

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

32 666

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 35/00 (2006.01)

A61K 31/7016 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-35874**

(22) Přihlášeno: **01.02.2019**

(47) Zapsáno: **12.03.2019**

(73) Majitel:
Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i.,
Praha 4, Krč, CZ

(72) Původce:
doc. MUDr. Jitka Čejková, DrSc., Praha 10, CZ
Ing. Irena Vačková, CSc., Praha 22, CZ

(74) Zástupce:
Jehne, Vodák a partneři
advokátní kancelář, JUDr. Robert Jehne, advokát,
Washingtonova 1567/25, 110 00 Praha 1

(54) Název užitného vzoru:
**Lyofilizovaný přípravek k léčení zánětlivých
a degenerativních onemocnění**

CZ 32666 U1

Lyofilizovaný přípravek k léčení zánětlivých a degenerativních onemocnění

Oblast techniky

5

Technické řešení se týká lyofilizovaného přípravku na bázi kondiciovaného média z kmenových buněk k léčení zánětlivých a degenerativních onemocnění.

10 Dosavadní stav techniky

Je známo, že mezenchymální kmenové buňky, v literatuře označované jako MSC (mesenchymal stem cells), produkují trofické faktory, které samy o sobě mají terapeutické účinky i bez přítomnosti samotných kmenových buněk. Proto je v poslední době atraktivní „bezbuněčná terapie“, tedy postup, při kterém se do místa poškození netransplantují buňky, ale pouze médium obohacené jejich sekrečními produkty, takzvané kondiciované médium.

Například z článku Vacková I., Kubínová Š.: Kondiciované médium z kmenových buněk a jeho využití v bezbuněčné terapii; Československá fyziologie, 2016, je známo, že jako alternativu k terapii kmenovými buňkami lze využít sekreční produkty kmenových buněk, přičemž terapeutický efekt této takzvané bezbuněčné terapie je srovnatelný s přímou aplikací kmenových buněk. Vzhledem k obsaženým účinným látkám (růstové faktory, cytokiny, chemokiny), které se v tomto médiu nacházejí, a které ztrácejí účinnost při vyšších teplotách, je nezbytně nutné toto médium skladovat a transportovat při teplotách hluboko pod nulou, například při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ nebo nižší.

V článku Bermudez a kol.: Corneal Epithelial Wound Healing and Bactericidal Effect of Conditioned Medium From Human Uterine Cervical Stem Cells; Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2015, je na pokusech na zvířatech popsáno použití lyofilizovaného média obsahujícího sekreční produkty kmenových buněk.

Mezinárodní přihláška vynálezu WO 2018070939 A1 popisuje lyofilizaci exosomů získaných ze sekretu kmenových buněk s přidávkem trehalózy před lyofilizací k zachování jejich terapeutické účinnosti.

35

Z českého patentu č. 307325 je znám přípravek k léčení zánětlivých onemocnění obsahující suspenzi kmenových buněk kultivovaných po separaci z biologického materiálu výhodně v kultivačním médiu s obsahem trehalózy.

40

Podstata technického řešení

Původci technického řešení zjistili, že kultivace MSC v kombinaci s trehalózou zlepšuje terapeutické vlastnosti lyofilizovaného kondiciovaného média z nich vytvořeného pro léčení zánětlivých a degenerativních onemocnění a zároveň zabraňuje denaturaci a inaktivaci proteinů v lyofilizovaném produktu.

Tento účinek se přičítá tomu, že trehalóza je během kultivace přijímána buňkami endocytózou, což ovlivňuje vlastnosti buněk kultivovaných v médiu s trehalózou a tyto buňky produkují médium s lepšími antioxidačními a protizánětlivými faktory. Zároveň může trehalóza přítomná v kondiciovaném médiu plnit protektivní funkci pro proteiny a další složky.

Podstata lyofilizovaného přípravku k léčení zánětlivých a degenerativních onemocnění podle tohoto technického řešení spočívá v tom, že sestává z lyofilizovaného kultivačního média, to znamená ze složek kultivačního média zbavených vody lyofilizací, a sekrečních produktů

55

pocházejících z kultury mezenchymálních kmenových buněk kultivovaných v přítomnosti trehalózy.

