

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 325

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/28 (2015.01)
A61K 31/7016 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
C07H 3/04 (2006.01)
D04H 1/42 (2012.01)
B82Y 40/00 (2011.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-644**
(22) Přihlášeno: **14.10.2016**
(40) Zveřejněno: **06.06.2018**
(Věstník č. 23/2018)
(47) Uděleno: **25.04.2018**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **06.06.2018**
(Věstník č. 23/2018)

(56) Relevantní dokumenty:
KRULOVÁ M.: „Čeká nás století kmenových buněk?“, Vesmír, vol. 94, no. 2, 2.2.2015; HOLAN V. et al.: „A Comparative Study of the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells and Limbal Epithelial Stem Cells for Ocular Surface Reconstruction“, Stem Cells Translational Medicine, vol. 4, no. 9, 2015, str. 1052 – 1063; GUOHU D. et al.: „Development and Evaluation of a Trehalose-Contained Solution Formula to Preserve hUC-MCSs at 4 °C“, Journal of Cellular Physiology, vol. 227, no. 3, 2012, str. 879 – 884.
EP 2 639 296; CN 104 758 923; WO 2006 026 730.

(73) Majitel patentu:
Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i.,
Praha 4, Krč, CZ

separaci kmenových buněk z biologického materiálu
a kultivaci kmenových buněk v kultivačním médiu.

(72) Původce:
prof. MUDr. Eva Syková, DrSc., Praha 6, CZ
doc. MUDr. Jitka Čejková, DrSc., Praha 10, CZ
Ing. Čestmír Čejka, Ph.D., Praha 2, CZ
MUDr. Serhiy Forostyak, Ph.D., Praha 8, CZ

(74) Zástupce:
AK Jehne, Vodák a partneři, JUDr. Robert Jehne,
advokát, Washingtonova 1567/25, 110 00 Praha 1

(54) Název vynálezu:
**Prostředek obsahující kmenové buňky k
létání posttraumatických zánětlivých reakcí
a způsob jeho výroby**

(57) Anotace:
Prostředek obsahující kmenové buňky k létání zánětlivých onemocnění, konkrétně k létání posttraumatické zánětlivé reakce po poškození nebo úrazu. Použití trehalózy pro výrobu specifických léčiv. Podstata vynálezu spočívá v použití kmenových buněk, zejména mezenchymálních kmenových buněk získaných z kostní dřeně nebo z tukové tkáně nebo limbálních kmenových buněk, upravených trehalózou. Podstatou vynálezu je dále použití trehalózy pro podpůrné létání zánětlivých onemocnění a posttraumatických reakcí při současném létání některého z těchto onemocnění pomocí prostředku obsahujícího mezenchymální kmenové buňky. Trehalóza může sloužit také ve formě roztoku, prášku či tablety k podpůrnému létání zánětlivých onemocnění při létání těchto onemocnění podáváním kmenových buněk. Prostředek se vyrábí způsobem, který zahrnuje

Prostředek obsahující kmenové buňky k léčení posttraumatických zánětlivých reakcí a způsob jeho výroby

5 Oblast techniky

Vynález se týká prostředku, který obsahuje kmenové buňky, k léčení zánětlivých onemocnění, konkrétně k léčení post-traumatické zánětlivé reakce po poškození nebo úrazu. Vynález se týká dále také způsobu výroby prostředku k léčení posttraumatické zánětlivé reakce po poškození nebo úrazu.

Dosavadní stav techniky

15 Kmenové buňky, například mezenchymální kmenové buňky (MSCs mezenchymal stem cells), mají výrazné imunomodulační, protizánětlivé a antioxidační vlastnosti. Pro tyto vlastnosti jsou využívány v moderní medicíně k léčení různých onemocnění, včetně degenerativních.

Pro některá terapeutická využití jsou vhodné také limbální kmenové buňky (LSCs, limbal stem cells), které zajišťují za fyziologických podmínek nepřetržitou obnovu rohovkového epitelu.

Například předmětem ochrany patentem EP 2 120 977 B1 jsou kmenové buňky CD10+, CD34-, CD105+ a CD200+ pro léčení zánětlivých střevních onemocnění.

25 Z čínské patentové přihlášky CN 104 758 923 je znám přípravek pro ošetření poranění nervu přípravkem na bázi mezenchymálních kmenových buněk suspendovaných v roztoku trehalózy.

Z dokumentu WO 2016/069173 je znám způsob přípravy suspenze kmenových buněk, která k potlačení nežádoucího shlukování buněk obsahuje trehalózu.

