

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

29 538

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C12N 5/0784 (2010.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-32206**

(22) Přihlášeno: **17.03.2016**

(47) Zapsáno: **14.06.2016**

(73) Majitel:
prof. MUDr. Jaroslav Michálek, Ph.D., Brno, CZ

(72) Původce:
prof. MUDr. Jaroslav Michálek, Ph.D., Brno, CZ

(74) Zástupce:
Mgr. Eva Grabarczyková, Pellicova 1, 602 00 Brno

(54) Název užitého vzoru.
**Sada pro přípravu protinádorové vakcíny,
protinádorová vakcína včetně posílení
účinku**

CZ 29538 U1

Sada pro přípravu protinádorové vakcíny, protinádorová vakcína včetně posílení účinku

Oblast techniky

Technické řešení se týká posílení protinádorového efektu protinádorové vakcíny s obsahem dendritických buněk (DB) pomocí imunomodulačních látek a sady pro přípravu této protinádorové vakcíny.

Dosavadní stav techniky

Dendritické buňky (DB) představují buňky imunitního systému, které tvoří spojení mezi nativními a adaptivními mechanismy imunity. Nacházejí se především v kůži, ve sliznicích a v malé míře také v dalších tkáních a krvi. Jejich hlavní funkcí je zpracování a prezentace antigenů (cizorodého materiálu) tak, aby byla cíleně a účinně nastartována imunitní odpověď v případě, že daný antigen je DB rozpoznán jako nebezpečný. DB se vyvíjí z hematopoetických prekursorů v kostní dřeni do myeloidní nebo lymfoidní DB. Za fyziologických okolností se v těle vyskytují především tzv. „nezralé“ DB, udržují stav tolerance imunitního systému, zejména k vlastním proteinům, molekulám a buňkám. Nezralé DB mají velmi dobrou schopnost fagocytózy, která slouží k pohlcování pevných částic, včetně cizorodých antigenů. Pokud je takový antigen rozpoznán jako nebezpečný, dojde k postupnému vyžívání DB a jejímu vycestování z tkáně do lymfatické uzliny. Vyžívání DB spočívá v utlumení fagocytózy nových částic a dochází k expresi molekul HLA (human leukocyte antigen) I. i II. třídy, které jsou nezbytné pro cílenou a specifickou aktivaci T lymfocytů v lymfatické uzlině. T lymfocyty představují výkonnou složku imunitního systému, která na základě informace předané od „zralých“ DB je schopna produkovat potřebné cytokiny (pomocné Th lymfocyty) a cytotoxický potenciál vůči cílovým antigenům (cytotoxické Tc lymfocyty). Pomocné Th lymfocyty můžeme rozdělit na Th1 a Th2. Th1 lymfocyty mají schopnost produkovat spektrum cytokinů (zejména interferon gama), které aktivují Tc lymfocyty a dále tak zvyšují jejich cytotoxický potenciál, který pak lze s výhodou využít v protinádorové imunoterapii. Th2 lymfocyty zodpovídají za stimulaci B lymfocytů a tvorbu protilátek, v protinádorové imunitě se výrazněji neuplatňují. Pro aktivaci Th1 lymfocytů jsou důležité cytokiny ze skupiny interleukinu IL-12, které produkují některé zralé DB. DB1, které produkují IL-12 a polarizují tak imunitní odpověď aktivací Th1 lymfocytů, jsou v současné době považovány za důležité pro protinádorovou imunoterapii.

DB mají tedy centrální úlohu při iniciaci imunitní odpovědi, která je zprostředkována T lymfocyty. DB tak fungují jako profesionální antigen-prezentující buňky, které jsou schopny cíleně prezentovat antigeny (včetně nádorových) a efektivně tak stimulovat imunitní odpověď cílenou proti danému antigenu. Je možné využít tyto buňky k léčbě nádorových onemocnění. Po vakcinaci pacienta DB připravených *in vitro* je možné využít aktivaci vlastního imunitního systému, zejména pomocných a cytotoxických T lymfocytů pacienta *in vivo*. S rostoucími poznatky z oblasti imunobiologie DB se vyvíjejí postupy jejich přípravy pro dosažení optimálních vlastností, za které se v současné době považuje zejména imunofenotyp, produkce cytokinu IL-12 a schopnost stimulovat vlastní i alogenní T lymfocyty.

