

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2018-707  
(22) Přihlášeno: 17.12.2018  
(40) Zveřejněno: 24.06.2020  
(Věstník č. 26/2020)  
(47) Uděleno: 26.05.2021  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 07.07.2021  
(Věstník č. 27/2021)

A61F 2/30 (2006.01)  
A61L 27/38 (2006.01)  
A61L 27/36 (2006.01)  
A61L 27/20 (2006.01)  
A61L 27/58 (2006.01)  
A61L 27/52 (2006.01)  
C12N 5/0775 (2010.01)

(56) Relevantní dokumenty:  
Torreggiani, E., Perut, F., Roncuzzi, L., Zini, N., Baglio, S. R., & Baldini, N. (2014). Exosomes: Novel effectors of human platelet lysate activity. *European Cells and Materials*, 28, 137-151.  
US 20160121 A1; WO 2015159308 A1; WO 2018148669 A2.

(73) Majitel patentu:  
Bioinova, s.r.o., Praha 4, Krč, CZ

(72) Původce:  
MUDr. Peter Bauer, Ph.D., Praha 4, Modřany, CZ  
RNDr. Tomáš Groh, Ph.D., Zdíby, Brnky, CZ  
doc. MUDr. Vojtěch Havlas, Ph.D., Praha 6,  
Vokovice, CZ  
Pavel Neckář, Novosedlice, CZ

(74) Zástupce:  
JUDr. David KARABEC - advokát, JUDr. David  
Karabec, Na stráži 1306/5, 180 00 Praha 8, Libeň

(54) Název vynálezu:  
**Způsob přípravy prostředku pro náhradu  
lidské chrupavkovité tkáně a prostředek  
tímto způsobem připravený**

(57) Anotace:  
Prostředek a způsob přípravy prostředku pro náhradu části lidské chrupavkovité tkáně, při kterém je modifikovaná plazma bohatá na destičky připravena z autologní periferní krve, která je nejprve první centrifugací zbavena červených krvinek, druhou centrifugací obohacena o destičky a ultracentrifugována při tíhovém zrychlení 80 000 až 100 000 g po dobu 2 až 4 hodin, čímž jsou mechanicky rozrušeny destičky, poté je modifikována alespoň dvěma cykly šokového zmrazení při teplotě -180 až -200 °C a rozmrazení; mesenchymální kmenové buňky jsou kultivovány nejméně do třetí pasáže, a následně resuspendovány v modifikované plazmě v koncentraci 50 000 až 500 000 mesenchymálních kmenových buněk na 1 ml modifikované plazmy, tato suspenze je dále smíchána s 10% hmotn. roztokem chloridu vápenatého a nanášena na připravený sterilní biodegradabilní pevný nosič z netkaných polysacharidových vláken a na tomto nosiči je kultivována po dobu 10 až 30 minut při teplotě 20 až 37 °C.

## Způsob přípravy prostředku pro náhradu lidské chrupavkové tkáně a prostředek tímto způsobem připravený

### 5 Oblast techniky

Vynález se týká prostředku pro mechanicky odolnou a biokompatibilní náhradu části chrupavkové lidské tkáně a způsobu jeho přípravy.

10

### Dosavadní stav techniky

Osteoartritida synoviálních kloubů je jedním z nejčastějších problémů produktivní a postproduktivní populace. Regenerace poškozené chrupavky její degenerací či dlouhodobým  
15 mechanickým poškozením je velmi omezená. Klinická léčba od určitého stádia onemocnění nabízí chirurgické řešení. Poškozená chrupavka může být odstraněna a nahrazena pevným fixovatelným materiálem, který přispěje k nitrokloubní hemostáze a k ochraně tkáně v místě defektu. V nejpokročilejších stádiích je provedena kompletní výměna kloubních ploch za umělou kloubní náhradu.

20

Při chirurgické opravě chrupavky je v závislosti na míře poškození a možnosti klinického centra zvolen léčebný způsob. Lze použít autologní štěp chrupavky z okrajové zdravé části kloubu či lze laboratorně připravit autologní diferencované chondrocyty, které jsou transplantovány do místa poškození. Další možností je zakrytí defektu biokompatibilním materiálem, který bude vytvářet  
25 vhodné prostředí pro regeneraci chrupavky. Nelze vyloučit také různé kombinace těchto postupů. Cílem jakékoli léčby osteoartritického kloubu je nezjizvené trvalé obnovení hyalinní chrupavky, která nebude vytvářet zvýšené mechanické tření v místě styku.

