

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2018-116

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **09.03.2018**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18.09.2019**
(Věstník č. 38/2019)

A01N 1/02 (2006.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
C12N 5/077 (2010.01)
C12N 5/02 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)

- (71) Přihlašovatel:
Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i.,
Praha 4, Krč, CZ
- (72) Původce:
doc. MUDr. Jitka Čejková, DrSc., Praha 10, CZ
Ing. Čestmír Čejka, Ph.D., Praha 2, CZ
Pharm. Dr. Šárka Kubinová, Ph.D., Praha 9, CZ
Ing. Irena Vacková, CSc., Praha 22, CZ
- (74) Zástupce:
Jehne, Vodák a partneři
advokátní kancelář, JUDr. Robert Jehne, advokát,
Washingtonova 1567/25, 110 00 Praha 1

(54) Název přihlášky vynálezu:
Způsob uchování živočišných buněk

- (57) Anotace:
Popisuje se způsob uchování živočišných buněk, zejména kmenových buněk, za účelem jejich skladování nebo transportu, při kterém se připraví zvolený farmaceutický roztok, zavádí se do něho plynný molekulární vodík H₂ do dosažení koncentrace alespoň 0,3 mg/l, v takto upraveném roztoku obsahujícím molekulární vodík H₂ se suspendují kmenové buňky, takto připravená suspenze se převede do nádoby nepropustné pro molekulární vodík H₂, a nádoby obsahující kmenové buňky v roztoku obsahujícím molekulární vodík H₂ se uchovávají při chladničkové teplotě, zejména při teplotě v rozmezí +2 až +8 °C.

Způsob uchování živočišných buněkOblast techniky

5

Vynález se týká způsobu uchování živočišných buněk, zejména kmenových buněk, při chladničkové teplotě, zejména při teplotě v rozmezí +2 až +8 °C, za účelem jejich skladování nebo transportu.

10

Dosavadní stav techniky

Kmenové buňky, zejména mezenchymální kmenové buňky (MSCs, Mesenchymal Stem Cells) jsou využívány v moderní medicíně k léčení různých onemocnění. Při léčbě je využíváno jejich imunomodulačních, protizánětlivých, antioxidačních, sekrečních, chemotaktických a

15

diferenčních vlastností. MSCs jsou rovněž využívány ve vědecké sféře k různým *in vitro* a *in vivo* pokusům a k preklinickým studiím na modelových zvířatech.

Před aplikací MSCs určených k terapeutickým účelům v humánní medicíně je třeba jejich důkladná charakterizace a testování. Je nutné potvrdit jejich bezpečnost (testy sterility, přítomnost endotoxinů a mykoplazmat), jejich identitu (povrchové znaky) a funkčnost. MSCs je dále třeba transportovat z místa výroby do místa podání buněk pacientovi nebo do místa jejich dalšího využití (testování, vědecké účely, preklinické testy). Všechny tyto procedury prodlužují dobu uskladnění buněčného přípravku a zvyšují nároky na prodlouženou životnost buněk. Jak

20

25

uvádí Sohn a kolektiv

(Cytotherapy, 2013), viabilita MSCs uchovaných v solném roztoku klesá již po dvou hodinách.

Pro uchování buněk se využívá většinou modifikovaných roztoků primárně vyvinutých pro transport orgánů (US 7951590, US 6045990, WO 2010064054 A1).

5

Použití různých roztoků pro dlouhodobé uchování mezenchymálních kmenových buněk je popsáno také v následujících publikacích.

10 Ginis a kolektiv (Tissue Eng Part C Methods, 2012) testovali uchování adherentních mezenchymálních kmenových buněk v roztoku Hypothermosol® FRS (roztok obsahující kationty Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} a anionty Cl^- , H_2PO_4^- , HCO_3^- a laktobionát, sacharózu, mannitol, glukózu, dextran-40, adenosin, glutathion, HEPES, Trolox) při 4 °C. Viabilita takto uchovaných buněk se pohybovala mezi 70-80 % po 2-4 denním skladování.

15 Chen a kolektiv (Cell Transplant, 2013) testovali uchování buněk v roztoku Plasmalyte (roztok obsahující kationty Na^+ , K^+ , Mg^{2+} a anionty Cl^- , CH_3COO^- a $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_7^-$) a 5 % dextrózy po dobu šesti hodin a zjistili pokles viability o 17-20 %.