30 Patent EP 1 727 892 B1 chrání mezenchymální kmenové buňky pro použití k léčení autoimunitní encefalitidy, sklerózy multiplex nebo zánětlivých onemocnění střeva.

Patent EP 2 298 863 B1 chrání mezenchymální kmenové buňky k léčení některých zánětlivých fibróz.

40 Trehalóza, disacharid glukózy, která je syntetizována nižšími organizmy v případech, kdy jsou vystaveny stresu, je známa jako protistresový faktor. Je hojně využívána v humánní medicíně, například pro zabránění úbytku vody v buňkách (dehydrataci), proti vystavení buněk nadměrnému teplu, chladu nebo oxyradikálům, proti hypoxii až anoxii a proti hypoxicko-reoxygenačnímu poškození.

45 Z přihlášky EP 2 848 683 A1 je známo při podávání suspenze kmenových buněk skrze cévní řečiště přidávat do této suspenze trehalózu za účelem prevence pulmonární embolie shlukými kmenovými buňkami.

Z přihlášky WO 2010/021714 A2 je známo, že viabilitu placentálních kmenových buněk během zmrazení a opětovného rozmrazení je možné zvýšit pomocí některých polysacharidů, mj. dextranu v kombinaci s trehalózou.

50 V článku Di Guohu, Wang Jiexi, Liu Minxia, Wu Chu-Tse, Han Ying a Duan Haifeng: Development and evaluation of a trehalose-contained solution formula to preserve HUC-MSCs at 4 °C; J Cell Physiol; 2012 Mar; 227(3):879-84, 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.

Podstata vynálezu

Původci vynálezu zjistili, že při úpravě kmenových buněk přidáním trehalózy dochází k výraznému zlepšení léčebného účinku kmenových buněk při hojení různých poranění, zánětlivých onemocnění a degenerativních onemocnění. Úprava kmenových buněk trehalózou způsobuje nejen, že jsou kmenové buňky životaschopnější, ale také, že produkují více kvalitních protizánětlivých cytokinů potlačujících nadměrný zánět, produkují více antioxidačních enzymů omezujících oxidační stres, produkují více parakrynních faktorů umožňujících hojení poškozených tkání (například omezením apoptózy), a také více napomáhají odbourávání škodlivých proteinů, které často vedou k zániku nervových vláken při degenerativních onemocněních.

Podstata vynálezu tedy spočívá v použití kmenových buněk, zejména mezenchymálních kmenových buněk získaných z kostní dřeně nebo z tukové tkáně nebo limbálních kmenových buněk, upravených trehalózou, k léčení zánětlivých onemocnění včetně posttraumatické zánětlivé reakce po poškození nebo úrazu. Trehalóza je podle vynálezu obsažena ve farmaceutickém roztoku v koncentraci 1 až 15 % hmotn., s výhodou 3 až 10 % hmotn., trehalózy.

Prostředek podle vynálezu, určený k léčení zánětlivých onemocnění, zejména k léčení posttraumatických zánětlivých reakcí po poškození nebo úrazu, obsahuje kmenové buňky vždy v kombinaci s trehalózou. Trehalóza je podle vynálezu obsažena ve farmaceutickém roztoku v koncentraci 1 až 15 % hmotn., s výhodou 3 až 10 % hmotn., trehalózy. Kmenové buňky jsou přítomny ve formě suspenze ve farmaceutickém roztoku s obsahem trehalózy, přičemž alespoň část z obsažených kmenových buněk je zachycena na nosiči z netkané textilie z nanovláken.

Prostředek podle vynálezu se vyrábí způsobem, který zahrnuje separaci kmenových buněk z biologického materiálu a kultivaci kmenových buněk v kultivačním médiu. Kultivace buněk se provádí obvyklým způsobem při teplotě kolem 37 °C. V průběhu kultivace buněk se zpravidla provádí pasážování, tedy enzymatické odloučení buněk, výměna kultivačního roztoku a přenesení buněk na větší kultivační plochu. Kmenové buňky se rozmíchají v roztoku pufru a odstředí se. Podle vynálezu se získané kmenové buňky suspendují v médiu pro uchovávání a transport kmenových buněk, které obsahuje 1 až 15 % hmotn., s výhodou 3 až 10 % hmotn. trehalózy. Kultivace kmenových buněk se alespoň v části doby kultivace v kultivačním médiu s obsahem trehalózy provádí v přítomnosti nosiče z nanovláken.

