

A01N 1/02 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2022-148
(22) Přihlášeno: 08.04.2022
(40) Zveřejněno: 27.09.2023
(Věstník č. 39/2023)
(47) Uděleno: 17.08.2023
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 27.09.2023
(Věstník č. 39/2023)

(56) Relevantní dokumenty:
PILBAUEROVA, Nela, et al. Innovative Approach in the Cryogenic Freezing Medium for Mesenchymal Stem Cells. Biomolecules. MDPI, 2022-04-20, 2022, Vol. 12, No. 5, p. 610, ISSN 2218-273X, celý dokument; SCHMIDT, Jan, et al. Low molecular weight hyaluronic acid effect on dental pulp stem cells in vitro. Biomolecules. MDPI; <https://doi.org/10.3390/biom11010022>, 2020-12-28, 2021, Vol. 11, No. 1, p. 22, ISSN 2218-273X. WO 2020166711 A1; WO 2005056763 A2; AU 2013234396 A1.

(73) Majitel patentu:
Contipro a.s., Dolní Dobrouč, CZ

(72) Původce:
Mgr. Tomáš Prát, Ph.D., Brno, Žabovřesky, CZ
MDDr. Nela Pilbauerová, Ph.D., Mořina, CZ
Mgr. Kristina Nešporová, Ph.D., Ústí nad Orlicí, CZ
doc. MUDr. Jakub Suchánek, Ph.D., Vrchovnice, CZ
doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc., Žamberk, CZ

(74) Zástupce:
Kania, Sedlák, Smola, s.r.o., Mendlovo náměstí
907/1a, 603 00 Brno, Staré Brno

(54) Název vynálezu:
**Kryoprezervační médium obsahující
kyselinu hyaluronovou, jeho použití a
způsob kryoprezervace**

(57) Anotace:
Kryoprezervační médium je roztok kyseliny hyaluronové a/nebo její sodné soli a DMSO pro kultivaci kmenových buněk, kde kyselina hyaluronová má molekulovou hmotnost v rozmezí 1 000 000 až 2 200 000 g/mol a koncentraci v rozmezí 0,08 až 0,2 % (w/v), a DMSO má koncentraci 3 až 5 % (v/v). Je určeno pro uchování buněčných linií a kmenových buněk v podmínkách velmi nízkých teplot a umožňuje snížení koncentrace potenciálně cytotoxického kryoprotektiva dimethylsulfoxidu DMSO. Dále se popisuje použití tohoto kryoprezervačního média a způsob kryoprezervace.

Kryoprezervační médium obsahující kyselinu hyaluronovou, jeho použití a způsob kryoprezervace

5 Oblast techniky

Vynález se týká složení, použití a přípravy zamrazovacího média pro dlouhodobé uchovávání buněčných linií kmenových buněk kryoprezervací. Médium obsahuje kyselinou hyaluronovou a/nebo její sodnou sůl, o hmotnostně střední molekulové hmotnosti v rozmezí 1 000 000 až 10 2 200 000 g/mol, v koncentraci 0,08 až 0,2 % (v/w), a DMSO v koncentraci 3 až 5 % (v/v).

Dosavadní stav techniky

15 Kryoprezervace je běžná metoda pro dlouhodobé uchovávání biologického materiálu pro následný výzkum či klinické použití. Kryoprezervace využívá nízkých teplot (-80 °C až -196 °C), při kterých dochází k pozastavení metabolických procesů. Optimální proces kryoprezervace je takový, kdy buňky po rozmrazení vykazují vysoký stupeň přežití, viabilitu a mají zachovanou svou funkčnost. Především u buněčných kultur kmenových buněk používaných pro terapeutické účely je nezbytné 20 zachování vysoké proliferační aktivity kryoprezervovaných buněk a také jejich pluripotence a genomické stability.

Proces kryoprezervace však může mít závažné následky na přežívání buněk. Z tohoto důvodu je nezbytné použít kryoprotektiva (CPA), látky, které snižují buněčné poškození během 25 kryoprezervace, ovlivňují integritu membrán a udržují rovnováhu iontových sil mezi intra- a extracelulárním prostorem. Nejčastěji používané kryoprotetivum dimethylsulfoxid (DMSO) má velmi úzké rozhraní účinku mezi cytoprotekcí a cytotoxicitou a existují pochyby o jeho biologické inertnosti (např. o vlivu na genovou expresi či epigenetické procesy).

30 Negativní efekt DMSO *in vitro* na kmenové buňky je závislý na dávce, při laboratorní teplotě už v rozmezí koncentrací 0,1 až 1 % (v/v) byl pozorován efekt na viabilitu, morfologii, buněčnou adhezi a diferenciaci (Pal *et al.*, 2012; Tunçer *et al.*, 2018). Kryoprezervované fetální jaterní progenitorové buňky měly sníženou expresi genů kmenovosti NANOG, OCT a SOX2 a buňky kostní dřeně měly 35 změněnou morfologii a funkci (Borisov *et al.*, 2014; Czysz *et al.*, 2015). Z těchto důvodů je snaha omezit působení DMSO na co nejnižší úroveň, snížit koncentraci DMSO či nahradit jej alternativním CPA (Awan *et al.*, 2020).

Většina takových alternativních kryoprotektiv se však v savčích buňkách nevyskytuje a jejich použití tedy vyžaduje přesnou znalost biokompatibility pro použití při kryoprezervaci. Jinak je 40 tomu u hyaluronanu (kyselina hyaluronové – HA), HA je hlavní a přirozenou komponentou nik kmenových buněk (mikroprostředí obklopující kmenové buňky) (Nevi *et al.*, 2017).

HA je nabitý hydrofilní nesulfatovaný lineární polysacharid, glykosaminoglykan (GAG) složený z opakujících se podjednotek disacharidů (β, 1-4)-glukuronové kyseliny (GlcUA) a (β, 1-3)-N-acetyl glukosaminu (GlcNAc). Délka polymeru, tedy molekulová hmotnost určuje fyziologické 45 vlastnosti HA, vazbu na ECM a buněčné receptory (např. CD44), a tak ovlivňuje kaskádu buněčné regulace (Monslow *et al.*, 2015).

