

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 30 270

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

**A01N 1/02** (2006.01)

**C12N 5/077** (2010.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-33101**  
(22) Přihlášeno: **13.05.2016**  
(47) Zapsáno: **17.01.2017**

- (73) Majitel:  
Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i.,  
Praha 4, Krč, CZ
- (72) Původce:  
Yuriy Petrenko, Ph.D., Charkov, UA  
prof. MUDr. Eva Syková, DrSc., Praha 6, CZ  
doc. MUDr. Jitka Čejková, DrSc., Praha 10, CZ  
Ing. Irena Vacková, CSc., Praha 22, CZ  
Tomáš Groh, Ph.D., Ústí nad Labem, CZ
- (74) Zástupce:  
JEHNE, VODÁK a partneři  
advokátní kancelář, JUDr. Robert Jehne, advokát,  
Washingtonova 1567/25, 110 00 Praha 1

- (54) Název užitého vzoru:  
**Prostředek pro uchování, transport a  
aplikaci kmenových buněk**

**CZ 30270 U1**

## Prostředek pro uchování, transport a aplikaci kmenových buněk

### Oblast techniky

Technické řešení se týká prostředku pro uchování, transport a aplikaci kmenových buněk k léčebnému použití, tvořeného pufrovaným vodným roztokem trehalózy, určeného pro uchování kmenových buněk po nezbytnou dobu před jejich aplikací pacientovi při teplotě kolem 4 °C.

### Dosavadní stav techniky

Využití kmenových buněk, zejména mezenchymálních kmenových buněk (MSCs - mesenchymal stem cells), je v současné době na vzestupu díky jejich výrazným imunomodulačním, protizánětlivým a antioxidačním vlastnostem. Kmenové buňky dále produkují nejrozličnější parakrinní faktory prospěšné pro regeneraci postižené tkáně a zároveň jsou schopny se diferencovat do buněk postižené tkáně. Pro tyto vlastnosti jsou využívány v moderní medicíně k léčení různých onemocnění.

Před aplikací MSCs určených k terapeutickým účelům je třeba jejich důkladná charakterizace a testování. Je většinou nutné potvrdit jejich bezpečnost (testy sterility, přítomnost endotoxinů a mykoplazmat) a jejich identitu (povrchové znaky). MSCs je třeba transportovat z místa výroby do místa podání buněk pacientovi. Všechny tyto procedury prodlužují dobu uskladnění buněk po sklizni (po ukončení jejich výroby) a zvyšují nároky na prodlouženou životaschopnost buněk. Jak uvádí Sohn a kolektiv (Cytotherapy, 2013), viabilita MSCs v solném roztoku klesá již po dvouhodinové kultivaci.

Pro uchování buněk se využívá většinou modifikovaných roztoků primárně vyvinutých pro transport orgánů (US 7951590 B2, US 6045990 A, WO 2010064054 AI).

Použití různých roztoků pro dlouhodobé uchování mezenchymálních kmenových buněk je popsáno také v následujících publikacích. Ginis a kolektiv (Tissue Eng Part C Methods, 2012; testovali uchování adherentních mezenchymálních kmenových buněk v roztoku Hypothermosol® FRS při 4 °C. Viabilita takto uchovaných buněk se pohybovala mezi 70-80 % po 2-4 denním skladování. Chen a kolektiv (Cell Transplant, 2013) testovali uchování buněk v roztoku Plasma-lyte obsahujícím lidské sérum a dextrans. Další komerčně dostupné roztoky (HBSS a ViaSpan®) testovali autoři Corwin a kolektiv (Cryobiology, 2014). Viabilita MSCs po 48 hodinovém uložení při 4 °C byla 45 %. Publikace Pogozhykha a kolektivu (PLoS One, 2015) popisuje přibližně 50%, zachování životaschopnosti MSCs po 24 hodinovém uskladnění buněk při 4 °C v kultivačním médiu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) s 10% fetálním bovinním sérem.

Popisované roztoky obsahují celou řadu látek, které by po dobu uchování buněk měly udržovat správné pH, zajišťovat optimální osmolaritu roztoku, chránit buňky před intracelulárním edémem, kontrakci, volnými radikály, apoptózou a dalšími negativními vlivy hypotermie.

Trehalóza, disacharid glukózy, která je syntetizována nižšími organismy v případech, kdy jsou vystaveny stresu, chladu, vysokým teplotám nebo vysušení, je známa jako protistresový faktor.

Je hojně využívána v humánní medicíně, například pro zabránění úbytku vody v buňkách (dehydrataci), při vystavení buněk nadměrnému teplu, chladu nebo kyslíkovým radikálům, proti účinkům hypoxie až anoxie a proti hypoxicko-reoxygenačnímu poškození. Díky svým jedinečným vlastnostem je trehalóza využívána v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu.

Předpokládá se, že trehalóza zabraňuje denaturaci a inaktivaci proteinů a chrání lipidovou dvojvrstvu buněčných membrán proti poškození. Trehalóza pravděpodobně slouží i jako zdroj uhlíku a glukózy pro zajištění buněčných funkcí, dále jako pohlcovač volných radikálů a poskytuje ochranu proti oxidačnímu stresu. Proto je v některých případech využívána v roztocích pro dlouhodobé uchování tkání a buněk v podmínkách hypotermie, při kryoprezervaci a lyofylizaci (mrazovým vysušením).