Prekursor DB jsou standardně získány z periferní krve leukaferézou. Leukaferéza znamená odsátí frakce bílých krvinek z plné krve, přičemž červené krvinky a krevní plazma se vrací zpět do krevního oběhu pacienta. Z těchto bílých krvinek jsou pak následně izolovány monocyty, které mají schopnost přilnavosti k povrchům. Monocyty představují výchozí surovinu - prekursor DB.

V současné době probíhají klinické studie, které ukazují přínos různě připravených DB u některých vybraných nádorových onemocnění (karcinom prostaty, melanom, glioblastom a další). V případě léčby karcinomu prostaty byla prokázána účinnost vakcíny na bázi DB naložené jediným nádorovým antigenem v klinické studii fáze III a tato vakcína pod názvem Sipuleucel-T byla registrována v USA pro léčbu hormonálně refrakterního karcinomu prostaty (Kantoff, et al. N Engl J Med 2010, 363:479-81). Studie se účastnilo 512 pacientů, z toho 341 pacientů dostávalo vakcínu a 171 pacientů dostávalo placebo. Výsledkem studie byl průkaz prodloužení mediánu přežití o 4,1 měsíce (z přibližně 22 na 26 měsíců) s využitím Sipuleucel-T oproti placebo. Jedná

se zatím o jedinou klinickou studii, která přípravek na bázi DB dovedla k jeho registraci americkou FDA. Nevýhodou takového postupu však může být použití pouze jediného nádorového antigenu oproti lyzátu nádorové tkáně, který obsahuje kompletní spektrum nádorových antigenů a protinádorová odpověď tak může být podstatně širší a účinnější. Příkladem takového přístupu je klinická studie využívající vakcinace DB u pacientů s glioblastomem, kdy standardní léčbou lze dosáhnout mediánu přežití 12-14 měsíců, při použití vakcíny na bázi autologních DB naložených autologním lyzátem glioblastomových nádorových buněk v kombinaci se standardní léčbou lze dosáhnout až 24 měsíční medián přežití (Ardon H, et al. J Neurooncol 2010, 99:261 -72). Nevýhodou této studie je fakt, že nádorový lyzát byl získán pouze od samotného pacienta, a tedy pouze pacienti schopní podstoupit neurochirurgický operační zákrok se mohli účastnit této léčby. Pacienti, u kterých nebylo možné provést operační zákrok pro získání nádorového antigenu, tak byli vyloučeni z této léčby. Další nevýhodou bylo použití DB bez prokazatelné produkce IL-12, což mohlo ovlivnit efektivitu vakcinace. Konečně při léčbě metastázujícího melanomu bylo velmi dobrých výsledků dosaženo v klinické studii fáze II pomocí vakcíny na bázi DB, která byla naložena nádorovými antigeny z lyzátu autologní nádorové linie (Dillman RO, et al. Cancer Biother Radiopharmaceut 2009, 24:311-9). Pokud byla vakcinace prováděna pouze nádorovou linií, medián přežití byl 31 měsíců, zatímco při využití vakcíny na bázi DB naložených lyzátem z autologní nádorové linie byl medián přežití signifikantně prodloužen na 64 měsíců s pětiletým přežitím 54 % takto léčených pacientů. Nevýhodou této studie je opět autologní přístup, neboť ne u všech pacientů lze získat a vypěstovat vlastní nádorovou linii pro využití vlastních antigenů, a také podání DB bez prokazatelné produkce IL-12. Vakcína na bázi DB, které produkují dostatečné množství IL-12, byla rovněž popsána (Dohnal A, et al. Cytotherapy. 2007, 9: 755-70). Tato vakcína využívá standardní kultivace nezralých DB pomocí GM-CSF a IL-4 v médiu AIM-V a maturace pomocí LPS a IFN γ . Vakcína však byla užita v kombinaci s autologním nádorovým lyzátem, což značně omezuje její rozšíření a nelze ji využít u pacientů, u kterých není dostupná vlastní nádorová tkáň. Výsledky této studie fáze I u dětských onkologických pacientů ukázaly dobrou snášenlivost a navození imunitní odpovědi u těžce předléčených pacientů.

