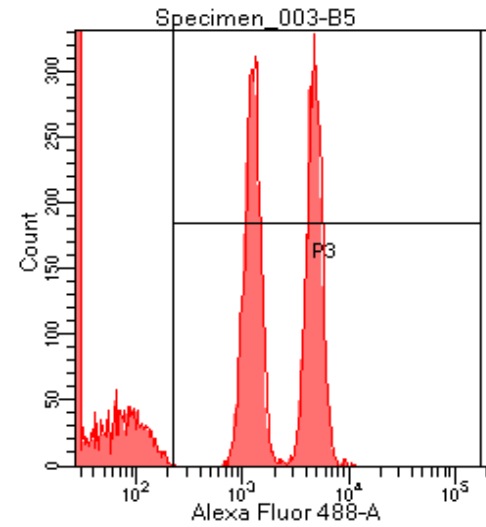
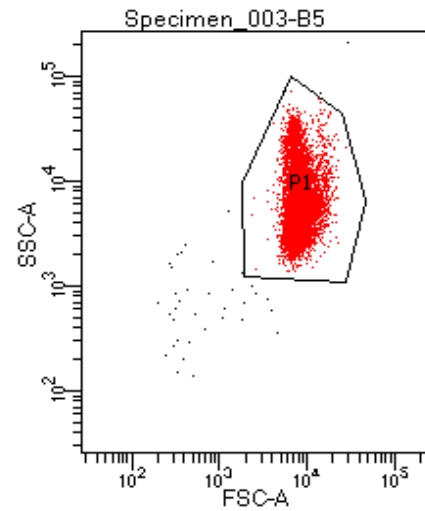
- Neem 25mL van een RBC-eenheid (met SCD volgens GPG)
- Was met 125mL SAGM (SCD)
- Voeg de biotine-oplossing toe en incubeer voor 1 uur bij KT (SCD)
- Was 2x met SAGM (SCD)
- De gelabelde erythrocyten worden gecontroleerd m.b.v. flow cytometrie (FACS)
- Product is klaar voor gebruik
  - Het naderhand bestralen van het product is mogelijk