Léčebné použití trehalózy v kombinaci s kmenovými buňkami vykazuje při léčení zánětlivých onemocnění, zejména posttraumatických reakcí, vyšší účinky, než jaké bylo možno očekávat na základě znalostí účinků obou složek používaných samostatně.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Aspirace kostní dřeně byla provedena trepanobiopstickou jehlou, která je součástí odběrového setu obsahujícího fyziologický roztok s heparinem a gentamicinem. Po transportu kostní dřeně do prostor pro sterilní zpracování biologického materiálu byl vzorek smíchán s infuzním roztokem Gelofusinu. Množství přidaného Gelofusinu odpovídalo 25 % objemu kostní dřeně. Směs sedimentovala 10 až 30 minut a vrstva prstence mononukleárních buněk byla odebrána. V odebrané vrstvě buněk byla analyzována buněčnost směsi hematologickým analyzátozem. Do každé z připravených kultivačních lahví o ploše 75 cm² bylo přidáno 10 ml kompletního kultivačního média (medium Alpha MEM Eagle obsahující 5% lidský destičkový lyzát a gentamicin) a definované množství suspenze izolovaných buněk (10 mil WBC) pro nasazení

- primokultury. Kultivace buněk probíhala při teplotě $37 \pm 2^\circ\text{C}$. 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 adheřujících buněk a jejich přenesení na větší kultivační plochu. Tento proces vždy začal optickou kontrolou kultury pod mikroskopem; optimální pro růst kultury bylo dosažení 80% 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 $37 \pm 2^\circ\text{C}$. 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 jednoho provedení vynálezu byla peleta získaná výše uvedeným postupem resuspendována v roztoku pufru PBS obsahujícím trehalózu.
- Obsah kmenových buněk je zpravidla 5×10^5 až 1×10^7 MSCs/ml. Při intravenózní aplikaci se může podávat například 1×10^6 MSCs/kg hmotnosti pokusného zvířete.

Příklad 2

- Z komerčně dostupného polymeru kyseliny mléčné (PLA, polylaktid) byla připravena nanovlákná ve formě netkané textilie. Z této netkané textilie byly vyříznuty vzorky ve formě čtverců o rozměrech přibližně 15×15 mm, které byly přeneseny na kultivační desky s kulturami mezenchymálních kmenových buněk získaných z kostní dřeně králíka. Inkubace mezenchymálních kmenových buněk v přítomnosti trehalózy ve styku s netkanou textilií z nanovláken byla prováděna po dobu 24 hodin, aby kmenové buňky mohly ulpět na struktuře nanovláken jakožto nosiči. Kultivační roztok pro pokusy podle vynálezu obsahoval 3 % hmotn. trehalózy, pro srovnávací pokusy byla inkubace prováděna bez přítomnosti trehalózy.
- Králičí oči byly poleptány 1N roztokem hydroxidu sodného NaOH aplikovaným pomocí filtračního papírku nasátého hydroxidem, načež byly oči propláchnuty proudem vody. U každého králíka bylo poškozeno pouze pravé oko. Oči zcela zdravých králíků (mimo pokus) sloužily pro srovnání.
- V první skupině byly na poškozené oči přeneseny nosiče z nanovláken s králičími mezenchymálními dřevnými buňkami, podle vynálezu inkubovanými v přítomnosti trehalózy, (buňkami dolů k povrchu poškozeného oka), nosiče byly pomocí čtyř stehů přichyceny ke spojivce, oči zavřeny a víčka sešita k sobě pomocí tří stehů. Po čtyřech dnech víčka rozešita, nosiče z nanovláken odstraněny a oko ponecháno bez dalšího léčení až do 15. dne, kdy byla pokusná zvířata utracena a oči vyšetřeny morfologicky, imunohistochemicky, biochemicky a pachymetricky. Veškeré pokusy na zvířatech byly prováděny tak, aby zvíře netrpělo, za použití celkové anestezie.
- Ve druhé skupině bylo stejně postupováno jako v první, s tím rozdílem, že nanovlákná byla napuštěna fyziologickým roztokem se 3 % hmotn. trehalózy, bez kmenových buněk.

Ve třetí skupině bylo postupováno stejně jako v první, s tím rozdílem, že nanovlákná nesla kmenové buňky bez trehalózy.

Ve čtvrté skupině bylo postupováno stejně, jako v první skupině, ale nanovlákná byla samotná (bez kmenových buněk a bez trehalózy).

V páté skupině byly oči stejně poškozené jako v první skupině, ale neléčeny.