Účinek protinádorové vakcíny lze posílit využitím imunomodulačních látek, které potlačují efekt tolerogenních T lymfocytů, které tlumí protinádorovou odpověď, a naopak stimulují účinek protinádorových cytotoxických T lymfocytů, které jsou stimulovány DB. Mezi tyto látky patří cyklotosfamid v nízké, tzv. metronomické dávce 50 mg užívané denně po dobu 2-4 týdnů před zahájením DB vakcinace a v průběhu vakcinace po dobu 3-12 měsíců (Ferrandina G, et al. BMC Cancer. 2014, 14: 947, Perroud HA, et al. Future Oncol. 2013, 9: 451-62). Pro posílení nespecifické imunity, včetně NK buněk, lze rovněž kombinovat podání metronomické dávky cyklofosfamidu s podáním betaglukanu 300 mg denně po dobu 14 dní před zahájením vakcinace DB a následně 100 mg denně po dobu vakcinace DB (Harnack U, et al. Anticancer Res. 2011, 31: 1169-72; Masuda Y, et al. J Leukoc Biol. 2015, 98:1015-25; Tian J, et al. Eur J Immunol. 2013, 43:1220-30).

Předkládané technické řešení si klade za cíl poskytnout sadu pro přípravu protinádorové vakcíny a výslednou protinádorovou vakcínu kombinovanou s imunomodulací vedoucí k přednostní aktivaci cytotoxických T lymfocytů, potlačení tolerogenních T lymfocytů a širší využití, tj. vakcínu nezávislou na autologním nádorovém lyzáte.

Podstata technického řešení

Předmětem předkládaného technického řešení je sada pro přípravu protinádorové vakcíny na bázi dendritických buněk z monocytů krve, která obsahuje cytokiny rekombinantní lidský interleukin IL-4 a rekombinantní lidský granulocyty a monocyty kolonie stimulující faktor GM-CSF, lipopolysacharid (LPS) a interferon gama (IFN- γ), médium, a alespoň dva rozdílné nádorové lyzáty ze stejného typu nádoru.

S výhodou je médiem DB médium CellGro, které je vhodné rovněž pro klinické použití. Toto médium je komerčně dostupné a má standardizované složení.

Ve výhodném provedení technického řešení jsou nádorové lyzáty kombinací alespoň jednoho nádorového lyzáte získaného od pacienta a alespoň jednoho nádorového lyzáte z nádorové linie.

V jiném výhodném provedení technického řešení jsou nádorové lyzáty kombinací lyzátů alespoň dvou nádorových linií stejného typu nádoru.

S výhodou je vakcinace DB doplněna podáním 2 imunomodulačních látek cyklofosfamidů a betaglukanu, které posilují protinádorový efekt vakcinace.

- 5 Příprava vakcíny na bázi dendritických buněk s pomocí sady podle předkládaného technického řešení probíhá tak, že se monocyty z krve kultivují za standardních podmínek (v inkubátoru v atmosféře 5 % CO₂ při 37 °C) po dobu 6 dnů v přítomnosti cytokinů rekombinantního lidského interleukinu IL-4 a rekombinantního lidského granulocyty a monocyty kolonie stimulujícího faktoru (GM-CSF) na nezralé dendritické buňky, které se dále kultivují v přítomnosti cytokinů rekombinantního lidského IL-4 a rekombinantního lidského GM-CSF a v přítomnosti alespoň 10 dvou rozdílných nádorových lyzátů ze stejného typu nádoru a s následným přidavkem lipopolysacharidu (LPS) a interferonu γ (IFN-gama) na zralé dendritické buňky. GM-CSF a IL-4 jsou standardně používány pro *in vitro* přípravu DB z monocytů periferní krve. Molekuly LPS a IFN- γ umožní plně vyzrání DB a produkci IL-12. Získání dostatečného množství DB je zabezpečeno 15 leukaferézou, což je standardně používaný postup k izolaci bílých krvinek z periferní krve. Použitím kombinace nádorových antigenů, což nebylo známo ve stavu techniky, je protinádorový efekt takto připravené vakcíny prohlouben. Navíc v situaci, kdy není dostupný autologní nádor, lze využít nádorové linie nebo kombinace více nádorových linií se stejným typem nádoru, jako je nádor pacienta.
- 20 Nádorový lyzát se s výhodou připraví z nádorové tkáně rozmělněním a protlačením přes vhodné sítko (např. 100 μ m). Výhodně je dárce nádorové tkáně podroben testům na přítomnost krví přenosných chorob, jako je HIV, hepatitida a syfilis, v případně pozitivního výsledku testu tkáň není použita.