5 Kultivační médium s výhodou obsahuje, vztaženo vždy na sušinu samotného kultivačního média bez kmenových buněk nebo jejich sekrečních produktů nebo jejich zbytků, 50 až 85 % hmotn., nejvýhodněji 65 až 69 % hmotn., trehalózy, dále obsahuje 10 až 40 % hmotn., nejvýhodněji 20 až 26 % hmotn., anorganických solí zvolených ze skupiny sestávající z CaCl_2 , MgSO_4 , KCl , NaHCO_3 , NaCl a NaH_2PO_4 , a 5 až 40 % hmotn., nejvýhodněji 6 až 11 % hmotn., dalších látek zvolených ze skupiny sestávající z aminokyselin, monosacharidů, nukleových kyselin, solí
10 organických kyselin, vitamínů, lyzátu z krevních destiček, antibiotik a popřípadě dalších doprovodných látek.

Lyofilizovaný přípravek podle technického řešení obsahuje, vztaženo na 1 g sušiny kondicionovaného kultivačního média, navíc vedle sušiny složek kultivačního média dále sekreční
15 produkty 10 až 60 milionů, s výhodou 24 až 38 milionů mezenchymálních kmenových buněk.

Lyofilizovaný přípravek podle technického řešení je v práškové formě možné skladovat a transportovat při teplotách až do $+24\text{ }^\circ\text{C}$. Těsně před použitím je nutné lyofilizovaný přípravek znovu zkapalnit přidáním vody pro injekce nebo fyziologického roztoku nebo jiného odborníkovi
20 známého farmaceutického roztoku.

Lyofilizovaný přípravek podle technického řešení je určen k léčbě zánětlivých onemocnění včetně posttraumatické zánětlivé reakce po poškození nebo úrazu a také k léčbě degenerativních a neurodegenerativních onemocnění. Je možné očekávat, že přípravek podle tohoto technického
25 řešení se uplatní také při léčbě traumat, hojení ran a popálenin, léčbě nemocí pohybového aparátu (šlachy, klouby, artritida, osteoartritida), kostních defektů, diabetu, mrtvice, kardiologických, onkologických a očních onemocnění.

30 Objasnění výkresů

Obr. 1. Porovnání tloušťky rohovky léčených a neléčených králíků.

35 Příklady uskutečnění technického řešení

Přípravek podle tohoto technického řešení sestává z lyofilizovaného kultivačního média a sekrečních produktů pocházejících z kultury mezenchymálních kmenových buněk kultivovaných v přítomnosti trehalózy způsobem odborníkovi známým.
40

Pro vytvoření přípravku podle tohoto technického řešení v následujících příkladech provedení byly kultivovány lidské pupečnickové mezenchymální kmenové buňky (WJ-MSC), získané způsobem odborníkovi známým. Jako kultivační médium v následujících příkladech provedení byla použita dvě komerčně dostupná kultivační média Alfa MEM a L-15 známého složení. Je
45 však třeba poznamenat, že pro dosažení přínosů technického řešení není konkrétní kultivační médium podstatné. Podstatné je to, že složkou lyofilizovaného přípravku jsou sekreční produkty pocházející z kultury mezenchymálních kmenových buněk kultivovaných v přítomnosti trehalózy.

50 Hlavními složkami média Alfa MEM jsou:

1234 mg/l aminokyseliny, zejména L-glutamin, L-arginin, L-cystein, L-lysin,

60 mg/l vitamíny, zejména kyselina askorbová

55

9838 mg/l anorganické soli, zejména NaCl a NaHCO₃, a dále také KCl, CaCl₂, NaH₂PO₄ a MgSO₄,

81 mg/l nukleové kyseliny

5

110 mg/l sodná sůl kyseliny 2-oxopropionové (pyruvát sodný),

1000 mg/l dextróza.

10 Hlavními složkami média L-15 jsou:

3415 mg/l aminokyseliny, zejména L-arginin, L-glutamin, L-treonin, L-tyrosin

8 mg/l vitamíny

15

8981 mg/l anorganické soli, zejména NaCl, KCl, Na₂HPO₄, CaCl₂ anhyd., MgSO₄ anhyd., MgCl₂, KH₂PO₄,

550 mg/l sodná sůl kyseliny 2-oxopropionové (pyruvát sodný),

20

900 mg/l D-galaktóza.