Patent WO 2014208053 AI popisuje využití různých fyziologických roztoků s přídavkem dextranů a trehalózy vhodných pro transplantaci savčích buněk.

Trehalóza je také součástí roztoků pro uchování a transplantaci orgánů chráněných patenty US 6365338 B1 a US 8512940 B2.

Patentová přihláška US 20150351380 A1 popisuje, mimo jiné, přidání trehalózy do roztoku pro uchování buněk pro regenerativní medicínu.

- 5 Patentová přihláška US 20130260461 A1 popisuje roztok obsahující trehalózu a kmenové buňky, který potlačuje shlukování a zvyšuje životaschopnost těchto buněk.

V článku Di a kolektivu (J Cell Physiol. 2012) je uvedeno, že přítomnost trehalózy v roztoku pro uchovávání mezenchymálních kmenových buněk výrazně zvyšuje jejich viabilitu při skladování při teplotě 4 °C, přičemž nejlepších výsledků bylo dosaženo s koncentrací 40 mM trehalózy.

- 10 Většina těchto roztoků byla původně vyvinuta pro transport orgánů určených k transplantaci a nejsou primárně určeny pro aplikaci pacientovi. Tyto roztoky se většinou skládají z velkého počtu anorganických solí, organických kyselin, sacharidů, polysacharidů, antioxidantů, pufovacích a chelatačních činidel, stabilizátorů nebo antiapoptotických faktorů, které nemusí být ve všech případech schváleny pro lidské použití při intravenózním, intraarteriálním, intramuskulárním, intratekálním, subkutánním, subkunjunktivním, lokálním a jiném podání.

#### Podstata technického řešení

- Výše uvedené nedostatky odstraňuje prostředek pro uchování, transport a aplikaci kmenových buněk k léčebnému použití, tvořený pufovaným vodným roztokem trehalózy. Tento roztok obsahuje jako nezbytné složky kationty  $K^+$  v množství 20 až 50 mmol/l, kationty  $Na^+$  v množství 20 až 80 mmol/l; anionty  $Cl^-$  v množství 0,5 až 40 mmol/l, anionty  $PO_4^{3-}$  a/nebo  $HPO_4^{2-}$ , a/nebo  $H_2PO_4^-$  v celkovém množství 20 až 65 mmol/l, a trehalózu v množství 60 až 300 mmol/l. Koncentrace uvedených složek jsou v rámci uvedeného rozmezí voleny tak, aby hodnota pH roztoku byla 7,1 až 7,6. V nejjednodušším provedení technického řešení nemusí prostředek podle technického řešení obsahovat žádné další záměrně přidávané složky. V každém případě, optimální celková osmolarita roztoku není vyšší než 400 mosmol/l.

- V dalších provedeních technického řešení roztok dále může obsahovat kationty  $Mg^{2+}$  a/nebo  $Ca^{2+}$  v celkovém množství 0 až 2 mmol/l a anionty  $SO_4^{2-}$  a/nebo  $HSO_4^-$  v celkovém množství 0 až 2 mmol/l. Jestliže jsou kationty  $Mg^{2+}$  a/nebo  $Ca^{2+}$  přítomny jako záměrně přidaná složka, jsou v roztoku obsaženy v celkovém množství 0,1 až 2 mmol/l. Jestliže jsou anionty  $SO_4^{2-}$  a/nebo  $HSO_4^-$  přítomny jako záměrně přidaná složka, jsou v roztoku obsaženy v celkovém množství 0,5 až 2 mmol/l.

- Ve výhodném provedení technického řešení roztok obsahuje kationty  $K^+$  v množství 28 až 32 mmol/l, kationty  $Na^+$  v množství 20 až 50 mmol/l, kationty  $Mg^{2+}$  a/nebo  $Ca^{2+}$  v celkovém množství 0,4 až 1,2 mmol/l, anionty  $Cl^-$  v množství 0,5 až 20 mmol/l, anionty  $PO_4^{3-}$  a/nebo  $HPO_4^{2-}$  a/nebo  $H_2PO_4^-$  v celkovém množství 40 až 50 mmol/l, anionty  $SO_4^{2-}$  a/nebo  $HSO_4^-$  v celkovém množství 0,9 až 1,2 mmol/l.

Ve zvláště výhodných provedeních technického řešení roztok obsahuje trehalózu v množství 230 až 270 mmol/l.

- 40 Zvláště výhodné je, když vodný roztok neobsahuje vedle kationtů  $K^+$ , kationtů  $Na^+$ , kationtů  $Mg^{2+}$  a/nebo  $Ca^{2+}$ , aniontů  $Cl^-$ , aniontů  $PO_4^{3-}$  a/nebo  $HPO_4^{2-}$  a/nebo  $H_2PO_4^-$ , aniontů  $SO_4^{2-}$  a/nebo  $HSO_4^-$  a trehalózy žádné další záměrně přidané složky. Samozřejmě nelze vyloučit, že v roztoku jsou stopová množství látek, jejichž přítomnost je podmíněna výrobou nebo jinak náhodná.

