PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2017-396

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

A01N 1/02	(2006.01)
C12N 5/00	(2006.01)
C12N 5/0775	(2010.01)
A61K 35/28	(2015.01)
A61K 47/36	(2006.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **07.07.2017**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.01.2019**

(Věstník č. 3/2019)

(71) Přihlašovatel:
Bioinova, s.r.o., Praha 4, Krč, CZ
Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i., Praha 4, Krč, CZ

(72) Původce:
Tomáš Groh, Ph.D., Ústí nad Labem, CZ
Yuriy Petrenko, Ph.D., Praha 5, CZ
Ing. Eliška Kosnarová, Zeleneč, CZ
MUDr. Peter Bauer, Ph.D., Praha 12, CZ

(74) Zástupce:
Ing. Jaroslav Potužník, patentový zástupce, U třetí baterie 1, 162 00 Praha 6

(54) Název přihlášky vynálezu:

Prostředek pro uchování lidských nebo zvířecích buněk při velmi nízkých teplotách a jeho použití

(57) Anotace:
Prostředek pro uchování lidských nebo zvířecích buněk při velmi nízkých teplotách od -18 °C do -196 °C, který je tvořen vodným roztokem trehalózy, který obsahuje trehalózu v množství 60 až 900 mmol/l. Roztok může dále obsahovat kationty K^+ v množství až 50 mmol/l, katonty Na^+ v množství až 80 mmol/l, anionty Cl^- v množství až 40 mmol/l, anionty PO_4^{3-} a/nebo HPO_4^{2-} a/nebo $H_2PO_4^-$ v celkovém množství až 65 mmol/l, kationty Mg^{2+} a/nebo Ca^{2+} v celkovém množství až 2 mmol/l, anionty SO_4^{2-} a/nebo HSO_4^- v celkovém množství až 2 mmol/l, přičemž pH roztoku je 7,1 až 7,6, a přičemž celková osmolalita roztoku není vyšší než 900 mosmol/l. Popisuje se také použití výše uvedeného prostředku k dlouhodobému uskladnění kmenových buněk, zejména mezenchymálních kmenových buněk po dobu více než tří dnů při velmi nízkých teplotách od -18 °C do -196 °C.

CZ 2017 - 396 A3

Prostředek pro uchování lidských nebo zvířecích buněk při velmi nízkých teplotách a jeho použití

Oblast techniky

Vynález se týká prostředku pro uchování lidských nebo zvířecích buněk při velmi nízkých teplotách. Dále se vynález týká použití pufrovaného nebo nepufrovaného vodného roztoku trehalózy k dlouhodobému uskladnění kmenových buněk při velmi nízkých teplotách.

Dosavadní stav techniky

Kmenové buňky jsou pro svůj multipotentní potenciál velmi ceněná frakce v biofarmaceutickém průmyslu. Jejich omezená životnost *ex vivo* je v současné době řešena jejich kryoprezervací, tj. hlubokým zmražením na teplotu -18 °C až -196 °C. Hluboce zamražené kmenové buňky je možné kdykoliv v případě potřeby použít a jejich životnost je v takovém stavu prodloužena o několik let. Klíčovým krokem v celém procesu mražení kmenových buněk je roztok, ve kterém jsou buňky uloženy. Jeho složení je zásadní pro výsledné vlastnosti buněk po jejich rozmražení. Z hlediska biofarmaceutického průmyslu a současných pravidel pro použití buněk k terapeutickým účelům je žádoucí, aby rozmražené buňky bylo možné přímo aplikovat pacientovi bez dalších kroků promývání či centrifugace buněk. Tento fakt klade velké nároky především na složení roztoku s ohledem na bezpečnost jednotlivých komponent v roztoku obsažených. Pro kryoprezervaci buněk se běžně používá dimethylsulfoxid (DMSO), ethylen glykol či glycerol.

Nevýhoda použití těchto kryoprotektivních látek je jejich nezanedbatelná cytoxicita a významné nežádoucí vedlejší účinky při podání pacientům. Proto jsou vyvíjeny kryoprotektivní roztoky, které jsou primárně založeny na použití netoxických složek při zachování kryoprezervačních vlastností.

