

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorský studijní program
Anatomie, histologie a embryologie

**Kryokonzervační metody ve výrobě léčivých přípravků
moderní terapie**

**Cryopreservation methods in manufacturing of advanced
therapy medicinal products**

Mgr. Miroslava Jandová

Školitel: doc. MUDr. Dana Čížková, Ph.D.
Školitel konzultant: prof. MUDr. Stanislav Filip, PhD., DSc.

Hradec Králové, 2022

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

Hradec Králové, 2022

Mgr. Miroslava Jandová

Poděkování

Na tomto místě bych poděkovala všem kolegům a školitelům, kteří mě na mé cestě studiem prováděli a udělovali mi cenné rady. Jmenovitě bych ráda poděkovala především panu MUDr. Pavlu Měřičkovi, Ph.D., který mě celou dobu studia podporoval a seznámil mě se základy teoretické i aplikované kryobiologie. Děkuji své školitelce doc. MUDr. Daně Čížkové, Ph.D. za nesčetné rady a pomoc při přípravě na státní zkoušky v oboru histologie. Děkuji panu prof. MUDr. Stanislavu Filipovi, Ph.D., DSc. za odborné konzultace a pomoc při sepsání disertační práce. Děkuji Mgr. Alžbětě Filipové, Ph.D. za pomoc a cenné rady v rámci experimentální části kryokonzervace hMSCs. Také bych chtěla poděkovat panu doc. RNDr. Aleši Bezroukovi, Ph.D. za pomoc se statistickým zpracováním experimentálních dat.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině za psychickou podporu a trpělivost během studia.

Obsah

1.	ÚVOD DO PROBLEMATIKY	16
1.1	Léčivé přípravky pro moderní terapii	16
1.1.1	Léčivé přípravky pro genovou terapii	20
1.1.2	Léčivé přípravky pro somatobuněčnou terapii	23
1.1.3	Přípravky tkáňového inženýrství	24
1.2	Cesta LPMT od výzkumu k registraci a uvedení na trh	24
1.3	Použití LPMT	28
1.4	Právní a regulační rámec	28
1.4.1	Legislativní rámec v Evropské unii vč. České republiky	28
1.4.2	Použití léčivých přípravků před zavedením regulace	31
1.4.3	Regulační rámec v USA	35
1.5	Výroba LPMT	36
1.5.1	Pracovníci	37
1.5.2	Prostory pro výrobu	37
1.5.3	Přístrojové vybavení	40
1.5.4	Dokumentace	40
1.5.5	Analýza rizik	41
1.5.6	Vlastní výroba	41
1.6	Kryokonzervace	41
1.6.1	Kryoprotektivní roztoky	42
1.6.2	Rychlost zmrazování	43
1.7	Skladování kryokonzervovaných produktů	44
1.8	Rozmrazování	45
1.9	Odmytí DMSO	46
2.	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	48
3.	METODIKA A MATERIÁL	49
	Část 1 – Opatřování a kryokonzervace výchozí suroviny pro výrobu LPMT Kymriah	49
3.1.1	Odběr nemobilizovaných mononukleárních buněk	49
3.1.1.1	Soubor nemocných	49
3.1.1.2	Spektrum provedených vyšetření	49
3.1.2	Zpracování a kryokonzervace suspenze mononukleárních buněk	50
3.1.3	Retrospektivní studie kryokonzervace nemobilizovaných mononukleárních buněk periferní krve	52
3.1.3.1	Soubor dárců a metodika	52

Část 2 – Prospektivní studie kryokonzervace hodnoceného LPMT na bázi hMSCs v podmínkách SVP	53
3.2.1 Parametry klinické studie a soubor pacientů/dárců	53
3.2.2 Specifikace výchozí suroviny (kostní dřev pro výrobu LPMT)	54
3.2.3 Kultivace a stanovení CFU-GM	54
3.2.3.1 Deplece erytrocytů před stanovením CFU-GM	54
3.2.3.2 Vlastní kultivace a stanovení	56
3.2.4 Kryokonzervace hMSCs	56
3.2.4.1 Kryokonzervace s použitím DMSO	57
3.2.4.2 Kryokonzervace s médiem Biofreeze	58
3.2.5 Rozmrazení vzorků hMSCs	59
3.2.6 Ověření počtu a vitality buněk trypanovou modří	59
3.2.7 Stanovení fenotypu, životaschopnosti a počtu buněk průtokovou cytometrií	60
3.2.8 Stanovení klonogenity	61
3.2.9 Mikrobiologické testy	63
3.2.9.1 Test na sterilitu přípravku	63
3.2.9.2 Test na přítomnost mykoplazmat	63
3.2.10 Simulace výrobního procesu s použitím živné půdy (media fill)	63
3.2.11 Aeroskopie	64
3.2.12 Analýza rizik výrobního procesu	65
Část 3 – Retrospektivní studie vlivu odmyváání DMSO na klíčové parametry v suspenzi nemobilizovaných a kryokonzervovaných autologních periferních progenitorových buněk (HPCs)	67
3.3.1 Soubor pacientů a metodika	67
3.3.2 Stanovení podílu a vitality CD34 ⁺ buněk	68
3.3.3 Stanovení krevního obrazu a diferenciálního počtu leukocytů	69
3.3.4 Stanovení CFU-GM	69
3.3.5 Stimulace buněk, leukaferéza, přípravný režim před autologní transplantací	69
3.3.6 Zpracování a kryokonzervace HPCs	69
3.3.7 Statistické metody	70
4. VÝSLEDKY	72
Část 1 – Opatřování a kryokonzervace výchozí suroviny - pro výrobu LPMT Kymriah	72
4.1.1 Odběr nemobilizovaných mononukleárních buněk pro účely validace	72
4.1.2 Kryokonzervace nemobilizovaných mononukleárních buněk pro účely validace	73
4.1.3 Výsledky kryokonzervace mononukleárních buněk pro výrobu LPMT Kymriah	74
Část 2 – Studie kryokonzervace hodnoceného LPMT na bázi hMSCs	75
4.2.1 Soubor pacientů	75

4.2.2	Parametry odebraného materiálu	75
4.2.3	Stanovení CFU v odebraných a rozmrazených kontrolních vzorcích	76
4.2.4	Programované zmrazování hMSCs	76
4.2.5	Vitalita a fenotyp rozmrazených buněk	77
4.2.5.1	Výsledky s použitím DMSO.....	77
4.2.5.2	Výsledky s použitím kryokonzervačního média Biofreeze	80
4.2.6	Určení klonogenity.....	80
4.2.7	Výsledky mikrobiologického testování.....	81
4.2.8	Výsledky simulace aseptického procesu	81
4.2.9	Analýza rizik výrobního procesu	81
	Část 3 – Retrospektivní studie o odmývání DMSO v suspenzi kryokonzervovaných autologních mobilizovaných periferních progenitorových buněk (HPCs).....	85
4.3.1	Vliv procesů kryokonzervace a odmytí DMSO na klíčové parametry suspenze HPC. 85	85
4.3.1.1	Deskriptivní statistika	85
4.3.2	Určení významnosti vlivu procesu zmrazení/rozmrazení a odmytí na klíčové parametry HPC	89
4.3.3	Stanovení CFU-GM a určení korelace mezi počtem CFU-GM a CD34 ⁺ buněk.....	91
4.3.4	Určení výtěžnosti (recovery).....	92
4.3.4.1	Výtěžnost po kryokonzervaci a rozmrazení.....	92
4.3.4.2	Výtěžnost po odmytí DMSO (rozmrazení-odmytí).....	93
4.3.4.3	Výtěžnost celkového procesu (separace-odmytí)	94
	Část 4 – Splnění speciálních požadavků na skladování výchozích surovin pro výrobu registrovaných a hodnocených geneticky modifikovaných přípravků	96
4.4.1	Skladování hodnoceného LPMT na bázi kryokonzervovaných hMSCs v kryoampulích	96
4.4.2	Skladování výchozích surovin (kryokonzervované mononukleární buňky) pro výrobu geneticky manipulovaných LPMT a skladování hotových LPMT na bázi GMO	97
	Část 5 – Splnění speciálních požadavků na transport a rozmrazování registrovaných a hodnocených geneticky modifikovaných přípravků moderní terapie	101
5.	DISKUSE	106
5.1	Opatřování a kryokonzervace výchozí suroviny - pro výrobu LPMT Kymriah	106
5.2	Kryokonzervace hodnoceného LPMT na bázi hMSCs	107
5.3	Odmývání DMSO v suspenzi kryokonzervovaných autologních periferních kmenových buněk (HPCs).....	109
5.4	Skladování výchozích surovin pro výrobu LPMT a hotových registrovaných nebo hodnocených LPMT	110
5.5	Transport a rozmrazování LPMT	111
6.	ZÁVĚRY	112

6.1 Opatřování a kryokonzervace výchozí suroviny - pro výrobu LPMT Kymriah	112
6.1.1 Zhodnocení odběru nemobilizovaných mononukleárních buněk.....	112
6.1.2 Zhodnocení kryokonzervace mononukleárních buněk.....	113
6.2 Kryokonzervace hodnoceného LPMT na bázi hMSCs	113
6.3 Studie Odmývání DMSO v suspenzi kryokonzervovaných autologních periferních kmenových buněk (HPCs)	113
6.4 Skladování, transport a rozmrazování registrovaných LPMT	114
7. Seznam citací použité literatury.....	115

Seznam použitých zkratek

- ADA** – Adenosindeamináza
- ALL** – Akutní lymfoblastická leukémie
- ATMP** – Advanced Therapy Medicinal Product; Léčivý přípravek moderní terapie
- AV ČR** – Akademie věd České republiky
- CAMP** - Centre for Advanced Medical Products; Centrum pro léčivé přípravky
- CAR** – Chimeric Antigen Receptor; Chimérický antigenní receptor
- CAT** – Committee for Advanced Therapies; Komise pro léčivé přípravky
- CBER** – Center for Biologics Evaluation and Research; Centrum pro biologické hodnocení a výzkum
- CFR** – Code of Federal Regulations; Kodex federálních předpisů
- CFU** – Colony Forming Unit; Jednotka tvořící kolonie
- CSF** – Colony stimulating factor; Faktor stimulující kolonie
- ČR** – Česká republika
- ČSAV** – Československá akademie věd
- DCs** – Dendritické buňky
- DLBCL** – Difuzní velkobuněčný B-lymfom
- DMSO** – Dimethylsulfoxid
- EBMT** - European society for blood and marrow transplantation, Evropská asociace pro transplantaci krve a kostní dřeně
- ECTAG** - Expanded Cart Tissue Allograft; Léčivý přípravek na bázi chondrocytů
- EDQM** - European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare; Evropské ředitelství pro kvalitu léčiv a zdravotní péče
- EK** – Evropská komise
- EMA** – European Medicine Agency; Evropská léková agentura
- EMEA** - European Agency for the Evaluation of Medicinal Products; dřívější název pro EMA
- ES** – Evropské společenství
- EU** – Evropská unie
- FACS** - Fluorescence-Activated Cell Sorting; Buněčné třídění aktivované fluorescencí
- FC** – Flow Cytometry (průtoková cytometrie)
- FDA** - Food and Drug Administration; Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
- FMEA** – Failure Mode and Effects Analysis; Analýza možných vad a jejich důsledků
- FN HK** – Fakultní nemocnice Hradec Králové

FS – Forward scatter; detektor průtokového cytometru umístěn v ose dopadajícího paprsku

G-CSF - Granulocyte colony stimulating factor; Faktor stimulující granulocytární kolonie

GDPR - General Data Protection Regulation (EU); Obecné nařízení o ochraně osobních údajů

GM-CSF – Granulocyty-makrofágy stimulující faktor

GMP – Good Manufacture Practices; Správná výrobní praxe

GTMP - Genové léčivé přípravky

GVHD – Graft vs. Host Disease; Reakce štěpu proti hostiteli

HPC – Human progenitor cell, Lidské progenitorové buňky

hMSCs – Human Mesenchymal Stromal Cells; Lidské mezenchymální stromální buňky

ICTRP – International Clinical Trials Registry Platform; Platforma pro registr mezinárodních klinických studií

IV. IHK – IV. Interní hematologická klinika

JACIE - The Joint Accreditation Committee ISCT-Europe & EBMT; Společný akreditační výbor Mezinárodní společnosti pro buněčnou a genovou terapii a Evropskou asociaci pro transplantaci krve a kostní dřeň

KH – Klinické hodnocení

KO – Krevní obraz

LPMT – Léčivý přípravek moderní terapie

LVV – Lentivirový vektor

MNC – Mononuclear Nucleated Cells; Mononleární buňky

MO ČR - Ministerstvo obrany České republiky

MZ ČR – Ministerstvo zdravotnictví České republiky

PCR – Polymerázová řetězová reakce

PMBCL – Mediastinální velkobuněčný B-lymfom

QP – Qualified Person; kvalifikovaná osoba

RPN – Risk Priority Number; Hodnota značící riziko

SCID – Severe Combined Immunodeficiency Diseases; Kombinovaný imunodeficit

SCMP - Somatobuněčné léčivé přípravky

SS – Side scatter; detektor průtokového cytometru umístěn v úhlu 90° na dopadající paprsek

SÚKL – Státní ústav pro kontrolu léčiv

SVP – Správná výrobní praxe

TB – Trypan Blue; Trypanová modř

TEP - Léčivé přípravky na bázi tkáňového inženýrství

TNC – Total Number of Nucleated Cells; Celkový počet jaderných buněk

ÚKBD – Ústav klinické biochemie a diagnostiky

ÚKIA – Ústav klinické imunologie a alergologie

ÚKM – Ústav klinické mikrobiologie

WBC – White blood cell; Bílé krvinky

WHO - World Health Organization; Světová zdravotnická organizace

Souhrn

Disertační práce je zaměřena na uplatnění kryokonzervačních metod při opatrování, resp. zpracování základní suroviny pro výrobu léčivých přípravků moderní terapie (LPMT) při jejich vlastní výrobě a při jejich dočasném skladování v kryokonzervačním skladu zdravotnického zařízení před jejich použitím. Všechny výsledky uvedené v této práci byly dosaženy za přísných podmínek stanovených pro výše uvedené činnosti předpisy Evropské unie a harmonizovanými právními normami ČR.

První část je věnována validaci odběru a kryokonzervace výchozí suroviny – mononukleárních buněk periferní krve pro výrobu registrovaných LPMT pomocí chimérických antigenních receptorů T-lymfocytů (CAR-T). Praktickým výstupem z tohoto bylo získání povolení opatrování, zpracování a distribuce mononukleárních buněk pro výrobu LPMT a také získání vývozní licence do země místa výroby geneticky manipulovaného LPMT.

V druhé části jsou prezentovány a vyhodnoceny výsledky odběru výchozí suroviny, kostní dřeně, pro výrobu hodnoceného LPMT na bázi lidských mezenchymálních stromálních buněk (hMSCs) a vývoje kryokonzervačního protokolu pro hodnocený léčivý přípravek moderní terapie za podmínek správné výrobní praxe (SVP) jako experimentální část klinické studie EUDRA CT č. 2016-000926-21. Protokol byl s úspěchem použit u všech hodnocených přípravků vyrobených pro 6 pacientů zapojených do studie a je možné ho využít v navazujícím klinickém hodnocení.

Třetí část se zabývá toxicitou kryoprotektiva dimethylsulfoxidu (DMSO), který se v současnosti používá jak při kryokonzervaci výchozích surovin pro výrobu LPMT, tak při kryokonzervaci finálních produktů. Jedná se o retrospektivní studii provedenou na souboru 13 pacientů, u kterých hematolog bezprostředně před podáním indikoval promytí DMSO z rozmražené suspenze mobilizovaných autologních kryokonzervovaných periferních progenitorových buněk. Tato studie ukazuje, že odstranění DMSO má za následek významně sníženou životaschopnost buněk, což naznačuje, že tento proces by měl být prováděn pouze u vysoce rizikových pacientů.

V poslední části práce navrhuji a v praxi ověřuji řešení skladování výchozích surovin pro výrobu geneticky modifikovaných přípravků moderní terapie a jejich transportu k výrobcu, dočasného skladování hotových geneticky modifikovaných přípravků dodávaných výrobcem v kryokonzervovaném stavu v podmínkách zdravotnického zařízení a transportu těchto přípravků na klinické pracoviště. Naše řešení plně obstálo při certifikačním auditu, což byla

jedna z podmínek pro zahájení programu CAR-T terapie ve Fakultní nemocnici Hradec Králové (FN HK).

Klíčová slova: Léčivé přípravky moderní terapie

Geneticky manipulované léčivé přípravky moderní terapie

Kryokonzervace

Kryoprotektiva

Lidské mezenchymové stromální buňky

Dimethylsulfoxid

Správná výrobní praxe

Summary

This dissertation deals with application of cryopreservation methods in the production and transport of advanced therapy medicinal products (ATMPs), including temporary storage in the Hospital cryostorage facility prior its clinical use. This work kept a strict adherence to European Union regulations and harmonized national legal norms.

The first section shows the method validation regarding the collection and cryopreservation of starting material - peripheral blood mononuclear cells for the production of registered ATMPs using chimeric antigen receptor of T-lymphocytes (CAR-T). As a practical output from this endeavor, we obtained the approval for the collection, processing, and distribution of mononuclear cells for ATMP manufacture, as well as an export license to foreign facilities where the final production of genetically modified ATMPs takes place.

The second part of this work presents the results of collection of starting material for ATMP production - bone marrow for manufacturing of human mesenchymal stromal cells (hMSCs)-based investigational ATMP and explains the development of the cryopreservation protocol for this investigational product under the conditions of good manufacturing practice (GMP) as an experimental part of the clinical trial EUDRA CT No. 2016-000926-21. The protocol was successfully used in all investigational products manufactured for the 6 patients included in the study, it could be used in the next clinical trials.

The third part deals with the toxicity of the cryoprotectant dimethyl sulfoxide (DMSO), which is currently used both in cryopreservation of starting materials for the ATMP manufacture and in cryopreservation of final products. In this section, I summarize the results of a retrospective study performed on a group of 13 patients in whom the hematologist indicated washing of DMSO from a thawed suspension of mobilized autologous cryopreserved peripheral blood progenitor cells immediately before their administration. This study shows that the removal of DMSO results in a significantly reduced cell viability, suggesting that this process should only be performed for high-risk patients.

In the last section of the dissertation I propose and verify the solution in practice for the storage of starting material, their transport to the manufacturer, temporary storage of ATMPs in the Hospital cryostorage facility, and transport of ATMPs to the Transplantation Unit in practice. The protocol hereby described met the pre-certification audit successfully, thus fulfilling the requirements for starting CAR-T therapy programme in University Hospital Hradec Králové.

Key words: Advanced therapy medicinal products

Cryopreservation

Cryoprotectans

Human mesenchymal stromal cells

Dimethyl sulfoxide

Good manufacturing practice

1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY

1.1 Léčivé přípravky pro moderní terapii

Léčivé přípravky pro moderní terapii používané v humánní medicíně jsou založené na somatobuněčné a genové terapii a na tkáňovém inženýrství. Léčivé přípravky moderní terapie mají velký potenciál pro léčbu řady progresivních neurologických onemocnění, jako jsou např. Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba, muskulární dystrofie, a další onemocnění (1). V nedávné době zaznamenaly tyto přípravky značný úspěch při léčbě hematologických malignit, především maligních lymfomů a mnohočetného myelomu s využitím autologních T-lymfocytů, které jsou upraveny pomocí chimérického antigenního receptoru (CAR). Na posledním kongresu EBMT (březen 2022) bylo diskutováno rozšíření indikací na určité typy leukemií, uvažuje se i o uplatnění těchto přípravků při léčbě solidních nádorů typu karcinomu (2,3). Mnohem delší tradici, od 80. let minulého století, má jejich úspěšné použití při léčbě popálenin (4–6) a traumat kloubní chrupavky (7). Přehled současného stavu problematiky v ČR v kontextu světového vývoje uvádí Kočí et al. (8) a Boráň (9,10). V současné době se probíhající klinické studie soustředí na následující onemocnění:

- zhoubné bujení (např. karcinom prostaty, prsu, atd.)
- kardiovaskulární choroby (např. infarkt myokardu, ischemická choroba dolních končetin)
- muskuloskeletární onemocnění (např. defekty kloubní chrupavky)
- onemocnění imunitního systému (např. autoimunitní choroby)
- neurologické poruchy (např. amyotrofická laterální skleróza)
- diabetes, gastrointestinální choroby (např. Crohnova choroba)
- oftalmologická onemocnění (např. defekty rohovky)
- plicní nemoci (např. bakteriální pneumonie)
- kožní choroby (např. rány a vředy)
- hematologická onemocnění (např. anémie, hemofilie)
- úrazové stavy (např. popáleniny)

V Tab. č. 1 přehledně uvádím zastoupení probíhajících klinických hodnocení (KH) v jednotlivých oborech v České republice (ČR). V Tab. č. 2 uvádím výčet klinických studií provedených ve FN HK, na kterých se podílelo, resp. podílí naše pracoviště – Tkáňová ústředna. V případě studie Steffi byl konečný produkt dodáván jako kryokonzervovaná suspenze buněk,

v případě studie CT 2016-00926-1 byla kryokonzervace prováděna experimentálně na našem pracovišti. U plánované studie (CARTITUDE-5), kde probíhá nyní dokončování přípravy podkladové dokumentace, bude dodán LPMT rovněž ve formě kryokonzervované suspenze. Od roku 2021 je FN HK certifikována i pro použití 3 registrovaných geneticky manipulovaných LPMT uvedených níže a určených k léčbě maligních lymfomů a mnohočetného myelomu. Všechny tyto přípravky jsou dodávány ve formě kryokonzervované suspenze.

Tab. č. 1: Počet KH v ČR k roku 2019, převzato z Boráň, 2019 (10).

Obor	Indikace	Počet
Onkologie	karcinom prostaty	8
	karcinom ovaria	4
	karcinom ledviny	3
	maligní melanom	2
	gliom, glioblastom	2
	leukémie	5
	nemalobuněčný karcinom plic	1
Kožní		1
Ortopedie		12
Kardiovaskulární choroby	kritická ischemie dolních končetin	11
	infarkt myokardu	2
Neurologie	amyotrofická laterální skleróza	2
Urologie	inkontinence moči	3
Jiné (fekální inkontinence, Crohnova choroba, bakteriální pneumonie, atd.)		6

Tab. č. 2. Seznam schválených klinických studií s použitím autologních LPMT vyrobených z buněk a tkání odebraných v Tkáňovém zařízení FN HK. Studie probíhaly od roku 2013 na Ortopedické a Chirurgické klinice FN HK. V současné době probíhá jedna studie na Ortopedické klinice, jedna studie je v přípravě - IV interní hematologická klinika.

Číslo studie/EUDRA number/název/stav studie	Typ odebrané tkáně nebo buněk	Výrobce LPMT	Konečný produkt LPMT/použití
CT 2012-05599-93 ukončena	Kostní dřev	Bioinova, a.s., Praha, ČR	Kultivované mezenchymální stromální buňky v suspenzi/ortopedie (11)
CT 2016-00926-21 ukončena	Kostní dřev	Bioinova, a.s., Praha, ČR	Kultivované mezenchymální stromální buňky v suspenzi/ortopedie (12) Experimentálně provedena kryokonzervace (13)
CT 2010-021463-32/ Steffi ukončena	Kosterní svalovina	Innovacell Technologie, Innsbruck, Rakousko	Kryokonzervovaná suspenze kultivovaných svalových buněk/chirurgie - léčba fekální inkontinence
CT 2011-005798-22/	Kloubní chrupavka	TETEC Technologies,	Kultivované chondrocyty na

Novocart 3D ukončena		SRN	nosiči/ ortopedie - léčba defektů kloubní chrupavky
CT 2017-004143-21 probíhá	Kostní dřev	Bioinova, a.s., Praha, ČR	Kultivované mezenchymální buňky na nosiči léčba defektů kloubní chrupavky
CT 68284528 CARTITUDE-5 Plánovaný začátek podzim 2022	Mononukleární buňky periferní krve	Janssen	Kryokonzervovaná suspenze geneticky modifikovaných mononukleárních buněk Léčba mnohočetného myelomu - CAR-T terapie

LMPT lze rozdělit do 3 hlavních skupin:

1. Léčivé přípravky pro genovou terapii

- vlastní účinná látka obsahuje rekombinantní nukleovou kyselinu. Rekombinantní DNA je uměle syntetizovaná DNA, která vzniká inzercí celého genu nebo jeho určité části do genomu jiného organismu. Má terapeutický, profylaktický nebo diagnostický efekt (1,14).

2. Léčivé přípravky pro somatobuněčnou terapii

- obsahují tkáň nebo buňky, které byly upraveny, zpravidla pomnožením v tkáňové kultuře tak, aby změnilly své biologické, fyziologické a strukturní vlastnosti za účelem využití pro léčbu, prevenci nebo diagnostiku (14). Ačkoliv jsou LPMT založené na buňkách chápány dle níže citovaných regulací jako podstatně manipulované, v širším pojetí jsou, zejména v USA, jako produkty buněčné terapie označovány i minimálně manipulované buňky (periferní progenitorové buňky, dárcovské lymfocyty, atd.) (15,16). Naproti tomu v EU jsou za LPMT považovány pouze ty minimálně manipulované buňky, které jsou použity heterotopicky, např. suspenze buněk kostní dřevě implantovaná do myokardu (17).

3. Přípravky tkáňového inženýrství

- obsahují upravené buňky nebo tkáně, které mají vlastnosti, jež slouží k obnově, opravě nebo nahrazení lidských tkání. Obsažené buňky či tkáně mohou být lidského nebo zvířecího původu nebo obojí (1,14).

Některé LPMT mohou navíc obsahovat další látky, jako jsou například biomolekuly, biomateriály, chemické látky, nosné struktury nebo matrice. Jako LPMT jsou označovány také kombinované LPMT, příkladem jsou buňky zabudované do biodegradabilních nosičů nebo do matrice. Příkladem mohou být hMSCs z tukové tkáně v kombinaci s beta-trikalcium fosfátem použité k léčbě kostních defektů (9,11). V rámci probíhajících klinických studií zabývajících se LPMT tvoří největší podíl somatobuněčná terapie (více než 50%), nejméně pak kombinované LPMT (1).

1.1.1 Léčivé přípravky pro genovou terapii

LPMT založené na rekombinantní nukleové kyselině slouží k regulaci, opravě, výměně, doplnění nebo odstranění genetické sekvence. Registrované LPMT tohoto charakteru jsou uvedeny níže, výrobci, data schválení a status jsou uvedeny v souhrnné Tab. č. 5.

- **Imlygic®**, EMEA/H/C/002771 (Amgen Europe B.V., Holandsko), účinná látka Talimogenum laherparepvecum – tento přípravek byl první genovou terapií odsouhlasenou na úrovni EMA a používá se v onkologii k léčbě melanomu dospělých s neresekovatelným melanomem s regionálními nebo vzdálenými metastázami (stadium IIIB, IIIC a IVM1a) bez postižení kostí, mozku, plic nebo jiného viscerálního postižení. Produkt je založen na geneticky modifikovaném herpetickém „onkolytickém“ viru, který je schopen infikovat buňky melanomu a rozmnožovat se v nich. Napadené buňky melanomu pak vytvářejí růstový hormon pro granulocytární řadu leukocytů a makrofágy (GM-CSF). Tento protein stimuluje imunitní systém pacienta k tomu, aby buňky melanomu rozpoznával a ničil (18,19).
- **Strimvelis®**, EMEA/H/C/003854 (Orchard Therapeutics B. V., Holandsko) – přípravek je navržen k léčbě kombinovaného imunodeficitu (SCID) způsobeného deficitem adenosindeaminázy (ADA) u pacientů, kteří nemohou být léčeni transplantací kostní dřeně z důvodu nedostupnosti vhodného dárce. Přípravek je založen na

autologních CD34⁺ buňkách transdukovaných retrovirovým vektorem, který kóduje humánní ADA cDNA sekvenci. Po infuzi se CD34⁺ buňky včlení do kostní dřeně, kde obohatí hematopoetický systém o podíl buněk, který exprimuje farmakologicky aktivní hladiny enzymu ADA (18,20).

- **Zalmoxis[®]**, EMEA/H/C/002801 (MolMed SpA, Itálie) - Přípravek se používá u pacientů, kteří podstoupili haploidentickou transplantaci hematopoetickými buňkami z důvodu závažného nádoru krve (např. některé leukémie a lymfomy). Alogenní T-lymfocyty jsou geneticky modifikovány zavedením „sebevražedného genu“ retrovirovým vektorem, který kóduje zkrácenou formu receptoru pro humánní nervový růstový faktor s nízkou afinitou (Δ LNFR) a thymidinkinázu viru herpes simplex I. (18,21).
- **Kymriah[®]**, EMEA/H/C/004090 (Novartis Europharm Ltd., Irsko) – je určen k léčbě dětí nebo mladých dospělých s B-lymfocytární akutní lymfoblastickou leukémií (ALL), u nichž zhoubné bujení nereagovalo na předchozí léčbu, a k léčbě difuzního velkobuněčného B-lymfomu (DLBCL) a folikulárního lymfomu u dospělých, u nichž onemocnění nereagovalo na léčbu nebo opakovaně relabovalo. Přípravek obsahuje vlastní T-lymfocyty pacienta, které byly geneticky upraveny tak, aby vytvářely bílkovinu zvanou chimérický antigenní receptor (CAR). CAR se váže na antigenní struktury na povrchu nádorových CD19⁺ buněk, čímž se spouští signalizační dráha vedoucí k usmrcení nádorových buněk (18,22). FN HK je od roku 2021 certifikována pro použití tohoto přípravku.
- **Yescarta[®]**, EMEA/H/C/004480 (Kite Pharma EU B.V., Holandsko) – léčivý přípravek určený k léčbě DLBCL nebo primárního mediastinálního velkobuněčného B-lymfomu. Je určen pro dospělé pacienty, u nichž nádor relaboval nebo byl refrakterní na standardní léčbu. Principem je terapie založená na CAR (18,23). FN HK je od roku 2021 certifikována pro použití tohoto přípravku.
- **Tecartus[®]**, EMEA/H/C/005102 (Kite Pharma EU B.V., Holandsko) – indikován k léčbě dospělých pacientů s relabujícím nebo refrakterním lymfomem z pláštěvých buněk po dvou či více liniích systémové léčby, které zahrnovaly léčbu inhibitorem

Brutonovy tyrosinkinázy (18,24). FN HK je od roku 2021 certifikována pro použití tohoto přípravku

- **Luxturna[®]**, EMEA/H/C/004451 (Novartis Europharm Ltd., Irsko) - přípravek je indikován k léčbě dospělých a dětských pacientů s potvrzenou bílelickou retinální dystrofií spojenou s mutací genu *RPE65*, kteří mají dostatek funkčních retinálních buněk a je používán pro 2 formy tohoto onemocnění: retinitis pigmentosa a Leberova kongenitální amauroza. Přípravek používá kapsidu adeno-asociovaného viru sérotypu 2 (AAV2) jako nosič proteinu lidského retinálního pigmentového epitelu do sítnice. Aplikací přípravku do oka je virem tento gen přenesen do buněk sítnice a umožní jim produkovat chybějící enzym (18,25).
- **Zynteglo[®]**, EMEA/H/C/003691 (Bluebird bio B.V., Holandsko) – přípravek obsahuje autologní CD34⁺ hematopoetické kmenové buňky transdukované lentivirovým vektorem kódujícím β A-T87Q-globinový gen a je používán k léčbě β -thalasémie (18,26).
- **Zolgensma[®]**, EMEA/H/C/004750 (Novartis Gene Therapies EU Ltd., Irsko) - k léčbě pediatrických pacientů mladších 2 let se spinální svalovou atrofií s bílelickou mutací genu *SMN1* bez ohledu na typ, objevené příznaky a předchozí léčbu. Přípravek působí tak, že poskytuje plně funkční kopii genu *SMN*, který pomáhá v těle produkovat dostatečné množství proteinu *SMN* (27).
- **Libmeldy[®]**, EMEA/H/C/005321 (Orchard Therapeutics B. V., Holandsko) - léčivý přípravek pro genovou terapii obsahující autologní buňky obohacené o CD34⁺ populaci, která obsahuje hematopoetické kmenové a progenitorové buňky transdukované *ex vivo* pomocí lentivirového vektoru kódujícího gen lidské arylsulfatázy A. Přípravek je indikován k léčbě metachromatické leukodystrofie charakterizované bílelickými mutacemi v genu pro arylsulfatázu A (ARSA) vedoucími ke snížení enzymatické aktivity ARSA: u dětí s pozdně infantilní nebo časně juvenilní formou bez klinických projevů onemocnění a u dětí s časně juvenilní formou, s časnými klinickými projevy onemocnění, které jsou stále schopny samostatné chůze a nedošlo u nich dosud k poklesu kognitivních funkcí (28).

1.1.2 Léčivé přípravky pro somatobuněčnou terapii

Léčivé přípravky na bázi lidských buněk jsou heterogenní, pokud jde o původ, typ a složitost produktu. Buňky mohou být samoobnovující se kmenové buňky, progenitorové buňky nebo terminálně diferencované buňky vykonávající specifickou definovanou fyziologickou funkci. Buňky mohou být autologního nebo alogenního původu. Kromě toho mohou být dále geneticky upraveny. Buňky lze použít samostatně ve spojení s biomolekulami nebo jinými chemickými látkami, nebo v kombinaci s nosiči biologického nebo arteficiálního původu, které samotné lze klasifikovat jako zdravotnické prostředky (kombinované LPMT) (29).

1.1.2.1 Lidské mezenchymální stromální buňky (hMSCs)

Lidské MSCs (hMSCs) jsou multipotentní kmenové buňky schopné diferencovat se v různé typy buněk (chondrocyty, osteocyty, adipocyty, kardiomyocyty, myocyty, neurony). Z těchto důvodů jsou hojně využívány v regenerativní medicíně a tkáňovém inženýrství, jejich účinek je ověřován v řadě klinických studií (30–36). Lze je získat např. kultivací odebrané kostní dřevě, tukové tkáně, pupečnickové krve, z kůže, kosterního svalu, atd. (37–42). Mají vysokou proliferační schopnost. V principu se jedná o adherentní buňky, které snadno nasedají na plastový povrch kultivační misky a lze je proto snadno izolovat. Produkují široké spektrum růstových faktorů a cytokinů, které mohou mít autokrinní nebo parakrinní působení, což může vést např. k novotvorbě krevních cév, k anti-apoptickým účinkům nebo mohou stimulovat dělení progenitorových buněk. Dále byly posány imunoregulační vlastnosti hMSCs. Endogenní hMSCs jsou v případě počínajícího zánětu aktivovány k sekreci faktorů, které inhibují proliferaci T-lymfocytů a tím brzdí prozánětlivou odpověď. Lidské MSCs také ovlivňují jiné buňky imunitního systému, např. B-lymfocyty, NK-buňky, dendritické buňky a makrofágy (40). Minimální fenotypové znaky pro identifikaci hMSCs jsou: exprese CD73, CD90 a CD105 (43–47) a absence CD34, CD45, HLA-DR (38,44,45,47). HMSCs jsou využívány v léčbě degenerativních onemocnění kosterního svalového a nervového systému, zejména kardiovaskulárních onemocněních (37,40,44,48,49).

Kryokonzervace hMSCs umožňuje skladování buněk pro pozdější využití a lépe tak načasovat transplantaci. Je nezbytné kryokonzervovat buňky z časných pasáží, abychom obdrželi zásobu zdravých a efektorových buněk pro transplantaci, protože s rostoucím počtem pasáží klesá diferenciační potenciál. Pro kryokonzervaci hMSCs v klinickém použití se nejčastěji používá 5–10 % DMSO v roztoku elektrolytu (např. Plasmalyte) s přidáním

proteinem (lidský sérový albumin). Obvyklá rychlost zmrazování je 1 – 5 °C/min do –100 °C, poté následuje přemístění buněk do kapalného dusíku nebo do jeho plynné fáze (37,40).

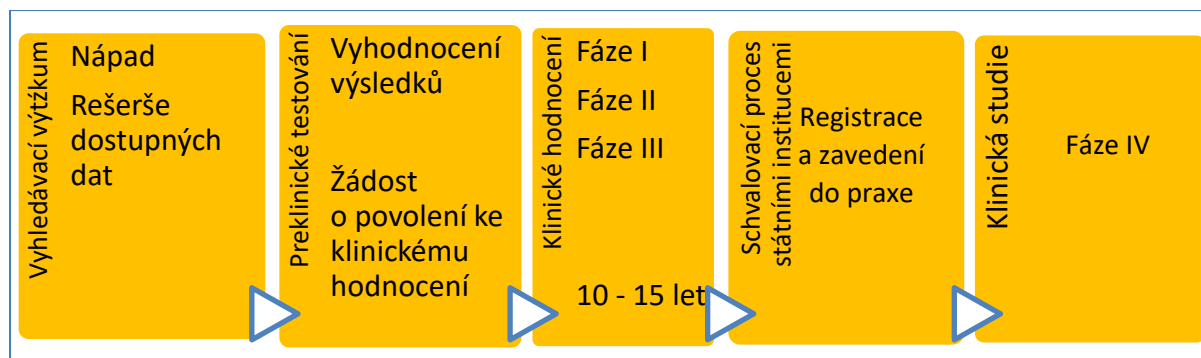
1.1.3 Přípravky tkáňového inženýrství

- **Holoclar[®], EMEA/H/C/002450** (Holostem Therapie Avanzate s.r.l., Itálie) – byl prvním na buňkách založeným LPMT schváleným v Evropské unii. Produkt je založen na *ex vivo* expandovaných autologních lidských rohovkových epiteliálních buňkách. Používá se u dospělých pacientů se středně závažným až závažným deficitem limbálních kmenových buněk způsobeným popálením očí, včetně chemického popálení. Počet buněk, které se mají aplikovat, záleží na velikosti povrchu rohovky (18,50).
- **Spherox[®], EMEA/H/C/002736** (CO.DON AG, Německo) - obsahuje sférické agregáty chondrocytů, což jsou buňky nacházející se ve zdravé chrupavce, které byly připraveny z vlastních tkání pacienta a používá se k nápravě defektů chrupavky v kolenním kloubu u dospělých. Artroskopicky odebrané buňky z chrupavky v kolenním kloubu pacienta se dále kultivují za vzniku chondrocytových sféroidů. V průběhu další artroskopie se léčivý přípravek aplikuje na poškozenou oblast pacientovy chrupavky v kolenním kloubu. Chondrocytové sféroidy přilnou k chrupavce během 20 minut. Sféroidy postupně vyplní defekt v chrupavce (18,51).
- **Alofisel[®], EMEA/H/C/004258** (Takeda Pharma A/S, Dánsko) – přípravek obsahuje alogenní hMSCs odebrané z tukové tkáně zdravého dospělého dárce a následně pomnožené *in vitro*. Používá se k léčbě komplexních perianálních píštělí u dospělých pacientů s Crohnovou chorobou, používá se v případech, kdy píštěle dostatečně nereagují na předchozí léčbu. Alofisel potlačuje zánět a zvyšuje pravděpodobnost zhojení píštěle (18,52).

1.2 Cesta LPMT od výzkumu k registraci a uvedení na trh

Cesta LPMT od prvotní ideji po registraci přípravku a jeho uvedení na trh je zdlouhavá a sestává se z několika kroků (viz Obr. č. 1). Na začátku výzkumu je provedena rešerše mapující současné poznatky vědy, je navržen design počátečního experimentu zaměřený na hodnocení parametrů charakterizujících komponenty LPMT, jsou navrženy biomarkery pro sledování

parametrů kvality, je navržena aplikační dávka, jsou vybrány vhodné testy k hodnocení biodistribuce přípravku. Následuje preklinické hodnocení, které zahrnuje *in vitro* a *in vivo* testy na zvířecím modelu. Tyto testy poskytují informace potřebné k dalším fázím preklinického testování, ke klinickým fázím testování a také pro registraci léčiva (53).