Mechanismus kryoprotektivních účinků HA není znám. Vysoká hydratační kapacita HA 50 způsobující zpomalení růstu krystalů ledu a její velmi nízká cytotoxicita by však mohla být výhodná pro její použití v kryoprezervaci (Gurruchaga *et al.*, 2018; Ujihira *et al.*, 2010). Použití HA při kryoprezervaci je dáno fyzikálně-chemickými vlastnostmi HA plynoucími především z poměru koncentrace a molekulové hmotnosti HA.

V současné době je mj. známo řešení podle přihlášky EP 1648227, která cílí na použití HA jako viskoelastické substance s cytoprotektivním charakterem pro transport a uchovávání rohovky pro transplantace. V rámci přihlášky je ale popsáno, že kryoprotektivní vlastnosti jsou dány přidavkem DMSO, nikoliv HA.

5

Také postup kryoprezervace již je popsán v patentu EP 2885969 B1, který v určitých případech zmiňuje obsah HA při kryoprezervaci kmenových buněk. Patent naznačuje možnost, že HA je vhodnou složkou zamrazovacího média, avšak nezmiňuje se, jaká molekulová hmotnost (a případně jakého původu) je nejvhodnější. Tento postup se také opírá o kryoprotektivní vlastnosti jiných CPA, mj. propylenglykolu, sacharózy, případně i ostatních cukrů (např. etylenglykolu).

10

V patentu CN 110074096 B je popsáno složení bezsérového média s obsahem DMSO, hydroxyetylovaného škrobu (HES), katechinu, tetraborátu sodného, hyaluronanu 0,8% až 2% (w / v) a vitamínu C. V tomto patentu nejsou kryoprotektivní vlastnosti HA přímo prokázány, např. použití DMSO a HES je dlouhodobě používáno a není z patentu jasné, jaká MW HA byla použita a za jaké zlepšení kryoprezervace je HA odpovědná při použití vysoké koncentrace DMSO.

15

V přihlášce CN 113661977 A bylo také použito polyglutamové kyseliny, HA a trehalózy zmíněno, nicméně byla namítána absence inovativnosti právě díky použití trehalózy, jejíž kryoprotektivní vlastnosti jsou dlouhodobě známy. Je zmíněno, že při rutinním zkoušení by bylo možné odvodit použití trehalózy v kryomédiu, jak je popsáno v CN 112806354 A. V této přihlášce jsou opět mezi kryoprotektivy použity HA, trehalóza, Dextran, glukóza a HES. Vliv HA na účinnost kryoprezervace nebyl ani v této přihlášce samostatně stanoven, nevyplývá z ní tedy, zdali není účinnost dána ostatními komponentami kryomédia.

20

Patent CN 110839614 B zmiňuje hyaluronovou kyselinu, avšak pro oddělení buněk od sebe a pro umožnění buněčné migrace, proliferace a zabránění diferenciaci, nikoliv pro vlastní kryoprezervaci.

25

Patent KR 102274228 B1 zmiňuje použití sulfatované kyseliny hyaluronové, ale pro porovnání i použití nesulfatované HA v rozmezí 300 000 až 500 000 g/mol a koncentracích 0,1 až 2 mg/ml (w/v). Patent však nároky cílí na sulfatovanou HA a její soli.

35 Podstata vynálezu

Přestože se v odborné a patentové literatuře použití HA zmiňuje, nevyplývá z žádného uvedeného řešení postup kryoprezervace hMSC opírající se o kryoprotektivní vlastnosti HA zvyšující jejich aplikační potenciál a postup eliminace negativních účinků DMSO při kryoprezervaci hMSC pomocí HA.

40

Výše uvedené problémy jsou do značné míry vyřešeny v tomto vynálezu popisujícím kryoprezervační médium opírající se o kryoprotektivní vlastnosti kyseliny hyaluronové.

45

Předmětem tohoto vynálezu je použití nativní kyseliny hyaluronové rozpuštěné v solích pro kultivace jako kryoprezervačního roztoku pro kryoprezervaci kmenových buněk, buněčných linií a tkání z živých buněk.

Složkou kryoprezervačního roztoku je nativní kyselina hyaluronová a její sodná sůl s hmotnostně střední molekulovou hmotností 1 000 000 až 2 200 000 g/mol, s výhodou v rozmezí od 1 000 000 do 1 750 000 g/mol, výhodněji 1 500 000 g/mol.

50

Nativní kyselina hyaluronová a její sodná sůl je použita v tomto vynálezu v koncentraci 0,08 až 0,2 % (w/v), s výhodou 0,1 až 0,2 % (w/v), ještě výhodněji 0,1 % (w/v).

55

Složkou pro rozpuštění nativní kyseliny hyaluronové jsou soli pro kultivace, čímž se rozumí standardní média, jako jsou například Dulbekovo modifikované Eaglovo médium (DMEM), modifikované Eaglovo médium v alfa modifikaci (α -MEM), Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI-1640) a Hankův roztok vyvážených solí (HBSS), výhodněji RPMI-1640 a HBSS v modifikaci bez přídavku NaHCO_3 . Zbývající komponentou směsi je voda.

Buněčnými kulturami se rozumí aseptické kultury eukaryotických buněk živočichů, jako jsou epiteliální, nervové, epidermální buňky, keratinocyty, hematopoetické buňky, melanocyty, chondrocyty, imunitní buňky typu B a T, červené krvinky, makrofágy, monocyty, fibroblasty, svalové buňky a kmenové buňky, konkrétněji embryonální, mezenchymální a indukované pluripotentní kmenové buňky.

Tento vynález, kryoprezervační médium, je výhodný v tom, že nemusí obsahovat chemicky nedefinovanou složku fetální bovinní sérum (FBS).

Kryoprezervační médium se používá sterilní a složení dle tohoto vynálezu umožňuje terminální sterilizaci vlhkým teplem.

Kryoprezervační médium popsané v tomto vynálezu obsahuje sníženou koncentraci DMSO oproti běžně používané koncentraci, konkrétně 3 až 5 % oproti 10 % DMSO (v/v), výhodněji 3 % DMSO (v/v).