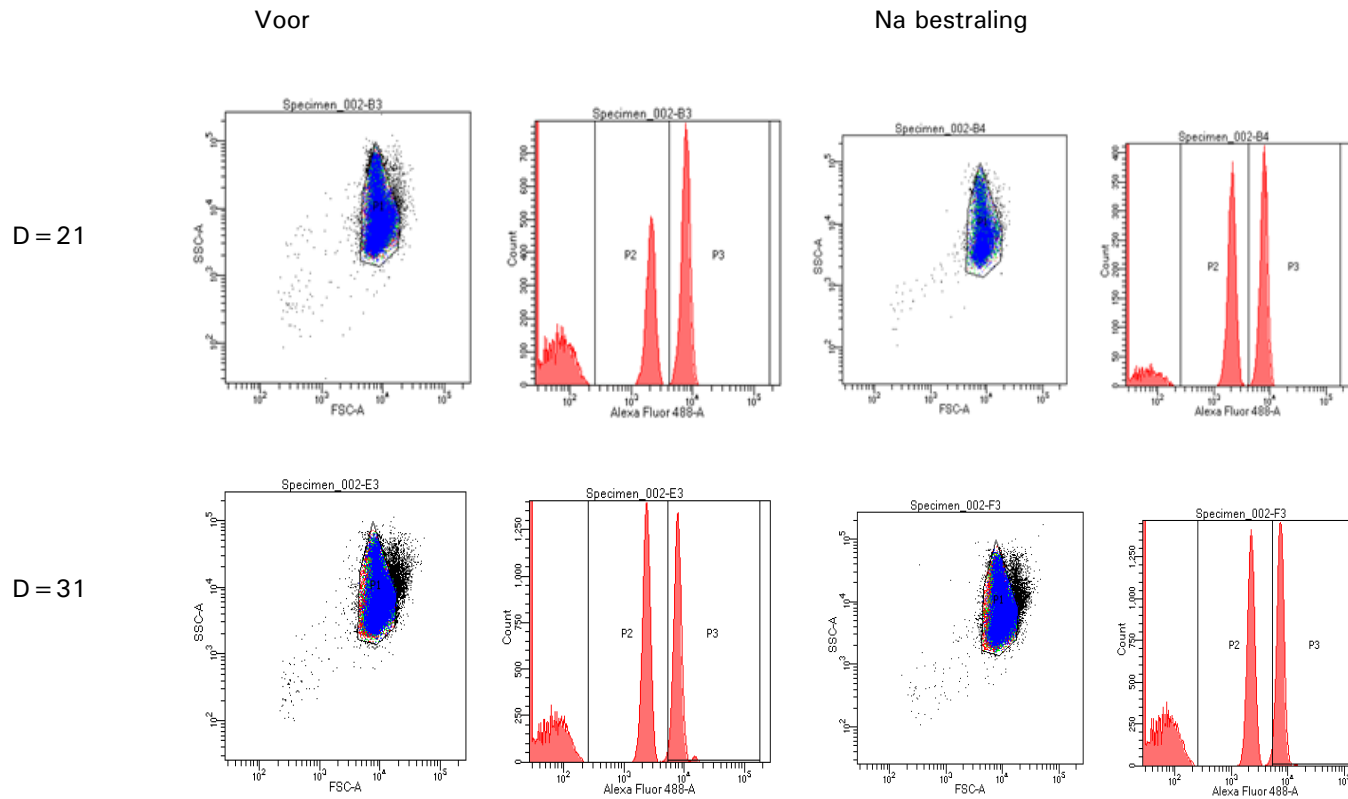
## Hoe erythrocyten te labelen



## Erythrocyten gebiotinyleerd met resp. 15 en 48 $\mu\text{g}$ biotine



## Effect van bestraling op de biotine-labelling per tijdsduur



## Veiligheid van gebiotinyleerde bloedproducten

- Steriliteit
  - Biotinylering zal worden gedaan in een gesloten systeem volgens GPG condities
- Toxiciteit
  - Geen verandering in functie/ overleving van erythrocyten na biotinylering, geen verdere toxiciteit gevonden
- Antilichamen tegen het biotine label
  - Eén op de acht volwassenen ontwikkelt antistoffen bij zeer hoge concentratie (162 µg/mL)
    - Geen hemolyse, noch versnelde RBC afbraak
  - Antistoffen verdwijnen na een jaar

## Veiligheid van gebiotinyleerde bloedproducten (2)

- Product is stabiel: geen effect van bestraling op biotine-label
- Volgende RBC parameters gecontroleerd:
  - Ht, Hb, RBC#, MCV, Pt, Leukocyten
  - Vrij hemoglobine (hemolyse)
  - Na, K
  - ATP
  - Morfologie (>21 dagen)
  - PS (>21 dagen)
  - pH, + pH <6: steriliteit test

## Samenvatting/ conclusie

- Gemakkelijk, robuust en reproduceerbaar
- Korte proceduretijd <110 min
- Biochemische parameters conform (bestraalde) niet-gelabelde RBC-eenheden
- Biotine-oplossing tot 1,5 maand (42 d.) bewaren bij -30 graden ( $\pm 5$ ) °C
  - Maximale invriestijd <30 min bij KT
  - Maximale ontdooitijd biotine-oplossing: 24 uur bij 4 °C of 1 uur bij 37 °C
- Eenmaal gelabeld 1 week houdbaar voor transfusie

