

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

308 154

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C01G 49/02 (2006.01)
C01G 51/04 (2006.01)
C01G 9/02 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
B82B 1/00 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2015-606**
(22) Přihlášeno: **04.09.2015**
(40) Zveřejněno: **14.06.2017**
(Věstník č. 24/2017)
(47) Uděleno: **18.12.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **29.01.2020**
(Věstník č. 5/2020)

(56) Relevantní dokumenty:
CZ 2012-813 B; CN 101256863; CZ 2011-763.

- (73) Majitel patentu:
Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i.,
Praha 4 Krč, CZ
Fyzikální ústav AV ČR, v. v. i., Praha 8, Libeň, CZ
Institut Klinické a Experimentální Medicíny, Praha
4, CZ
- (72) Původce:
Vít Herynek, Zápy, CZ
Karolína Turnovcová, Praha 2, CZ
Eva Syková, Praha 6, CZ
Pavla Jendelová, Středokluky, CZ
Jakub Koktan, Olbramice, CZ
Miroslav Veverka, Mníšek pod Brdy, CZ
Pavel Veverka, Praha 5, CZ
Pavel Žvátora, Plumlov, CZ
- (74) Zástupce:
VYNÁLEZ s.r.o., Vinohradská 17, 120 00 Praha 2
Vinohrady

viabilitu ani diferenční potenciál. Další výhodou je, že přítomnost nanočástic nezpůsobuje v buňce poškození DNA, lipidů a proteinů. Jsou proto vhodné k in vivo sledování transplantovaných buněk pomocí zobrazování magnetickou rezonancí a optickými metodami.

- (54) Název vynálezu:
Nanočástice pro magnetické a fluorescenční značení buněk, způsob přípravy a použití

- (57) Anotace:
Předkládané řešení poskytuje způsob značení buněk a zobrazování pomocí multifunkční vodné suspenze kobaltatozinečnatých feritových nanočástic. Hybridní nanočástice spinelové, feritové fáze obecného vzorce $\text{Co}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_{4+y}$, kde x je 0,2 až 0,8, opatřených souvislou vrstvou hydratovaného oxidu křemičitého s navázanou fluorescenční značkou, s výhodou fluoresceinisothiokyanátu (FITC), který jednak zajišťuje stabilitu jejich vodných suspenzí a neškodnost v organismu svým biokompatibilním povrchem a jednak umožňuje zobrazování značených buněk fluorescenčním mikroskopem. Ve srovnání se stávajícími materiály vykazují výrazně zvýšenou transversální relaxivitu a tím i vyšší kontrast při zobrazení magnetickou rezonancí. Jsou proto využitelné v biologii a v medicíně pro značení transplantovaných buněk, zejména mezenchymových kmenových buněk, neboť značení neovlivňuje ani jejich

CZ 308154 B6

Nanočástice pro magnetické a fluorescenční značení buněk, způsob přípravy a použití

Oblast techniky

5

Vynález se týká využití biokompatibilních ferimagnetických kobalt-natozinečnatých feritových nanočástic krystalujících ve strukturním typu spinelu pro vybrané medicínální aplikace (značení buněk před transplantací do živého organismu, neinvazivní sledování implantátu v těle příjemce pomocí magnetické rezonance a optického zobrazování in vivo, sledování buněk in vitro a ex vivo pomocí fluorescenční mikroskopie), především tam, kde je vyžadováno dlouhodobé monitorování distribuce značených transplantovaných buněk v těle příjemce, jako je transplantace buněk do ischemických a traumatických lézí, použití kmenových buněk v degenerativních a metabolických onemocněních a to jak v experimentálních modelech, tak ve veterinární i lidské medicíně.

15

Nanočástice pro magnetické a fluorescenční značení buněk jsou připravovány kovalentním navázáním fluorescenční značky do obalu hydratovaného oxidu křemičitého částic složených z jader feritů a souvislé vrstvy z hydratovaného oxidu křemičitého. Feritová jádra jsou připravována koprecipitací s následným mechanickým a tepelným zpracováním. Jádra jsou enkapsulována do hydratovaného oxidu křemičitého modifikovaným postupem bazické polykondenzace alkylsiloxanů. Postup přípravy jader a jejich enkapsulace do hydratovaného oxidu křemičitého byl popsán v patentu CZ 307623. Na feritová jádra obalená hydratovaným oxidem křemičitým je pomocí adiční reakce navázáno fluorescenční činidlo. Následná enkapsulace do hydratovaného oxidu křemičitého pomocí polykondenzační reakce alkylsiloxanů zajišťuje stabilitu navázání fluorescenčního činidla.

Takto připravené nanočástice jsou přidány do media s buněčnými kulturami buď samotné nebo v kombinaci s transfekčními činidly, které zkracují dobu inkubace potřebnou pro značení buněk. Nanočástice lze kombinovat i s mikroporačními technikami. Označené buňky jsou podány příjemci a díky získanému magnetickému a fluorescenčnímu značení mohou být in vitro sortovány průtokovou cytometrií, po podání do živého organismu sledovány v těle příjemce magnetickou rezonancí nebo optickým zobrazováním a ex vivo detekovány fluorescenční mikroskopií.

35

Dosavadní stav techniky

Neinvazivní sledování transplantovaných buněk

Pokroky v buněčné terapii, vedoucí k rozvoji klinických studií, vyžadují zásadní použití neinvazivní techniky pro monitorování účinnosti buněčné terapie a přežití štěpu v hostitelském organismu, s cílem odhalit nebezpečné vedlejší účinky, jako například hyperproliferaci nebo migraci do nežádoucích struktur. V případě experimentálních zvířecích modelů je vždy po skončení experimentu provedena histologická analýza transplantované tkáně, což není v klinické praxi myslitelné. V posledních letech se proto rozvinuly různé zobrazovací metody, jako například pozitronová emisní tomografie (PET), optické zobrazování nebo magnetická rezonance (Modo, M.: Current opinion in organ transplantation, 13 (2008) 654). Pro klinickou praxi se nejlépe hodí poslední jmenovaná, neboť PET má horší prostorové rozlišení (Luker, GD. a Piwnica-Worms D.: Academic radiology, 8 (2001) 4) a pracuje s izotopickými sondami, které mají relativně krátký poločas rozpadu, zatímco optické zobrazování je velmi citlivou metodou ve studiích využívajících malá laboratorní zvířata, ale díky omezené penetraci vlnových délek emitovaných fluorochromy do tkáně je použitelné pouze v povrchových vrstvách (Mahmood, U. a Weissleder, R: Molecular cancer therapeutics, 2 (2003) 489). Magnetická rezonance (MR) má několik výhod: výborné rozlišení (až 100 μm), není limitována velikostí pacienta a nevyžaduje použití izotopicky značených sond. Kontrastní látky v mikromolárních koncentracích mění

relaxační časy sousedních protonů vody a zvyšují tak kontrast. Mohou měnit kontrast T_1 i T_2 vážených obrazů. Paramagnetické látky zkracují zejména T_1 relaxaci vody, zatímco superpara-, ferro- a ferri- magnetické látky mají dominantní vliv na T_2 relaxaci.

5 Značení buněk nanočásticemi

Nejčastěji používané superparamagnetické kontrastní látky pro magnetickou rezonanci jsou na bázi oxidů železa (SPIO). Seznam komerčních kontrastních látek zahrnuje ferumoxidy obalené dextranem (Endorem[®], Feridex[®]), ferucarbotran (Resovist[®]), ferumoxan (Sinerem[®], Combidex[®]), ferumoxsil (Lumirem[®], Gastromark[®]). Všechny tyto kontrastní látky byly vyvinuty k zobrazování orgánů pro rutinní klinická vyšetření, ale začaly se používat i ke značení buněk (Corot, C. et al.: Advanced drug delivery reviews, 58 (2006) 1471). Liší se hlavně svojí velikostí a povrchem, což ovlivňuje zejména jejich endocytózu. Většina komerčních látek nemá ideální vlastnosti z hlediska značení buněk, většinou se jedná o malou účinnost značení, případně má jejich přítomnost v buňce negativní efekt na buněčnou diferenciaci nebo růst.

