

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

36 430

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 47/00 (2006.01)
G01N 1/42 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2022-39909**
(22) Přihlášeno: **18.05.2022**
(47) Zapsáno: **14.10.2022**

(73) Majitel:
Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha 4, Krč,
CZ
Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i.,
Praha 4, Krč, CZ
Univerzita Karlova, Praha 1, Staré Město, CZ

(72) Původce:
Yuriy Petrenko, Ph.D., Praha 5, Jinonice, CZ
Ing. Irena Vacková, CSc., Praha 10, Uhřetěves, CZ
prof. MUDr. Vojtěch Havlas, Ph.D., Praha 6,
Vokovice, CZ
Ing. Eliška Vavřínová, Zruč nad Sázavou, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název užitého vzoru:
**Zařízení a souprava pro přípravu
terapeutického přípravku na bázi nosiče
osetého buňkami**

Zařízení a souprava pro přípravu terapeutického přípravku na bázi nosiče osetého buňkami

Oblast techniky

5

Technické řešení se týká zařízení a soupravy pro přípravu terapeutického přípravku na bázi nosiče osetého buňkami.

10

Dosavadní stav techniky

V humánní medicíně se v klinických studiích stále častěji ověřuje bezpečnost a účinnost mezenchymálních stromálních buněk (MSC) pro léčbu nejrozličnějších onemocnění a poranění. Klinické studie využívající buněčných terapií a tkáňového inženýrství se mimo jiné zaměřují na

15 léčbu neurodegenerativních onemocnění, autoimunitních onemocnění, kardiovaskulárních onemocnění, diabetu, syndromu diabetických noh, na ortopedické aplikace a další. MSC lze využít i pro alogenní podání, tedy využít buňky zdravého dárce pro léčbu pacientů, u kterých nelze využít jejich vlastní MSC.

20 Před aplikací je nutné produkt určený pro aplikace v humánní medicíně podrobit zkouškám bezpečnosti, které trvají 48 až 72 hodin. Po celou dobu testování bezpečnosti musí být produkt uchován v uzavřeném sterilním prostředí a nesmí s ním být manipulováno až do doby použití na operačním sále.

25 Kryokonzervace reprezentuje jedinou možnost jak zajistit rychlou dostupnost buněčného štěpu pro aplikace v tkáňovém inženýrství stejně jako zajistit bezpečnost a množství produktu při opakovaných podáních. V tomto případě kryobanka obsahuje sadu zkumavek se stejnými buňkami z jedné šarže, z nichž část je určena pro testování kvality, které lze provádět v různých časových intervalech během doby skladování. Za optimálních validačních podmínek mohou být výsledky

30 těchto testů kvality přeneseny na konečné šarže produktu používané pro aplikaci pacientovi bez dalšího hodnocení konečného produktu.

Ke kryokonzervaci různých typů buněk je však nutné využívat kryoprotektiva, která brání tvorbě ledových krystalů v průběhu zmrazování, a tím chrání buňky před poškozením membrán

35 a buněčnou smrtí. V současné době se jako kryoprotektivum ve většině případů využívá dimethylsulfoxid (DMSO) v relativně vysokých koncentracích (až 10 obj. %). Při těchto koncentracích má DMSO při plusových teplotách toxický účinek na rozmražené buňky i na buňky a tkáň pacienta, kterému jsou buňky v roztoku s DMSO aplikovány. Pro zajištění terapeutických výsledků a minimalizaci vedlejších účinků spojených s aplikací roztoku obsahujícího

40 kryoprotektivum je velmi žádoucí vyvinout postupy pro snížení koncentrace DMSO ve zmrazovacích roztocích nebo kontrolovatelné postupy pro odstranění DMSO z média po rozmražení buněk. Přetrvávající přítomnost DMSO během kultivace *in vitro* navíc omezuje životnost buněk a jejich schopnost přichytit se k biomateriálovým nosičům. Proto by mělo být DMSO před aplikací z buněk pokud možno zcela odstraněno.

45

Podle současných předpisů by jeden ze způsobů odstranění DMSO, tedy nasazení buněk do nebo na biomateriálový nosič, mělo probíhat v certifikované laboratoři. Tento vysoce časově a finančně nákladný krok výrazně omezuje použití kryokonzervovaných buněk pro jejich využití v buněčných terapiích a regenerativní medicíně. Odstranění DMSO lze také provádět centrifugací rozmražených

50 buněk přímo na operačním sále, což ale zvyšuje riziko kontaminace těchto buněk a zvyšuje nároky na vybavení operačních sálů.

Slibnějším způsobem použití kryokonzervovaných buněk je zajištění odstranění DMSO v uzavřených systémech, které umožňují výsev na nosič, kultivaci i následnou manipulaci

55 s buňkami a zabráňují kontaminaci buněčného produktu nebo ztrátě buněčné funkce.

Současné metody odstraňování DMSO (a dalších kryoprotektiv) v uzavřených systémech jsou vyvinuty pouze pro krevní produkty, kde objem kryokonzervovaného vzorku krve je však výrazně vyšší než objem kryoprezervovaných buněk a tyto systémy nejsou použitelné pro vzorky s malým objemem. Navíc kromě již výše zmíněných omezení týkajících se velikosti vzorků, vysoké náklady na pořízení a provoz těchto přístrojů a nemožnost jejich využití pro výsev a kultivaci buněk na/v nosičích minimalizuje jejich použití pro výše zmiňované účely.

Proto jsou hledány systémy, které by bez velkých manipulací s rozmraženými buňkami dokázaly bezpečně odstranit DMSO (případně jiná kryoprotektiva) a zajistit vysazení, ukotvení, kultivaci, skladování a transport buněk v nebo na biomateriálových nosičích a zachovat bezpečnost buněčného produktu.

I v případě čerstvě odebraných buněk, které neprošly fází zamražení, je nutné produkt určený pro aplikace v humánní medicíně před použitím podrobit zkouškám bezpečnosti, které trvají 48 až 72 hodin. Po celou dobu testování bezpečnosti musí být produkt uchován v uzavřeném sterilním prostředí a nesmí s ním být manipulováno až do doby použití na operačním sále.

Předkládané technické řešení si klade za cíl odstranit problémy dosavadních řešení.

Podstata technického řešení

Předkládané technické řešení poskytuje komoru a soupravu pro přípravu terapeutického přípravku na bázi nosiče osetého buňkami, které zachovávají bezpečnost buněčného produktu, brání kontaminaci z vnějšího prostředí, a dovoluji zajistit za těchto aseptických podmínek rozmražení, odmytí kryoprotektantů, ukotvení, kultivaci, skladování a transport buněk v nebo na biomateriálových nosičích pro klinické aplikace. Lze využívat čerstvé i kryoprezervované buňky.

V prvním aspektu poskytuje technické řešení komoru pro přípravu terapeutického přípravku, přičemž tato komora obsahuje alespoň jednu nádobu. Nádoba je opatřena alespoň dvěma vstupními/výstupními porty upravenými pro aseptické vnášení a odběr tekutin, přičemž alespoň jeden z portů je opatřen trojcestným kohoutem, jehož jeden přívod je opatřen filtrem pro čištění vstupujících plynů a druhý přívod uzavíratelným ventilem, a přičemž ostatní vstupní/výstupní porty mohou být volitelně také opatřeny ventily. Nádoba je opatřena alespoň jedním uzavíratelným otvorem pro vnesení a odběr nosiče.