20 Další komerčně dostupná média a roztoky HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Hanksův pufrovaný solný roztok obsahující KCl, KH_2PO_4 , NaCl, NaHCO_3 , Na_2HPO_4 a D-glukózu) a ViaSpan® (roztok obsahující KH_2PO_4 , MgSO_4 , laktobionát draselný, raffinózu, adenosin, glutathion, allopurinol, hydroxyethylškrob) testovali autoři Corwin a kolektiv (Cryobiology, 2014). Viabilita MSCs po 48-hodinovém uložení při 4 °C byla 45 %.

Z patentu CZ 306800 je znám prostředek pro uchování, transport a aplikaci kmenových buněk tvořený pufrovaným vodným roztokem trehalózy (KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , CaCl_2 , MgSO_4 , trehalóza a H_2O). MSCs uchované v tomto prostředí po dobu 72 hodin si zachovaly 84-90% životnost.

5

Podstata vynálezu

Vynález je založen na myšlence použít pro chladové uchování živočišných buněk, zejména kmenových buněk, při takzvané chladničkové teplotě, zejména při teplotě +2 až +8 °C, jako složku roztoku molekulární vodík H_2 . Molekulární vodík díky své malé velikosti snadno difunduje do cytoplazmy, mitochondrií, případně i jader buněk, kde působí antioxidačně, antiapoptoticky, protizánětlivě a cytoprotektivně.

Podstata vynálezu spočívá v tom, že molekulárním vodíkem je obohacován, v množství alespoň 0,3 mg/l, vhodný roztok, s výhodou farmaceutický roztok, ve kterém jsou buňky uchovávány a zároveň podávány pacientovi. Jako vhodný farmaceutický roztok lze využít např. infuzní roztoky (např. Ringerův roztok, Hartmannův roztok, fyziologický roztok, Plasmalyte), případně PBS (phosphate buffered saline – fyziologický roztok s fosfátovým pufrem), HBSS, EBSS (Earl's balanced salt solution – Earlův balancovaný solný roztok) nebo pufrovaný vodný roztok trehalózy (patent CZ 306800). Roztok po saturaci vodíkem by měl mít hodnotu pH v rozmezí 6,3 – 7,8; ideálně 6,9 - 7,4; hodnotu celkové osmolarity v rozmezí 270 – 350 mOsm/l; ideálně 290 - 310 mOsm/l.

Roztoky lze sytit molekulárním vodíkem buď komerčně dostupnými prostředky uvolňujícími vodík, jako jsou chemické patrony (Dr.

H. Hayashi's original HydrogenRich Water Stick™), tyčinky (Doctor SUIOSUI®, Friendear, Tokyo, Japan) nebo tablety na bázi hořčíku (US 20160113865 A1), přísávkem obecného kovu s jedlou organickou kyselinou (US 20150258136 A1) nebo probubláváním vodných roztoků plynným vodíkem.

5

Výhodně se do zvoleného roztoku zavádí molekulární vodík probubláváním plynným vodíkem z tlakové lahve.

10

Roztok může být obohacován vodíkem na libovolný obsah vodíku, který poskytuje pozorovatelný účinek, s výhodou však až do jeho saturace za daných podmínek. Roztok by měl obsahovat 0,3 až 1,6 mg/l molekulárního vodíku; ideálně 0,5 až 1,5 mg/l.

15

Způsob uchování za využití molekulárního vodíku je určen pro chladové uchování bez nutnosti zamrazení suspenzí různých typů buněk, zejména živočišných, například buněčných linií, například fibroblastů z pojivové tkáně, zejména však mezenchymálních kmenových buněk získaných například z kostní dřeni, tukové tkáně, periferní krve, zubní pulpy, z extraembryonálních tkání (placenta, pupečník, pupečnicková krev), ale i embryonálních, nervových, indukovaných nebo limbálních kmenových buněk savců včetně člověka. Může sloužit také k uchování kmenových buněk uchycených na biologickém nosiči nebo zabudovaných uvnitř

20

nosiče.

Kmenové buňky uchované způsobem podle vynálezu mohou být aplikovány přímo pacientovi bez nutnosti další manipulace, a to zejména intravenózně, intraarteriálně, intramuskulárně, subkutánně, subkunjktiválně nebo intratekálně, a to buď samostatně, nebo v kombinaci, např.

25

s nosičem.