Obr. č. 1: Schéma vývoje LPMT.

Po získání všech potřebných dat je podána žádost o povolení ke klinickému hodnocení. Klinické hodnocení prováděné na lidech má velmi přísná pravidla a probíhá dle předem určeného plánu, tzv. protokolu. Žádost o provedení klinického hodnocení musí být posouzena a odsouhlasena Státním ústavem pro kontrolu léčiv (SÚKL) a nejméně jednou etickou komisí. Posuzuje se splnění požadavků na správnou klinickou praxi, což je standard pro plánování, provádění, vedení, monitorování a další činnosti, které zajistí věrohodné a přesné údaje, ochranu práv a integritu osob zařazených do klinického hodnocení i důvěrnost jejich údajů. Dále se hodnotí poměr možných rizik a přínosů léku pro pacienty, vědecké opodstatnění klinického hodnocení, kvalita používaných léků a další parametry (54).

Klinické hodnocení má několik fází (Obr. č. 1). Ve fázi I je LPMT podán poprvé pacientovi, který je prostřednictvím informovaného souhlasu seznámen s cíli studie, s předpokládaným benefitem léčby i s možnými nežádoucími účinky. Po udělení souhlasu pacientem je LPMT podán. Jsou sledovány a hodnoceny případné nežádoucí účinky přípravku a navrženými metodami je sledována biodistribuce přípravku a jeho předpokládaný léčebný efekt. V klinickém hodnocení fáze II je lék poprvé podán malému počtu nemocných, a to na základě velmi přísných zařazovacích kritérií. Prokazují se tak léčebné účinky, hledá se vhodná dávka a shromažďují se další údaje o léku (54). Ve fázi III se jedná o randomizované multicentrické studie srovnávající nový přípravek se současným standardem na velké skupině pacientů. Poté, co LPMT projde potřebnými fázemi klinického hodnocení, je možné získané údaje předložit v žádosti o jeho registraci, která je umožněna pouze centrálně, na evropské

úrovni u Evropské lékové agentury (EMA). LPMT s platnou registrací u EMA může být běžně podáván pacientům v indikovaných případech ve všech státech EU. Fáze IV je postregistrační, zde se ověřuje léčebná dávka v běžné klinické praxi a dále se vyhodnocují případné nežádoucí účinky. Ani skutečnost, že je LPMT registrován automaticky neznamená, že může být používán zcela volně. Výrobci LPMT ověřují, zda spolupracující tkáňové zařízení i klinické pracoviště splňují všechny podmínky nezbytné ke spolupráci v rámci certifikačního procesu. Ten je obzvláště složitý, jde-li o přípravky vyráběné v USA, neboť je zapotřebí splnit podmínky Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) pro dovoz odebraných buněk či tkáně (36) na jedné straně a na druhé straně podmínky stanovené lokálními předpisy pro uchovávání v podmínkách spolupracující nemocnice (18,54–56).

Existuje však také možnost aplikace neregistrovaného LPMT ve zdravotnických zařízeních, a to v rámci tzv. „Nemocniční výjimky“ (18,57,58). Regulace 2001/83/ES pojednává o Nemocniční výjimce pro produkty, které nejsou určeny pro běžný trh. LPMT aplikované v rámci Nemocniční výjimky musí být připravovány neprůmyslovým způsobem a musí být připraveny pro konkrétního pacienta (18,54). Nemocniční výjimku v ČR uděluje a zároveň také ukončuje SÚKL. V r. 2018 pouze 7 členských států EU hlásilo použití LPMT v rámci Nemocniční výjimky (18). V Tab. č. 3 jsou uvedeny jednotlivé státy a typ LPMT, u kterého byla povolena nemocniční výjimka.

Tab. č. 3: Nemocniční výjimka v jednotlivých státech EU v r. 2018 (18).

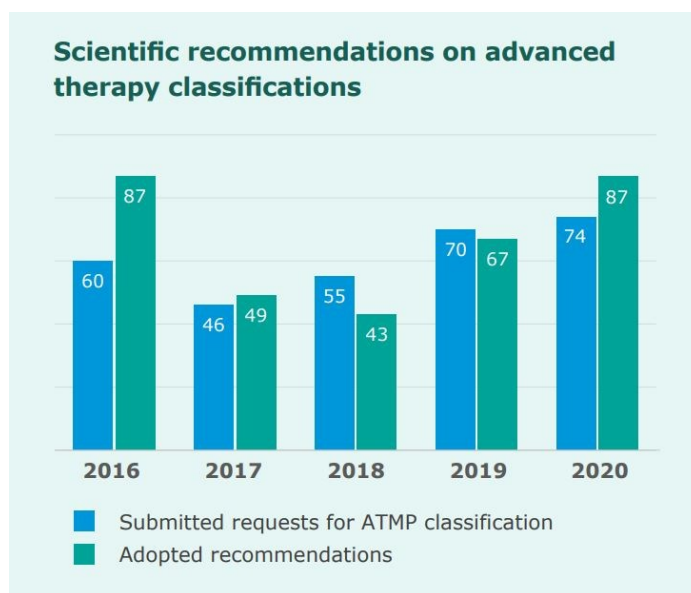
Stát	LPMT
ČR	chondrocyty
Německo	cytokiny indukované NK buňky, dendritické buňky, chondrocyty, mezenchymální stromální buňky, derivované progenitorové buňky kostní dřeně, vytvořená ústní sliznice
Irsko	limbální kmenové buňky
Litva	cytokiny indukované NK buňky, dendritické buňky, T-lymfocyty, buňky stromální vaskulární frakce
Holandsko	lymfocyty, mezenchymální kmenové buňky, mononukleární buňky, T-lymfocyty
Norsko	chondrocyty, T-lymfocyty, dendritické buňky, fibroblasty
Švédsko	mezenchymální kmenové buňky, chondrocyty, mezenchymální stromální buňky, fetální kmenové buňky, keratinocyty

Po r. 2020 včetně je plánováno uvedení dalších LPMT na trh. Ve fázi III se nacházejí dvě CAR-T terapie: **JCAR017** pro léčbu B-buněčných non-Hodgkinovských lymfomů a **bb2121** k léčbě mnohočetného myelomu. Dále sem patří **Tab-celTM**, což je alogenní

T-buněčná imunoterapie k léčbě posttransplantačních lymfoproliferativních onemocnění asociovaných s virem Epstein-Barrové. Přípravek **Lenadogene nolparvovec (GS-010)** je genová terapie pro léčbu Leberovy hereditární oční neuropatie. **REX-001 (Rexmylocel)** jsou autologní mononukleární buňky kostní dřeně určené k intra-arteriálnímu podání při léčbě kritické ischemie končetin. **Multistem®** je buněčná terapie aplikovatelná pro celou řadu onemocnění, např. náhlou příhodu mozkovou (fáze III), ulcerózní kolitidu (fáze II) nebo infarkt myokardu (fáze I). **PXX-PAD** přípravek založený na hMSCs placentárního původu pro snadnější regeneraci tkání (18).

Dle poslední výroční zprávy agentury EMA za rok 2020 (59) Komise pro léčivé přípravky (CAT) v r. 2020 obdržela 74 žádostí o LPMT klasifikaci (o 6 % více než v roce 2019) a přijala 87 doporučení, což je nárůst o 30 % ve srovnání s rokem 2020. Tato čísla potvrzují rostoucí trend od roku 2017 a naznačují silný růst ve vývoji LPMT do budoucna (Obr. č. 2) (59).

Komise EMA pro humánní léčivé přípravky v r. 2020 doporučila registraci 3 přípravků jako LPMT: **Libmeldy** - pro léčbu metachromatické leukodystrofie; **Tecartus** - pro léčbu relabujícího nebo refrakterního lymfomu z pláštěvých buněk a **Zolgensma** pro léčbu spinální muskulární atrofie (59).



Obr. č. 2: Trend v počtu podaných žádostí o zařazení (klasifikaci) LPMT a počty vědecky podložených doporučení ke klasifikaci přípravku jako LPMT, převzato z výroční zprávy EMA (59).

1.3 Použití LPMT

Klinický vývoj LPMT naráží na specifické problémy vzhledem k povaze produktu a omezené dostupnosti neklinických údajů. Kromě toho může být způsob jejich podávání invazivní nebo může vyžadovat speciální vybavení. To s sebou nese další problémy se zajištěním kvality. V Tab. č. 4 jsou shrnuty výhody a nevýhody použití LPMT (58).

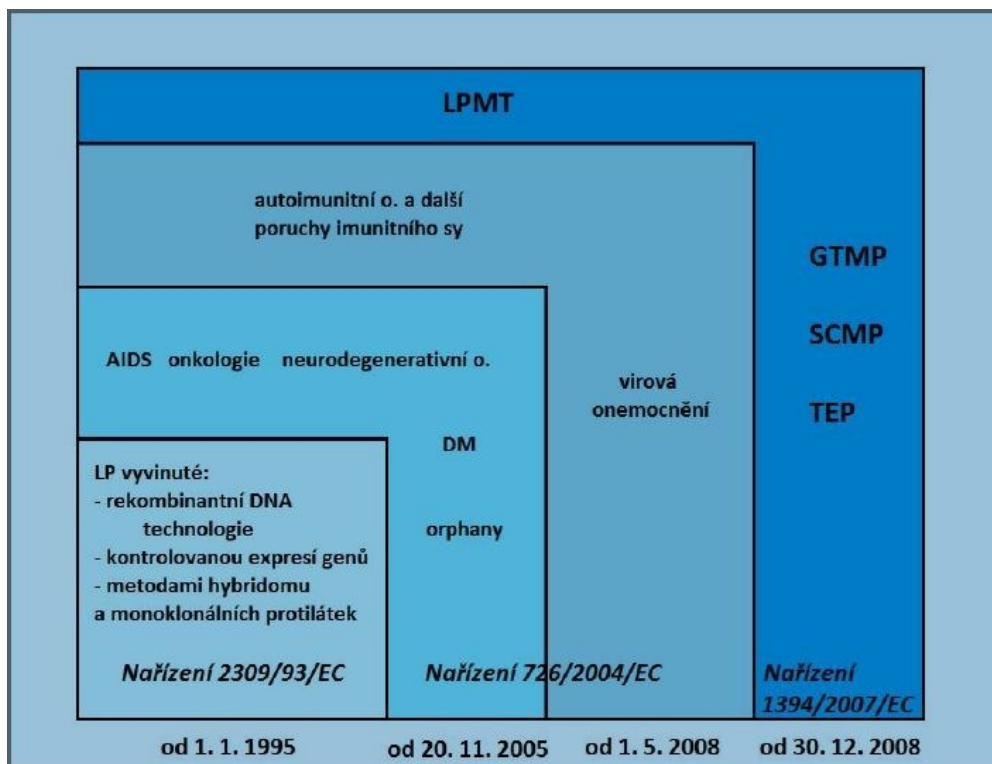
Tab. č. 4: Výhody a nevýhody použití LPMT (58).

Výhody	Nevýhody
Vysoce personalizovaná terapie	Komplexní výroba
Přímá aplikace infúzí	Vysoké počáteční náklady
Dlouhotrvající efekt	Jednorázová léčba
Řešení komplexních onemocnění	Specifické požadavky na regulaci a farmakovigilanci
Zlepšení kvality života	Vysoce specifické požadavky na skladování: krátká doba použitelnosti (pokud není produkt kryokonzervován)
Méně hospitalizací, komorbidit a přidružené léčby	

1.4 Právní a regulační rámec

1.4.1 Legislativní rámec v Evropské unii vč. České republiky

V České republice byly LPMT poprvé definovány ve vyhlášce č. 228/2004 Sb. a zahrnovaly přípravky pro genovou terapii a přípravky pro somatobuněčnou terapii (9). Právní a regulační rámec pro LPMT v rámci Evropské unie byl ustanoven Evropskou komisí v r. 2007 (Nařízení Evropského parlamentu a Evropské rady (ES) č. 1394/2007 o léčivých přípravcích pro moderní terapii a o změně směrnice 2001/83/ES a nařízení (ES) č. 726/2004) a poprvé aplikován v r. 2008 (1,18,55,58,60,61). V tomto roce tedy prvně vzešel pojem „Léčivý přípravek moderní terapie“. Vývoj legislativy pro léčivé přípravky od r. 1995 je schematicky znázorněn na Obr. č. 3.



Obr. č. 3: Vývoj regulace v oblasti léčivých přípravků do první definice LPMT (10) (*Pozn. GTMP – genové léčivé přípravky, SCMP – somatobuněčné léčivé přípravky, TEP – léčivé přípravky na bázi tkáňového inženýrství*).

Dnes jsou všechny LPMT autorizovány centrálně cestou EMA. Úkolem EMA je usnadňovat vývoj léků a jejich dostupnost, vyhodnocovat žádosti o registraci léků, kontrolovat bezpečnost léků během jejich životního cyklu a poskytovat informace zdravotnickým pracovníkům a pacientům. Důležitou roli hraje Komise pro léčivé přípravky (CAT) skládající se z 34 členů, která funguje v rámci EMA. Zajišťuje vědecké hodnocení, dohled a kontrolu bezpečnosti nad humánními a veterinárními léčivými přípravky v rámci EU, vydává doporučení ke klasifikaci LPMT (55).

Nicméně v r. 2017, tj. 8 let po zavedení regulačního rámce bylo registrováno pouze 5 LPMT: Provenge[®], 2013 – buněčná terapie pro léčbu metastatického, kastrát-rezistentního karcinomu prostaty, Glybera[®], 2012 – genový přípravek pro léčbu familiárního deficitu lipoproteinové lipázy a 3 autologní přípravky určené pro somatobuněčnou terapii nebo tkáňové inženýrství v rámci léčby chrupavky (ChondroCelect[®], 2009; MACI[®], 2013 a Holoclar[®], 2015) (1). Dle Mezinárodní platformy pro registraci klinických studií (ICTRP), který je součástí Světové zdravotnické organizace (WHO), bylo v roce 2018 registrováno více než 60 000

klinických studií, přičemž celkový počet klinických studií týkající se LPMT byl pouze 939 (62). Od roku 2009 do současnosti bylo registrováno pouze 17 LPMT, z čehož k r. 2022 byly 4 z nich pozastaveny vzhledem vysoké ceně přípravku (Tab. č. 5) (55). Počty klinických hodnocení v rámci České republiky v jednotlivých letech jsou uvedeny v Tab. č. 6.

Tab. č. 5: Seznam registrovaných LPMT, aktuální stav k r. 1.4.2022 (55,63).

Název	Výrobce	Datum povolení	Status
LIBMELDY	Orchard Therapeutics B. V.	Prosinec 2020	Povolen
TECARTUS	Kite Pharma	Prosinec 2020	Povolen
ZOLGENSMA	Novartis Gene Therapies EU Ltd.	Květen 2020	Povolen
ZYNTEGLO	Bluebird bio B. V.	Červen 2019	Povolen
LUXTURNA	Spark Therapeutics	Březen 2019	Povolen
YESCARTA	Kite Pharma EU B.V.	Srpen 2018	Povolen
KYMRIAH	Novartis Europharm Ltd.	Srpen 2018	Povolen
ALOFISEL	Takeda Pharma A/S	Březen 2018	Povolen
SPHEROX	CO.DON AG	Květen 2017	Povolen
ZALMOXIS	MolMed SpA.	Červen 2016	Povolen
STRIMVELIS	Orchard Therapeutics B. V	Květen 2016	Povolen
IMLYGIC	Amgen Europe B.V.	Říjen 2015	Povolen
HOLOCLAR	Holostem Terapie Avanzate s.r.l.	Březen 2015	Povolen
PROVENGE	Dendreon	Říjen 2013	Pozastaven v r. 2015
MACI	Vericel	Červen 2013	Pozastaven v r. 2014
GLYBERA	uniQure	Listopad 2012	Pozastaven v r. 2017
CHONDROCELECT	TiGenix	Listopad 2009	Pozastaven v r. 2016

Tab. č. 6: Počet klinických hodnocení v jednotlivých letech v ČR (10).

Rok	Počet	Rok	Počet
2005	2	2012	1
2006	0	2013	7
2007	3	2014	7
2008	1	2015	1
2009	6	2016	6
2010	1	2017	10
2011	8	2018	7
		2019 (1. pololetí)	2 (3 v procesu)

LTMP tedy představují dynamicky se rozvíjející oblast, nicméně většina produktů je v rané vývojové fázi (fáze I, II/III: 64,3 %, fáze II, II/III: 27,9 %, fáze III: 6,9 %) vzhledem k nákladnosti, časové náročnosti studie a specifitě, v klinických studiích je pak kladen důraz na malé množství vzorku, otevřené jednoramenné klinické hodnocení, integrované protokoly a přizpůsobivý design (1).

Opatřování výchozí suroviny pro výrobu LPMT je v diki tkáňového zařízení, odběrového zařízení nebo výrobce LPMT, pokud je současně tkáňovým nebo odběrovým zařízením a je řízeno zákonem č. 296/2008 Sb. o zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka a o změně souvisejících zákonů a vyhláškou Ministerstva zdravotnictví (MZ ČR) č. 422/2008 Sb. v platném znění (64,65). Výchozí surovina musí být propuštěna do výroby odpovědnou osobou tkáňového zařízení, po propuštění je výroba LPMT regulována Zákonem o léčivech č. 378/2007 Sb (66). Veškeré procesy jsou schvalovány, posuzovány a pravidelně auditovány SÚKL. SÚKL rovněž poskytuje konzultace, rozhoduje o zařazení produktů mezi různé typy LPMT, má své zastoupení rovněž v pracovních skupinách a výborech EMA (včetně CAT). V neposlední řadě se také podílí na tvorbě evropských legislativních norem. Vývoz základní suroviny pro výrobu LPMT k zahraničnímu výrobcí a zpětný import hotového LPMT schvaluje MZ ČR (54).

1.4.2 Použití léčivých přípravků před zavedením regulace

Ačkoliv byly v ČR LPMT poprvé definovány v r. 2004, podstatně manipulované buněčné přípravky existovaly už před tímto datem a před zavedením samotné regulace v rámci

EU (2008). Jako příklad lze uvést kultivaci lidských epidermálních keratinocytů (4,67), které se využívaly především k léčbě popálenin a jejich následnou kultivaci na nosiči (68). Průkopníky zavedení této metody do léčby popálenin ještě před rokem 1989 byli Königová, z Kliniky plastické chirurgie a popálenin v Praze, Veselý a Matoušková z ČSAV (5). Kultivované autologní epidermální keratinocyty byly aplikovány ve formě konfluentních blan nebo zakotvené na nosičích a aplikovány metodou „upside down“ (69,70).

V první polovině devadesátých let bylo použití autologních kultivovaných epidermálních keratinocytů do rutinní léčby popálenin zavedeno rovněž na Popáleninovém centru v Brně Bohunicích (71,72) a na Oddělení plastické chirurgie a popálenin v Hradci Králové (73,74). Na tomto programu podpořeném granty IGA MZ ČR a MO ČR se podílela i Katedra histologie a embryologie Lékařské fakulty v Hradci Králové. Keratinocyty byly používány ve formě suspenze, konfluentní blány i zakotvené na nosiči Laserskin vyvinutém italskými autory (68). Běžná byla již tehdy kryokonzervace části meziprojektu – primokultrury, pro případ selhání kultivace (75). Kromě popálenin byly keratinocyty úspěšně použity u dvou případů Lyellova syndromu (76). Tuto práci cituje Kočí et al. (8) jako vůbec první klinickou studii provedenou v ČR s léčivým přípravkem moderní terapie. Uvažovalo se i o použití alogenních keratinocytů (77) a o použití kompozitních dermoepidermálních štěpů (78,79). Po ukončení grantové podpory zájem o použití keratinocytů v ČR poklesl s ohledem na jejich vyšší cenu ve srovnání s použitím tehdy standardních biologických krytů, především xenogenních (80,81). Po ukončení používání xenogenních krytů v ČR (82) se zájem o použití autologních keratinocytů opět zvýšil (83), ale zatím se v ČR nezačala žádná klinická studie orientovaná tímto směrem (8).

Podobně jako keratinocyty u popáleninových úrazů byly ještě před přijetím nových regulačních pravidel často používány kultivované limbální buňky k léčbě traumatických i zánětlivých defektů předního epitelu rohovky. V ČR byly tyto buňky připravovány v laboratoři 1. LF UK v Praze a VFN Praha, založené prof. Filipcem (84,85). Po ukončení této aktivity v důsledku nových regulačních pravidel byl v ČR v rámci klinické studie používán přípravek Holoclar (viz kapitola 1.1.3). Po jeho registraci v r. 2015 výrobce plánoval jeho použití i na oční klinice FN HK, k realizaci však nedošlo. Alternativně v současné době dominuje v klinické praxi použití amnia, které se do defektu rohovky vsívá a trvale se připojí, zatímco buňky předního epitelu po něm migrují, až se vytvoří nový epiteliální kryt (86).

Ještě většího rozšíření doznalo použití autologních kultivovaných chondrocytů při léčbě traumatických defektů chrupavky. Původní metoda Brittbergova spočívala v aplikaci suspenze buněk do defektu chrupavky a v jeho překrytí lalokem z periostu (7). Později se prosadilo

použití chondrocytů zakotvených na různých typech nosičů (87–90). S těmito typy přípravků byly dosaženy výrazně lepší klinické výsledky než se suspenzí buněk (88,89). Kontrolované klinické studie jednoznačně prokázaly lepší výsledky této metody ve srovnání s alternativami, jako je známková plastika či mikrofraktury (90–93), a to i po dlouhodobém, až desetiletém sledování od implantace (94). Jedna ze studií sledovala i vliv kryokonzervace na fenotyp kultivovaných chondrocytů a prokázala jeho změny (95).

Využití kultivovaných chondrocytů při léčbě úrazových defektů chrupavky i některých ortopedických onemocnění, např. *osteochondritis dissecans* se dobře rozvíjelo i v ČR. Kultivované chondrocyty v suspenzi i zakotvené na nosiči (Tissue-Coll) byly připravovány na pracovišti Tkáňové banky v Brně Bohunicích (96) a Tkáňové ústředny FN HK, a využívány na řadě chirurgických a ortopedických pracovišť. Na našem pracovišti byla příprava chondrocytů v suspenzi původní Brittbergovou metodou a jejich použití na Ortopedické klinice podpořeno grantem IGA MZ ČR (97). Současně byly v rámci rutinní klinické praxe používány u úrazových defektů chrupavky chondrocyty zakotvené na nosiči (98). Mimo FN HK používalo naše chondrocyty na nosiči Centrum léčby pohybového aparátu v Praze Vysočanech, které se orientovalo na sportovní traumatologii. Rutinně byla používána i kryokonzervace meziprojektu, především v případě náhlé indispozice pacienta (interkurentní infekce, akutní operační výkon z jiné indikace) nebo z jiných, především rodinných, důvodů na straně pacienta. Vývojem přípravku na bázi chondrocytů se zabývalo i pracoviště AV ČR (99).

Počátkem roku 2009 byl s ohledem na nová pravidla EK tento program ve FN HK přerušeno a podařilo se jej obnovit v roce 2012 po splnění všech nově vyžadovaných podmínek daných zákonem o tkáních a buňkách a zákonem o léčivech, tj. získání povolení činnosti Tkáňového zařízení a externího odběrového zařízení – II. Ortopedická klinika dětí a dospělých FN v Motole (listopad 2011), povolení pro výrobu hodnocených léčivých přípravků moderní terapie a získání certifikátu správné výrobní praxe (únor 2012). Současně bylo nutné splnit pokyny EMA pro používání léčivých přípravků moderní terapie obecně (100) a výrobu a kontrolu kultivovaných chondrocytů (101), především s ohledem na použité metody kontroly vitality a čistoty kultivovaných buněk. Teprve poté souhlasilo MZ ČR s použitím neregistrovaného léčivého přípravku moderní terapie vedeného pod pracovním názvem Expanded Cart Tissue Allograft (ECTAG) v rámci specifického léčebného programu vyhlášeného na 1 rok. Specifický léčebný program probíhal výhradně na II. Ortopedické klinice FN v Motole, a hlavní zkoušející doc. Handl, který již měl předchozí zkušenosti (102), úspěšně použil chondrocyty zakotvené v Tissue-Collu u 12 pacientů s hlubokými chondrálními defekty většími než 4 cm² (103,104). Na specifický léčebný program měla navazovat standardní studie,

k její realizaci však nedošlo. Kompetentní autority ČR tehdy doporučovaly klinickým pracovištím použití již v EU centrálně registrovaného autologního přípravku Chondrocelect. Toto řešení však klinická pracoviště odmítala pro jeho vysokou cenu. Přípravek Chondrocelect byl nakonec stažen z trhu (8). V současné době je v ČR situace řešena nemocniční výjimkou pro neregistrovaný autologní přípravek Chondrograft (Národní centrum tkání a buněk Brno, nyní Ostrava).

Alternativou použití registrovaného autologního přípravku je zařazení pacientů do studie, kdy je povinností výrobce poskytovat hodnocený přípravek zdarma. Na ortopedické klinice FN HK proběhla randomizovaná studie Novocart 3D (Tab. č. 2) zaměřená na srovnání použití chondrocytů zakotvených v nosiči s metodou mikrofraktur.

V současné době probíhá na Ortopedické klinice FN HK studie zaměřená na léčbu chondrálních defektů hodnoceným přípravkem z hMSCs (Bioinova, a.s., Praha), Tab. č. 2. Použití hMSCs má proti preparátům na bázi chondrocytů výhodu spočívající jednak ve vyloučení první artroskopie nutné pro odběr vzorku kloubní chrupavky pro kultivaci a jednak v lepší diferenační schopnosti mezenchymálních buněk (105). Paralelně klinika využívala pro léčbu *osteocondritis dissecans* i alternativní metoda transchondrálního mikrodrillingu (106).

Počátkem tohoto tisíciletí upozornilo několik experimentálních prací na možnost léčby akutního infarktu myokardu intrakoronární aplikací buněk kostní dřeně (107,108). Pilotní studie provedené u pacientů s infarktem myokardu, kterým byly intrakoronárně aplikovány minimálně manipulované buňky autologní kostní dřeně, prokázaly nadějně výsledky (109,110). Účinnost této léčby potvrdily i některé navazující kontrolované klinické studie (111,112). Tyto studie prokázaly jednak bezpečnost intrakoronárního podání buněk kostní dřeně, jednak zlepšení funkce levé srdeční komory po jejich implantaci. Uvedená metoda byla zkoušena i v ČR. Ve FN HK klinické zkoušení probíhalo v rámci výzkumného záměru MZ0 FN HK 2005 na I. interní kardiologické klinice. Na záměru se podílelo i naše pracoviště, které provádělo úpravu odebrané suspenze kostní dřeně vlastním sedimentačně-centrifugačním postupem. Celkem byla implantace provedena u 6 pacientů s akutním infarktem myokardu. I tato studie prokázala bezpečnost podání a zlepšení funkce levé komory po implantaci (17). Výsledky obdobné studie po dvouletém, sledování publikovala rovněž Skalická et al. z pražského IKEM (113).

Podobně nadějně se jevila intramuskulární aplikace suspenze kostní dřeně při léčbě ischemické choroby dolních končetin, v ČR se touto problematikou zabývá např. Jalůvka (114). Hlavní metodou léčby kritické ischemie dolních končetin však stále zůstávají chirurgické rekonstrukce umělou protézou nebo čerstvým (115,116), či kryokonzervovaným alogenním

cévním štěpem (117,118). Nevýhodou tohoto postupu je však nutnost použití imunosuprese. Teprve budoucnost ukáže, do jaké míry se v těchto indikacích v praxi uplatní decelularizované cévní alografty nebo biologické cévní protézy vytvořené z jiných decelularizovaných alogenních nebo xenogenních pojivových tkání, popřípadě osazených kultivovaným autologním cévním endotelem, které by bylo možno použít bez imunosuprese (119).

1.4.3 Regulatorní rámec v USA

Regulace v oblasti LPMT je v USA v dikci FDA. Byla založena v r. 1906. Produkty buněčné terapie a genové terapie jsou regulovány Centrem biologického hodnocení a výzkumu (CBER). CBER postupuje dle § 361 zákona o službách veřejného zdraví a souvisejícími předpisy, zejména č. 21 kódovacího federálního systému (CFR – Code of Federal Regulations) část 1271.10(a)(1) definující kritéria pro minimálně manipulované přípravky a část 1271.10 (a) (2) týkající se homologního použití (56). V současné době je schváleno celkem 23 LPMT (120).

V provnání FDA a EMA existují rozdíly v klasifikaci LPMT (16). Porovnáme-li údaje v Tab. č. 5 a 7, je patrné, že přípravek Maci, který má aktuálně registraci v USA, je v EU pozastaven. Oproti EU je v USA schváleno velké množství LPMT založených na hematopoetických progenitorových buňkách z pupečnickové krve.

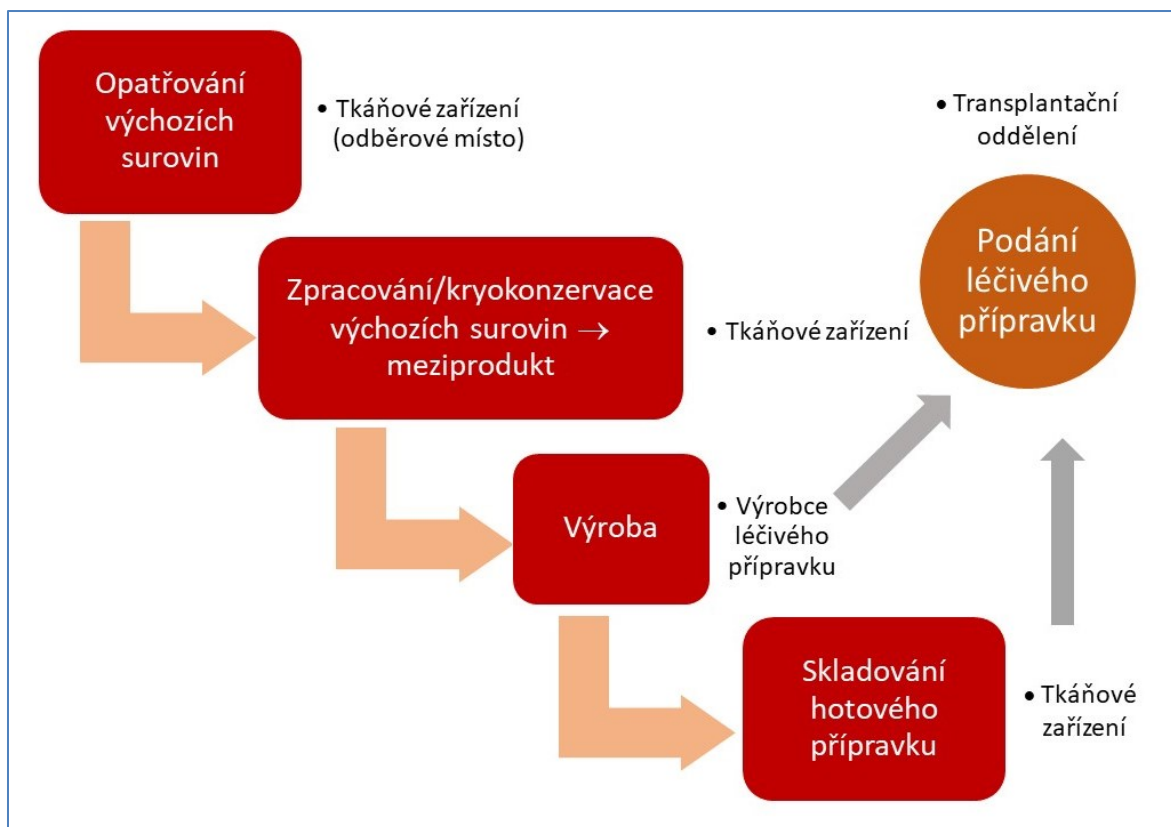
Tab. č. 7: Seznam LPMT aktuálně schválených v USA (120).

Název (účinná látka)	Výrobce
ABECMA (idecabtagene vicleucel)	Celgene Corporation, a Bristol-Myers Squibb Company
ALLOCORD (HPC pupečnickové krve)	SSM Cardinal Glennon Children's Medical Center
BREYANZI (lisocabtagene maraleucel)	Juno Therapeutics, Inc., a Bristol-Myers Squibb Company
CARVYKTI (ciltacabtagene autoleucel)	Janssen Biotech, Inc.
CLEVECORD (HPC pupečnickové krve)	Cleveland Cord Blood Center
DUCORD (HPC pupečnickové krve)	Duke University School of Medicine
GINTUIT (alogenní kultivované keratinocyty a fibroblasty v hovězím séru)	Organogenesis Incorporated

HEMACORD (HPC pupečnickové krve)	New York Blood Center, Inc
Obchodní název nedefinován, HPC pupečnickové krve	Clinimmune Labs, University of Colorado Cord Blood Bank
	MD Anderson Cord Blood Bank
	LifeSouth Community Blood Centers, Inc.
	Bloodworks
IMLYGIC (talimogene laherparepvec)	Amgen Inc.
KYMRIAH (tisagenlecleucel)	Novartis Pharmaceuticals Corporation
LAVIV (Azficel-T)	Fibrocell Technologies, Inc.
LUXTURNA (voretigene neparvovec-rzyl)	Spark Therapeutics, Inc.
MACI (autologní chondrocyty kultivované na prasečí membráně)	Vericel Corporation
PROVENGE (sipuleucel-T)	Dendreon Corporation
RETHYMIC (alogenní zpracovaná tkáň brzlíku-agdc)	Enzyvant Therapeutics GmbH
STRATAGRAFT (alogenní kultivované keratinocyty a kožní fibroblasty v myším klagenu-dsat)	Stratatech Corporation
TECARTUS (brexucabtagene autoleucel)	Kite Pharma, Inc.
YESCARTA (axicabtagene ciloleucel)	Kite Pharma Inc.
ZOLGENSMA (onasemnogene abeparvovec-xioi)	Novartis Gene Therapies, Inc.

1.5 Výroba LPMT

Výroba LPMT v EU probíhá dle pokynů Evropské komise implementovaných v ČR jako pokyn SÚKL VYR-43 pro správnou výrobní praxi (SVP) (121,122). Pravidla se vztahují na všechny registrované i hodnocené LPMT a jasně definují požadavky na výrobní prostory, personál, vybavení, dokumentaci, výchozí suroviny a materiály pro výrobu, atd. Výrobní proces probíhá dle následujícího schématu (Obr. č. 4).



Obr. 4: Schéma výroby LPMT.

1.5.1 Pracovníci

Pracovníci pracující v čistých prostorech by měli absolvovat specifické školení v aseptické výrobě, včetně základních aspektů mikrobiologie, musí absolvovat pravidelná školení v zásadách SVP. Před účastí v rutinních aseptických výrobních operacích mají pracovníci absolvovat úspěšný test simulace výrobního procesu (121). Pracovníci používají ve výrobních prostorech speciální antiemisní kombinézy, přičemž pro každou třídu čistoty je přesně určen daný typ kombinézy a požadavky na zakrytí částí těla pracovníka (ústěnka, čepce, rukavice). Specifické je pak oblékání kombinézy tak, aby nedošlo ke kontaminaci obleku kůží pracovníka (prostory třídy čistoty A/B). Klíčovými osobami ve výrobě jsou osoba odpovědná za výrobu, osoba odpovědná za kontrolu jakosti a kvalifikovaná osoba. Roli osoby odpovědné za kontrolu jakosti a kvalifikované osoby může vykonávat tatáž osoba. Ovšem osoba, která kontroluje jakost (manažer jakosti) by měl být na výrobě nezávislý (15,121).

1.5.2 Prostory pro výrobu

LPMT musí být vyráběny v čistých prostorech s přesně danými požadavky na jednotlivé třídy čistoty z hlediska maximálního přípustného počtu částic (Tab. č. 8) a z hlediska

mikrobiologické zátěže čistých prostor za provozu (Tab. č. 9). Pohyb osob, tok kritických materiálů a odpadů je v čistých prostorách jasně oddělen. Na obr. č. 5 je uveden příklad z praxe (Tkáňové zařízení FN HK) – schéma ukazuje rozdělení jednotlivých tříd v čistých prostorách, kde se zpracovávají buňky a tkáně. Obr. č. 6 ilustruje zpracování buněčných koncentrátů v laminárním boxu ve třídě čistoty A s pozadím B. Měření částic vč. aeroskopického stanovení provádíme na našem pracovišti čtvrtletně. 1x ročně je prováděna operační kvalifikace čistých prostor autorizovanou firmou, která zahrnuje jak kontrolu počtu částic, tak mikrobiologickou kontrolu, kontrolu přetlaků a chodu vzduchotechniky. Na operační kvalifikaci navazuje procesní kvalifikace, která monitoruje výše zmíněné parametry při pracovním procesu (provádí personál pracoviště). V pravidelných intervalech (1x měsíčně) jsou také prováděny mikrobiologické stěry z povrchů pracovních ploch, ale také z pracovní kombinézy pracovníka. Závěry validací jsou pravidelně auditovány SÚKL.

Pro skladování hotových LPMT není nutný prostor s definovanou čistotou (Obr. č. 5). Je však nutná kontinuální kontrola hladiny kyslíku, teploty a vlhkosti. Standardem je kontrola přístupu do skladovacího prostoru, např. pomocí zaměstnaneckých karet a kontinuální videosurveillance celého prostoru.

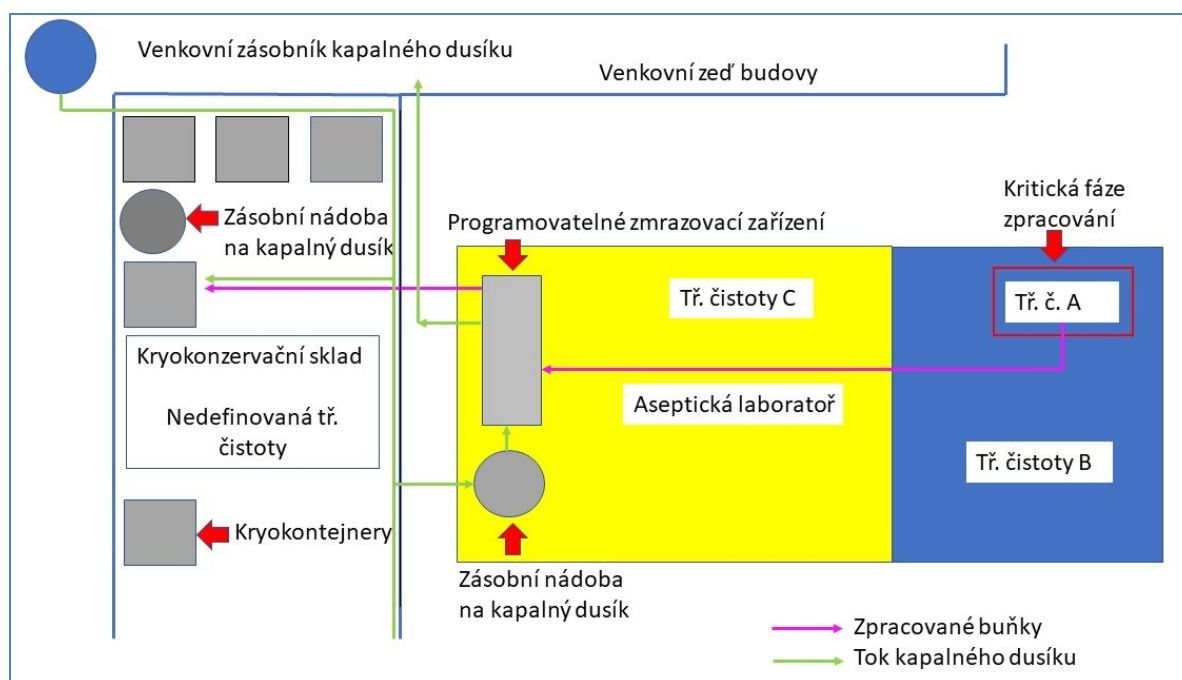
Tab. č. 8: Maximální přípustné parametry počtu částic v jednotlivých třídách čistých prostor, převzato z (121).