Kyselina hyaluronová je přírodně se vyskytující polysacharid v synoviální tekutině. Je zodpovědná za optimální fyzikálně chemické vlastnosti synoviální tekutiny, může ovlivňovat zánětlivé prostředí kloubu. Je možné ji do kloubního pouzdra aplikovat jako tekutý přípravek. Deriváty kyseliny hyaluronové jsou hojně využívané pro zvláknění a tvorbu pevného nosiče pro regenerativní medicínu.

Při chirurgickém zákroku často dochází k frézování postižené chrupavky. Takto vzniklá dutina je vyplňována biodegradabilními materiály. Na trhu je několik pevných výplní, například Chondro-Gide® (obsahuje prasečí kolagen), Chondrotissue® (obsahuje hyaluronan a polyglykolovou kyselinu) či Hyalofast™ (obsahuje benzylester kyseliny hyaluronové). Jejich použití může být kombinováno s transplantací různě diferencovaných buněk či jejich koncentrátů. Fixace takových  
40 materiálů v místě defektu je nejčastěji pomocí stehů či tkáňového lepidla.

Využití autologních kmenových buněk, zejména mesenchymálních kmenových buněk (MSCs – mesenchymal stem cells), je v současné době velmi perspektivní díky jejich unikátním vlastnostem.

45

Izolovaná autologní frakce periferní krve – plazma bohatá na destičky obsahuje unikátní mix základních růstových faktorů a faktorů ovlivňující diferenciaci buněk. V místě poškozené chrupavky je schopná indukovat migraci a proliferaci progenitorových buněk chondrocytů. Postup izolace této frakce popisuje například Jo a kolektiv (Journal of Oral Implantology, 2013) a různé postupy indukce tvorby fibrinové sraženiny (gelovatění) popisuje Huber a kolektiv (Journal of Stem Cells and Regenerative Medicine, 2016). Iniciace tvorby sraženiny je možná pomocí glukonátu vápenatého či chloridu vápenatého. Gelová forma plazmy bohaté na destičky je výhodná především díky svým fyzikálním vlastnostem a také díky pozvolnému uvolňování  
50 růstových faktorů v ní obsažených.

55

Způsob přípravy prostředku pro náhradu části lidské tkáně je popsán v dokumentu WO 2015159308, ve kterém je využita modifikovaná plazma bohatá na destičky, zbavená centrifugací červených krvinek a horní frakce podruhé centrifugací obohacena o destičky, kde jsou mesenchymální kmenové buňky resuspendovány v modifikované plazmě a smíchány s chloridem vápenatým, poté následuje nános na pevný biodegradabilní nosič. Způsoby přípravy prostředku pro náhradu části lidské tkáně popisují také dokumenty US 20160121 nebo WO 2018148669, avšak u těchto dokumentů neprobíhá druhá centrifugace ani míchání s chloridem vápenatým a pevný nosič není biodegradabilní. Žádný z těchto dokumentů nepopisuje efektivní mechanické rozrušení destiček ani šokové mražení, výsledné přípravky nejsou dostatečně plastické a nedokážou perfektně kopírovat defekty postižených tkání, obsahují nedostatečné množství růstových faktorů.

### Podstata vynálezu

Fyzikální a chemické nedostatky prostředků známých ze stavu techniky odstraňuje způsob přípravy prostředku pro náhradu části lidské chrupavkovité tkáně dle vynálezu, při kterém

- je modifikovaná plazma bohatá na destičky připravena z autologní periferní krve, která je nejprve po odběru z lidského těla do odběrového setu s antikoagulantem první centrifugací zbavena červených krvinek, odebraná horní lehčí plazmatická frakce je druhou centrifugací obohacena o destičky a potom zbavena nově vzniklé horní lehčí frakce, následně je dolní těžší frakce z druhé centrifugace ultracentrifugována při tíhovém zrychlení 80 000 až 100 000 g po dobu 2 až 4 hodin a poté je modifikována alespoň dvěma cykly šokového zmražení při teplotě -180 až -200 °C a rozmražení; teplotní rozsah je klíčový pro šokové mražení a tím zkrácení doby, kdy může připravovaný materiál vlivem nevhodných teplot degradovat,
- z lidského těla izolované mesenchymální kmenové buňky jsou kultivovány nejméně do třetí pasáže, a následně
- resuspendovány v modifikované plazmě v koncentraci 50 000 až 500 000 mesenchymálních kmenových buněk na 1 ml modifikované plazmy bohaté na destičky,
- tato suspenze je dále smíchána s 10% hmotn. roztokem chloridu vápenatého v hmotnostním poměru 80:20 až 99:1,
- výsledná směs je neprodleně nanесena na připravený sterilní biodegradabilní pevný nosič z netkaných polysacharidových vláken, k němuž je ukotvena pomocí autologních fibrinových polymerů,
- a na tomto nosiči je kultivována po dobu 10 až 30 minut při teplotě 20 až 37 °C.