## Dankwoord

Alle donoren

B. Beuger

R. Vlaar

B. Daal

M. Go

W. Karssing

J. Lagerberg

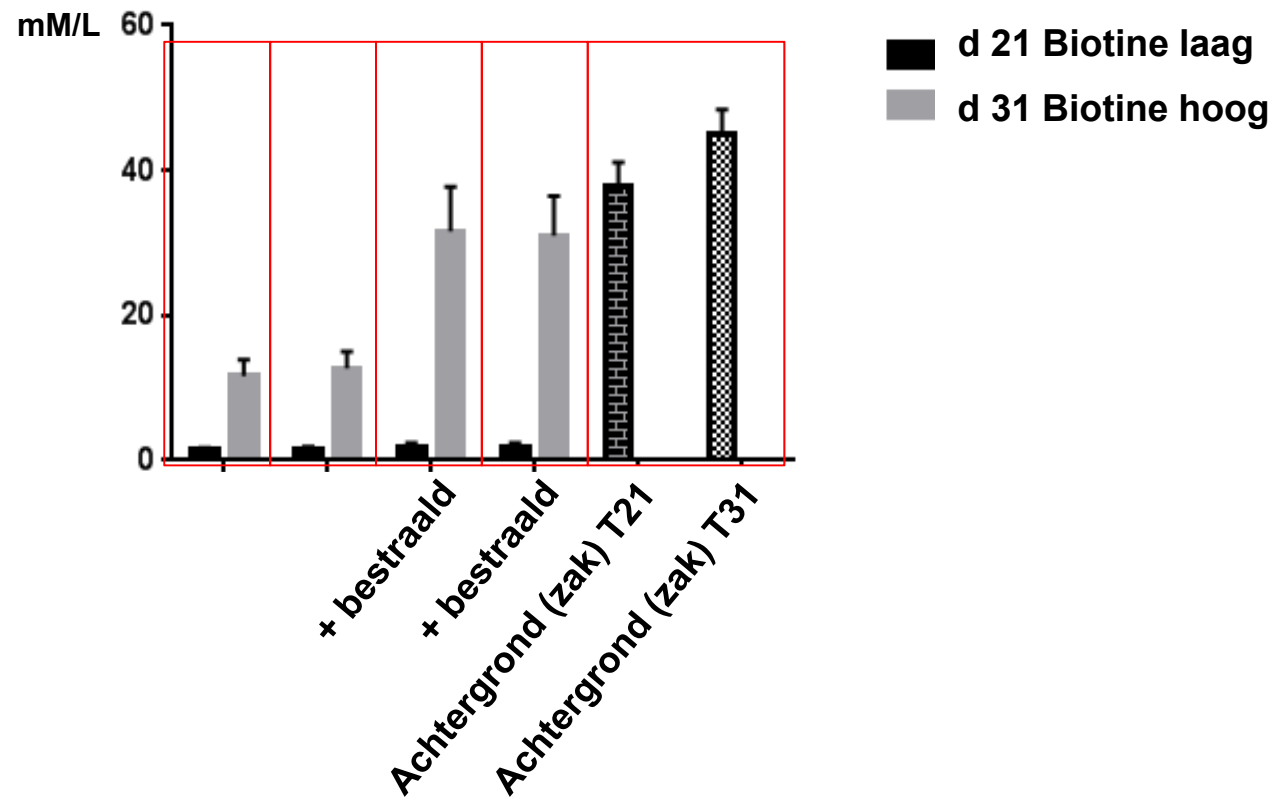
D. de Korte

C. Vermeulen