Dále se vynález týká použití kryoprezervačního média popsaného výše pro kryoprezervaci kmenových buněk, buněčných linií a tkání z živých buněk a způsobu kryoprezervace kmenových buněk, buněčných linií a tkání z živých buněk, za použití tohoto média, kde se nejprve k buněčným kulturám kmenových buněk, buněčným liniím nebo tkáním z živých buněk přidá kryoprezervační médium podle vynálezu a následně se tato směs pomalu zamrazí, například rychlostí 1 °C/min, pro následné uchování při -80 °C až -196 °C.

Použití kryoprezervačního média dle stávajícího vynálezu umožňuje snížení potřebné koncentrace DMSO a tím snížení negativních účinků DMSO na kryoprezervované kultury.

Použití kryoprezervačního média dle stávajícího vynálezu zvyšuje proliferační schopnost kryoprezervovaných kmenových buněk a tím vede k vyššímu počtu kmenových buněk získaných následnou kultivací.

Použití kryoprezervačního média dle stávajícího vynálezu udržuje povrchový fenotyp kmenových buněk a zvyšuje expresi povrchového markeru spojeného s proliferací a pluripotentností.

Použití kryoprezervačního média dle stávajícího vynálezu nemění schopnost kmenových buněk diferenciovat do různých vývojových buněčných linií.

Objasnění výkresů

Obr. 1 znázorňuje celkový počet buněk hMSC měřený pomocí CaSy cell counter (OMNI Life Science GmbH) po dvou týdnech kultivace. Data jsou zobrazena jako průměry a směrodatná odchylka znázorněna jako chybová úsečka.

Obr. 2 znázorňuje fenotypový profil povrchových receptorů hMSC vyhodnocený před kryoprezervací a dva týdny po rozmrazení. Graf reprezentuje procenta pozitivních buněk určených jako procento s fluorescenční intenzitou větší, než je 99,5 % negativní izotypové kontroly. Data jsou zobrazena jako průměry a směrodatná odchylka znázorněna jako chybová úsečka.

Obr. 3 znázorňuje immunocytochemické a histologické barvení pro stanovení diferenciačního potenciálu hMSC.

Obr. 4 vlevo znázorňuje celkový počet buněk hMSC měřený pomocí CaSy cell counter (OMNI Life Science GmbH) po dvou týdnech kultivace. Data jsou zobrazena jako průměry a směrodatná odchylka znázorněna jako chybová úsečka. Obr. 4 vpravo znázorňuje fenotypový profil povrchového receptoru hMSC vyhodnocený dva týdny po rozmrazení. Graf reprezentuje procenta pozitivních buněk určený jako procento s fluorescenční intenzitou větší, než je 99,5 % negativní izotypové kontroly. Data jsou zobrazena jako průměry a směrodatná odchylka znázorněna jako chybová úsečka.

Obr. 5 vlevo znázorňuje celkový počet buněk hMSC měřený pomocí CaSy cell counter (OMNI Life Science GmbH) po dvou týdnech kultivace. Data jsou zobrazena jako průměry a směrodatná odchylka znázorněna jako chybová úsečka. Obr. 5 vpravo znázorňuje fenotypový profil povrchového receptoru hMSC vyhodnocený dva týdny po rozmrazení. Graf reprezentuje procenta pozitivních buněk určený jako procento s fluorescenční intenzitou větší, než je 99,5 % negativní izotypové kontroly. Data jsou zobrazena jako průměry a směrodatná odchylka znázorněna jako chybová úsečka.

Obr. 6 vlevo znázorňuje celkový počet buněk hMSC měřený pomocí CaSy cell counter (OMNI Life Science GmbH) po dvou týdnech kultivace. Data jsou zobrazena jako průměry a směrodatná odchylka znázorněna jako chybová úsečka. Obr. 6 vpravo znázorňuje fenotypový profil povrchového receptoru hMSC vyhodnocený dva týdny po rozmrazení. Graf reprezentuje procenta pozitivních buněk určený jako procento s fluorescenční intenzitou větší, než je 99,5 % negativní izotypové kontroly. Data jsou zobrazena jako průměry a směrodatná odchylka znázorněna jako chybová úsečka.

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

Buněčné kultury mezenchymálních kmenových buněk byly kryoprezervovány. Metoda kryoprezervace se skládá z přidavku kryoprezervačního média ke vzorku a následně nekontrolované kryoprezervace pomalým zamrazením rychlostí 1 °C/min, pro uchování vzorku v nízkých teplotách (-80 °C až -196 °C). Kryoprezervovaná kultura kmenových buněk je po době uchování oživena rozmrazením ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 2 minut a následně je od buněčné suspence kryoprezervační médium odmyto centrifugací. Poté jsou buňky nasazeny na kultivační láhev a kultivovány po dobu dvou týdnů.

Pro kryoprezervaci bylo použito 4 různých kombinací kryoprotektivního média obsahujícího kyselinu hyaluronovou o MW 1 500 000 g/mol ve dvou koncentracích 0,1 a 0,2 % (w/v) s přidavkem 5 nebo 3 % DMSO (v/v) rozpuštěných ve standardním médiu α -MEM. Kompozice obsahující 5, 3 nebo 10 % (v/v) DMSO v médiu sloužila jako kontrola kryoprezervace. Snížená koncentrace DMSO na 5 až 3 % (v/v) se projevila na nižší efektivitě přežití a proliferace MSCs.

Překvapivě, obohacení kryoprezervačního média o 0,1 či 0,2 % (w/v) HA o MW 1 500 000 g/mol vedlo k nárůstu v efektivitě přežití a proliferace kmenových buněk. Oproti očekávání vyšší účinnosti vyšší koncentrace HA (0,2 % (w/v)) a vyšší koncentrace DMSO (5 % (v/v)) byl počet kryoprezervovaných kmenových buněk nejvyšší v kombinaci 3 % DMSO (v/v) a 0,1 % HA (w/v) o MW 1 500 000 g/mol a po dvou týdnech kultivace přesáhl úroveň nejen své kontroly (3 % DMSO (v/v)), ale i 10 % DMSO (v/v) (obr. 1).

Zatímco vysoká exprese markerů CD73 a CD90 nebyla nijak ovlivněna složením kryoprezervačního média, pozorovali jsme nárůst CD49f markeru u buněk kryoprezervovaných

pomocí 3 % DMSO a 0,1 % HA o MW 1 500 000 g/mol, spojený pravděpodobně s vyšší proliferací aktivitou (obr. 2).