5 Nosičem kmenových buněk 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. Nosičem může být biodegradabilní i nedegradabilní materiál.

10 Alternativně se pro aplikace, které počítají s nosičem, mohou kultivace kmenových buněk provádět v přítomnosti těchto nosičů a společně uchovávat způsobem podle vynálezu.

Alternativně se mohou kmenové buňky uchovávat způsobem podle vynálezu a před aplikací pacientovi smíchat s biokompatibilními nosiči a podávat pacientovi společně.

15 Přehled obrázků

Na připojených vyobrazeních jsou mikrofotografie adherovaných mezenchymálních kmenových buněk z pupečnickové tkáně vysazených na kultivační plast po 6-denním skladování v chladových podmínkách způsobem podle vynálezu za využití molekulárního vodíku.

20

Obrázky ilustrují:

obr. 1A Adherované MSCs, které byly 6 dní uchovávány v chladových podmínkách v roztoku PBS a poté vysazeny na kultivační plast, po 24-hodinové kultivaci v kompletním médiu,

obr. 1B Adherované MSCs, které byly 6 dní uchovávány v chladových podmínkách v roztoku PBS s koncentrací molekulárního vodíku 0,68 mg/L a poté vysazeny na kultivační plast, po 24-hodinové kultivaci v kompletním médiu

5

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Způsob izolace pupečnickových MSCs

- 10 Lidský pupečník byl získán od zdravých novorozenců ihned po porodu. Pupečnickové arterie a vena byly odstraněny a pupečnicková tkáň byla nakrájena na malé kousky (asi 1 - 2 mm³). MSCs z umbilikální tkáně byly izolovány explantátovou metodou, kdy byly kousky tkáně vysazeny do kultivační lahve o ploše 25 cm². Kultivace probíhala ve 4 ml kompletního kultivačního média (médiu Alpha MEM Eagle obsahující 5 % obj. lidského destičkového lyzátu a gentamicin). Po
- 15 10 dnech byly kousky tkáně odmyty a buňky, které vycestovaly z pupečnickové tkáně a přisedly na plast, byly dále kultivovány v kompletním kultivačním mediu při teplotě 37 °C s 5 % CO₂. V průběhu kultivace buněk probíhala 3x týdně výměna média. 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
- 20 mikroskopem; optimální pro růst kultury bylo dosažení 80-90% pokrytí buněk kultivačního dna. Pro pasážování bylo nutné odsát kultivačního média, oplach kultury 4 ml pufru PBS a přidání 1 ml roztoku enzymu Trypsin/EDTA. Kultivační lahve byly cca 4 minuty inkubovány při 37 °C. Správný průběh enzymatické reakce byl kontrolován pod mikroskopem. Pokud se buňky pohybovaly s proudící kapalinou po poklepání kultivační lahve, byl do každé lahve

25

- přidán 1 ml fetálního bovinního séra a 2 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 znovu vysazena do nových kultivačních lahví o ploše 75 cm² v poměru 4000 buněk/1 cm² plochy.
- 5 Třetím pasážováním buněk bylo dosaženo finální suspenze buněk.

Příklad 2: Způsob sycení roztoků molekulárním vodíkem

- Roztoky zvolené pro příklady sycení vodíkem byly fosfátový pufr PBS o složení NaCl, KCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ a H₂O a pufrovaný vodný roztok s trehalózou podle patentu CZ 306800 o složení KH₂PO₄, Na₂HPO₄, CaCl₂, MgSO₄, trehalóza a H₂O. Sycení roztoků vodíkem bylo prováděno probubláváním roztoků vodíkem z tlakové láhve (průtok 1 l/min, 10 min, za stálého míchání), pomocí komerčně dostupné patrony Dr. H. Hayashi's original HydrogenRich Water Stick™ nebo rozpuštěním tablety pro produkci molekulárního vodíku Active H₂, Purative.
- 10 Koncentrace rozpuštěného molekulárního vodíku v roztoku byla měřena pomocí přístroje Trustlex ENH-1000 a dosahovala hodnot 0,5 – 1,5 mg/l.
- 15

- Lze použít také systém MiZ Co., Ltd. Japan. Tento systém používá vak z hliníkové fólie, do kterého se umístí tableta (agens uvolňující H₂) a pro H₂ propustný vak z polyethylénu nebo polystyrénu, obsahující pufr s uchovávanými buňkami. Po přidání vody se hliníkový vak zavaří.
- 20 Vyvíjející se H₂ proniká do pufru v polyethylenovém nebo polystyrénovém vaku. Kromě H₂ žádná jiná látka do vaku s pufrem a buňkami neproniká.

