

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

31 206

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2017-33889**
(22) Přihlášeno: **07.07.2017**
(47) Zapsáno: **21.11.2017**

- (73) Majitel:
Bioinova, s.r.o., Praha 4, CZ
- (72) Původce:
Tomáš Groh, Ph.D., Ústí nad Labem, CZ
Yuriy Petrenko, Ph.D., Praha 5, CZ
Ing. Eliška Kosnarová, Zeleneč, CZ
MUDr. Peter Bauer, Ph.D., Praha 12, CZ
- (74) Zástupce:
Ing. Jaroslav Potužník, U třetí baterie 1057/1,
162 00 Praha 6, Břevnov

- (54) Název užitného vzoru:
**Prostředek pro uchování lidských nebo
zvířecích buněk při velmi nízkých teplotách**

CZ 31206 U1

Prostředek pro uchování lidských nebo zvířecích buněk při velmi nízkých teplotách

Oblast techniky

Technické řešení se týká prostředku pro uchování lidských nebo zvířecích buněk při velmi nízkých teplotách.

5 Dosavadní stav techniky

Kmenové buňky jsou pro svůj multipotentní potenciál velmi ceněná frakce v biofarmaceutickém průmyslu. Jejich omezená životnost *ex vivo* je v současné době řešena jejich kryoprezervací, tj. hlubokým zmrazením na teplotu $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hluboce zamražené kmenové buňky je možné kdykoliv v případě potřeby použít a jejich životnost je v takovém stavu prodloužena 10 o několik let. Klíčovým krokem v celém procesu mražení kmenových buněk je roztok, ve kterém jsou buňky uloženy. Jeho složení je zásadní pro výsledné vlastnosti buněk po jejich rozmražení. Z hlediska biofarmaceutického průmyslu a současných pravidel pro použití buněk k terapeutickým účelům je žádoucí, aby rozmražené buňky bylo možné přímo aplikovat pacientovi bez dalších kroků promývání či centrifugace buněk. Tento fakt klade velké nároky především na složení 15 roztoku s ohledem na bezpečnost jednotlivých komponent v roztoku obsažených. Pro kryoprezervaci buněk se běžně používá dimethylsulfoxid (DMSO), ethylen glykol či glycerol. Nevýhoda použití těchto kryoprotektivních látek je jejich nezanedbatelná cytotoxicita a významné nežádoucí vedlejší účinky při podání pacientům. Proto jsou vyvíjeny kryoprotektivní roztoky, které jsou primárně založeny na použití netoxických složek při zachování kryoprezervačních vlastností.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Podstata technického řešení

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

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

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

30 Tento roztok s výhodou obsahuje jako nezbytné složky kationty K^+ v množství 20 až 50 mmol/l, kationty Na^+ v množství 20 až 80 mmol/l, anionty Cl^- množství 0,5 až 40 mmol/l, anionty PO_4^{3-} a/nebo HPO_4^{2-} a/nebo $H_2PO_4^-$ v celkovém množství 20 až 65 mmol/l, a trehalózu v množství minimálně 60 mmol/l, s výhodou minimálně 200 mmol/l, ještě výhodněji minimálně 300 mmol/l. Horní mez obsahu trehalózy je určena tím, že celková osmolarita roztoku nemá být vyšší než 900 mosmol/l. Horní mez obsahu trehalózy v pufovaném roztoku je tedy o množství disociovaných solí nižší než 900 mosmol/l. Koncentrace uvedených složek jsou v rámci uvedeného rozmezí voleny tak, aby hodnota pH roztoku byla 7,1 až 7,6. V nejjednodušším provedení technického řešení nemusí prostředek obsahovat žádné další záměrně přidávané složky. V každém případě, optimální celková osmolarita roztoku není vyšší než 900 mosmol/l.

35 V dalších provedeních technického řešení roztok dále může obsahovat kationty Mg^{2+} a/nebo Ca^{2+} v celkovém množství 0 až 2 mmol/l a anionty SO_4^{2-} a/nebo HSO_4^- v celkovém množství 0 až 2 mmol/l. Jestliže jsou kationty Mg^{2+} a/nebo Ca^{2+} přítomny jako záměrně přidaná složka, jsou v roztoku obsaženy v celkovém množství 0,1 až 2 mmol/l. Jestliže jsou anionty SO_4^{2-} a/nebo HSO_4^- přítomny jako záměrně přidaná složka, jsou v roztoku obsaženy v celkovém množství 0,5 až 2 mmol/l.