5 V základním testu diferenciaci hMSC do chondrogenní a osteogenní buněčné linie nebyly pozorovány imunocytochemickým barvením rozdíly mezi kryomédií. Buňky kryoprezervované pomocí 3 % DMSO (v/v) a 0,1 % HA (w/v) o MW 1 500 000 g/mol byly schopny diferenciaci do chondrogenní a osteogenní buněčné linie (obr. 3).

10 Kompozice kryoprezervačního média 3 % DMSO (v/v) a 0,1 % HA (w/v) o MW 1 500 000 g/mol je tedy účinná pro kryoprezervaci kmenových buněk a je bezpečná pro zachování klíčových a unikátních vlastností MSCs – vysoké proliferční aktivity a pluripotentnosti a umožňuje tak snížení koncentrace DMSO.

Příklad 2

15 Buněčné kultury mezenchymálních kmenových buněk hMSC byly kryoprezervovány. Metoda kryoprezervace se skládá z přidavku kryoprezervačního média ke vzorku a následné nekontrolované kryoprezervace pro uchování vzorku v nízkých teplotách (-80 °C až -196 °C). Kryoprezervovaná kultura kmenových buněk je po době uchování oživena rozmrazením ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 2 minut a následně je od buněčné suspence kryoprezervační médium odmyto centrifugací. Poté jsou buňky nasazeny na kultivační láhev a kultivovány.

25 Pro kryoprezervaci kmenových buněk bylo použito různých molekulových hmotností kyseliny hyaluronové od 800 do 2 120 000 g/mol v koncentraci 0,1 % (w/v) s přidavkem 3 % DMSO (v/v) rozpuštěných ve standardním médiu pro kultivaci buněk DMEM. Pro porovnání účinnosti bylo každé složení kryoprezervačního média srovnáno s médiem obsahujícím 10 % a 3 % DMSO (v/v) a 3 % DMSO (v/v) spolu s 0,1 % HA (w/v) o MW 1 500 000 g/mol.

30 Oproti pozorovanému nárůstu celkového počtu hMSC v kryoprezervačním médiu s kombinací 3 % DMSO (v/v) a 0,1 % HA (w/v) nebyl takový nárůst oproti kontrole s 3 % DMSO (v/v) pozorován u kombinací s HA o MW od 800 do 130 000 g/ml po dvou týdnech kultivace od rozmrazení. Částečný nárůst v počtu buněk u kombinace HA o MW 130 000 g/ml a 3 % DMSO (v/v) nebyl překvapivě reflektován u exprese povrchového markeru CD49f oproti kombinaci 3 % DMSO (v/v) a 0,1 % HA (w/v) o MW 1 500 000 g/mol (obr. 4).

35 U kombinací kryoprezervačního média s HA o MW od 260 000 do 800 000 g/ml po dvou týdnech kultivace od rozmrazení byl nárůst počtu buněk již pozorován, překvapivě však nedosahoval takového rozsahu jako u kombinace kryoprezervačního média 3 % DMSO (v/v) a 0,1 % HA (w/v) o MW 1 500 000 g/mol, přestože již byl nárůst exprese povrchového markeru CD49 patrný (obr. 5).

40 U kombinací kryoprezervačního média s HA o MW 2 070 000 až 2 120 000 g/mol po dvou týdnech kultivace od rozmrazení nebyl nárůst počtu buněk oproti kombinaci kryoprezervačního média 3 % DMSO (v/v) a 0,1 % HA (w/v) o MW 1 500 000 g/mol rozdílný. Taktéž nárůst exprese povrchového markeru CD49 je u těchto kombinací kryoprezervačního média s HA stejný jako u kombinace kryoprezervačního média 3 % DMSO (v/v) a 0,1 % HA (w/v) o MW 1 500 000 g/mol (obr. 6).

50 Kompozice kryomédia 3 % DMSO/0,1 % HA je tedy účinná pro kryoprezervaci kmenových buněk a je bezpečná pro zachování klíčových a unikátních vlastností MSCs – vysoké proliferční aktivity a pluripotentnosti, a umožňuje tak snížení koncentrace DMSO.

Příklad 3

Buněčné kultury mezenchymálních kmenových buněk byly kryoprezervovány. Metoda kryoprezervace se skládá z přidavku kryoprezervačního média ke vzorku a následné nekontrolované kryoprezervace pro uchování vzorku v nízkých teplotách (-80 °C až -196 °C). Kryoprezervovaná kultura kmenových buněk je po době uchování oživena rozmrazením ve vodní lázni o teplotě 37 °C po dobu 2 minut a následně je od buněčné suspence kryoprezervační médium odmyto centrifugací. Poté jsou buňky nasazeny na kultivační láhev a kultivovány po dobu dvou týdnů.

Pro kryoprezervaci bylo použito kryoprotektivního média obsahujícího kyselinu hyaluronovou o MW 1 500 000 g/mol v koncentraci 0,08 a 0,1 % (w/v) s přidavkem 5 nebo 3 % DMSO (v/v) rozpuštěných ve standardním médiu RPMI-1640. Kompozice obsahující 3 nebo 10 % (v/v) DMSO v médiu sloužila jako kontrola kryoprezervace. Počet kryoprezervovaných kmenových buněk získaných po dvou týdnech kultivace, stejně jako viabilita buněk a exprese markerů CD49f, CD70 a CD90 byly srovnatelné s kryoprezervačním médiem podle příkladu 1.