- 45 Prodloužení skladovatelnosti kmenových buněk před podáním pacientovi je nutné kvůli možnosti otestovat jejich sterilitu, což je nezbytný krok před každým podáním buněk pacientovi. Prodloužení skladovatelnosti a uchování životaschopnosti buněk je nutné i pro možnost transportu buněk na větší vzdálenosti.

Konkrétněji prostředek podle technického řešení je určen k uskladnění buněk při teplotě -4 °C až 25 °C, s výhodou 0 °C až 8 °C, nejčastěji 4 °C až 6 °C. Dostatečná životaschopnost buněk je přitom zachována po dobu minimálně 72 hodin. Prostředek podle technického řešení se skládá

z farmaceuticky přijatelných sloučenin a může být použit přímo k aplikaci kmenových buněk, které jsou v něm uchovány.

V souladu s tím může být prostředek podle technického řešení použit k prodloužení životaschopnosti kmenových buněk, například při teplotě 0 °C až 8 °C po dobu až 72 hodin.

- 5     Prostředek podle technického řešení je určen zejména pro uchování mezenchymálních kmenových buněk získaných z kostní dřeni, tukové tkáně, periferní krve nebo z extraembryonálních tkání (placenta, pupečník, pupečnicková krev) nebo embryonálních, nervových, indukovaných nebo limbálních kmenových buněk savců včetně člověka. Může sloužit také k uchování kmenových buněk uchycených na biologickém nosiči.
- 10    Prostředek podle technického řešení obsahující příslušné kmenové buňky je určen k léčbě zánětlivých onemocnění včetně posttraumatické zánětlivé reakce po poškození nebo úrazu a také k léčbě degenerativních a neurodegenerativních onemocnění. Prostředek podle technického řešení obsahující příslušné kmenové buňky lze dále využít při léčbě traumat, vývojových vad, hojení ran a popálenin kůže, k náhradě tkání, léčbě nemocí pohybového aparátu (šlachy, klouby, zánětlivá onemocnění - artritida, osteoartritida), kostních defektů, diabetu, mrtvice, kardiologických a onkologických onemocnění.
- 15    Kmenové buňky uchované v prostředku podle technického řešení mohou být aplikovány bez nutnosti odmytí tohoto prostředku přímo pacientovi zejména intravenózně, intraarteriálně, intramuskulárně, subkutánně, subkunjuktiválně nebo intratekálně, a to buď samostatně, nebo s nosičem.

- 20    Nosičem kmenových buněk mohou být funkční biomateriály. Může se jednat o syntetické biokompatibilní polymery (kyselina polylaktidová PLA, kyselina polyglykolová PGA, polyethylen-glykol PEG, polykaprolakton PCL, polyhydroxybutyrát PHB a další), přírodní polymery a polysacharidy (kolagen typu I, hyaluronová kyselina, fibrin, chitosan, celulóza, škrob a další) nebo extracelulární matrice (ECM) ve formě hydrogelu, nanovláken nebo mikrovláken. Nosičem může
- 25    být biodegradabilní i nedegradabilní materiál.

Alternativně se pro aplikace, které počítají s nosičem, mohou kultivace kmenových buněk provádět v přítomnosti těchto nosičů a společně uchovávat a aplikovat v prostředku podle technického řešení.

- 30    Alternativně se mohou kmenové buňky uchovávat v prostředku podle technického řešení a před aplikací pacientovi smíchat s biokompatibilními nosiči a podávat pacientovi společně.

#### Objasnění výkresu

- 35    Na připojených vyobrazeních jsou mikrofotografie diferencovaných mezenchymálních kmenových buněk (BM-MSCs) z kostní dřeni po 72 hodinovém skladování v roztoku podle technického řešení v chladových podmínkách. Obrázky ilustrují schopnost BM-MSCs diferencovat do buněk adipocytů, chondrocytů a osteocytů.

Obrázky ilustrují:

obr. 1A adipogenní,

obr. 1B chondrogenní a

obr. 1C osteogenní diferenciaci.

- 40    Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: izolace a kultivace MSCs z kostní dřeni (BM-MSCs)

- 45    Aspirace kostní dřeni byla provedena trepanobiopickou jehlou, která je součástí odběrového setu obsahujícího fyziologický roztok s heparinem a gentamicinem. Po transportu kostní dřeni do prostor pro sterilní zpracování biologického materiálu byl vzorek smíchán s infuzním roztokem Gelofusinu. Množství přidaného Gelofusinu odpovídalo 25 % objemu kostní dřeni. Směs sedimentovala 10 – 30 minut a poté byla odebrána vrstva prstence mononukleárních buněk. V odebrané vrstvě buněk byla analyzována buněčnost směsi hematologickým analyzátozem. Do každé