Nádoba je plynotěsná a kapalnotěsná. Do nádoby se vkládá nosič a vnáší médium a buňky, probíhá v ní taktéž kultivace buněk.

Nádoba komory je vyrobena z materiálu vhodného pro kontakt s buňkami, s výhodou z materiálu vybraného z polystyrenu, skla, polyethylenu. Lze ji vyrobit mnoha technikami, například 3D tiskem nebo lisováním. Komora může být opakovaně použitelná, v takovém případě by materiál měl být sterilizovatelný.

Vstupní/výstupní porty jsou upraveny pro aseptické vnášení a odběr tekutin. Vstupních/výstupních portů je s výhodou dva až šest, výhodněji dva až čtyři. Vstupní/výstupní porty mohou být osazeny Luer-Lock adaptéry. Vstupní/výstupní porty mohou být dále osazeny filtry a/nebo ventily a/nebo trojcestným kohoutem, tyto součástky lze s výhodou připojit prostřednictvím Luer-Lock adaptérů.

Uzavíratelný otvor pro vnesení a odběr nosiče může být v některých provedeních opatřen šroubovacím uzávěrem, který může být dále opatřen trojcestným kohoutem s filtrem a/nebo ventilem (tento trojcestný kohout může či nemusí být jediným trojcestným kohoutem nádoby). V jiných provedeních může být uzavíratelný otvor pro vnesení a odběr nosiče opatřen těsnicím víkem, které lze uchytit k nádobě například upínacími svorkami.

Filtr je s výhodou filtr o velikosti ok nejvýše 0,22 μm .

5 V některých provedeních může být komora dále opatřena vstupem a výstupem připojeným k peristaltické nebo injekční pumpě. Toto uspořádání umožňuje dynamickou výměnu média uvnitř komory.

10 Ve druhém aspektu je předmětem technického řešení souprava pro přípravu terapeutického přípravku, obsahující komoru popsanou výše, a dále nádobku s 1 až 10% (hmotn.) vodným roztokem CaCl_2 .

Dále může souprava volitelně obsahovat alespoň jednu další součást vybranou z:

- 15 - nádobky s 0,9% (hmotn.) vodným roztokem NaCl nebo Ringerovým roztokem;
- nosiče, s výhodou umístěného v nádobce komory;
- nádobky s destičkovým lyzátem nebo krevní plasmou;
- 20 - nádobky s dimethylsulfoxidem (DMSO).

25 Dále je zde pro úplnost popsán postup přípravy terapeutického přípravku na bázi nosiče osetého buňkami s použitím komory a soupravy podle předkládaného technického řešení. Do nádoby komory se vnese nosič určený pro osazení buňkami a komora se uzavře. Poté se do nádoby komory vnesou vstupním/výstupním portem buňky resuspendované v destičkovém lyzátu nebo krevní plasmě spolu s 1 až 10% (hmotn.) vodným roztokem CaCl_2 a komora se ponechá po dobu 5 až 10 minut při teplotě 30 až 40 $^{\circ}\text{C}$ pro proběhnutí gelotvorné reakce fibrinogenu. Vytvořeným gelem se uchyty buňky na povrchu nosiče či v nosiči. Tím se vytvoří terapeutický přípravek tvořený nosičem, buňkami a gelem (fibrinovým hydrogelem).

30 Lidský destičkový lyzát nebo lidská plazma obsahují fibrinogen, který po vnesení roztoku CaCl_2 tvoří gel. Tento gel (fibrinový hydrogel) napomáhá udržení/adhezi buněk na/v nosiči.

35 Nosič se může s výhodou před vnesením buněk promýt sterilním fyziologickým nebo Ringerovým roztokem nebo kompletním kultivačním médiem.

40 Buňky lze s destičkovým lyzátem nebo krevní plazmou resuspendovat čerstvé (nezmražené), nebo lze použít čerstvě rozmražené buňky, kde destičkový lyzát nebo krevní plasma byly spolu s kryoprotektantem součástí kryoprotektivního média. Kryoprotektantem může být s výhodou 1 až 10% (obj.) dimethylsulfoxid, který minimalizuje poškození buněk během mražení, je ale pro buňky v nezmraženém stavu, v závislosti na dávce, cytotoxický.

45 V případě použití rozmražených buněk a jejich vnesení do nádoby komory spolu s kryoprotektantem se proto následně do nádoby komory vnese vstupním/výstupním portem 0,9% (hmotn.) vodný roztok NaCl nebo Ringerův roztok z důvodu odmytí pro buňky toxického dimethylsulfoxidu, který se následně vstupním/výstupním portem odebere. To se s výhodou provádí tak, že nádobka s 0,9% (hmotn.) roztokem NaCl nebo Ringerovým roztokem se zahřeje na 30 až 40 $^{\circ}\text{C}$ a roztok se opatrně injekční stříkačkou vnese do nádoby komory prostřednictvím vstupního/výstupního portu, aby se naředil DMSO. Pomocí sterilní injekční stříkačky se kapalina 50 z komory odstraní, opět prostřednictvím vstupního/výstupního portu. Krok vnesení 0,9% (hmotn.) vodného roztoku NaCl nebo Ringerova roztoku a jeho odebrání lze vícekrát zopakovat, obvykle se opakuje 1 až 4krát.

55 V kroku rozmražení buněk a tvorby gelu se buňky rozmrazí při 30 až 43 $^{\circ}\text{C}$ během nejvýše 5 minut, nasaje se 1 až 10 % (hmotn.) roztok CaCl_2 do injekční stříkačky a rozmražené buňky

v kryoprotektivním médiu se odeberou do stejné injekční stříkačky. Bezprostředně poté se obsah stříkačky pomalu vstříkne do nádoby komory jedním vstupním/výstupním portem. Komora se umístí na 5 až 10 minut do termostatu při teplotě 30 až 40 °C pro proběhnutí gelotvorné reakce fibrinogenu.

5

Po proběhnutí gelotvorné reakce a odmytí DMSO v případě přidání rozmražených buněk, nebo po proběhnutí gelotvorné reakce v případě přidání čerstvých buněk resuspendovaných v destičkovém lyzátu nebo krevní plazmě je nosič s uchycenými buňkami a s gelem (terapeutický přípravek) připraven buď k aplikaci, nebo je určen k další kultivaci buněk na nosiči a následné aplikaci. Další

10

kultivace buněk na nosiči může trvat 6 hodin až 14 dní, s výhodou 1 až 7 dní. Kultivace obvykle probíhá v kompletním kultivačním médiu vhodném pro kultivovaný typ buněk, při teplotě 35,5 až 39,5 °C, ve vlhčené atmosféře s řízenou výměnou plynů se 3 až 7 % (obj.) CO₂ a 1 až 21 % (obj.) O₂ ve směsi plynů.

15

V hermeticky uzavřené komoře za přítomnosti kultivačního média lze buňky uchycené v gelu na nosiči uchovat při teplotě 10 až 30 °C, s výhodou 23 až 28 °C, bez přístupu vzduchu po dobu až 10 dní, s výhodou 2 až 6 dní, bez jakékoli další manipulace v aseptickém prostředí.