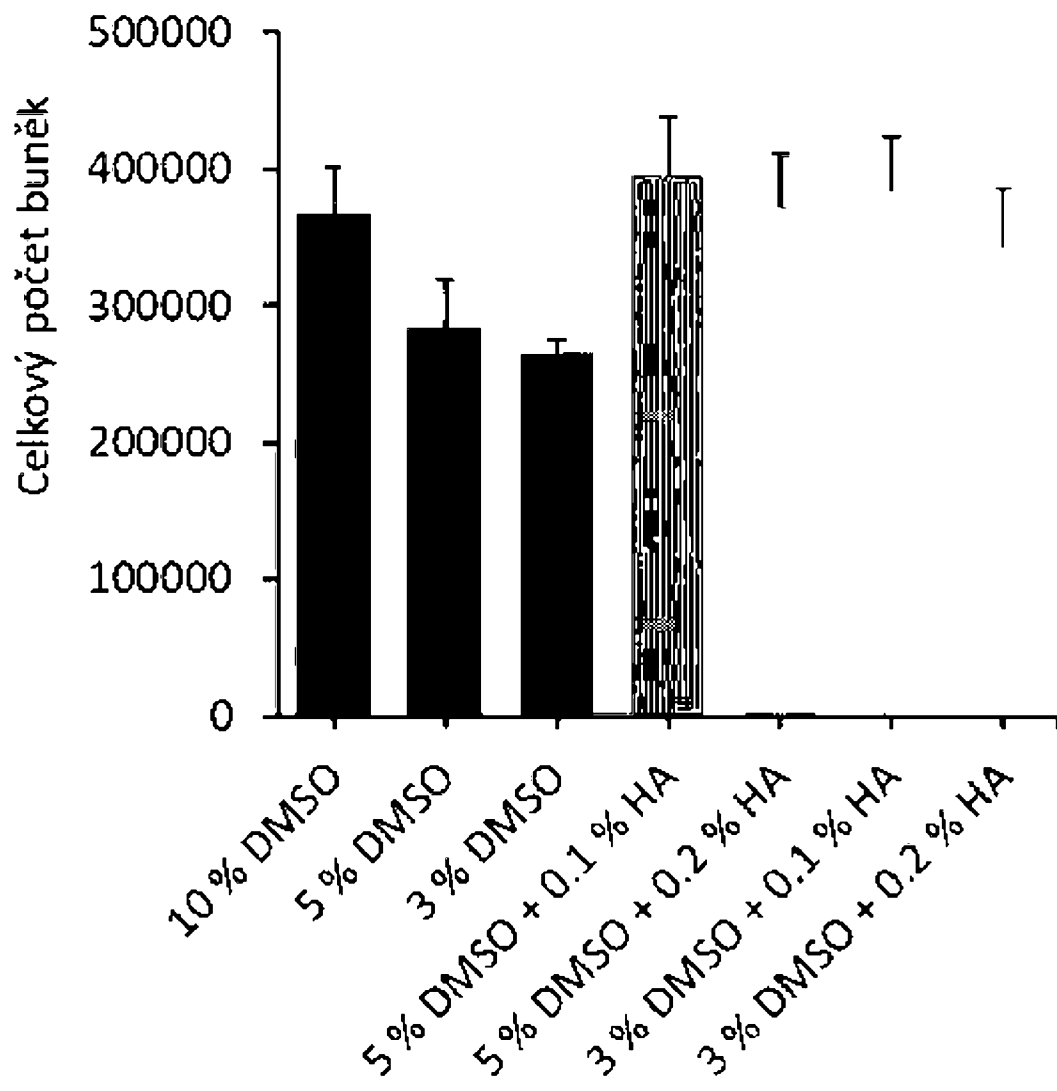
Reference:

- Awan, M., Buriak, I., Fleck, R., Fuller, B., Goltsev, A., Kerby, J., Lowdell, M., Mericka, P., Petrenko, A., Petrenko, Y., et al. (2020). Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regen. Med.* 15, 1463-1491.
- Borisov, P.A., Dimitrov, A.Y., Ostankov, M.V., and Goltsev, A.N. (2014). Effect of Different DMSO Concentrations on Expression Level of Stemness Genes in Mice Fetal Liver Stem Cells Prior to and after Cryopreservation. *Probl. Cryobiol. Cryomedicine* 24, 185.
- Czys, K., Minger, S., and Thomas, N. (2015). DMSO efficiently down regulates pluripotency genes in human embryonic stem cells during definitive endoderm derivation and increases the proficiency of hepatic differentiation. *PloS One* 10, e0117689.
- Gurruchaga, H., Saenz del Burgo, L., Orive, G., Hernandez, R.M., Ciriza, J., and Pedraz, J.L. (2018). Low molecular-weight hyaluronan as a cryoprotectant for the storage of microencapsulated cells. *Int. J. Pharm.* 548, 206-216.
- Monslow, J., Govindaraju, P., and Puré, E. (2015). Hyaluronan – A Functional and Structural Sweet Spot in the Tissue Microenvironment. *Front. Immunol.* 6, 231.
- Nevi, L., Cardinale, V., Carpino, G., Costantini, D., Di Matteo, S., Cantafora, A., Melandro, F., Brunelli, R., Bastianelli, C., Aliberti, C., et al. (2017). Cryopreservation protocol for human biliary tree stem/progenitors, hepatic and pancreatic precursors. *Sci. Rep.* 7, 6080.
- Pal, R., Mamidi, M.K., Das, A.K., and Bhonde, R. (2012). Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells. *Arch. Toxicol.* 86, 651-661.
- Tunçer, S., Gurbanov, R., Sheraj, I., Solel, E., Esenturk, O., and Banerjee, S. (2018). Low dose dimethyl sulfoxide driven gross molecular changes have the potential to interfere with various cellular processes. *Sci. Rep.* 8, 14828.
- Ujihira, M., Iwama, A., Aoki, M., Aoki, K., Omaki, S., Goto, E., and Mabuchi, K. (2010). Cryoprotective effect of low-molecular-weight hyaluronan on human dermal fibroblast monolayers. *Cryo Letters* 31, 101-111.