Mesenchymální kmenové buňky je možné získat z kostní dřeně, tukové tkáně, periferní krve nebo z extraembryonálních tkání, například placenty, pupečnicku nebo pupečnickové krve, nebo embryonálních, nervových, indukovaných nebo limbálních kmenových lidských buněk. Kultivaci mesenchymálních kmenových buněk nejméně do třetí pasáže je prováděna za účelem získání frakce buněk složené z morfologicky totožných buněk.

Pacient má dvě hodiny před odběrem autologní periferní krve pro přípravu plazmy bohaté na destičky dostatečný přísun tekutin, například také ve formě infuze fyziologického roztoku. Periferní krev je odebrána od pacientům, kteří za poslední tři měsíce nedostali z jakéhokoli důvodu transfuzi krevních derivátů. Při samotném odběru je s výhodou použit jako antikoagulant roztok dextrosy, citrátu sodného a kyseliny citrónové, tzv. roztok ACD. Výhodou je především jeho snadná dostupnost. Způsob přípravy plazmy bohaté na mechanicky rozrušené destičky, které

jsou rozrušené především díky ultracentrifugaci, a zahrnující několik cyklů šokového mražení podmiňuje vznik jedinečného složení podporujícího fyzikálně chemické vlastnosti prostředí, který je vhodný pro mechanicky odolnou plně biokompatibilní náhradu části chrupavkovité tkáně. Přípravek je díky tomu plastický, perfektně dokáže kopírovat defekt a odolává průplachům postiženého místa v průběhu operace či při revizi defektu. Při kroku ultracentrifugace dochází k částečnému mechanickému poškození izolovaných destiček a obohacení roztoku o důležité fragmenty růstových faktorů. Materiál stěn použitých ultracentrifugačních zkumavek je takový, aby nevázal proteiny.

Koncentrace 50 000 až 500 000 mesenchymálních kmenových buněk na 1 ml modifikované plazmy bohaté na destičky je kritická pro požadované vlastnosti výsledného přípravku. Pokud je tato koncentrace překročena, dochází v prostředí dle vynálezu k hromadění metabolitů buněk a zároveň k lokálnímu nedostatku živin. To vede během několika hodin k programované buněčné smrti takových buněk, případně k jejich nekróze, což následně vede ke změně fyzikálně chemických poměrů uvnitř ošetřeného defektu. Nižší koncentrace naopak není vhodná, protože nedostatečné množství buněk způsobuje jejich suboptimální proliferaci a diferenciaci.

Polymerace fibrinu je iniciována přidáním chloridu vápenatého. Z chemického hlediska je výhodné, pokud nosič obsahuje velké množství polysacharidových derivátů například kyseliny hyaluronové a nosič je biodegradabilní v horizontu několika dní až měsíců. Z fyzikálního hlediska je výhodné, pokud je nosič nasákový, ohebný a lehce upravitelný chirurgickými nůžkami na požadovanou velikost chondrálního defektu.

Uvedená doba kultivace výsledné směsi na nosiči je dostatečná, aby bezpečně proběhla polymerace fibrinu a suspenze buněk v plazmě bohaté na destičky výrazně změnila konzistenci na gelovitou strukturu. Gelovitá struktura je ideální pro fixaci mesenchymálních kmenových buněk na nosič a zároveň vytváří ideální biokompatibilní prostředí v defektu.

Výhodou vynálezu následně určeného k aplikaci do lidské tkáně je způsob fixace buněk, který umožňuje intenzivní promývání rány v průběhu operace, bez rizika vyplavení aplikovaných kmenových buněk. Prostředek připravený popsáním způsobem umožňuje ideální kopírování tvaru defektu a po čase je plně resorbován. Způsob fixace také umožňuje zkrátit dobu před první rehabilitací.

Mesenchymální kmenové buňky s výhodou pochází z kostní dřeně. Odběr kostní dřeně je poměrně standardní lékařský zákrok s nízkým rizikem. Výtěžnost kmenových buněk z kostní dřeně je vysoká.

Jako antikoaguant je s výhodou použit roztok dextrosy, citrátu sodného a kyseliny citrónové, tzv. roztok ACD.