20

Nosič je obvykle vytvořen z biomateriálu a je s výhodou porézní. Vhodné jsou zejména biomateriály v kvalitě pro klinické aplikace. To jsou zejména syntetické biokompatibilní polymery, jako je kyselina polymléčná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA), kyselina polymléčná-glykolová (PLGA), polyethylenglykol (PEG), polykaprolakton (PCL), polyhydroxybutyrát (PHB); dále přírodní polymery, proteiny a polysacharidy, jako je kolagen, kolagen typu I, želatina, alginát, agar, hyaluronová kyselina, hyaluronan sodný, benzylester kyseliny hyaluronové, fibrin, chitosan, celulóza, škrob; nebo extracelulární matrice (ECM), silikon, hydroxyapatit, a směsi těchto materiálů. Materiál nosiče může být ve formě hydrogelu, nanovláken, mikrovláken, membrán či kontaktních čoček. Nosičem může být materiál jak biodegradabilní, tak i nedegradabilní.

25

30

Buňkami jsou adherentní buňky. Zejména jsou používány buňky ze skupiny zahrnující mezenchymální stromální buňky, například získané z kostní dřeně, tukové tkáně, periferní krve, vlasových folikulů, epidermis, varlat, pupečnickové krve, pupečnickové tkáně, placenty, amniové tekutiny, buňky tkáňově specifické, například buňky nervové, limbální, endoteliální, chondrocyty, fibroblasty, osteoblasty, dále embryonální kmenové buňky, extraembryonální kmenové buňky

35

a indukované pluripotentní buňky.

Rozměry komory a její nádoby lze volit podle velikosti a počtu nosičů, které se do nich budou vkládat. Komora i kultivační nádoba mohou být například kruhového, obdélníkového či čtvercového tvaru.

40

Komoru a soupravu podle předkládaného technického řešení lze využít pro odmytí DMSO z rozmražených buněk uchycených na nosiči či v nosiči, pro kultivaci buněk na nosiči či v nosiči, pro dlouhodobé uchování buněk v na nosiči či v nosiči (až 10 dní) v uzavřeném aseptickém prostředí bez přístupu vzduchu při teplotě 10 až 30 °C. Nosič osazený buňkami ve fibrinovém hydrogelu tvoří terapeutický přípravek.

45

Objasnění výkresů

50

Obr. 1 znázorňuje první provedení komory podle technického řešení.

Obr. 2 a 3 znázorňují druhé provedení komory podle technického řešení.

55

Obr. 4 ukazuje závislost životaschopnosti/míry proliferace buněk hWJ-MSC v nosičích hyalofast (HF, přerušovaná linie) a chondrotissue (CHT, nepřerušovaná linie) na době kultivace.

Obr. 5 ukazuje životaschopnost/míru proliferace buněk hWJ-MSC v nosičích hyalofast (HF) v obou testovaných komorách, při uchování 0, 2, 6 dní, komory byly hermeticky uzavřené při teplotě 25 °C (č1, č2 - komora č. 1, komora č. 2; d0 - buňky ukotvené v nosiči HF po osmidenní kultivaci v termostatu s řízenou atmosférou před uchováním v uzavřené komoře bez přístupu plynů při teplotě 25 °C; d2 - buňky ukotvené v nosiči HF po dvoudenním uchování v uzavřené komoře bez přístupu plynů při teplotě 25 °C a d6 - buňky ukotvené v příslušném nosiči po šestidenním uchování v uzavřené komoře bez přístupu plynů při teplotě 25 °C).

Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Konstrukce komory

Komora popsaná v tomto příkladu je znázorněna na Obr. 1. Komora obsahuje nádobu A komory, která je opatřena dvěma vstupními/výstupními porty P1 a P2 pro aseptické vnášení a odběr tekutin. Nádoba A komory je dále opatřena otvorem O, který je uzavíratelný šroubovacím uzávěrem U, přičemž šroubovací uzávěr U je opatřen portem P3 s trojcestným uzavíratelným kohoutem K, jehož jeden přívod je opatřen uzavíratelným ventilem V3 a jehož druhý přívod je opatřen filtrem F pro čištění vstupujících plynů, přičemž vstupní/výstupní porty P1, P2 mohou být volitelně také opatřeny ventily V1, V2, nebo mohou být osazeny filtry (neznázorněno).

Do nádoby A komory se otvorem O vnese biomateriálový nosič N. Po vnesení nosiče se komora uzavře šroubovacím uzávěrem U s trojcestným uzavíratelným kohoutem K. Po otevření ventilu V1 se vstupním/výstupním portem P1 vnese injekční stříkačkou Ringerův roztok a ventil V1 se uzavře. Po 10 minutách se Ringerův roztok odsaje injekční stříkačkou ventilem V2 přes vstupní/výstupní port P2 a ventil se uzavře. Takto je systém připraven pro vnesení buněk spolu s destičkovým lyzátem či krevní plazmou a roztokem CaCl_2 , které se do systému vnáší injekční stříkačkou po otevření ventilu V3 přes vstupní/výstupní port P3 trojcestného kohoutu K.

Příklad 2: Konstrukce komory

Komora popsaná v tomto příkladu je znázorněna na Obr. 2 a 3. Komora obsahuje nádobu A komory, která je opatřena čtyřmi vstupními/výstupními porty P1, P2, P3, P4 upravenými pro aseptické vnášení a odběr tekutin. Nádoba A komory je dále opatřena otvorem O krytým víkem B a silikonovým těsněním C, přičemž víko B je fixováno čtyřmi upínacími svorkami D. Vstupní/výstupní porty P1, P2, P3, P4 jsou opatřeny trojcestnými uzavíratelnými kohouty K1, K2, K3, K4, jejichž jeden přívod je vždy opatřen filtrem F1, F2, F3, F4 pro čištění vstupujících plynů a jejichž druhý přívod je opatřen ventilem V1, V2, V3, V4.

Nosič N je do systému vnášen otvorem O po otevření víka B. Nosič N kompletně vyplňuje plochu nádoby A komory. Případně lze vnést několik menších nosičů (neznázorněno). Po vnesení nosiče N se na nádobu A komory přiloží silikonové těsnění C a víko B, které se fixuje pomocí čtyř upínacích svorek D. Po otevření libovolného ventilu V1, V2, V3 nebo V4 se do nádoby A komory vnese Ringerův roztok a ventil V1, V2, V3 nebo V4 se uzavře. Po 10 minutách se ventil V1, V2, V3 nebo V4 otevře a Ringerův roztok se z komory odsaje. Takto je systém připraven pro vnesení buněk spolu s destičkovým lyzátem či krevní plazmou a roztokem CaCl_2 .

Příklad 3: Kryokonzervace buněk použitých pro vysazení do nádoby komory

Příklad 3A: Postup zmrazení mezenchymálních stromálních buněk derivovaných z Whartonova gelu lidských pupečků (lidské WJ-MSC, hWJ-MSC)

Jeden milion hWJ-MSC byl zmrazen na 3. pasáži ve zmrazovací zkumavce v jednom mililitru kryoprezervačního média složeného z lyzátu lidských krevních destiček (destičkový lyzát; DL) s 1,

2, 5 a 10% (obj.) DMSO pomalým zmrazováním na teplotu -80 °C rychlostí cca 1 °C za minutu ve zmrazovacím kontejneru CoolCell, a poté uložen do kontejneru s tekutým dusíkem. Zmražené vzorky byly po 30 dnech vyjmuty z dusíku a okamžitě rozmrazeny při 37 °C pro analýzu buněčné viability.