Kultivační médium Alfa MEM bylo použito v kombinaci s trehalózou v koncentracích 40, 80 a 200 mmol/l. Kultivační médium L-15 bylo kombinované s trehalózou vždy byla celková osmolalita ne vyšší než 400 mosmol/l.

25

Složení kultivačního média kombinovaného s trehalózou vyjádřené v procentech obsahů jednotlivých složek vztažených na součet hmotností všech složek ve čtyřech příkladech provedení je uvedeno v následující tabulce.

30

Tabulka 1: Složení kultivačního média kombinovaného s trehalózou podle příkladů provedení technického řešení

Alfa MEM + 80 mmol trehalózy/l		Alfa MEM + 40 mmol trehalózy/l		Alfa MEM + 200 mmol trehalózy/l		L-15 + 80 mmol trehalózy/l	
složka	% hmotn.	složka	% hmotn.	složka	% hmotn.	složka	% hmotn.
trehalóza	68,97	trehalóza	52,61	trehalóza	84,73	trehalóza	66,41
anorganické sol	24,77	anorganické sol	37,83	anorganické soli	12,19	anorganické soli	21,78
nukleové kyseliny	0,20	nukleové kyseliny	0,31	nukleové kyseliny	0,10	nukleové kyseliny	0
pyruvát sodný	0,28	pyruvát sodný	0,42	pyruvát sodný	0,14	pyruvát sodný	1,33
monosacharidy	2,52	monosacharidy	3,85	monosacharidy	1,24	monosacharidy	2,18
aminokyseliny	3,11	aminokyseliny	4,75	aminokyseliny	1,53	aminokyseliny	8,28
vitamíny	0,15	vitamíny	0,23	vitamíny	0,07	vitamíny	0,02

35

Kromě výše uvedených složek může kultivační médium obsahovat až 5 % hmotnostních dalších složek, jako jsou destičkový lyzát a/nebo krevní sérum a/nebo antibiotika, a popřípadě doprovodné příměsi.

40

Mezenchymální kmenové buňky byly kultivovány po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Poté byly kmenové buňky jejich zlomky a zbytky odseparovány a kultivační médium obohacené o sekreční produkty kmenových buněk bylo přefiltrováno.

Byl sledován počet buněk, které produkovaly sekreční produkty do média, přičemž koncentrace kmenových buněk byla vždy mezi 1 až 1,5 milionu buněk/ml kultivačního média.

Kultivační médium obohacené o sekreční produkty kmenových buněk bylo poté lyofilizováno.

5 Množství suchých složek kultivačního média, které bylo získáno lyofilizací vždy 1 mililitru kultivačního média spolu se sekrečními produkty 1 až 1,5 milionu kmenových buněk je uvedeno v následující tabulce.

Tabulka 2: Složení lyofilizovaného přípravku podle příkladů provedení technického řešení

Alfa MEM + 80 mmol trehalózy/l	Alfa MEM + 40 mmol trehalózy/l	Alfa MEM + 200 mmol trehalózy/l	L-15 + B0 mmol trehalózy/l
39,706 mg	26,014 mg	80,782 mg	41,238 mg
sekreční produkty 1 až 1,5 milionu MSC	sekreční produkty 1 až 1,5 milionu MSC	sekreční produkty 1 až 1,5 milionu MSC	sekreční produkty 1 až 1,5 milionu MSC

10

Takto získaný lyofilizovaný přípravek v práškové formě byl uchováván v chladničce. Před použitím bylo příslušné množství prášku, které bylo získáno lyofilizací vždy 1 mililitru kultivačního média, rozpuštěno vždy v 0,5 ml pufru PBS nebo v deionizované vodě, to znamená, že roztok přípravku pro aplikaci byl zahuštěn tak, že v 1 mililitru obsahoval sekreční produkt, který vytvořily 2 až 3 miliony kmenových buněk.