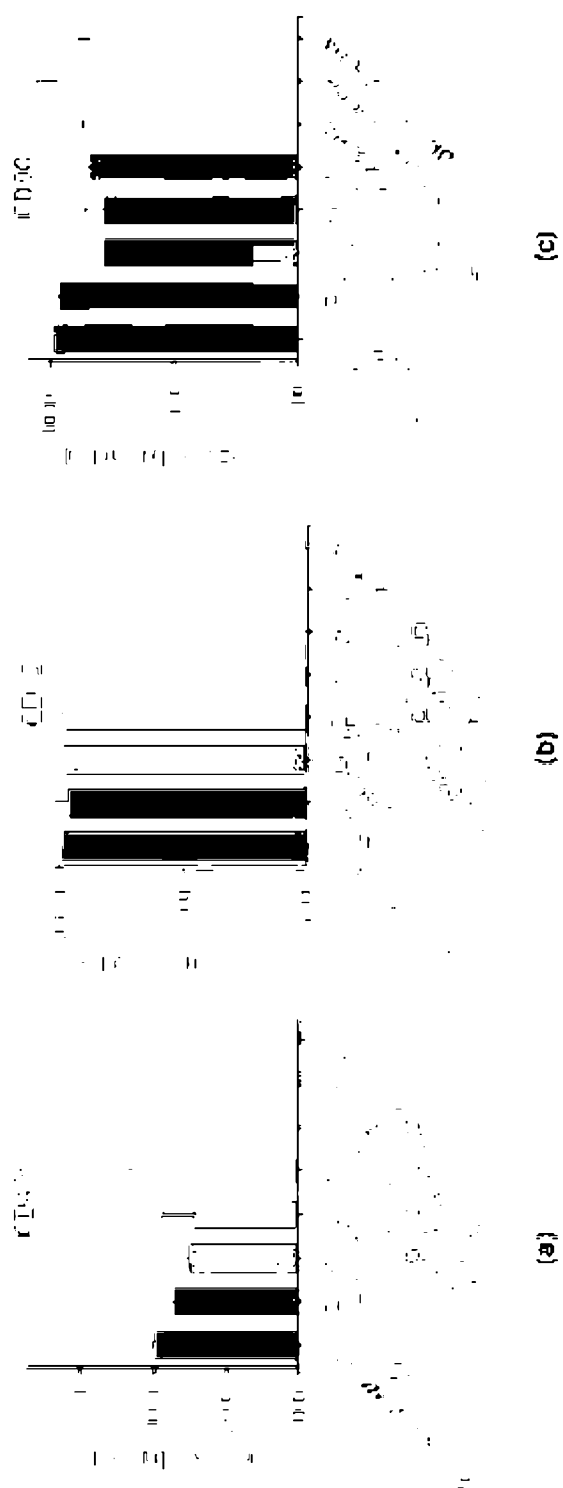
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kryoprezervační médium pro kryoprezervaci kmenových buněk, buněčných linií a tkání z živých buněk, obsahující kyselinu hyaluronovou a/nebo její sodnou sůl a DMSO, **vyznačující se tím**, že kyselina hyaluronová a její sodná sůl má hmotnostně střední molekulovou hmotnost v rozmezí 1 000 000 až 2 200 000 g/mol a přičemž kyselina hyaluronová a její sodná sůl je v médiu přítomna v koncentraci 0,08 až 0,2 % (v/v), a že DMSO je v médiu přítomen v koncentraci 3 až 5 % (v/v).
2. Kryoprezervační médium podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že kyselina hyaluronová a její sodná sůl mají molekulovou hmotnost v rozmezí od 1 000 000 do 1 750 000 g/mol.
3. Kryoprezervační médium podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že kyselina hyaluronová a její sodná sůl mají molekulovou hmotnost 1 500 000 g/mol.
4. Kryoprezervační médium podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že kyselina hyaluronová a její sodná sůl jsou přítomny v koncentraci 0,1 % (v/w).
5. Kryoprezervační médium podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že DMSO je přítomen v koncentraci 3 % (v/v).
6. Kryoprezervační médium podle kteréhokoliv z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že kyselina hyaluronová a její sodná sůl jsou rozpuštěny ve standardním médiu vybraném ze skupiny obsahující DMEM, MEM v alfa modifikaci, RPMI-1640 a HBSS.
7. Kryoprezervační médium podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že kyselina hyaluronová a její sodná sůl jsou rozpuštěny v RPMI-1640 nebo HBSS v modifikaci bez přídavku NaHCO_3 .
8. Použití kryoprezervačního média definovaného v kterémkoliv z nároků 1 až 7 pro kryoprezervaci kmenových buněk, buněčných linií a tkání z živých buněk.
9. Způsob kryoprezervace kmenových buněk, buněčných linií a tkání z živých buněk, **vyznačující se tím**, že zahrnuje kroky:
- a) k buněčným kulturám kmenových buněk, buněčným liniím nebo tkáním z živých buněk se přidá kryoprezervační médium definované v kterémkoliv z nároků 1 až 7,
 - b) buněčné kultury, buněčné linie nebo tkáně v kryoprezervačním médiu z kroku a) se pomalu zamrazí pro následné uchovávání při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