Obecně platí, že pro maximální kontrast intracelulárně značených buněk je důležitým parametrem počet částic absorbovaných buňkami. Endocytózu komerčních kontrastních látek lze zlepšit transfekčními činidly (Arbab, AS. et al.: Radiology, 229 (2003) 838), která zvyšují účinnost značení zkracují dobu nezbytnou pro příjem nanočástic do buněk. Endocytóza nanočástic přes buněčnou membránu může být rovněž usnadněna použitím elektroporace (Gilad, AA. et al.: Magn Reson Med, 60 (2008) 1), specifickým cílením a endocytózou nanočástic přes receptory transferinu (Bulte, JW. et al.: Proc. Nat. Acad. Sci. 96, (1999) 15256), magnetodendrimery (Bulte, JW. et al.: Academie radiology, 9 Suppl 2 (2002) S332) nebo transdukčními činidly, jako je např. TAT protein odvozený od HIV (Kircher, MF. et al.: Cancer research, 63 (2003) 6838). Pro klinické aplikace jsou s výhodou používány takové kontrastní látky, které neobsahují jiné přísady k usnadnění endocytózy, čímž odpadá nutnost schvalování dalšího přípravku pro lékařské použití.

Dalším aspektem značení buněk kontrastními látkami je jejich vliv na regenerační potenciál kmenových buněk po transplantaci. Bylo pozorováno, že značení lidských neurálních kmenových buněk magnetickými nanočásticemi neovlivnilo jejich přežití, migraci nebo dělení a nedošlo ke změně elektrofyziologické vlastnosti neuronů (Guzman, R. et al.: Proc. Nat. Acad. Sci. 104, (2007) 10211). Nedávná studie na neurálních kmenových buňkách naproti tomu ukázala, že buňky značené komplexem gadolinium-rhodamin-dextran transplantované po iktu do kontralaterální hemisféry nemigrovaly do oblasti penumbry a ani nijak významně nezlepšily deficit chování ve srovnání s buňkami značenými pouze fluorescenčním barvivem. Naopak, 1 rok po transplantaci došlo k mírnému nárůstu velikosti léze. Tato práce zdůraznila nezbytnost dlouhodobých studií, protože většina používaných kontrastních látek nebyla původně určena pro zobrazování buněk (Modo, M. et al.: NeuroImage, 47 Suppl 2, (2009) T133).

Tento vynález řeší problematiku značení buněk nanočásticemi pro neinvazivní sledování buněk pomocí magnetické rezonance a optického zobrazování a současně detekci buněk in vitro fluorescenčním mikroskopem. Nanočástice nevykazují vedlejší cytotoxické a genotoxické účinky, a přitom je citlivost detekce díky jejich vysoké relaxivitě vyšší. Bimodální látky pro značení buněk s navázanou fluorescenční značkou mohou sloužit k detekci transplantovaných buněk v těle příjemce magnetickou rezonancí in vivo a současně k detekci buněk ve tkáni pomocí histologie fluorescenčním mikroskopem.

50

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu jsou bimodální nanočástice CZF-F, připravené modifikací feritových jader enkapsulovaných do hydratovaného oxidu křemičitého pomocí fluorescenčního činidla, a způsob jejich použití pro značení a sledování buněk in vivo pomocí magnetické rezonance a optického

55

zobrazování, a in vitro pomocí fluorescenční mikroskopie. Vynález využívá feritová jádra obecného vzorce $\text{Co}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_{4+y}$ (CZF), kde x je 0,2 až 0,8, s výhodou 0,4 až 0,6 opatřených souvislou vrstvou hydratovaného oxidu křemičitého v tloušťce v rozmezí 1 až 100 nanometrů (viz dokument CZ 307623).

5

Nanočástice pro magnetické a fluorescenční značení buněk se skládají z jader opatřených hydrofilním obalem zajišťujícím biokompatibilitu materiálu s možností navázání fluorescenčního činidla. Obal jader zajišťuje fluorescenční signál a stabilitu vodných suspenzí nanočástic v rozsahu hodnot pH 5 až pH 9, v souladu s biologickým prostředím.

10

Připravené nanočástice CZF-F v koncentraci 0,02 až 0,3 mmol.dm⁻³(CZF) nesnižují životaschopnost buněk, neovlivňují fyziologické funkce (například diferenciační potenciál u multipotentních kmenových buněk) a nejsou genotoxické (nepůsobují poškození DNA, lipidů ani proteinů). Připravené nanočástice jsou určeny pro značení živých buněk, vhodných pro
15 buněčnou terapii ve zvířecích experimentálních modelech i ve veterinární a klinické medicíně, jako je transplantace buněk do ischemických a traumatických lézí (například iktus, srdeční ischemie, míšni poranění), degenerativních onemocnění (například, artróza kloubů), neurodegenerativních onemocnění (ALS), metabolických chorob (diabetes, ateroskleróza). Živý příjemce je experimentální model (laboratorní zvíře) nebo pacient veterinární nebo humánní
20 medicíny. Post mortem nebo ex vivo (biopsie) lze buňky označené CZF-F detekovat ve tkáni příjemce pomocí fluorescenční mikroskopie.

Po podání buněk s obsahem nanočástic v cytoplazmě je možné neinvazivní metodou, pomocí magnetické rezonance a optického zobrazování, sledovat pohyb značených buněk v těle příjemce
25 a následně je detekovat pomocí fluorescenčního mikroskopu ex vivo v biopsiích a histologických vzorcích.

Připravené nanočástice CZF-F představují vhodný materiál ke sledování distribuce a průběhu cesty buněk transplantovaných do organismu, včetně jejich in vivo migrace s možností ověření
30 účinnosti značení před transplantací pomocí průtokového cytometru nebo fluorescenčního mikroskopu a následně post mortem nebo z biopsie histologicky pomocí fluorescenčního mikroskopu. Připravené nanočástice CZF-F jsou vhodné pro neinvazivní sledování značených buněk v těle příjemce a slouží a) ke značení adherentních buněk ex vivo (mezenchymových kmenových buněk z kostní dřeně, placenty, pupečnickové tkáně, tukové tkáně, buněk olfaktorické
35 glie z čichového epitelu, neurálních progenitorových buněk, indukovaných pluripotentních buněk a jejich derivátů, embryonálních kmenových buněk a jejich derivátů, endoteliálních buněk, Langerhansových ostrůvků, fibroblastů a nádorových linií); b) k ověření účinnosti značení pomocí průtokové cytometrie a případného výběru pouze značených buněk (mezenchymových kmenových buněk z kostní dřeně, placenty, pupečnickové tkáně, tukové tkáně, buněk olfaktorické
40 glie z čichového epitelu, neurálních progenitorových buněk, indukovaných pluripotentních buněk a jejich derivátů, embryonálních kmenových buněk a jejich derivátů, endoteliálních buněk, Langerhansových ostrůvků, fibroblastů a nádorových linií); c) k podání značených buněk (mezenchymových kmenových buněk z kostní dřeně, placenty, pupečnickové tkáně, tukové tkáně, buněk olfaktorické glie z čichového epitelu, neurálních progenitorových buněk, indukovaných
45 pluripotentních buněk a jejich derivátů, embryonálních kmenových buněk a jejich derivátů, endoteliálních buněk, Langerhansových ostrůvků, fibroblastů a nádorových linií) živému příjemci (zvířeti nebo člověku s ischemickou nebo traumatickou lézí, s degenerativním, neurodegenerativním, nádorovým nebo metabolickým onemocněním), kdy nanočástice umožňují sledovat pohyb, umístění a přežití exogenních buněk prostřednictvím MRI nebo optického
50 zobrazení. Z následné post mortem histologie nebo biopsie lze ověřit přežití, migraci a cestu transplantovaných buněk ve tkáni (například v nervové tkáni, cévách, játrech, chrupavce, epidermis, nádorové tkáni).

Nanočástice pro magnetické a fluorescenční značení buněk se připraví kovalentním navázáním
55 fluorescenční značky, s výhodou fluoresceinu, na vrstvu hydratovaného oxidu křemičitého částic

tvořených jádry feritů, s výhodou nanokrystalů feritů obecného vzorce $\text{Co}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_{4+\gamma}$ (CZF), kde x je 0,2 až 0,8, s výhodou 0,4 až 0,6, enkapsulovaných do hydratovaného oxidu křemičitého. Fluorescenční značka je navázána pomocí adiční reakce mezi aminoalkylalkoxysilanem, s výhodou aminopropyltriethoxysilanem, a činidlem obsahujícím skupinu s násobnou vazbu, s výhodou fluorescein–isothiokyanátem obsahující skupinu $\text{C}=\text{N}$. Pro omezení hydrolyzy navázaných molekul fluorescenčního činidla je následně uskutečněna reakce bazické polykondenzace alkylsiloxanů, s výhodou tetraethoxysilanu nebo jeho derivátů, s nastavením vhodných podmínek přípravy. Jsou tak získány suspenze vysoce stabilní ve vodném prostředí při $\text{pH} > 4$. Hydrofilní obal z vrstvy hydratovaného oxidu křemičitého zároveň zamezuje expozici magnetických jader buněčnému prostředí, což zajišťuje dostatečnou biokompatibilitu a použitelnost pro medicínské aplikace.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech provedení. Tyto příklady, které představují přípravu nanokrystalů feritové fáze pro magnetické značení buněk podle vynálezu, mají výhradně ilustrativní charakter a rozsah vynálezu v žádném ohledu neomezuje.