Ve výhodném provedení je první centrifugace provedena při tíhovém zrychlení 100 až 300 g po dobu 5 až 15 minut, nejvýhodněji však při tíhovém zrychlení 130 až 160 g po dobu 9 až 12 minut. Tyto parametry zajišťují optimální výtěžnost. Delší a silnější centrifugace může vést ke spontánní degradaci produktu, naopak kratší a slabší centrifugace jsou nedostatečné pro získání požadované meziprojektu.

Ve výhodném provedení je druhá centrifugace provedena při tíhovém zrychlení 500 až 1000 g po dobu 12 až 20 minut, nejvýhodněji však při tíhovém zrychlení 700 až 800 g po dobu 14 až 17 minut. Delší a silnější centrifugace není efektivní a šetrná k meziprojektu, naopak kratší a slabší centrifugace je nedostatečná pro získání požadované meziprojektu.

Ve výhodném provedení je ultracentrifugace provedena při tíhovém zrychlení 90 000 až 100 000 g. V tomto rozsahu dochází k lepšímu mechanickému rozrušení destiček.

55

Ve výhodném provedení je suspenze mezenchymálních buněk a plazmy smíchána s komerčně dostupným 10% hmotn. vodným roztokem chloridu vápenatého v poměru hmotnostních dílů 90:10 až 99:1, ve zvláště výhodném provedení pak v poměru hmotnostních dílů 95:5 až 99:1. Méně hmotnostních dílů chloridu vápenatého je nedostatečné pro finalizaci produktu, tedy tvorbu gelovité struktury produktu. Naopak vyšší podíl chloridu vápenatého snižuje životaschopnost kmenových buněk.

S výhodou je směs na biodegradabilním nosiči kultivována 12 až 20 minut při 22 až 30 °C. Časový interval a teplota jsou optimální s ohledem na dílčí finální vlastnosti produktu – tedy pevnost produktu a životaschopnost buněk. Nižší teplota, zejména pod 20 °C zpomaluje či dokonce znemožňuje polymeraci fibrinu. Vyšší teplota, zejména nad 37 °C může mít negativní vliv na použité buňky.

Prostředek je s výhodou skladován v lednici při 2 až 8 °C či v kultivačním médiu při 37 °C, tedy teplotě blízké lidskému tělu.

Dalším předmětem vynálezu je prostředek pro náhradu části lidské chrupavkovité tkáně, který obsahuje směs ukotvenou autologními fibrinovými polymery na sterilní biodegradabilní polysacharidový pevný nosič z netkaných vláken, kde uvedená směs zahrnuje suspenzi o koncentraci 50 000 až 500 000 mesenchymálních kmenových buněk na 1 ml autologní modifikované plazmy bohaté na mechanicky rozrušené destičky předem upravené ultracentrifugací a mražením, a dále tato směs obsahuje v hmotnostním poměru 80:20 až 99:1 k této suspenzi přidaný 10% hmotn. roztok chloridu vápenatého. Autologní modifikovaná plazma je bohatá na mechanicky rozrušení destičky, tj. obsahuje mechanicky rozrušené destičky předem upravené ultracentrifugací a alespoň dvěma cykly šokového zmražení při teplotě -180 až 200 °C a rozmražení.

Použití pevného nosiče umožňuje vytvarovat přípravek do požadovaného tvaru. Pevným nosičem kmenových buněk jsou biomateriály, například biokompatibilní syntetické polymery jako je kyselina polylaktidová PLA, kyselina polyglykolová PGA, polyethylenglykol PEG a další, přírodní polymery a polysacharidy jako například kolagen typu I, hyaluronová kyselina, fibrin, celulóza, škrob a další nebo extracelulární matrice – ECM ve formě nanovláken nebo mikrovláken.

Prostředek pro mechanicky odolnou plně biokompatibilní náhradu části lidské chrupavkovité tkáně může být dle potřeby složen v zásadě z čistě z tělu vlastních komponent, odpadá tedy možnost nežádoucí imunologické reakce.

#### Objasnění výkresů

Podstata vynálezu je dále objasněna na příkladech jeho uskutečnění, které jsou popsány s využitím připojeného výkresu, kde na:

obr. 1 je znázorněna mikrofotografie obarvených živých mesenchymálních kmenových buněk fixovaných na biodegradabilním nosiči,

obr. 2 je znázorněna optimální distribuce buněk v nosiči.