Maximální přípustný počet částic o velikosti rovné nebo větší než 0,5 µm			
Třída	Za klidu (na m³)	Za provozu (na m³)	Klasifikace podle normy ISO (za klidu/za provozu)
A	3 520	3 520	5/5
B	3 520	352 000	5/7
C	352 000	3 520 000	7/8
D	3 520 000	Neurčeno	8

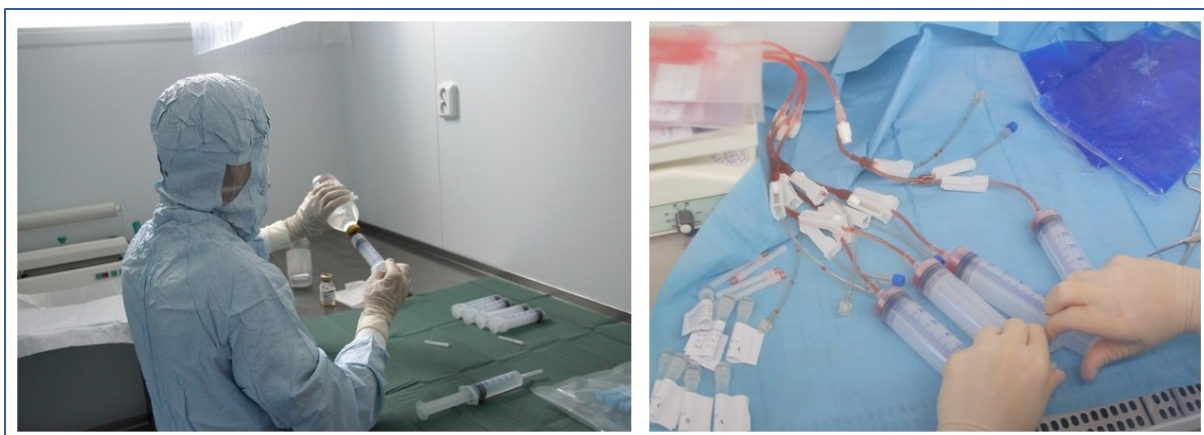
Tab. č. 9: Maximální přípustné počty CFU (colony forming units), převzato z (121).

Třída	Vzorkování vzduchu CFU/m ³	Spadové misky (průměr 90 mm) CFU/4 hod*	Kontaktní desky (průměr 55 mm) CFU/deska
A**	<1	<1	<1
B	10	5	5
C	100	50	25
D	200	100	50

Produkty jsou vyráběny za kontinuálního monitoringu částic. Finální produkt je do klinického použití propuštěn kvalifikovanou osobou výrobce.



Obr. č. 5: Schéma čistých prostor s vyznačením jednotlivých tříd čistoty. Tok materiálu je vyznačen fialově, rozvod kapalného dusíku je vyznačen zeleně. V prostoru pro vlastní skladování (vlevo) není čistota prostředí definována.



Obr. č. 6: Příprava kryoprotektivních roztoků pod stropem s laminárním prouděním, tř. čistoty A/B (vlevo), zpracování buněčného koncentrátu v laminárním boxu, tř. čistoty A/B (vpravo).

1.5.3 Přístrojové vybavení

Zařízení používané při výrobních nebo kontrolních činnostech musí odpovídat účelu a nemá představovat žádné riziko pro přípravek. Ty části výrobního zařízení, které se dostávají do styku s přípravkem, nemají vykazovat nežádoucí reaktivní, aditivní, adsorpční ani absorpční vlastnosti, které by mohly ovlivnit jakost přípravku. Kromě toho ty části zařízení, které přicházejí do styku s buňkami/tkáněmi, mají být sterilní (121).

Přístroje klíčové pro výrobu jsou validovány autorizovanou firmou 1x ročně dle metrologického plánu výrobce LPMT, je u nich provedena bezpečnostní technická zkouška včetně elektrevize, probíhá pravidelná kalibrace čidel (teplota, vlhkost, hladina kyslíku). Detailní přehled vhodných přístrojů pro kryokonzervaci, skladování, transport a rozmrazování LPMT publikoval nedávno Hunt (123).

1.5.4 Dokumentace

Dokumentace výrobního procesu zahrnuje specifikace výchozích surovin, meziproductů a konečných přípravků, specifikace kritických materiálů, tj. takových, které by mohly ovlivnit jakost a bezpečnost konečného přípravku, musí být jasně definovány šarže. Dále se vypracovává Základní dokument o místě výroby („Site master file“), instrukce a standardní operační postupy pro výrobu, propouštění, výdej, stahování šarží nebo likvidaci LTMP. Pro každé změny v řízené dokumentaci musí být vedeno změnové řízení, dokumenty jsou rovněž auditovány SÚKL.

1.5.5 Analýza rizik

Pro jednotlivé kroky výrobního procesu by měla být provedena analýza rizik tak, aby se předešlo případným nežádoucím událostem, které by mohly vést k ohrožení jakosti a bezpečnosti LPMT (15,121). Vhodnou metodou je např. analýza FMEA (Failure Mode and Effects Analysis), která využívá kombinaci tří parametrů; významu, výskytu a pravděpodobnosti odhalení vady při 5ti nebo 10ti bodové stupnici. Kombinací všech 3 faktorů dostaneme hodnotu tzv. „rizikového číslo“ (RPN). Při překročení kritické hodnoty RPN je významné riziko vzniku vady a měla by následovat nápravná opatření (15,124).

1.5.6 Vlastní výroba

Výrobní proces probíhá asepticky, v čistých prostorách patřičné třídy čistoty. Materiály, zařízení a ostatní předměty, které jsou zaváděny do čistých prostor, nesmějí být zdrojem kontaminace. Aseptický postup musí být validován a musí zahrnovat simulaci výrobního procesu (tzv. „media fill“). Simulace aseptického výrobního procesu představuje provedení výrobního procesu s použitím sterilní živné půdy pro mikrobiologický růst a/nebo placebo (např. kultivační média buněk, o nichž je prokázáno, že podporují růst bakterií), kterým se otestuje, zda výrobní postupy jsou adekvátní pro prevenci kontaminace během výroby (121,122).

1.6 Kryokonzervace

Kryokonzervace je proces, který umožňuje dlouhodobé uskladnění přípravku a optimální načasování podání příjemci (nezávislé na aktuálním zdravotním stavu pacienta). Jedná se o proces chránící buněčné organely, buňky, tkáně a jiné biologické struktury zmrazením na velmi nízké teploty. První teorii kryokonzervace formuloval Luyet již ve 30. letech 20. století. V podstatě existují 2 přístupy: vitifikace velmi rychlým poklesem teplot (125,126) nebo postupné zmrazování (127,128).

V případě LPMT můžeme kryokonzervovat buď výchozí surovinu, meziprodukt pro výrobu LPMT, nebo LPMT již jako konečný produkt. Výhodou tohoto postupu je zajistit pacientovi/příjemci terapii i v případě, kdy není schopen podstoupit plánovanou transplantaci a uchovat tak materiál pro pozdější použití, resp. zabránit jeho znehodnocení. Kryokonzervací hotového produktu vzniká další LPMT s novými vlastnostmi. Cílem je proto navrhnout takový kryokonzervační protokol, aby se vlastnosti kryokonzervovaného produktu co nejvíce blížily vlastnostem produktu před kryokonzervací.

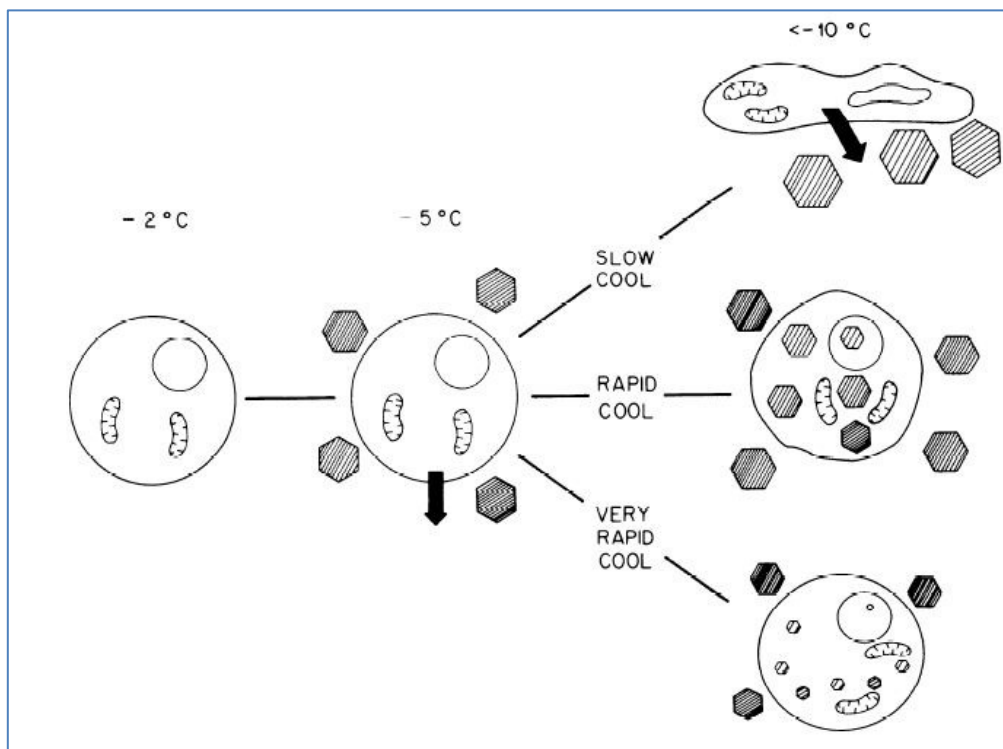
1.6.1 Kryoprotektivní roztoky

V procesu kryokonzervace hrají důležitou roli kryoprotektiva, která dělíme na ta, která do buňky pronikají a na ta, která buněčnou membránou nepronikají. Mezi pronikající (intracelulární) kryoprotektiva patří: DMSO, glycerol, ethylenglykol, propylenglykol, methanol, ethanol, propanol, formamid. Chrání buňky před vysokými koncentracemi solí a snižují dehydrataci buněk na únosnou mez. Mezi nepronikající (extracelulární) kryoprotektiva patří např. polyvinylpyrolidon, trehalóza, laktóza, glukóza, manitol, sorbitol, hydroxyethylškrob, která jsou používána v nízkých osmolálních koncentracích (40). V praxi je často používána kombinace jak intracelulárních, tak extracelulárních kryoprotektiv (13,129).

Většina kryokonzervačních protokolů používá jako kryoprotektivum 10% DMSO v kombinaci s hovězím sérovým albuminem v rozmezí koncentrací 5 % - 90 % (31,40,129–132). Obecně je DMSO považováno za netoxické v koncentracích pod 10 % (133). Přesto toxicita DMSO při podání kryokonzervovaných přípravků představuje nejčastější komplikaci. Závažné nežádoucí účinky byly popsány u pacientů s kardiovaskulárními, respiračními a renálními obtížemi (134–136). Toxicita DMSO závisí na podané dávce, přičemž maximální denní dávka činí 1 g DMSO na kg hmotnosti pacienta/příjemce (137–139). Od počátku tisíciletí upozorňoval Baust na možnost vyvolání opožděné buněčné smrti kryokonzervací (cryopreservation induced delayed onset of cell death), zvláště v případě použití DMSO (140,141). Autor zdůrazňuje nutnost kombinovat po rozmrazení testy membránové integrity s repopulačními testy a epigenetickými studiemi (142,143). Tyto zásady jsou zvláště důležité při kryokonzervaci LPMT (144). Detailní přehled problematiky použití DMSO jako kryoprotektiva a možnosti jeho náhrady publikoval nedávno Awan et al. (145). Navrhuje dodržovat pravidlo „tří R“ „Reduce, Replace, Remove“, tedy 1. Snižuj koncentraci, resp. podaný objem, 2. Nahrazuj, 3. Odstraňuj. Regulační pravidla EU nevyklučují použití DMSO pro kryokonzervaci LPMT v rámci klinických studií, nicméně by mělo být před vlastním podáním přípravku odstraněno odmytím nebo diafiltrací (122). Tam, kde to není možné, např. u geneticky modifikovaných LPMT, přicházejí v úvahu další 2 způsoby, tj. snížení podaného objemu přípravku a kombinace DMSO s jinými kryoprotektivy. Často je také využíváno hovězí nebo ovčí sérum pocházející ze zvířat z certifikovaných chovů jako aditivum kryokonzervační směsi. Současným trendem je hledání nových kryokonzervačních směsí bez obsahu DMSO a zvířecích komponent (40,132) s využitím např. trehalosy (146), kryokonzervačního média Biofreeze (132), karboxylovaného poly-L-lysinu (32), ethylenglykolu nebo propylenglykolu (40).

1.6.2 Rychlost zmrazování

Důležitým aspektem je také rychlost zmrazování. Při zmrazování suspenze buněk ve fyziologickém roztoku voda krystalizuje v čisté formě v extracelulárním prostoru. Dochází tak ke vzniku koncentračního gradientu napříč buněčnou membránou. Jestliže k teplotním změnám dochází pomalu, voda se přemísťuje z buněk v důsledku osmotického stresu. S postupujícím ochlazováním se tvoří více ledu, soli se koncentrují, dochází k dehydrataci buněk a k jejich srašťování. Poškození buněk způsobené rostoucí koncentrací solí je označováno jako „poškození pomalým mrazením“ (40,147). Pokud je rychlost zmrazování rychlá, dochází k tvorbě intracelulárního ledu a „poškození rychlým zmrazováním“. Na Obr. č. 7 jsou znázorněny fyzikální pochody, ke kterým dochází během pomalého, rychlého a velmi rychlého zmrazování. Rychlost ochlazování by tedy měla být dostatečně vysoká, aby bylo dosaženo nízkých teplot. Aby bylo minimalizováno působení rozpuštěných látek, je třeba se vyvarovat tvorbě intracelulárního ledu. Jednotlivé typy buněk mají rozdílnou membránovou propustnost, je tedy třeba použít optimální rychlost zmrazování (40).



Obr. č. 7: Schéma fyzikálních procesů uvnitř buňky během zmrazování, převzato z Mazur, 1984 (147).

Pro buňky a tkáně vyžadující pomalé zmrazovací režimy se dlouhodobě používají programovatelná zmrazovací zařízení, obvykle pracující na bázi regulace vstříkovaní kapalného dusíku do mrazicí komory přístroje (123,148,149). Alternativu představují nedávno vyvinuté přístroje, určené především pro kryokonzervaci LPMT, které se obejdou bez použití kapalného dusíku, takže je lze umístit i do čistých prostor třídy B (123,150).

1.7 Skladování kryokonzervovaných produktů

Všechny produkty určené pro klinické použití by měly být skladovány v souladu s teplotními nároky produktu. Produkty by měly být skladovány dle legislativních požadavků tak, aby bylo zabráněno případné křížové kontaminaci. Ve zvláštním karanténním sektoru by pak měly být odděleně skladovány produkty s pozitivními infekčními markery. V naší praxi skladujeme též odděleně produkty pro autologní a alogenní použití. Zatímco výchozí suroviny pro výrobu LPMT mohou být skladovány v souladu se zákonem č. 296/2008 Sb., skladování hotových LPMT se řídí pravidly SVP a zákonem č. 378/2007 Sb. a tyto musí být skladovány ve vyhrazeném kontejneru. Jednotlivé druhy přípravků by měly mít svůj vlastní označený rám vnitřní vestavby, přičemž konkrétní přípravky jsou pak uloženy v samostatných pozicích v rámu (151,152). Pro dlouhodobé skladování se nejčastěji využívá skladování v parách kapalného dusíku ($T < -150\text{ °C}$). Takováto zařízení musí mít zajištěno havarijní dochlazování pro případ selhání techniky. Teplota by měla být monitorována a zaznamenávána, s nastavením alarmových stavů. Důležitou součástí skladovacích systémů jsou softwary (SW) pro skladové hospodářství produktů, aby bylo možné kdykoliv snadno dohledat jakýkoliv produkt. Skladovací SW musí být spravovány v souladu s požadavky na ochranu osobních údajů, protože obsahují citlivá data (56,151–153). Za posledních 30 let technologie skladování kryokonzervovaných vzorků pokročila. Prvotní praxe skladování pod hladinou kapalného dusíku v nádobách s ručním (154), později s automatickým doplňováním dusíku v kombinaci s používáním kryovaků vyrobených z plastů ne vždy dostatečně odolných vůči velmi nízkým teplotám, se ukázaly jako nevyhovující (popraskání obalů kryovaků a kryoampulí), navíc také vzhledem k možné křížové kontaminaci prostřednictvím kapaliny (155). Od poloviny 90. let minulého století bylo skladování prováděno v pokročilejších kryokontejnerech uzpůsobených pro skladování v parách či kapalném dusíku (156). Tato technologie stále plně vyhovuje pro skladování minimálně manipulovaných buněk určených k transplantaci, i pro skladování mononukleárních buněk pro výrobu geneticky modifikovaných LPMT. V současné době je nejpokročilejší tzv. „dry-storage“ technologie, kdy je přímý kontakt uložených vzorků

s kapalinou vyloučen (viz 4.15 a 4.16). Při porovnání těchto zařízení se zařízeními staršího typu je také patrný rozdíl v konstrukci zařízení, kdy modernější kryokontejnery mají lepší obvodovou konstrukci a menší průměr víka (Obr. č. 31), což s sebou nese výhody v podobě menších tepelných ztrát, menší spotřeby kapalného dusíku. Jejich nevýhodou je menší manipulační prostor (menší průměr víka). Tento problém pak řeší robotické systémy umožňující automatizované vyhledání a podání konkrétního vzorku přímo uživateli. Tato zařízení jsou však velmi drahá (řádově několik milionů) a nejsou tedy součástí běžné praxe tkáňových zařízení. Hlavní výhoda ovšem spočívá ve stabilnějších teplotních poměrech uvnitř zařízení, které jsou minimálně ovlivňovány procesem automatického doplňování kapalného dusíku.

1.8 Rozmrazování

Proces rozmrazování po určité době skladování je významnou částí kryokonzervačního protokolu, je nezbytné kontrolovat jeho kinetiku stejně tak jako u procesu ochlazování při vlastním zmrazování. Dlouhou dobu byl akceptován a aplikován koncept rychlého rozmrazování. Tento koncept vychází z teorie, že při pomalém rozmrazování může s přibývajícím množstvím volných molekul vody docházet k jejich rekrystalizaci, což může vést k poškození buněk (157). Tradiční metody pro rozmrazování vzorků používají vodní lázeň. Tento typ rozmrazování může být velkým zdrojem variability při porovnání parametrů stejných vzorků (158), tato metoda se osvědčila především pro vzorky menšího objemu (kryoampule a nebo nízkoobjemové kryovaky) (159,160). U rozmrazování velkoobjemových vzorků záleží na tvaru a geometrii kryovaků (161). V současné době jsou již komerčně dostupné elektricky vyhřívané regulovatelné ohříváče, např. Via-THAWTM (Cytiva, UK), Plasmatherm (Barkey, GmbH, Německo). Tyto systémy používají mechanické zahřívání, při němž nedochází k přímému kontaktu s rozmrazovaným vzorkem, eliminují variabilitu mezi uživateli a poskytují konzistentní programovatelný proces, který odstraňuje jakýkoli subjektivní zásah ze strany uživatele (158).

Je-li geometrie kryokonzervovaných produktů standardní a je-li zajištěna kryokonzervace v tenké vrstvě, jako je např. zmrazování minimálně manipulovaných HPC nebo geneticky manipulovaných přípravků Yescarta, Tecartus (Kite Pharma, USA) či Kymriah, (Novartis, Švýcarsko), je rozmrazování ve vodní lázni stále s úspěchem používáno (148).

V některých situacích je naopak preferováno pomalé rozmrazování, a to u některých produktů s velkou tloušťkou a definovanou strukturální integritou jako jsou např.

kryokonzervované arteriální segmenty, kde by rychlý vzestup teplot při rozmrazování mohl vést ke vzniku mikrofraktur v této tkáni (162–164). Výhodou použití pomalého rozmrazování může být i snížení imunogenicity cévního štěpu, jak nedávno prokázal Hrubý při experimentální transplantaci kryokonzervovaných aortálních štěpů u potkanů (165).

V současné době je předmětem zájmu výzkum technologií založených na využití nanočástic s cílem zlepšit distribuci tepla napříč vzorkem v kryogenních teplotách (166).

1.9 Odmytí DMSO

Ačkoliv jsou kryoprotektiva nepostradatelná pro zachování vysoké životaschopnosti buněk, vysoké koncentrace kryoprotektiv mohou způsobovat toxické nežádoucí reakce (167). Z těchto důvodů jsou vyvíjeny strategie, jak toxicitu neutralizovat, snížit koncentraci kryoprotektiva nebo jak jej nejúčinněji odmyt před klinickým podáním. Nejvíce využívanou technikou v odmyvání DMSO je postupné ředění buněčné suspenze s její následnou centrifugací a kolekcí roztoku zbaveného kryoprotektiva (149). Stupeň ředění a složení promývacího roztoku bývají upraveny tak, aby byly minimalizovány osmotické změny. Součástí promývacího média by měly být akceptovatelné z klinického hlediska, tzn., že by neměly obsahovat komponenty zvířecího původu a měly by obsahovat certifikované a SÚKLEM schválené produkty. V klinické praxi jsou obvykle při odmyvání používány certifikované solné roztoky/elektrolyty vč. 0,9 % NaCl, např. Normosol-R[®], Plasma-Lyte 148[®], Ringerův roztok. Tato média jsou často suplementována dextrans-40, hydroxyethylškrobem nebo lidským sérovým albuminem v různých koncentracích (168–171). K odmyvání kryoprotektiv lze také využít komerčně dostupné uzavřené automatické systémy, které byly vyvinuty pro hematopoetické buněčné štěpy, jež jsou obvykle charakterizované velkými transplantovanými objemy. Příkladem takovýchto systémů jsou např. přístroje založené na principu ředění a následné centrifugaci, např. COBE[®]2991 Cell Processor (Terumo BCT, Inc.), Sepax S-100[®] (Sepax 2 S-100), Biosafe SA[®] (GE HealthCare) (134,169,171,172) nebo na principu ředění a následné filtraci, např. Haemonetics ACP215 Automated Cell Processor[®] (Haemonetics Corp), CytoMate[®] (Baxter/Nexell) nebo Lovo[®] (Fresenius Kabi) (134,173,174). Ačkoliv jsou automatické systémy doporučovány zejména pro klinické aplikace, jejich vysoká cena a velké pracovní objemy často limitují jejich použití v praxi. Manuální odmytí kryoprotektiva před aplikací pacientovi představuje náročnější krok, ale je cenově dostupnější.

V naší praxi ve FN HK odmyváme DMSO manuálně, k naředění výchozí buněčné suspenze před odmytím používáme hydroxyethylškrob s přísadkou ACD-A s protisrážlivým

účinkem. Nejčastějšími indikacemi k odmytí DMSO z produktů buněčné terapie jsou renální insuficience, primární amyloidóza, sekundární amyloidóza u mnohočetného myelomu, nebo alergická reakce na DMSO, která se může objevit při prvním podání. Z literatury jsou známy případy závažných nežádoucích reakcí po podání infúze obsahující DMSO (134,136,175–177). Základem naší praxe je používání CE certifikovaného DMSO v kombinaci s hydroxyethylškrobem, efektivní stimulace pacientů (G-CSF) a separační protokoly, eliminace nesterilních kryokonzervovaných vaků a kontrolované podání přípravků obsahujících DMSO, aby byla dodržena maximální povolená denní dávka. Podání vaků s DMSO je případně rozděleno do více dnů (178,179).

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce bylo ověřit možnosti uplatnění kryokonzervačních metod při opatřování, resp. zpracování základní suroviny pro výrobu léčivých přípravků moderní terapie (LPMT) při jejich vlastní výrobě a při jejich dočasném skladování v kryokonzervačním skladu zdravotnického zařízení před jejich použitím a zavedení těchto metod do praxe pracoviště autorky práce.

Dílčí cíle disertační práce byly následující:

1. Ověřit možnost splnění limitů výrobců pro množství a kvalitu odebraných buněk kostní dřeně pro výrobu hodnoceného léčivého přípravku na bázi hMSCs (část 1) a mononukleárních buněk periferní krve pro výrobu registrovaného léčivého přípravku, ve druhém případě i po kryokonzervaci (část 2).
2. Ověřit experimentálně možnost provedení kryokonzervace hodnoceného léčivého přípravku na bázi hMSCs za podmínek SVP v rámci schválené studie EUDRA CT 2016-00926-21, srovnat parametry kryokonzervovaného přípravku s parametry uvedenými výrobcem ve specifikaci chlazeného (nativního) přípravku (část 2).
3. Ověřit vliv odmytí DMSO na klíčové parametry rozmrazené suspenze HPC pro autologní transplantaci (část 3).
4. Navrhnout a v praxi ověřit vhodný způsob skladování (část 4) a transportu základní suroviny pro výrobu finálních geneticky modifikovaných přípravků moderní terapie na místo výroby, dočasného skladování finálního produktu před jeho klinickým použitím v podmínkách zdravotnického zařízení a transportu finálního produktu na místo jeho použití (část 5).

3. METODIKA A MATERIÁL

Část 1 – Opatřování a kryokonzervace výchozí suroviny pro výrobu LPMT Kymriah

3.1.1 Odběr nemobilizovaných mononukleárních buněk

Na tomto místě uvádím metodiku a výsledky retrospektivní validační studie procesů odběru a kryokonzervace nemobilizovaných mononukleárních buněk periferní krve, která byla nezbytnou podmínkou získání příslušného povolení od kompetentní autority (SÚKL).

Opatřování výchozích surovin (nemobilizované mononukleární buňky) pro výrobu LPMT, jejichž specifikace jsou uvedeny níže v Tab. č. 10, bylo prováděno v souladu s pokyny výrobce.

3.1.1.1 Soubor nemocných

Odběr autologních mononukleárních buněk byl proveden na souboru 3 pacientů (2 ženy a 1 muž) s diagnózou GVHD (n=1) a Sézaryho syndrom (n=2), ve věku 49–61 let (medián 50), u nichž bylo provedeno celkem 5 separací za účelem léčby extrakorporální fotoferézou. Výchozí surovina – suspenze mononukleárních buněk byla opatřena na přístroji Spectra Optia, separace buněk byla provedena na Separátorovém centru IV. Interní hematologické kliniky FN HK. Vzhledem k požadavkům SÚKL (180) předložit 3 validační šarže byla zhodnocena data na souboru dat z 5 separací provedených u 3 pacientů.

3.1.1.2 Spektrum provedených vyšetření

Odběr vzorků na vyšetření byl proveden dle požadavků výrobce a v souladu s doporučeními EBMT (139) a EDQM, verze 4 (138) před přidáním fyziologického roztoku k vyseparované suspenzi. Požadavky EBMT (139) a EDQM – verze 4 (138) na specifikace výchozí suroviny jsou uvedeny v Tab. č. 10 a jsou transponovány do vnitřního předpisu tkáňového zařízení SPEC_E 001 Specifikace produktů buněčné terapie. Provedená vyšetření:

- Krevní obraz vč. diferenciálního rozpočtu leukocytů byl stanoven na automatickém hematologickém analyzátoru Sysmex XN3000 (Sysmex, Japonsko) (provádí Laboratoř IV. Interní hematologické kliniky FN HK).

- Procento CD3⁺ z leukocytů a stanovení životaschopnosti buněk bylo provedeno na průtokovém cytometru FC Navios Ex (Beckman Coulter, USA) a analyzováno pomocí softwaru Kaluza 2.0 (Beckman Coulter, USA) (provádí ÚKIA FN HK).
- Vyšetření na sterilitu bylo provedeno v automatickém kultivačním systému Bactalert (typ BTA 3D 240, SW verze B50, BioMérieux, Francie) (provádí ÚKM FN HK) dle metody Institutu Paula Erlicha, která odpovídá zkoušce na sterilitu alternativní metodou dle Českého lékopisu (ČL) 5.1.6. (181).

Tab. č. 10: Specifikace odebrané výchozí suroviny (138,139).

Parametr	Požadované minimální hodnoty
Počet CD3 ⁺ buněk	$\geq 1 \times 10^9$ CD3 ⁺
Celkový počet jaderných buněk (TNC)	$\geq 2 \times 10^9$
% CD3 ⁺ z TNC	$\geq 3 \%$

3.1.2 Zpracování a kryokonzervace suspenze mononukleárních buněk

Použitý materiál a reagensy

- Rukavice sterilní (Hartman, Německo)
- Rouška sterilní (Panep, s.r.o., ČR)
- Stříkačky 5 ml steril. (B Braun, Německo)
- Stříkačky 50 ml steril. (B Braun, Německo)
- Trn s filtrem Mini-Spike (B Braun, Německo)
- Jehly sterilní (B Braun Německo)
- Vak na konzervaci buněk CryOMACS Freezing Bag 500 (Miltenyi Biotec, Německo)
- 20% lidský sérový albumin / Albutein, registrace SÚKL (Grifols, Španělsko)
- DMSO (WAK Chemie GmbH, Německo), CE certifikát
- 10 % hydroxyethylškrob Voluven (Fresenius Kabi, GmbH, Německo), CE certifikát
- Spojovací hadička Mediform (Baxter Health Care, Švýcarsko)
- Trn (Baxter Health Care, Švýcarsko)
- Kryozkumavka NUNC (ThermoFisher, Dánsko)
- Mikrozukumavka sterilní 2 ml (Sarstedt AG & Co, Německo)
- Sáček Steriking steril. 205 x 300 mm

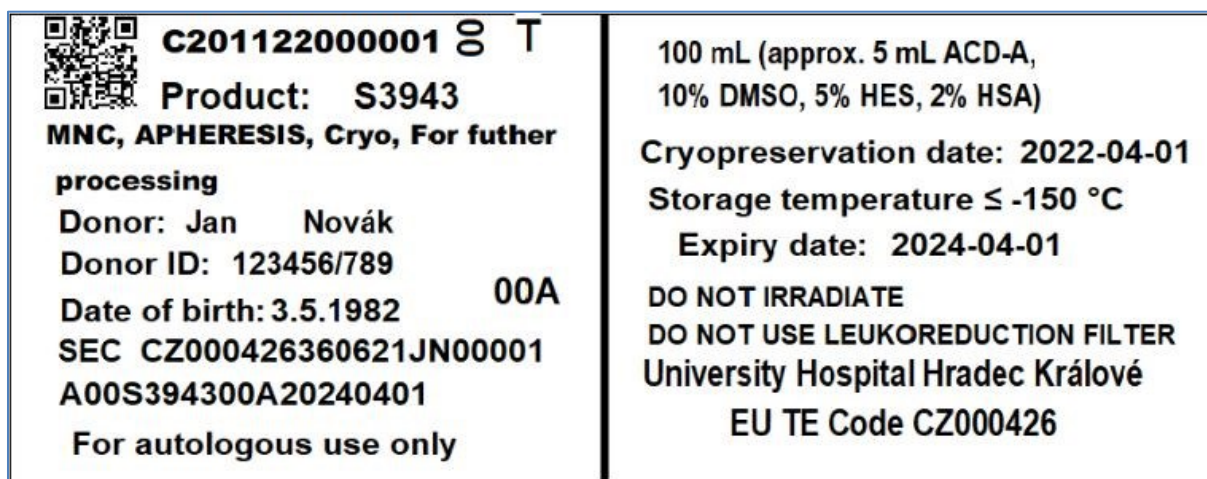
- Sáček Steriking steril. 250 x 400 mm
- Pean sterilní
- Nůžky sterilní

Přístrojové vybavení

- Laminární box Herasafe (Thermo Scientific, USA)
- Svářečka obalů Dental-X (Dentalex, s.r.o., ČR)
- Svářečka EVA vaků (HAWO GmbH, Německo)
- Tavička hadiček MacoSeal Twin EVA (MacoPharma, Francie)
- Programovatelné zmrazovací zařízení Planer (Planer Biomed, Anglie)
- Počítač částic (Denwel, Německo)
- Kryokontejner MVE (Chart, Industries, Inc., USA)

Postup

Výchozí suspenze odebraných mononukleárních buněk byla dle vnitřního předpisu Tkáňové ústředny (SPP L 003 Zpracování autologních periferních mononukleárních buněk pro výrobu léčivého přípravku moderní terapie Kymriah) rozplněna do dílčích kryovaků a smíšena s kryoprotektivním roztokem v poměru 1:1 tak, aby finální koncentrace produktu obsahovala 10 % DMSO, 5 % hydroxyethylškrob a 5% lidský sérový albumin. Vyrobené kryovaky byly označeny štítkem v souladu se standardy ISBT-128 (182) (Obr. č. 8).



Obr. č. 8: Vzor štítku pro označení kryokonzervovaných mononukleárních buněk pro výrobu LPMT.

Vaky uzavřené do kazet byly spolu s kontrolními zmrazovacími ampulemi vloženy do přístroje s kontrolovaným zmrazováním Planer, kde byly zmrazeny rychlostí 1 °C/min do

-90 °C a dále pak rychlostí 5 °C/min do -150 °C. Po skončení zmrazovacího programu byly zmrazené vaky v parách dusíku přeneseny do kryoskladu, kde byly uskladněny v kryokontejneru při teplotách -175 °C až -195 °C s alarmovou hodnotou nastavenou na teplotu -160 °C.

3.1.3. Retrospektivní studie kryokonzervace nemobilizovaných mononukleárních buněk periferní krve

3.1.3.1 Soubor dárců a metodika

Zhodnocení procesu kryokonzervace nemobilizovaných mononukleárních buněk (lymfocytů dárce) určených k podání u pacientů po alogenní transplantaci k navození řízené reakce štěpu proti nádoru. Validace byla provedena na odběrech od 16 dárců (9 žen a 7 mužů), věk průměr 40 let (21–68). Země původu buněk byla ČR, nebo státy EU (n=14) a třetí země (n=2). Cílem bylo porovnat parametry v odebrané suspenzi s parametry v kryokonzervované suspenzi (koncentrace jaderných buněk, procento mononukleárních buněk, životaschopnost a celkový počet vitálních CD3⁺ buněk). Na základě výsledků jsme stanovili výtěžnost (recovery) vitálních jaderných, mononukleárních a CD3⁺ buněk dle následujícího vztahu (148,183):

$$Recovery = \frac{\text{parametr} \times \text{životaschopnost post} - \text{procesu}}{\text{parametr} \times \text{životaschopnost pre} - \text{procesu}} \times 100$$

Požadavky na specifikaci kryokonzervované výchozí suroviny jsou uvedeny v Tab. č. 11.

Tab. č. 11: Specifikace kryokonzervované výchozí suroviny

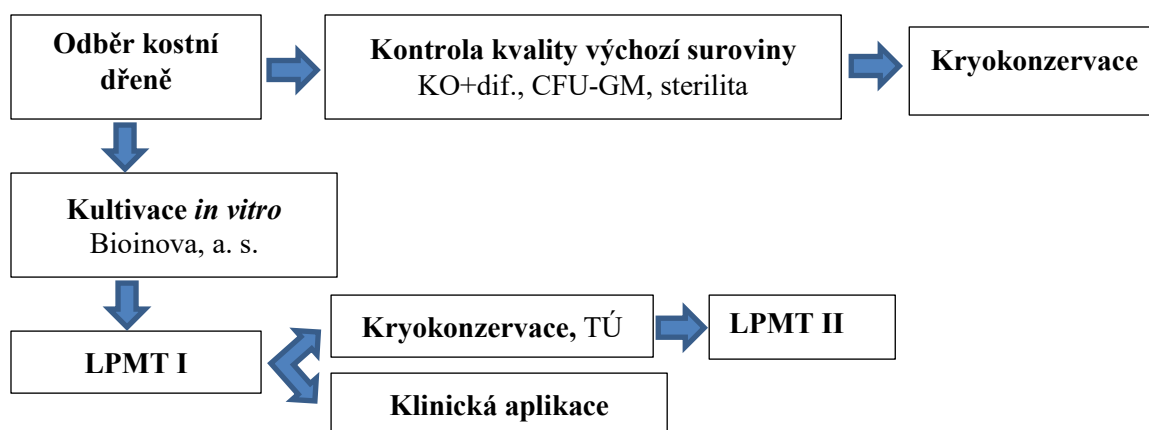
Parametr	Požadované minimální hodnoty
Koncentrace leukocytů (WBC)	1 x 10 ⁸ /ml
Sterilita	sterilní
Počet kryokonzervovaných vaků/1 pacient	max 10*

***Pozn.:** Maximální počet 10 vaků je určen výrobcem. Minimální počet vaků není definován (závisí na objemu separované suspenze).

Část 2 – Prospektivní studie kryokonzervace hodnoceného LPMT na bázi hMSCs v podmínkách SVP

3.2.1 Parametry klinické studie a soubor pacientů/dárců

V druhé části disertační práce, která proběhla v rámci klinické studie EUDRA CT 2016-00926-21, podpořené grantem TAČR, jsme se zaměřili na sestavení optimálního protokolu pro kryokonzervaci hMSCs. Buňky byly vykultivovány u smluvního výrobce Bioinova, a.s. ze suspenze buněk kostní dřeně odebrané pacientům/dárcům na Ortopedické klinice FN HK. Do studie byli na základě přesných zařazovacích kritérií vybráni pacienti podstupující opakovanou výměnu kyčelního kloubu, u nichž předchozí operace nepřinesla efektivní zlepšení. Všichni dárči vyhověli v sérologických testech předepsaných vyhláškou MZ ČR č. 422/2008 Sb. v platném znění. Schéma provedení klinické studie, vč. vlastní experimentální části je uvedeno na Obr. č. 9. Z odebrané kostní dřeně byly vykultivovány hMSCs (Bioinova, a.s., Praha) jako léčivý přípravek moderní terapie. Po 3 – 4 týdnech kultivace byly buňky transportovány zpět do FN HK a aplikovány v podobě absorbovatelného proužku v rámci operačního výkonu s cílem efektivní regenerace a přihojení. Část vykultivovaných buněk byla dále předána do Laboratoře buněčné terapie Tkáňové ústředny FN HK, kde byl kryokonzervací vyroben nový LPMT. Před samotným odběrem byli pacienti seznámeni s cíli klinické studie a také s použitím části hMSCs pro experimentální účely formou informovaného souhlasu. Vzhledem k nákladnosti celé studie a k přísným kritériím z hlediska výběru dárců vhodných do zařazení do studie, byl experiment proveden pouze na souboru šesti dárců.



Obr. č. 9: Schéma experimentu kultivace a kryokonzervace hMSCs.

Soubor pacientů/dárců: 6 (3 muži, 3 ženy).

Věk: 18–73 let, medián: 63,5.

Ve všech případech byla provedena kryokonzervace s použitím kryoprotektiva DMSO, ve dvou případech též s kryoprotektivním roztokem neobsahujícím DMSO.