Příklad 3: Způsob uchování kmenových buněk v roztocích obohacených molekulárním vodíkem

- Suspenze kmenových buněk, jejichž získávání je popsáno v příkladu 1, vždy v množství 5 - 10 mil/ml byla resuspendována v roztoku obohaceném o molekulární vodík podle příkladu 2 a uzavřena v nádobkách z borosilikátového skla hydrolytické třídy 1 se šroubovacím magnetickým uzávěrem s těsněním ze silikonu a teflonu schopných zadržet molekulární vodík po dobu skladování. Nádobky se suspenzí buněk byly skladovány při teplotě cca 4 °C po dobu 6 dnů. Po 3 dnech byla odebrána poměrná část nádobek pro zjištění průběhu příkladu.
- Alternativně lze uchovávat buňky ve vacích prostupných pro H₂ v zatavených hliníkových vacích s agens produkujícím kontinuálně molekulární vodík.

Příklad 3a: Srovnávací příklad k příkladu 3

- Jako srovnávací příklad k příkladu 3 bylo stejné množství pupečnickových MSCs (5 – 10 mil/ml) uchováno ve stejném typu nádobek jako v příkladu 3 a ve stejných roztocích jako v příkladu 2, ale bez syčení molekulárním vodíkem a skladováno při teplotě cca 4 °C po dobu 6 dnů. Po 3 dnech byla odebrána poměrná část nádobek pro zjištění průběhu příkladu.
- Příklad 4: Viabilita pupečnickových MSCs po 3 a 6-denním skladování

Byla hodnocena viabilita MSCs izolovaných z pupečnickové tkáně uchovaných po dobu 3 resp. 6 dní při teplotě okolo 4 °C. MSCs z lidské pupečnickové tkáně byly vyrobeny podle příkladu 1 a

uskladněny podle příkladu 3 a 3a. Po 3 resp. 6 dnech byla stanovena viabilita buněk na základě dvou nezávislých metod.

- 5 Nejprve byla suspenze buněk obarvena roztokem trypanové modři a počítán poměr živých a mrtvých buněk pomocí Bürkerovy počítací komůrky. Živé a mrtvé buňky je možno rozlišit barvením. U buněk s narušenou plazmatickou membránou dochází k průniku barviva a tím k obarvení buňky, nepoškozené živé buňky zůstávají neobarvené. Viabilita stanovená barvením trypanovou modří odráží životnost jednotlivých buněk v suspenzi.
- 10 Viabilita pupečníkůvých MSCs byla dále hodnocena pomocí Amalar blue® testu, který vypovídá o metabolické aktivitě kultivovaných buněk. Aktivní složka Amalar 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 je přímo úměrné počtu živých buněk a koresponduje s metabolickou aktivitu buněk.
- 15 Pro tento účel bylo vysazeno stejné objemové množství buněk odpovídající počtu 100 000 buněk v čerstvém stavu na 24 jamkovou kultivační destičku a buňky byly kultivovány po dobu 24 hodin. Následně byl přidán objemově 10% roztok Alamar blue® v kompletním kultivačním médiu a MSCs byly inkubovány další 4 hodiny při teplotě 37 °C. Intenzita fluorescence byla hodnocena při vlnové délce excitace 535 nm a vlnové délce emise 550 nm na spektrofotometru
- 20 (Tecan). Metabolická aktivita buněk byla prezentována jako poměr mezi intenzitou fluorescence MSCs po 3 a 6 dnech skladování v chladovém prostředí podle příkladu 3 a buněk ze stejné skupiny před uskladněním (po sklizni v čase 0). Výsledky byly porovnány s výsledky ze srovnávacího příkladu 3a (buňky uchované ve stejném typu nádobek v pufrovacích roztocích nesycených

25

molekulárním vodíkem a skladované při teplotě asi 4 °C po dobu 3 a 6 dnů).

V tabulce 1 jsou uvedeny hodnoty vždy z několika měření, zjištěné s koncentracemi vodíku v rozmezí 0,3 až 1,6 mg/l (koncentrace vodíku na začátku pokusu).