Nové znaky předmětu vynálezu

Novým znakem je navázání fluorescenční látky. Příprava CZF–F nanočástic pro magnetické a fluorescenční značení buněk je provedena tak, že na jádra feritů obecného vzorce $\text{Co}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_{4+\gamma}$, kde x je 0,2 až 0,8, o velikosti nanokrystalů v rozmezí 1 až 90 nanometrů, která jsou enkapsulovaná do hydratovaného oxidu křemičitého v tloušťce v rozmezí 1 až 100 nanometrů, jsou postupnými reakcemi kovalentně navázány aminoalkylalkoxysilan, s výhodou aminopropyltriethoxysilan, v bazickém prostředí při teplotě v rozmezí 20 °C až 50 °C po dobu v rozmezí 1 až 24 hod., činidlo tvořící fluorescenční značku, s výhodou fluorescein–isothiokyanát, v bezvodém prostředí při teplotě v rozmezí 20 až 90 °C po dobu 1 až 24 hod. a alkoxysilan, s výhodou tetraethoxysilan, v bazickém prostředí při teplotě v rozmezí 20 až 80 °C po dobu 1 až 24 hod. Novými znaky použití nanočástic jsou nízká buněčná toxicita. Buňky označené CZF–F nanočásticemi v koncentraci 0,03 až 0,2 mM proliferyují stejně jako kontrolní neoznačené buňky, což znamená, že značení buněk CZF–F nanočásticemi neovlivňuje proliferaci a expanzi buněk (viz příklad 2). Buňky lze pozorovat fluorescenčním mikroskopem (viz příklad 3).

Novým znakem je fluorescenčně označená buňka, kterou lze analyzovat a oddělit z buněčné suspenze pomocí průtokové cytometrie a následného sortování na základě jejího fluorescenčního značení. Lze tak snadno změřit procentuální poměr označených buněk (viz příklad 6) a následně oddělit označené a neoznačené buňky.

Novým znakem je to, že buňky značené nanočásticemi vykazují vysoký relaxační poměr R_2 při nižším obsahu potenciálně toxického magnetického kovu v buňkách, než je dosaženo u běžně užívaných magnetických značek (viz příklad 7).

Vysoký relaxační poměr buněk značených nanočásticemi zajišťuje jejich snadnou detekci pomocí magnetické rezonance in vitro i in vivo v nízkých koncentracích. Detekovat lze pomocí MR zobrazování i jednotlivé buňky (viz příklad 9). Po podání označených buněk příjemci (zvířeti nebo člověku) lze z odebrané tkáně obsahující transplantované buňky (autopsie, biopsie) detekovat transplantované buňky (viz příklad 12) ve tkáni a pomocí dalšího imunohistochemického barvení na různé markery analyzovat stav buněk (například stupeň jejich diferenciací) nebo jejich interakci s tkání příjemce (kontakt buněk, zánětlivá reakce v přímém okolí transplantovaných buněk).

Objasnění výkresů

Obr. 1 znázorňuje snímky A, B a C, kde snímek A zachycuje buňky značené nanočásticemi při koncentraci $0,11 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3} (\text{CZF-F})$ v optickém mikroskopu, snímek B zachycuje totéž jako

snímek A, avšak ve fluorescenčním mikroskopu, a C zachycuje překrytí snímků A a B a ukazuje na přítomnost fluorescenčních částic v buňkách;

5 Obr. 2 znázorňuje graf obsahující růstové křivky buněk rMSC značených nanočásticemi o koncentracích 0,055; 0,11 a 0,55 mmol.dm⁻³_(CZF-F);

Obr. 3 znázorňuje snímek detailu rMSC buněk s přítomností nanočástic jako menších tmavých míst;

10 Obr. 4 znázorňuje grafy z FACS analýzy vykazující hodnoty fluorescence a procento nanočásticemi značených (0,11 mmol. dm⁻³_(CZF-F)) různých typů buněk;

Obr. 5 znázorňuje MR obrazy vzorků buněčných suspenzí změřených pomocí MR spektrometru Bruker pracujícím s polem 4,7 T získané pomocí standardní T₂-vážené turbospinové sekvence;

15 Obr. 6a znázorňuje MR obraz implantátu v mozku potkana in vivo změřený 24 hod. po implantaci pomocí standardní T₂-vážené turbospinové sekvence;

Obr. 6b znázorňuje MR obraz získaný T₂*-váženou sekvencí gradientového echa;

20 Obr. 7 znázorňuje snímek detekce zeleně svítících transplantovaných buněk v mozkové tkáni příjemce, kde modře jsou dobarvena jádra buněk (DAPI).

25 Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

30 Příprava suspenze nanočástic sestává z následujících kroků:

1. smíchání 250 µl aminopropylethoxysilanu a 1 ml chloroformu, čímž vznikne roztok aminopropylethoxysilanu;

35 2. smíchání 10 ml suspenze v ethanolu obsahující přibližně 40 mg jader feritu enkapsulovaných do hydratovaného oxidu křemičitého, 100 µl koncentrovaného roztoku amoniaku a roztoku aminopropylethoxysilanu, čímž vznikne směs I;

3. dispergace směsi I v ultrazvukové lázni po dobu 5 min.;

40 4. míchání směsi I ve skleněné baňce při nastavené teplotě v rozsahu 10 až 75 °C, s výhodou při 20 °C, po dobu 12 hod.;

45 5. oddělení meziproductu I, kde meziproduct I představuje jádra feritu enkapsulovaných do hydratovaného oxidu křemičitého s navázaným aminopropylethoxysilanem, od zreagované směsi I odstředěním při 10 000 ot./min. po dobu 10 min.

6. dispergace meziproductu I v bezvodém ethanolu v ultrazvukové lázni po dobu 5 min.;

50 7. opakování oddělení meziproductu I a následné dispergace v trojnásobném provedení;

8. oddělení rozpouštědla pomocí vakuové odparky;

9. dispergace suchého meziproductu I v ultrazvukové lázni v 6 ml dimethylformamidu;

10. smíchání 1,5 mg fluorescein–isothiokyanátu a 1 ml dimethylformamidu, čímž vznikne roztok fluorescein–isothiokyanátu;
11. smíchání suspenze meziprojektu I v dimethylformamidu a roztoku fluorescein–isothiokyanátu, čímž vznikne směs II;
12. dispergace směsi II v ultrazvukové lázni po dobu 5 min.
13. míchání směsi II ve skleněné baňce se zpětným chladičem uložené v olejové lázni, při nastavené teplotě v rozsahu 10 až 90 °C, s výhodou při 80 °C, po dobu 12 hod.;
14. oddělení meziprojektu II, kde meziprojekt II představuje jádra feritu enkapsulovaných do hydratovaného oxidu křemičitého s navázaným fluoresceinem, odstředěním při 10 000 ot./min. po dobu 10 min.
15. smíchání 15 ml ethanolu, 3 ml demineralizované vody a 1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku, čímž vznikne silanizační roztok;
16. smíchání meziprojektu II a silanizačního roztoku, čímž vznikne směs III;
17. dispergace směsi III v ultrazvukové lázni, po dobu 5 min.;
18. smíchání směsi III a 5 µl tetraethoxysilanu, čímž vznikne směs IV;
19. míchání směsi IV při nastavené teplotě v rozsahu 10 až 90 °C, s výhodou při 57 °C, po dobu v rozmezí 0,5 až 24 hod., s výhodou 4 hod.;
20. oddělení produktu nanočástic odstředěním při 10 000 ot./min. po dobu 10 min.;
21. dispergace produktu nanočástic v ethanolu v ultrazvukové lázni po dobu 5 min.;
22. opakování oddělení produktu nanočástic a následné dispergace v ethanolu v dvojnásobném provedení;
23. opakování oddělení produktu nanočástic a následné dispergace v demineralizované vodě v trojnásobném provedení.