3.2.2 Specifikace výchozí suroviny (kostní dřeň pro výrobu LPMT)

V odebrané suspenzi kostní dřene byly stanoveny následující parametry:

- Krevní obraz vč. diferenciálního rozpočtu leukocytů - stanoven na automatickém hematologickém analyzátoru Sysmex XN3000 (Sysmex, Japonsko) (provádí Laboratoř IV. Interní hematologické kliniky FN HK).
- Vyšetření na sterilitu - provedeno v automatickém kultivačním systému Bactalert (typ BTA 3D 240, SW verze B50, BioMérieux, Francie) (provádí ÚKM FN HK) dle metody Institutu Paula Erlicha, která odpovídá zkoušce na sterilitu alternativní metodou dle Českého lékopisu (ČL) 5.1.6. (164).
- Test na stanovení jednotek tvořících kolonie CFU-GM dle vnitřního předpisu Tkáňové ústředny *SPP_F Kultivační stanovení progenitorových buněk krvetvorby* vycházející z Českého lékopisu – 2.7.28 Stanovení počtu buněk tvořících kolonie u lidských krvetvorných progenitorových buněk (181).
- Odebraný materiál byl označen jedinečnou sekvencí darování dle platných legislativních předpisů (64).

3.2.3 Kultivace a stanovení CFU-GM

3.2.3.1 Deplece erytrocytů před stanovením CFU-GM

Ve vzorcích kostní dřene byly odstraněny zralé erytrocyty a jejich jaderné prekurzory za účelem usnadnění a zpřesnění odečítání hodnocených kolonií, především CFU-GM, které jsou při vysoké koncentraci erytrocytů ve vzorku špatně zřetelné nebo úplně překryté. Při depleci erytrocytů jsem postupovala dle vnitřního předpisu Tkáňové ústředny „SPP F 002 Postup pro odstranění erytrocytů ze vzorků kostní dřene před kultivací progenitorových buněk krvetvorby“.

Použité materiály a reagenty

- Iscovovo MDM médium s glutaminem (IMDM) (Sigma Aldrich, s.r.o., ČR)
- 0,8 % roztok chloridu amonného (NH₄Cl) s 0,1 mM EDTA (StemCell™ Technologies, USA)

- Sterilní zkumavky Gama Group 15 ml (Gama Group, a.s., ČR)
- Skleněné pipety sterilizované
- Pipety Nichipet (Nichryo CO., Ltd., USA)
- Špičky s filtrem Nichipet (Nichryo CO., Ltd., USA)

Přístrojové vybavení

- Laminární box Herasafe (Thermo Scientific, USA)
- Centrifuga Megafuge 1.0 (Thermo Scientific, USA)
- BBD Inkubátor CO₂ (Thermo Scientific, USA)
- Elektrický pipetovací nástavec
- Lednice Liebherr UKS 1800 (Liebherr Hausgeräte, Německo), 2–4 °C
- Laboratorní míchačka Vortex (Tool, s.r.o., ČR)

Postup:

1. Do sterilní zkumavky o objemu 15 ml se odměří 1 ml resuspendovaného vzorku kostní dřeni a na zkumavce se v místě hladiny vyznačí popisovačem ryska. Ke dřeni se přidá 5 ml roztoku 0,8 % NH₄Cl a obsah se jemně promíchá Vortexem.
2. Zkumavka se uloží do lednice na 10 minut. Během této inkubační doby se 1 – 2x promíchá. Poté se zkontroluje, zda je rozložení (lýza) erytrocytů úplné. To znamená, že roztok je červený a není zakalený zbývajícími erytrocyty. Pokud tomu tak není, prodlouží se doba inkubace s roztokem NH₄Cl o 5-10 minut a obsah zkumavky se opět promíchá.
3. Po lýze erytrocytů se do zkumavky přidá 6 ml ředícího média (IMDM) a centrifuguje se 10 min při 300 G (1200 ot. /min. na centrifuze Megafuge 1.0).
4. Odstraní se supernatant, sediment se důkladně resuspenduje v 10 ml IMDM a znovu centrifuguje 10 min při 300 G.
5. Supernatant se opět odstraní, sediment se naředí IMDM na původní objem (tj. 1 ml) a resuspenduje se.
6. Takto připravený vzorek se použije pro kultivační stanovení progenitorových buněk v kostní dřeni. Pro výpočet objemu potřebného pro kultivaci se použije hodnota počtu leukocytů v původním vzorku kostní dřeni.

3.2.3.2 Vlastní kultivace a stanovení

Použité materiály a reagenty

- Kultivační médium Metho-Cult™ (StemCell™ Technologies, USA)
- Iscovovo médium MDM s glutaminem (IMDM) (Sigma Aldrich, s.r.o., ČR)
- Sterilní zkumavky Gama Group 15 ml (Gama Group, s.r.o., ČR)
- Pipety Nichipet (Nichryo CO., Ltd., USA)
- Špičky s filtrem Nichipet (Nichryo CO., Ltd., USA)
- Petriho misky, průměr 35 mm (Sigma Aldrich, s.r.o., ČR)

Přístrojové vybavení

- Laminární box Herasafe (Thermo Scientific, USA)
- BBD Inkubátor CO₂ (Thermo Scientific, USA)
- Laboratorní míchačka Vortex (Tool, s.r.o., ČR)

Postup

1. Při stanovení CFU-GM jsem postupovala dle vnitřního předpisu Tkáňové ústředny SPP F 001 Kultivační stanovení progenitorových buněk krvetvorby vycházející z Českého lékopisu – 2.7.28 Stanovení počtu buněk tvořících kolonie u lidských krvetvorných progenitorových buněk (181). Dle hodnoty leukocytů ve výchozí buněčné suspenzi se vypočte objem potřebný ke kultivaci. Dvojnásobek vypočtené hodnoty objemu se napipetuje do 600 µl IMDM a promíchá na Vortexu.
2. Z promíchané suspenze se odebere 300 µl a napipetuje do 3 ml kultivačního média, promísíme na Vortexu.
3. Ke kultivaci použijeme 2 Petriho misky, přičemž na každou napipetujeme 1,1 ml. Misky umístíme do inkubátoru, kultivujeme v prostředí 5 % CO₂, teplotou 37 °C a 95% relativní vlhkostí 14 dní.
4. Po 14 dnech kultivace, dle doporučení výrobce kultivačního média, hodnotíme počty kolonií CFU-GM na celé Petriho misce. Na základě odečtených hodnot vypočítáme počty CFU-GM.

3.2.4 Kryokonzervace hMSCs

Kryokonzervací nativních hMSCs (ve formě hodnoceného LPMT) vzniká nový LPMT, u něhož bylo třeba ověřit, zda se nezměnily vlastnosti buněk po kryokonzervačním procesu.

Řídili jsme se parametry doporučenými výrobcem nativních hMSCs (Bioinova, a. s., Praha), Tab. č. 12.

Tab. č. 12: Specifikace kryokonzervovaných hMSCs stanovené výrobcem nativního LPMT (Bioinova, a. s.).

Parametr	Požadované rozmezí
Objem	1,4 – 1,6 ml
Počet buněk	7–13 x 10 ⁶ /ml
Vitalita	90–100 %
Přítomnost mykoplazmat	Bez mykoplazmat
Sterilita	sterilní
Fenotyp hMSCs buněk (CD105 ⁺ , CD73 ⁺ , CD90 ⁺ , HLA-DR ⁻ , CD-45 ⁻ , CD34 ⁻)	> 90 %

Zpracování a kryokonzervace hMSCs byla provedena v Laboratoři buněčné terapie Tkáňové ústředny FN HK, v čistých prostorách v laminárním boxu, v třídě čistoty A s pozadím B za kontinuálního měření částic, v souladu s evropskými standardy GMP (122).

3.2.4.1 Kryokonzervace s použitím DMSO

Použitý materiál a reagentie

- DMSO (WAK Chemie GmbH, Německo), CE certifikát
- 10 % hydroxyethylškrob Voluven (Fresenius Kabi, GmbH, Německo), CE certifikát
- 20 % lidský sérový albumin (Grifols, Španělsko)
- Kryozkumavky Nunc 1,8 ml (ThermoFisher, Dánsko)
- Pipety Nichipet (Nichryo CO., Ltd., USA)
- Špičky s filtrem Nichipet (Nichryo CO., Ltd., USA)
- Sterilní kovový stojan na kryozkumavky
- Injekční stříkačka 5 ml (B Braun, Německo)
- Injekční jehla Sterican (B Braun, Německo)
- Mikrozukumavka sterilní 2 ml (Sarstedt AG & Co, Německo)

Přístrojové vybavení

- Laminární box MSC Advantage (Trigon plus, s.r.o., ČR)
- Programovatelné zmrazovací zařízení Planer (Planer Biomed, Anglie)
- Počítač částic (Denwel, Německo)
- Kryokontejner CryoCE 10K (TaylorWharton, USA)

Postup kryokonzervace

Výchozí buněčná suspenze byla v laminárním boxu smíšena s kryoprotektivní směsí sestávající se z DMSO, 10 % Voluvenu a 20 % lidského sérového albuminu v kryozkumavkách Nunc v poměru 1:1 tak, že finální koncentrace DMSO byla 10 %. Buňky byly zamrazeny v koncentraci $0,5-1 \times 10^6$ /ml (dle dostupného množství výchozí suroviny). Po smíšení byla suspenze pomocí pipety promíchána a rozdělena do kryoampulí o objemu 1,8 ml. Kryoampule byly přemístěny v termoboxu s mraženými gely do kryolaboratoře v třídě čistoty C, kde byly zmrazeny v programovatelném zmrazovacím zařízení Planer rychlostí rychlostí 1 °C/min do -90 °C a dále pak 5 °C/min do -150 °C. Poté byly kryokonzervované vzorky v parách dusíku přemístěny k finálnímu uložení v kontejneru určeném pro skladování v parách kapalného dusíku CryoCE 10K. Jedná se kontejner s automatickým doplňováním dusíku a kontinuálním monitoringem teplot. Skladovací teplota se pohybovala v rozmezí -190 °C až -194 °C.

3.2.4.2 Kryokonzervace s médiem Biofreeze

Použitý materiál a reagentie

- Biofreeze (Biochrom, Německo)
- Hartmanův roztok (Baxter Czech, s r.o., ČR)
- Kryozkumavky Nunc 1,8 ml (ThermoFisher, Dánsko)
- Pipety Nichipet, (Nichryo CO., Ltd., USA)
- Špičky s filtrem Nichipet, (Nichryo CO., Ltd., USA)
- Sterilní kovový stojan na kryozkumavky
- Injekční stříkačka 5 ml (B Braun, Německo)
- Injekční jehla Sterican (B Braun, Německo)

Přístrojové vybavení

- Laminární box MSC Advantage (Trigon plus, s.r.o., ČR)
- Programovatelné zmrazovací zařízení Planer (Planer Biomed, Anglie)

- Počítač částic (Denwel, Německo)
- Kryokontejner CryoCE 10K (TaylorWharton, USA)
- Centrifuga (Thermo Fisher Scientific, USA)

Postup kryokonzervace

Výchozí buněčná suspenze byla centrifugována při 1200 ot. /5 min, poté byl odsát supernatant. Buňky byly dále resuspendovány v 1 ml Hartmanova roztoku a opět centrifugovány při 1200 ot. /5 min. Po odsátí přebytečného supernatantu byla suspenze naředěna v poměru 1:9 kryokonzervačním médiem Biofreeze a rozplněna do kryoampulí o objemu 1,8 ml. Buňky byly zamrazeny v koncentraci $0,5 \times 10^6$ /ml v programovatelném zmrazovacím zařízení Planer rychlostí rychlostí 1 °C/min do -90 °C a dále pak 5 °C/min do -150 °C. Poté byly kryokonzervované vzorky v parách dusíku přemístěny k finálnímu uložení v kontejneru určeném pro skladování v parách kapalného dusíku CryoCE 10K. Jedná se kontejner s automatickým doplňováním dusíku a kontinuálním monitoringem teplot. Skladovací teplota se pohybovala v rozmezí -190 °C až -194 °C.

3.2.5 Rozmrazení vzorků hMSCs

Po vyjmutí kryoampulí z hlubokomrazícího kontejneru a jejich rozmrazení ve vodní lázni temperované na 37 °C byly buňky podrobeny dalším testům (Tab. č. 12). Průměrná doba skladování vzorků byla 128 dní (25–413). Minimální doba skladování pro ověření vlastností kryokonzervovaných vzorků byla stanovena na min. 24 hod od proběhlé kryokonzervace.

3.2.6 Ověření počtu a vitality buněk trypanovou modří

Použitý materiál a reagensie

- Trypanová modř (Sigma Aldrich, USA)
- Mikrozkuavka sterilní 2 ml (Sarstedt AG & Co, Německo)
- Pipeta Biohit, vč. sterilní špička (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Bürkerova komůrka (BDL, s.r.o., ČR)
- Krycí sklíčko

Přístrojové vybavení

- Inverzní mikroskop (Olympus CK40, Japonsko), zvětšení 40x

Postup

Bylo smíseno 25 µl buněčné suspenze a 25 µl trypanové modři, směs byla promísena a inkubována 5 minut. Poté bylo napipetováno 20 µl do Bürkerovy komůrky. Modře zbarvené buňky byly považovány za mrtvé, bezbarvé za životaschopné. Počet buněk byl hodnocen v 50 čvercích o rozměrech 0,2 x 0,2 mm s hloubkou 0,1 mm.

3.2.7 Stanovení fenotypu, životaschopnosti a počtu buněk průtokovou cytometrií

Použitý materiál a reagentie

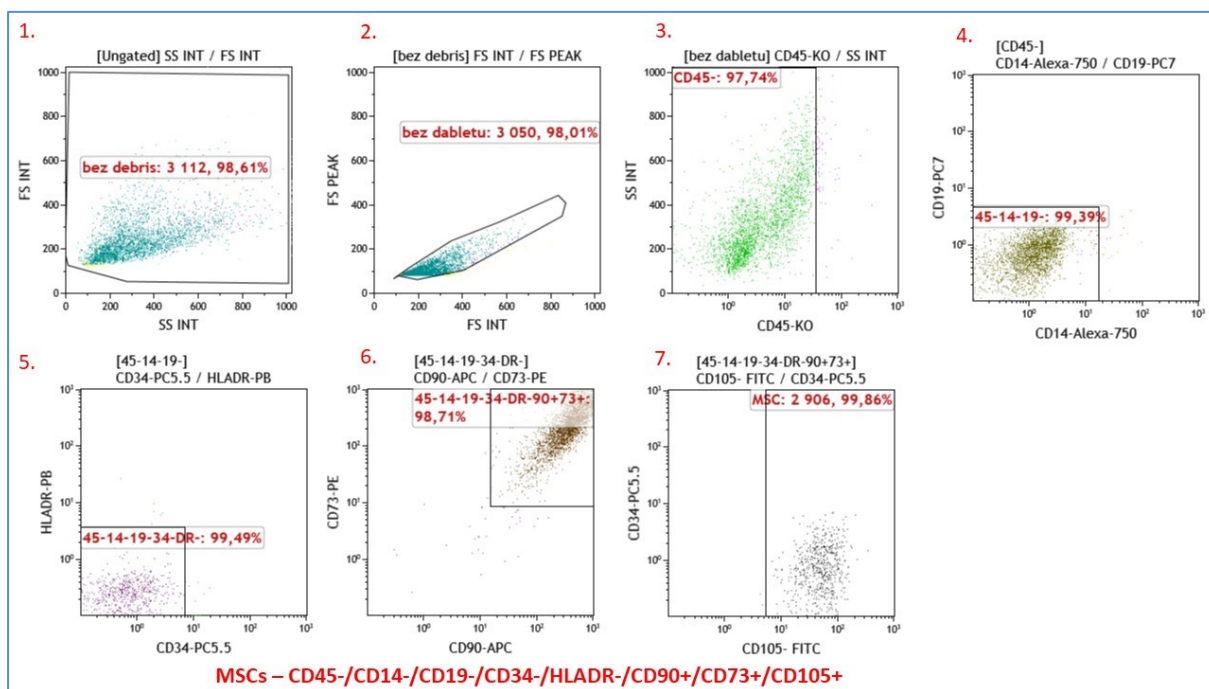
- Značené monoklonální protilátky anti CD-105-FITC, anti-CD-73-PE, anti-CD34-PC5, anti-CD19-PC7, anti-CD90-APC, anti-CD45-KO (Beckman Coulter, USA nebo Exbio, ČR)
- Propidium jodid (Sigma Aldrich, ČR)
- 7-AAD (Beckman Coulter, USA)
- DRAQ7 (Biostatus, Spojené království)
- Pipety, špičky Biohit (Thermo Fisher Scientific, USA)

Přístrojové vybavení

- Průtokový cytometr FACS Navios (Beckman Coulter, USA) používající SW Kaluza, verze 1.2 (Beckman Coulter, USA)

Postup

Fenotypizace hMSCs byla provedena na ÚKIA FN HK, v kontrolní laboratoři schválené SÚKLEM, na průtokovém cytometru Navios (Beckman Coulter, USA). Při výběru negativních a pozitivních znaků hMSCs bylo postupováno dle autorů Dominici et al., 2006 a Nery et al., 2013 (43,44). Počet hMSCs ve vzorku byl stanoven porovnáním počtu buněk s přidáním vnitřním standardem (fluorescenční kuličky o známé koncentraci). Vitalita buněk byla zjišťována prostřednictvím akumulace propidium jodidu apoptickými buňkami s narušenou membránou. Buněčná suspenze byla konjugována s monoklonálními protilátkami a propidium jodidem, fluorescenčním značením 7-AAD nebo DRAQ7. Na Obr. č. 10 je zobrazena strategie gatování povrchových CD znaků.



Obř. ř. 10: Strategie gatování povrřových CD znaků

3.2.8 Stanovení klonogenity

Princípem tohoto testu bylo urření proliferační schopnosti buněk tvořit stabilní populace. Snařili jsme se urřit poměr K_{CFU-F} mezi počtem kolonií a shluků (clusterů), přičemř za shluky jsou považovány nesouvislé kolonie mající méně než 50 buněk.

$$K_{CFU-F} = \frac{\textit{kolonie}}{\textit{kolonie+shluky}}$$

Výsledná hodnota $K_{CFU-F} \geq 0,5$ značí větší počet kolonií než klastrů (normální proliferace), zatímco hodnota $K_{CFU-F} \leq 0,5$ pod znamená, ře buňky tvoří více clustery než kolonie, tedy méně stabilní populaci. Test na klonogenitu byl urřen pouze u prvních 2 pacientů vřledem k nedostatku vykultivovaných buněk (nativní hMSCs získané kultivací z kostní dřeneř byly beze zbytku aplikovány pacientovi).

Pouřité materiály a reagentie

- Dulbeccoův fosřátový puřrovaný fyziologický roztok (D-PBS) (P-LAB a.s., řR)
- 0,25% trypsin (Sigma Aldrich, s.r.o., řR)
- 4% kyselina octová (Sigma Aldrich, s.r.o., řR)
- Kultivační lahve, 75 cm², s hustotou 6,25 x 10⁵ buněk/cm² (Sarstedt AG & Co, Německo)
- Kultivační médium α -MEM (Gibco, USA)

- 10% fetální telecí sérum (Sarstedt AG & Co, Německo)
- Fibroblastový růstový faktor (FGF) (Peprotech, USA)
- 70% Methanol (Lach-ner, s.r.o., ČR)
- Krystalová violet' (Penta, s.r.o., ČR)
- Deionizovaná voda
- Centrifugační zkumavka 50 ml (Sarstedt AG & Co, Německo)
- Mikrozukavky (Sarstedt AG & Co, Německo)
- Pipety vč. filtru (Gilson, USA)

Přístrojové vybavení

- Inkubátor CO₂ ((BBD Herasafe, USA)
- Inverzní mikroskop (Olympus CK40, Japonsko)
- Centrifuga (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Chladnička 4–8 °C

Postup

Postupovali jsme dle metody popsané Prockopem et al., 2008 (131). Po rozmrazení kryokonzervovaných vzorků ve vodní lázni jsme pomocí centrifugace a promytí v PBS odmyli kryoprotektivum a buňky byly resuspendovány v PBS a nasazeny do kultivační lahve. Buňky byly kultivovány při 37 °C s 5 % CO₂ v kultivačním médiu α -MEM s přidavkem FGF. Růst buněk byl průběžně kontrolován pod inverzním mikroskopem. Při dosažení cca 80 % konfluence byla provedena pasáž buněk a buňky z každé pasáže byly testovány na klonogenitu. Pro test klonogenity v každé pasáži byly použity speciální 6ti jamkové destičky pro kultivaci buněk. Na každou kultivační misku bylo nasazeno 100 buněk, které byly dále kultivovány po dobu 2–3 týdnů postupem viz výše a poté byly fixovány. Pro fixaci buněk bylo smíšeno 140 ml methanolu a 2,2 g krystalové violeti, objem doplněn na 200 ml deionizovanou vodou. Z každé kultivační misky bylo odsáto médium a buňky byly promyty v PBS. Poté byl přidán fixační roztok tak, aby bylo rovnoměrně pokryto celé dno kultivační misky. Buňky byly fixovány po dobu 30 min, poté byl fixační roztok odsát a následoval oplach. Do vodní lázně jsme přidali 5–10 peciček NaOH a kultivační destičky jsme dnem vzhůru ponořili do tohoto roztoku. Obarvené kolonie byly hodnoceny pod inverzním mikroskopem (zvětšení 40x) a byl určen poměr kolonií ku celkovému počtu kolonií a clusterů. Testování probíhalo na Fakultě vojenského zdravotnictví Univerzity obrany v Hradci Králové.

3.2.9 Mikrobiologické testy

3.2.9.1 Test na sterilitu přípravku

Test na sterilitu byl proveden na ÚKM FN HK v čistých prostorách metodou dle Českého lékopisu 5.1.6. (181) za využití přístroje pro automatickou detekci mikrobů Bactalert (typ BTA 3D 240, SW verze B 50, BioMérieux, Francie).

3.2.9.2 Test na přítomnost mykoplazmat

Přítomnost případných mykoplazmat v rozmrazených vzorcích byla určena metodou PCR na ÚKBD FN HK, kit obsahoval primery pro následující druhy: *Mycoplasma sp.*, *M. fermentans*, *M. hyorhinis*, *M. arginini*, *M. rale*, *M. salivarium*, *M. hominis*, *M. pulmonis*, *M. arthritidis*, *M. bovis*, *M. pneumoniae*, *M. pirum*, *M. capricolum*, *Acholeplasma sp.* a *Spiroplasma sp.*

3.2.10 Simulace výrobního procesu s použitím živné půdy (media fill)

Použité materiály a reagensie

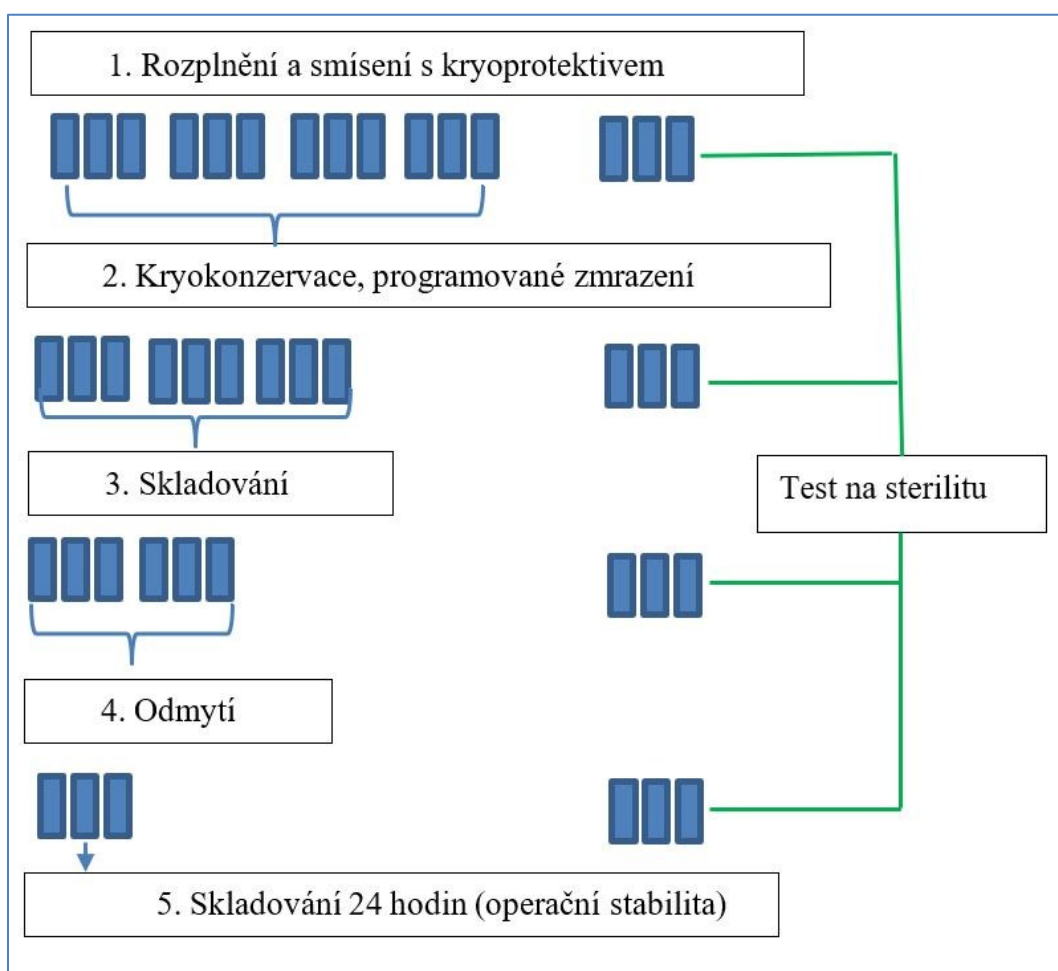
- 10 % hydroxyethylškrob Voluven (Fresenius Kabi, GmbH, Německo), CE certifikát
- 20 % lidský sérový albumin (Grifols, Španělsko)
- Kryozkumavky Nunc 1,8 ml (ThermoFisher, Dánsko)
- Pipety Nichipet (Nichryo CO., Ltd., USA)
- Špičky s filtrem Nichipet (Nichryo CO., Ltd., USA)
- Sterilní kovový stojan na kryozkumavky
- Injekční stříkačka 2 a 5 ml (B Braun, Německo)
- Injekční jehly Sterican (B Braun, Německo)
- Kultivační médium BacT/ALERT® BPA (aerobic), Biomrieux, Francie

Přístrojové vybavení

- Laminární box MSC Advantage (Trigon plus, ČR)
- Programovatelné zmrazovací zařízení Planer (Planer Biomed, Anglie)
- Počítač částic (Denwel, Německo)
- Kryokontejner CryoCE 10K (TaylorWharton, USA)

Postup kryokonzervace

Pro celý proces kryokonzervace hMSCs s použitím DMSO byla provedena simulace výrobního procesu v souladu s VYR-43 (121), kdy z klíčových fází procesu byly odebrány vždy 3 po sobě jdoucí kontrolní vzorky, ve kterých byla provedena zkouška na sterilitu. Jako živné médium bylo použito médium Bact/Alert pro aerobní mikroby. Schéma simulace aseptického procesu je na Obr. č. 11. Během zpracování byly kontinuálně měřeny částice (Denwel, Německo) a také aeroskopie.



Obr. č. 11: Schéma simulace aseptického procesu

3.2.11 Aeroskopie

Při aeroskopickém stanovení byl použit aeroskop MAS-100 NT (Merck Millipore, Německo) s aktivním nasáváním a 2 druhy mikrobiologických agarových půd (PCA – pro stanovení směsné populace bakterií a YGC – pro stanovení směsné populace plísní) v Petriho miskách. Objem vyšetřovaného vzorku vzduchu byl 2x 500 litrů pro jeden druh půdy, doba

nasávání 5 minut. Postupovala jsem dle standardního operačního postupu pracoviště ÚKM SOP_S_004 Kontrola ovduší.

3.2.12 Analýza rizik výrobního procesu

V souladu se zásadami SVP (121) byla vytvořena analýza rizik pro celý výrobní proces s cílem odhalit případná rizika a nedostatky a zajistit jejich nápravu tak, aby nebyla ohrožena jakost produktu. Analýzu rizik jsem vypracovala s využitím FMEA s cílem nalézt možné chyby. Při vlastním sestavování analýzy jsem posuzovala:

- pravděpodobnost výskytu vady
- význam (důležitost) vady
- pravděpodobnost odhalení vady

Kombinací těchto tří parametrů jsem stanovila rizikové číslo (RPN), kdy jako hraniční hodnotu jsem zvolila 125. Procesy s hodnotou $RPN \geq 125$ jsou považovány za rizikové. Pro vyhodnocení jsem použila 10ti bodovou stupnici:

Pravděpodobnost výskytu vady

- 1 - vada nepravděpodobná, v minulosti neznámá
- 2 - velmi nízká pravděpodobnost výskytu
- 3 - nízká pravděpodobnost výskytu
- 4 - malá pravděpodobnost výskytu
- 5 - příležitostně vyskytující se chyba
- 6 - střední pravděpodobnost výskytu
- 7 -vyšší pravděpodobnost výskytu
- 8 - vysoká pravděpodobnost výskytu
- 10 - velmi vysoká pravděpodobnost výskytu
- 10 - vada téměř jistá

Význam (důležitost) vady

- 1 – žádný
- 2 – velmi slabý
- 3 – slabý

- 4 – malý
- 5 – střední
- 6 – důležitá vada
- 7 – velký význam
- 8 – extrémní
- 9 – vážný
- 10 – velmi vážné riziko

Pravděpodobnost odhalení vady (u výrobce)

- 1 – téměř jistá
- 2 – velmi vysoká
- 3 – vysoká
- 4 – vyšší
- 5 – střední
- 6 – nízká
- 7 – slabá
- 8 – velmi slabá
- 9 – neznámá pravděpodobnost
- 10 – téměř nemožné odhalení

Část 3 – Retrospektivní studie vlivu odmývání DMSO na klíčové parametry v suspenzi nemobilizovaných a kryokonzervovaných autologních periferních progenitorových buněk (HPCs)

Odmytí DMSO po rozmrazení LPMT je jednou z možností, jak omezit výskyt nežádoucích reakcí u příjemce kryokonzervovaného přípravku. V této práci uvádím metodiku, výsledky a závěry studie vlivu procesu odmytí na klíčové parametry suspenze HPC provedené u pacientů s vyšším rizikem nepříznivé reakce na DMSO, u nichž hematolog indikoval jeho odmytí.

3.3.1 Soubor pacientů a metodika

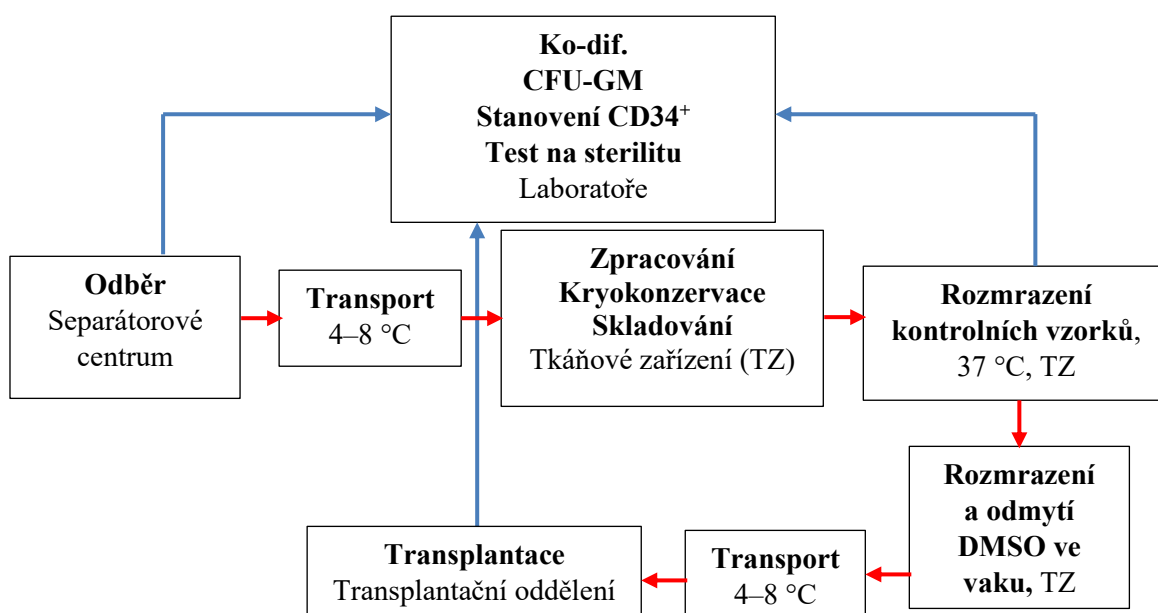
Cílem retrospektivní studie bylo zhodnotit proces odmývání DMSO v koncentrátech HPCs u souboru pacientů s primární amyloidózou (n=3), sekundární amyloidózou u mnohočetného myelomu (n = 9) nebo samotným mnohočetným myelomem (n = 1) (Tab. č. 13). U všech pacientů bylo před vlastním podáním provedeno odmytí DMSO. Požadavky na zařazovací kritéria (kompletní dokumentace, iniciální koncentrace jaderných buněk $NC \leq 400 \times 10^9/l$, zpracování do 24 hodin od leukaferézy) splnilo 13 pacientů (9 mužů a 4 ženy) s průměrným věkem 58 let (44–70 let) a hmotností 80 kg (52–103 kg).

Tab. č. 13: Soubor pacientů a diagnóza.

Pacient číslo	Pohlaví	Věk (roky)	Hmotnost (kg)	Diagnóza / důvod odmytí DMSO
1	muž	55	81	Mnohočetný myelom – sekundární amyloidóza – suspektní amyloidóza srdce
2	žena	61	52	Primární amyloidóza kostní dřeně, jater a ledvin
3	muž	48	94	Mnohočetný myelom – alergická reakce (DMSO)
4	muž	56	91	Mnohočetný myelom - sekundární amyloidóza – suspektní amyloidóza srdce
5	žena	55	80	Mnohočetný myelom – sekundární amyloidóza ledvin
6	žena	57	61	Mnohočetný myelom - sekundární amyloidóza – suspektní amyloidóza srdce
7	muž	69	93	Primární amyloidóza jater a plic
8	žena	51	58	Mnohočetný myelom – sekundární amyloidóza gastrointestinálního traktu a ledvin
9	muž	44	102	Mnohočetný myelom - sekundární amyloidóza – suspektní amyloidóza srdce
10	muž	58	84	Mnohočetný myelom – sekundární amyloidóza duodena a srdce
11	muž	66	77	Mnohočetný myelom - sekundární amyloidóza gastrointestinálního traktu

12	muž	59	67	Primární amyloidóza kostní dřeně a ledvin
13	muž	70	103	Mnohočetný myelom - sekundární amyloidóza – suspektní amyloidóza srdce

Požadovaná dávka HPCs k aplikaci byla rozdělena do více dnů. V rámci této studie jsem u každého pacienta vyhodnotila vždy pouze promývací proces provedený u 100ml kryovaku s cílem zhodnotit výtěžnost (recovery) procesu a posoudit, do jaké míry je daný proces pro buňky zatěžující. Na Obr. č. 12 je uvedeno schéma zahrnující celý proces odběru HPCs, jejich transportu do tkáňového zařízení, zpracování, kryokonzervace, skladování, rozmrazení, odmytí a aplikace.



Obr. č. 12: Schéma znázorňující cestu HPCs od odběru až po transplantaci

Z jednoho separačního vaku, obvykle o objemu 154–210 ml se při zpracování vytvoří 4 dílčí kryovaky. V této analýze jsou prezentována data dávek NC (jaderné buňky), MNC (mononukleární buňky), CD34⁺ buněk a CFU-GM vztažených na kg hmotnosti příjemce, které jsou obsaženy v 1 vaku o objemu 100 ml před a po procesu odmytí.

3.3.2 Stanovení podílu a vitality CD34⁺ buněk

Analýza periferních progenitorových buněk byla provedena na ÚKIA FN HK pomocí ISHAGE protokolu a byla založena na postupném gatování buněčných populací až k vyselektování primitivních progenitorových buněk (CD34⁺, CD45⁺ low, s nízkým SS a FS). Jako další informace bylo stanoveno procento všech živých buněk (TNC) – buňky s expresí

CD45⁺ a s vysokým SS a FS (tzn. všechny leukocyty) a životnost mononukleární frakce (MNC), což jsou buňky s expresí CD45⁺ a nízkým FS – jde o frakce, kde se kmenové buňky vyskytují.

3.3.3 Stanovení krevního obrazu a diferenciálního počtu leukocytů

Stanovení bylo provedeno v Laboratoři IV. Interní hematologické kliniky FN HK viz kapitola 3.1.2. Hodnoty NC a MNC byly odečteny z výsledků krevního obrazu a diferenciálního rozpočtu leukocytů.

3.3.4 Stanovení CFU-GM

Stanovení CFU-GM bylo provedeno dle Českého lékopisu viz bod 2.7.28. (181) v Laboratoři tkáňových kultur Tkáňové ústředny.

3.3.5 Stimulace buněk, leukaferéza, přípravný režim před autologní transplantací

Separace a sběr HPCs byla provedena leukaferézou po mobilizaci Cyklofosfamidem 2,5 g/m² a G-CSF 10 µg/kg/den (od 5. dne mobilizační chemoterapie) na separátoru Cobe Spectra nebo Spectra Optia (Terumo BCT, USA). Jako přípravný režim před transplantací byl podán Melphalan v dávce 140 nebo 200 mg/m².

3.3.6 Zpracování a kryokonzervace HPCs

Použitý materiál a reagentie

- Rukavice sterilní (Hartman, Německo)
- Rouška sterilní (Panep, s.r.o., ČR)
- Stříkačky 5 ml steril. (B Braun, Německo)
- Stříkačky 50 ml steril. (B Braun, Německo)
- Jehly sterilní (B Braun, Německo)
- Vak na konzervaci buněk CryoMACS Freezing Bag 500 (Miltenyi Biotec, Německo)
- 20% lidský sérový albumin / Albutein, registrace SÚKL (Grifols, Španělsko)
- DMSO (WAK Chemie GmbH, Německo), CE certifikát
- 10 % hydroxyethylškrob Voluven (Fresenius Kabi, GmbH, Německo), CE certifikát
- Kryozkumavka NUNC (ThermoFisher, Dánsko)
- Mikrozukumavka sterilní 2 ml (Sarstedt AG & Co, Německo)
- Sáček Striking steril. 205 x 300 mm

- Sáček Steriking steril. 250 x 400 mm
- Pean sterilní
- Nůžky sterilní

Přístrojové vybavení

- Laminární box Herasafe (Thermo Scientific, USA)
- Svářečka obalů Dental-X (Dentalex, s.r.o., ČR)
- Svářečka EVA vaků (HAWO GmbH, Německo)
- Tavička hadiček MacoSeal Twin EVA (MacoPharma, Francie)
- Programovatelné zmrazovací zařízení Planer (Planer Biomed, Anglie)
- Počítač částic (Denwel, Německo)
- Kryokontejner MVE (Chart, Industries, Inc., USA)

Postup:

Výchozí koncentrát periferních progenitorových buněk byl zpracován dle vnitřního předpisu Tkáňové ústředny (SPP D 001 Příjem a zpracování hematopoetických a mononukleárních buněk). Odebraná suspenze byla zpracována v prostředí tř. A/B, rozplněna do dílčích kryovaků a smíšena s kryoprotektivním roztokem v poměru 1:1 tak, aby finální koncentrace produktu obsahovala 10 % DMSO, 5 % hydroxyethylškrob a 5% lidský sérový albumin. Vyrobené kryovaky byly označeny štítkem. Vaky uzavřené do kazet byly spolu s kontrolními zmrazovacími ampulemi vloženy do přístroje s kontrolovaným zmrazováním Planer, kde byly zmrazeny rychlostí 1 °C/min do -90 °C a dále pak rychlostí 5 °C/min do -150 °C. Po skončení zmrazovacího programu byly zmrazené vaky v parách dusíku přeneseny do kryoskladu, kde byly uskladněny v kryokontejneru při teplotách -175 °C až -195 °C s alarmovou hodnotou nastavenou na -160 °C.