5

Tabulka 1

	Viabilita; barvení trypanovou modří; % živých (negativních) buněk		Metabolická aktivita adherovaných buněk; barvení pomocí Alamar blue®; vyjádřeno v %; vztaženo k času 0 hodin	
	3 dny	6 dní	3 dny	6 dní
PBS	75,71 ± 3,8	55,46 ± 2,8	82,3 ± 3,6	63,4 ± 2,5
TR-200	87,5 ± 5,7	79,4 ± 4,8	88,2 ± 2,7	73,5 ± 2,4
PBS + H ₂	89,51 ± 2,3	80,7 ± 3,6	91,8 ± 5,2	72,9 ± 3,7
TR-200 + H ₂	90,35 ± 4,1	82,14 ± 3,1	92,1 ± 4,2	77,1 ± 5,7

PBS – fyziologický roztok s fosfátovým pufrém

TR-200 - pufrovaný vodný roztok s trehalózou obsahující 200mM trehalózu;

PBS + H₂ - vodíkem sycený fyziologický roztok s fosfátovým pufrém TR-200 + H₂ - vodíkem sycený pufrovaný vodný roztok s trehalózou obsahující 200mM trehalózu

10

Z tabulky č. 1 vyplývá, že sycení roztoku vodíkem zlepšuje životnost a přežitelnost buněk v chladových podmínkách podle způsobu provedení vynálezu. Přídavkem trehalózy, která je známa svými antioxidačními účinky a zvýšením odolnosti vůči nízkým teplotám, se účinek vodíku na životnost buněk ještě zvyšuje.

15

Kromě toho byla životnost pupečnickových MSCs po chladovém skladování posouzena pomocí hodnocení jejich adheze na kultivační plast během kultivace po dobu 24 hodin v kompletním médiu (podle příkladu 1). Adheze na kultivační plast je jedním ze základních znaků kmenových buněk. Adheze odráží životnost buněk, protože adherovat mohou pouze živé, chladové skladování přeživší buňky. Pro posouzení buněčné adheze byly pořízeny mikroskopické fotografie pupečnickových MSCs adherovaných na

20

kultivační plast po 6-denním uchování v chladových podmínkách podle způsobu provedení vynálezu (obr. 1). Z obr. 1 je patrné, že buňky uchované v roztocích syčených vodíkem vykazují výrazně lepší adhezi.

- 5 Byla provedena řada pokusů v roztocích s obsahem vodíku v rozmezí 0,3 až 1,6 mg/l. Obsah vodíku v celém tomto rozmezí poskytoval pozorovatelné zlepšení. Nejvýraznější zlepšení viability kmenových buněk po 6-denním skladování při teplotě 4 °C bylo pozorováno při obsahu vodíku 0,5 až 1,5 mg/l.

- 10 Hodnoty pH roztoků ve všech pokusech byly 6,9 až 7,4, přijatelné však jsou hodnoty pH v širším rozmezí pH 6,3 až 7,8. Celková osmolarita byla ve všech případech v rozmezí 290 až 310 mOsm/l, při použití jiných vhodných farmaceutických roztoků však může celková osmolarita nabývat nižších hodnot než 290 mOsm/l i vyšších hodnot než 310 mOsm/l, může tedy být v rozmezí 270 až 350 mOsm/l.

- 15 **Příklad 5: Uchování lidských dermálních fibroblastů v roztocích obohacených molekulárním vodíkem**

- 20 Pro ověření možnosti uchování jiných buněk než kmenových buněk byly provedeny pokusy s uchováním fibroblastů v roztoku PBS, ve kterém byla koncentrace molekulárního vodíku na začátku pokusu 0,68 mg/l. Viabilita fibroblastů po šesti dnech byla posuzována kvalitativně. Byla vždy zřetelně vyšší než u kontrolních vzorků bez vodíku.

- 25 **Příklad 6: Zachování fenotypu pupečnickových MSCs po 6-denním chladovém uchování podle způsobu vynálezu – analýza povrchových znaků**

Dalším znakem charakterizujícím MSCs je kromě adheze k plastu exprese povrchových CD markerů. Pupečnickové MSCs značené protilátkami konjugovanými s fluorescenční značkou byly po 6-denním uchování v chladových podmínkách v roztoku PBS syceného molekulárním vodíkem způsobem podle vynálezu analyzovány na průtokovém cytometru za použití excitačních laserů o vlnové délce 405 nm, 488 nm a 633 nm. Byly testovány znaky CD105, CD90, CD73, CD45, CD34, CD14, CD19 a HLA-DR. 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 mezenchymálních kmenových buněk a splňují minimální kritéria pro jejich identifikaci podle ISCT (Mezinárodní společnost pro buněčnou terapii).