Meziprojekty:

- I = jádra feritu enkapsulovaných do hydratovaného oxidu křemičitého s navázaným aminopropylethoxysilanem
- II = jádra feritu enkapsulovaných do hydratovaného oxidu křemičitého s navázaným fluoresceinem

Vstupní látky:

- aminopropyltriethoxysilan (silanizační činidlo s aminovou skupinou, p.a.)
- demineralizovaná voda (rozpouštědlo, vodivost < 0,01 mS.m⁻¹)
- chloroform (rozpouštědlo, p.a.)
- ethanol (bezvodé rozpouštědlo, p.a.)
- ethanol (rozpouštědlo, 96 %, p.a.)
- fluorescein–isothiokyanát (fluorescenční činidlo, p.a.)
- koncentrovaný vodný roztok amoniaku (25 %, p.a.)
- N,N–dimethylformamid (bezvodé rozpouštědlo, p.a.)

suspenze v ethanolu rozptýlených jader feritu (CZF) enkapsulovaných do hydratovaného oxidu křemičitého (viz dokument CZ/307623)
tetraethoxysilan (silanizační činidlo, p.a.)

- 5 Výsledný produkt: nanočástice obsahující jádra feritu enkapsulovaných do hydratovaného oxidu křemičitého a modifikovaných fluoresceinem.

Příklad 2

- 10 Značení buněk nanočásticemi

Vstupní látky: buněčná suspenze, suspenze nanočástic CZF–F, kultivační medium DMEM +10 % FBS + primocin

- 15 Postup značení buněk nanočásticemi zahrnuje následující kroky:

1. Vysetí mesenchymálních kmenových buněk do kultivačních lahví;
- 20 2. Přidání vodné suspenze nanočástic připravených podle příkladu 1 po 2 hodinách do media (DMEM +10% FBS + primocin) tak, aby výsledná koncentrace CZF–F v mediu byla 0,055, 0,11 a 0,55 mmol.dm⁻³_(CZF–F);
- 25 3. Kultivace mesenchymálních kmenových buněk v kultivačním mediu DMEM +10% FBS + primocin s koncentracemi 0,055, 0,11 a 0,55 mmol. dm⁻³_(CZF–F) po dobu 6 až 72 hod, s výhodou 48 hod.;
4. Po 48 h výměna média za čisté, bez nanočástic.

Příklad 3

30

Mikroskopie značených buněk

Postup mikroskopie značených buněk zahrnuje:

- 35 1. Pozorování mezenchymových stromálních buněk potkana (rMSC) značených nanočásticemi CZF–F podle příkladu 2 v optickém mikroskopu a fluorescenčním mikroskopu (obr. 1).

Buňky v kontaktu s nanočásticemi připravenými podle příkladu 1 adherují a prolifерují a endocytují nanočástice CZF–F (viz obr. 1). Účinnost značení lze ověřit pomocí průtokové cytometrie.

40

Příklad 4

Měření viability a proliferace

45

Způsob měření viability a proliferace zahrnuje následující kroky:

1. Proliferace v reálném čase se měří metodou RTCA xCELLigence (ACEA);
- 50 2. Vysetí buněk rMSC do E–Plate destiček v počtu 20 000 buněk na jamku;
3. Po 2 hod přidání vodné suspenze nanočástic CZF–F připravených podle příkladu 1 s výslednými koncentracemi v jamkách 0,055; 0,011 a 0,55 mmol. dm⁻³_(CZF–F);
- 55 4. Měření proliferace pro dobu 48 hodin.

Průběh růstových křivek buněk s přítomností nanočástic o koncentraci 0,055 a 0,11 mmol.dm⁻³ je téměř shodný s tvarem růstové křivky neznačených buněk (viz obr. 2). Nejvyšší koncentrace nanočástic zpomaluje růst buněk oproti neznačeným buňkám i buňkám značených nižšími koncentracemi nanočástic.

Příklad 5

Transmisní elektronová mikroskopie buněk značených nanočásticemi

Způsob transmisní elektronové mikroskopie buněk značených nanočásticemi zahrnuje následující kroky:

1. Označení rMSC buněk podle příkladu 2;

2. Fixace a zpracování buněk pro potřeby elektronové mikroskopie;

3. Pozorování buněk v elektronovém mikroskopu

Na obr. 3. jsou patrné četné shluky nanočástic uvnitř značených buněk. Shluky nanočástic jsou rovnoměrně rozmístěny v buněčné cytoplazmě a není viditelné, že se hromadí na buněčné membráně.

Příklad 6

Stanovení účinnosti značení pomocí průtokové cytometrie

Způsob semikvantitativního stanovení účinnosti značení různých typů buněk fluorescenčními nanočásticemi zahrnuje následující kroky:

1. Označení buněk (lidských a potkaních mezenchymových kmenových buněk, potkaní a lidské nádorové linie) podle příkladu 2

2. Po 48 h vymytí přebytečných nanočástic kultivačním médiem a oplach PBS;

3. Sklizení označených buněk pomocí trypsinu/EDTA a příprava buněčné suspenze v PBS pro potřeby průtokové cytometrie.

4. Analýza průtokovým cytometrem.

Z měření jsou vyhodnoceny následující parametry: procenta značených buněk a střední intenzita fluorescence (MFI), viz obr. 4.

Příklad 7

Relaxivita buněk značených nanočásticemi

Přítomnost nanočástic v rMSC buňkách připravených a označených podle příkladu 2 je ověřena pomocí relaxometrie. Stanovený relaxační poměr buněčné suspenze R_2 odpovídá kontrastu v MR obrazu.

Způsob stanovení a ověření relaxivity buněk značených nanočásticemi zahrnuje následující kroky:

1. Buněčná suspenze se rozptýlí ve 4% želatině, která zabrání usazování buněk během měření;

2. Pomocí relaxometru se měřicí sekvencí CPMG stanoví relaxační čas T_2 vzorku;

3. Relaxační čas se přepočítá na relaxační poměr vztahem převrácené hodnoty relaxačního času na koncentraci buněk v daném objemu po odečtení příspěvku čisté želatiny.

Relaxační poměr R_2 vzorků rMSC buněk zjištěné pomocí relaxometru Bruker Minispec při magnetickém poli 0,5 T jsou uvedeny v tabulce:

Koncentrace v médiu [mmol.dm ⁻³]	CZF-F	Relaxační poměr R_2 (0,5 T) [s ⁻¹ /10 ⁶ buněk/ml]
0,055		0,85
0,11		1,55

Příklad 8

Stanovení obsahu prvků metodou ICP-MS

Metodou ICP-MS je stanoven obsah prvků (Co, Zn a Fe) ve značených buňkách podle příkladu 2. Měření metodou ICP-MS jsou prováděna na spektrometru Elan DRC-e (Perkin Elmer, Concord, Kanada) vybaveném koncentrickým zmlžovačem s cyklonickou mlžnou komorou a reakční/kolizní celou (DRC) pro eliminaci interferencí, a peristaltickým čerpadlem Gilson 212. Pro stanovení kobaltu, železa a zinku jsou monitorovány isotopy ⁵⁹Co, ⁵⁷Fe a ⁶⁶Zn.

Způsob stanovení obsahu prvků metodou ICP-MS zahrnuje následující kroky:

1. Příprava kalibračních roztoků stanovovaných prvků i roztoku vnitřního standardu (Rh) ředěním roztoků o koncentraci 1,000 ± 0,002 g/l (Merck, Darmstadt, SRN);

2. Úprava pH měřených roztoků pomocí koncentrovaného roztoku kyseliny dusičné (Suprapur, Merck), (5ml/100ml);

3. Doplnění vzorků připravených podle příkladu 2 demineralizovanou vodou (Mili-Q, Millipore, USA) na 50 ml;

4. Kvantitativní převedení vzorků pomocí koncentrované kyseliny dusičné do teflonových nádobek pro mikrovlnný rozklad;

5. Rozklad v mikrovlnném zařízení (Uniclever BMI-Z, Plazmatronika, Polsko) ve směsi 3 ml koncentrované kyseliny dusičné a 1 ml koncentrované kyseliny fosforečné;

6. Převod vzorků po rozkladu do 50 ml odměrných baněk;

7. Ředění vzorků 10x pro vlastní analýzu.

Hodnoty obsahu analyzovaných prvků jsou uvedeny v následující tabulce:

Konc. CZF [mol.dm ⁻³]	Obsah prvku [pg v buňce]		
	Co	Zn	Fe
0,05	2,767	4,28	10,19
0,11	6,346	6,01	27,97

Příklad 9

5 In vitro MR zobrazení buněk značených nanočásticemi

Zobrazování vzorků značených buněk in vitro je výhodné k prokázání citlivosti MRI a současně k napodobení průběhu signálu v mozkové tkáni.