3.3.7 Statistické metody

Dílčí procesy zpracování jsem zhodnotila pomocí celkového počtu životaschopných NC, MNC, CD34⁺ a CFU-GM, resp. jejich dávek na kg hmotnosti příjemce obsažených v jednom 100 ml vaku. Vzhledem k tomu, že naměřená data nevykazovala normální rozdělení, pro deskriptivní statistiku byly použity hodnoty mediánu vč. prvního a třetího kvartilu. Vzhledem k vícenásobným porovnáním dat byla použita Bonferroniho korekce hladiny významnosti alfa. Data byla porovnána pomocí Wilcoxonova testu se znaménkem při korigované hodnotě alfa $\alpha = 0,017$.

Při určení korelace mezi počtem CFU-GM a počtem vitálních CD buněk jsem vycházela z Evansovy příručky (184).

4. VÝSLEDKY

Část 1 – Opatřování a kryokonzervace výchozí suroviny pro výrobu LPMT Kymriah

4.1.1 Odběr nemobilizovaných mononukleárních buněk pro účely validace

V Tab. č. 14 jsou uvedeny výsledné parametry krevního obrazu, vč. koncentrace jaderných buněk (NC/l) a celkový počet odebraných jaderných buněk (TNC) v odebrané suspenzi, na Obr. č. 15 pak procento a celkový počet CD3⁺ buněk.

Tab. č. 14: Výsledné parametry krevního obrazu.

Dárce	Pohlaví	Diagnóza	Objem odebrané suspenze (ml)	Koncentrace NC (10 ⁹ /l)	TNC (10 ⁸)	Splnění kritéria celkového počtu jaderných buněk	Potřebný počet separací
A.V.	žena	GVHD	140	67,0	93,8 ●	ano	1
A.V.	žena	GVHD	140	67,0	93,8 ●	ano	1
H. Š.	žena	Sezary sy	140	53,9	75,4 ●	ano	1
H. Š.	žena	Sezary sy	140	46,8	65,5 ●	ano	1
P. J.	muž	Sezary sy	140	198,9	278,5	ano	1

Pozn.: ● nutná redukce objemu centrifugací, kritérium pro TNC $\geq 20 \times 10^8$ bylo ve všech případech splněno; NC – jaderné buňky, TNC – celkový počet vitálních NC

Tab. č. 15: Ověření požadavků na % CD3⁺ v odebrané suspenzi a celkový počet odebraných CD3⁺ uvedených ve specifikaci výchozí suroviny v odebraném objemu 140 ml.

Iničiály dárce	CD3 ⁺ (%)	Celkový počet CD3 ⁺ (10 ⁶)	Splnění kritéria celkového počtu CD3 ⁺	Potřebný počet separací
A.V.	18,3	1716,7	ano	1
A.V.	22,0	2063,6	ano	1
H. Š.	63,6	4799,9	ano	1
H. Š.	63,8	4176,4	ano	1
P. J.	72,2	20104,8	ano	1

Pozn.: Kritérium stanovené výrobcem pro opatřování základní suroviny pro celkový počet CD3⁺ více než 1000 x 10⁶ bylo ve všech případech splněno

Všechny odebrané suspenze byly testovány na sterilitu s výsledkem sterilní.

4.1.2 Kryokonzervace nemobilizovaných mononukleárních buněk pro účely validace

V Tab. č. 16 uvádím výsledné parametry odběru nemobilizovaných MNC a v Tab. č. 17 pak výsledné parametry těchto buněk stanovené z rozmrazených kontrolních vzorků. V Tab. č. 18 je uvedena výtěžnost (recovery) všech jaderných, mononukleárních a CD3⁺ buněk.

Tab. č. 16: Parametry suspenze nemobilizovaných MNC odebraných z periferní krve u 16 dárců.

	Objem (ml)	Koncentrace NC (10 ⁹ /l)	% MNC	Vitalita NC (%)	Vitalita MNC (%)	Počet vitálních CD3 ⁺ (10 ⁶)
Průměr	181,70	85,8	94,2	99,6	99,6	7409,1
SD	68,70	36,3	6,4	0,9	0,8	3472,7
Medián	152,00	75,2	96,4	100,0	100,0	6660,1

Pozn.: NC – jaderné buňky, MNC – mononukleární buňky

Tab. č. 17: Parametry kryokonzervované suspenze nemobilizovaných MNC odebraných z periferní krve u 16 dárců, odhad z rozmrazených kontrolních vzorků.

	Objem (ml)	Koncentrace NC (10⁹/l)	% MNC	Vitalita NC (%)	Vitalita MNC (%)	Počet vitálních CD3⁺ (10⁶)
Průměr	355,8	37,1	95,2	98,2	98,9	7209,5
SD	139,3	15,2	2,3	0,7	0,5	4153,9
Medián	300,0	34,0	95,7	98,0	99,0	5711,8

Pozn.: NC – jaderné buňky, MNC – mononukleární buňky

Tab. č. 18: Výtěžnost (recovery) jaderných, mononukleárních buněk a CD3⁺ buněk po rozmrazení v procentech.

	Vitální NC (%)	Vitálních MNC (%)	Vitální CD3⁺ (%)
Průměr	73,7	72,8	73,2
SD	10,3	10,2	14,3
Medián	88,3	87,9	88,6

Pozn.: NC – jaderné buňky, MNC – mononukleární buňky

Ve všech kryokonzervovaných vacích byla potvrzena sterilita.

4.1.3 Výsledky kryokonzervace mononukleárních buněk pro výrobu LPMT Kymriah

Kryokonzervace mononukleárních buněk pro výrobu tohoto přípravku byla zatím provedena u 2 pacientů (2 ženy ve věku 74 a 68, s diagnózou C83.3 – B-buněčný lymfom z velkých buněk). V obou případech splňoval kryokonzervovaný produkt kritéria stanovená výrobcem. LPMT Kymriah byl úspěšně vyroben a po dočasném skladování v kryokonzervačním skladu Tkáňové ústředny aplikován příjemcům.

Část 2 – Studie kryokonzervace hodnoceného LPMT na bázi hMSCs

Výsledky této části práce byly již publikovány (Jandová M. et al., 2020) (13).

4.2.1 Soubor pacientů

Všichni pacienti/dárci vyhověli zařazovacím kritériím klinické studie, žádný nebyl vyloučen. Během odběru výchozí suroviny, kostní dřeně, nedošlo u pacientů k nežádoucím reakcím ani k pacientů či nežádoucím událostem.

4.2.2 Parametry odebraného materiálu

Všechny odebrané vzorky výchozí suroviny vyhověly předepsaným specifikacím a byly propuštěny¹ pro výrobu LPMT. Celkový počet získaných jaderných a mononukleárních buněk a další hematologické parametry ve vzorcích odebrané kostní dřeně jsou obsaženy v Tab. č. 19.

Tab. č. 19: Hematologické parametry odebrané kostní dřeně – výchozí suroviny pro výrobu LPMT.

Pacient	Pohlaví	Věk (roky)	Celkový počet NC x 10 ⁸ /10 ml	Celkový počet MNC x 10 ⁸ /10 ml	Hematokrit	Počet červených krvinek x 10 ¹² /l	Počet krevních destiček x 10 ⁹ /l
1	muž	42	0,824	0,326	0,272	2,5	115,0
2	žena	62	0,638	0,185	0,363	3,7	162,0
3	muž	67	1,258	0,412	0,321	3,1	21,0
4	muž	59	0,766	0,473	0,415	4,5	123,0
5	žena	63	1,343	0,398	0,324	3,4	76,0
6	žena	73	0,842	0,262	0,322	3,4	69,0
	Průměr	61	0,971	0,343	0,336	3,4	94,3
	SD	10,5	0,324	0,106	0,048	0,6	49,5
	Medián	62,5	0,833	0,362	0,323	3,4	95,5

Pozn.: NC – jaderné buňky, MNC – mononukleární buňky

¹ Propouštění výchozích surovin odpovědnou osobou osobou tkáňového zařízení je termínem daným vyhl. č. zákonem č. 296/2008 Sb. a 422/2008 Sb.

Výsledky testu CFU pro výchozí surovinu jsou uvedeny v tab. č. 19.–24. Stanovení bylo provedeno po úvodní depleci erytrocytů ze vzorků kostní dřevě.

4.2.3 Stanovení CFU v odebraných a rozmrazených kontrolních vzorcích

V Tab. č. 20 jsou uvedeny výsledné hodnoty CFU-GM po kultivaci buněk v autologní kostní dřevě.

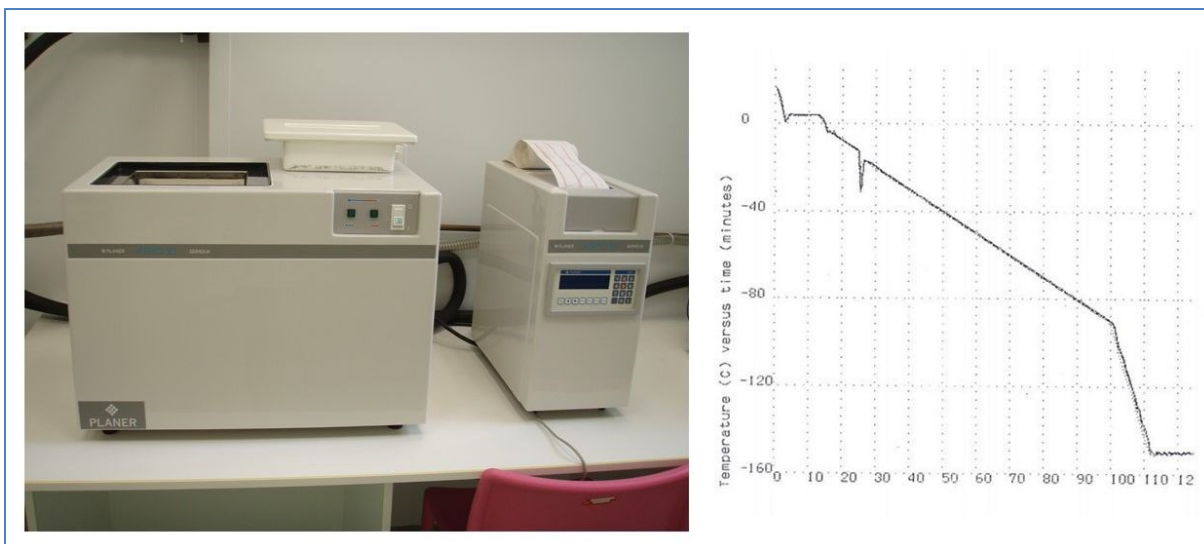
Tab. č. 20: Hodnoty CFU-GM odebrané a kryokonzervované autologní kostní dřevě, základní suroviny pro výrobu LPMT.

Dárce číslo	Počet kolonií CFU-GM							
	Před zmražením		Průměr	V 1ml vzorku (x 10 ³)	Po rozmrazení		Průměr	V 1ml* vzorku (x 10 ³)
KD 1/17	104	86	95	1,98	98	57	78	1,63
KD 2/17	35	23	29	1,85	25	14	19,5	0,62
KD 3/17	144	143	143,50	8,97	121	118	119,50	3,77
KD 4/17	81	56	68,50	2,63	55	52	53,50	1,02
KD 5/17	123	112	117,50	8,01	82	80	81	2,70
KD 6/18	103	104	103,50	4,37	96	97	98	2,04

*po přepočtu na původní objem 1 ml

4.2.4 Programované zmrazování hMSCs

Na obr. č. 13 je zobrazeno zmrazovací zařízení Planer a výsledný teplotní průběh zmrazování v programovatelném zmrazovacím zařízení.



Obr. č. 13: Programovatelné zařízení Planer a záznam teplotního průběhu zmrazování v přístroji Planer (Planer Biomed, Anglie).

4.2.5 Vitalita a fenotyp rozmrazených buněk

4.2.5.1 Výsledky s použitím DMSO

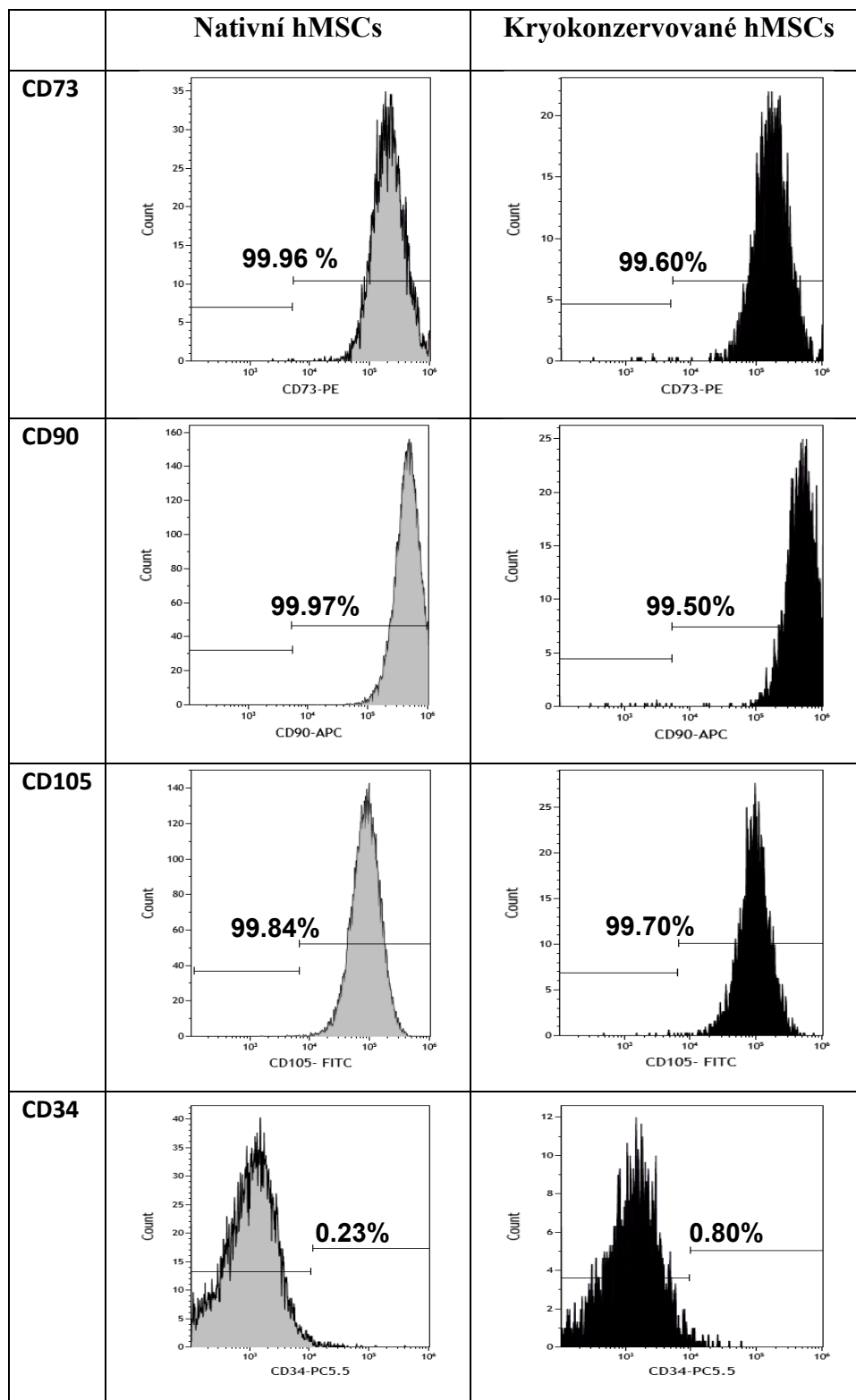
Vitalita a fenotyp hMSCs před a po kryokonzervaci médiem obsahujícím DMSO jsou uvedeny v Tab. č. 21 a na obrázku č. 14. Vitalita rozmrazených buněk ověřená trypanovou modří dosahovala parametrů čerstvých nekryokonzervovaných buněk ($\geq 90\%$) u všech 6 pacientů. Fenotypová čistota stanovená průtokovou cytometrií (tj. buňky s fenotypem hMSCs: CD105⁺, CD73⁺, CD90⁺, MHC I, CD14⁻, CD19⁻, CD45⁻, CD34⁻ $\geq 90\%$) (43,44,47) dosahovala parametrů nativních buněk v polovině případů, u pacientů 3, 5 a 6 byla fenotypová čistota pod 90 %.

Tab. č. 21: Vitalita a fenotypová čistota buněk před a po kryokonzervaci za použití média obsahujícího DMSO.

Pacient	Nativní buňky			Buňky po kryokonzervaci		
	Vitalita (%)		Fenotypová čistota (%)	Vitalita (%)		Fenotypová čistota (%)
	FC	TM	FC	FC	TM	FC
1	96	97	99	93	90	98
2	99	100	91	96	97	96
3	96	Z technických důvodů nestanoveno	97	91	Z technických důvodů nestanoveno	67
4	98	98	98	99	100	90
5	99	98	97	92	91	84
6	98	100	95	89	93	85
Průměr	98	98	97	93	93	88
SD	1,2	1,2	2,6	3,3	3,8	10,2
Medián	98	99	96	93	94	87

Pozn.: FC-průtoková cytometrie, TM – barvení trypanovou modří

Na obr. č. 14 uvádíme porovnání fenotypových znaků typických pro hMSCs u buněk před a po kryokonzervaci.



Obr. č. 14: Výsledný fenotyp hMSCs před a po kryokonzervaci v médiu obsahujícím DMSO stanovený průtokovou cytometrií.

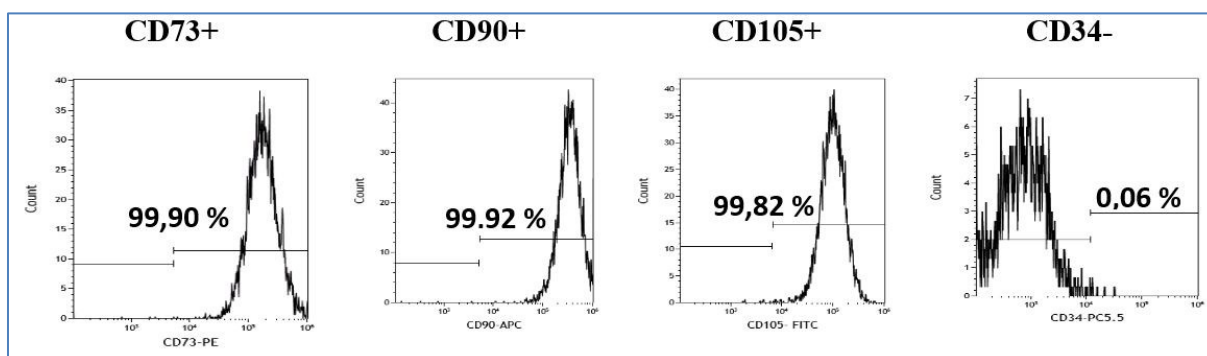
4.2.5.2 Výsledky s použitím kryokonzervačního média Biofreeze

U pacienta č. 2 byly hMSCs také kryokonzervovány médiem Biofreeze neobsahujícím DMSO. Z důvodu nedostatečného množství výchozí buněčné suspenze dostupné k experimentu nebylo možno tímto médiem otestovat větší soubor pacientů. Nicméně prvotní výsledky jsou slibné vzhledem k vysoké vitalitě a fenotypové čistotě po kryokonzervaci (Tab. č. 22 a Obr. č. 15).

Tab. č. 22: Vitalita and fenotypová čistota buněk před a po kryokonzervaci médiem Biofreeze.

Pacient	Nativní buňky			Buňky po kryokonzervaci		
	Vitalita [%]		Fenotypová čistota [%]	Vitalita [%]		Fenotypová čistota [%]
	FC	TM	FC	FC	TM	FC
2	99	100	91	97	80	97

FC-průtoková cytometrie, TM – barvení trypanovou modří

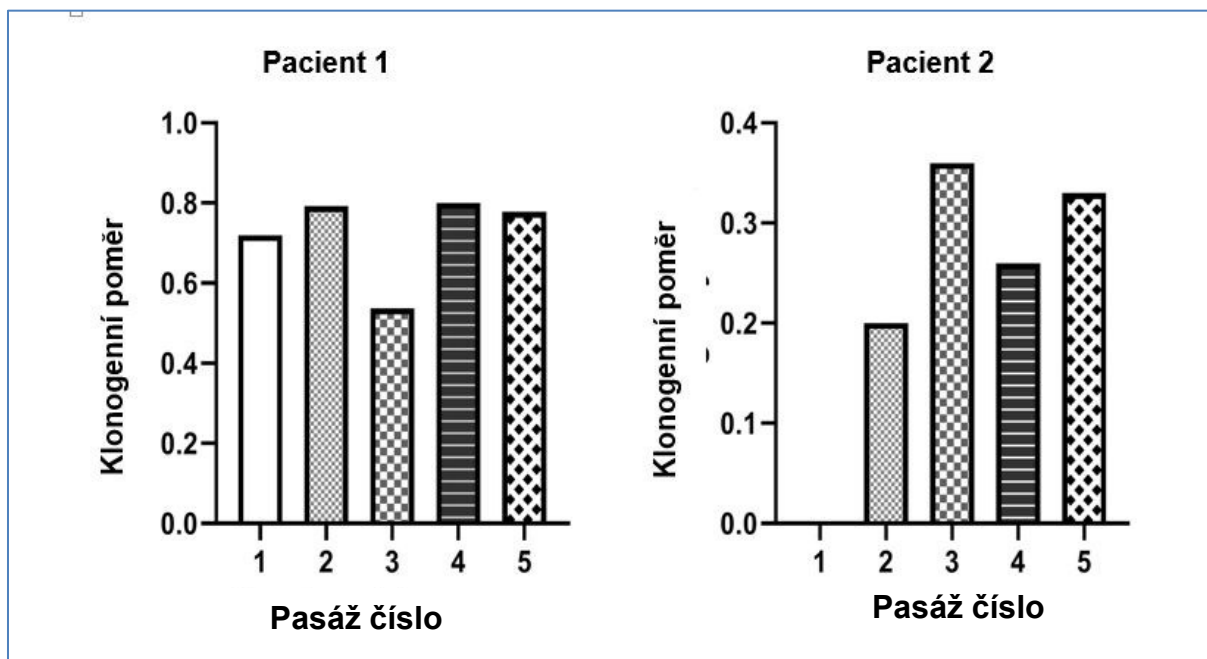


Obr. č. 15: Výsledný fenotyp hMSCs po kryokonzervaci v médiu Biofreeze stanovený průtokovou cytometrií.

4.2.6 Určení klonogenity

Z důvodu nedostatku kryokonzervovaného materiálu pro tento test bylo ověření klonogenního potenciálu provedeno s kryokonzervovanými buňkami pouze u prvních dvou pacientů. U prvního pacienta výsledky ukázaly proliferačně stabilní hMSCs populaci, neboť ve všech pasážích vyšel klonogenní poměr $> 0,5$. U druhého pacienta byl naopak poměr $< 0,5$, což ukazuje, že v tomto případě se tvořily více klastry než kolonie. Z důvodu pomalého růstu při

kultivaci rozmrazených hMSCs, jsme provedli o jednu pasáž méně než v prvním případě (Obr. č. 16).



Obr. č. 16: Výsledky testu pro určení klonogenního potenciálu u prvních dvou pacientů s kryokonzervovanými hMSCs v médiu s DMSO.

4.2.7 Výsledky mikrobiologického testování

Bylo prokázáno, že všechny vyrobené kryokonzervované produkty LPMT vyhověly v mikrobiologických testech na sterilitu a neobsahovaly mykoplazmata.

4.2.8 Výsledky simulace aseptického procesu

Ve všech kontrolních vzorcích byla prokázána sterilita a počet měřených částic v prostředí během procesu simulace odpovídal požadavkům GMP.

4.2.9 Analýza rizik výrobního procesu

Analýza rizik výrobního procesu kryokonzervovaných hMSCs je uvedena v následující Tab. č. 23. Z uvedených výsledků vyplývá, že nebyla překročena hraniční hodnota RPN 125, navržené postupy jsou funkční a nevyžadují nápravná opatření.

Tab. č. 23: Analýza rizik pro výrobu léčivého přípravku moderní terapie z kryokonzervovaných hMSCs metodou FMEA

Prvek	Možná vada	Možné následky vady	Význam	Možné příčiny	Výskyt	Stávající opatření	Stávající řízení návrhu - odhalování	Odhalitelnost	Rizikové číslo
Kritické materiály	všechny kritické materiály - nesterilita	kontaminace produktu	10	narušení obalu, neodržení skladovacích teplot	3	kontrola neporušenosti obalu	nezávislé posouzení sterility (ITEST-plus)	3	90
	CryoSureDMSO nedodržení skladovacích podmínek	tvorba krystalů, explozivita	9	chyba pracovníka	2	proškolení pracovníků v pracovních postupech	žádné	1	18
	Voluven - nedodržení skladovacích podmínek	tvorba krystalů	9	chyba pracovníka	2	proškolení pracovníků v pracovních postupech	žádné	1	18
	Albumin humanum, Hartmanův roztok - nedodržení skladovacích podmínek	zákal	9	chyba pracovníka	2	proškolení pracovníků v pracovních postupech	žádné	1	18
	Registrované léčivé přípravky - Přehlednutí informace SÚKLu o stažení přípravku	Použití vadné šarže	9	chyba pracovníka	2	sledování důležitých upozornění SÚKLu	pověření pracovníka sledováním	1	18
Výchozí materiál: kostní dřev	mikrobiologické riziko při odběru kostní dřevě	kontaminace výchozí suroviny	9	chyba pracovníka	1	žádné	žádné	1	9
	nedostatečné promísení kostní dřevě s antikoagulantem ve zkumavce	vznik sraženin	7	chyba pracovníka	5	proškolení pracovníků v pracovních postupech	stanovení krevního obrazu a diferenciálního rozpočtu leukocytů	1	35

Počítání buněk pomocí trypanové modři na vstupu	chybně provedený odečet	chybná rozvaha ohledně následného ředění	7	pracovník dobře metodu neovládá	3	pověřený pracovník byl proškolen v odečtu pomocí Trypanové modři v rámci stáže na FVZ	Konfrontace výsledků s výsledky výrobce nativních hMSCs (Bioinova, s.r.o.)	1	21
Kryokonzervace a skladování hMSCs	chyba při oblékání ochranného oděvu do čistých prostor	kontaminace oděvu, netěsnost kombinézy, možné narušení sterility produktu	7	nedodržení standardního postupu pro převlékání do čistých prostor	6	pravidelné školení v oblékání do čistých prostor	namátkové stěry z povrchu kombinézy pracovníka v rámci procesní kvalifikace	2	84
	chybné uvedení laminárního boxu do provozu - není zapnuta funkce laminárního proudění	riziko kontaminace produktu	7	chyba pracovníka	3	pracovník užívající laminární byl proškolen v práci s přístrojem	kontrola sterility hotového přípravku	2	42
	není spuštěn laminární box	riziko kontaminace produktu	9	selhání techniky	2	pravidelná preventivní údržba přístroje, vč. BTK a elektrovizí	pravidelná validace přístroje autorizovanou firmou	3	54
	neaseptické vybalení kritických materiálů z primárních obalů na pracovní plochu laminárního boxu	riziko kontaminace, porušení sterility produktu	5	možná nesterilita léčivého přípravku	3	pravidelné školení ve standardních pracovních postupech	žádné	8	120
	začátek zpracování dřívě, než je prokázána třída čistoty čítačem částic	riziko nesterility produktu	7	chyba pracovníka	3	pravidelné školení ve standardních pracovních postupech	kontrola výstupních dat z čítače částic	1	21
	chyba v pipetování (nesprávný objem buněčné suspenze v kryozkumavce)	teoretická koncentrace přípravku se neshoduje s realitou	6	vada pipety	1	pravidelná kalibrace pipet autorizovanou firmou	pravidelná kalibrace pipet autorizovanou firmou	2	12

	chyba v pipetování (nesprávný objem buněčné suspenze v kryozkumavce)	teoretická koncentrace přípravku se neshoduje s realitou	6	chyba pracovníka	2	žádné	žádné	10	120
	chyba v pipetování (nesprávný objem kryoprotektiva v kryozkumavce)	riziko poškození buněk nízkými teplotami (tvorba krystalků ledu)	9	vada pipety	1	pravidelná kalibrace pipet autorizovanou firmou	pravidelná kalibrace pipet autorizovanou firmou	2	18
	chyba v pipetování (nesprávný objem kryoprotektiva v kryozkumavce)	riziko poškození buněk nízkými teplotami (tvorba krystalků ledu)	9	chyba pracovníka	2	žádné	žádné	2	36
Kryokonzervace hMSCs	velký interval mezi smícháním s kryoprotektivem a zahájením zmrazování	riziko poškození membrány buněk	9	chyba pracovníka	2	pravidelné školení ve standardních pracovních postupech	žádné	3	54
	chybně zvolený program zmrazování	riziko poškození membrány buněk, snížení životnosti buněk	9	chyba pracovníka	2	pravidelné školení ve standardních pracovních postupech	žádné	1	18
	přerušování zmrazovacího programu	riziko poškození membrány buněk, snížení životnosti buněk	9	selhání techniky	4	pravidelná preventivní údržba přístroje, vč. BTK a elektrorevize	pravidelná validace přístroje autorizovanou firmou	1	36
	nedodržení teplotního řetězce od zmrazovacího zařízení k finálnímu uložení v teplotách tekutého dusíku	riziko poškození membrány buněk, snížení životnosti buněk	6	chyba pracovníka	2	pravidelné školení ve standardních pracovních postupech	žádné	3	36
	uložení přípravku do kontejneru s neadekvátními teplotními podmínkami	rychlý pokles životnosti v čase	6	neznalost pracovníka	2	pravidelné školení ve standardních pracovních postupech	žádné	1	12

Část 3 – Retrospektivní studie odmytí DMSO v suspenzi kryokonzervovaných autologních mobilizovaných periferních progenitorových buněk (HPCs)

4.3.1 Vliv procesů kryokonzervace a odmytí DMSO na klíčové parametry suspenze HPC

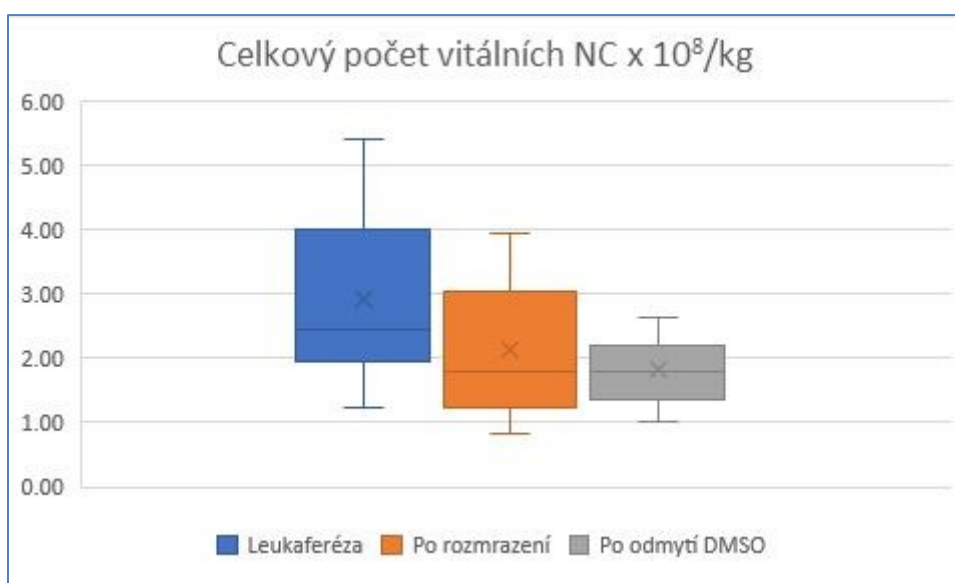
4.3.1.1 Deskriptivní statistika

Základní parametry deskriptivní statistiky – medián, první a třetí kvartil, minimum, maximum, celkové dávky vitálních NC, MNC and CD34⁺/kg hmotnosti příjemce obsažené v jednom kryokonzervačním vaku o objemu 100 ml, resp. v 50 ml separované suspenze HPC při sběru, po kryokonzervaci a rozmrazení a po odmytí DMSO jsou uvedeny v Tab. č. 24–26 a na Obr. č. 17–19.

Tab. č. 24: Celková dávka vitálních jaderných buněk (NC)/kg při leukaferéze, po rozmrazení a po odmytí DMSO v jednom vaku o objemu 100 ml.

Proces <i>n</i> = 13	Celkový počet vitálních NC [10 ⁸]/kg		
	Leukaferéza	Po rozmrazení	Po odmytí DMSO
Min	1,25	0,84	1,01
Max	5,40	3,94	2,64
Medián	2,46	1,79	1,79
(1. Q; 3. Q)	(1,96; 4,01)	(1,24; 3,04)	(1,37; 2,20)

Pozn.: NC – jaderné buňky

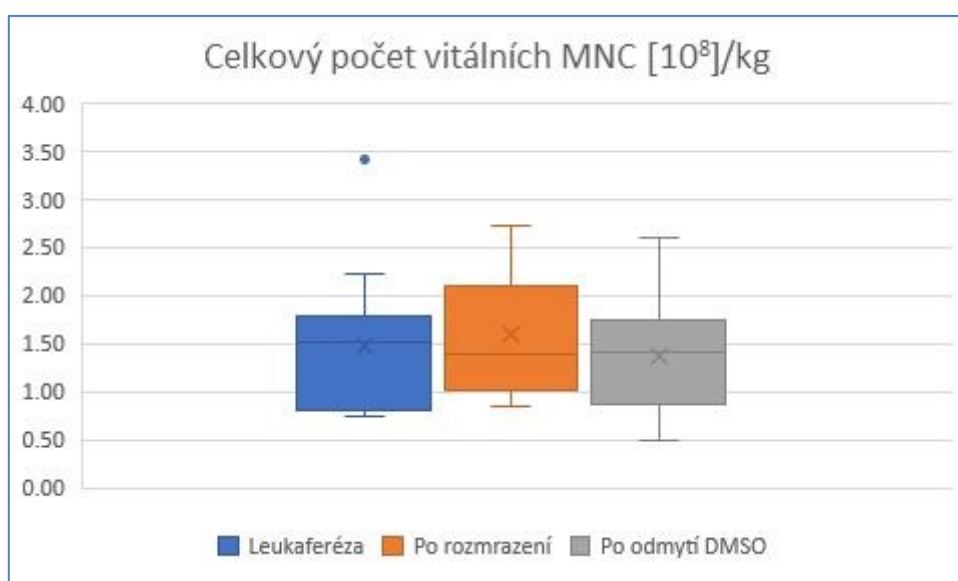


Obr. č. 17. Celková dávka vitálních NC [10⁸]/kg hmotnosti příjemce

Tab. 25: Celková dávka vitálních mononukleárních buněk (MNC) při leukaferéze, po rozmrazení a po odmytí DMSO v jednom vaku o objemu 100 ml.

Proces <i>n</i> = 13	Celkový počet vitálních MNC [10^8]/kg		
	Leukaferéza	Po rozmrazení	Po odmytí DMSO
Min	0,74	0,85	0,50
Max	3,41	2,73	2,60
Medián (1. Q; 3. Q)	1,51 (0,80; 1,78)	1,40 (1,01; 2,09)	1,40 (0,87; 1,75)

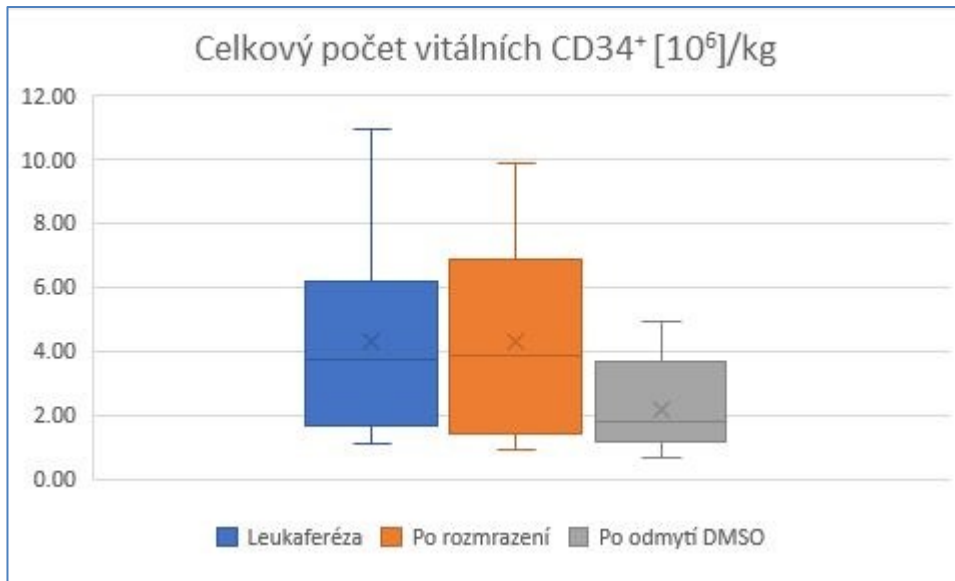
Pozn.: MNC – mononukleární buňky



Obr. č. 18. Celková dávka vitálních MNC [10^8]/kg hmotnosti příjemce.

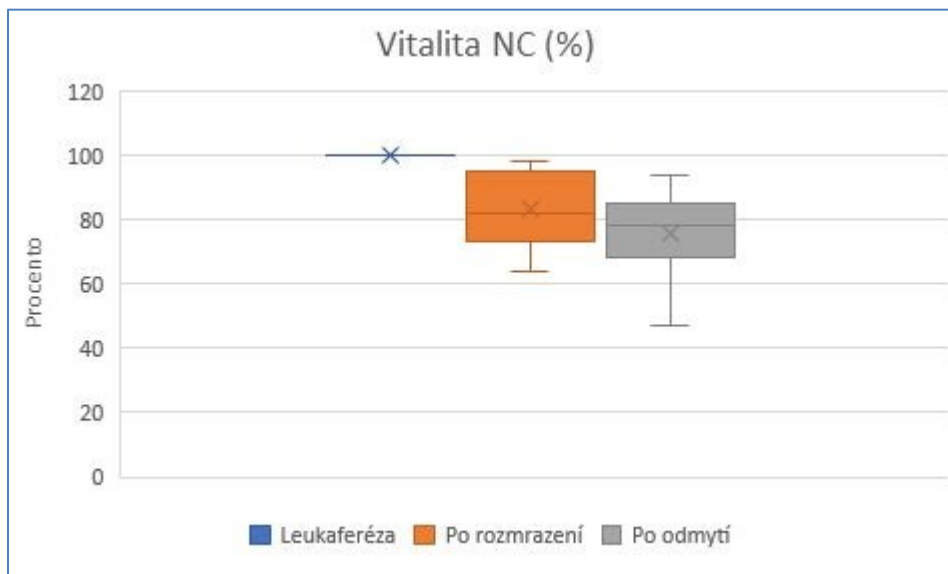
Tab. 26: Celkový počet vitálních $CD34^+$ buněk/kg při leukaferéze, po rozmrazení a po odmytí DMSO v jednom vaku o objemu 100 ml.