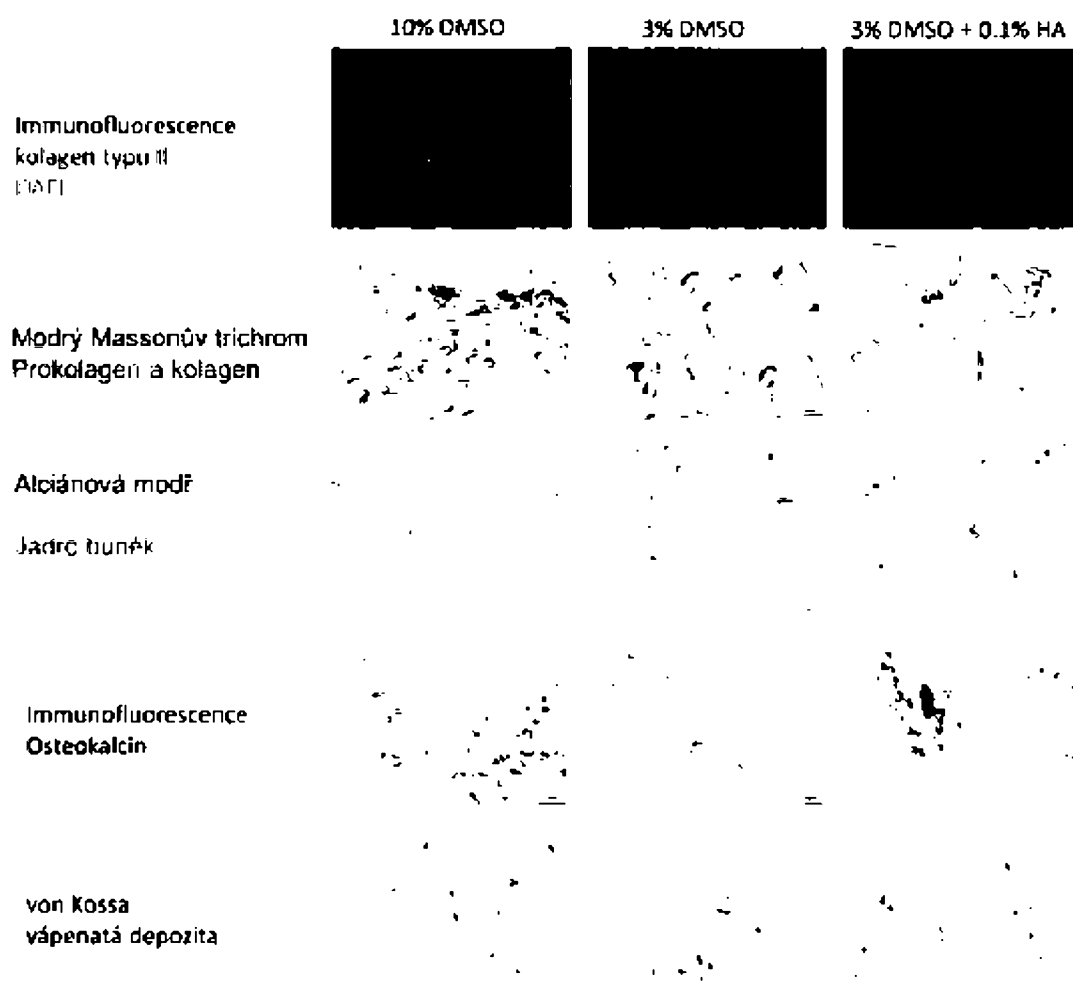
6 výkresů



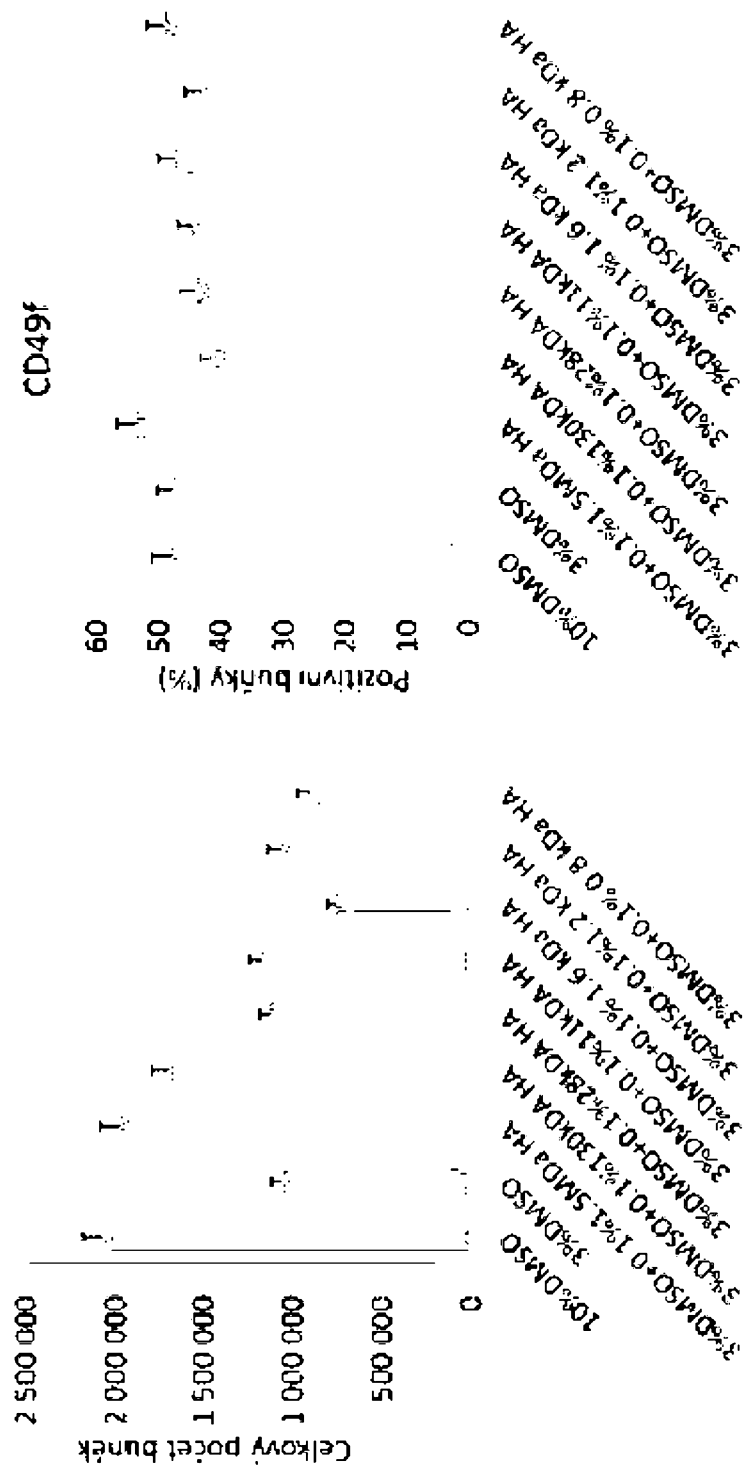
Obr. 1



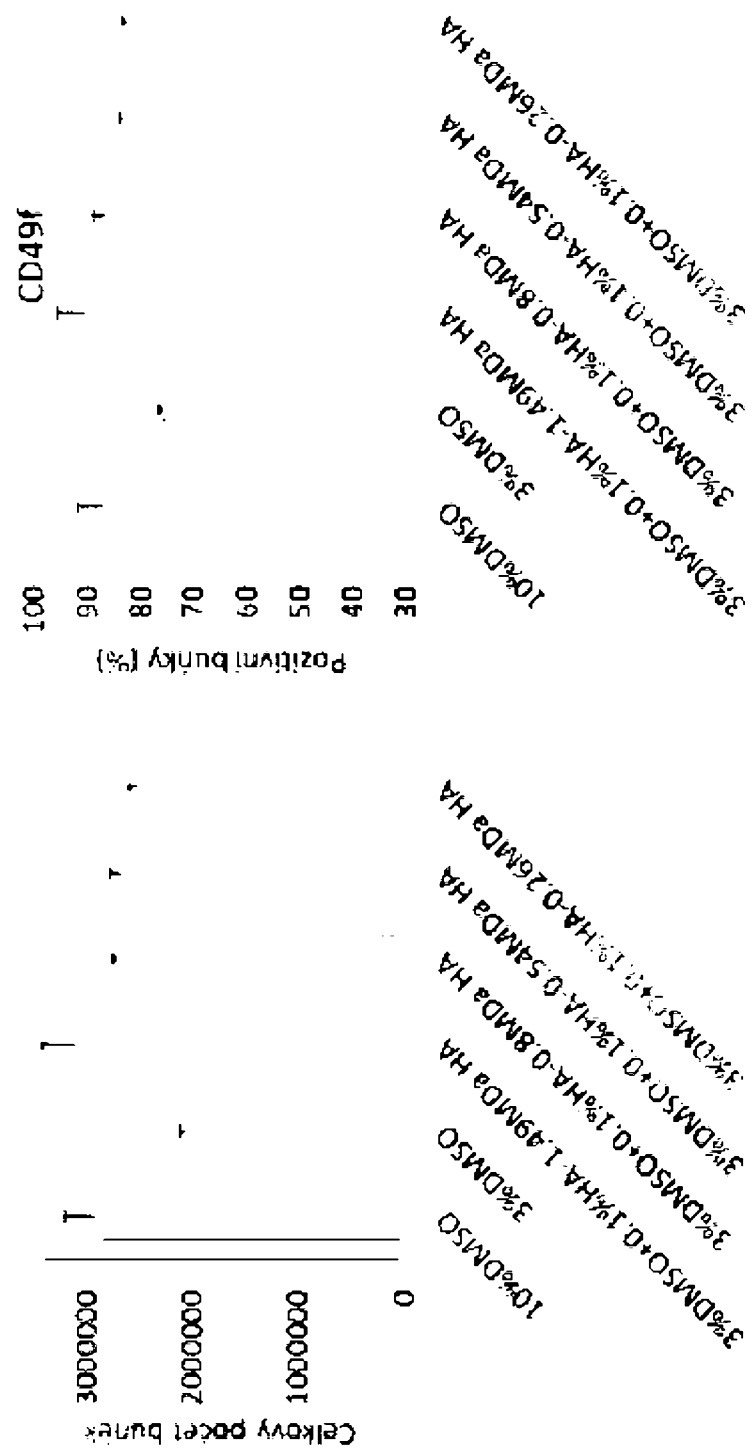