10 Způsob in vitro MR zobrazení buněk značených nanočásticemi zahrnuje následující kroky:

1) Suspenze buněk značených podle příkladu 2 se rozptýlí ve 4% roztoku želatiny podle příkladu 9. Pro posouzení citlivosti je nezbytné připravit suspenze s různým počtem značených a neznačených buněk sloužících jako kontrolní vzorek;

15 2) Vzorky se vloží do tomografu a MR obrazy se změří standardními T₂- nebo T₂*-váženými zobrazovacími sekvencemi.

MR obrazy vzorků buněčných suspenzí změřených pomocí MR spektrometru Bruker pracujícím s polem 4,7 T získané pomocí standardní T₂-vážené turbospinové sekvence (parametry sekvence: repetiční čas TR = 2 000 ms, efektivní echočas TE = 72 ms, turbofaktor = 8, počet akvizic AC = 8, zobrazené pole FOV = 45 x 45 mm, matrice MTX = 512 x 512, tloušťka vrstvy 0,5 mm, nastavená geometrie poskytuje srovnatelnou velikost voxelu jako u běžných in vivo měření) jsou v obr. 5.

Při použití obou sekvencí poskytují buňky značené nanočásticemi vynikající kontrast (hypointenzní signál, vzorky C–E resp. G–I) ve srovnání s neznačenými buňkami (vzorky B, F). Viditelný kontrast v MR obrazu je pozorován i u vzorku, jehož každý obrazový voxel obsahuje průměrně pouhé 0,6 buňky.

30 Obrázek 5:

A – vzorek obsahující čistý gel bez buněk

B – vzorek obsahující 19500 neznačených buněk v 0,5 ml, tj . průměrně 0,6 buňky na obrazový voxel

C – vzorek obsahující 19500 značených buněk v 0,5 ml tj. průměrně 0,6 buňky na obrazový voxel; buňky byly značeny nanočásticemi o koncentraci 0,055 mmol.dm³_(CZF) v médiu.

D – vzorek obsahující 19500 značených buněk v 0,5 ml tj. průměrně 0,6 buňky na obrazový voxel; buňky byly značeny nanočásticemi o koncentraci 0,11 mmol.dm³_(CZF) v médiu.

40 E – vzorek obsahující 19500 značených buněk v 0,5 ml tj. průměrně 0,6 buňky na obrazový voxel; buňky byly značeny nanočásticemi o koncentraci 0,55 mmol.dm³_(CZF) v médiu.

F – vzorek obsahující 625000 neznačených buněk v 0,5 ml, tj . průměrně 19 buněk na obrazový voxel

45 G – vzorek obsahující 625000 značených buněk v 0,5 ml tj . průměrně 19 buněk na obrazový voxel; buňky byly značeny nanočásticemi o koncentraci 0,055 mmol.dm³_(CZF) v médiu.

H – vzorek obsahující 625000 značených buněk v 0,5 ml tj . průměrně 19 buněk na obrazový voxel; buňky byly značeny nanočásticemi o koncentraci 0,11 mmol.dm³_(CZF) v médiu.

I – vzorek obsahující 625000 značených buněk v 0,5 ml tj . průměrně 19 buněk na obrazový voxel; buňky byly značeny nanočásticemi o koncentraci $0,55 \text{ mmol.dm}^3_{(\text{CZF})}$ v médiu.

Příklad 10

5

In vivo MR zobrazení buněk značených nanočásticemi

Značené buňky podle příkladu 2 se transplantují do mozku potkanů kmene Wistar a provede se standardní vyšetření na MR tomografu.

10

Způsob in vivo MR zobrazení buněk značených nanočásticemi zahrnuje následující kroky:
Implantace buněk:

1) Buňky se označí nanočásticemi ve výsledné koncentraci $0,11 \text{ mol.dm}^3_{(\text{CZF})}$ po dobu 48 hod.,
15 poté se opláchnou čistým médiem a sklídí pomocí trypsinu/EDTA;

2) Suspenze se upraví na výsledný obsah 25 000 buněk rMSC v 10 μl ;

3) Experimentální potkan se anestezuje pasivní inhalací 2 % isofluranu ve vzduchu;

20

4) Po návrtu lebky se implantují 2 μl buněčné suspenze do parietální mozkové kůry (koordináty 3 mm front., 3 mm dx. od bregmatu, 2 mm do hloubky od povrchu tvrdé pleny);

5) Po implantaci se návrť uzavře kostním voskem a měkké tkáně se sešijí;

25

In vivo MR vyšetření

6) Potkan se anestezuje pasivní inhalací 1,5 až 2 % isofluranu ve vzduchu;

7) Potkan se umístí do speciálního vyhřívaného držáku, se kterým se zvíře vloží do MR tomografu;

8) Pro základní lokalizaci se změří jednoduché sagitální, koronální a příčné snímky např. rychlou gradientovou echo sekvencí;

35

9) Značené buňky se detekují pomocí standardní T_2 -vážené zobrazovací sekvence (např. turbospinové echo) nebo T_2^* -vážené sekvence (gradientové echo);

10) V průběhu experimentu se monitoruje dýchání experimentálního zvířete.

40

MR obraz implantátu v mozku potkana in vivo změřený 24 hod. po implantaci pomocí standardní T_2 -vážené turbospinové sekvence (TR = 2 000 ms, TE = 42,5 ms, turbofaktor = 4, AC = 16, FOV = 30 x 30 mm, matrice MTX 256 x 256, tloušťka vrstvy 0,75 mm) na MR spektrometru Bruker 4,7 T je na obr. 6a. MR obraz získaný T_2^* -váženou sekvencí gradientového echa (TR = 180 ms, TE = 12 ms, stejná geometrie zobrazení) je na obr. 6b.

45

Obr. 6a a obr. 6b prokazují, že buňky značené nanočásticemi podle příkladu 2 jsou velmi dobře rozeznatelné ve tkáni in vivo. Buněčné implantáty značené nanočásticemi jsou zřetelné jako hypointenzní signál v pravé hemisféře při počtu 5000 transplantovaných buněk v 2 μl média. Neznačené buněčné implantáty v levé hemisféře jsou viditelné na MR T_2 -vážených snímcích jako tkáňová nehomogenita bez hypointenzního signálu (obr. 6a).

50

Příklad 11

55 Genotoxicita

Poškození DNA je studováno pomocí jednobuněčné gelové elektroforézy (kometový test). Pro pokus se používá alkalická verze testu, která umožňuje detekci jedno- a dvouřetězcových zlomů DNA.

5

Způsob stanovení a ověření genotoxicity nanočástic zahrnuje následující kroky:

1. Sklizeň buněk značených nanočásticemi podle příkladu 2;
- 10 2. Umístění buněk na testovací skla (čtyři skla pro každý vzorek)/
3. Lyzace buněk v lyzačním roztoku při pH 10;
4. Oplach PBS a inkubace dvou skel s FPG a endonukleázou III po dobu 1 hod. při 37 °C;
- 15 5. Inkubace dalších 2 skel v pufru použitým pro ředění enzymů (0,1 mol KCl, 4 mmol EDTA, 2,5 mmol HEPES, 2 % BSA);
6. Vložení vzorků lyžovaných buněk do alkalického pufru na dobu 40 min., aby došlo k uvolnění DNA;
- 20 7. Provedení elektroforézy v čerstvém alkalickém pufru po dobu 20 min.;
8. Neutralizace vzorků v roztoku 0,4 mol Tris obsahujícím 0,005 % ethidiumbromidu;
- 25 9. Oplach destilovanou vodou;
10. Fixace methanolem a sušení při pokojové teplotě;
- 30 11. Analýza vzorků pomocí VANOX BHS fluorescenčního mikroskopu a hodnocení množství uvolněné DNA softwarem Lucia G 4.81.

Výsledky se uvádí jako procento DNA vyexportované do ocasu komety (Tail DNA %).

- 35 Celkové poškození DNA (total DNA damage, enzymatické) a zlomy (DNA–SB, bez enzymů) se počítají na 2 x 50 nespecificky (náhodně) vybraných buňkách. Stupeň oxidativního poškození se vyjadřuje jako rozdíl mezi mediánem celkového poškození DNA a mediánem zlomů. Pro oba typy poškození DNA se získají čtyři hodnoty pro jeden vzorek. K oběma typům poškození dochází pouze při nejvyšší koncentraci 0,55 mmol.dm³_(CZF-F) ve vzorku, zatímco u vzorků s
- 40 nižšími koncentracemi CZF poškození DNA nenastane podobně jako u neznačených kontrol.