Proces <i>n</i> = 13	Celkový počet vitálních $CD34^+$ [10^6]/kg		
	Leukaferéza	Po rozmrazení	Po odmytí DMSO
Min	1,09	0,93	0,64
Max	10,93	9,86	4,94
Medián (1. Q; 3. Q)	3,71 (1,64; 6,15)	3,88 (1,42; 6,84)	1,76 (1,13; 3,65)

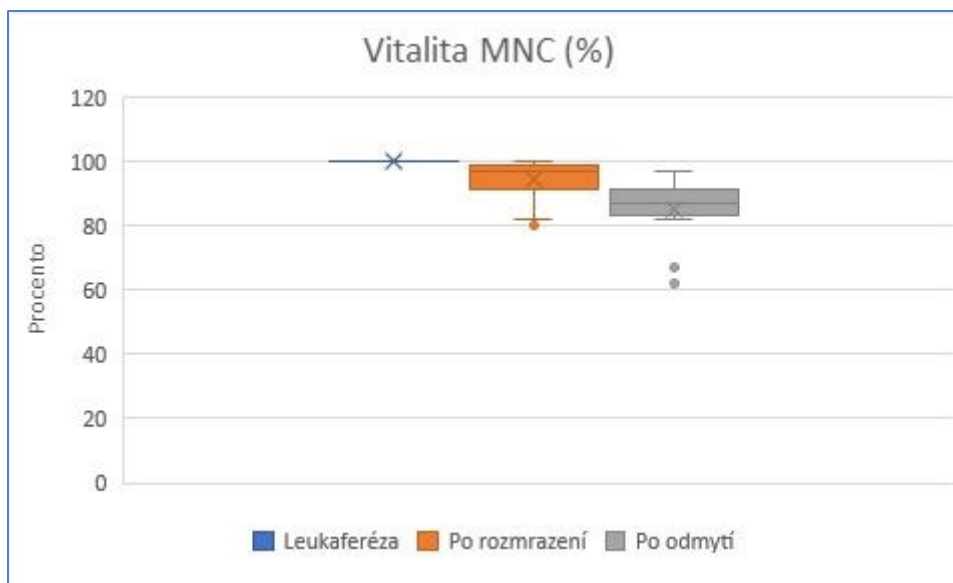


Obr. č. 19. Celková dávka vitálních CD34⁺ [10⁶]/kg hmotnosti příjemce.

Životaschopnost (vitalita) NC a MNC je uvedena na Obr. č. 20 a č. 21.



Obr. č. 20: Životaschopnost jaderných buněk při leukaferéze, po rozmrazení a po odmytí.

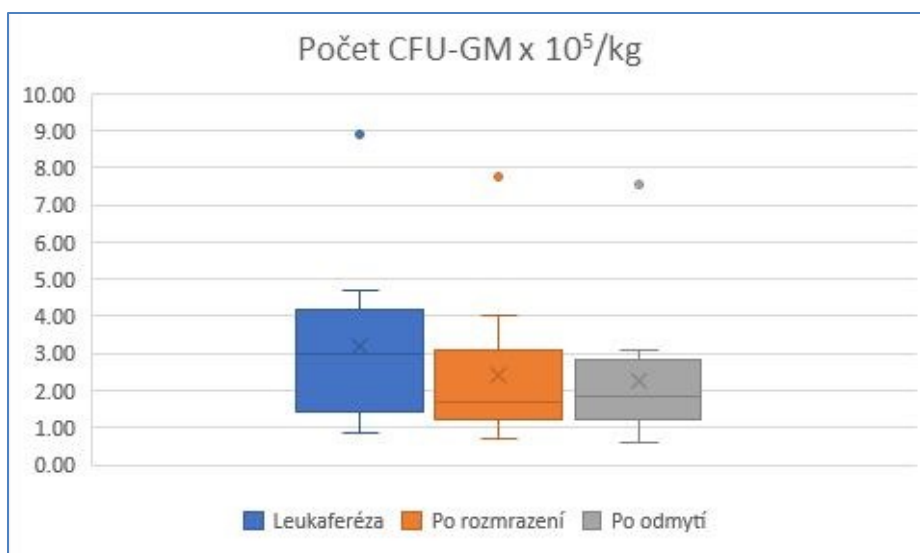


Obr. 21: Životaschopnost MNC při sběru, po rozmrazení a po odmytí DMSO.

Celková dávka CFU-GM na kg hmotnosti příjemce je uvedena v Tab. č. 27 a na Obr. č. 22.

Tab. č. 27: Celková dávka CFU-GM/kg při leukaferéze, po rozmrazení a po odmytí DMSO v jednom vaku o objemu 100 ml.

Proces <i>n</i> = 13	CFU-GM x 10 ⁵ /kg		
	Leukaferéza	Po rozmrazení	Po odmytí DMSO
Min	0,87	0,69	0,58
Max	8,88	7,74	7,56
Medián	2,97	1,68	1,82
(1. Q; 3. Q)	(1,71; 4,05)	(1,42; 2,91)	(1,31; 2,71)



Obr. č. 22: Celkový počet CFU-GM [10⁵]/kg hmotnosti příjemce.

4.3.2 Určení významnosti vlivu procesu zmrazení/rozmrazení a odmytí na klíčové parametry HPC

V Tab. č. 28 je jsou uvedeny hodnoty mediánů klíčových parametrů před zmrazením a po rozmrazení. Z výsledků vyplývá, že proces zmrazení/rozmrazení signifikantně snižuje vitalitu všech jaderných (TNC) i mononukleárních buněk (MNC), dávku TNC/kg a CFU-GM/kg. Dávky MNC/kg a CD34⁺ buněk/kg ovlivněny nejsou, procento MNC se významně zvyšuje.

Tab č. 28: Vliv procesu zmrazení/rozmrazení na parametry koncentráту autologních mobilizovaných HPCs.

Parametr	Leukaferéza	Po rozmrazení	Hodnota P
TNC/kg (10 ⁸)	2,46	1,79*	0,0064
Vitalita NC (%)	100	82*	0,0016
TMNC/kg (10 ⁸)	1,51	1,40	0,3636
Vitalita MNC (%)	100	97*	0,0018
MNC (%)	55,60	69,90*	0,0021
CD34 ⁺ /kg (10 ⁶)	3,71	3,88	0,5294
CD34 ⁺ (%)	1,33	1,63*	0,0144
CFU-GM/kg (10 ⁵)	2,97	1,68*	0,0017

Pozn.: NC – jaderné buňky, MNC – mononukleární buňky, *) hvězdička označuje signifikantní rozdíl hodnot naměřených před zmrazením a po rozmrazení

V Tab. č. 29 jsou uvedeny hodnoty mediánů klíčových parametrů po odmytí DMSO. Z uvedeného vyplývá, že samotný proces odmytí významně snižuje vitalitu MNC i procento CD34⁺ buněk z leukocytů, ostatní parametry významně ovlivněny nejsou.

Tab. č. 29: Vliv odmytí DMSO na parametry rozmrazeného koncentrátu autologních mobilizovaných HPCs.

Parametr	Po rozmrazení	Po odmytí	Hodnota P
TNC/kg (10 ⁸)	1,79	1,79	0,5761
Vitalita NC (%)	82	78	0,0251
TMNC/kg (10 ⁸)	1,40	1,40	0,4017
Vitalita MNC (%)	97	87*	0,0023
MNC (%)	69,90	63,3	0,0806
CD34 ⁺ /kg (10 ⁶)	3,88	1,75	0,0175
CD34 ⁺ (%)	1,63	0,9*	0,0017
CFU-GM/kg (10 ⁵)	1,68	1,82	0,1327

Pozn.: NC – jaderné buňky, MNC – mononukleární buňky, *) hvězdička označuje signifikantní rozdíl hodnot naměřených po rozmrazení a po odmytí

V Tab. č. 30 jsou uvedeny hodnoty mediánů klíčových parametrů při porovnání hodnot při leukaferéze a po odmytí DMSO. Celý proces statisticky významně snižuje vitalitu TNC i MNC, procento CD34⁺ z leukocytů, dávku CD34⁺/kg i dávku CFU-GM/kg.

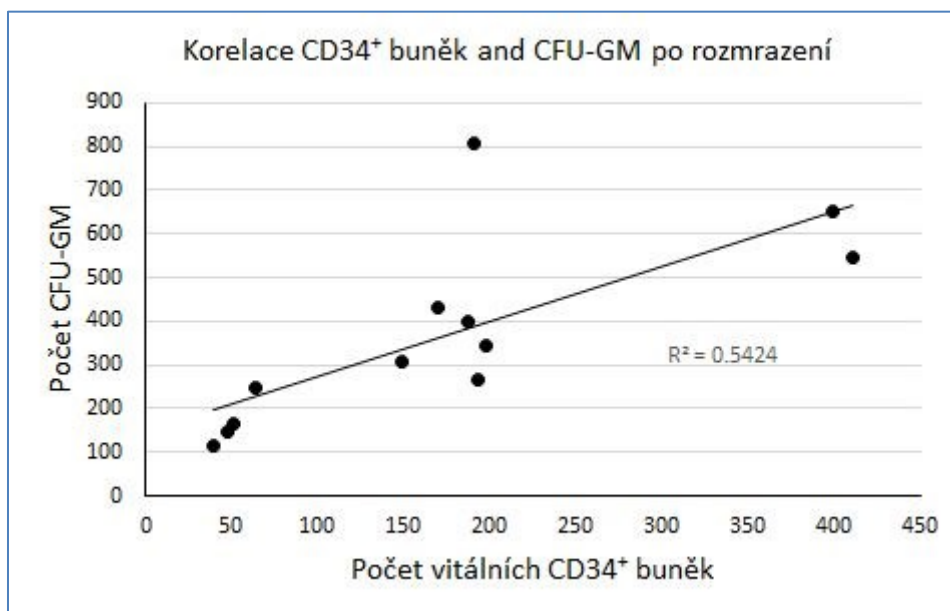
Tab. č. 30. Vliv celého procesu rozmrazení – odmytí DMSO na parametry koncentráту autologních mobilizovaných HPCs.

Parametr	Leukaferéza	Po odmytí	Hodnota P
TNC/kg (10^8)	2,46	1,79	0,0360
Vitalita NC (%)	100	78*	0,0017
TMNC/kg (10^8)	1,51	1,40	0,9442
Vitalita MNC (%)	100	87*	0,0017
MNC (%)	55,60	63,3	0,0359
CD34 ⁺ /kg (10^6)	3,71	1,75*	0,0097
CD34 ⁺ (%)	1,33	0,9*	0,0030
CFU-GM/kg (10^5)	2,97	1,82*	0,0057

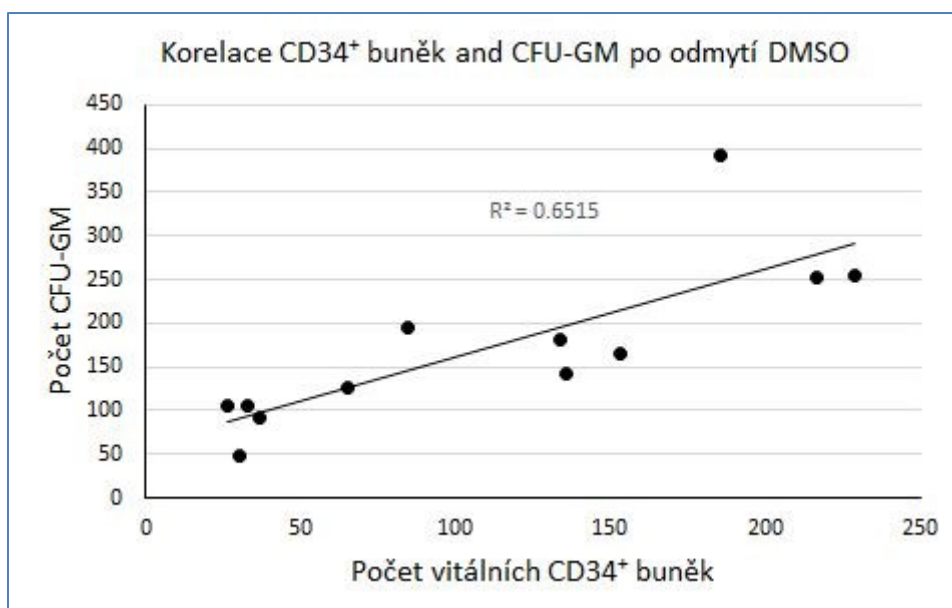
Pozn.: NC – jaderné buňky, MNC – mononukleární buňky, *) hvězdička označuje signifikantní rozdíl hodnot naměřených před zmrazením a po odmytí

4.3.3 Stanovení CFU-GM a určení korelace mezi počtem CFU-GM a CD34⁺ buněk

Tab. č. 27 ukazuje na určitý pokles v počtu CFU-GM po rozmrazení a po odmytí. Byla zjištěna středně silná korelace ($r = 0,763$, $p = 0,002$) mezi počtem CFU-GM a počtem vitálních CD34⁺ buněk po procesu kryokonzervace a rozmrazení (Obr. č. 23). Korelace mezi počtem CFU-GM a vitálních CD34⁺ buněk po odmytí DMSO byla rovněž středně silná ($r = 0,807$, $p = 0,00341$) (obr. č. 24).



Obr. č. 23: Korelace CD34⁺ buněk a CFU-GM po kryokonzervaci a rozmrazení ($r = 0,751$, $p = 0,0031$)



Obr. č. 24: Korelace CD34⁺ buněk a CFU-GM po odmytí DMSO

4.3.4 Určení výtěžnosti (recovery)

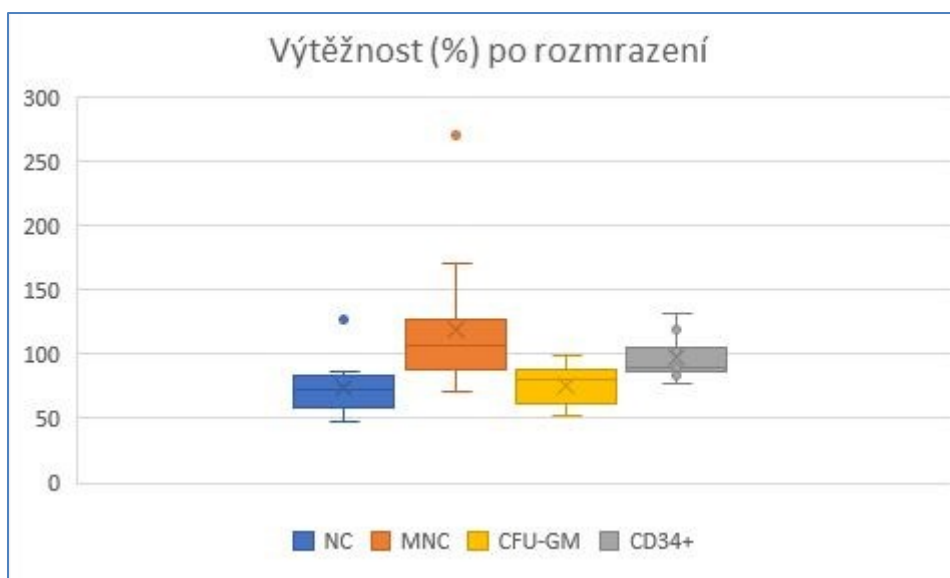
4.3.4.1 Výtěžnost po kryokonzervaci a rozmrazení

Tab. č. 31 uvádí výtěžnosti v rozmrazených kryokonzervovaných 100ml vacích ($n = 13$). Ve skupině jaderných buněk je medián hodnoty výtěžnosti (recovery) 86,85 %, zatímco výtěžnost u mononukleárních buněk se pohybuje okolo 100 %, což koreluje s počty CD34⁺ progenitorových buněk (Obr. č. 25). Z uvedeného vyplývá, že mononukleární a progenitorové buňky jsou k procesu kryokonzervace méně citlivé než zralé polymorfonukleární leukocyty.

Tab. č. 31: Hodnoty výtěžnosti procesu kryokonzervace - rozmrazení, $n = 13$

Parameter	Recovery (%)			
	Počet vitálních NC	Počet vitálních MNC	Počet vitálních CD34 ⁺	Počet CFU-GM
Minimum	47,43	70,88	76,37	52,29
Maximum	126,27	269,56	131,74	99,49
Medián	86,85	106,32	90,18	80,61
(1. Q; 3. Q)	(58,43; 82,30)	(89,66; 125,96)	(86,00; 104,51)	(62,16; 87,16)

Pozn.: NC – jaderné buňky, MNC – mononukleární buňky



Obr. č. 25: Výtěžnost parametrů HPC po procesu zmrazení - rozmrazení.

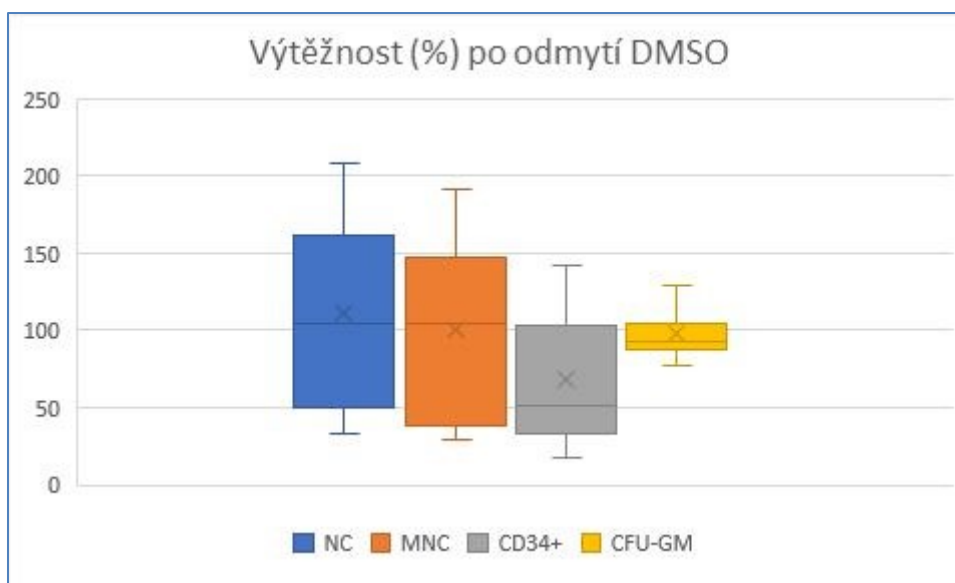
4.3.4.2 Výtěžnost po odmytí DMSO (rozmrazení-odmytí)

V Tab. č. 32 a na Obr. č. 26 je uvedena výtěžnost po procesu odmytí DMSO ve srovnání s počtem vitálních buněk v rozmrazených vzorcích. Dle hodnot výtěžnosti jsou progenitorové buňky CD34⁺ více citlivé k procesu odmytí než ostatní jaderné buňky.

Tab. č. 32: Hodnoty výtěžnosti procesu odmytí DMSO, $n = 13$

Parameter	Recovery (%)			
	Počet vitálních NC	Počet vitálních MNC	Počet vitálních CD34 ⁺	Počet CFU-GM
Minimum	33,25	29,12	17,86	77,23
Maximum	208,45	191,79	141,91	128,73
Medián	120,85	104,53	51,49	93,37
	(61,1; 154,16)	(39,98; 139,27)	(40,35; 91,82)	(90,86; 97,59)

Pozn.: NC – jaderné buňky, MNC – mononukleární buňky



Obr. č. 26: Výtěžnost parametrů HPC po procesu odmytí DMSO.

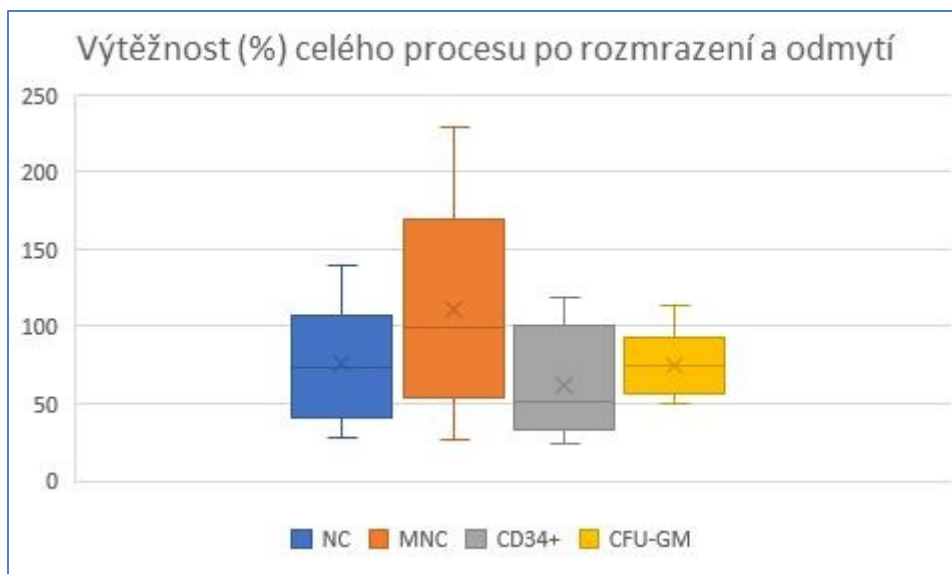
4.3.4.3 Výtěžnost celkového procesu (separace-odmytí)

Tab. č. 33 a Obr. č. 27 uvádí hodnoty výtěžností celkového procesu při srovnání hodnot vzorků ze separace a po odmytí DMSO. Výsledná data opět potvrzují relativní odolnost mononukleárních buněk, progenitorové CD34⁺ buňky jsou více citlivé k procesu odmytí (Tab. č. 29) než k procesu zmrazení/rozmrazení (Tab. č. 28). Obrázky č. 26 a č. 27 dokumentují velkou individuální variabilitu výsledků procesu odmytí a celého procesu ve srovnání se samotným procesem zmrazení/rozmrazení (Obr. č. 25).

Tab. č. 33: Hodnoty výtěžností celkového procesu, $n = 13$

Parameter	Recovery (%)			
	Počet vitálních NC	Počet vitálních MNC	Počet vitálních CD34 ⁺	Počet vitálních CFU-GM
Minimum	28,13	26,36	23,53	50,31
Maximum	139,83	228,69	118,65	113,81
Medián	83,98 (42,62; 95,26)	98,71 (57,00; 166,4)	50,96 (35,9; 95,96)	74,80 (57,92; 85,07)

Pozn.: NC – jaderné buňky, MNC – mononukleární buňky

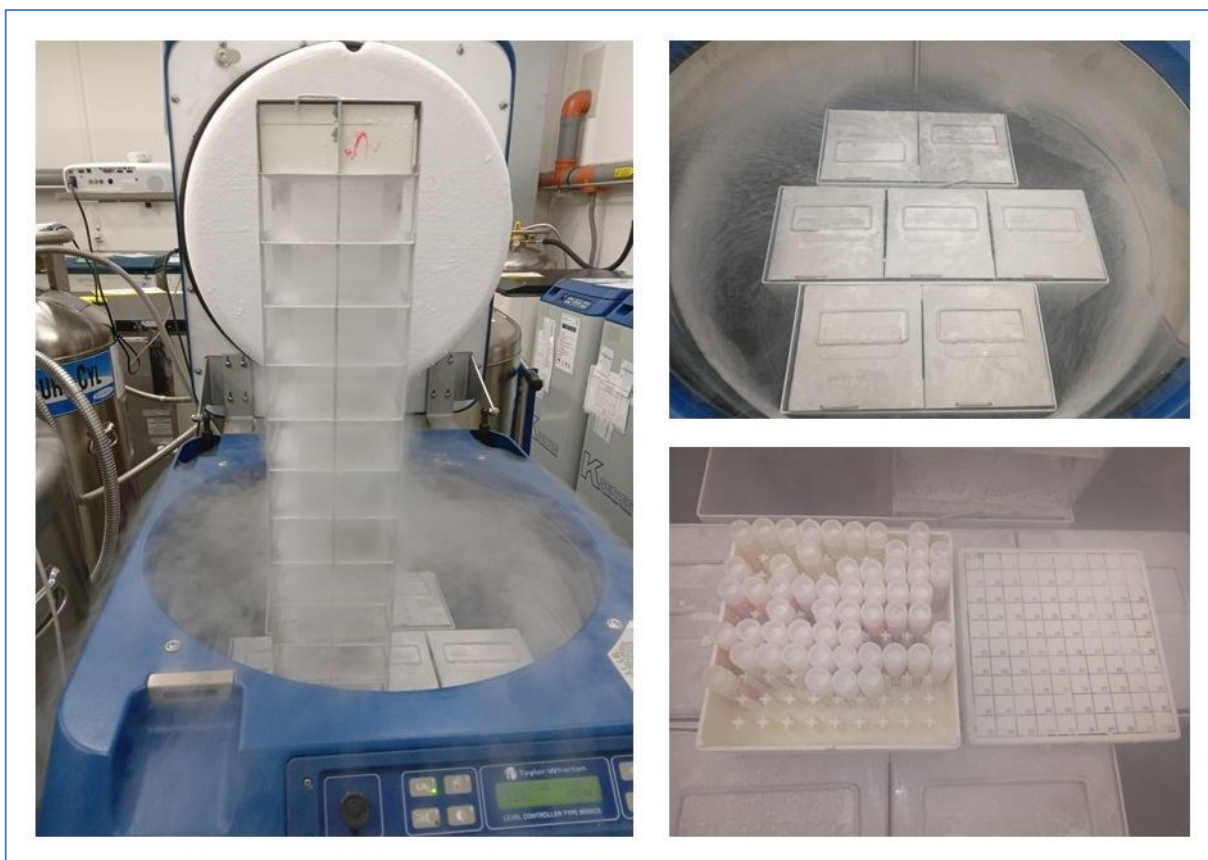


Obr. č. 27: Výtěžnost parametrů HPC po celém procesu zmrazení - rozmrazení a odmytí DMSO

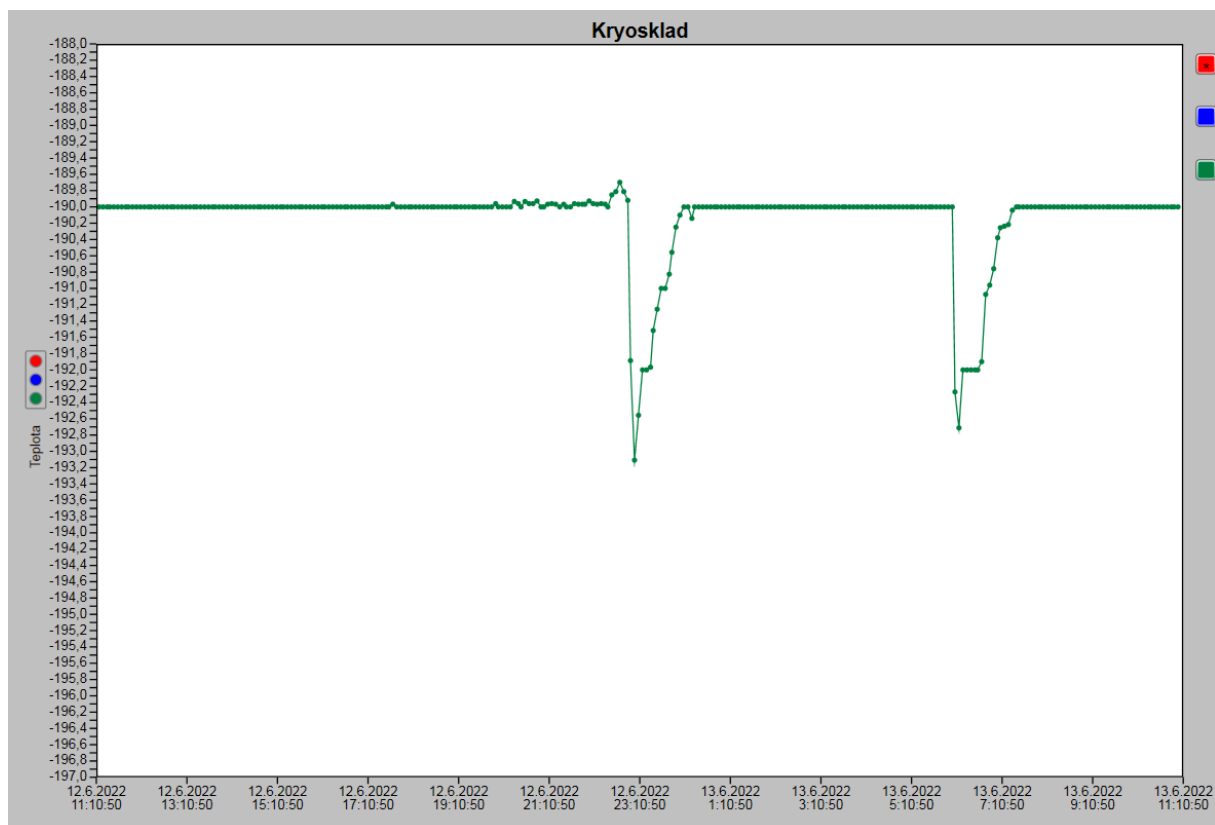
Část 4 – Splnění speciálních požadavků na skladování výchozích surovin pro výrobu registrovaných a hodnocených geneticky modifikovaných přípravků

4.4.1 Skladování hodnoceného LPMT na bázi kryokonzervovaných hMSCs v kryoampulích

Na obr. č. 28 je zobrazen kryokontejner Taylor Wharton 10K (Taylor Wharton, USA) s technologií „dry-storage“, v němž jsou uloženy hMSCs, jejichž výroba je popsána v části 2 této práce, na Obr. č. 29 je pak teplotní záznam ze skladování hotového přípravku. Přípravek je skladován v parách kapalného dusíku při teplotách $-175\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$. Teplota je snímána pomocí 2 teplotních čidel, která jsou umístěna v různých výškách, teploty jsou kontinuálně monitorovány a zaznamenávány. Vnitřní vestavba je koncipována do jednotlivých sloupců (rámů, neboli „racků“), které jsou umístěny v kovových komínkách, mezi nimiž cirkuluje kapalný dusík. Jednotlivé vzorky jsou umístěny na konkrétních pozicích v označených plastových kryoboxech (10 x 10 pozic). Přístroj má funkci automatického doplňování kapalného dusíku.



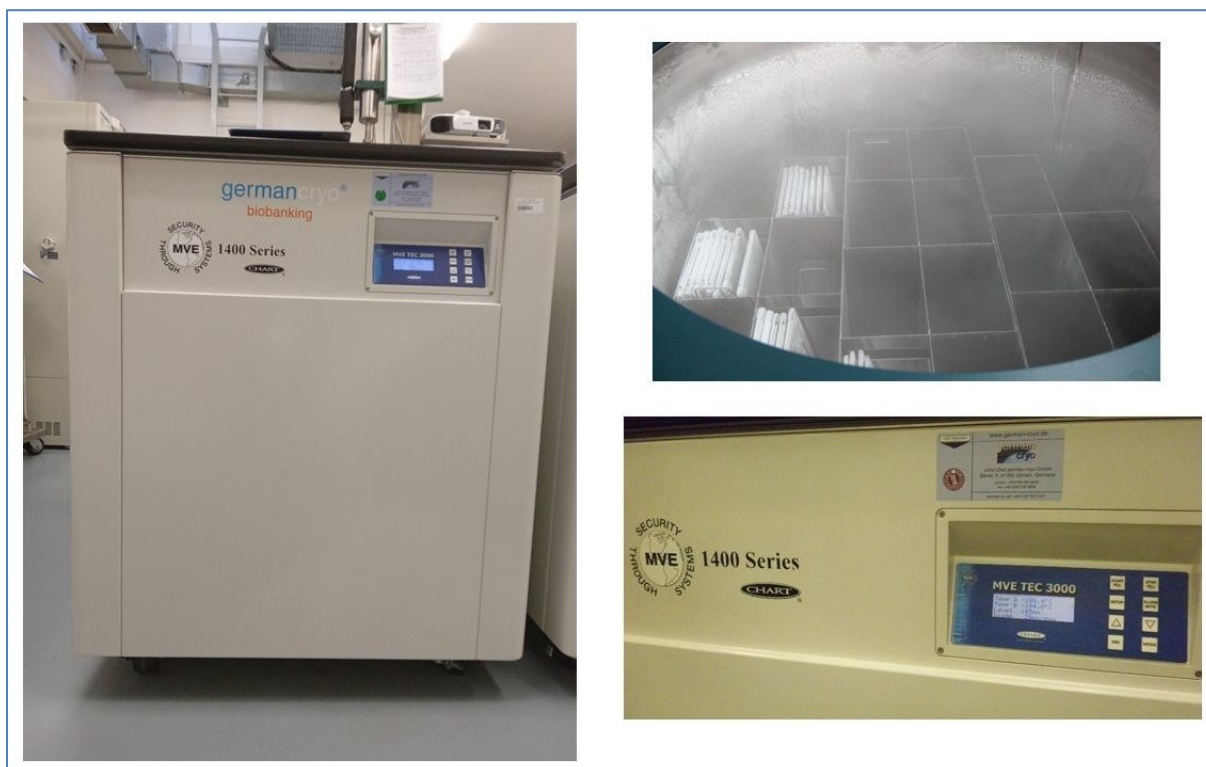
Obr. č. 28: Skladování hodnoceného LPMT na bázi kryokonzervovaných hMSCs v kryokontejneru Taylor Wharton 10K (Taylor Wharton, USA).



Obr. č. 29: Teplotní průběh skladování vzorků uložených v kryokontejneru Taylor Wharton 10K (Taylor Wharton, USA). Teplota skladování odpovídá požadavkům FDA pro LPMT, tzn., je nižší než $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.2 Skladování výchozích surovin (kryokonzervované mononukleární buňky) pro výrobu geneticky manipulovaných LPMT a skladování hotových LPMT na bázi GMO

Na Obr. č. 30 je kryokontejner, v němž skladujeme výchozí suroviny (mononukleární buňky) pro výrobu LPMT. Jedná se o starší typ kontejneru se stimulovaným odparem pomocí měděného plátu. Vzorky jsou skladovány v kryovacích umístěných v kovových kazetách, jednotlivé kazety jsou umístěny v kovových rámech, v parách kapalného dusíku při teplotách $-175\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$. Teplota je snímána pomocí 2 teplotních čidel, která jsou umístěna v různých výškách, teploty jsou kontinuálně monitorovány a zaznamenávány.



Obr. č. 30: Kryokontejner pro skladování výchozích surovin (mononukleární buňky) pro výrobu geneticky modifikovaných LPMT MVE 1400 Series (Chart Industries, Inc., USA).

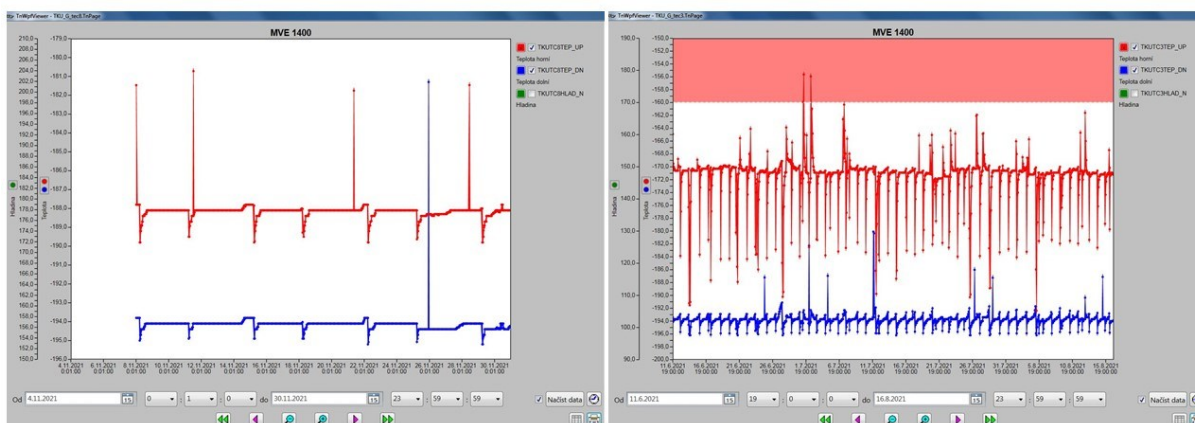
Na Obr. č. 31 je kryokontejner LPMT MVE 815P-190-F (Chart Industries, Inc., USA) s technologií „dry-storage“ určený výhradně pro skladování registrovaných nebo hodnocených LPMT na bázi GMO propuštěných pro klinické použití kvalifikovanou osobou výrobce. Uspořádání vnitřní vestavby zahrnující pravidlo „co rám, to druh přípravku“ koresponduje s doporučenými standardy (151,152). Vzorky jsou skladovány v parách, při teplotách $-175\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$. Teplota je snímána pomocí 2 teplotních čidel, která jsou umístěna v různých výškách a teploty jsou kontinuálně monitorovány a zaznamenávány.

Na Obr. č. 32 je porovnán teplotní průběh skladování v kryokontejneru se stimulovaným odparem pomocí měděného plátu a v kontejneru s „dry-storage“ technologií.

Kryokontejner určené pro skladování hotových propuštěných registrovaných nebo hodnocených LPMT je třeba pravidelně validovat, validace je prováděna autorizovanými firmami 1x ročně podle pravidel platných ve výrobě léčiv, tzn. při striktním dodržování triády: instalační kvalifikace, operační kvalifikace a procesní validace. Na obr. č. 33 je nástin teplotní validace kryokontejneru určeného pro skladování LPMT.



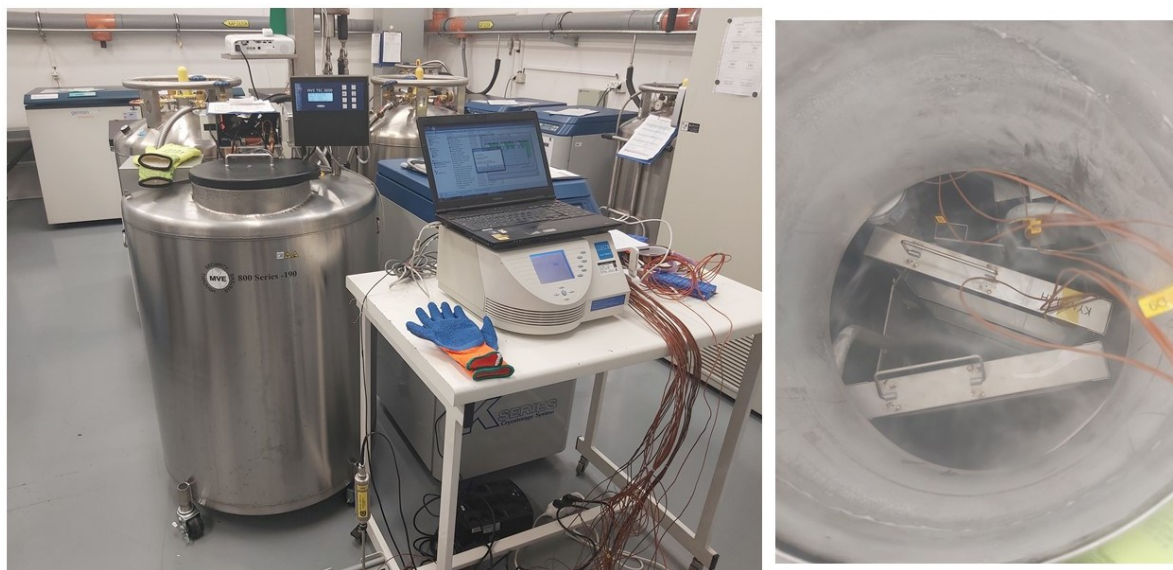
Obr. č. 31: Kryokontejner určený pro skladování propuštěných registrovaných nebo hodnocených geneticky modifikovaných LPMT MVE 815P-190-F (Chart Industries, Inc., USA), vpravo detail rámu vnitřní vestavy.



Obr. č. 32: Teplotní záznamy průběhu skladování. Vlevo - skladování v kryokontejneru se stimulovaným odparem pomocí měděného plátu, vpravo – skladování v kryokontejneru s technologií „dry“.