M. van Kraaij

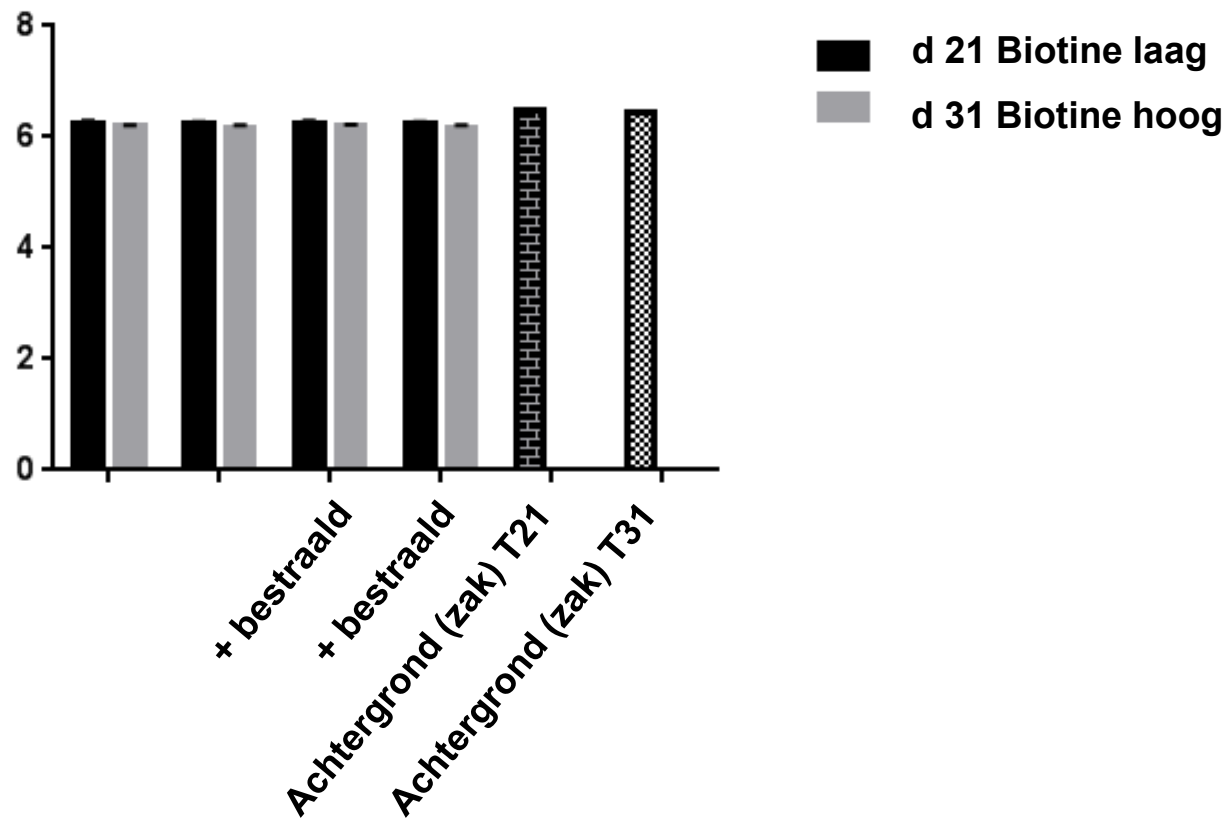
R. van Bruggen

## *K<sup>+</sup> release T21 vs. T31*

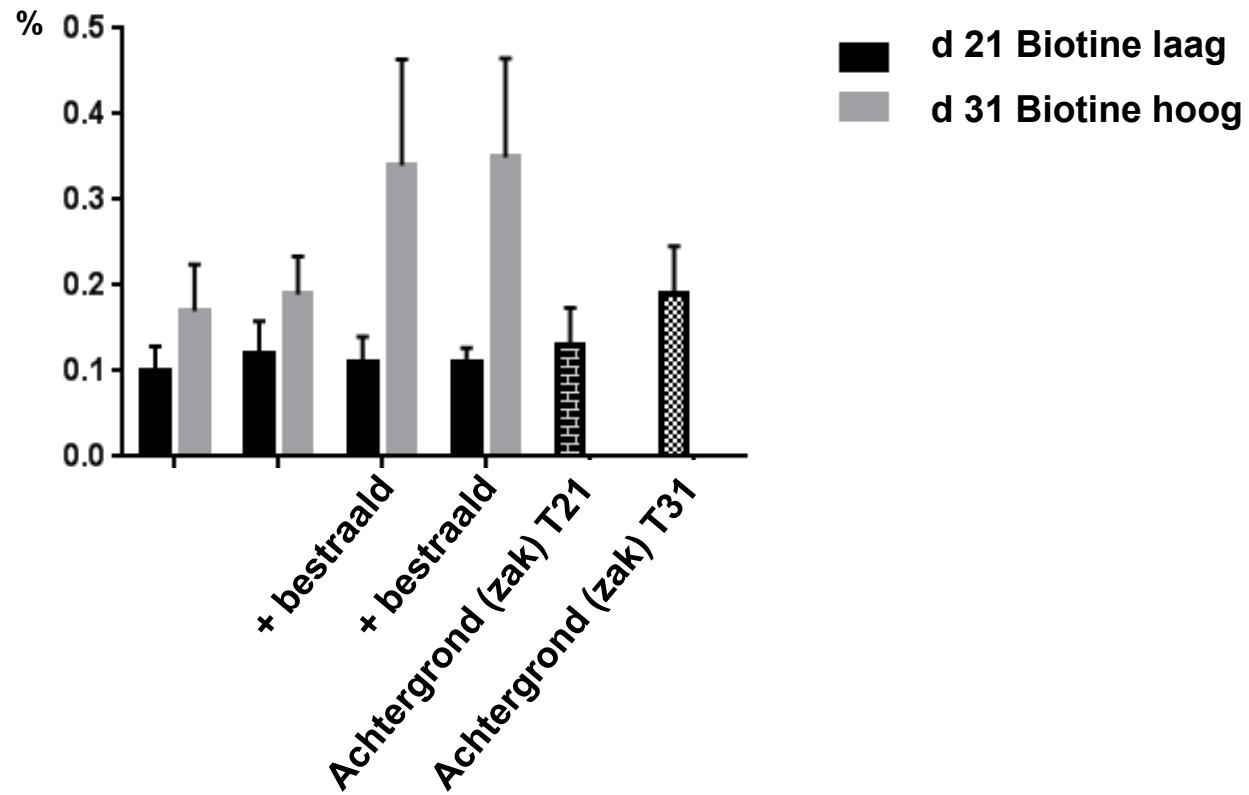