Jako velmi potentní složka kryoprotektivních roztoků se ukazuje trehalóza. Trehalóza, disacharid glukózy, je syntetizována nižšími organizmy v případech, kdy jsou vystaveny stresu, chladu, vysokým teplotám nebo vysušení, je známa jako protistresový faktor. Trehalóza, na rozdíl od DMSO, neprochází buněčnou membránou a při mražení chrání buňky extracelulárně díky mírné dehydrataci buněk.

Dash a kolektiv testovali trehalózu (Curr Stem Cell Res Ther., 2008) pro mražení rybích embryonálních kmenových buněk. Přidaná trehalóza do kryoprotektivního roztoku obsahujícího DMSO zvýšila viabilitu rozmražených buněk.

Velmi pozitivní účinek 1M roztoku trehalózy na mražení kmenových CD34 + buněk izolovaných z periferní krve popisuje Martinetti (Biomed Rep., 2017).

Použití extracelulární a také intracelulární trehalózy v kryoroztoku příznivě ovlivňuje vitalitu rozmražených kmenových buněk izolovaných z pupečníkové krve (Motta a kol., Cryobiology, 2014).

Campbell a kolektiv popisuje (Cryobiology, 2012) výhodné použití 0,2 - 0,4M roztoku trehalózy v kombinaci s uhličitanem sodným a kultivačním médiem EMEM (Eagle`s Minimum Essential Medium) pro mražení hovězích endotheliálních buněk.

Velice výhodná se ukazuje 24 hodinová preinkubace buněk s trehalózou před samotným procesem mražení. Výhodu preinkubace buněk 200mM roztokem trehalózy také popisuje Petrenko a kol. (Cryo Letters. 2014).

Patentová přihláška CN105961374 popisuje kryoprotektivní roztok pro uchování mesenchymálních kmenových buněk. Tento roztok obsahuje zejména polyethylen glykol a albumin, přičemž jako jednu ze složek obsahuje i trehalózu.

Přihláška CN105494317 popisuje zamražení kmenových buněk izolovaných z tukové tkáně v roztoku obsahujícím zejména lipoprotein, trehalózu a glycerin.

Patentová přihláška CN104012519 popisuje výhodnou kombinaci trehalózy a erytropoietinu v kryoprotektivním roztoku.

Patentová přihláška US2011008300 popisuje výhodné použití roztoku s obsahem trehalózy a glycerinu pro kryoprezervaci tukové tkáně.

Patentová přihláška KR20140046690 popisuje mražení prasečích spermatogonálních buněk v roztoku obsahujícím 200 mM trehalózy, fetální hovězí sérum, DMSO a kultivační médium Alpha MEM (Alpha Modification of Eagle`s Minimum Essential Media).

Obdobně, přihláška CN102578077 je zaměřena na problematiku mražení mesenchymálních kmenových buněk v kryoroztoku obsahujícím DMSO, trehalózu a další komponenty. Kryoroztok je použit bez obsahu séra.

Korejský patent KR20120078094 popisuje výhodnou kombinaci DMSO, trehalózy, katalasy a kaspasového inhibitoru zVAD-fmk pro mražení kmenových buněk izolovaných z plodové vody.

Roztok obsahující trehalózu a další farmaceuticky použitelné ingredience je popsán v české patentové přihlášce PV 2016-284. Přihláška popisuje hypothermické skladování buněk v tomto roztoku při teplotě snížené až na -4 °C.

Dosud známá řešení neumožňují hluboké zmražení za použití farmaceuticky nekompatibilních složek, což výrazně v klinické praxi znemožňuje bezprostřední využití takových roztoků po rozmražení.

Podstata vynálezu

Výše uvedené nedostatky odstraňuje prostředek pro uchování kmenových buněk při velmi nízkých teplotách, který je tvořen vodným roztokem trehalózy, který obsahuje disacharid trehalózu v množství 60 až 900 mmol/l, s výhodou 200 až 900 mmol/l a nejvýhodněji 300 až 900 mmol/l.

Roztok se může skládat pouze z vody a trehalózy v množství 60 až 900 mmol/l, přičemž pH roztoku může být, v závislosti na použité vodě, 7 až 8, zpravidla však je hodnota pH 7,1 až 7,6.