- 25 Dalším předmětem předkládaného technického řešení je protinádorová vakcína na bázi dendritických buněk, jejíž podstata spočívá v tom, že obsahuje dendritické buňky produkující interleukin 12 (IL-12) a prezentující antigeny alespoň dvou nádorových linií stejného typu nádoru nebo antigeny nádorových buněk získaných od pacienta a alespoň jedné nádorové linie ze stejného typu nádoru.

- 30 Vakcína na bázi dendritických buněk může být využita jako doplňková léčba pro pacienty s glioblastomem, renálním karcinomem, ovariálním karcinomem a melanomem, pokud je naložena příslušným lyzátem nádorové tkáně z jednotlivých typů nádorů a nádorových linií. Je určena jednak k individuálnímu podávání v případech indikovaných příslušným ošetřujícím lékařem nebo k testování v rámci klinických studií v souladu s ES č. 1394/2007, směrnicí 2001/83/ES a se Zákonem o léčivech 378/2007.

- 35 Léčebného efektu se dosáhne zejména u přísně indikovaných pacientů nejlépe v situaci, kdy je standardní léčbou navozena parciální nebo kompletní remise, případně když se jedná o tzv. minimální zbytkovou chorobu, kdy pacientův imunitní systém není oslaben natolik, aby to znemožňovalo jeho aktivaci pomocí vakcíny. Oslabený imunitní systém pacienta lze posílit podáváním imunomodulačních látek cyklofosfamidů a betaglukanu. V těchto situacích lze očekávat maxi- 40 mální efekt vakcíny.

Příklad provedení technického řešení

Příprava nádorového lyzátu:

Reagencie

- DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, 10x PBs), (Lonza. No.: BE17-515F)
- 45 - HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) (Lonza, No.: BE10-547F nebo BE10-527F)
- Injekční voda Aqua pro iniectione ardeaphanna (Ardeapharma, No.: 76/926/95-C), Sterile water for injection Fresenius (Fresenius Kabi, No.: 87/405/97-C) nebo Aqua pro iniectione (B. Braun, No.: 87/02/98-C)

- KLH: Hemocyanin, Keyhole Limpet, *Megathura crenulata*, glycerol (Calbiochem, No.: 374817)

- NaCl 0,9 % Sodium chloride in water for injectione (Fresenius Kabi, No.:76/365/96-C)

5 Nádorová tkáň odebraná od dárce nebo získaná z kultivační misky (pokud se jedná o nádorovou linii) je uložena do zkumavky obsahující NaCl. Zkumavku je třeba uchovávat při 4 °C a zpracovat do 3 dnů od operace nádoru. Před zpracováním vzorku nádoru je potřeba ozářit zkumavku 120 Gy. Dále je vhodné před zpracováním nádoru podrobit dárce (pokud se jedná o nádorovou tkáň pacienta) testům krví přenosných chorob (HIV, hepatitis B, hepatitis C, syfilis), při pozitivě testů není vzorek použit.

10 Nádorová tkáň (pokud se jedná o nádorovou tkáň pacienta) se přenesse do sterilní Petriho misky s 5-10 ml HBSS. S pomocí skalpelu a pinzety se odstraní nekrotická a konektivní tkáň. Skalpelem se nádor nakrájí na částičky o rozměru asi 0,5 mm a následně se rozmělní zadním koncem stříkačky. Získaná suspenze nádorových buněk se opakovaně protlačí injekční stříkačkou s jehlou. Suspenze buněk se pak protlačí přes nylonové sítko (100 µm) do čisté 50 ml zkumavky.
15 Tím se získá suspenze jednotlivých buněk. Petriho miska se zbytky suspenze se opláchne HBSS a opět protlačí přes nylonové sítko. Sítko se poté ještě propláchne zbylým HBSS. Získaná suspenze se centrifuguje při 1600 rpm, 7 min při 4 °C. Supernatant se odsaje pipetou, pelet buněk se resuspenduje v 2 ml injekční vody. Suspenze se rozdělí do mikrozskumavek po cca 1 ml. Mikrozskumavky se suspenzí nádorových buněk se zamrazí v tekutém dusíku (-196°C) dokud
20 nebude na pohled zmrzlá - cca 3 min - a rozmrazí ve vodní lázni (37 °C) dokud nebude na pohled tekutá. Tento proces se opakuje 5x pro docílení lyze nádorových buněk. Suspenze se pak centrifuguje při 1600 rpm, 7 min při 4 °C.