45 Ve výhodném provedení technického řešení roztok obsahuje kationty K^+ v množství 28 až 32 mmol/l, kationty Na^+ v množství 20 až 50 mmol/l, kationty Mg^{2+} a/nebo Ca^{2+} v celkovém množství 0,4 až 1,2 mmol/l, anionty Cl^- v množství 0,5 až 20 mmol/l, anionty PO_4^{3-} a/nebo HPO_4^{2-} a/nebo $H_2PO_4^-$ v celkovém množství 40 až 50 mmol/l, anionty SO_4^{2-} a/nebo HSO_4^- v celkovém množství 0,9 až 1,2 mmol/l.

Ve zvláště výhodných provedeních technického řešení roztok obsahuje trehalózu v množství 200 až 400 mmol/l.

Zvláště výhodné je, když vodný roztok neobsahuje vedle kationtů K^+ , kationtů Na^+ , kationtů Mg^{2+} a/nebo Ca^{2+} , aniontů Cl^- , aniontů PO_4^{3-} a/nebo HPO_4^{2-} a/nebo $H_2PO_4^-$, aniontů SO_4^{2-} a/nebo HSO_4^- a trehalózy žádné další záměrně přidané složky. Samozřejmě nelze vyloučit, že v roztoku jsou stopová množství látek, jejichž přítomnost je podmíněna výrobou nebo jinak náhodná.

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

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

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

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

Nosičem kmenových buněk může být biodegradabilní i nedegradabilní materiál. Nosičem mohou být funkční biomateriály. Může se jednat o syntetické biokompatibilní polymery (kyselina polylaktidová PLA, kyselina polyglykolová PGA, polyethylenglykol PEG, polykaprolakton PCL, polyhydroxybutyrát PHB a další), přírodní polymery a polysacharidy (kolagen typu I, hyaluronová kyselina, fibrin, chitosan, celulóza, škrob a další) nebo extracelulární matrice (ECM) ve formě hydrogelu, nanovláken nebo mikrovláken. Alternativně se pro aplikace, které počítají s nosičem, mohou kultivace kmenových buněk provádět v přítomnosti těchto nosičů a společně
35 uchovávat a aplikovat v prostředku podle technického řešení.

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

Pufrovaný vodný roztok trehalózy, obsahující trehalózu v množství 200 až 400 mmol/l, kationty K^+ v množství 28 až 32 mmol/l, kationty Na^+ v množství 20 až 50 mmol/l, kationty Mg^{2+} a/nebo Ca^{2+} v celkovém množství 0,4 až 1,2 mmol/l, anionty Cl^- v množství 0,5 až 20 mmol/l, anionty
45 PO_4^{3-} a/nebo HPO_4^{2-} a/nebo $H_2PO_4^-$ v celkovém množství 40 až 50 mmol/l, anionty SO_4^{2-} a/nebo HSO_4^- v celkovém množství 0,9 až 1,2 mmol/l, je možné použít zejména k dlouhodobému uskladnění hluboce zmrazených mezenchymálních kmenových buněk.