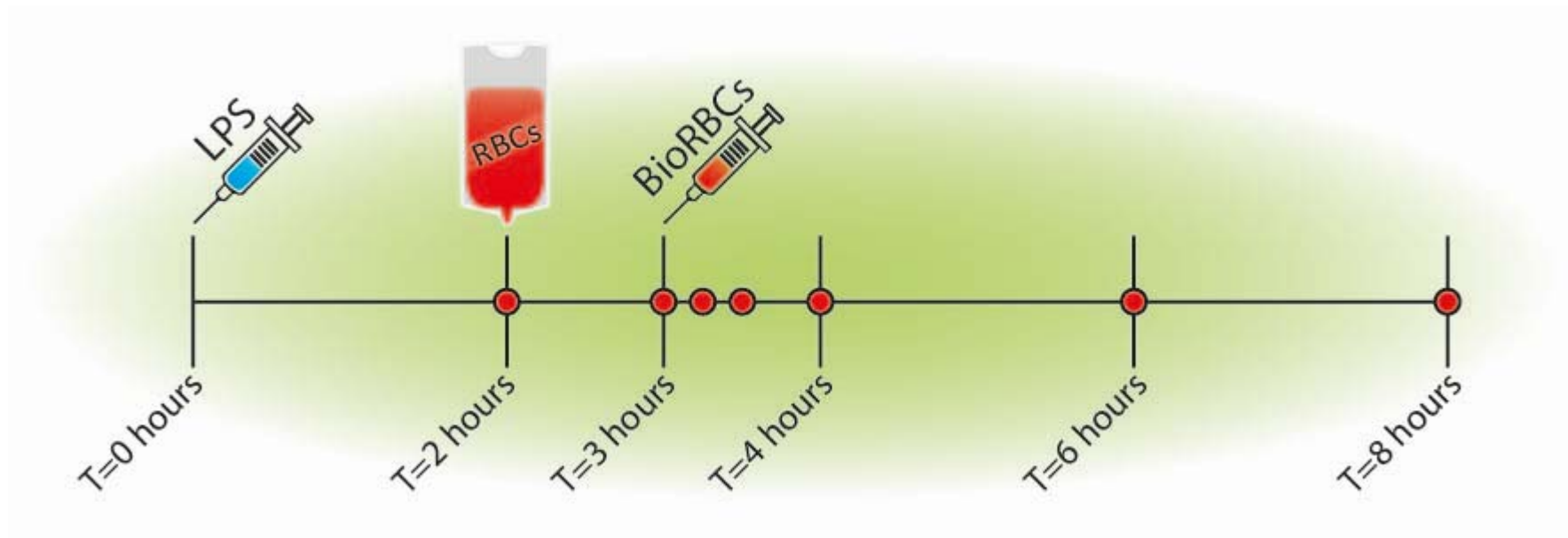
## *pH T21 vs. T31*



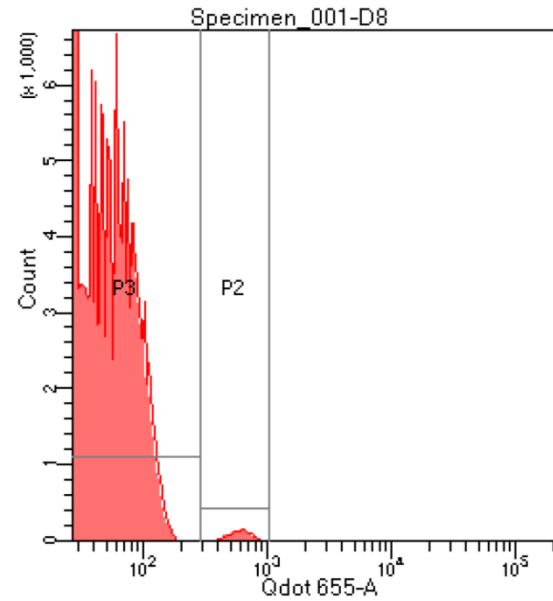
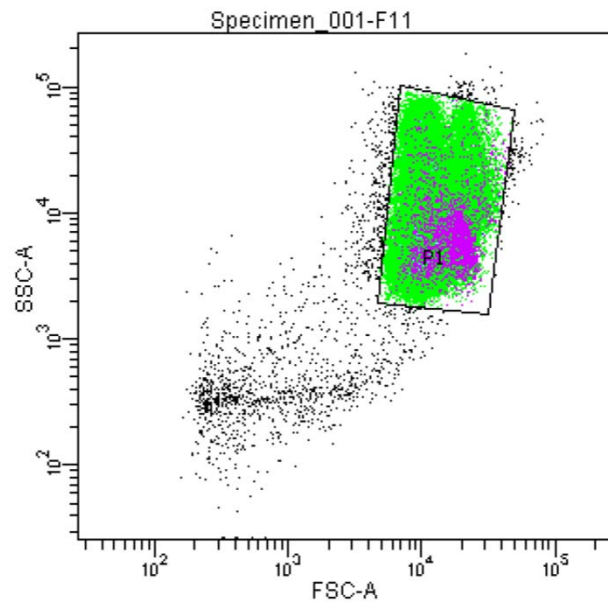
## Average haemolysis T21 vs. T31