Supernatant ze všech mikrozskumavek se nasaje pomocí jehly do jedné injekční stříkačky tak, aby nebyl nasát pelet buněk a aby supernatant nezůstal v jehle. Supernatant se pomocí stříkačky filtruje přes membránový filtr (0,2 µm) do sterilní 50 ml zkumavky.
25

K nádorovému lyzátu se přidá DPBS (10xPBS) v objemu odpovídajícím 1/10 objemu lyzátu. Koncentrace proteinů se stanovuje spektrofotometricky.

Kultivace monocytů do vakcín:

Reagencie

- 30 • CellGro DC Medium (CellGenix, No.: 2007)
- IL-4: Recombinant Human Interleukin 4 (CellGenix, GMP-grade, No.: 1003-050)
- GM-CSF: Recombinant Human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (CellGenix, GMP-grade. No.: 1012-050)
- 35 • KLH: Hemocyanin, Keyhole Limpet, *Megathura crenulata*, glycerol (Calbiochem, No.: 374817)
- LPS: lipopolysacharid Endotoxin (US Pharmacopeia, No.: 1235503)
- IFN-γ: interferon-γ, Imukin (Boehringer Ingelheim, No: 1-19480)
- Accutase, 100 ml (PAA, No.: L11-007)
- 40 • Kryoprezervační roztok CryoStor CS2/DLite (BioLife Solutions, No.: 650211 - 50 ml; 650212 - 100 ml) nebo CryoStor CS5 (BioLife Solutions, No.: 610202 - 100 ml)
- HBSS, 500 ml (Lonza, No.: BE10-547F nebo BE10-527F).

Monocyty se separují z leukoferézy dárce elutriací (Elutra Cell Separation Systém, Gambro BCT) nebo magnetickou separací (CliniMACS).

45 IL-4 se rozpustí v médiu CellGro na výslednou koncentraci 32 000 U/ml. Rozplní se po 750 µl a 170 µl do mikrozskumavek. GM-CSF se rozpustí v médiu CellGro na výslednou koncentraci 100 000 U/ml. Rozplní se po 750 µl a 170 µl do mikrozskumavek. KLH (dodávaný rozpuštěný

v glycerolu, koncentrace 22,7 mg/ml) - ke 200 µl roztoku KLH v glycerolu se přidá 45,2 ml HBSS. Výsledná koncentrace je 100 µg/ml. Rozplní se po 500 µl do mikrozkušavek. CryoStor CS2/DLite nebo CryoStor CS5 - sterilní stříkačkou s jehlou se odebere 30 ml a rozplní po cca 1,5 ml do 20 mikrozkušavek.

- 5 Do každé kultivační láhve se nasadí cca 167×10^6 monocytů do 70 ml média. Na cca 167×10^6 monocytů (1 kultivační láhev) budeme potřebovat 150 µg nádorového lyzátu. Dále je uveden postup pro kultivaci 500×10^6 monocytů. Suspenze monocytů v kultivačních lahvích se centrifuguje při 1500/10 min/22 °C. Odstraní se supernatant. Pelet se resuspenduje v malém množství média CellGro a doplní médiem CellGro do 35 ml. Přelije se do kultivačních lahví.

- 10 Do kultivačních lahví se přidá zbylé médium (35 ml na láhev) s cytokiny:

Pro 167×10^6 monocytů v 70 ml média (1 kultivační láhev):

IL-4 (32 000 U/ml)	320 U/ml	700 µl
GM-CSF (100 000 U/ml)	1000 U/ml	700 µl

- 15 Promíchá se opatrným obracením láhve ze strany na stranu. Buňky se kultivují v termostatu při 37 °C, 5 % CO₂ po dobu 3 dnů. K buňkám pak bylo přidáno stejné množství média (70 ml) a cytokinů (700 µl IL-4 a 700 µl GM-CSF) jako na začátku kultivace. Buňky se kultivují v termostatu při 37 °C, 5 % CO₂ po dobu dalších 3 dnů.