5

Při 2% (obj.) a vyšší koncentraci DMSO v kryoprezervačním médiu byla po rozmražení integrita membrány buněk (jeden ze znaků životaschopnosti buněk) po obarvení trypanovou modří velmi vysoká (90 až 98 %). I při 1% (obj.) koncentraci DMSO byla zjištěna životaschopnost dostačující (65 ± 18 %) (Tab. 1). Data získaná okamžitě po rozmražení a použití pouze jednoho parametru (integrita membrány) však mohou nadhodnocovat výsledky, protože je známo, že apoptotické procesy, ke kterým může dojít během kryokonzervace, přetrvávají přibližně 24 hodin po návratu buněk do fyziologických podmínek (tj. do buněčné kultury). Stanovení míry přežitelnosti hWJ-MSC 24 hodin po kryokonzervaci měřené resazurinovým testem skutečně ukazuje zcela odlišné výsledky (Tab. 1), kdy je buněčná vitalita významně nižší ve srovnání s životaschopností buněk, která byla hodnocena barvením trypanovou modří bezprostředně po rozmražení. Míra přežitelnosti hWJ-MSC po kryokonzervaci s použitím 1% (obj.) koncentrace DMSO v DL dosahovala pouze 6 ± 1 %. Přidání 2% (obj.) DMSO do kryoprotektivního média zajistilo 66 ± 3 % regeneraci buněk a aplikace 5% a 10% poskytuje podobné výsledky, tedy přibližně 80% míru regenerace.

20 Tabulka 1 - Životaschopnost a míra přežitelnosti (regenerace) buněk po rozmražení měřená pomocí trypanové modří a resazurinového testu v závislosti na koncentraci DMSO ve zmrazovacím médiu připraveného z lidského destičkového lyzátu.

Koncentrace DMSO v kryoprezervačním roztoku	Životaschopnost WJ-MSC	Míra přežitelnosti WJ-MSC
	měřeno trypanovou modří	měřeno resazurinovým testem
(v %)	(v % ± směrodatná odchylka)	(v % ± směrodatná odchylka)
1	65 ± 18	6 ± 1
2	93 ± 3	66 ± 3
5	96 ± 2	85 ± 10
10	95 ± 3	79 ± 9

25 Resazurin, netoxické, modré, nefluorescenční, ve vodě rozpustné barvivo, je metabolicky aktivními buňkami redukováno na růžové, vysoce fluorescenční barvivo resofurin. K této přeměně dochází pouze v životaschopných buňkách, a proto je množství produkovaného resorufinu úměrné počtu životaschopných buněk, které přežily kryokonzervaci. Resazurinový test probíhal podle následujícího postupu: konstrukty buněk s biomateriálovými nosiči byly přeneseny na 2 hodiny do 0,5 ml kompletního kultivačního média s přidavkem resazurinu a poté byla změřena fluorescence média (Ex/Em=530/590) na přístroji Synergy™ HT Multi-Mode Microplate reader. Kompletní kultivační médium sestávalo z Alpha MEM média, 5% DL a 10 µg/ml gentamycinu.

35 Aplikace kryoprotektivního média složeného z lidského destičkového lyzátu s 5% nebo 10% DMSO zajišťuje vysokou životaschopnost i míru přežitelnosti WJ-MSC po kryokonzervaci.

Příklad 3B: Postup zmražení prasečích fibroblastů

40 Prasečí fibroblasty na 3. pasáži derivované z ušního boltce prasete plemene české bílé ušlechtilé v množství 1 milion buněk byly zmrazeny ve zmrazovací zkumavce v 1 ml kryoprezervačního roztoku složeného z prasečí krevní plazmy s 5 % DMSO pomalým zmrazováním na teplotu -80 °C rychlostí cca 1 °C za minutu ve zmrazovacím kontejneru CoolCell, a poté uloženy do tekutého dusíku. Po rozmražení byla pomocí trypanové modří zjištěna životaschopnost 91 ± 8% a míra přežitelnosti měřená resazurinovým testem dosahovala hodnoty 81 ± 10%.

45

Bylo tedy potvrzeno, že aplikace kryoprotektivního média složeného z destičkového lyzátu/krevní plazmy s 5 až 10 % DMSO zajišťuje vysokou životaschopnost i míru přežití buněk po kryokonzervaci.

5 Příklad 4: Odmytí DMSO z kryoprezervovaných buněk

Buňky byly kryokonzervovány jak je popsáno v Příkladu 3A. Celkem byl kryokonzervován 1 milion buněk v objemu 1 ml DL s 10 % (obj.) DMSO v jedné kryozkumavce. Buňky byly rozmrazeny rychlým zahřátím kryozkumavky při 37 °C. Jedna třetina objemu (330 µl, 330 tis. buněk) byla vysazena na komerční nosiče o velikosti 5 x 5 mm uložené v nádobách komor. Použité nosiče jsou komerční pevné výplně, které se používají při ortopedických operacích: Chondrotissue® obsahující hyaluronan sodný a polyglykolovou kyselinu, a Hyalofast™ obsahující benzyl ester kyseliny hyaluronové. Od každého nosiče bylo v rámci zkoušky osazeno 6 vzorků, každý do samostatné komory. Nosiče byly předem navlhčeny v Ringerově roztoku po dobu 30 min. Nosič Hyalofast byl vnesen do nádoby komory podle Příkladu 1, nosič Chondrotissue byl vnesen do nádoby komory podle Příkladu 2. Nosiče byly do komor vneseny tak, jak je popsáno v Příkladech 1 a 2.

Kryozkumavka s buňkami byla rozmrazena při 37 °C během 5 minut, 25 µl roztoku 10% roztoku (hmot.) CaCl₂ bylo nasáto do injekční stříkačky a obsah kryozkumavky (rozmražené buňky v kryoprezervačním roztoku) byl odebrán do stejné injekční stříkačky. Bezprostředně poté byla 1/3 obsahu stříkačky vstříknuta do jedné komory přes odpovídající porty a ventily podle Příkladů 1 a 2. Druhá třetina byla vstříknuta do druhé komory a třetí třetina do třetí komory.

25 Příklad 4A: Odmytí DMSO z kryoprezervovaných buněk

Tento postup byl prováděn v komorách podle Příkladu 1. Stříkačka byla připojena přes ventil V3, trojcestný kohout byl nastaven do polohy „filtr uzavřen“, suspenze byla vstříknuta do nádoby A komory, stříkačka byla odpojena, ventil V3 byl uzavřen a trojcestný kohout byl nastaven do polohy „filtr otevřen“. Ve všech nádobách A byl umístěn předem navlhčený nosič Hyalofast. Na každý vzorek bylo použito 330 tis. buněk. Vzhledem k tomu, že po spojení všech složek gel začíná tuhnout za cca 60 sekund, musí být tekutina s buňkami nanесena na navlhčený nosič okamžitě po smíchání všech složek. Tekutina s buňkami se vsákla do nosiče a do jedné minuty začala gelotvorná reakce. Všechny komory byly umístěny na 10 minut do inkubátoru s 37 °C. Po vytvoření hydrogelu, který slouží k ukotvení buněk v nosiči, byl Ringerův roztok, předem zahřátý na 37 °C, přenesen do sterilní stříkačky a 2 ml tohoto roztoku bylo opatrně vneseno do nádoby A komory přes ventil V1, který je připojen ke vstupnímu/výstupnímu portu P1, aby byl naředěn DMSO. Po jedné minutě byl roztok z komory odsán další sterilní stříkačkou přes ventil V2. Promývání bylo zopakováno ještě 2x. Po promytí byly terapeutické přípravky tvořené buňkami, nosičem a hydrogelem vyjmuty z komory a využity pro detekci životaschopnosti buněk. Terapeutické přípravky byly vyjmuty sterilní pinzetou přes otvor Q po odšroubování šroubovacího uzávěru U.