#### Příklady uskutečnění vynálezu

V prvním příkladném provedení byla plazma obohacená o destičky připravena tak, že nejprve byla autologní periferní krev odebrána do injekční stříkačky obsahující jako antikoagulant roztok ACD. Takto odebraná periferní krev byla centrifugována první centrifugací při 150 g po dobu 9

minut. Pro další zpracování byla odebrána horní – lehčí průhledná nažloutlá plazmatická frakce, která byla dále centrifugována druhou centrifugací při 750 g po dobu 16 minut. Po druhé centrifugaci byla dále zpracována dolní třetina roztoku včetně pelety destiček, tak, že tato těžší frakce byla dále ultracentrifugována při tíhovém zrychlení 100 000 g po dobu 180 minut.

5 Následná frakce byla dvakrát šokově zmrazena na  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  a rozmrazena. Takto připravená modifikovaná plazma bohatá na mechanicky rozrušené destičky byla následně použita pro resuspendování buněk.

V dalších příkladných provedeních byly změněny parametry přípravy dle tab. 1.

10 Tabulka 1

Příkladné provedení	1. centrifugace		2. centrifugace		ultracentrifugace		šokové mražení	
	g [tíhové zrychlení]	t [min]	g [tíhové zrychlení]	t [min]	g [tíhové zrychlení]	t [min]	Počet cyklů	T [ $^{\circ}\text{C}$ ]
2	100	15	500	20	80 000	240	2	-196
3	300	5	1000	12	85 000	200	2	-200
4	130	12	700	17	90 000	180	2	-180
5	160	9	800	14	100 000	120	2	-180

V prvním příkladném provedení byla provedena izolace a kultivace mesenchymálních kmenových buněk MSCs z kostní dřevě – BM MSCs. Aspirace kostní dřevě byla provedena trepanobiopickou jehlou, která je součástí odběrového setu obsahujícího fyziologický roztok s heparinem. Po transportu kostní dřevě do prostor pro sterilní zpracování biologického materiálu byl vzorek smíchán s infuzním roztokem Gelofusinu, což je roztok obsahující ionty  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  a sukcinylovanou želatinu. Množství přidaného Gelofusinu odpovídalo 25 % objemu kostní dřevě.

15 Směs sedimentovala 10 minut a poté z ní byla odebrána vrstva prstence mononukleárních buněk. V odebrané vrstvě buněk byla analyzována buněčnost směsi hematologickým analyzátozem. Do každé z připravených kultivačních lahví o ploše  $75\text{ cm}^2$  bylo přidáno 10 ml kompletního kultivačního média Alpha MEM Eagle obsahující 5% hmotn. lidský destičkový lyzát a definované množství suspenze izolovaných buněk - 5 milionů jaderných buněk pro nasazení primokultury. Kultivace buněk probíhala při teplotě  $37 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . 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;

20 optimální pro růst kultury bylo dosažení 80 až 90 plošných % 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  $37 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Správný průběh enzymatické reakce byl kontrolován pod mikroskopem. Pokud se buňky pohybovaly s proudící kapalinou po poklepání kultivační lahve, byl do každé lahve přidán

25 1 ml infuzního roztoku 20% hmotn. 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 při 230 g po dobu 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 při 230 g po dobu 5 minut. Tímto byla vytvořena peleta kultivovaných mesenchymálních buněk. V jiném příkladném provedení směs sedimentovala 30 minut, definované množství suspenze izolovaných buněk bylo 10 milionů jaderných buněk pro nasazení primokultury a kultivace byla provedena do čtvrté pasáže. V dalších příkladných provedeních byly mesenchymální kmenové buňky získány z tukové tkáně, periferní krve, placenty, pupečnicku, pupečnickové krve, embryonálních, nervových, indukovaných nebo limbálních kmenových buněk člověka.

30  
35  
40  
45

Pro vytvoření přípravku podle provedení vynálezu byla peleta získaná výše uvedeným postupem resuspendována v roztoku modifikované plazmy bohaté na mechanicky rozrušené destičky. Obsah kmenových buněk byl 50 000 mesenchymálních kmenových buněk na 1 ml modifikované plazmy bohaté na mechanicky rozrušené destičky. V jiném příkladném provedení byla koncentrace 500 000 mesenchymálních kmenových buněk na 1 ml modifikované plazmy bohaté na mechanicky rozrušené destičky.

V prvním příkladném provedení byla připravená suspenze mesenchymálních kmenových buněk dále smíchána s 10% hmotn. roztokem chloridu vápenatého v poměru hmotnostních dílů 97,5 : 2,5 a ihned nanášena na nosič z netkaných vláken kyseliny hyaluronové HA a kyseliny polyglykolové PGA. Tato směs byla poté kultivována při pokojové teplotě po dobu 15 minut, kdy proběhla fixace buněk na nosič. Takto připravený nosič je možné přímo aplikovat na daný defekt. Další příkladná provedení se změněnými parametry uvádí tabulka 2.