z připravených kultivačních lahví o ploše 75 cm<sup>2</sup> bylo přidáno 10 ml kompletního kultivačního média (médiu Alpha MEM Eagle obsahující 5% lidský destičkový lysát a gentamicin) a definované množství suspenze izolovaných buněk (5 – 10 milionu jaderných buněk) pro nasazení primokultury. Kultivace buněk probíhala při teplotě 37 ± 0,5 °C. V průběhu kultivace buněk probíhala průběžná výměna kompletního kultivačního média s případným oplachem buněk pomocí 10 ml pufru PBS na jednu kultivační láhev. Dle množství rostoucích buněk probíhalo jejich pasážování, tedy řízené enzymatické odloučení adherujících buněk a jejich přenesení na větší kultivační plochu. Tento proces vždy začal optickou kontrolou kultury pod mikroskopem; optimální pro růst kultury bylo dosažení 80-90% pokrytí buněk kultivačního dna. Pro pasážování bylo nutné odsátí kultivačního média, oplach kultury 10 ml pufru PBS a přidání 1 ml roztoku enzymu TrypLE Select CTS. Kultivační lahve byly cca 4 minuty inkubovány při 37 ± 0,5 °C. Správný průběh enzymatické reakce byl kontrolován pod mikroskopem. Pokud se buňky pohybovaly s proudící kapalinou po poklepání kultivační lahve, byl do každé lahve přidán 1 ml infuzního roztoku 20% HSA (lidský sérový albumin) a 6 ml pufru PBS. Tato směs byla promíchána jemným nasátím a vysátím z pipety a byla převedena do centrifugační zkumavky a centrifugována (230 g, 5 minut). Peleta buněk byla resuspendována v kompletním kultivačním médiu a suspenze buněk rozdělena na požadované množství kultivačních lahví. Třetím pasážováním buněk bylo dosaženo finální suspenze buněk. Ta byla navíc ještě jednou promyta pufrům PBS a centrifugována (230 g, 5 minut).

Pro vytvoření přípravku podle provedení technického řešení byla peleta získaná výše uvedeným postupem resuspendována v roztoku přípravku uvedeném v příkladu 4A (s 250 mM trehalózou, který je dále označován TR-Y 250), 4B (s 200 mM trehalózou, označován TR Y 200) a v roztoku Hypothermosolu® FRS (označován zde HTS).

Obsah kmenových buněk byl zpravidla 5 x 10<sup>5</sup> až 1 x 10<sup>7</sup> MSCs/ml. Při intravenózní aplikaci se může podávat například 1 x 10<sup>6</sup> MSCs/kg hmotnosti pacienta.

#### Příklad 2: Izolace tukových MSCs (AT-MSCs)

Lipoaspirát o objemu 40-200 ml byl odebrán pomocí standardní tumescenční liposukce od dobrovolných dárců. AT-MSCs byly izolovány z lipoaspirátu 60 minutovou enzymatickou digestí pomocí 0,3 U/ml enzymu Collagenase NB 6 GMP Grade. Digestovaný lipoaspirát byl promyt pufrům PBS a centrifugován při 230 g, 5 minut při pokojové teplotě. Vzniklá peleta na dně zkumavky byla resuspendována v kultivačním médiu a nasazena na kultivační lahve o ploše 75 cm<sup>2</sup>. Dále bylo postupováno podle příkladu 1.

#### Příklad 3: Izolace pupečnickových MSCs (WJ-MSCs)

Lidský pupečník byl získán od zdravých novorozenců ihned po porodu. Pupečnickové arterie a vena byly odstraněny a pupečnicková tkáň (Whartonův gel, WJ) byla nakrájena na malé kousky (cca 1 - 2 mm<sup>3</sup>). MSCs z umbilikální tkáně byly izolovány explantátovou metodou nebo enzymatickou digestí. Při explantátové metodě byly kousky tkáně vsazeny do kultivační lahve, ze které byly po 10 dnech odmyty. Buňky, které vycestovaly z WJ a přisedly na plast, byly dále kultivovány a zpracovány podle příkladu 1. Buněčná suspenze vzniklá po enzymatické digesti byla dále zpracována a kultivována podle příkladu 2.

#### Příklad 4: Možné přípravy 100 ml prostředku (roztoku) podle technického řešení

##### Příklad 4A. Příprava roztoku podle technického řešení s 250 mM trehalózou (TR-Y 250).

Navážíme 0,408 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 0,213 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, rozpustíme v 20 ml destilované vody; navážíme 0,007 g CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O a rozpustíme v 10 ml destilované vody; navážíme 0,012 g MgSO<sub>4</sub> a rozpustíme v 10 ml destilované vody. Takto připravené roztoky smícháme a upravíme pH na hodnotu 7,4. Poté ve směsi rozpustíme 9,45 g trehalózy a konečný objem upravíme destilovanou vodou na 100 ml. Výsledná osmolarita roztoku je 358 mosm.

##### Příklad 4B. Příprava roztoku podle technického řešení s 200 mM trehalózou (TR-Y 200).

Navážíme 0,408 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, a 0,213 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, rozpustíme v 20 ml destilované vody; navážíme 0,007 g CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O a rozpustíme v 10 ml destilované vody; navážíme 0,012 g MgSO<sub>4</sub> a roz-

pustíme v 10 ml destilované vody. Takto připravené roztoky smícháme a upravíme pH na hodnotu 7,4. Poté ve směsi rozpustíme 7,56 g trehalózy a konečný objem upravíme destilovanou vodou na 100 ml. Výsledná osmolarita roztoku je 308 mosm.