Příklad 4B: Odmytí DMSO z kryoprezervovaných buněk

Tento postup byl prováděn v komorách podle Příkladu 2. Komory s vloženým navlhčeným nosičem N byly natočeny do vertikální polohy se vstupními/výstupními porty P3 a P4 směřujícími dolů. Nosičem N byl Chondrotissue®. Trojcestné kohouty K2, K3, K4 připojené ke vstupním/výstupním portům P2, P3, P4 byly nastaveny do polohy „filtr otevřen“, zatímco trojcestný ventil připojený ke vstupnímu/výstupnímu portu P1 byl nastaven do pozice „filtr uzavřen“. Stříkačka se suspenzí buněk byla připojena k ventilu V1, který je spojen se vstupním/výstupním portem P1, a suspenze byla vstříknuta do nádoby A na nosič N. Po vstříknutí suspenze byla komora natočena do horizontální polohy a jemným kýváním ze strany na stranu byla suspenze rozprostřena po povrchu nosiče. Poté byla injekční stříkačka odpojena a všechny trojcestné kohouty K1, K2, K3, K4 byly nastaveny do polohy „filtr uzavřen“. Na každý vzorek bylo použito 330 tis. buněk. Každý vzorek byl osazen v jedné komoře.

Pro zlepšení homogenity a účinnosti osetí nosičů je možné postup nasazení buněk opakovat z dalších ventilů.

- 5 Všechny komory byly umístěny na 10 minut do inkubátoru s 37 °C. Po 10 minutách, kdy se vytvořil přeměnou fibrinogenu obsaženého v destičkovém lyzátu na fibrin hydrogel, který slouží k ukotvení buněk v nosiči, byl Ringerův roztok zahřátý na 37 °C přenesen do sterilní stříkačky a 2 ml tohoto roztoku bylo opatrně vstříknuto do nádoby A přes ventil V1 spojený se vstupním/výstupním portem P1, aby byl naředěn DMSO, přičemž všechny trojcestné kohouty K1, K2, K3, K4 byly nastaveny na „filtr uzavřen“. Po jedné minutě byl roztok z komory odsát další sterilní stříkačkou přes ventil V4 spojený se vstupním/výstupním portem P4. Promývání bylo zopakováno ještě 2x.

- 15 Po promytí byly terapeutické přípravky konstrukty tvořené buňkami, nosičem a hydrogelem vyjmuty z komory a využity pro detekci životaschopnosti buněk. Terapeutické přípravky byly z komory vyjmuty sterilní pinzetou po odstranění upínacích svorek D a víka B.

Příklad 5: Detekce životaschopnosti buněk po odmytí DMSO

- 20 Pro detekci životaschopnosti buněk byly terapeutické přípravky tvořené buňkami, nosičem a hydrogelem z Příkladů 4A a 4B vyjmuty z komory podle Příkladu 1 otvorem Q po sejmutí horního šroubovacího uzávěru U nebo z komory podle Příkladu 2 odstraněním upínacích svorek D a otevřením víka B, a obarveny pomocí LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity kitu (podle instrukcí výrobce), který obsahuje barviva Calcein AM, které patří mezi nejlepší indikátory živých buněk, a Ethidium homodimer-1, které barví mrtvé buňky s poškozenou membránovou integritou. Po obarvení a oplachu byly obarvené terapeutické přípravky analyzovány na mikroskopu. Pomocí programu ImageJ byla provedena analýza obrazu a vypočteno procentuální zastoupení živých a mrtvých buněk.

- 25 Zároveň byl LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity kit použit k obarvení buněk, které byly zmrazeny podle Příkladu 3A a rozmrazeny podle Příkladu 4. Po rozmrazení byly buňky s kryoprezervačním médiem resuspendovány ve 4 ml Ringerova roztoku, stočeny na centrifuze 5 minut při 300 rcf (relativní centrifugační síly), supernatant s DMSO byl odstraněn a peleta resuspendována v 1 ml Ringerova roztoku. Naměřené hodnoty byly použity jako kontrolní hodnoty.

35

TABULKA 2 Procentuální obsah živých buněk po odmytí DMSO z kryoprezervovaných buněk

	Komora podle Příkladu 1	Komora podle Příkladu 2	Centrifugace
Procento živých buněk	91 ± 6	87 ± 3	88 ± 7

- 40 Výsledky uvedené v tabulce 2 potvrzují, že odmytí DMSO z kryoprezervovaných buněk podle Příkladů 4A a 4B je přinejmenším srovnatelné s konvenčně používaným způsobem odmytí pomocí centrifugace.

Příklad 6: Nasazení čerstvě sklizených buněk do biomateriálového nosiče

- 45 Lidské WJ-MSC na 3. pasáži byly sklizeny pomocí enzymu trypsin/EDTA a po přidání fetálního bovinního séra a fyziologického roztoku stočeny na stolní centrifuze (5 min, 1100 rpm). Jeden milion buněk byl resuspendován v jednom mililitru krevní plazmy, natažen do sterilní zkumavky, která již obsahovala 25 µl 10% (hmotn.) roztoku CaCl₂. Buňky byly vneseny do nádoby A komory podle Příkladu 1. Z jedné stříkačky byly osety tři komory. Celkem bylo osazeno šest komor pro každý typ nosiče. Nosičem byl nastříhaný komerční nosič (5 x 5 mm) hyalofast a nastříhaný komerční nosič (5 x 5 mm) chondrotissue. Nosiče byly před vnesením buněk navlhčeny kompletním kultivačním médiem po dobu 30 min.

50

Příklad 7: Kultivace terapeutických přípravků v komoře podle Příkladu 1

Po vysazení buněk podle Příkladu 6 bylo do nádoby A komory podle Příkladu 1 injekční stříkačkou vneseno přes ventil V2 připojený ke vstupnímu/výstupnímu portu P2 2 ml kompletního kultivačního media, stejného jako v Příkladu 3A. Poté byl trojcestný kohout K nastaven do pozice „filtr otevřen“, což umožňuje výměnu vzduchu v systému. Pro statickou buněčnou kulturu byly všechny osazené komory umístěny do inkubátoru při 37 °C, 5 % CO₂. Výměna vzduchu probíhala přes 0,22 µm filtr.

První, čtvrtý a sedmý den byly 3D konstrukty buněk s biomateriálovými nosiči vyjmuty z komory a byla změřena životnost buněk pomocí resazurinové esejí podle Příkladu 3A. Poté byly terapeutické přípravky vráceny do kultivační komory, 1x promyty v kompletním kultivačním médiu a dále kultivovány v kultivačním médiu v termostatu s řízenou atmosférou při 37 °C, 5% CO₂. Terapeutické přípravky byly vyjímány a vráceny z/do nádoby A sterilní pinzetou přes otvor O po otevření šroubovacího uzávěru U.