Příklady uskutečnění technického řešení

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

Aspirace kostní dřeně byla provedena trepanobiopickou jehlou, která je součástí odběrového setu obsahujícího fyziologický roztok s heparinem a gentamicinem. Po transportu kostní dřeně do
 5 prostor pro sterilní zpracování biologického materiálu byl vzorek smíchán s infuzním roztokem Gelofusinu. Množství přidaného Gelofusinu odpovídalo 25 % objemu kostní dřeně. Směs sedimentovala 10 až 30 minut a poté byla odebrána vrstva prstence mononukleárních buněk. V odebrané vrstvě buněk byla analyzována buněčnost směsi hematologickým analyzátozem. Do každé z připravených kultivačních lahví o ploše 75 cm² bylo přidáno 10 ml kompletního kultivačního
 10 média (médiu Alpha MEM Eagle obsahující 5% lidský destičkový lyzát a gentamicin) a definované množství suspenze izolovaných buněk (5 až 10 milionů jaderných buněk) pro nasazení primokultury. Kultivace buněk probíhala při teplotě 37 ± 0,5 °C a 5 % CO₂. V průběhu kultivace buněk probíhala průběžná výměna kompletního kultivačního média s případným oplachem buněk pomocí 10 ml pufru PBS na jednu kultivační láhev. Dle množství rostoucích buněk probíhalo
 15 jejich pasážování, tedy řízené enzymatické odloučení adhezujících buněk a jejich přenesení na větší kultivační plochu. Tento proces vždy začal optickou kontrolou kultury pod mikroskopem; optimální pro růst kultury bylo dosažení 80 až 90% pokrytí buněk kultivačního dna. Pro pasážování bylo nutné odsátí kultivačního média, oplach kultury 10 ml pufru PBS a přidání 1 ml roztoku enzymu TrypLE Select CTS. Kultivační lahve byly cca 4 minuty inkubovány při
 20 37 ± 0,5 °C. Správný průběh enzymatické reakce byl kontrolován pod mikroskopem. Pokud se buňky pohybovaly s proudící kapalinou po poklepnání kultivační lahve, byl do každé lahve přidán 1 ml infuzního roztoku 20% HSA (lidský sérový albumin) a 6 ml pufru PBS. Tato směs byla promíchána jemným nasátím a vysátím z pipety a byla převedena do centrifugační zkumavky a centrifugována (230 g, 5 minut). Peleta buněk byla resuspendována v kompletním kultivačním
 25 médiu a suspenze buněk rozdělena na požadované množství kultivačních lahví. Třetím pasážováním buněk bylo dosaženo finální suspenze buněk. Ta byla navíc ještě jednou promyta pufrům PBS a centrifugována (230 g, 5 minut). Pro vytvoření přípravku podle provedení technického řešení byla peleta získaná výše uvedeným postupem resuspendována v roztoku
 30 přípravku uvedeném v příkladu 2A (s 250 mM trehalózou, který je dále označován TR-250), 2B (s 300 mM trehalózou, označovaném TR-300), 2C (s 350 mM trehalózou, označovaném TR-350), 2D (s 400 mM trehalózou, označovaném TR-400) a 2E (pouze vodný roztok s 400 mM trehalózou označovaném TRH-400). Značkou mM nebo také mmol/l je označován počet milimolů v litru roztoku.

Obsah zmražených kmenových buněk byl zpravidla 5 x 10⁵ až 1 x 10⁷ MSCs/ml. Takto připravená suspenze buněk byla průběžně míchána lehkým protřepáním po dobu nejméně deseti minut
 35 při pokojové teplotě. Zároveň byla stanovena viabilita vstupní suspenze buněk. Následně byla suspenze (TR-250 a TR-300) uložena do mrazáku o teplotě -70 °C v mrazicím zařízení Cool-Cell® (BioCision). Paralelně byly vzorky uloženy přímo do teploty -70 °C či do -196 °C na dobu 24 hodin (tabulka 1). V tabulce 2 jsou uvedeny hodnoty viability buněk zmražených pouhým
 40 uložením do teploty -196 °C, nicméně buňky jsou v suspenzi v různých roztocích (TR-350, TR-400 a TRH-400). Následně byly všechny vzorky uloženy do Dewarovy nádoby obsahující tekutý dusík. Po jejich rozmrazení ve vodní lázni při 37 °C byly vzorky testovány dle příkladu 3.

Příklad 2: Možné přípravy 100 ml roztoku podle technického řešení

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

45 Navážíme 0,408 g KH₂PO₄ a 0,213 g Na₂HPO₄, rozpustíme v 20 ml destilované vody; navážíme 0,007 g CaCl₂ x 2H₂O a rozpustíme v 10 ml destilované vody; navážíme 0,012 g MgSO₄ a rozpustíme v 10 ml destilované vody. Takto připravené roztoky smícháme a upravíme pH na hodnotu 7,4. Poté ve směsi rozpustíme 9,45 g trehalózy a konečný objem upravíme destilovanou vodou na 100 ml. Výsledná osmolarita roztoku je 358 mosmol/l.