Ve výhodném provedení roztok sestává z pufrovaného vodného roztoku trehalózy, který obsahuje jednoduché soli pro tlumení výkyvů pH, přičemž pH roztoku je 7,1 až 7,6, a přičemž celková osmolarita roztoku není vyšší než 900 mosmol/l. Osmolaritou se v této přihlášce rozumí osmolarita vypočtená způsobem v této oblasti techniky obvyklým, nebo, v případě že by byla vyšší než vypočtená, osmolarita změřená.

Tento roztok s výhodou 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 $H_2PO_4^{2-}$ v celkovém množství 20 až 65 mmol/l, a trehalózu v množství minimálně 60 mmol/l, s výhodou minimálně 200 mmol/l, ještě výhodněji minimálně 300 mmol/l. Horní mez obsahu trehalózy je určena tím, že celková osmolarita roztoku nemá být vyšší než 900 mosmol/l. Horní mez obsahu trehalózy v pufrovaném roztoku je tedy o množství disociovaných

solí nižší než 900 mosmol/l. Koncentrace uvedených složek jsou v rámci uvedeného rozmezí voleny tak, aby hodnota pH roztoku byla 7,1 až 7,6. V nejjednodušším provedení vynálezu nemusí prostředek podle vynálezu obsahovat žádné další záměrně přidávané složky. V každém případě, optimální celková osmolarita roztoku není vyšší než 900 mosmol/l.

V dalších provedeních vynálezu 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 vynálezu 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 vynálezu roztok obsahuje trehalózu v množství 200 až 400 mmol/l.

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.

Konkrétněji, prostředek podle vynálezu je určen k uskladnění buněk při nízkých a velmi nízkých teplotách od -5 °C až do -273 °C. Prostředek podle vynálezu je zvláště vhodný k uskladnění kmenových buněk při teplotách od -18 °C do -196 °C, s výhodou -60 °C až-196 °C, nejčastěji -80 °C až -196 °C. Režim mražení prostředku podle vynálezu může mít různý průběh. Může být použito programovatelných mrazicích jednotek (např. IceCube; SY-LAB) či dalších teplotně optimalizovaných zařízení: Mr. Frosty™ (Thermo Fisher Scientific) či CoolCell® (BioCision). S výhodou lze suspenzi buněk v prostředku dle vynálezu mrazit také přímým uložením vzorku do par tekutého dusíku. Tekutý dusík či jeho páry jsou z pohledu mražení i uskladnění vzorku nejvhodnější.

Prostředek podle vynálezu se skládá z farmaceuticky přijatelných sloučenin a může být použit přímo k aplikaci kmenových buněk, které jsou v něm zmraženy. Po rozmražení kmenových buněk je zajištěna jejich dostatečná životaschopnost.

Prostředek podle vynálezu je určen zejména pro mrazové uchování mezenchymálních kmenových buněk získaných z kostní dřeně, tukové tkáně, periferní krve nebo z extraembryonálních tkání (placenta, pupečník, pupečníková krev) nebo embryonálních, nervových, indukovaných nebo limbálních kmenových buněk savců včetně člověka. Může sloužit také k uchování kmenových buněk uchycených na biologickém nosiči. Z podstaty samotného vynálezu, tedy osmotický vliv roztoku na buňky před zmražením vč. stabilizace buněčné membrány, je možné očekávat pozitivní vliv roztoku také na jiné buněčné typy.

Kmenové buňky uchované v prostředku podle vynálezu mohou být po rozmražení aplikovány bez nutnosti odmytí tohoto prostředku přímo pacientovi zejména intravenózně, intraarteriálně, intramuskulárně, subkutánně, subkunjunktiviálně nebo intratekálně, a to buď samostatně, nebo s nosičem.

Nosičem kmenových buněk může být biodegradabilní i nedegradabilní materiál. Nosičem mohou být funkční biomateriály. Může se jednat o syntetické biokompatibilní polymery (kyselina

polylaktidová PLA, kyselina polyglykolová PGA, polyethylenglykol 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. 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 vynálezu.