V 15. den pokusu byly oči vyšetřeny pomocí imunohistochemie a biochemie pro-zánětlivých cytokinů. Regenerace epitelu byla hodnocena morfologicky a imunohistochemií epiteliálních buněk. Neovaskularizace byla posuzována prostřednictvím kvantifikace cév v jednotlivých sektorech rohovky. Transparence rohovky byla hodnocena makroskopicky (fotograficky) a pachymetricky, kvantifikací hodnot středových tloušťek rohovek.

Byly zjištěny následující výsledky:

V očích poškozených a neléčených byl rozvinutý zánět, rohovka bez epitelu, transparence ztracena, rohovka vaskularizována. Podobný obraz byl po aplikaci samotného nosiče z nanovláken, pouze rohovka byla částečně reepitelizována.

Po aplikaci nosiče z nanovláken se samotnou trehalózou byla rohovka pokryta nepravidelným epitelem, zánět byl částečně redukován. Neovaskularizace rohovky byla snížena. Stejný obraz byl zjištěn po aplikaci nosiče z nanovláken se samotnými kmenovými buňkami.

Po aplikaci kombinace mezenchymálních kmenových buněk s trehalózou byla rohovka regenerována pravidelným epitelem, transparence rohovky byla obnovena z 90 %, neovaskularizace rohovky byla signifikantně potlačena.

Popsaný experiment prokázal zvýšený léčebný účinek mezenchymálních kmenových buněk kombinovaných s trehalózou.

Pro ověření zvýšeného léčebného účinku kmenových buněk v kombinaci s trehalózou byly, obdobně jako je výše popsáno na příkladu králíčních dřevných buněk, inkubovány v přítomnosti kultivačního roztoku obsahujícího 3 % hmotn. trehalózy lidské mezenchymální kmenové buňky z kostní dřevě, nebo lidské tukové kmenové buňky, nebo lidské limbální kmenové buňky. Také s těmito lidskými kmenovými buňkami se při pokusu na poleptaném králíčním oku rohovka zhojila pomocí kmenových buněk kombinovaných s trehalózou lépe než pomocí samotných kmenových buněk. Výsledky makroskopické, morfologické, imunohistochemické a biochemické byly shodné jako po aplikaci králíčních mezenchymálních buněk.

Příklad 3

Pro ověření zvýšeného účinku mezenchymálních kmenových buněk v kombinaci s trehalózou, obdobně jako je výše popsáno na příkladu králíčních dřevných buněk, byly inkubovány v přítomnosti kultivačního roztoku obsahujícího 3 % hmotn. trehalózy lidské mezenchymální kmenové buňky z kostní dřevě, nebo lidské tukové kmenové buňky, nebo lidské limbální kmenové buňky. Také s těmito lidskými kmenovými buňkami se v pokusu na poleptaném králíčním oku (postupováno jako v příkladu 2) rohovka zhojila pomocí kmenových buněk kombinovaných s trehalózou lépe než pomocí samotných kmenových buněk. Výsledky makroskopické, morfologické, imunohistochemické, biochemické a fyzikální byly shodné jako po aplikaci králíčních mezenchymálních buněk (s trehalózou).

Příklad 4

Zvýšeného léčebného účinku mezenchymálních kmenových buněk (nebo tukových mezenchymálních kmenových buněk, nebo limbálních kmenových buněk), inkubovaných na

nanovlákněném nosiči (bez trehalózy) bylo též dosaženo po nakapání 3% roztoku trehalózy na kmenové buňky na nosiči a po aplikování nosiče na poleptané oko (jako v příkladu 2).

5 Příklad 5

10 Zvýšeného léčebného účinku mezenchymálních kmenových buněk (nebo tukových mezenchymálních kmenových buněk, nebo limbálních kmenových buněk), inkubovaných na nanovlákněném nosiči (bez trehalózy) bylo též dosaženo po naštítí nanovlákněného nosiče s kmenovými buňkami na poleptané oko (jako v příkladu 2) a nakapání 3% roztoku trehalózy na rubovou stranu našitého nosiče (10 kapek po dobu 1 min) před sešitím víček.

15 Příklad 6 (provedení odchylné od vynálezu, bez použití nosiče)

15 U poleptaného oka bylo dosaženo zvýšeného léčebného účinku mezenchymálních kmenových buněk (nebo tukových mezenchymálních kmenových buněk, nebo limbálních kmenových buněk) po přidání 3% roztoku trehalózy a po intravenózní aplikaci králíkovi s poleptaným okem jako v příkladu 2.