Příklad 4C. Příprava roztoku podle technického řešení s 250 mM trehalózou.

- 5 Navážíme 0,816 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 0,426 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , rozpustíme v 20 ml destilované vody; navážíme 0,014 g  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  a rozpustíme v 10 ml destilované vody; navážíme 0,024 g  $\text{MgSO}_4$  a rozpustíme v 10 ml destilované vody. Takto připravené roztoky smícháme a upravíme pH na hodnotu 7,4 a doplníme do 100 ml destilovanou vodou (vznikne směs 1).

Rozpustíme 37,8 g trehalózy v destilované vodě a doplníme do 100 ml (vznikne směs 2).

- 10 Výsledný roztok vznikne smícháním tří dílů směsi 2, šesti dílů směsi 1 a tří dílů destilované vody. Úprava pH není potřeba. Výsledná osmolarita roztoku je 358 mosm.

Příklad 4D. Příprava TR-Y s 200 mM trehalózou.

- 15 Navážíme 0,816 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 0,426 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , rozpustíme v 20 ml destilované vody; navážíme 0,014 g  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  a rozpustíme v 10 ml destilované vody; navážíme 0,024 g  $\text{MgSO}_4$  a rozpustíme v 10 ml destilované vody. Takto připravené roztoky smícháme a upravíme pH na hodnotu 7,4 a doplníme do 100 ml destilovanou vodou (vznikne směs 1).

Rozpustíme 37,8 g trehalózy v destilované vodě a doplníme do 100 ml (vznikne směs 2).

Výsledný roztok vznikne smícháním dvou dílů směsi 2, pěti dílů směsi 1 a tří dílů destilované vody. Úprava pH není potřeba. Výsledná osmolarita roztoku je 308 mosm.

- 20 Příklad 5: Životaschopnost BM-MSCs, AT-MSCs a WJ-MSCs po 48-72 hodinovém skladování

- Byla hodnocena životaschopnost MSCs izolovaných z lidské kostní dřeně, tukové a pupečnickové tkáně uchovaných po dobu 48 a 72 hodin při teplotě okolo 4 °C. MSCs z lidské kostní dřeně, tukové a pupečnickové tkáně byly vyrobeny podle příkladů 1, 2 a 3. MSCs byly sklizeny a resuspendovány v prostředí podle technického řešení podle příkladu 1. Po 48, resp. 72 hodinách byla stanovena životnost buněk na základě tří nezávislých metod.

- 30 Nejprve byla suspenze barvena propidium jodidem a viabilita buněk stanovena metodou průtokové cytometrie. U buněk s narušenou plazmatickou membránou dochází k vazbě barviva, nepoškozené živé buňky zůstávají neobarvené. Následně bylo vysazeno stejné objemové množství buněk odpovídající počtu 100 000 buněk v čerstvém stavu na 24 a 96 jamkovou kultivační desku. Po 24 hodinách byl na buňkách proveden Amalar blue® test (96 jamková destička), který vypovídá o metabolické aktivitě kultivovaných buněk a buňky z 24 jamkové destičky byly sklizeny a spočítány pomocí Bürkerovy komůrky. Výsledky byly porovnány s výsledky získanými v čase 0 (ihned po sklizni; finální pasáži). Jako kontrolní konzervační roztok byl použit roztok Hypo-thermosol® FRS (HTS) podle US 8642255.

- 35 Viabilita stanovená barvením propidium jodidem odráží životaschopnost jednotlivých buněk v suspenzi. Propidium jodid je látka, která neprostupuje membránou živých buněk. U poškozených a neživotaschopných buněk se propidium jodid váže na DNA.

- 40 Životaschopnost BM-MSCs sledovaná barvením propidium jodidem bezprostředně po 48 hodinách skladování dosahovala více než 80 % u všech studovaných roztoků (tabulka č. 1). Po 72 hodinovém skladování klesla asi o 5 % u buněk v roztoku TR-Y 250 a HTS, zatímco v TR-Y 200 byl pokles nejvyšší, na hodnotu  $73,4 \pm 3,1$  %. Aby bylo možné posoudit funkčnost BM-MSCs po skladování buněk, byly buňky kultivovány přes noc v kompletním médiu s cílem jejich adherence na kultivační plochu. Adherence na kultivační plast je jedním ze znaků kmenových buněk. Adherentní buňky byly sklizeny a pomocí Bürkerovy komůrky byl stanoven jejich počet.
- 45 Koeficient adherence byl stanoven jako poměr mezi počtem sklizených a nasazených buněk. Koeficient adheze buněk po 48 hodinách skladování se pohyboval v rozmezí 80-90 % a byl nejvyšší u buněk v roztoku TR-Y 250. Po 72 hodinách skladování bylo pozorováno další snížení, avšak nejnižší hodnoty byly získány u buněk v roztoku HTS ( $66 \pm 4,4$  %). Byla sledována také metabolická aktivita adherentních buněk pomocí Alamar blue® testu. Aktivní složka Alamar