Vhodný roztok trehalózy o koncentraci trehalózy v množství 60 až 900 mmol/l, s výhodou 300 až 900 mmol/l, je možné použít k dlouhodobému uskladnění hluboce zmražených mezenchymálních kmenových buněk. Hlubokým zmražením se rozumí zmražení na velmi nízké teploty od -18 °C do -196 °C. Nižší teploty jsou také možné, i když méně praktické. Dlouhodobým uskladněním se rozumí uskladnění po dobu více než tří dnů, ale i několika týdnů nebo měsíců, například až pěti let.

Pufrovaný vodný roztok trehalózy, obsahující trehalózu v množství 200 až 400 mmol/l, 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, je možné použít zejména k dlouhodobému uskladnění hluboce zmražených mezenchymálních kmenových buněk.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Izolace a kultivace MSCs z kostní dřeně (BM-MSCs)

Aspirace kostní dřeně byla provedena trepanobioptickou 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 - 30 minut a poté byla odebrána vrstva prstence mononukleárních buněk. V odebrané vrstvě buněk byla analyzována buněčnost směsi hematologickým analyzátorem. Do každé z připravených kultivačních lahví o ploše 75 cm^2 bylo přidáno 10 ml kompletního kultivačního média (médium Alpha MEM Eagle obsahující 5% lidský destičkový lyzát a gentamicin) a definované množství suspenze izolovaných buněk (5 - 10 milionů jaderných buněk) pro nasazení primokultury. Kultivace buněk probíhala při teplotě 37 ± 0,5 °C a 5 % CO_2. 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 pufrem PBS a centrifugována (230 g, 5 minut). Pro vytvoření přípravku podle provedení vynálezu byla peleta získaná výše uvedeným postupem resuspendována v roztoku přípravku uvedeném v příkladu 2A (s 250 mM trehalózou, který je dále označován TR-250), 2B (s 300 mM trehalózou, označovaném TR-300), 2C (s 350 mM trehalózou, označovaném TR-350), 2D (s 400 mM trehalózou, označovaném TR-400) a 2E

(pouze vodný roztok s 400 mM trehalózou označovaném TRH-400). Značkou mM nebo také mmol/l je označován počet milimolů v litru roztoku.

Obsah zmražených kmenových buněk byl zpravidla 5 x 10^5 až 1 x 10^7 MSCs/ml. Takto připravená suspenze buněk byla průběžně míchána lehkým protřepáním po dobu nejméně deseti minut při pokojové teplotě. Zároveň byla stanovena viabilita vstupní suspenze buněk. Následně byla suspenze (TR-250 a TR-300) uložena do mrazáku o teplotě -70 °C v mrazicím zařízení CoolCell® (BioCision). Paralelně byly vzorky uloženy přímo do teploty -70 °C či do -196 °C na dobu 24 hodin (tabulka 1). V tabulce 2 jsou uvedeny hodnoty viability buněk zmražených pouhým uložením do teploty -196 °C, nicméně buňky jsou v suspenzi v různých roztocích (TR-350, TR-400 a TRH-400). Následně byly všechny vzorky uloženy do Dewarovy nádoby obsahující tekutý dusík. Po jejich rozmražení ve vodní lázni při 37 °C byly vzorky testovány dle přikladu 3.

Příklad 2: Možné přípravy 100 ml roztoku podle vynálezu

Příklad 2A. Příprava roztoku podle vynálezu s 250 mM trehalózou (TR-250)

Navážíme 0, 408 g KH_2PO_4 a 0,213 g Na_2HPO_4, rozpustíme v 20 ml destilované vody; naváží me 0,007 g $CaCl_2$ x $2H_2O$ a rozpustíme v 10 ml destilované vody; naválíme 0,012 g $MgSO_4$ 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 mosmol/l.

Příklad 2B. Příprava roztoku podle vynálezu s 300 mM trehalózou (TR-300)

Navážíme 0, 408 g KH_2PO_4 a 0,213 g Na_2HPO_4, rozpustíme v 20 ml destilované vody; naváží me 0,007 g $CaCl_2$ x $2H_2O$ a rozpustíme v 10 ml destilované vody; naválíme 0,012 g $MgSO_4$ a rozpustíme v 10 ml destilované vody. Takto připravené roztoky smícháme a upravíme pH na hodnotu 7,4. Poté ve směsi rozpustíme 11,34 g trehalózy a konečný objem upravíme destilovanou vodou na 100 ml. Výsledná osmolarita roztoku je 408 mosmol/l.