Příklad 12

Histologická detekce označených buněk

45

Způsob histologické detekce označených buněk zahrnuje následující kroky:

1. Uvedení potkanů do celkové anestézie a perfundace přes levou srdeční komoru solnofosfátovým pufrům a 4% paraformaldehydem (pH 7,4);
- 50 2. Vynětí mozku a fixace přes noc v 4% paraformaldehydu;
3. Zamražení v 30 % roztoku sukrozy;
- 55 4. Nařezání mozkové tkáně na řezy o tloušťce 40 μm;

5. Zamontování na sklíčko.

5 Transplantované buňky jsou detekovány pod fluorescenčním mikroskopem v mozkové tkáni (Obr.7).

Průmyslová využitelnost

10 Hybridní nanočástice spinelové feritové fáze obecného vzorce $\text{Co}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_{4+\gamma}$ opatřených souvislou vrstvou hydratovaného oxidu křemičitého se zabudovanou fluorescenční značkou podle tohoto vynálezu mohou být použity jako bimodální činidlo pro značení buněk a jejich následnou vizualizaci pomocí magnetické rezonance a fluorescenčního mikroskopu. Značení a zobrazování buněk je velice dobře využitelné v různých výzkumných oblastech, včetně
15 biologického a lékařského výzkumu, kde je prováděn výzkum a vývoj v oboru buněčné terapie a její převod do klinické praxe.

Bylo zjištěno, že značení buněk připravenými nanočásticemi je výhodnější než značení částicemi oxidů železa díky vyšším hodnotám T_2 relaxivity (např. v poli 0,5 T dosahuje T_2 hodnot kolem
20 $500 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{dm}^3_{(\text{Fe})}$ pro nanočástice s krystalickými jádry o velikosti 15 nm až 50 nm oproti hodnotě $200 \text{ s}^{-1} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{dm}^3_{(\text{Fe})}$ pro nanočástice $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ s dextranovým potahem).

Další výhodou předkládaného řešení s použitím takto modifikovaných nanočástic je podstatně menší zátěž sledovaného živého organismu než v případě použití SPIO částic, neboť SPIO
25 nanočástice mohou poškozovat DNA, lipidy a proteiny (Novotna, B. et al: Toxicology Letters, 210 (2012) 53).

Připravené nanočástice představují vhodný materiál ke sledování distribuce a průběhu cesty buněk transplantovaných do organismu, včetně jejich in vivo migrace s možností ověření
30 účinnosti značení před transplantací pomocí průtokového cytometru nebo fluorescenčního mikroskopu a následně post mortem nebo z biopsie histologicky pomocí fluorescenčního mikroskopu. Připravené nanočástice jsou vhodné pro neinvazivní sledování značených buněk v těle příjemce a slouží a) ke značení kmenových buněk ex vivo; b) k ověření účinnosti značení pomocí průtokové cytometrie a případného výběru pouze značených buněk; c) k podání
35 značených kmenových buněk výše živému příjemci, kdy nanočástice umožňují sledovat pohyb, umístění a přežití exogenních buněk prostřednictvím MRI zobrazení. Z následné post mortem histologie nebo biopsie lze ověřit přežití, migraci a cestu transplantovaných buněk ve tkáni.

40 **PATENTOVÉ NÁROKY**

1. Způsob přípravy nanočástic pro magnetické a fluorescenční značení buněk, **vyznačující se tím**, že v obalu hydratovaného oxidu křemičitého částic složených z jader feritů obecného vzorce
45 $\text{Co}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_{4+\gamma}$, kde x je 0,2 až 0,8, o velikosti nanokrystalů v rozmezí 1 až 90 nanometrů a souvislé vrstvy z hydratovaného oxidu křemičitého v tloušťce v rozmezí 1 až 100 nanometrů, je kovalentně navázána fluorescenční značka,
příčemž na jádra feritů obecného vzorce $\text{Co}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_{4+\gamma}$, kde x je 0,2 až 0,8, s výhodou 0,4 až 0,6, o velikosti nanokrystalů v rozmezí 1 až 90 nanometrů, enkapsulovaných do hydratovaného
50 oxidu křemičitého v tloušťce v rozmezí 1 až 100 nanometrů, jsou postupnými reakcemi kovalentně navázány aminoalkylalkoxysilan, s výhodou aminopropyltriethoxysilan, v bazickém prostředí při teplotě v rozmezí 20 až 50 °C po dobu v rozmezí 1 až 24 hod., činidlo tvořící fluorescenční značku, s výhodou fluorescein–isothiokyanát, v bezvodém prostředí při teplotě v rozmezí 20 až 90 °C po dobu 1 až 12. hod. a alkoxysilan, s výhodou tetraethoxysilan, v bazickém
55 prostředí při teplotě v rozmezí 20 až 80 °C po dobu 1 až 24 hod.

2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že příprava suspenze nanočástic sestává z následujících kroků:

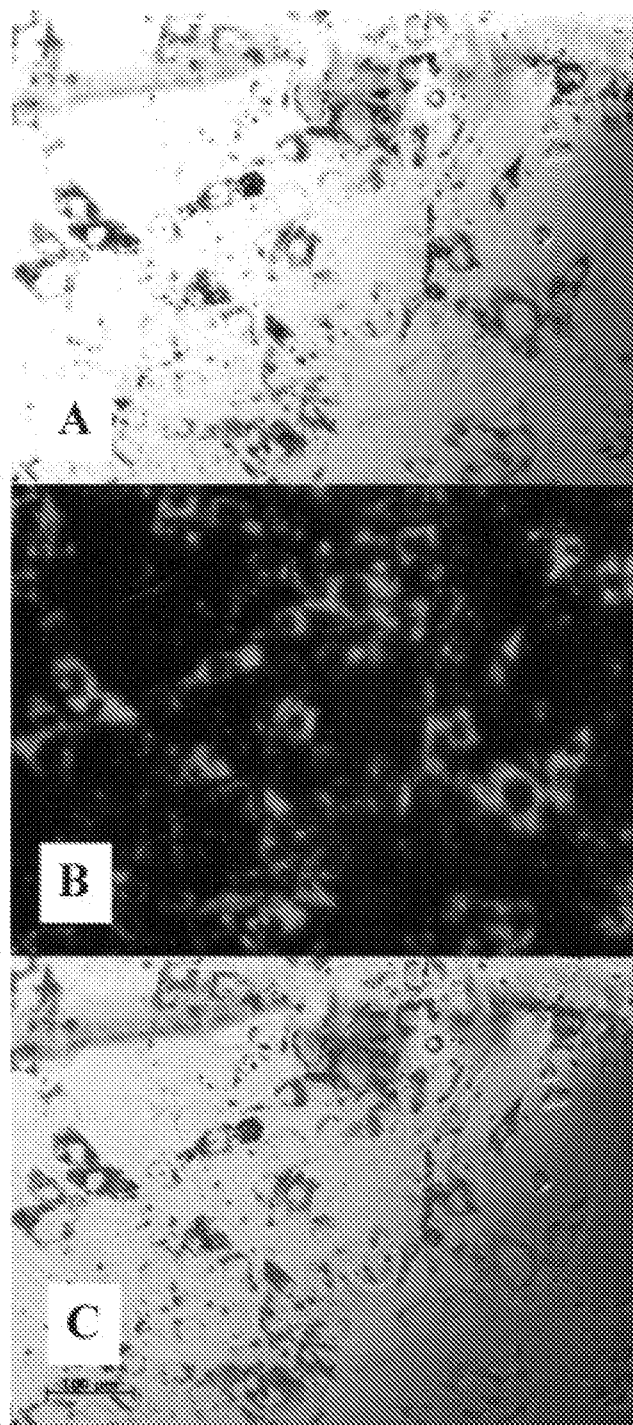
- 5 – smíchání 250 μ l aminopropylethoxysilanu a 1 ml chloroformu, čímž vznikne roztok aminopropylethoxysilanu;
- smíchání 10 ml suspenze v ethanolu obsahující přibližně 40 mg jader feritu enkapsulovaných do hydratovaného oxidu křemičitého, 100 μ l koncentrovaného roztoku amoniaku a roztoku aminopropylethoxysilanu, čímž vznikne směs I;
- 10 – dispergace směsi I v ultrazvukové lázni po dobu 5 min.;
- míchání směsi I ve skleněné baňce při nastavené teplotě v rozsahu 10 až 75 °C, s výhodou při 20 °C, po dobu 12 hod.;
- oddělení meziproduktu I, kde meziprodukt I představuje jádra feritu enkapsulovaných do hydratovaného oxidu křemičitého s navázaným aminopropylethoxysilanem, od zreagované směsi I
- 15 I odstředěním při 10 000 ot./min. po dobu 10 min.
- dispergace meziproduktu I v bezvodém ethanolu v ultrazvukové lázni po dobu 5 min.;
- opakování oddělení meziproduktu I a následné dispergace v trojnásobném provedení;
- oddělení rozpouštědla pomocí vakuové odparky;
- dispergace suchého meziproduktu I v ultrazvukové lázni v 6 ml dimethylformamidu;
- 20 – smíchání 1,5 mg fluorescein–isothiokyanátu a 1 ml dimethylformamidu, čímž vznikne roztok fluorescein–isothiokyanátu;
- smíchání suspenze meziproduktu I v dimethylformamidu a roztoku fluorescein–isothiokyanátu, čímž vznikne směs II;
- dispergace směsi II v ultrazvukové lázni po dobu 5 min.;
- 25 – míchání směsi II ve skleněné baňce se zpětným chladičem uložené v olejové lázni, při nastavené teplotě v rozsahu 10 až 90 °C, s výhodou při 80 °C, po dobu 12 hod.;
- oddělení meziproduktu II, kde meziprodukt II představuje jádra feritu enkapsulovaných do hydratovaného oxidu křemičitého s navázaným fluoresceinem, odstředěním při 10 000 ot./min. po dobu 10 min.;
- 30 – smíchání 15 ml ethanolu, 3 ml demineralizované vody a 1 ml koncentrovaného roztoku amoniaku, čímž vznikne silanizační roztok;
- smíchání meziproduktu II a silanizačního roztoku, čímž vznikne směs III;
- dispergace směsi III v ultrazvukové lázni, po dobu 5 min.;
- smíchání směsi III a 5 μ l tetraethoxysilanu, čímž vznikne směs IV;
- 35 – míchání směsi IV při nastavené teplotě v rozsahu 10 až 90 °C, s výhodou při 57 °C, po dobu v rozmezí 0,5 až 24 hod., s výhodou 4 hod.;
- oddělení produktu nanočástic odstředěním při 10 000 ot./min. po dobu 10 min.;
- dispergace produktu nanočástic v ethanolu v ultrazvukové lázni po dobu 5 min.;
- opakování oddělení produktu nanočástic a následné dispergace v ethanolu v dvojnásobném
- 40 provedení;
- opakování oddělení produktu nanočástic a následné dispergace v demineralizované vodě v trojnásobném provedení.