Obr. 2



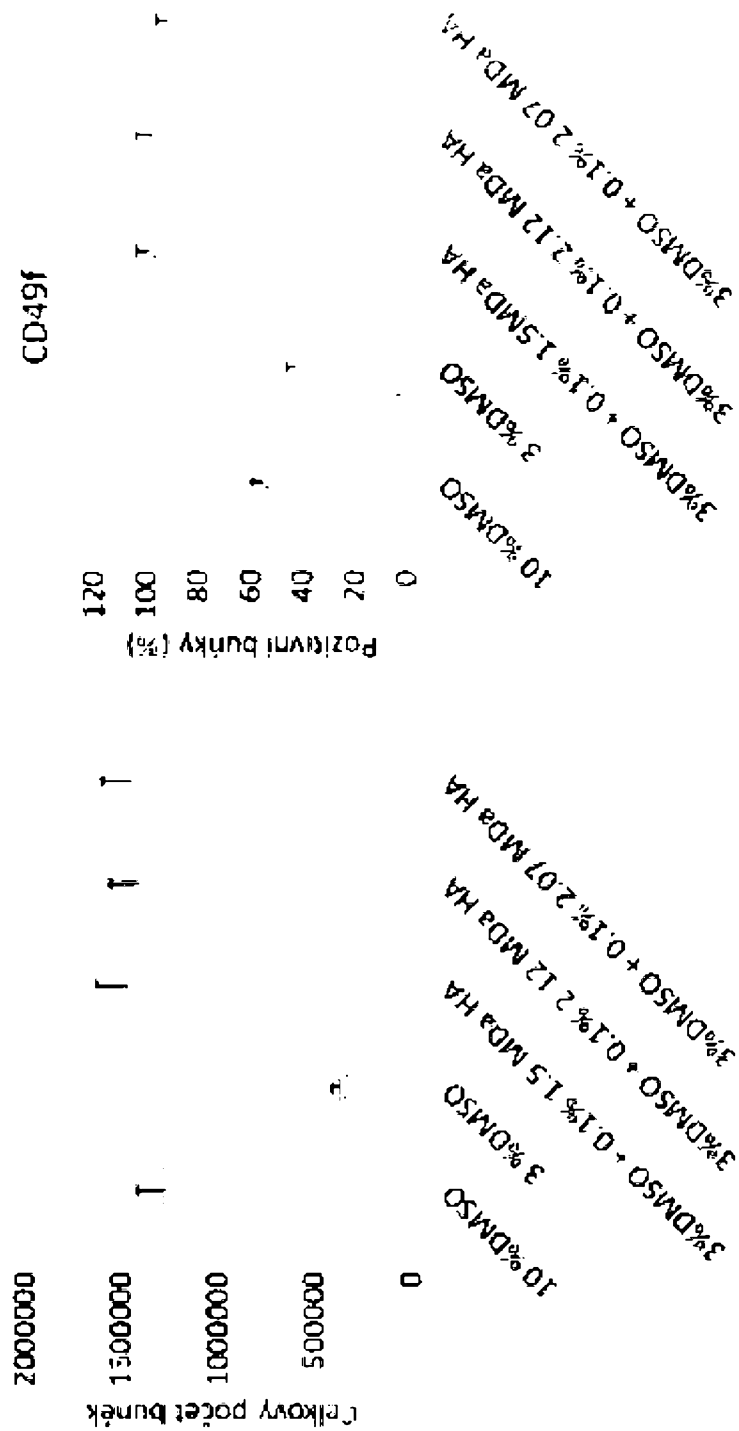
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6