Tabulka 2

Příkladné provedení	Konc. CaCl <sub>2</sub> [hmotn. %]	Hmotn. poměr suspenze: CaCl <sub>2</sub> 10% hmotn.	Doba kultivace t[min]	Teplota kultivace T[°C]
2	10	80 : 20	10	20 °C
3	10	99 : 1	30	21 °C
4	10	95 : 5	20	30 °C
5	10	90 : 10	10	22 °C

V dalších příkladných provedeních byl jako nosič kmenových buněk použit vždy některý z následujícího výčtu: kyselina polylaktidová PLA, kyselina polyglykolová PGA, polyethylenglykol PEG, kolagen typu I, hyaluronová kyselina, fibrin, celulóza, škrob nebo extracelulární matrice - ECM ve formě nanovláken nebo mikrovláken, a jejich kombinace.

Pro stanovení metabolické aktivity buněk fixovaných na nosič byla suspenze buněk fixovaných na vláknitý nosič kultivována při 37 °C v kompletním kultivačním médiu Alpha MEM Eagle obsahujícím 5% hmotn. lidský destičkový lyzát po dobu pěti dní. Následně byl nosič přenesen do malé Petriho misky včetně 500 µl kompletního média. Bylo přidáno 250 µl roztoku MTT, což je 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid; 2mg/ml zásobní roztok v PBS, a směs kultivována dvě hodiny při 37 °C. Žluté MTT se mitochondriálními enzymy dýchacího řetězce živých buněk redukuje na fialový formazanový derivát, který zůstává uvnitř buněk ve formě nerozpustných granulí. Vyhodnocení proběhlo makroskopicky, tedy kontrolou zabarvení nosiče, ten byl po ukončení detekce kompletně tmavě fialový. Proběhla také mikroskopická analýza vzorku, kdy bylo možné sledovat jednotlivé buňky v blízkosti vláken nosiče, viz obr. 1. Buňky fixované na nosič jsou tedy dlouhodobě životaschopné a zároveň ve formě mechanicky odolné biokompatibilní matrice vhodné pro náhradu.

Pro důkaz optimální distribuce mesenchymálních kmenových buněk v přípravku byla provedena následující metodika. K připravené suspenzi byla přidána červená fluorescenční barva PKH26, v tomto příkladném provedení PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits, která barví membrány buněk. Nadbytek barvy byl odmyt a poté byly buňky smíchány s roztokem modifikované plazmy bohaté na mechanicky rozrušené destičky. K 1,4 ml obarvených buněk o koncentraci 5 10<sup>6</sup> buněk/ml bylo přidáno 36 µl roztoku Calcium chloratum Biotika, tj. 10% roztok chloridu vápenatého. Po smíchání bylo vše převedeno na Chondrotissue<sup>®</sup>, kde celá směs zatuhla. Poté byly buňky fixovány 4% paraformaldehydem a pořízeny řezy na mikrotomu, tj. 10µm řezy, každý šestý byl dokumentován – přenesen na sklíčko, zakápnut montovacím médiem a nafocen pomocí fluorescenčního mikroskopu Leica, při zvětšení 25x. Na obr. 2 lze pozorovat optimální distribuci buněk v nosiči. Řez je v hloubce 900 mikronů, což dokazuje homogenost celého přípravku.

V prvním příkladném provedení byl přípravek skladován v lednici při teplotě 4 °C. V jiném

příkladném provedení byl přípravek skladován v kultivačním médiu při 37 °C.

#### Průmyslová využitelnost

5

Prostředek připravený dle vynálezu pro mechanicky odolnou plně biokompatibilní náhradu poškozené části lidské chrupavkovité tkáně je určen k aplikaci na místo chondrálního defektu. Je možné jej využít v rámci buněčné cílené terapie při ortopedických operacích nejen velkých kloubů, při zánětlivých kloubních onemocnění včetně posttraumatické zánětlivé reakce po