U kontejneru určeného pro skladování výchozí suroviny (Obr. č. 30) je dodrženo doporučení EDQM a je nižší než $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$, u kontejneru pro skladování LPMT (Obr. č. 31) je dodrženo

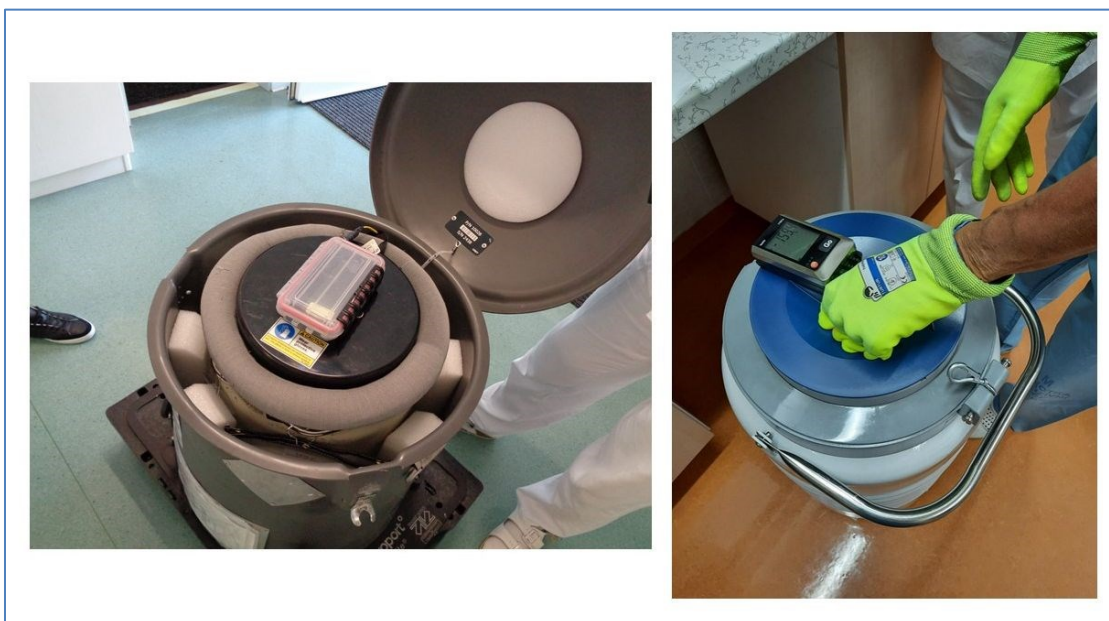
požadavek FDA a je nižší než $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při skladování hotových LPMT je vyloučen kontakt skladovaných vzorků s kapalnou fází dusíku, jak požadují jejich výrobci.



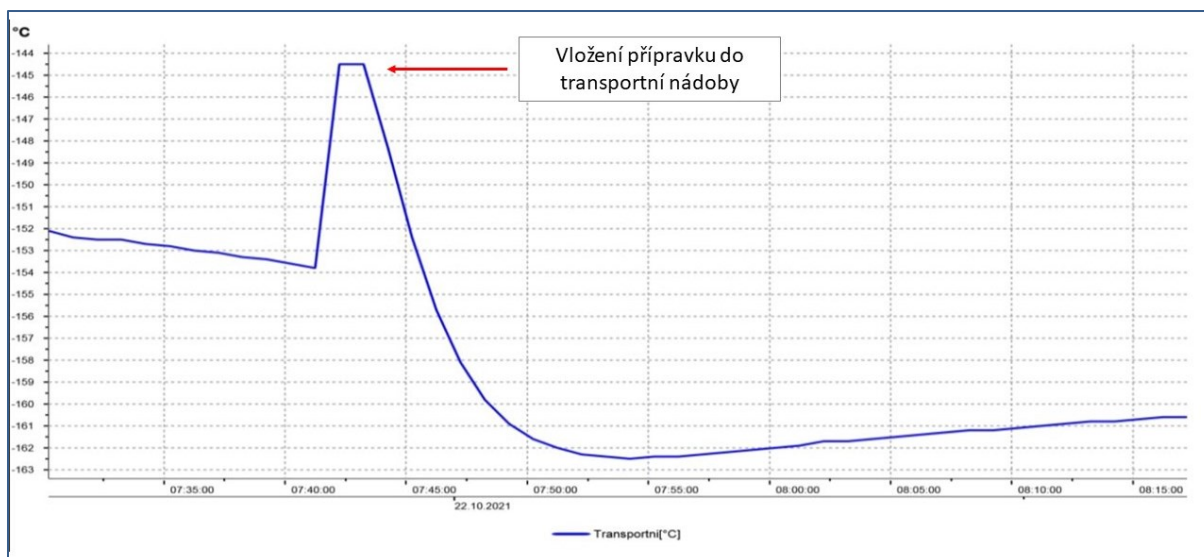
Obr. č. 33: Operační validace kryokontejneru pro skladování LPMT autorizovanou firmou.

Část 5 – Splnění speciálních požadavků na transport a rozmrazování registrovaných a hodnocených geneticky modifikovaných přípravků moderní terapie

Transport kryokonzervované výchozí suroviny na místo výroby, obvykle v západní Evropě nebo v USA, a zpětný transport hotového LPMT do místa použití je prováděn v pokročilých transportních nádobách „dry shipperech“ vybavených telemetrickým sledováním teploty během transportu. Transport LPMT z místa uložení v rámci nemocnice na příslušnou kliniku je prováděn v jednodušších „dry shipperch“ vybavených „datalogery“ při teplotě skladování doporučené výrobcem, teplota během transportu musí být monitorována. V obou případech jsou k dispozici SW na vyhodnocení případných teplotních odchylek, které se mohly vyskytnout během transportu. Na Obr. č. 34 je transportní nádoba (dry shipper), v které transportujeme LPMT z kryokonzervačního skladu Tkáňové ústředny na Transplantační oddělení IV. Interní hematologické kliniky. Teplotní průběh transportu je kontinuálně monitorován pomocí teplotního „dataloggeru“. Přípravek je transportován v parách kapalného dusíku. Před zahájením transportu se nádoba naplní kapalným dusíkem a těsně před vložením přípravku se obsah nádoby vylije. Teplotní záznam transportu je na Obr. č. 35. Šipka označuje moment vložení přípravku do nádoby, kdy teplota v důsledku otevření nádoby stoupne. Záznam na Obr. č. 34 ukazuje, že je splněn požadavek FDA a teplota během transportu je pod hodnotou -150°C .



Obr. č. 34: Dva různé typy nádob určených pro transport LPMT v parách kapalného dusíku.



Obr. č. 35: Teplotní záznam z transportu LPMT v transportní nádobě (dry-shipperu).

Léčivé přípravky moderní terapie, stejně jako minimálně manipulované produkty buněčné terapie, rozmrazujeme ve vodní lázni temperované na $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (Obr. č. 36). Po kontrole identifikačních údajů přípravku se otevře kovová kazeta, vyjme se kryovak s kryokonzervovaným LPMT a ponoří se do vodní lázně. Vak se nesmí při rozmrazování ohýbat. Rozmrazení probíhá na základě vizuální kontroly do doby vymizení ledu. Po ukončení rozmrazení je pomocí nůžek otevřen sekundární obal a přítomná sestra vyjme opatrně primární vak a obsah vaku je infundován pacientovi. V případě podání více vaků se tyto rozmrazují postupně jeden po druhém, vždy po skončení podání předchozího vaku. Ještě před rozmrazením každého vaku se provede kontrola, zda údaje na štítku vaku odpovídají údajům pacienta. Na rozdíl od aplikace minimálně manipulovaných produktů buněčné terapie se u těchto typů přípravků neprovádí kontrola koncentrace buněk, jejich vitality ani kontrola sterility přípravku. Rovněž se neprovádí odmývání DMSO.



Obr. č. 36: Rozmrazování LPMT ve vodní lázni na Transplantačním oddělení IV. Interní hematologické kliniky.

V Tab. č. 34 je uvedena analýza rizik pro příjem a uložení léčivého přípravku, jeho výdej a rozmrazení. Z uvedených výsledků vyplývá, že nebyla překročena hraniční hodnota RPN 125, navržené postupy jsou funkční a nevyžadují nápravná opatření.

Tab. č. 34: Analýza rizik pro příjem a uložení léčivého přípravku v Tkáňovém zařízení, jeho výdej a následné rozmrazení před vlastním podáním metodou FMEA

Prvek	Možná vada	Možné následky vady	Význam	Možné příčiny	Výskyt	Stávající opatření pro prevenci	Stávající řízení návrhu - odhalování	Odhaltitelnost	Rizikové číslo
Příjem materiálu v TZ	Transportní dry shipper je viditelně poškozen	Vliv na jakost a bezpečnost přípravku	6	Poškození během přepravy	1	Kontrola neporušenosti nádoby	Vizuální kontrola	1	6
Náhodný vliv	ID na dry shipperu se neshoduje s ID dárce/příjemce v dokumentaci	Riziko záměny	10	Chyba na straně výrobce	1	Kontrola údajů na příjmu - check list	Kontrola údajů – check list	1	10
	Kazeta s produktem viditelně poškozena	Riziko záměny	10	Chyba na straně výrobce	2	Kontrola údajů na příjmu - check list	Vizuální kontrola	1	20
	Primární vak viditelně poškozen	Riziko záměny	10	Poškození během přepravy	2	Kontrola údajů na příjmu - check list	Vizuální kontrola	1	20
	Údaje na štítku přípravku nesouhlasí s dokumentací	Komplikace při identifikaci dárce/příjemce	3	Chyba na straně výrobce	1	Kontrola údajů na příjmu - check list	Vizuální kontrola	1	3
	Dárce nevyhovuje v předepsaných testech	Ohrožení pacienta reinfekcí	10	Infekce v době odběru	1	Kontrola údajů na příjmu - check list	Kontrola dokumentace	1	10
	Vak není v sekundárním obalu	Riziko mechanického poškození vaku	6	Chyba na straně výrobce	5	Kontrola vaku na příjmu - check list	Vizuální kontrola	1	30
	Vak nedodán v termoboxu	Riziko snížení vitality buněk	6	Chyba na straně výrobce	1	Kontrola při převzetí - check list	Vizuální kontrola	1	6
	Není přítomno chladičí médium při transportu	Vliv na jakost a bezpečnost přípravku	10	Chyba na straně výrobce	3	Kontrola při převzetí - check list	Vizuální kontrola	1	30
Lidský faktor	Nedodržení pracovního postupu pro příjem	Riziko záměny	10	Lidský faktor	3	Kontrola údajů na příjmu - check list, školení v SPP	Proškolení pracovníků	2	60

Uložení materiálu	Neuložení materiálu	Znehodnocení konečného produktu	10	Lidský faktor	1	Pravidelné proškolení v SPP	Kontrola „4 očí“	1	10
Lidský faktor	Nezapsání pozice uskladnění	Obtížná dohledatelnost produktu	6	Lidský faktor	1	Pravidelné proškolení v SPP	Prospektivní validace uložených dat	1	6
Technika	Porucha skladovacího kontejneru	Ohrožený skladovaných produktů	10	Selhání techniky	4	Pravidelná údržba, validace a BTK autorizovanou firmou	Centrální monitoring teplot, hladin dusíku	1	40
Výdej a transport	Záměna produktů určených k podání	ohrožení zdraví pacienta	10	Lidský faktor	1	kontrola 4 očí při vzjmutí z kontejneru, 2. kontrola 4 očí na oddělení před podáním	Kontrol „4 očí“	1	10
Lidský faktor									
Transport na IV. IHK	Porušení teplotního řetězce při transportu z TZ na IV. IHK	Pokles vitality buněk	7	Lidský faktor	1	Pravidelné školení v SPP, transport v dryshipperu	Teplotní záznam na dataloggeru	1	7
Rozmrazení	Primární vak je viditelně poškozen	hrozí únik obsahu do sekundárního vaku	10	Náhodný vliv	1	Pravidelné školení v SPP	Vizuální kontrola	4	40
Náhodný vliv Lidský faktor	Přípravek nemá sekundární obal	hrozí únik obsahu primárního vaku do lázně	5	Chyba výrobce	10	Primární vak je umístěn před započítím rozmrazování do sekundárního vaku	Vizuální kontrola	1	50
	Prasknutí primárního vaku	hrozí únik obsahu primárního vaku do lázně	10	Náhodný vliv/lidský faktor	1	Pravidelné školení v SPP	Vizuální kontrola	4	40

5. DISKUSE

5.1 Opatřování a kryokonzervace výchozí suroviny pro výrobu LPMT Kymriah

Z počátku byla výroba LPMT omezena na menší výrobní zařízení, ale s postupem času se prosadil trend výrobu LPMT centralizovat (18). Je tedy nezbytně nutné, aby původ, složení a specifikace LPMT, výrobní proces, metody kontroly kvality byly sladěny mezi regulačními agenturami a výrobcí LPMT. Problémem je nesourodost v používaných materiálech třídy GMP/SVP a dodržování zásad SVP v buněčných a tkáňových bankách, resp. tkáňových zařízeních uchovávajících výchozí suroviny, což vede k nezajištění konzistence, bezpečnosti a čistoty konečných LPMT. Tento problém je jistě zčásti způsoben rozdílymi nároky na systém jistění jakosti v tkáňových zařízeních, resp. různou interpretací existujících pravidel obsažených v direktivách EU v jednotlivých členských zemích a striktním vyžadováním aplikace zásad GMP/SVP výrobcí LPMT. Řešení tohoto problému by měla napomoci aplikace již existujících doporučení Evropského direktoriátu pro kvalitu léčiv pro jistění kvality v tkáňových zařízeních (138), která zahrnují řadu zásad SVP platných ve výrobě léčiv (179,185). Dalším problémem je mnohdy kratší doba použitelnosti produktů buněčné terapie ve srovnání s jinými biologickými látkami, což činí tyto produkty obzvláště náchylnými k poškození během přepravy. Jedním z takových příkladů je přípravek Holoclar, kde výrobce musí obdržet biopsie pacienta do 24 hodin a který má pouze 36ti hodinovou trvanlivost (55). Kryokonzervace výchozí suroviny za podmínek SVP je jistě v takových případech vhodným řešením. Alternativou jsou nová média umožňující prodloužit skladovatelnost výchozích surovin v nadnulových teplotách.

V současnosti dominuje manuální výroba LPMT, která se omezuje na maloobjemové nádoby (ampule, kryovaky malého objemu). Takový přístup zvyšuje celkové výrobní náklady a vede k problémům s kvalitou a konzistencí, v neposlední řadě dostupnosti vyškolených pracovníků. Cílem je automatizace výroby, zajištění standardizace a reprodukovatelnosti výrobních procesů a s tím spojené snížení výrobních nákladů (60).

Na druhé straně centralizace výroby vedla u autologních přípravků somatobuněčné terapie ke značnému zvýšení nákladů spojených s centrální registrací, takže výsledný počet registrovaných přípravků je překvapivě malý (Tab č. 5). Navíc vzhledem k vysoké ceně nebyl o některé z nich zájem, takže byly nakonec staženy z trhu. Příkladem úspěšné centralizované výroby s dlouhodobou perspektivou jsou autologní geneticky modifikované LPMT. Jde o terapii

založenou na chimérických antigenních receptorech T-lymfocytů (CAR-T), která představuje novodobý převratný typ léčby řady hematologických onemocnění. Pro odběr a zejména kryokonzervaci výchozí suroviny (mononukleární buňky) pro výrobu LPMT vyvstávají 2 zásadní otázky: (1) zda a do jaké míry tyto procesy ovlivňují výrobu a účinnost konečného produktu CAR-T, (2) jak ovlivňují následné přetrvávání CAR-T v organismu po podané infuzi. Kryokonzervační protokoly pro CAR-T využívají pomalé kontrolované zmrazování, jako kryoprotektivum se nejčastěji používá DMSO. Jako sekundární kryoprotektivum se často používá hydroxyethylškrob (HES) (obvykle v koncentraci do 6 %) a lidský sérový albumin (obvykle do 5 %). Jako další komponenty se používají roztoky elektrolytů (nejčastěji Plasma-Lyte A, X-Vivo, Normosol nebo fyziologický roztok), což umožňuje snížení obsahu DMSO na 6,5 – 7,5 % (13,148,186,187). V našem tkáňovém zařízení využíváme pouze CE certifikované materiály, nebo registrovaná léčiva, zpracování probíhá v čistých prostorách, ve třídě čistoty A (laminární box / stůl s laminárním stropem) s pozadím B. Zmrazování probíhá v programovatelném zařízení pomalým ochlazováním, nejprve rychlostí 1 °C/min do –90 °C a poté rychlostí 5 °C/min do –150 °C, což je srovnatelné s jinými autory (188). Zvolený kryokonzervační režim byl odvozen od dlouhodobě používaného protokolu pro konzervaci lymfocytů dárce (189), který zajišťuje vysokou vitalitu buněk po rozmrazení i vysokou výtěžnost mononukleárních buněk a CD3⁺ buněk (Tab č. 18). První zkušenosti s kryokonzervací pro výrobu ukázaly, že proces je dobře nastaven, což umožňuje úspěšnou následnou výrobu a tím i použitelnost hotového přípravku. První zkušenosti rovněž ukázaly plnou funkčnost nového vybavení pro skladování kryokonzervovaných registrovaných nebo hodnocených geneticky manipulovaných LPMT v kryokontejnerech, které jsou pravidelně validované autorizovanými firmami, v parách dusíku. Alarmové stavy se ani během skladování, ani během transportu LPMT nevyskytly.

Podářilo se i splnit podmínky stanovené povolením MŽP pro zacházení s GMO, které bylo našemu pracovišti vydáno. Během dalšího provozu bude nutno skladovací prostory a zařízení rovněž ve stanovených intervalech monitorovat na výskyt GMO molekulárně-biologickými metodami pomocí speciálně navržených primerů.

5.2 Kryokonzervace hodnoceného LPMT na bázi hMSCs

V současné době jsou klinické aplikace neregistrovaných LPMT na bázi kmenových buněk omezeny na klinická hodnocení registrovaná EMA, schválená a kontrolovaná příslušným vnitrostátním orgánem (SÚKL). To vyžaduje, aby všechna zařízení účastníci se klinických

hodnocení vlastnila příslušná schválení pro takové činnosti, jako je odběr buněk lidského původu (tkáňová zařízení), sérologické testování dárců (diagnostické laboratoře), výroba LPMT (výrobci LPMT) nebo testování léčivých přípravků (kontrolní laboratoře). Všechny manipulace s otevřenými produkty, včetně jejich bakteriologické kontroly, musí být prováděny ve třídě čistoty A s pozadím třídy B, zatímco s uzavřenými vzorky lze manipulovat v prostředí třídy čistoty C (122).

V naší studii (Eudra CT:2016-000926-21) byla značná variabilita v celkovém množství shromážděných WBC ($0,766 - 1,258 \times 10^8$), která byla také vyjádřena v mononukleární frakci ($0,262 - 0,473 \times 10^8$) (Tab. č. 19). Tato variabilita nezpůsobila žádné selhání klinické aplikace, ale vedla ke značnému omezení počtu buněk dostupných pro použití v experimentech (Tab. č. 21 a č. 22). Z tohoto důvodu jsme mohli provést testování klonogenity pouze ve dvou případech a rovněž pouze ve 2 případech použít kryoprotektivum neobsahující DMSO (Obr. č. 16).

Silnou stránkou naší technologie je udržování vysoké úrovně bezpečnosti kryokonzervovaného produktu, což je zajištěno výhradním používáním registrovaných léků, zdravotnických prostředků s certifikátem CE a absencí jakýchkoli složek živočišného původu. Kvalita aseptické práce během „sklizně“ buněk a všech výrobních kroků byla také potvrzena absencí jakýchkoli nálezů nesterility, jak ve shromážděném výchozím materiálu, tak v kryokonzervovaném ATMP, a absencí mykoplazmat v kryokonzervovaném produktu. Další výhodou je, že jsme mohli použít konvenční programovatelné mrazicí zařízení, které chladí kapalným dusíkem a bylo umístěno do prostředí třídy C. To je v kontrastu s tvrzením některých autorů (190), že pro kryokonzervaci LPMT nejsou zařízení pracující na bázi vstřikování par kapalného dusíku do mrazicí komory přístroje vhodná. Naše technologie vedla k vývoji kryokonzervovaných produktů hMSC, které kvalitativně odpovídají parametrům léčivých přípravků získaných z nativních (čerstvých) buněk. Naše výsledky v případech použití DMSO jako kryoprotektiva ukazují, že popsáná technologie je vhodná pro produkci LPMT, protože umožňuje buňkám udržovat své fenotypové vlastnosti a životaschopnost na standardech vyhovujících SVP. Výsledky testování klonogenity ukázaly snížení repopulační potence buněk ve druhé pasáži po rozmrazení, což by mohlo být výrazem výskytu fenoménu oddálené buněčné smrti popisované Baustem (141). Překvapivě vysoká byla i vitalita a čistota buněk při použití kryoprotektiva bez DMSO (Tab. č. 26), tyto výsledky by ovšem bylo nutné potvrdit na větším souboru.

Někteří autoři uvádějí protichůdné výsledky týkající se pozitivního nebo negativního imunozačení (44). Při stanovení fenotypu jsme vycházeli z faktu, že hMSCs musí na svém buněčném povrchu vykazovat přítomnost CD-105, CD-73 a CD-90 znaků a musí být negativní

pro CD-45, CD-34, CD-14, CD-19 a HLA-DR znaky. Životaschopnost po rozmrazení dosažená v naší studii byla srovnatelná s výsledky skupiny Kotobuki et al., 2005 (48).

Nevýhodou naší práce je nízký počet pacientů zahrnutých do studie. Naše výsledky však ukazují, že je možné připravit LPMT s vysoce kvalitními parametry a silným potenciálem pro použití v budoucích klinických studiích. Další výzkum by měl být zaměřen na optimalizaci složení média, ve kterém hMSC mohou zůstat stabilní po dobu nejméně 24 hodin po rozmrazení a eliminaci DMSO.

Technologie kryokonzervace prezentovaná v této práci může pomoci řešit situace, kdy pacient není schopen podstoupit operaci v přesný okamžik, kdy je finální produkt hMSC připraven k aplikaci. Za těchto okolností představuje kryokonzervovaný LPMT nový produkt schopný uchovat jedinečný materiál pro opožděnou transplantaci. Klinické použití námi vyvinutého přípravku by však mohlo probíhat pouze v rámci navazující klinické studie nebo v rámci nemocniční výjimky pro použití neregistrovaného přípravku.

5.3 Odmývání DMSO v suspenzi kryokonzervovaných autologních periferních kmenových buněk (HPCs)

U prvních autologních transplantací krvetvorných buněk ještě před začátkem pravidelného hematologického transplantačního programu ve FN HK byl jako kryoprotektivum používán glycerol (191,192), později se přešlo na použití DMSO a standardně bylo prováděno jeho odmytí. Od počátku roku 1994 bylo rutinní odmytí DMSO zastaveno a řídili jsme se již tehdy v zahraničí aplikovaným pravidlem, že denní dávka DMSO na kg hmotnosti příjemce nemá přesáhnout 1 g. Přesto přetrvávaly v ČR o jeho klinickém použití určité pochybnosti, především s ohledem na kvalitu produktu (193). Pochybnosti byly odstraněny plným akceptováním použití DMSO ze strany SÚKL v r. 1996. Pokud dávka přesahovala doporučenou hodnotu, byly infuze rozděleny do několika dnů (193).

V současné době existují nové trendy, jejichž cílem je buď nalézt jiné, stejně účinné kryoprotektivní roztoky, nebo alespoň riziko nepříznivých reakcí snížit (145). Obecně se uvádí pravidlo „tři R“ – Replace, Reduce, Remove (144). Jedná se například o hledání vhodných kombinací s dlouhodobě známými, ovšem samostatně méně účinnými, kryoprotektivy jako jsou ethylenglykol, hydroxycelulóza, sacharóza, maltóza, trehalóza a také některé makromolekuly (dextran, polyvinylpyrrolidon atd.) (134). Pro vlastní odmytí DMSO po rozmrazení jsou k dispozici automatické promývací systémy pracující v uzavřeném systému. Ve srovnání s klasickým ručním odmytím DMSO je jejich výhodou vysoká životaschopnost

hematopoetických buněk a minimální riziko mikrobiální kontaminace. Nevýhodou je vysoká cena zařízení (134,169,171,172).

Naše předchozí studie provedené u pacientů s mnohočetným myelomem, kteří podstoupili autologní transplantaci, prokázaly, že dávky DMSO na kg aplikované při transplantaci v jsou naprosté většině případů hluboce pod maximální povolenou denní dávkou (178). Problém představují občas se vyskytující špatně mobilizovatelní pacienti, u nichž je transplantační dávku nutné dělit do dvou po případě více dnů.

Odmývání DMSO po rozmrazení provádíme pouze u pacientů se známým vyšším rizikem arytmií, což jsou především pacienti s primární nebo sekundární amyloidózou myokardu nebo u pacientů, u nichž hrozí akumulace DMSO v organismu z důvodu selhání ledvin (Tab. 13). To je důvod, proč za posledních 5 let bylo na našem pracovišti odmyto DMSO pouze u 13 pacientů. Tři pacienti trpěli primární amyloidózou, 10 pacientů sekundární amyloidózou jako komplikace u mnohočetného myelomu. Pouze v jednom případě nebylo odstranění DMSO plánováno a bylo provedeno v naléhavé situaci u pacienta s těžkou nežádoucí reakcí po zahájení infuze rozmraženého koncentrátu. Potvrdili jsme, že odstranění DMSO promytím buněk vede k významnému poklesu vitality mononukleárních buněk a dávky CD34⁺ buněk na kg hmotnosti příjemce, což je dokladují Tab. č. 29 a 30 a že výsledky procesu odmytí i celého procesu vykazují velké individuální rozdíly (Obr. č. 26 a 27). Snížení vitality může být projevem kryokonzervací vyvolané oddálené buněčné smrti. Naše výsledky potvrzují, že odmývání by mělo být omezeno pouze na indikované případy, což je v souladu s doporučením EDQM, 2019 (138). Podání tohoto produktu nese i další rizika spočívající v nedokončených testech sterility, jejichž výsledky jsou známy až po aplikaci přípravku. Toto riziko je ovšem minimální, pokud je manipulace s rozmrazeným přípravkem prováděna ve třídě čistoty A s pozadím B (Obr. č. 6).

Naše výsledky recovery procesu zmrazení – rozmrazení ve skupině CD34⁺ jsou srovnatelné s výsledky skupiny Yang et al., 2005 (183), kteří stanovili v procesu zmrazení/rozmrazení medián výtěžnosti vitálních CD34⁺ buněk 66,4 % (36,1–93,6 %) a CFU-GM 63,0 % (28,6–85,7 %).

5.4 Skladování výchozích surovin pro výrobu LPMT a hotových registrovaných nebo hodnocených LPMT

Při dodání geneticky modifikovaných LPMT propuštěných pro klinické použití existuje možnost jejich krátkodobého skladování v „dry shipperech“ kurýrních společnostech a co

nejrychlejší aplikace pacientovi. Tento postup však s sebou nese riziko znehodnocení přípravku v případě zjištění neočekávané komplikace u příjemce, která podání v plánovaný čas vylučuje. Toto riziko lze významně snížit je-li přípravek možno skladovat v kryoskladu zdravotnického zařízení, který ovšem musí splňovat podmínky stanovené výrobcem LPMT a kompetentními autoritami (viz kapitola 1.5). Vzhledem k požadavku na striktní vyloučení kontaktu kazety s kryokonzervovaným produktem s kapalnou fází dusíku, jsme zvolili skladování v kontejneru na základě dry technologie. Vhodně se nám podařilo vyřešit způsob vnitřního uspořádání v kontejneru, kdy je vyžadováno, aby každý typ přípravku měl k dispozici vlastní rám (194). To ovšem komplikuje skutečnost, že velikosti kazet od různých výrobců se liší a rámy tak některá pracoviště dávají zhotovovat na míru pro každý typ přípravku zvlášť. Problém jsme vyřešili využitím další zevní kazety ze standardního skladovacího systému Taylor Wharton (USA), do níž lze vložit kazety různých rozměrů.

5.5 Transport a rozmrazování LPMT

Standardem pro transport při ultranízkých teplotách je přenosný „dry shipper“, který se plní kapalným dusíkem a těsně před samotným transportem se nádoba vyprázdní. Validací jsme ověřili, že po vylití kapaliny nádoba drží teplotu ≤ -150 °C až po dobu 10 dní. Požadavky na teplotu transportu LPMT se liší u jednotlivých výrobců v rozsahu -120 °C až -150 °C, přičemž se požadavky na teplotu skladování a transport přípravku liší u evropských a amerických výrobců LPMT. Zatímco v EU, vč. Švýcarska, postačí teploty pod -120 °C, američtí výrobci se řídí požadavkem FDA, který stanovil maximální teplotu skladování a transportu LPMT na -150 °C a schopnost spolupracujícího pracoviště tyto podmínky dodržet ověřují předcertifikačním auditem. Obrázky č. 31 a č. 32 dokládají, že se nám podařilo tyto podmínky splnit.

Ačkoliv některá pracoviště využívají metodu suchého rozmrazování při definované teplotě (158), standardem zatím zůstává rozmrazování ve vodní lázni temperované na 37 °C \pm 1 °C. Léčivé přípravky jsou rozmrazovány ve dvojbalu (prevence úniku osahu kryovaku do vodní lázně) (195). V našich podmínkách se plně osvědčilo vložení kryovaku s LPMT do zevního sterilního obalu Steriking (Obr. č. 36), což je metoda, která byla dlouho používána při rozmrazování minimálně manipulovaných krvetvorných buněk.

6. ZÁVĚRY

V posledních pěti letech prodělalo využití kryokonzervačních metod ve výrobě LPMT rychlý rozvoj.

Ještě v letech 2016–2018 byla kryokonzervace vyžívána především jako pojistka pro případ selhání výrobního procesu. Pro dopravu výchozí suroviny do místa výroby a hotového přípravku na místo použití byla preferována hypotermní konzervace. Kryokonzervace byla obecně vnímána jako možná, ale až zbytečně komplikovaná varianta. Podobně byly spíše výjimkou kryokonzervované hotové LPMT.

V současné době jsou kryokonzervované hotové LPMT již běžně výrobci distribuovány a jsou oceňovány i výhody kryokonzervace základní suroviny umožňující prodloužení její trvanlivosti a rozšíření možností plánování výroby LPMT

U extrémně drahých LPMT pro CAR-T schválených k použití v EU teprve v roce 2018 navíc představuje kryokonzervace významný prostředek proti jejich znehodnocení v důsledku zdržení transportu nebo neočekávané indispozice pacienta.

Pro pracoviště provádějící dočasné skladování kryokonzervovaných hotových registrovaných nebo hodnocených LPMT to ovšem představuje nutnost dosáhnout plné technologické kompatibility s požadavky jejich výrobců.

Při řešení problematiky jsem splnila dílčí cíle disertační práce.

6.1 Opatřování a kryokonzervace výchozí suroviny - pro výrobu LPMT Kymriah

Samostatně jsem zpracovávala výchozí suroviny pro výrobu LPMT, provedla vyhodnocení a zpracovala podklady nutné pro schválení SÚKL.

6.1.1 Zhodnocení odběru nemobilizovaných mononukleárních buněk

Na přístroji Spectra Optia byla naseparována buněčná suspenze mononukleárních buněk. Ve všech případech postačila jedna separace o objemu 140 ml k dosažení dostatečného počtu jaderných buněk i % CD3⁺ buněk. S výjimkou jednoho případu nebylo splněno požadované kritérium výrobce na iniciální koncentraci jaderných buněk. V těchto případech by bylo nutné separovanou suspenzi před kryokonzervací koncentrovat centrifugací (Tab. č. 14). S touto eventualitou náš standardní pracovní postup pro zpracování suspenze mononukleárních buněk počítá. Vyšetření sterility bylo ve všech případech s výsledkem: „Sterilní“.

6.1.2 Zhodnocení kryokonzervace mononukleárních buněk

Výsledky potvrzují úspěšnost kryokonzervačního procesu. Výtěžnost vitálních jaderných, mononukleárních a CD 3+ pozitivních buněk je přibližně 75 % (Tab. č. 18) a životaschopnost (vitalita) po rozmrazení nad 90 % (Tab. č. 17).

Na základě výsledků prospektivní analýzy odebraných koncentrátů mononukleárních buněk a kryokonzervovaných mononukleárních buněk bylo Tkáňovému zařízení FN HK (CZ000426) uděleno povolení SÚKL pro opatřování mononukleárních buněk pro výrobu LPMT.

6.2 Kryokonzervace hodnoceného LPMT na bázi hMSCs

Samostatně jsem provedla zpracování a kryokonzervaci hodnoceného léčivého přípravku na bázi hMSCs, vyhodnocení parametrů CFU-GM ve výchozí surovině – kostní dřeni a samostatně jsem určila počet buněk pomocí trypanové modři. Ve spolupráci s kolegy Fakulty vojenského zdravotnictví jsem pracovala na stanovení klonogenity kryokonzervovaných hMSCs. Samostatně jsem provedla validaci aseptického zpracování (media fill), vč. aeroskopie a kontinuálního měření a vyhodnocení počtu částic.

V rámci probíhající klinické studie ve spolupráci s Ortopedickou klinikou FN se nám podařilo úspěšně navrhnout protokol pro kryokonzervaci hMSCs. Zvolenou metodou jsme dosáhli u kryokonzervovaných buněk vysoké životaschopnosti (vitality) převyšující v průměru 90 % (průměr 93 %) při stanovení životaschopnosti pomocí trypanové modře a průtokové cytometrie. Po rozmrazení, buňky odpovídající fenotypu hMSCs (CD105⁺, CD73⁺, CD90⁺, MHC I⁺, CD14⁻, CD45⁻ a CD34⁻) dosahovaly zastoupení ≥ 90 % v polovině případů (3 pacienti), v ostatních případech bylo průtokovou cytometrií stanoveno zastoupení 67 – 85 %. Fenotypové hodnoty byly porovnány s hodnotami v suspenzi čerstvých buněk. Výsledky považujeme za uspokojivé. Vzhledem k možné toxicitě použitého kryoprotektivního roztoku je třeba před vlastním podáním kryoprotektivum odmýt. Naše výsledky by bylo všem možno v praxi využít pouze v rámci navazující klinické studie.

6.3 Studie Odmývání DMSO v suspenzi kryokonzervovaných autologních periferních kmenových buněk (HPCs)

V rámci retrospektivní studie provedené u pacientů indikovaných k autologní transplantaci periferními progenitorovými buňkami jsem vyhodnotila parametry krevního

obrazu, výsledky průtokové cytometrie a CFU-GM. U řady pacientů jsem samostatně provedla kryokonzervace, vč. samotného odmytí DMSO. Dospěla jsem k závěru, že ve skupině jaderných buněk jsou k procesu odmytí DMSO nejcitlivější právě progenitorové CD34⁺ buňky, kdy výtěžnost (dávka CD34⁺/kg) po odmytí významně klesá. Potvrzuje to fakt, že indikace k odmytí by měla být jen ve vyhraněných případech. Dále jsem potvrdila korelaci mezi hladinou CD34⁺ a CFU-GM v souladu s výsledky vědecké práce Yang H. et al., 2005. Z uvedeného vyplývá, že před samotným podáním přípravku by měly být známy zároveň výsledky CFU-GM, protože optimální hladiny CFU-GM jsou podkladem pro úspěšné přihojení štěpu.

6.4 Skladování, transport a rozmrazování registrovaných LPMT

Výsledkem této části bylo vypracování a praktické ověření postupů odpovídajících současným nárokům výrobců geneticky manipulovaných LPMT, což byla jedna z nezbytných podmínek zahájení klinického programu CAR-T terapie ve FN HK.

7. Seznam citací použité literatury

1. Hanna E, Rémuzat C, Auquier P, Toumi M. Advanced therapy medicinal products: current and future perspectives. *J Mark Access Health Policy*. 2016;4.
2. Lysák D. Imunoterapie pomocí CAR T-lymfocytů. *Onkologie*. 2015;9(1):13–8.
3. Lukjanov V, Koutná I, Šimara P. CAR T-Cell Production Using Nonviral Approaches. Ponce-Soto LA, editor. *J Immunol Res*. 27. březen 2021;2021:1–9.
4. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell*. listopad 1975;6(3):331–43.
5. Matousková E, Veselý P, Königová R. Modified method of in vitro cultivation of human keratinocytes suitable for grafting. *Folia Biol (Praha)*. 1989;35(4):267–71.
6. Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. Permanent Coverage of Large Burn Wounds with Autologous Cultured Human Epithelium. *N Engl J Med*. 16. srpen 1984;311(7):448–51.
7. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. *N Engl J Med*. 6. říjen 1994;331(14):889–95.
8. Kočí Z, Boráň T, Krůpa P, Kubinová Š. The Current State of Advanced Therapy Medicinal Products in the Czech Republic. *Hum Gene Ther Clin Dev*. září 2018;29(3):132–47.
9. Boráň T. Zákonné normy pro materiály pro tkáňové inženýrství [Internet]. 2016 [citován 11. březen 2021]; Praha. Dostupné z: https://nanoed.tul.cz/pluginfile.php/6663/mod_resource/content/012_Z%C3%AAlkonn%C3%A9%20normy%20pro%20materi%C3%AAly%20pro%20tk%C3%AAl%C5%88ov%C3%A9%20in%C5%BEen%C3%BDrstv%C3%AD.pdf
10. Boráň T. Léčivé přípravky pro moderní terapii (LPMT) [Internet]. 2019 [citován 26. květen 2020]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/161038025-2019-statni-ustav-pro-kontrolu-leciv.html>
11. Šponer P, Filip S, Kučera T, Brtková J, Urban K, Palička V, et al. Utilizing Autologous Multipotent Mesenchymal Stromal Cells and β -Tricalcium Phosphate Scaffold in Human Bone Defects: A Prospective, Controlled Feasibility Trial. *BioMed Res Int*. 2016;2016:2076061.
12. Šponer P, Kučera T, Brtková J, Urban K, Kočí Z, Měřička P, et al. Comparative Study on the Application of Mesenchymal Stromal Cells Combined with Tricalcium Phosphate Scaffold into Femoral Bone Defects. *Cell Transplant*. říjen 2018;27(10):1459–68.
13. Jandová M, Šponer P, Vokurková D, Bauer PO, Filipová A, Filip S, et al. New Cryopreservation Technology of hMSCs: First Preclinical Results Using DMSO-containing Medium. *Cryo Letters*. únor 2020;41(1):50–6.