Příklad 7: Zachování diferenciačního potenciálu pupečnickových MSCs po 6-denním uchování v chladových podmínkách podle způsobu vynálezu

Pupečnickové MSCs, které byly skladovány po dobu 6 dnů způsobem podle vynálezu v roztoku PBS syceném molekulárním vodíkem při cca 4 °C, si zachovaly svou schopnost diferencovat do buněk adipocytů, osteocytů a chondrocytů. Schopnost diferenciace do těchto tří typů buněk je dalším z minimálních kritérií, které musí podle ISCT mezenchymální kmenové buňky splňovat. Buňky získané podle příkladu 1 byly po 6-denním skladování v chladových podmínkách podle příkladu 2 v roztoku PBS syceném molekulárním vodíkem podle příkladu 3 vysazeny na kultivační plast a kultivovány s vhodnými diferenciačními médii. Po 21 dnech byly buňky zafixovány 4% paraformaldehydem v PBS a obarveny olejovou červení, alciánovou modří a alizarinovou červení pro důkaz adipogenní, chondrogenní a osteogenní diferenciace.

Příklad 8: Životnost pupečníkůvých MSCs uchycených na biologickém nosiči po 6-denním uchování v chladových podmínkách podle způsobu vynálezu

Pupečníkové MSCs byly vysazeny na biologický nosič na bázi PCL nanovláken v hustotě 150 000 buněk/cm². Po dvoudenní kultivaci byl biologický nosič s buňkami vyjmut z kultivační nádoby, opláchnut roztokem PBS a uložen v prostředí podle příkladu 3 a 3a při teplotě okolo 4 °C. Počet uchycených buněk na biologickém nosiči bylo stanoveno na základě fluorescenčního barvení mikrofilament pomocí phalloidinu a buněčných jader pomocí DAPI. Mikroskopické vyhodnocení obarvených preparátů prokázalo, že po 6-denním skladování v roztoku PBS syceným molekulárním vodíkem bylo na nosiči uchycen o cca 28 % vyšší počet buněk než u nosiče s buňkami skladovaného pouze v roztoku PBS. Předpokládáme, že mrtvé buňky, které ztrácejí schopnost adheze a mění svůj tvar z protáhlého na kulovitý, byly z materiálu vyplaveny během barvicího procesu.