10

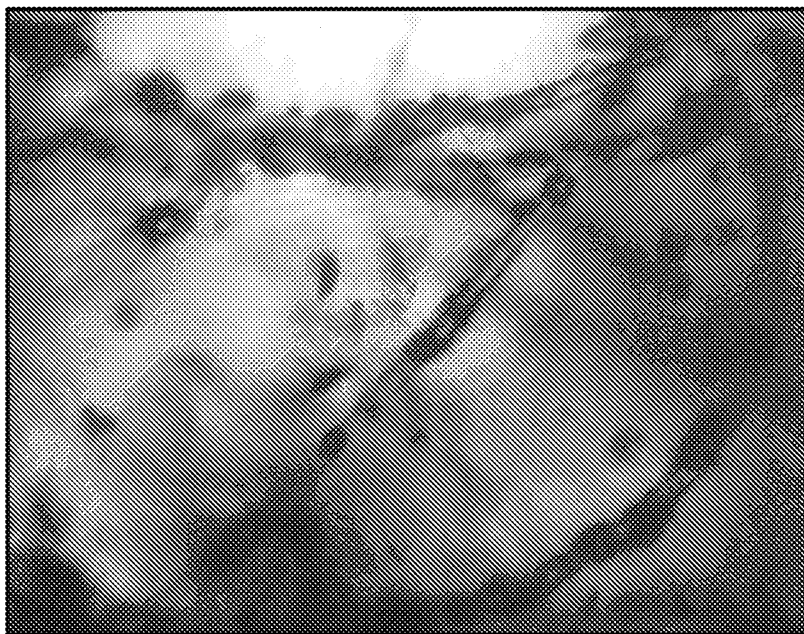
poškození nebo úrazu a také k léčbě degenerativních onemocnění. Prostředek podle vynálezu lze dále využít při léčbě traumat, vývojových vad, hojení ran, k náhradě tkání, konkrétně pro léčbu zánětlivých onemocnění kloubů jako je artritida, osteoartritida.

## PATENTOVÉ NÁROKY

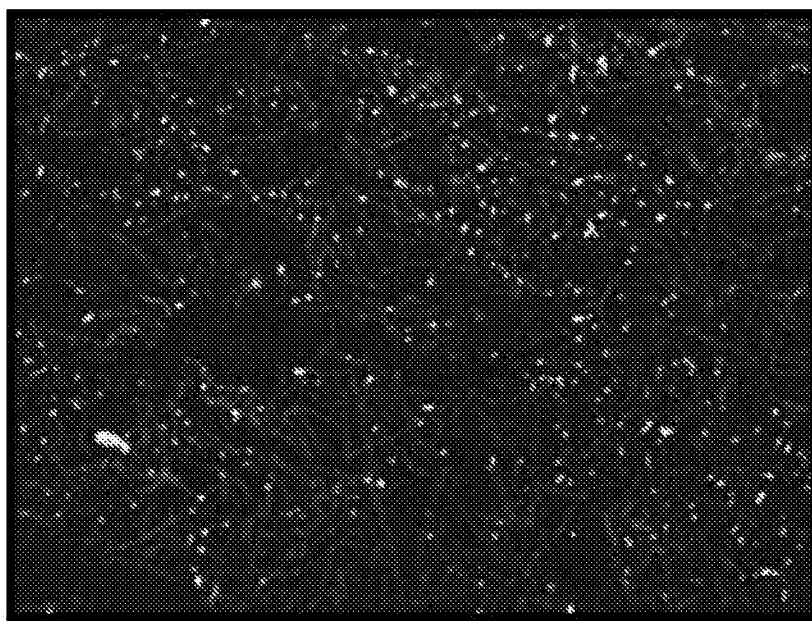
1. Způsob přípravy prostředku pro náhradu části lidské chrupavkovité tkáně, při kterém
- 5
- je modifikovaná plasma bohatá na destičky připravena z autologní periferní krve, která je nejprve po odběru z lidského těla do odběrového setu s antikoagulantem první centrifugací zbavena červených krvinek, odebraná horní lehčí plasmatická frakce je druhou centrifugací obohacena o destičky,
  - 10
  - z lidského těla izolované mesenchymálních kmenové buňky jsou kultivovány nejméně do třetí pasáže, a následně
  - resuspendovány v modifikované plasmě v koncentraci 50 000 až 500 000 mesenchymálních
  - 15
  - kmenových buněk na 1 ml modifikované plasmy bohaté na mechanicky rozrušené destičky,
  - tato suspenze je dále smíchána s 10% hmotn. roztokem chloridu vápenatého v hmotnostním poměru 80:20 až 99:1,
  - 20
  - výsledná směs je neprodleně nanесena na připravený sterilní biodegradabilní pevný nosič z netkaných polysacharidových vláken,
- vyznačující se tím, že po kroku druhé centrifugace modifikované plasmy je odstraněna horní lehčí frakce a dolní těžší frakce je ultracentrifugována při tíhovém zrychlení 80 000 až 100 000 g po dobu 2 až 4 hodin a poté je modifikována alespoň dvěma cykly šokového zmrazení při teplotě -180 až -200 °C a rozmrazení, a teprve poté probíhá kultivace izolovaných mesenchymálních buněk do třetí pasáže, a dále tím, že výsledná směs je na pevném biodegradabilním nosiči kultivována po dobu 10 až 30 minut při teplotě 20 až 37 °C.**
- 25
2. Způsob přípravy prostředku pro náhradu části lidské chrupavkovité tkáně podle nároku 1, **vyznačující se tím, že při kterém je první centrifugace provedena při tíhovém zrychlení 100 až 300 g po dobu 5 až 15 minut, nejvýhodněji při tíhovém zrychlení 130 až 160 g po dobu 9 až 12 minut.**
- 30
3. Způsob přípravy prostředku pro náhradu části lidské chrupavkovité tkáně podle kteréhokoliv z přecházejících nároků, **vyznačující se tím, že je druhá centrifugace provedena při tíhovém zrychlení 500 až 1000 g po dobu 12 až 20 minut, nejvýhodněji při tíhovém zrychlení 700 až 800 g po dobu 14 až 17 minut.**
- 35
4. Způsob přípravy prostředku pro náhradu části lidské chrupavkovité tkáně podle kteréhokoliv z přecházejících nároků, **vyznačující se tím, že ultracentrifugace je provedena při tíhovém zrychlení 90 000 až 100 000 g.**
- 40
5. Způsob přípravy prostředku pro náhradu části lidské chrupavkovité tkáně podle kteréhokoliv z přecházejících nároků, **vyznačující se tím, že suspenze mezenchymálních buněk a plazmy je smíchána s 10% hmotn. vodným roztokem chloridu vápenatého v poměru hmotnostních dílů 90:10 až 99:1, nejvýhodněji v poměru hmotnostních dílů 95:5 až 99:1.**
- 45
6. Způsob přípravy prostředku pro náhradu části lidské chrupavkovité tkáně podle kteréhokoliv z přecházejících nároků, **vyznačující se tím, že směs je na biodegradabilním nosiči kultivována 12 až 20 minut při 22 až 30 °C.**
- 50
7. Způsob přípravy prostředku pro náhradu části lidské chrupavkovité tkáně podle kteréhokoliv z přecházejících nároků, **vyznačující se tím, že po kultivaci je prostředek skladován v lednici při 2 až 8 °C či v kultivačním médiu při 37 °C.**
- 55