15

Rohovky králíků byly poleptány 0,25M roztokem NaOH (kapáním na povrch rohovky, 10 kapek louhu po dobu 1 minuty). Poté byly oči propláchnuty proudem vody. Králíci byli rozděleni do pěti skupin. První skupina zůstala neléčena (Kontrola 1), druhá skupina byla léčena kapáním nekondicionovaného kultivačního média Alfa MEM (Kontrola 2), třetí skupina kondicionovaným médiem Alfa MEM, čtvrtá skupina lyofilizovaným médiem, ke kterému byla přidána trehalóza až těsně před lyofilizací, pátá skupina byla léčena lyofilizovaným médiem, které bylo kondicionováno buňkami kultivovanými v kombinaci s trehalózou v koncentraci 80 mmol/l (skupina léčená přípravkem podle technického řešení). Kapky byly kapány po dobu 10 dnů 4x denně. Oči neléčené nebo léčené nekondicionovaným médiem se zhojily neprůhlednou jizvou a vaskularizací rohovky. Oči léčené kondicionovaným médiem se zhojily navrácením průhlednosti a bez neovaskularizace.

20

25

Výsledky pachymetrického měření tloušťky rohovky u těchto skupin pokusných králíků vždy před poškozením, po dvou dnech, po deseti dnech a po dvaceti dnech trvání pokusů jsou znázorněny na obr. 1. Na ose y jsou uvedeny zjištěné tloušťky rohovky v mikrometrech. Na ose x je uveden vždy počet dní od poškození oka pokusného králíka.

30

Průběžné pachymetrické vyšetření ukázalo, že u očí léčených lyofilizovaným kondicionovaným médiem podle tohoto technického řešení, kdy kmenové buňky byly kultivovány v kultivačním médiu v kombinaci s trehalózou, byl průběh hojení rychlejší oproti hojení očí léčených lyofilizovaným kondicionovaným médiem, ke kterému byla trehalóza přidána až před lyofilizací a kondicionovaným médiem bez přídavku trehalózy, nelyofilizovaným. Po 20 dnech nabyly hodnoty tloušťky rohovky u všech těchto skupin fyziologických hodnot.

35

40

NÁROKY NA OCHRANU

45

1. Lyofilizovaný přípravek k léčení zánětlivých a degenerativních onemocnění, **vyznačující se tím**, že sestává z lyofilizovaného kultivačního média a sekrečních produktů pocházejících z kultury mezenchymálních kmenových buněk kultivovaných v přítomnosti trehalózy.
2. Lyofilizovaný přípravek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že kultivační médium obsahuje, vztaženo vždy na sušinu kultivačního média, 50 až 85 % hmotn. trehalózy, 10 až 40 %

50

5 hmotn. anorganických solí zvolených ze skupiny sestávající z CaCl_2 , MgSO_4 , KCl , NaHCO_3 , NaCl a NaH_2PO_4 , 5 až 40 % hmotn. dalších látek zvolených ze skupiny sestávající z aminokyselin, monosacharidů, nukleových kyselin, solí organických kyselin, vitamínů, krevního séra, lyzátu z krevních destiček, antibiotik a popřípadě dalších doprovodných látek, přičemž lyofilizovaný přípravek obsahuje, vztaženo na 1 g sušiny kultivačního média, sekreční produkty 10 až 60 milionů mezenchymálních kmenových buněk.

10 **3.** Lyofilizovaný přípravek podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že kultivační médium obsahuje, vztaženo vždy na sušinu kultivačního média, 65 až 69 % hmotn. trehalózy, 20 až 26 % hmotn. anorganických solí zvolených ze skupiny sestávající z CaCl_2 , MgSO_4 , KCl , NaHCO_3 , NaCl a NaH_2PO_4 , a 6 až 11 % hmotn. dalších látek zvolených ze skupiny sestávající z aminokyselin, monosacharidů, nukleových kyselin, solí organických kyselin, vitamínů a popřípadě dalších doprovodných látek, přičemž lyofilizovaný přípravek obsahuje, vztaženo na 15 1 g sušiny kultivačního média, sekreční produkty 24 až 38 milionů mezenchymálních kmenových buněk.

1 výkres