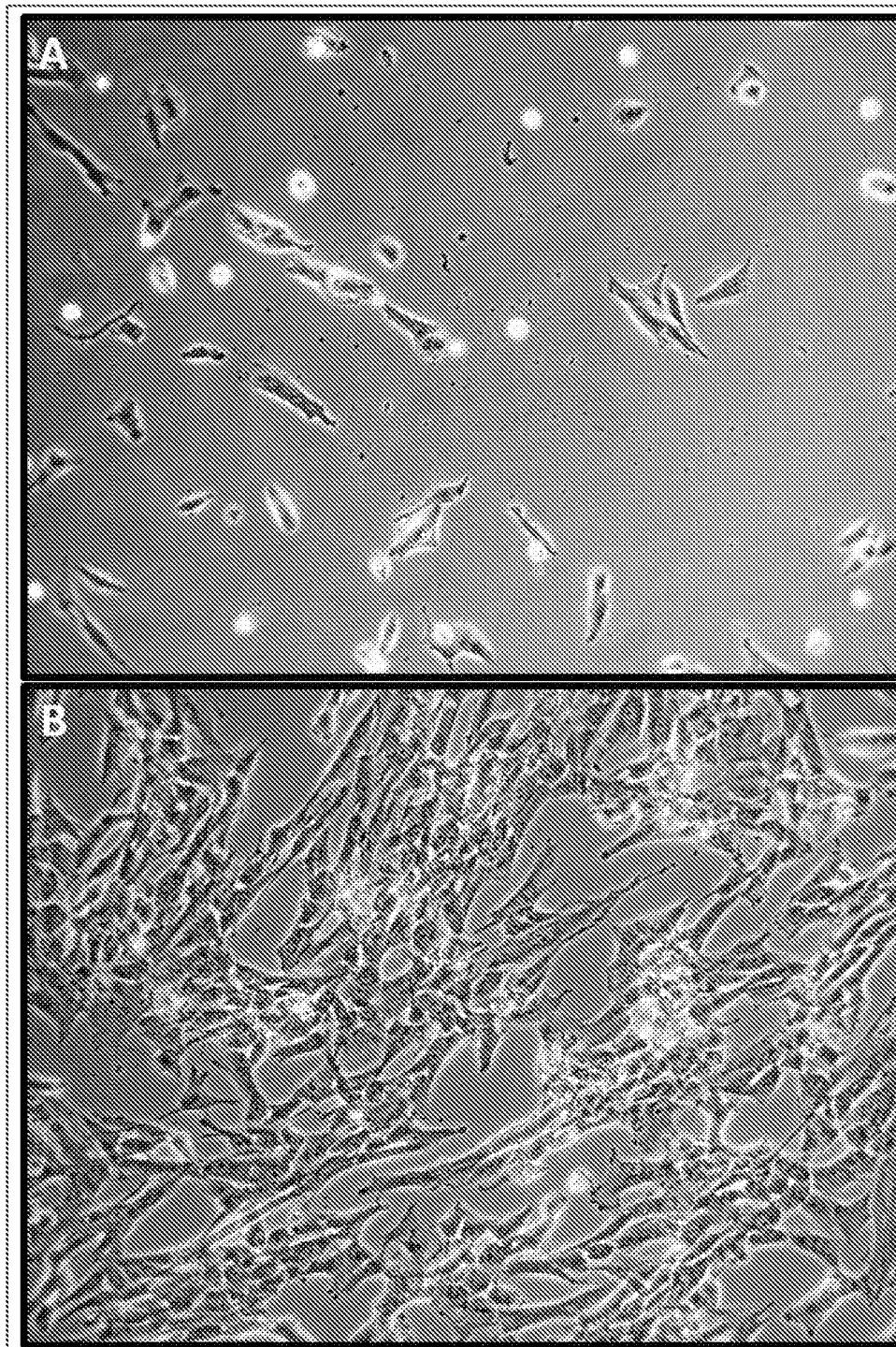
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob uchování a transportu živočišných buněk, **vyznačující se tím**, že se připraví zvolený farmaceutický roztok, zavádí se do něho plynný molekulární vodík H₂ do dosažení koncentrace alespoň 0,3 mg/l, v takto upraveném roztoku obsahujícím molekulární vodík H₂ se suspendují buňky, takto připravená suspenze se převede do nádoby nepropustné pro molekulární vodík H₂, a nádoby obsahující buňky v roztoku obsahujícím molekulární vodík H₂ se uchovávají v chladu.
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že buňky jsou kmenové buňky.
3. Způsob podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že se plynný molekulární vodík H₂ zavádí do roztoku do dosažení koncentrace 0,3 až 1,6 mg/l.
4. Způsob podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že se plynný molekulární vodík H₂ zavádí do roztoku do dosažení koncentrace 0,5 až 1,5 mg/l.
5. Způsob podle některého z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že prostřednictvím volby farmaceutického roztoku a volby metody zavádění plynného molekulárního vodíku H₂ se nastavuje pH roztoku obsahujícího molekulární vodík H₂ v rozmezí 6,3 až 7,8 a celková osmolarita v rozmezí 270 až 350 mOsm/l.
6. Způsob podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že se nastavuje pH roztoku obsahujícího molekulární vodík H₂

v rozmezí 6,9 až 7,4 a celková osmolarita v rozmezí 290 až 310 mOsm/l.

- 5 7. Způsob podle některého z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že nádoby obsahující kmenové buňky v roztoku obsahujícím molekulární vodík H_2 se uchovají při teplotě 2 až 8 °C po dobu až 6 dnů.
8. Způsob podle některého z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že v roztoku obsahujícím molekulární vodík H_2 se suspendují kmenové buňky získané z pupečnickové tkáně v množství 5 000 000 až 10 000 000 buněk na mililitr roztoku.
- 10 9. Způsob podle některého z nároků 2 až 8, **vyznačující se tím**, že kmenové buňky se uchovají v chladu v roztoku obsahujícím molekulární vodík v přítomnosti nosiče.

1 výkres



Obr.1