Promývání kompletním kultivačním médiem probíhalo dle následujícího postupu: sterilní 5 ml stříkačka byla připojena k ventilu V2 spojenému se vstupním/výstupním portem P2 a médium bylo ze systému odsáto, stříkačka byla odpojena a ventil uzavřen. Pomocí další 5 ml injekční stříkačky bylo ventilem V3 přidáno 2 ml čerstvého media. Poté byl trojcestný kohout K nastaven do pozice „filtr otevřen“.

Výsledky experimentů ukazují, že buňky ukotvené v materiálu jsou vitální a neztrácí schopnost proliferace po dvou dnech kultivace (Obr. 4). Buňky kultivované v na nosiči HF si zachovávají proliferaci schopnost i sedmý den kultivace.

Příklad 8: Uchování buněk v terapeutických přípravcích v uzavřené komoře po dobu 2 až 6 dní při 25 °C

V tomto příkladu byl pro kultivace využit jen nosič hyalofast (5 x 5 mm), který byl osazen do obou typů komor (dle Příkladu 1 a dle Příkladu 2). K pokusu bylo osazeno 6 komor každého typu.

Trypsinizované buňky byly vysazeny do nádoby A komory podle Příkladu 1 postupem podle Příkladu 6, a po proběhnutí gelotvorné reakce byly injekční stříkačkou přes ventil V2 připojený ke vstupnímu/výstupnímu portu P2 vneseny 2 ml kompletního kultivačního média, stejného jako v Příkladu 3A. Poté byl trojcestný kohout K nastaven do pozice „filtr otevřen“, což umožňuje výměnu vzduchu v systému. Pro statickou buněčnou kulturu byla komora umístěna do inkubátoru s řízenou atmosférou při 37 °C, 5% CO₂. Výměna vzduchu probíhala přes 0,22 µm filtr.

Trypsinizované buňky podle Příkladu 6 byly vysazeny do nádoby komory č. 2 podle příkladu 4B. Po proběhnutí gelotvorné reakce byly injekční stříkačkou přes ventil V1, který je připojen ke vstupnímu/výstupnímu portu P1, vneseny 2 ml kompletního kultivačního media, stejného jako v Příkladu 3A. Trojcestné kohouty K2, K3, K4 na vstupních/výstupních portech P2, P3, P4 byl nastaven do pozice „filtr otevřen“, což umožňuje výměnu vzduchu v systému. Pro statickou buněčnou kulturu byla komora umístěna do inkubátoru s řízenou atmosférou při 37 °C, 5% CO₂. Výměna vzduchu probíhala přes 0,22 µm filtr.

První, čtvrtý a sedmý den bylo v komorách vyměněno médium. Výměna kultivačního média probíhala dle následujícího postupu: v komoře podle Příkladu 1 byla sterilní 5 ml stříkačka připojena k ventilu V2 spojenému se vstupním/výstupním portem P2 a médium bylo ze systému odsáto, stříkačka byla odpojena a ventil V2 uzavřen. Pomocí další 5 ml injekční stříkačky byly ventilem V3 přidány 2 ml čerstvého média. Poté byl trojcestný kohout K nastaven do pozice „filtr otevřen“. V komoře podle Příkladu 2 byla sterilní 5 ml stříkačka připojena k ventilu V3 spojenému se vstupním/výstupním portem P3 a médium bylo ze systému odsáto, stříkačka byla odpojena a ventil V3 uzavřen. Poté byl trojcestný kohout K nastaven do pozice „filtr otevřen“. Pomocí další

5 ml stříkačky bylo čerstvé médium vneseno do nádoby komory pomocí ventilu V1, spojeného se vstupním/výstupním portem P1. Trojcestné kohouty K2 a K4 na vstupních/výstupních portech P2 a P4 byly nastaveny do polohy „filtr otevřen“, zatímco trojcestné kohouty K1 a K2 na vstupních/výstupních portech P1 a P2 byly nastaveny do polohy „filtr uzavřen“.

5

Osmý den byl u buněk v terapeutických přípravcích proveden resazurinový test podle příkladu 3A. Po resazurinovém testu byly terapeutické přípravky promyty kompletním kultivačním médiem a vráceny do komor s čerstvým médiem. Po jedné hodině kultivace v termostatu s řízenou atmosférou 5% CO₂, 37 °C byly komory vyjmuty z termostatu s řízenou atmosférou, hermeticky uzavřeny tak, aby se zamezilo přístupu vzduchu, a umístěny na 2 nebo 6 dní do termostatu se stálou teplotou 25 °C. Díky jednohodinové kultivaci před vyjmutím z termostatu s řízenou atmosférou bylo kultivační médium dostatečně satureováno oxidem uhličitým. Po celou dobu uchování buněk při 25 °C nebylo s komorou ani terapeutickým přípravkem manipulováno. Po 2, resp. 6 dnech byly z nádob komor vyjmuty terapeutické přípravky podle Příkladů 4A a 4B a postupem podle Příkladu 3A byl proveden resazurinový test, aby se zjistila životaschopnost/míra přežitelnosti buněk po uchování 2, resp. 6 dní v pro buňky nefyziologických podmínkách. Zároveň bylo změřeno pH média, ve kterém byly buňky skladovány po dobu 2, resp. 6 dní. Ideální hodnota pH média pro buňky je 7,2 až 7,4. Hodnoty nižší než 6,8 nebo vyšší než 8,2 jsou pro buňky nevhodné a mohou způsobovat buněčnou smrt. Bylo změřeno rovněž pH média, které bylo odebráno 8. den kultivace před resazurinovým testem.

pH média, ve kterém byly buňky uskladněny po dobu 2, resp. 6 dnů, se výrazně nezměnilo oproti pH kontrolního média, ve kterém byly buňky kultivovány v optimálním prostředí termostatu s řízenou atmosférou a teplotou (Tabulka 3). Resazurinový test prokázal, že buňky v terapeutických přípravcích si zachovávají vysokou míru přežitelnosti po dvou i šesti dnech skladování v uzavřené komoře bez přístupu vzduchu a plynů při teplotě 25 °C, jsou vitální a schopné dále proliferovat (Obr. 5). Doba 2 až 6 dní uchování bez další manipulace, ve sterilním prostředí, je nutná pro provedení zkoušek bezpečnosti potřebných pro propuštění terapeutického přípravku a pro jeho transport na místo aplikace.

30

Tabulka 3 – pH media před a po 2 a 6denním uchování v uzavřené komoře

pH média	den 0	den 2	den 6
Komora podle Př. 1	7,21 ± 0,23	7,54 ± 0,27	7,63 ± 0,26
Komora podle Př. 2	7,32 ± 0,15	7,57 ± 0,18	7,67 ± 0,22

NÁROKY NA OCHRANU

1. Komora pro přípravu terapeutického přípravku, přičemž tato komora obsahuje alespoň jednu nádobu (A), **vyznačující se tím**, že nádoba (A) je opatřena alespoň dvěma vstupními/výstupními porty (P1), (P2), (P3), (P4) upravenými pro aseptické vnášení a odběr tekutin, přičemž alespoň jeden z vstupních/výstupních portů (P1), (P2), (P3), (P4) je opatřen trojcestným kohoutem (K), (K1), (K2), (K3), (K4), jehož jeden přívod je opatřen filtrem (F), (F1), (F2), (F3), (F4) pro čištění vstupujících plynů a druhý přívod uzavíratelným ventilem (V1), (V2), (V3), (V4), a přičemž ostatní vstupní/výstupní porty (P1), (P2), (P3), (P4) mohou být volitelně také opatřeny ventily (V1), (V2), (V3), (V4), přičemž nádoba (A) je opatřena alespoň jedním uzavíratelným otvorem (O) pro vnesení a odběr nosiče (N).