20

Příklad 7

25 Zvýšené léčebné účinky mezenchymálních kmenových buněk (dřeňových, nebo tukových), nebo limbálních kmenových buněk po adici 3% roztoku trehalózy ke kmenovým buňkám byly pozorovány také po jejich subkonjunktivální aplikaci do oka s poškozenou rohovkou louhem sodným jako v příkladu 2. Pro urychlení hojení se trehalóza může s výhodou kombinovat s antiflogistiky (steroidními nebo nesteroidními), nebo s antibiotiky, nebo s jinými látkami, např. s antioxidačními enzymy.

30

Příklad 8

35 Ozařování králičích očí UVB paprsky po dobu 5 dnů (denní dávka záření 1.01 J/cm²) způsobila fotokeratitidu, zvýšenou hydrataci rohovky a ztenčení rohovkového epitelu. Transparence rohovky byla ztracena. 15. den po ozařování byly neléčené rohovky ulcerovány, nebo se hojily neprůhlednou jizvou. Rohovky byly vaskularizovány. Jestliže byly na rohovky aplikovány okamžitě po posledním ozáření mezenchymální kmenové buňky (dřeňové nebo tukové) v roztoku obsahujícím 3 % hmotn. trehalózy, rohovky se zhojily s 90% návratem transparency. Vředy se nevytvořily v žádné léčené rohovce. Za použití metodiky obdobné jako v příkladu 2 bylo zjištěno, že aplikace kmenových buněk v kombinaci s trehalózou přinesla lepší výsledky než aplikace samotné trehalózy. Při užití samotné trehalózy nebo samotných kmenových buněk byly některé rohovky ulcerovány a vaskularizovány. Při lokální aplikaci kmenových buněk s trehalózou na ozářené oko byla trehalóza s výhodou kombinována s kyselinou hyaluronovou.

40 Kapáním nebo subkonjunktivální injekcí byla podávána suspenze obsahující 2 x 10⁶ MSCs/0,5 ml v roztoku obsahujícím 3 % hmotn. trehalózy a 0,4 % hmotn. kyseliny hyaluronové. Mikroskopické a biochemické vyšetření prokázalo, že oxidační poškození, způsobené UVB zářením, je signifikantně inhibováno aplikací kmenových buněk s trehalózou. Kmenové buňky měly zvýšený antioxidační účinek.

50

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Prostředek k léčení posttraumatických zánětlivých reakcí po poškození nebo úrazu, **vyznačující se tím**, že obsahuje kmenové buňky na nosiči z netkané textilie z nanovláken a farmaceutický roztok obsahující 1 až 15 % hmotn. trehalózy.
- 10 2. Prostředek podle nároku 1, přičemž kmenové buňky jsou kmenové buňky inkubované v kultivačním roztoku s obsahem trehalózy.
3. Prostředek podle některého z nároků 1 nebo 2, přičemž kmenové buňky zahrnují kmenové buňky inkubované v kultivačním roztoku s obsahem trehalózy na nosiči z netkané textilie z nanovláken.
- 15 4. Prostředek podle některého z předcházejících nároků, určený k léčení poranění epitelových tkání, přičemž kmenové buňky jsou mezenchymální kmenové buňky.
- 20 5. Prostředek podle nároku 4, přičemž farmaceutický roztok obsahuje 3 až 10 % hmotn., trehalózy.
6. Prostředek podle některého z nároků 1 až 3, určený k léčení poranění oční rohovky, přičemž kmenové buňky jsou limbální kmenové buňky.
- 25 7. Prostředek podle nároku 6, přičemž farmaceutický roztok obsahuje 3 až 10 % hmotn., trehalózy.
8. Způsob výroby prostředku podle některého z předcházejících nároků 3 až 7, zahrnující separaci kmenových buněk z biologického materiálu, kultivaci kmenových buněk v kultivačním médiu, jedno nebo více pasážování přibývajících kmenových buněk v průběhu kultivace, odstředění kmenových buněk a suspendování získaných kmenových buněk ve farmaceutickém roztoku, **vyznačující se tím**, že do farmaceutického roztoku se přidá 1 až 15 % hmotn. trehalózy, přičemž kultivace kmenových buněk se provádí v kultivačním médiu s obsahem trehalózy, alespoň v části doby kultivace v přítomnosti nosiče z nanovláken.
- 30 9. Způsob podle nároku 8, přičemž do farmaceutického roztoku se přidá 3 až 10 % hmotn. trehalózy.
- 35
- 40

Konec dokumentu