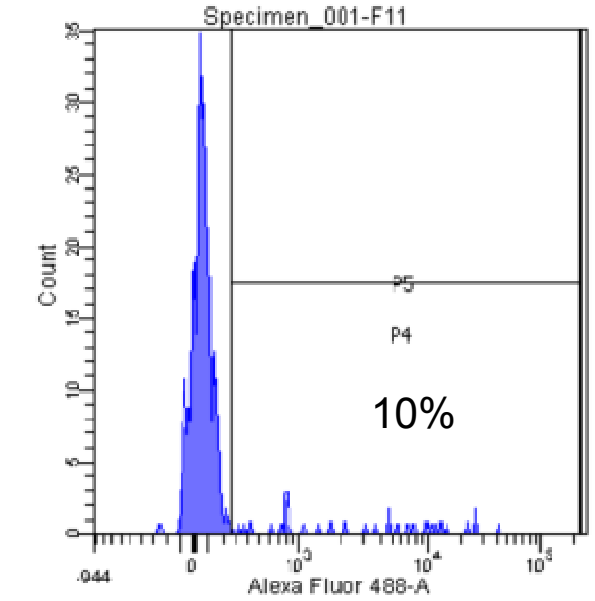
## Autologous transfusion of bioRBC in volunteers



## Autologous transfusion of BioRBC in volunteers



BioRBC



Annexin V