Příklad 2C. Příprava roztoku podle vynálezu s 350 mM trehalózou (TR-350)

Navážíme 0,408 g KH_2PO_4 a 0,213 g Na_2HPO_4, rozpustíme v 20 ml destilované vody; naváží me 0,007 g $CaCl_2$ x $2H_2O$ a rozpustíme v 10 ml destilované vody; naválíme 0,012 g $MgSO_4$ a rozpustíme v 10 ml destilované vody. Takto připravené roztoky smícháme a upravíme pH na hodnotu 7,4. Poté ve směsi rozpustíme 13,23 g trehalózy a konečný objem upravíme destilovanou vodou na 100 ml. Výsledná osmolarita roztoku je 458 mosmol/l.

Příklad 2D. Příprava roztoku podle vynálezu s 400 mM trehalózou (TR-400)

Navážíme 0, 408 g KH_2PO_4 a 0,213 g Na_2HPO_4, rozpustíme v 20 ml destilované vody; naváží me 0,007 g $CaCl_2$ x $2H_2O$ a rozpustíme v 10 ml destilované vody; naválíme 0,012 g $MgSO_4$ a rozpustíme v 10 ml destilované vody. Takto připravené roztoky smícháme a upravíme pH na hodnotu 7,4. Poté ve směsi rozpustíme 15,12 g trehalózy a konečný objem upravíme destilovanou vodou na 100 ml. Výsledná osmolarita roztoku je 508 mosmol/l.

Přiklad 2E. Příprava vodného nepufrovaného roztoku podle vynálezu s 400 mM trehalózou (TRH-400)

Navážíme a rozpustíme 15,12 g trehalózy a konečný objem upravíme destilovanou vodou na 100 ml. Výsledná osmolarita roztoku je 400 mosmol/l.

Příklad 3: Životaschopnost BM-MSCs po jejich zmražení a následném rozmražení (uskladnění v

tekutém dusíku)

Byla hodnocena životaschopnost MSCs izolovaných z lidské kostní dřeně uchovaných v roztoku TR-250, TR-300, TR-350, TR-400 a TRH- 400 ihned po jejich rozmražení. Nejprve byla suspenze barvena propidium jodidem a viabilita buněk stanovena metodou průtokové cytometrie. 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. Životaschopnost BM-MSCs sledovaná barvením propidium jodidem bezprostředně po rozmražení dosahovala více než 50 % u vzorků zmražených šokovým uložením do -70 °C či do -196 °C (tabulka 1). Nejvhodnější se ukazuje právě přímé uložení suspense buněk v prostředku dle vynálezu do -70 °C či -196 °C v roztoku TR-250 i TR-300 (tabulka 1). Nejlepších výsledků bylo ovšem dosaženo při použití roztoku TR-400 s nejvyšší koncentrací trehalózy. Ten chrání buňky před poškozením mrazem nejvíce, viabilita buněk se po rozmražení pohybuje nad 60 % (tabulka 2).

Tabulka 1 - MSCs z kostní dřeně, viabilita buněk v roztoku TR-250 a TR-300 v různých režimech mražení

TR-250	% živých (propidium jodid negativních) buněk
vzorek před mražením	90,8
COOLCELL	14,2
přímé uložení do -70 °C	54,7
přímé uložení do -196 °C	52,9

TR-300	% živých (propidium jodid negativních) buněk
vzorek před mražením	90, 8
COOLCELL	12,1
přímé uložení do -70 °C	51,0
přímé uložení do -196 °C	59,7

Tabulka 2 - MSCs z kostní dřeně, viabilita buněk uložených přímo do -196 °C v různých roztocích dle vynálezu

Uložení do -196 °C	% živých (propidium jodid negativních) buněk
vzorek před mražením	91,1
TR-350	54, 5
TR-400	63,9
TRH-400	39,1