blue® testu je sloučenina resazurin, která proniká do všech buněk. Životaschopné, metabolicky aktivní buňky jsou schopny tuto modrou sloučeninu přeměnit na jasně červené fluorescenční barvivo resofurin. Množství fluorescence nebo absorbance je přímo úměrné počtu živých buněk a koresponduje s metabolickou aktivitou buněk. Pro tento účel byly buňky kultivovány přes noc, aby byla zajištěna jejich adherence, následně byl přidán 10% roztok Alamar blue® v kompletním kultivačním médiu a BM-MSCs byly inkubovány po dobu 4 hodin při teplotě 37 °C. Intenzita fluorescence byla hodnocena na čtečce mikrotitračních destiček při vlnové délce excitace 535 nm a vlnové délce emise 550 nm. Metabolická aktivita adherentních buněk byla prezentována jako poměr mezi intenzitou fluorescence BM-MSCs po 48 nebo 72 hodinách skladování a buněk ze stejné skupiny před uskladněním (po sklizni). Dynamika poklesu metabolické aktivity BH-MSCs skladovaných ve studovaných roztocích byla obdobná jako dynamika, poklesu koeficientu adherence buněk.

Výsledky měření všech parametrů životaschopnosti BM-MSCs shrnuté v tabulce č. 1 ukazují, že nejvhodnějším roztokem pro 48 – 72 hodinové chladové uchování je roztok TR-Y 250. Komerčně dostupný roztok HTS se ukázal jako roztok uchovávající nejnižší viabilitu buněk po 48 hodinovém chladovém skladování BH-MSCs, po 72 hodinovém uchování BM-HSCs v tomto roztoku byl pouze v jednom ze tří sledovaných parametrů lepší než TR-Y 200.

Tabulka 1 - MSCs z kostní dřeně

|          | Viabilita; barvení propidium jodidem; % živých (negativních) buněk |            | Koeficient adherence; % adherujících buněk; vztaheno k času 0 hodin |            | Metabolická aktivita adherujících buněk; barvení pomocí Alamar blue®; vyjádřeno v %; vztaheno k času 0 hodin |            |
|----------|--------------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
|          | 48 hodin                                                           | 72 hodin   | 48 hodin                                                            | 72 hodin   | 48 hodin                                                                                                     | 72 hodin   |
| TR-Y 250 | 88,3 ± 4,3                                                         | 84,2 ± 0,8 | 90,1 ± 5,2                                                          | 83,0 ± 4,5 | 87,4 ± 4,1                                                                                                   | 80,4 ± 2,8 |
| TR-Y 200 | 86,5 ± 3,2                                                         | 73,4 ± 3,1 | 83,2 ± 3,3                                                          | 76,0 ± 3,7 | 87,1 ± 3,8                                                                                                   | 73,0 ± 4,2 |
| HTS      | 85,1 ± 1,6                                                         | 80,9 ± 3,6 | 80,7 ± 2,1                                                          | 66,0 ± 4,4 | 80,8 ± 1,7                                                                                                   | 72,2 ± 2,2 |

(TR-Y 250) přípravek dle technického řešení obsahující 250mM trehalózu;

(TR-Y 200) přípravek dle technického řešení obsahující 200mM trehalózu;

(HTS) roztok Hypothermosolu® FRS.

Životaschopnost AT-MSCs po 48 hodinách skladování hodnocena barvením propidium jodidem dosahovala přibližně 95 % u všech studovaných skupin a po 72 hodinách skladování se snížila o 5-7 % (tabulka č. 2). Nicméně parametry buněčné adheze byly po 48 hodinovém skladování o 15 % nižší v porovnání s metodou barvení propidium jodidem. Pro chladové uchování AT-MSCs se ukázal jako nejméně vhodný roztok TR-Y 200. Rozdíly mezi TR-Y 250 a HTS se při 48 hodinovém chladovém uchování ukázaly jako bezvýznamné, TR-Y 250 byl oproti tomu výrazně lepší u parametrů sledující koeficient adherence a metabolickou aktivitu po 72 hodinách než roztok HTS.

Tabulka 2 - MSCs z tukové tkáně

|          | Viabilita; barvení propidium jodidem; % živých (negativních) buněk |            | Koeficient adherence; % adheřujících buněk; vztaheno k času 0 hodin |            | Metabolická aktivita adheřujících buněk; barvení pomocí Alamar blue®; vyjádřeno v %; vztaheno k času 0 hodin |            |
|----------|--------------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
|          | 48 hodin                                                           | 72 hodin   | 48 hodin                                                            | 72 hodin   | 48 hodin                                                                                                     | 72 hodin   |
| TR-Y 250 | 95,2 ± 5,5                                                         | 90,1 ± 4,1 | 79,6 ± 3,7                                                          | 67,4 ± 3,5 | 80,5 ± 3,8                                                                                                   | 65,3 ± 2,3 |
| TR-Y 200 | 94,5 ± 3,6                                                         | 87,5 ± 4,2 | 77,3 ± 2,1                                                          | 60,8 ± 5,5 | 75,2 ± 1,5                                                                                                   | 50,1 ± 5,3 |
| HTS      | 96,1 ± 3,3                                                         | 90,3 ± 2,7 | 79,3 ± 4,5                                                          | 60,2 ± 5,3 | 78,7 ± 2,5                                                                                                   | 58,6 ± 4,7 |

(TR-Y 250) přípravek dle technického řešení obsahující 250mM trehalózu;

(TR-Y 200) přípravek dle technického řešení obsahující 200mM trehalózu;

(HTS) roztok Hypothermosolu® FRS.