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

Navážíme 0,408 g KH_2PO_4 a 0,213 g Na_2HPO_4 , rozpustíme v 20 ml destilované vody; navážíme 0,007 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ a rozpustíme v 10 ml destilované vody; navážíme 0,012 g MgSO_4 a rozpustíme v 10 ml destilované vody. Takto připravené roztoky smícháme a upravíme pH na hodnotu 7,4. Poté ve směsi rozpustíme 11,34 g trehalózy a konečný objem upravíme destilovanou vodou na 100 ml. Výsledná osmolarita roztoku je 408 mosmol/l.

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

Navážíme 0,408 g KH_2PO_4 a 0,213 g Na_2HPO_4 , rozpustíme v 20 ml destilované vody, navážíme 0,007 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ a rozpustíme v 10 ml destilované vody; navážíme 0,012 g MgSO_4 a rozpustíme v 10 ml destilované vody. Takto připravené roztoky smícháme a upravíme pH na hodnotu 7,4. Poté ve směsi rozpustíme 13,23 g trehalózy a konečný objem upravíme destilovanou vodou na 100 ml. Výsledná osmolarita roztoku je 458 mosmol/l.

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

Navážíme 0,408 g KH_2PO_4 a 0,213 g Na_2HPO_4 , rozpustíme v 20 ml destilované vody; navážíme 0,007 g $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ a rozpustíme v 10 ml destilované vody; navážíme 0,012 g MgSO_4 a rozpustíme v 10 ml destilované vody. Takto připravené roztoky smícháme a upravíme pH na hodnotu 7,4. Poté ve směsi rozpustíme 15,12 g trehalózy a konečný objem upravíme destilovanou vodou na 100 ml. Výsledná osmolarita roztoku je 508 mosmol/l.

Příklad 2E. Příprava vodného nepufrovaného roztoku podle technického řešení s 400 mM trehalózou (TRH-400)

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

Příklad 3: Životaschopnost BM-MSCs po jejich zmrazení a následném rozmrazení (uskladnění v tekutém dusíku)

Byla hodnocena životaschopnost MSCs izolovaných z lidské kostní dřeně uchovaných v roztoku TR-250, TR-300, TR-350, TR-400 a TRH-400 ihned po jejich rozmrazení. Nejprve byla suspenze barvena propidium jodidem a viabilita buněk stanovena metodou průtokové cytometrie. Viabilita stanovena barvením propidium jodidem odráží životaschopnost jednotlivých buněk v suspenzi. Propidium jodid je látka, která neprostupuje membránou živých buněk. U poškozených a neživotaschopných buněk se propidium jodid váže na DNA. Životaschopnost BM-MSCs sledovaná barvením propidium jodidem bezprostředně po rozmrazení dosahovala více než 50 % u vzorků zmrazených šokovým uložením do $-70\text{ }^\circ\text{C}$ či do $-196\text{ }^\circ\text{C}$ (tabulka 1). Nejvhodnější se ukazuje právě přímé uložení suspence buněk v prostředí dle technického řešení do $-70\text{ }^\circ\text{C}$ či $-196\text{ }^\circ\text{C}$ v roztoku TR-250 i TR-300 (tabulka 1). Nejlepších výsledků bylo ovšem dosaženo při použití roztoku TR-400 s nejvyšší koncentrací trehalózy. Ten chrání buňky před poškozením mrazem nejvíce, viabilita buněk se po rozmrazení pohybuje nad 60 % (tabulka 2).

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

TR-250	% živých (propidium jodid negativních) buněk
	90,8
	14,2
	54,7
	52,9

TR-300	% živých (propidium jodid negativních) buněk
	90,8
	12,1
	51,0
	59,7

Tabulka 2 - MSCs z kostní dřevě, viabilita buněk uložených přímo do -196 °C v různých roztocích dle technického řešení

Uložení do -196 °C	% živých (propidium jodid negativních) buněk
	91,1
	54,5
	63,9
	39,1