8. Prostředek pro náhradu části lidské chrupavkovité tkáně, který obsahuje směs ukotvenou autologními fibrinovými polymery na sterilní biodegradabilní polysacharidový pevný nosič z netkaných vláken, kde uvedená směs zahrnuje suspenzi o koncentraci 50 000 až 500 000 mesenchymálních kmenových buněk na 1 ml autologní modifikované plasmy a dále tato směs obsahuje v hmotnostním poměru 80:20 až 99:1 k této suspenzi přidaný 10% hmotn. roztok chloridu vápenatého **vyznačující se tím**, že autologní modifikovaná plasma obsahuje mechanicky rozrušené destičky předem upravené ultracentrifugací a alespoň dvěma cykly šokového zmrazení při teplotě -180 až -200 °C a rozmrazení.
9. Prostředek pro náhradu části lidské chrupavkovité tkáně podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že obsahuje v hmotnostním poměru 90:10 až 99:1, nejvýhodněji v hmotnostním poměru 95:5 až 99:1, k této suspenzi přidaný 10% hmotn. roztok chloridu vápenatého.
10. Prostředek pro náhradu části lidské chrupavkovité tkáně podle kteréhokoliv z nároků 8 nebo 9, **vyznačující se tím**, že pevným nosičem je některý z následujících: kyselina polylaktidová PLA, kyselina polyglykolová PGA, polyethylenglykol PEG, kolagen typu I, hyaluronová kyselina, fibrin, celulóza, škrob nebo extracelulární matrice ve formě nanovláken nebo mikrovláken, nebo jejich kombinace.
11. Prostředek pro náhradu části lidské chrupavkovité tkáně podle kteréhokoliv z nároků 8 nebo 9, **vyznačující se tím**, že pevným nosičem je nosič z netkaných vláken z kyseliny hyaluronové HA a kyseliny polyglykolové PGA.

I výkres



Obr. 1



Obr. 2