- 20 Výsledná buněčná suspenze nezralých DB s médiem se přelije z každé kultivační láhve do tří 50 ml zkumavek. Do každé kultivační láhve se doplní 5 ml čerstvého média CellGro bez cytokinů, aby přežily i buňky, které zůstaly adherované na povrchu láhve. Buněčná suspenze ve zkumavkách se centrifuguje při 1500/10 min/22 °C. Odstraní se supernatant. Pelet se resuspenduje v cca 2 ml média CellGro. Přenesou se všechny buňky pocházející z jedné kultivační láhve vždy do jedné 50 ml zkumavky. Každá ze tří zkumavek se doplní médiem CellGro do 10 ml. Jemně se promíchá obracením zkumavky.

- 25 Do každé ze tří 50 ml zkumavek s buňkami se přidá potřebné množství maturačních cytosinů, KLH a nádorového lyzátu získaného z nádoru pacienta a z nádorové linie nebo ze dvou nádorových linií dle následujícího rozpisu:

Pro nezralé DB v 15 ml média (1 kultivační láhev):

IL-4 (32 000 U/ml)	320 U/ml	150 µl
30 GM-CSF (100 000 U/ml)	1000 U/ml	150 µl
KLH (100 µg/ml)	1 µg/ml	150 µl
lyzát nádoru (nebo linie)	10 µg/ml	150 µg
lyzát nádorové linie	10 µg/ml	150 µg

- 35 Buněčná suspenze s médiem a reagensiemi se přenesou zpět do příslušných kultivačních lahví, které se promíchají opatrným obracením láhve ze strany na stranu. Buňky se inkubují v termostatu při 37 °C, 5 % CO₂ 1,5 až 2 hodiny.

LPS (aktivita 10×10^4 U/vial) se rozpustí v 0,5 ml HBSS (přednostně stejný HBSS jako byl použit již dříve pro přípravu nádorového lyzátu daného dárce). Výsledná koncentrace bude 20 000 U/ml.

- 40 K nezralým DB se přidají maturační cytokiny pro DB dle následujícího rozpisu:

Pro nezralé DB v 15 ml média (1 kultivační láhev):

LPs (20 000 U/ml)	200 U/ml	150 µl
IFN-γ (200 000 ng/ml)	50 ng/ml	37,5 µl

Promíchá se opatrným obracením láhve ze strany na stranu. Buňky se inkubují v termostatu při 37 °C, 5 % CO₂ 6 hodin.

Rozplnění a zamražení vakcíny:

- 5 MiniCooler se dá nachladit do lednice. Kultivační láhev s buňkami se promíchá protřepáním tak, aby se adherentní buňky uvolnily od stěn láhve. Objem každé kultivační láhve se přelije do označené 50 ml zkumavky. Každá kultivační láhev se dvakrát vypláchne po cca 10 ml HBSS (přednostně stejný HBSS jako byl použit již dříve pro přípravu nádorového lyzátu daného dárce). Promíchá se protřepáním a přelije se celý objem HBSS do příslušné zkumavky s buňkami. Do každé kultivační láhve se nalije cca 5 ml HBSS a láhev se položí do boxu.
- 10 Buněčná suspenze v každé zkumavce se doplní HBSS do 50 ml a promíchá obracením zkumavky. Zkumavky se centrifugují při 1500/10 min/4 °C. Supernatant se slijí a k peletu buněk se přidá cca 5 ml HBSS. Buňky se resuspendují v HBSS a slijí ze všech zkumavek do jedné 50 ml zkumavky. Doplní se HBSS do 50 ml. Promíchá se obracením zkumavky. Odebere se 10 µl suspenze na stanovení buněčnosti v Burkerově počítací komůrce. Pokud je buněčnost vyšší než 1,4x 10⁶/ml, následující odstavec přeskočíme. Pokud je buněčnost nižší než 1,4x 10⁶/ml, použijeme pro uvolnění buněk z kultivačních lahví akutázu.
- 15

Zamrazíme alikvoty o 5x10⁶ DB. Minimálně je třeba zamrazit 6 alikvotů pro podání pacientovi, po jedné kryozkumavce pro kontrolu kvality, pro imunomonitoring, itest, testy na přítomnost mykoplazmat a tři kryozkumavky pro arbitráž.