2. Komora podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že vstupních/výstupních portů (P1), (P2), (P3), (P4) je dva až šest, výhodně dva až čtyři.

3. Komora podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že uzavíratelný otvor (O) pro vnesení a odběr nosiče (N) je opatřen šroubovacím uzávěrem (U), který může být volitelně dále opatřen trojcestným kohoutem (K) s filtrem (F) a/nebo ventilem (V).

4. Komora podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že uzavíratelný otvor (O) pro vnesení a odběr nosiče je opatřen těsnicím víkem (B).

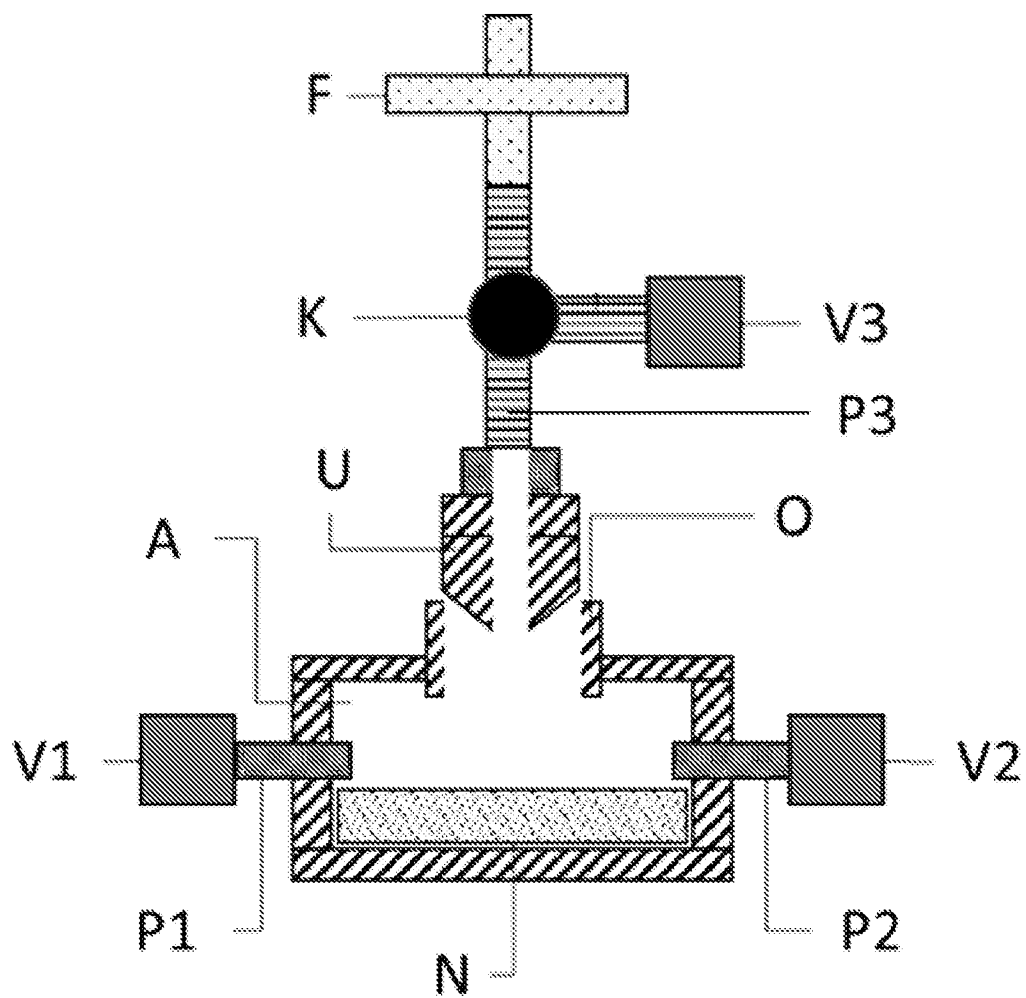
5. Komora podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že je dále opatřena vstupem a výstupem připojeným k peristaltické nebo injekční pumpě.

6. Souprava pro přípravu terapeutického přípravku, **vyznačující se tím**, že obsahuje komoru podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, a dále nádobku s 1 až 10% (hmotn.) vodným roztokem CaCl_2 .

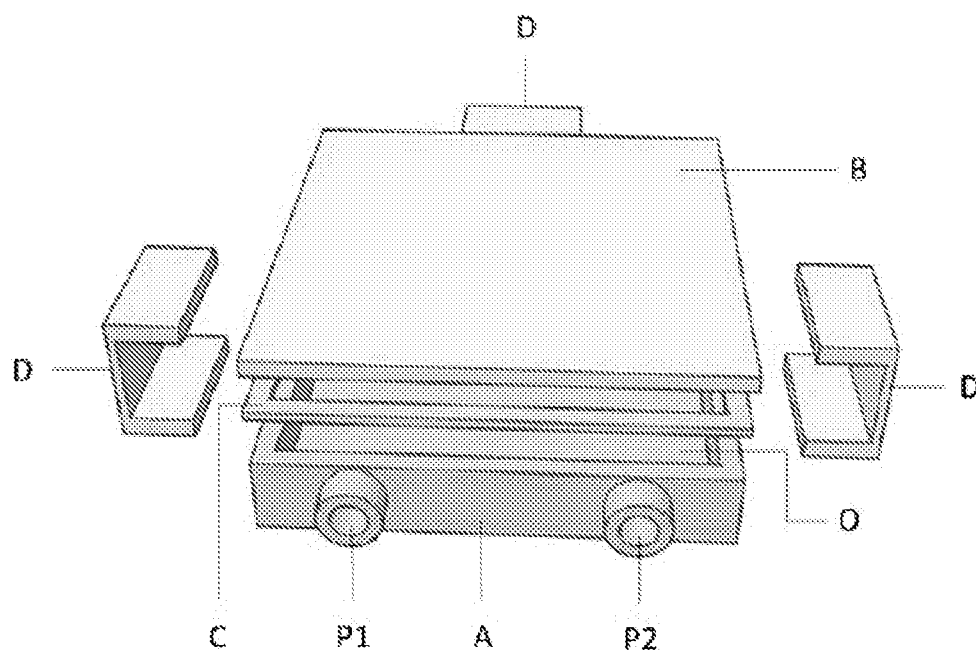
7. Souprava podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje alespoň jednu další součást vybranou z:

- nosiče, s výhodou umístěného v nádobě (A) komory;
- nádobky s destičkovým lyzátem nebo krevní plasmou;
- nádobky s dimethylsulfoxidem;
- nádobky s 0,9% (hmotn.) vodným roztokem NaCl nebo Ringerovým roztokem.