3. Nanočástice pro magnetické a fluorescenční značení buněk, **vyznačující se tím**, že v obalu hydratovaného oxidu křemičitého částic složených z jader feritů obecného vzorce $\text{Co}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_{4+y}$, kde x je 0,2 až 0,8, o velikosti nanokrystalů v rozmezí 1 až 90 nanometrů a souvislé vrstvy z hydratovaného oxidu křemičitého v tloušťce v rozmezí 1 až 100 nanometrů, je kovalentně navázána fluorescenční značka.

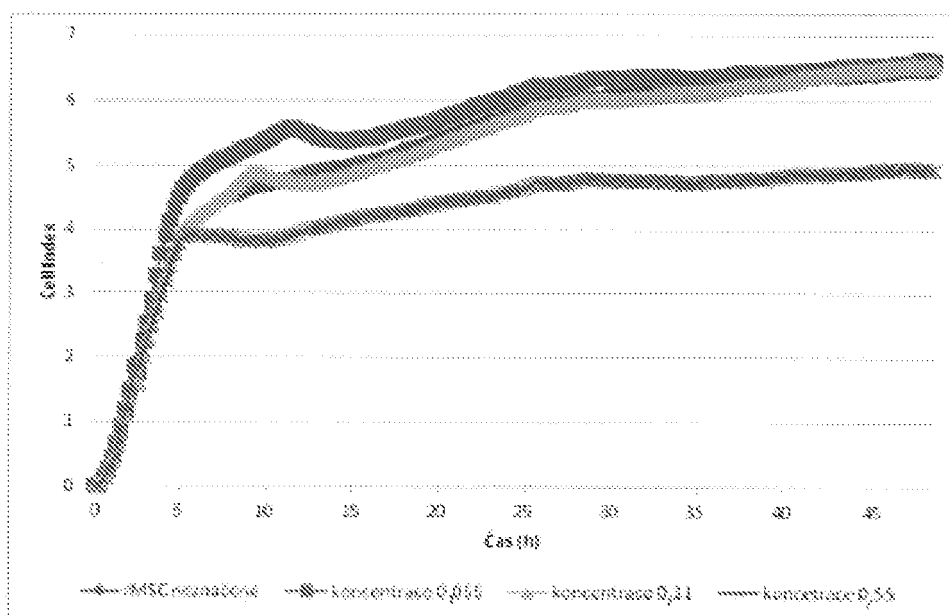
4. Použití nanočástice pro magnetické a fluorescenční značení buněk podle nároku 3 a/nebo nanočástice připravené způsobem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 k medicínským aplikacím, využívajících buněčnou terapii ve zvířecích experimentálních modelech, veterinární medicíně a humánní medicíně: degenerativní a neurodegenerativní onemocnění, ischemické léze, traumatické léze, metabolické poruchy a nádorová onemocnění.

5. Použití nanočástice pro magnetické a fluorescenční značení buněk podle nároku 3 a/nebo nanočástice připravené způsobem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 jako látky pro zobrazování značených buněk magnetickou rezonancí.
- 5 6. Použití nanočástice pro magnetické a fluorescenční značení buněk podle nároku 3 a/nebo nanočástice připravené způsobem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 jako látky pro zobrazování značených buněk fluorescenčním mikroskopem.
- 10 7. Použití nanočástice pro magnetické a fluorescenční značení buněk podle nároku 3 a/nebo nanočástice připravené způsobem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 jako látky pro analýzu a sortování značených buněk průtokovým cytometrem.
- 15 8. Použití nanočástic pro magnetické a fluorescenční značení buněk podle nároku 3 a/nebo nanočástice připravené způsobem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 v koncentracích $0,001 \text{ mmol.dm}^{-3}$ až $0,5 \text{ mmol.dm}^{-3}$ po dobu 2 až 72 hodin při inkubaci adherentních buněk.
- 20 9. Použití podle nároku 8, **vyznačené tím**, že adherentní buňky zahrnují fagocytující buňky, buňky nádorové, buňky nádorových linií, epitheliální buňky a jejich prekurzory, mezenchymové stromální buňky izolované z kostní dřeně, tukové tkáně, pupečnickové tkáně a krve, dále buňky olfaktorické glie, neurální kmenové buňky a neurální progenitorové buňky a dendritické buňky.
- 25 10. Použití nanočástic pro magnetické a fluorescenční značení buněk podle nároku 3 a/nebo nanočástice připravené způsobem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2 v médiu s buněčnými kulturami samostatně a/nebo samostatně nebo v kombinaci s chemickou indukci nebo transdukcí nebo v kombinaci s mechanickou indukci nebo transfekcí.