- 5 Kmenové buňky získané z pupečnickové tkáně uchované v roztoku dle technického řešení obsahujícím 250 mM trehalózu po dobu 48 hodin při 4 °C si zachovaly viabilitu (stanovenou barvením propidium jodidem) vyšší než 90 %, naproti tomu WJ-MSCs uchované v roztoku HTS si zachovaly viabilitu jen okolo 80 %. Z výsledků v tabulce č. 3 vyplývá, že hodnoty koeficientu adherence byly v porovnání s metodou barvením propidium jodidem nižší, avšak dynamika trendů mezi jednotlivými roztoky zůstala stejná. Nejvyšší koeficient adherence WJ-MSCs po 72 hodinách skladování byl ve skupině TR-Y 250 ( $73,8 \pm 4,3$  %). Ve všech sledovaných parametrech 10 vykazovaly buňky uchované v TR-Y 250 nejvyšší životaschopnost. U WJ-MSCs uchovaných v komerčním roztoku HTS byla ve všech sledovaných parametrech zjištěna nejnižší životnost.

Tabulka 3 MSCs z pupečnickové tkáně

|          | Viabilita; barvení propidium jodidem; % živých (negativních) buněk |            | Koeficient adherence; % adheřujících buněk; vztaheno k času 0 hodin |            | Metabolická aktivita adheřujících buněk; barvení pomocí Alamar blue®; vyjádřeno v %; vztaheno k času 0 hodin |            |
|----------|--------------------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------------------|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
|          | 48 hodin                                                           | 72 hodin   | 48 hodin                                                            | 72 hodin   | 48 hodin                                                                                                     | 72 hodin   |
| TR-Y 250 | 92,3 ± 3,2                                                         | 85,3 ± 3,1 | 90,3 ± 2,8                                                          | 73,8 ± 4,3 | 90,5 ± 3,3                                                                                                   | 81,0 ± 2,8 |
| TR-Y 200 | 88,7 ± 4,4                                                         | 78,4 ± 2,7 | 78,4 ± 3,2                                                          | 65,3 ± 5,2 | 87,6 ± 4,2                                                                                                   | 75,2 ± 5,1 |
| HTS      | 83,4 ± 3,1                                                         | 76,8 ± 2,1 | 77,2 ± 4,1                                                          | 55,4 ± 5,1 | 79,4 ± 2,5                                                                                                   | 60,6 ± 6,6 |

(TR-Y 250) přípravek dle technického řešení obsahující 250mM trehalózu;

(TR-Y 200) přípravek dle technického řešení obsahující 200mM trehalózu;

(HTS) roztok Hypothermosolu® FRS.

- 15 Z uvedených výsledků vyplývá, že buňky uchované v roztoku TR-Y 250 a TR-Y 200 po dobu 48 - 72 hodin v chladových podmínkách si ve všech sledovaných parametrech zachovávají vysokou životnost.

Příklad 6: Zachování fenotypu BM-MSCs po 72 hodinovém chladovém uchování - analýza povrchových znaků

- 20 Povrchové znaky kmenových buněk jsou jedním ze základních znaků charakterizujících jejich identitu. Pro detekci povrchových znaků bylo použito značení BM-MSCs protilátkami konjugovanými s fluorescenční značkou. Značené BM-MSCs po 72 hodinovém uchování v chladových podmínkách v prostředí obsahujícím 250 mM trehalózu (TR-Y 250) podle technického řešení byly analyzovány na průtokovém cytometru za použití excitačních laserů o vlnové délce 405 nm, 25 488 nm a 633 nm. Byly testovány znaky CD105, CD90, CD73, HLA-DR, CD45, CD34, CD14, CD19. Analýza prokázala pozitivitu znaků (>90 % buněk) CD105, CD90 a CD73, zatímco negativitu znaků (<10 % buněk) HLA-DR, CD45, CD34, CD14 a CD19. Tyto výsledky odpovídají správnému fenotypu kmenových buněk.

Příklad 7: Zachování funkčních vlastností BM-MSCs po 72 hodinovém uchování v chladových podmínkách

U BM-MSCs, které byly skladovány po dobu 72 hodin v prostředí podle technického řešení (roztok TR-Y 250) při cca 4 °C, byla potvrzena jejich schopnost diferencovat do buněk adipocytů, osteocytů a chondrocytů. Buňky byly po 72 hodinovém skladování v roztoku TR-Y 250 v chladových podmínkách vysazeny na kultivační plast a kultivovány s vhodnými diferenciálními médii. Po 21 dnech byly buňky zafixovány a obarveny olejovou červení, alciánovou modří a alizarinovou červení pro důkaz adipogenní, chondrogenní a osteogenní diferenciace. Byly pořízeny mikroskopické fotografie diferenciovaných buněk (obr. 1).