- 5 Rozmražené buňky byly paralelně také testovány pomocí následné kultivace a byla sledována jejich schopnost adherence na kultivační plastik a jejich morfologické vlastnosti. Základní vlastností mesenchymálních kmenových buněk je jejich schopnost adherence na kultivační plastik. Z morfologického hlediska mají životaschopné mesenchymální kmenové buňky protáhlý fibroblastový tvar. Bylo vysazeno stejné objemové množství buněk odpovídající počtu 100 000 buněk
- 10 v čerstvém stavu na 24 jamkovou kultivační desku. Po 48 hodinách byly buňky hodnoceny pod mikroskopem. Nejvyšší míra adheze byla pozorována u suspenze buněk mražených přímým uložením do -70 °C či -196 °C v roztoku dle technického řešení (TR-250, TR-300, TR-350 a TR-400). Všechny adherované buňky odpovídaly morfologii mesenchymálních kmenových buněk. Tato pozorování jsou v souladu s pozorováním při detekci viability pomocí propidium jodidu.
- 15 Orientačními pokusy bylo zjištěno, že obsah trehalózy může být i vyšší než 400 mmol/l, avšak její účinek se již nijak významně nezvyšuje, přičemž při celkové osmolaritě vyšší než 900 již je roztok farmaceuticky nevhodný, a naopak obsah trehalózy nižší než 60 mmol/l nemá již pozorovatelný vliv.

NÁROKY NA OCHRANU

- 20 1. Prostředek pro uchování lidských nebo zvířecích buněk při velmi nízkých teplotách, vyznačující se tím, že je tvořen vodným roztokem trehalózy, který obsahuje trehalózu v množství 60 až 900 mmol/l, přičemž roztok může dále obsahovat kationty K^+ v množství

- 0 až 50 mmol/l, kationty Na^+ v množství 0 až 80 mmol/l, anionty Cl^- v množství 0 až 40 mmol/l, anionty PO_4^{3-} a/nebo HPO_4^{2-} a/nebo H_2PO_4^- v celkovém množství 0 až 65 mmol/l, kationty Mg^{2+} a/nebo Ca^{2+} v celkovém množství 0 až 2 mmol/l, anionty SO_4^{2-} a/nebo HSO_4^- v celkovém množství 0 až 2 mmol/l, přičemž pH roztoku je 7,1 až 7,6, a přičemž celková osmolarita roztoku není vyšší než 900 mosmol/l.
- 5 **2.** Prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že roztok sestává výlučně z trehalózy, vody a popřípadě stopových množství doprovodných rozpuštěných látek.
- 3.** Prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že roztok obsahuje kationty K^+ v množství 20 až 50 mmol/l, kationty Na^+ v množství 20 až 80 mmol/l, anionty Cl^- v množství 10 0,5 až 40 mmol/l, anionty PO_4^{3-} a/nebo HPO_4^{2-} a/nebo H_2PO_4^- v celkovém množství 20 až 65 mmol/l.
- 4.** Prostředek podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že roztok obsahuje kationty Mg^{2+} a/nebo Ca^{2+} v celkovém množství 0,1 až 2 mmol/l, anionty SO_4^{2-} a/nebo HSO_4^- v celkovém množství 0,5 až 2 mmol/l.
- 15 **5.** Prostředek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že roztok obsahuje trehalózu v množství 200 až 400 mmol/l, kationty K^+ v množství 28 až 32 mmol/l, kationty Na^+ v množství 20 až 50 mmol/l, kationty Mg^{2+} a/nebo Ca^{2+} v celkovém množství 0,4 až 1,2 mmol/l, anionty Cl^- v množství 0,5 až 20 mmol/l, anionty PO_4^{3-} a/nebo HPO_4^{2-} a/nebo H_2PO_4^- v celkovém množství 40 až 50 mmol/l, anionty SO_4^{2-} a/nebo HSO_4^- v celkovém množství 0,9 až 1,2 mmol/l.
- 20 **6.** Prostředek podle některého z nároků 1 nebo 3 až 5, **vyznačující se tím**, že roztok sestává výlučně z trehalózy, vody, alespoň některého kationtu ze skupiny kationtů K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} a alespoň některého aniontu ze skupiny aniontů Cl^- , PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} , H_2PO_4^- , SO_4^{2-} , HSO_4^- , a popřípadě stopových množství doprovodných rozpuštěných látek.
- 25 **7.** Prostředek podle nároku 5 nebo 6, **vyznačující se tím**, že uchovávané buňky jsou mezenchymální kmenové buňky.

Konec dokumentu