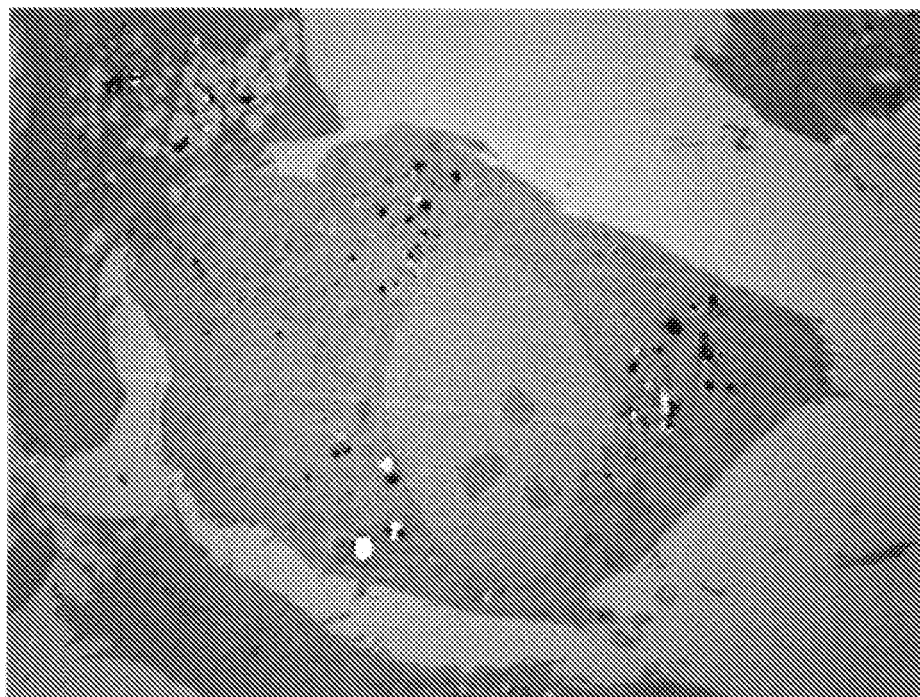
6 výkresů



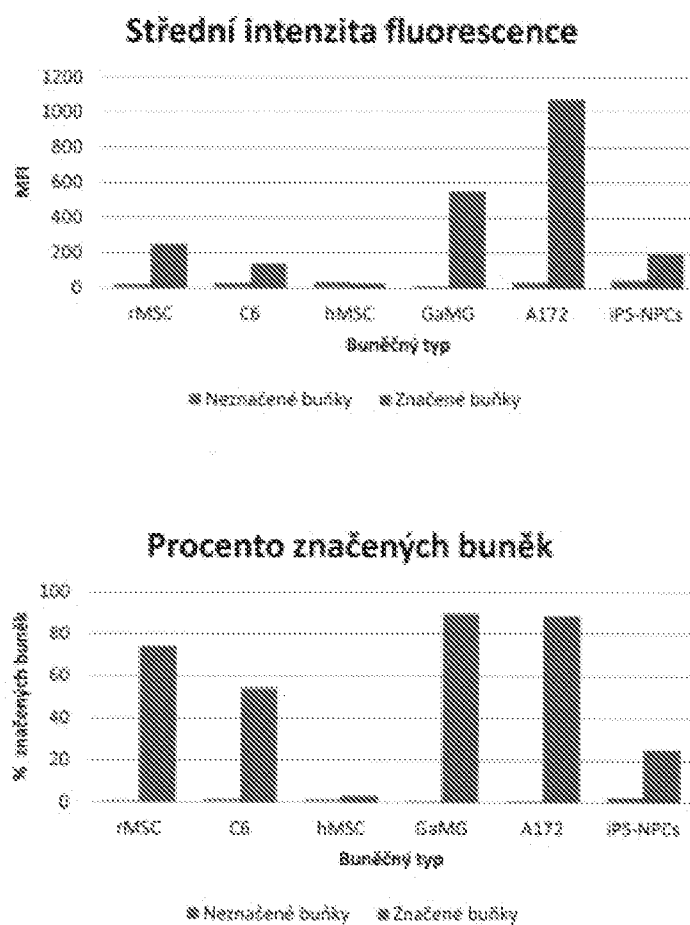
Obr. 1



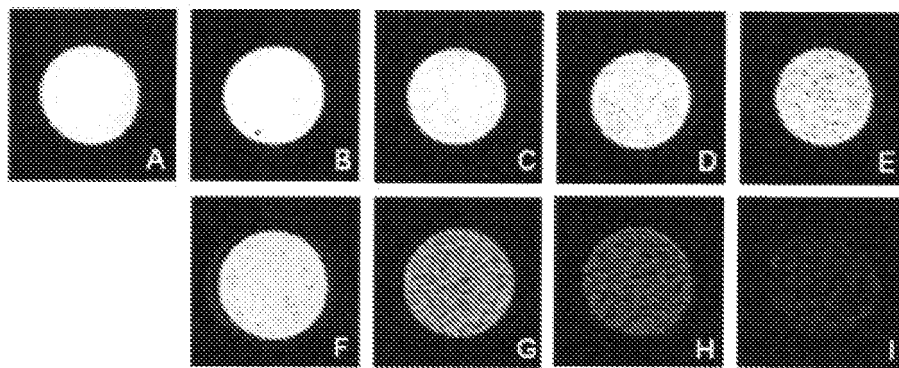
Obr. 2



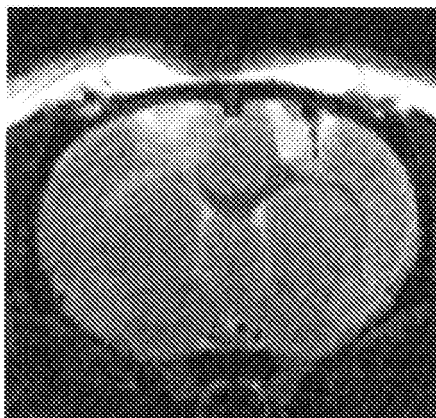
Obr. 3



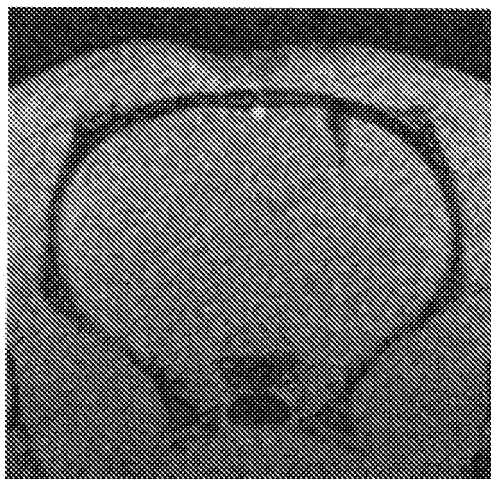
Obr. 4



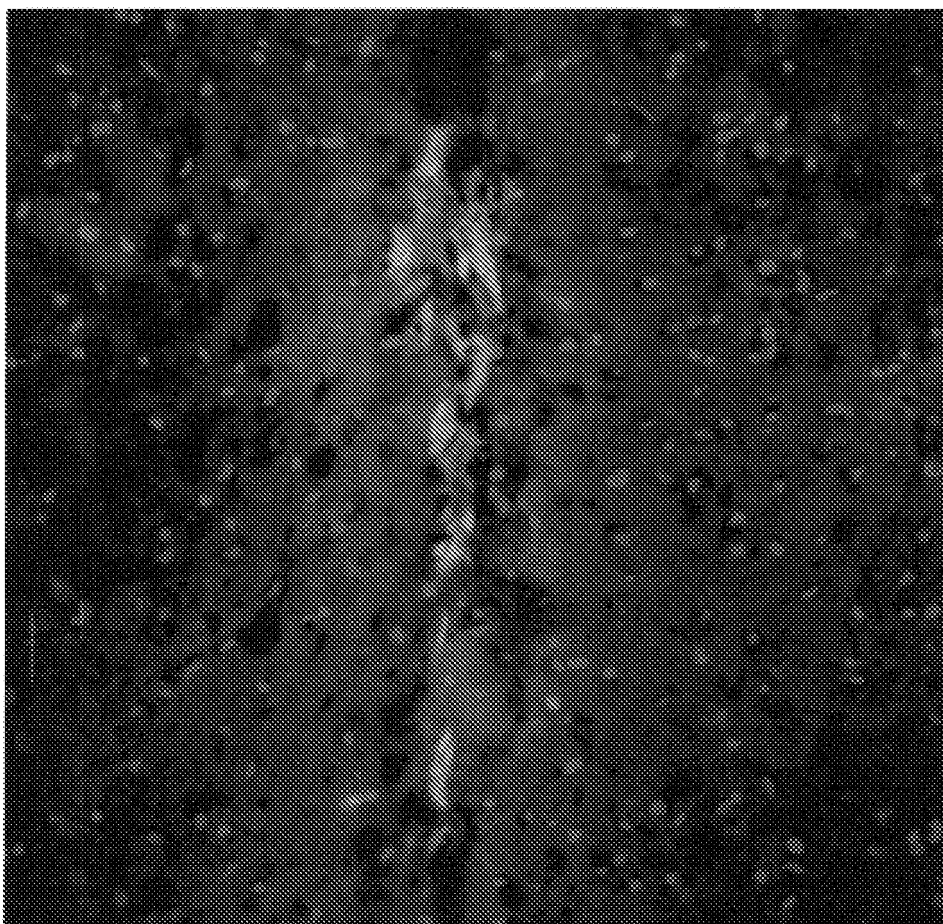
Obr. 5



Obr. 6a



Obr. 6b



Obr. 7