Příklad 8: Životaschopnost WJ-MSCs uchycených na biologickém nosiči po 48-72 hodinovém skladování

WJ-MSCs z lidské pupečníkové tkáně byly vyrobeny podle příkladu 3. Po pasážování buněk podle příkladu 1 byly WJ-MSCs vysazeny na biologický nosič na bázi PCL nanovláknů v hustotě 150 000 buněk/cm<sup>2</sup>. Po dvoudenní kultivaci byl biologický nosič s buňkami vyjmut z kultivační nádoby, opláchnut roztokem PBS a uložen v prostředí podle příkladu 4A při teplotě okolo 4 °C. Množství uchycených buněk na biologickém nosiči bylo stanoveno pomocí fluorescenčního barvení biologického nosiče s uchycenými WJ-MSCs. Byl použit protokol barvení mikrofilament pomocí faloidinu a buněčných jader pomocí DAPI. Mikroskopické vyhodnocení obarvených preparátů prokázalo, že i po 72 hodinovém skladování bylo na nosiči uchyceno dostatečné množství živých buněk, jejichž počet byl o cca 20 % nižší než u nosiče s buňkami obarveného ihned po vyjmutí z kultivačního média. Po 48 hodinovém skladování došlo jen k 15% poklesu počtu živých buněk. Předpokládáme, že mrtvé buňky, které ztrácejí schopnost adheze a mění svůj tvar z protáhlého na kulovitý, byly z materiálu vyplaveny během barvicího procesu.

## NÁROKY NA OCHRANU

1. Prostředek pro uchování, transport a aplikaci kmenových buněk k léčebnému použití, tvořený pufrovaným vodným roztokem trehalózy, **vyznačující se tím**, že roztok obsahuje kationty K<sup>+</sup> v množství 20 až 50 mmol/l, kationty Na<sup>+</sup> v množství 20 až 80 mmol/l; anionty Cl<sup>-</sup> v množství 0,5 až 40 mmol/l, anionty PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> a/nebo HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> a/nebo H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> v celkovém množství 20 až 65 mmol/l, trehalózu v množství 60 až 300 mmol/l, přičemž roztok dále může obsahovat kationty Mg<sup>2+</sup> a/nebo Ca<sup>2+</sup> v celkovém množství 0 až 2 mmol/l a anionty SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> a/nebo HSO<sub>4</sub><sup>-</sup> v celkovém množství 0 až 2 mmol/l, a přičemž pH roztoku je 7,1 až 7,6.

2. Prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že roztok obsahuje kationty Mg<sup>2+</sup> a/nebo Ca<sup>2+</sup> v celkovém množství 0,1 až 2 mmol/l.

3. Prostředek podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že roztok obsahuje anionty SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> a/nebo HSO<sub>4</sub><sup>-</sup> v celkovém množství 0,5 až 2 mmol/l.

4. Prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že roztok obsahuje kationty K<sup>+</sup> v množství 28 až 32 mmol/l, kationty Na<sup>+</sup> v množství 20 až 50 mmol/l, kationty Mg<sup>2+</sup> a/nebo Ca<sup>2+</sup> v celkovém množství 0,4 až 1,2 mmol/l, anionty Cl<sup>-</sup> v množství 0,5 až 20 mmol/l, anionty PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> a/nebo HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> a/nebo H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> v celkovém množství 40 až 50 mmol/l, anionty SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> a/nebo HSO<sub>4</sub><sup>-</sup> v celkovém množství 0,9 až 1,2 mmol/l.

5. Prostředek podle některého z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že roztok sestává výlučně z kationtů K<sup>+</sup>, kationtů Na<sup>+</sup>, kationtů Mg<sup>2+</sup> a/nebo Ca<sup>2+</sup>, aniontů Cl<sup>-</sup>, aniontů PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> a/nebo HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> a/nebo H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, aniontů SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> a/nebo HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, trehalózy, vody a popřípadě stopových množství doprovodných rozpuštěných látek.

6. Prostředek podle některého z nároků 1 až 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že roztok obsahuje trehalózu v množství 230 až 270 mmol/l.

1 výkres

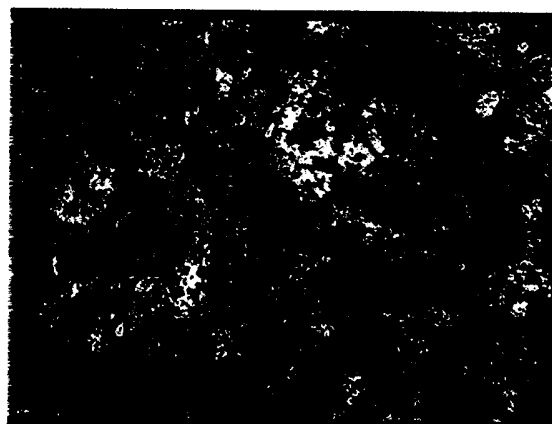
A



B



C



Obr. 1