Rozmražené buňky byly paralelně také testovány pomocí následné kultivace a byla sledována jejich schopnost adherence na kultivační plastik a jejich morfologické vlastnosti. Základní vlastnosti mesenchymálních kmenových buněk je jejich schopnost adherence na kultivační plastik. Z morfologického hlediska mají životaschopné mesenchymální kmenové buňky protáhlý fibroblastový tvar. Bylo vysazeno stejné objemové množství buněk odpovídající počtu 100 000 buněk v čerstvém stavu na 24 jamkovou kultivační desku. Po 48 hodinách byly buňky hodnoceny pod mikroskopem. Nejvyšší míra adheze byla pozorována u suspenze buněk mražených přímým uložením do -70 °C či -196 °C v roztoku dle vynálezu (TR- 250, TR-300, TR-350 a TR-400). Všechny adherované buňky odpovídaly morfologii mesenchymálních kmenových buněk. Tato pozorování jsou v souladu s pozorováním při detekci viability pomocí propidium jodidu.

Orientačními pokusy bylo zjištěno, že obsah trehalózy může být i vyšší než 400 mmol/l, avšak její účinek se již nijak významně nezvyšuje, přičemž při celkové osmolaritě vyšší než 900 již je roztok farmaceuticky nevhodný, a naopak obsah trehalózy nižší než 60 mmol/l nemá již pozorovatelný vliv.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Prostředek pro uchování lidských nebo zvířecích buněk při velmi nízkých teplotách, **vyznačující se tím,** že je tvořen vodným roztokem trehalózy, který obsahuje trehalózu v množství 60 až 900 mmol/l, přičemž roztok může dále obsahovat kationty K^+ v množství 0 až 50 mmol/l, kationty Na^+ v množství 0 až 80 mmol/l, anionty Cl^- v množství 0 až 40 mmol/l, anionty PO_4^{3-} a/nebo HPO_4^{2-} a/nebo $H_2PO_4^-$ v celkovém množství 0 až 65 mmol/l, kationty Mg^{2+} a/nebo Ca^{2+} v celkovém množství 0 až 2 mmol/l, anionty SO_4^{2-} a/nebo HSO_4^- v celkovém množství 0 až 2 mmol/l, přičemž pH roztoku je 7,1 až 7,6, a přičemž celková osmolarita roztoku není vyšší než 900 mosmol/l.

2. Prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím,** že roztok sestává výlučně z trehalózy, vody a popřípadě stopových množství doprovodných rozpuštěných látek.

3. Prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím,** že roztok obsahuje 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.

4. Prostředek podle nároku 3, **vyznačující se tím,** že roztok obsahuje kationty Mg^{2+} a/nebo Ca^{2+} v celkovém množství 0,1 až 2 mmol/l, anionty SO_4^{2-} a/nebo HSO_4^- v celkovém množství 0,5 až 2 mmol/l

5. Prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím,** že roztok obsahuje trehalózu v množství 200 až 400 mmol/l, 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.

6. Prostředek podle některého z nároků 1 nebo 3 až 5, **vyznačující se tím,** že roztok sestává výlučně z trehalózy, vody, alespoň některého kationtu ze skupiny kationtů K^+, Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} a alespoň některého aniontu ze skupiny aniontů Cl^-, PO_4^{3-}, HPO_4^{2-}, $H_2PO_4^-$, SO_4^{2-}, HSO_4^- a popřípadě stopových množství doprovodných rozpuštěných látek.

7. Použití prostředku podle některého z nároků 3 až 6 k uskladnění kmenových buněk po dobu alespoň tří dnů při velmi nízkých teplotách od -18 °C do -196 °C.

8. Použití vodného roztoku trehalózy o koncentraci trehalózy v množství 60 až 900 mmol/l, k dlouhodobému, po dobu více než tří dnů, uskladnění mezenchymálních kmenových buněk při velmi nízkých teplotách od -18 °C do -196 °C.

9. Použití pufrovaného vodného roztoku trehalózy, obsahujícího trehalózu v množství 200 až 400 mmol/l, 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, k dlouhodobému, po dobu více než tří dnů, uskladnění mezenchymálních kmenových buněk při velmi nízkých teplotách od -18 °C do -196 °C.