- 20 Buňky centrifugujeme při 1500/10 min/4 °C. Kryozkumavky se přemístí do vychlazeného Mini-Cooleru. Z centrifugovaných buněk se slijí supernatant a k sedimentu centrifugovaných buněk se přidá CryoStore (médiu pro zamražení). Do kryozkumavek se napipetuje přípravek.

- 25 Ihned po rozplnění se přemístí všechny kryozkumavky s léčivým přípravkem do ethanolové krabičky a zamrazí se do -80 °C. Co nejdříve po uplynutí minimálně 24 hodin se přemístí všechny kryozkumavky z -80 °C do Dewarovy nádoby s tekutým dusíkem (-196 °C) určené pouze pro potřeby ČP.

V tabulce 1 je uveden příklad tří vyrobených vakcín na bázi DB s příslušnými testovanými parametry. Jednalo se o tři různé dárce. Všechny tři vakcíny splnily kritéria přijatelnosti.

Tabulka 1:

Typ vyšetření		Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	Kritéria přijatelnosti
Sterilita konečného přípravku		sterilní	sterilní	sterilní	sterilní
Test na přítomnost mykoplazmat		negativní	negativní	negativní	negativní
Počet buněk ($\times 10^6$)		3,6	4,8	3,9	$1-5 \times 10^6$
Viabilita (%)		93,8	91,4	87,8	70-100%
Čistota (%)		98,0	98,1	98,2	70-100%
Nečistoty	CD3 (%)	0,7	0,2	1,1	celkem 0-30%
	CD19 (%)	1,3	1,7	0,7	
Fenotyp*	CD80 (%)	98,4	98,1	95,2	60-100%
	CD86 (%)	99,3	99,2	99,0	60-100%
	MHC II (%)	86,2	99,3	74,6	60-100%
	CD83 (%)	97,6	86,5	86,8	60-100%
	CD14 (%)	1,8	26,2	0,3	0-40%
Produkce IL-12 (pg/ml)		9639,3	11874,6	836,63	≥ 100 pg/ml
alloMLR - aktivované T-lymfocyty (%)**	DC:PBMC v poměru 1:5	87,1	81,1	90,6	$\geq 30\%$
	DC:PBMC v poměru 1:10	77,2	75,1	80,6	$\geq 30\%$
	DC:PBMC v poměru 1:20	62,7	68,4	46,2	$\geq 15\%$
Závěr		vyhovuje	vyhovuje	vyhovuje	-

* Z 5 uvedených fenotypových znaků musí alespoň 3 splňovat kritéria přijatelnosti

** Ze 3 uvedených poměrů alloMLR musí alespoň 2 splňovat kritéria přijatelnosti

NÁROKY NA OCHRANU

1. Protinádorová vakcína na bázi dendritických buněk, **vyznačující se tím**, že obsahuje dendritické buňky produkující interleukin IL-12 a prezentující antigeny alespoň dvou nádorových linií stejného typu nádoru nebo antigeny nádorových buněk získaných od pacienta a alespoň jedné nádorové linie ze stejného typu nádoru.
2. Protinádorová vakcína podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje v metronomické dávce cyklofosfamid a betaglukan.
3. Sada pro přípravu protinádorové vakcíny na bázi dendritických buněk z monocytů krve, podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje rekombinantní lidský interleukin IL-4, rekombinantní lidský granulocyty a monocyty kolonie stimulující faktor GM-CSF, lipopolysacharid a interferon gama, médium, a alespoň dva rozdílné nádorové lyzáty ze stejného typu nádoru.
4. Sada pro přípravu protinádorové vakcíny na bázi dendritických buněk z monocytů krve podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že nádorové lyzáty jsou kombinací alespoň jed-

noho nádorového lyzátu získaného od pacienta a alespoň jednoho nádorového lyzátu z nádorové linie.

5. Sada pro přípravu protinádorové vakcíny na bázi dendritických buněk z monocytů krve podle nároku 1, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že nádorové lyzáty jsou kombinací lyzátů alespoň
5 dvou nádorových linií stejného typu nádoru.

Konec dokumentu