14. Evropský parlament a rada. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1394/2007 o léčivých přípravcích pro moderní terapii a o změně směrnice 2001/83/ES a nařízení (ES) č. 726/2004. 1394/2007 lis 13, 2007.
15. Aljurf MD, Snowden JA, Hayden P, Orchard KH, McGrath E, Joint Accreditation Committee of EBMT and ISCT. Quality management and accreditation in hematopoietic stem cell transplantation and cellular therapy: the JACIE Guide [Internet]. 2021 [citován 25. květen 2022]. Dostupné z: <https://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=6483075>
16. Seoane-Vazquez E, Shukla V, Rodriguez-Monguio R. Innovation and competition in advanced therapy medicinal products. *EMBO Mol Med* [Internet]. březen 2019 [citován 8. červen 2022]; 11(3). Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/emmm.201809992>
17. Pudil R, Vojádek J, Filip S, Mericka P, Sřásek J, Straková H, et al. Transplantation of bone marrow derived progenitor cells in acute myocardial infarction. The first results. *Acta Medica (Hradec Kralove)*. 2005;48(3–4):153–5.
18. Eder C, Wild C. Technology forecast: advanced therapies in late clinical research, EMA approval or clinical application via hospital exemption. *J Mark Access Health Policy*. 2019;7(1):1600939.
19. European Medicine Agency. Imlygic [Internet]. Imlygic. 2022 [citován 8. červen 2022]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/imlygic-epar-product-information_en.pdf
20. European Medicine Agency. Strimvelis [Internet]. Strimvelis. 2022 [citován 8. červen 2022]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/strimvelis-epar-product-information_en.pdf
21. European Medicine Agency. Zalmoxis [Internet]. Zalmoxis. 2020 [citován 8. červen 2022]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zalmoxis-epar-product-information_en.pdf
22. European Medicine Agency. Kymriah [Internet]. Kymriah. 2018 [citován 8. červen 2022]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/kymriah-epar-product-information_en.pdf
23. European Medicine Agency. Yescarta [Internet]. Yescarta. 2022 [citován 8. červen 2022]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/yescarta-epar-product-information_en.pdf
24. European Medicine Agency. Tecartus [Internet]. Tecartus. 2021 [citován 8. červen 2022]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/tecartus-epar-product-information_en.pdf
25. European Medicine Agency. Luxturna [Internet]. Luxturna. 2021 [citován 8. červen 2022]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/luxturna-epar-product-information_en.pdf

26. European Medicine Agency. Zynteglo [Internet]. Zynteglo. 2021 [citován 8. červen 2022]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zynteglo-epar-product-information_en-1.pdf
27. European Medicine Agency. Zolgensma [Internet]. Zolgensma. 2021 [citován 8. červen 2022]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/zolgensma-epar-product-information_en.pdf
28. European Medicine Agency. Libmeldy [Internet]. Libmeldy. 2021 [citován 8. červen 2022]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/libmeldy-epar-product-information_en.pdf
29. Centre for Advanced Medicinal Products (CAMP). Centre for Advanced Medicinal Products [Internet]. Centre for Advanced Medicinal Products (CAMP). 2018 [citován 12. říjen 2020]. Dostupné z: <https://atmpsweden.se/camp-2/camp/>
30. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol.* srpen 2000;28(8):875–84.
31. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* srpen 2001;44(8):1928–42.
32. Matsumura K, Hayashi F, Nagashima T, Hyon SH. Long-term cryopreservation of human mesenchymal stem cells using carboxylated poly-l-lysine without the addition of proteins or dimethyl sulfoxide. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2013;24(12):1484–97.
33. Bakopoulou A, Apatzidou D, Aggelidou E, Gousopoulou E, Leyhausen G, Volk J, et al. Isolation and prolonged expansion of oral mesenchymal stem cells under clinical-grade, GMP-compliant conditions differentially affects “stemness” properties. *Stem Cell Res Ther.* prosinec 2017;8(1):247.
34. Andrzejewska A, Lukomska B, Janowski M. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: From Roots to Boost. *Stem Cells.* 1. červenec 2019;37(7):855–64.
35. Fujita Y, Nishimura M, Komori N, Sawamoto O, Kaneda S. Protein-free solution containing trehalose and dextran 40 for cryopreservation of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Cryobiology.* červen 2021;100:46–57.
36. Jovic D, Yu Y, Wang D, Wang K, Li H, Xu F, et al. A Brief Overview of Global Trends in MSC-Based Cell Therapy. *Stem Cell Rev Rep* [Internet]. 28. březen 2022 [citován 20. květen 2022]; Dostupné z: <https://link.springer.com/10.1007/s12015-022-10369-1>
37. Liu G, Shu C, Cui L, Liu W, Cao Y. Tissue-engineered bone formation with cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cryobiology.* červen 2008;56(3):209–15.
38. Dvorakova J, Hrubá A, Velebný V, Kubala L. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. *Cell Biol Int.* září 2008;32(9):1116–25.
39. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells Dayt Ohio.* květen 2006;24(5):1294–301.

40. Marquez-Curtis LA, Janowska-Wieczorek A, McGann LE, Elliott JAW. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*. říjen 2015;71(2):181–97.
41. Martins JP, Santos JM, de Almeida JM, Filipe MA, de Almeida MVT, Almeida SCP, et al. Towards an advanced therapy medicinal product based on mesenchymal stromal cells isolated from the umbilical cord tissue: quality and safety data. *Stem Cell Res Ther*. 17. leden 2014;5(1):9.
42. Mafi R, Hindocha S, Mafi P, Griffin M, Khan WS. Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications - a systematic review of the literature. *Open Orthop J*. 2011;5 Suppl 2:242–8.
43. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315–7.
44. Nery AA, Nascimento IC, Glaser T, Bassaneze V, Krieger JE, Ulrich H. Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. leden 2013;83(1):48–61.
45. Sensebé L, Gadelorge M, Fleury-Cappellesso S. Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. *Stem Cell Res Ther*. 7. červen 2013;4(3):66.
46. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep*. 28. duben 2015;35(2):e00191.
47. Chen X, Huang J, Wu J, Hao J, Fu B, Wang Y, et al. Human mesenchymal stem cells. *Cell Prolif* [Internet]. duben 2022 [citován 31. květen 2022];55(4). Dostupné z: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/cpr.13141>
48. Kotobuki N, Hirose M, Machida H, Katou Y, Muraki K, Takakura Y, et al. Viability and osteogenic potential of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal cells. *Tissue Eng*. červen 2005;11(5–6):663–73.
49. Volkova NA, Yukhta MS, Pavlovich EV, Goltsev AN. Change in Functional State of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells After Incubation with Silver Nanoparticles. In: Fesenko O, Yatsenko L, editoři. *Nanophotonics, Nanooptics, Nanobiotechnology, and Their Applications* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [citován 25. květen 2022]. s. 273–82. (Springer Proceedings in Physics; roč. 222). Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-17755-3_19
50. European Medicine Agency. Holoclar [Internet]. Holoclar. 2021 [citován 8. červen 2022]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/holoclar-epar-product-information_en.pdf
51. European Medicine Agency. Spherox [Internet]. Spherox. 2021 [citován 8. červen 2022]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/spherox-epar-product-information_en.pdf

52. European Medicine Agency. Alofisel [Internet]. Alofisel. 2022 [citován 8. červen 2022]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/alofisel-epar-product-information_en.pdf
53. Demlová R, Součková L. Organizace plánování a hodnocení klinických studií [Internet]. 2016 kvě 23 [citován 8. srpen 2020]. Dostupné z: https://is.muni.cz/el/med/podzim2016/BMAM051/um/Organizace_planovani_a_hodnoceni_klinickych_studii_-_rev_LS_2016.pdf
54. Státní ústav pro kontrolu léčiv. Zdravotnická zařízení [Internet]. Zdravotnická zařízení. 2022. Dostupné z: <https://www.sukl.cz/zdravotnicka-zarizeni>
55. European Medicines agency. European Medicines Agency - Science Medicine Health [Internet]. European Medicines Agency - Science Medicine Health. [citován 12. říjen 2020]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines>
56. U. S Drug and Food Administration. Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) [Internet]. Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). 2021 [citován 8. červen 2022]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/about-fda/fda-organization/center-biologics-evaluation-and-research-cber>
57. European Parliament and of the Council. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. 2001/83/EC lis 6, 2001.
58. Goula A, Gkioka V, Michalopoulos E, Katsimpoulas M, Noutsias M, Sarri EF, et al. Advanced Therapy Medicinal Products Challenges and Perspectives in Regenerative Medicine. *J Clin Med Res.* 2020;12(12):780–6.
59. European Medicines Agency. European Medicines Agency - Annual report 2020, The European Medicines Agency's contribution to science, medicines and health in 2020 [Internet]. European Medicines Agency; 2020 [citován 25. květen 2022]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/annual-report/2020-annual-report-european-medicines-agency_en.pdf
60. Morrow D, Ussi A, Migliaccio G. Addressing Pressing Needs in the Development of Advanced Therapies. *Front Bioeng Biotechnol.* 2017;5:55.
61. Iglesias-Lopez C, Agustí A, Obach M, Vallano A. Regulatory Framework for Advanced Therapy Medicinal Products in Europe and United States. *Front Pharmacol.* 30. srpen 2019;10:921.
62. World Health Organization. International Clinical Trials Registry Platform [Internet]. International Clinical Trials Platform Registry. 2022 [citován 11. květen 2020]. Dostupné z: <https://www.who.int/clinical-trials-registry-platform/the-ictrp-search-portal>
63. Cynober T. Why Are There Only 11 Cell and Gene Therapies in Europe? [Internet]. LABIOTECH.eu. [citován 25. květen 2022]. Dostupné z: <https://www.labiotech.eu/in-depth/atmp-cell-gene-therapy-ema/>

64. Ministerstvo zdravotnictví ČR. Vyhláška o stanovení bližších požadavků pro zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka. 422/2008 Sb. čer 24, 2017.
65. Parlament České republiky. Zákon o zajištění jakosti a bezpečnosti lidských tkání a buněk určených k použití u člověka a o změně souvisejících zákonů (zákon o lidských tkáních a bunčkách). 296/2008 Sb. čvc 1, 2017.
66. Parlament ČR. Zákon o léčivech a o změnách některých souvisejících zákonů (zákon o léčivech). 378/2007 Sb. úno 1, 2022.
67. Rheinwald JG, Green H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature*. 3. únor 1977;265(5593):421–4.
68. Andreassi L, Casini L, Trabucchi E, Diamantini S, Rastelli A, Donati L, et al. Human keratynocytes cultured on membranes composed of benzyl ester of hyaluronic acid. *Wounds*. 1991;3:116–26.
69. Matoušková E, Bucek S, Vogtová D, Veselý P, Chaloupková A, Brož L, et al. Treatment of burns and donor sites with human allogeneic keratinocytes grown on acellular pig dermis. *Br J Dermatol*. červen 1997;136(6):901–7.
70. Arenberger P, Brož L, Veselý P, Havlíčková B, Matoušková E. Tissue -engineered skin in the treatment of vitiligo lesions. *Folia Biol (Praha)*. 2000;46:157–60.
71. Brychta P, Horký D, Havranová D, Janeček Z, Adler J. Model Skin Defects in Rats for the Composite Skin Grafts Evaluation. *Acta Vet Brno*. 1997;66(1):23–6.
72. Brychta P, Suchánek I, Ríhová H, Adler J, Komárková J. Cultured epidermal allografts for the treatment of deep dermal burns. *Acta Chir Plast*. 1995;37(1):20–4.
73. Klein L, Mericka P, Hošek F. Zajištění péče o termické úrazy na našem pracovišti. *Vojen Zdr Listy*. 1994;64:147–9.
74. Měřička P, Klein L, Straková H, Šorma M, Pintér L, Talábová Z, et al. Biologické kryty pro léčbu popálených - vlastní zkušenosti. *Vojen Zdr Listy*. 1995;64:1450–3.
75. Straková H, Měřička P, Červinka M, Kerekes Z, Šubrtová D. Cultivation of epithelial sheets from cryopreserved keratinocyte primocultures. *J Exp Clin Cancer Res*. 1996;14(1):99–101.
76. Klein L, Měřicka P, Straková H, Jebavý L, Nozicková M, Bláha M, et al. Biological skin covers in treatment of two cases of the Lyell's syndrome. *Ann Transplant*. 1997;2(1):45–8.
77. Měřička P, Straková H, Klein L, Šubrtová D. Practical aspects of establishing an allogeneic Keratinocyte Bank. *Rocz Oparzen Ann Burns*. 1997 1996;7–8:105–9.
78. Měřička P, Straková H, Šubrtová D, Mokřý J, Klein L, Červinka M. Composite dermoepidermal graft for burn treatment. *Acta Medica*. 1998;41:58.

79. Měříčka P, Šubrtová D, Straková H, Klein L, Preis J, Dočekalová Š, et al. Náš příspěvek k přípravě a použití kompozitních dermoepidermálních štěpů. *Lékařské Zprávy*. 1999;44:157–9.
80. Měříčka P, Straková H, Cermák P, Stěpánová V, Hradecký Z, Drahosová M. New safety assurance for biological skin covers. *Acta Chir Plast*. 2002;44(1):23–9.
81. Klein L, Königová R, Mišička P. Xenografts in burns treatment. *Burns*. únor 2007;33(1):S85.
82. Mericka P. Current trends in safety assurance for tissue grafts used in burn treatment. *Acta Chir Plast*. 2006;48(2):51–8.
83. Měříčka P, Klein L, Straková H. Současné podmínky přípravy a použití biologických kožních krytů v České republice. *Rozhl V Chir Mesicnik Ceskoslovenske Chir Spolecnosti*. květen 2013;92(5):279–82.
84. Jirsová K. Příprava rohovky pro transplantaci: historie, současnost, budoucnost [Internet]. 2014 [citován 20. květen 2022]. Dostupné z: <http://site.ebrary.com/id/10852868>
85. Brejchova K, Trosan P, Studeny P, Skalicka P, Utheim TP, Bednar J, et al. Characterization and comparison of human limbal explant cultures grown under defined and xeno-free conditions. *Exp Eye Res*. listopad 2018;176:20–8.
86. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol*. 1. duben 1999;83(4):399–402.
87. Basad E, Ishaque B, Bachmann G, Stürz H, Steinmeyer J. Matrix-induced autologous chondrocyte implantation versus microfracture in the treatment of cartilage defects of the knee: a 2-year randomised study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. duben 2010;18(4):519–27.
88. Harris JD, Siston RA, Brophy RH, Lattermann C, Carey JL, Flanigan DC. Failures, re-operations, and complications after autologous chondrocyte implantation--a systematic review. *Osteoarthritis Cartilage*. červenec 2011;19(7):779–91.
89. Pietschmann MF, Niethammer TR, Horng A, Gülecüyz MF, Feist-Pagenstert I, Jansson V, et al. The incidence and clinical relevance of graft hypertrophy after matrix-based autologous chondrocyte implantation. *Am J Sports Med*. leden 2012;40(1):68–74.
90. Zellner J, Krutsch W, Pfeifer C, Koch M, Nerlich M, Angele P. Autologous chondrocyte implantation for cartilage repair: current perspectives. *Orthop Res Rev*. listopad 2015;149.
91. Bentley G, Biant LC, Carrington RWJ, Akmal M, Goldberg A, Williams AM, et al. A prospective, randomised comparison of autologous chondrocyte implantation *versus* mosaicplasty for osteochondral defects in the knee. *J Bone Joint Surg Br*. březem 2003;85-B(2):223–30.
92. Vanlauwe J, Saris DBF, Victor J, Almqvist KF, Bellemans J, Luyten FP, et al. Five-year outcome of characterized chondrocyte implantation versus microfracture for symptomatic cartilage defects of the knee: early treatment matters. *Am J Sports Med*. prosinec 2011;39(12):2566–74.

93. Crawford DC, DeBerardino TM, Williams RJ. NeoCart, an Autologous Cartilage Tissue Implant, Compared with Microfracture for Treatment of Distal Femoral Cartilage Lesions: An FDA Phase-II Prospective, Randomized Clinical Trial After Two Years. *J Bone Jt Surg*. 6. červen 2012;94(11):979–89.
94. Aldrian S, Zak L, Wondrasch B, Albrecht C, Stelzeneder B, Binder H, et al. Clinical and Radiological Long-term Outcomes After Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Transplantation: A Prospective Follow-up at a Minimum of 10 Years. *Am J Sports Med*. listopad 2014;42(11):2680–8.
95. Albrecht C, Tichy B, Nürnberger S, Zak L, Handl MJ, Marlovits S, et al. Influence of cryopreservation, cultivation time and patient's age on gene expression in Hyalograft® C cartilage transplants. *Int Orthop*. listopad 2013;37(11):2297–303.
96. Višňa P, Adler J, Folvarský J, Horký D. Terapie hlubokých chondrálních defektů kolene pomocí autologně kultivovaných chondrocytů na nosiči – příprava chondrograftu. *Acta Chir Orthop Traumatol Čech*. 2003;70(6):350–5.
97. Pavlata J, Urban K, Karpaš K, Měřička P, Straková H, Brtková J. Reconstruction of the joint surface. *Acta Medica*. 2002;45:64–5.
98. Folvarský J, Dědek T, Dobeš D, Frank M, Adler J. Chondrografty na bázi fibrinového lepidla Tissucol-Kit immuno® jako nová možnost léčby defektů kloubních ploch – popis metody. *Vojen Zdr Listy*. 2003;72(6):253–7.
99. Filová E, Rampichová M, Handl M, Lytvynets A, Halouzka R, Usvald D, et al. Composite hyaluronate-type I collagen-fibrin scaffold in the therapy of osteochondral defects in miniature pigs. *Physiol Res*. 2007;56 Suppl 1:S5–16.
100. European Medicines Agency. Guideline on human cell-based medical products [Internet]. EMA European Medicines Agency. 2008 [citován 25. květen 2022]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-human-cell-based-medicinal-products_en.pdf
101. European Medicines Agency. EMA: Reflection paper on in-vitro cultured chondrocyte containing products for cartilage repair of the knee [Internet]. Reflection paper on in-vitro cultured chondrocyte containing products for cartilage repair of the knee. 2010 [citován 25. květen 2022]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-vitro-cultured-chondrocyte-containing-products-cartilage-repair-knee_en.pdf
102. Handl M, Trc T, Hanus M, Stastný E, Fricová-Poulová M, Neuwirth J, et al. [Autologous chondrocyte implantation in the treatment of cartilage lesions of ankle joint]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*. únor 2007;74(1):29–36.
103. Handl M. Závěrečná zpráva specifického léčebného programu – klinická část, Ortopedická klinika. LFUK, FN Motol, Praha; 2013.
104. Měřička P, Straková H, Štěrba L, Šrámek B. Specifický léčebný program, Závěrečná zpráva – Laboratorní část. Fakultní nemocnice Hradec Králové Tkáňová ústředna, Laboratoř buněčné terapie; 2013.

105. Nejadnik H, Hui JH, Feng Choong EP, Tai BC, Lee EH. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells versus autologous chondrocyte implantation: an observational cohort study. *Am J Sports Med.* červen 2010;38(6):1110–6.
106. Shaikh HH, Vícha J, Proček T, Pavlata J, Kučera T. Osteochondritis Dissecans of the Knee in Children and Adolescents: Our Experience with Transchondral Drilling. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 2015;58(3):98–103.
107. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 28. srpen 2001;98(18):10344–9.
108. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* duben 2001;7(4):430–6.
109. Britten MB, Abolmaali ND, Assmus B, Lehmann R, Honold J, Schmitt J, et al. Infarct Remodeling After Intracoronary Progenitor Cell Treatment in Patients With Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI): Mechanistic Insights From Serial Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging. *Circulation.* 4. listopad 2003;108(18):2212–8.
110. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, Ringes-Lichtenberg S, Lippolt P, Breidenbach C, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet Lond Engl.* 10. červenec 2004;364(9429):141–8.
111. Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation.* 10. prosinec 2002;106(24):3009–17.
112. Schächinger V, Erbs S, Elsässer A, Haberbosch W, Hambrecht R, Hölschermann H, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 21. září 2006;355(12):1210–21.
113. Skalická H, Horak J, Kobyłka P, Paleček T, Linhart A, Aschermann M. Intracoronary injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in patients with large anterior acute myocardial infarction and left ventricular dysfunction: a 24-month follow up study. *Bratisl Lek Listy.* 2012;113(4):220–7.
114. Jaluvka F, Ihnat P, Madaric J, Vrtkova A, Janosek J, Prochazka V. Current Status of Cell-Based Therapy in Patients with Critical Limb Ischemia. *Int J Mol Sci.* 26. listopad 2020;21(23):8999.
115. Matia I, Janousek L, Marada T, Adamec M. Cold-stored venous allografts in the treatment of critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg Off J Eur Soc Vasc Surg.* říjen 2007;34(4):424–31.
116. Matia I, Fellmer P, Splith K, Varga M, Adamec M, Kämmerer I, et al. Immunosuppressive protocol with delayed use of low-dose tacrolimus after aortic transplantation suppresses donor-specific anti-MHC class I and class II antibody production in rats. *Ann Transplant.* 12. květen 2014;19:225–32.

117. Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, Štádl P, Adamec M, Vlachovský R, et al. Organization model for allotransplantations of cryopreserved vascular grafts in Czech Republic. *Cell Tissue Bank*. září 2018;19(3):437–45.
118. Měříčka P, Janoušek L, Benda A, Lainková R, Sabó J, Dalecká M, et al. Cell Viability Assessment Using Fluorescence Vital Dyes and Confocal Microscopy in Evaluating Freezing and Thawing Protocols Used in Cryopreservation of Allogeneic Venous Grafts. *Int J Mol Sci*. 30. září 2021;22(19):10653.
119. Chlupac J, Matejka R, Konarik M, Novotny R, Simunkova Z, Mrazova I, et al. Vascular Remodeling of Clinically Used Patches and Decellularized Pericardial Matrices Recellularized with Autologous or Allogeneic Cells in a Porcine Carotid Artery Model. *Int J Mol Sci*. 18. březen 2022;23(6):3310.
120. U.S. Food and Drug Administration. U.S. Food and Drug Administration [Internet]. Approved Cellular and Gene Therapy Products. 2022 [citován 8. červen 2022]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/cellular-gene-therapy-products/approved-cellular-and-gene-therapy-products>
121. Státní ústav pro kontrolu léčiv. VYR-43 verze 0 Pokyny pro správnou výrobní praxi léčivých přípravků pro moderní terapie. kvě 22, 2018 s. 78.
122. European Commission. EudraLex - Volume 4 - Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines [Internet]. European Commission; 2017 [citován 25. květen 2022]. Dostupné z: https://ec.europa.eu/health/medicinal-products/eudralex/eudralex-volume-4_en
123. Hunt CJ. Technical Considerations in the Freezing, Low-Temperature Storage and Thawing of Stem Cells for Cellular Therapies. *Transfus Med Hemotherapy*. 2019;46(3):134–50.
124. Veselý M. Použití metody FMEA pro prevenci chyb v průmyslovém podniku [Internet] [Diplomová práce]. [Brno]: Vysoké učení technické v Brně - Fakulta strojního inženýrství; 2012 [citován 2. březen 2020]. Dostupné z: <https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/4439/final-thesis.pdf?sequence=6>
125. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 15. říjen 1949;164(4172):666.
126. Luyet BJ. Life and Death at Low Temperatures [Internet]. 1940. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=E09OswEACAAJ>
127. Mazur P. Physical and Temporal Factors Involved in the Death of Yeast at Subzero Temperatures. *Biophys J*. leden 1961;1(3):247–64.
128. Mazur P. Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing. *J Gen Physiol*. 1. listopad 1963;47(2):347–69.
129. Naaldijk Y, Staude M, Fedorova V, Stolzing A. Effect of different freezing rates during cryopreservation of rat mesenchymal stem cells using combinations of hydroxyethyl starch and dimethylsulfoxide. *BMC Biotechnol*. 13. srpen 2012;12:49.

130. Doan ChC, Truong NH, Vu NB, Nguyen TT, Nguyen HM, Nguyen KG, et al. Isolation, culture and cryopreservation of human bone marrow – derived mesenchymal stem cells. *Int J Plant Anim Environ Sci.* 2012;2(2):83–90.
131. Prockop DJ, Phinney DG, Bunnell BA. *Mesenchymal stem cells: methods and protocols.* Totowa (N.J.): Humana press; 2008. (Methods in molecular biology).
132. Freimark D, Sehl C, Weber C, Hudel K, Czermak P, Hofmann N, et al. Systematic parameter optimization of a Me(2)SO- and serum-free cryopreservation protocol for human mesenchymal stem cells. *Cryobiology.* říjen 2011;63(2):67–75.
133. Verheijen M, Lienhard M, Schrooders Y, Clayton O, Nudischer R, Boerno S, et al. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci Rep.* 15. března 2019;9(1):4641.
134. Shu Z, Heimfeld S, Huang Z, Liu C, Gao D. Progress in Cryopreservation of Stem Cells and Immune Cells for Cytotherapy. In: Demirer T, editor. *Progress in Stem Cell Transplantation* [Internet]. InTech; 2015 [citován 24. květen 2022]. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/progress-in-stem-cell-transplantation/progress-in-cryopreservation-of-stem-cells-and-immune-cells-for-cytotherapy>
135. Brockbank KG. Removal of Potentially Cytotoxic DMSO from Cell Therapy Cryopreservation Formulations. *MOJ Cell Sci Rep* [Internet]. 7. září 2016 [citován 19. květen 2022];3(4). Dostupné z: <https://medcraveonline.com/MOJCSR/removal-of-potentially-cytotoxic-dms0-from-cell-therapy-cryopreservation-formulationsnbsp.html>
136. Cox MA, Kastrup J, Hrubisko M. Historical perspectives and the future of adverse reactions associated with haemopoietic stem cells cryopreserved with dimethyl sulfoxide. *Cell Tissue Bank.* červen 2012;13(2):203–15.
137. Měříčka P, Straková H, Vávra L, Bláha M, Filip S, Ettlerová E, et al. Validation of the standard operating procedure for cryopreservation of peripheral blood progenitor cells. In: *Cryoprotectants in Medical Practice/Utilisation des Cryoprotecteurs en Médecine.* Hradec Králové: International Institute of Refrigeration; s. 19. (Refrigeration Science and Technology /Science et Technique du Froid; roč. 1).
138. European Directorate for the Quality of Medicines, Consell d'Europa. Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application [Internet]. 2019 [citován 19. květen 2022]. Dostupné z: <https://www.edqm.eu/en/news/new-guide-quality-and-safety-tissues-and-cells-human-application>
139. Carreras E, Dufour C, Mohty M, Kröger N, editoři. *The EBMT Handbook: Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Cellular Therapies* [Internet]. 7th vyd. Cham (CH): Springer; 2019 [citován 19. květen 2022]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553942/>
140. Baust JM, Vogel MJ, Van Buskirk R, Baust JG. A molecular basis of cryopreservation failure and its modulation to improve cell survival. *Cell Transplant.* 2001;10(7):561–71.
141. Baust JM, Snyder KK, VanBuskirk RG, Baust JG. Changing Paradigms in Biopreservation. *Biopreservation Biobanking.* března 2009;7(1):3–12.

142. Baust JM, Campbell LH, Harbell JW. Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. *Vitro Cell Dev Biol - Anim.* prosinec 2017;53(10):855–71.
143. Baust JM, Corwin W, Snyder KK, Van Buskirk R, Baust JG. Cryopreservation: Evolution of Molecular Based Strategies. *Adv Exp Med Biol.* 2016;951:13–29.
144. Buriak IA, Elliott G, Fleck RA, Fuller BJ, Glasmacher B, Goltsev AM, et al. Preservation and Storage of Cells for Therapy: Fundamental Aspects of Low Temperature Science. In: Gimble JM, Marolt Presen D, Oreffo ROC, Wolbank S, Redl H, editoři. *Cell Engineering and Regeneration* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2022 [citován 19. květen 2022]. s. 1–60. (Reference Series in Biomedical Engineering). Dostupné z: https://link.springer.com/10.1007/978-3-319-37076-7_67-1
145. Awan M, Buriak I, Fleck R, Fuller B, Goltsev A, Kerby J, et al. Dimethyl sulfoxide: a central player since the dawn of cryobiology, is efficacy balanced by toxicity? *Regen Med.* březem 2020;15(3):1463–91.
146. Dovgan B, Dermol J, Barlič A, Knežević M, Miklavčič D. Cryopreservation of Human Umbilical Stem Cells in Combination with Trehalose and Reversible Electroporation. In: Jarm T, Kramar P, editoři. *1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2016 [citován 20. květen 2022]. s. 307–10. (IFMBE Proceedings; roč. 53). Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-981-287-817-5_68
147. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol.* září 1984;247(3 Pt 1):C125-142.
148. Acker J, Bondarovich M, Brunotte R, Buriak I, Fuller BJ, Glasmacher B, et al. Preservation and Storage of Cells for Therapy: Current Applications and Protocols. In: Gimble J.M., Marolt Presen D., Oreffo R.O.C., Wolbank S., Redl H. (eds) *Cell Engineering and Regeneration*. Reference Series in Biomedical Engineering. Springer, Cham.
149. Meryman HT. Cryopreservation of living cells: principles and practice. *Transfusion (Paris).* květen 2007;47(5):935–45.
150. Massie I, Selden C, Hodgson H, Fuller B. 060 Towards large scale GMP cryopreservation of the conditioned liver cell biomass for a bioartificial liver machine: Delivery of process control for the freezing protocol. *Cryobiology.* prosinec 2013;67(3):414–5.
151. Yakoub-Agha I, Chabannon C, Bader P, Basak GW, Bonig H, Ciceri F, et al. Management of adults and children undergoing chimeric antigen receptor T-cell therapy: best practice recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT (JACIE). *Haematologica.* 2020;105(2):297–316.
152. Kröger N, Gribben J, Chabannon C, Yakoub-Agha I, Einsele H, European Society for Blood and Marrow Transplantation, et al. *The EBMT/EHA CAR-T cell handbook* [Internet]. 2022 [citován 20. květen 2022]. Dostupné z: <https://ezproxy.library.dal.ca/login?url=https://doi.org/10.1007/978-3-030-94353-0>

153. Parlament České republiky. Zákon o zpracování osobních údajů. 110/2019 Sb. dub 24, 2019.
154. Cryogenics 2017 conference, Institut international du froid, Institut international du froid, editoři. 14th cryogenics 2017 conference: Dresden, Germany, May 15-19, 2017. Paris: Institut international du froid; 2017. (Refrigeration science and technology).
155. Tedder RS, Zuckerman MA, Goldstone AH, Hawkins AE, Fielding A, Briggs EM, et al. Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet Lond Engl.* 15. červenec 1995;346(8968):137–40.
156. Hunt CJ, Pegg DE. Improved Temperature Stability in Gas-Phase Nitrogen Refrigerators: Use of a Copper Heat Shunt. *Cryobiology.* říjen 1996;33(5):544–51.
157. Day JG, Stacey GN, editoři. *Cryopreservation and freeze-drying protocols.* 2. ed. Totowa: Humana Press; 2007. 347 s. (Methods in molecular biology).
158. Kilbride P, Meneghel J, Creasey G, Masoudzadeh F, Drew T, Creasey H, et al. Automated dry thawing of cryopreserved haematopoietic cells is not adversely influenced by cryostorage time, patient age or gender. *PloS One.* 2020;15(10):e0240310.
159. Pravdyuk AI, Petrenko YA, Fuller BJ, Petrenko AY. Cryopreservation of alginate encapsulated mesenchymal stromal cells. *Cryobiology.* červen 2013;66(3):215–22.
160. Gurruchaga H, Ciriza J, Saenz Del Burgo L, Rodriguez-Madoz JR, Santos E, Prosper F, et al. Cryopreservation of microencapsulated murine mesenchymal stem cells genetically engineered to secrete erythropoietin. *Int J Pharm.* 15. květen 2015;485(1–2):15–24.
161. Kilbride P, Lamb S, Milne S, Gibbons S, Erro E, Bundy J, et al. Spatial considerations during cryopreservation of a large volume sample. *Cryobiology.* srpen 2016;73(1):47–54.
162. Pegg DE, Wusteman MC, Boylan S. Fractures in cryopreserved elastic arteries. *Cryobiology.* březen 1997;34(2):183–92.
163. Buján J, Pascual G, López R, Corrales C, Rodríguez M, Turégano F, et al. Gradual Thawing Improves the Preservation of Cryopreserved Arteries. *Cryobiology.* červen 2001;42(4):256–65.
164. Novotny R, Mericka P, Chlupac J, Matejka R, Kristek J, Marada T, et al. The Effect of Different Thawing Rates on Cryopreserved Human Iliac Arteries Allograft's Structural Damage and Mechanical Properties. *BioMed Res Int.* 2020;2020:6545190.
165. Hruby J, Spunda R, Mericka P, Mlcek M, Pecha O, Splith K, et al. Influence of the new standardized clinical cryopreservation/slow thawing protocol on immunogenicity of arterial allografts in rats. Serra R, editor. *PLOS ONE.* 10. březen 2020;15(3):e0230234.
166. Ehrlich LE, Gao Z, Bischof JC, Rabin Y. Thermal conductivity of cryoprotective agents loaded with nanoparticles, with application to recovery of preserved tissues and organs from cryogenic storage. *PloS One.* 2020;15(9):e0238941.
167. Ruiz-Delgado GJ, Mancías-Guerra C, Tamez-Gómez EL, Rodríguez-Romo LN, López-Otero A, Hernández-Arizpe A, et al. Dimethyl sulfoxide-induced toxicity in cord blood

- stem cell transplantation: report of three cases and review of the literature. *Acta Haematol.* 2009;122(1):1–5.
168. Rowley SD, Feng Z, Yadock D, Holmberg L, Macleod B, Heimfeld S. Post-thaw removal of DMSO does not completely abrogate infusional toxicity or the need for pre-infusion histamine blockade. *Cytotherapy.* 1999;1(6):439–46.
169. Rodríguez L, Azqueta C, Azzalin S, García J, Querol S. Washing of cord blood grafts after thawing: high cell recovery using an automated and closed system. *Vox Sang.* říjen 2004;87(3):165–72.
170. Foïs E, Desmartin M, Benhamida S, Xavier F, Vanneaux V, Rea D, et al. Recovery, viability and clinical toxicity of thawed and washed haematopoietic progenitor cells: analysis of 952 autologous peripheral blood stem cell transplantations. *Bone Marrow Transplant.* listopad 2007;40(9):831–5.
171. Decot V, Houzé P, Stoltz JF, Bensoussan D. Quantification of residual dimethylsulfoxide after washing cryopreserved stem cells and thawing tissue grafts. *Biomed Mater Eng.* 2009;19(4–5):293–300.
172. Adamusová. Automatizované promývání transplantátů krvinečných buněk pro autologní použití.
173. Calmels B, Houzé P, Hengesse JC, Ducrot T, Malenfant C, Chabannon C. Preclinical evaluation of an automated closed fluid management device: Cytomate™, for washing out DMSO from hematopoietic stem cell grafts after thawing. *Bone Marrow Transplant.* květen 2003;31(9):823–8.
174. Mfarrej B, Bouchet G, Couquiaud J, Regimbaud L, Binniger S, Mercier M, et al. Pre-clinical assessment of the Lovo device for dimethyl sulfoxide removal and cell concentration in thawed hematopoietic progenitor cell grafts. *Cytotherapy.* prosinec 2017;19(12):1501–8.
175. Milone G, Mercurio S, Strano A, Leotta S, Pinto V, Battiato K, et al. Adverse events after infusions of cryopreserved hematopoietic stem cells depend on non-mononuclear cells in the infused suspension and patient age. *Cytotherapy.* 2007;9(4):348–55.
176. Shu Z, Heimfeld S, Gao D. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant.* duben 2014;49(4):469–76.
177. Yi X, Liu M, Luo Q, Zhuo H, Cao H, Wang J, et al. Toxic effects of dimethyl sulfoxide on red blood cells, platelets, and vascular endothelial cells in vitro. *FEBS Open Bio.* duben 2017;7(4):485–94.
178. Měříčka P, Straková H, Honegrová B, Lánská M, Vokurková D, Maisnar V, et al. Retrospective analysis of dimethylsulphoxide load in autologous peripheral progenitor cell transplantation in multiple myeloma. In: *CryoLetters.* Prague: CryoLetters; 2018. s. 264–5.
179. Chrz V, International Institute of Refrigeration, editoři. *Cryogenics 2021 online: the 16th Cryogenics 2021 IIR International Conference: October 5-7, 2021: proceedings.* Paris,

- France: International Institute of Refrigeration; 2021. 274 s. (Refrigeration science and technology).
180. Státní ústav pro kontrolu léčiv. VYR-39, verze 3 [Internet]. Sek. Pokyny SÚKL, VYR-39 srp 10, 2018 s. 6 stran. Dostupné z: file://fnhk.cz/dfs/data1/documents/jandomir/Downloads/VYR_39_verze3_Povoleni_cinnosti_souvisejicich_se_zajistenim_LTB.pdf
181. Ministerstvo zdravotnictví ČR. Český lékopis 2017. První. Roč. 2017. Praha: Grada Publishing, a.s.; 2017. 1000 s.
182. International Council for Commonality in Blood Banking Automation. International Council for Commonality in Blood Banking Automation. ISBT 128 [Internet]. ISBT 128 – The Global Information Standard for Medical Products of Human Origin. 2022 [citován 1. duben 2022]. Dostupné z: <https://www.icbba.org/>
183. Yang H, Acker JP, Cabuhat M, Letcher B, Larratt L, McGann LE. Association of post-thaw viable CD34+ cells and CFU-GM with time to hematopoietic engraftment. *Bone Marrow Transplant*. 1. květen 2005;35(9):881–7.
184. Evans RH. An Analysis of Criterion Variable Reliability in Conjoint Analysis. *Percept Mot Skills*. červen 1996;82(3):988–90.
185. Měřička P, Gregor J, Jandová M, Honegrová B, Lánská M, Vokurková D, et al. Základní parametry kryokonzervovaných koncentrátů nemobilizovaných mononukleárních buněk určených k infuzi dárcovských lymfocytů u pacientů po alogenní transplantaci a koncentrátů mobilizovaných krvetvorných buněk určených k alogenní transplantaci v naší praxi. *Zprav Čes-Slov Biol Spol Z S*. 2020;30:39.
186. Panch SR, Srivastava SK, Elavia N, McManus A, Liu S, Jin P, et al. Effect of Cryopreservation on Autologous Chimeric Antigen Receptor T Cell Characteristics. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 3. červenec 2019;27(7):1275–85.
187. European Commission. EU Coding Platform Reference Compendia for the Application of a single European Coding System for Tissues and Cells. [Internet]. EU Coding Platform Reference Compendia for the Application of a single European Coding System for Tissues and Cells. Dostupné z: <https://webgate.ec.europa.eu/eucoding/reports/te/index.xhtml>
188. Levine BL, Miskin J, Wonnacott K, Keir C. Global Manufacturing of CAR T Cell Therapy. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 17. březen 2017;4:92–101.
189. Měřička P, Jandová M, Gregor J, Lánská M, Vokurková D, Fátorová I, et al. Cryopreservation of non-mobilized peripheral blood mononuclear cells (PBMC) - current situation and future perspectives. In: *CryoLetters*. Online: *CryoLetters*; 2020. s. 376–7.
190. Morris GJ, Acton E. Controlled ice nucleation in cryopreservation--a review. *Cryobiology*. duben 2013;66(2):85–92.
191. Blaha M, Mericka P, Zak P, Stepanova V, Vavra L, Maly J, et al. The risk of infection transmission from blood progenitor cell concentrates. *J Hematother Stem Cell Res*. duben 2003;12(2):161–4.

192. Měřicka P, Schustr P, Vins M, Dudek A, Vávra L, Cervinka M, et al. Containers for freezing and storage of bone marrow stem cells. *Sb Vedeckých Pr Lek Fak Karlovy Univ V Hradci Kralove*. 1991;34(4):367–87.
193. Měřička P, Straková H, editoři. *Cryoprotectants in medical practice: May 12-15, 1997, Hradec Kralové, Czech Republic long abstracts*. Paris: IIR = IIF; 1998. (Refrigeration science and technology).
194. Yakoub-Agha I, Chabannon C, Bader P, Basak GW, Bonig H, Ciceri F, et al. Management of adults and children undergoing chimeric antigen receptor T-cell therapy: best practice recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT (JACIE). *Haematologica*. 2020;105(2):297–316.
195. Tyagarajan S, Schmitt D, Acker C, Rutjens E. Autologous cryopreserved leukapheresis cellular material for chimeric antigen receptor-T cell manufacture. *Cytotherapy*. prosinec 2019;21(12):1198–205.