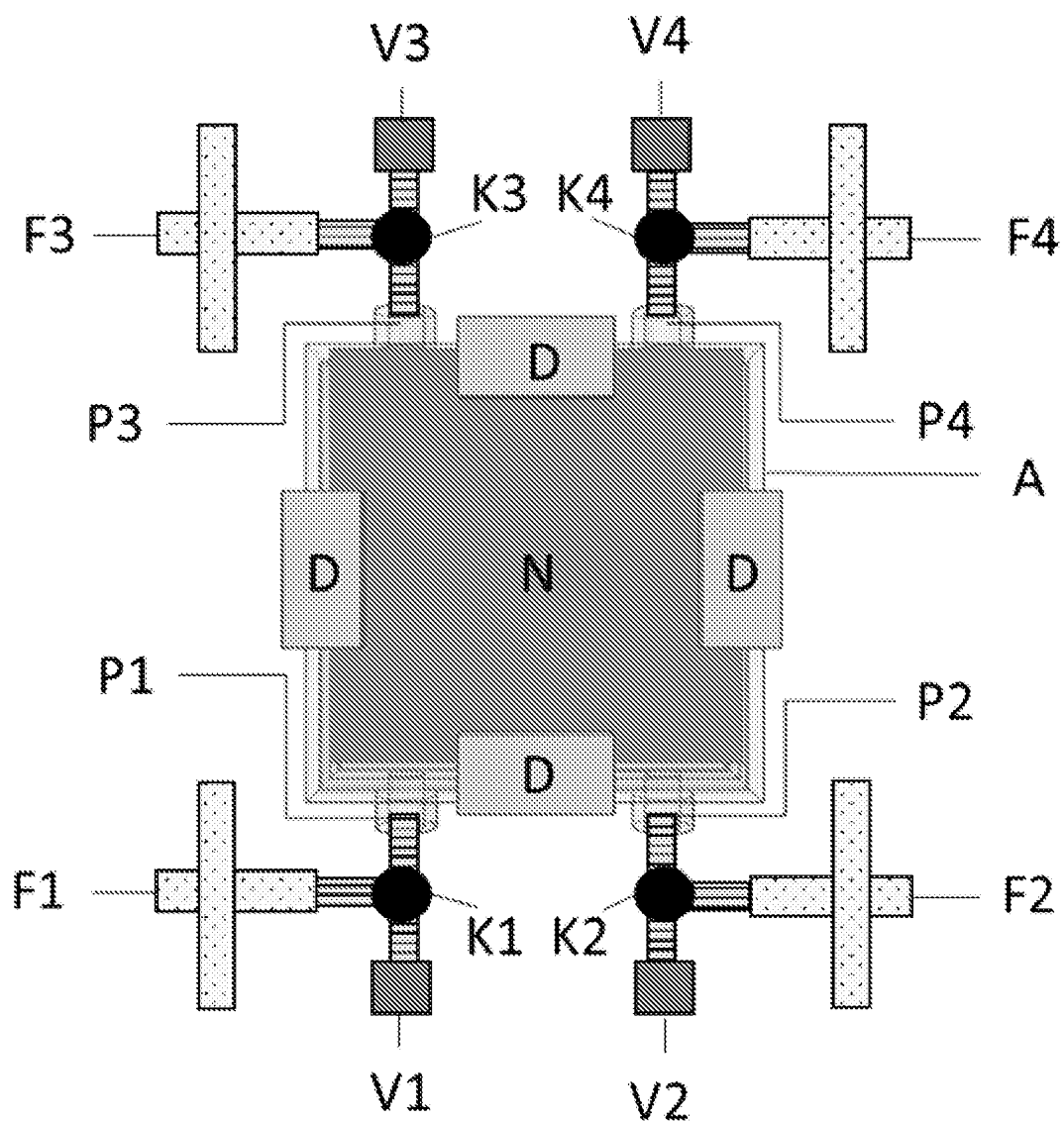
5 výkresů



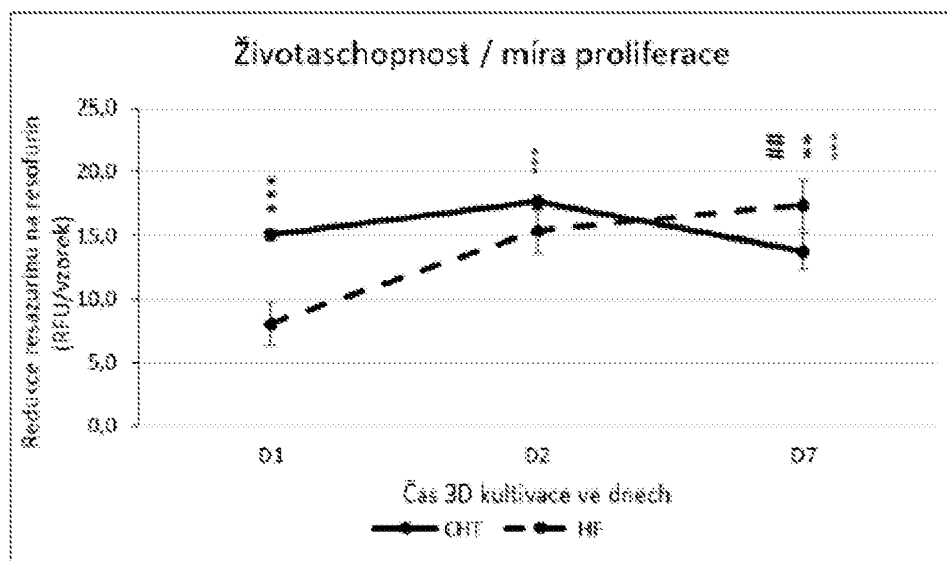
Obr. 1



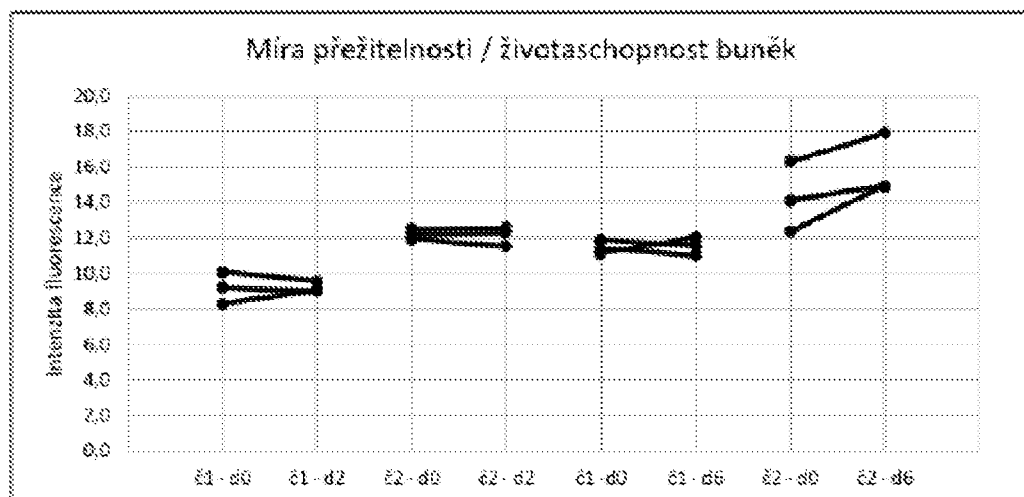
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5