

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Kryokonzervační metody ve výrobě léčivých přípravků moderní terapie

Mgr. Miroslava Jandová

Autoreferát disertační práce

Doktorský studijní program: Anatomie, histologie a embryologie

Hradec Králové

2022

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Anatomie, histologie a embryologie na Tkáňové ústředně Fakultní nemocnice v Hradci Králové.

Autor: Mgr. Miroslava Jandová, Tkáňová ústředna, Fakultní nemocnice
Hradec Králové

Školitel: doc. MUDr. Dana Čížková, Ph.D., Ústav histologie a embryologie,
Lékařská fakulta v Hradci Králové

Školitel konzultant: prof. MUDr. Stanislav Filip, Ph.D., DSc., Klinika onkologie
a radioterapie, Fakultní nemocnice Hradec Králové

Oponenti: Mgr. Lucie Stříbrná, Ph.D., fakulta chemicko-technologická, Univerzita
Pardubice

prof. RNDr. Petr Dubový, CSc., Anatomický ústav, Lékařská fakulta
Masarykova Univerzita

Obhajoba se bude konat před Komisí pro obhajoby OR Anatomie, histologie a embryologie
dne 21.9.2022 v zasedací místnosti děkanátu LF HK od 13 hod.

Tato práce vznikla za podpory grantu TAČR č. TG02010000, Granty Karlovy univerzity
PROGRES Č. Q40/06, SVV č. 260 397/2017, SVV a SVV260543/2020.

S disertační prací je možno se seznámit na studijním oddělení děkanátu Lékařské fakulty
v Hradci Králové, Univerzity Karlovy, Šimkova 870, 500 03 Hradec Králové (tel.
495 816 134).

prof. MUDr. Jaroslav Mokrý, Ph.D.
Předseda komise pro obhajoby disertačních prací
v doktorském studijním programu Anatomie, histologie a embryologie
Garant studijního programu

1. Obsah

1. Obsah	1
2. Souhrn	2
3. Summary	3
4. Úvod do problematiky	4
5. Cíle disertační práce	8
6. Materiál a metodika	9
7. Výsledky	11
8. Diskuse	16
8.1 Opatřování a kryokonzervace výchozí suroviny pro výrobu LPMT Kymriah	16
8.2 Kryokonzervace hodnoceného LPMT na bázi hMSCs	17
8.3 Odmývání DMSO v suspenzi kryokonzervovaných autologních periferních kmenových buněk (HPCs)	18
8.4 Skladování výchozích surovin pro výrobu LPMT a hotových registrovaných nebo hodnocených LPMT	19
8.5 Transport a rozmrazování LPMT	20
9. Závěry	21
9.1 Opatřování a kryokonzervace výchozí suroviny pro výrobu LPMT Kymriah	21
9.1.1 Zhodnocení odběru nemobilizovaných mononukleárních buněk	21
9.1.2 Zhodnocení kryokonzervace mononukleárních buněk	21
9.2 Kryokonzervace hodnoceného LPMT na bázi hMSCs	22
9.3 Studie odmývání DMSO v suspenzi kryokonzervovaných autologních periferních kmenových buněk (HPCs)	22
9.4 Skladování, transport a rozmrazování registrovaných LPMT	22
10. Použitá literatura	23
11. Přehled publikační činnosti autora	30
11.1 Původní vědecké práce v impaktovaných časopisech	30
11.2 Přednášky a plakátová sdělení na odborných akcích	30
11.3 Abstrakta publikovaná v zahraničních časopisech	33
11.4 Abstrakta publikovaná v českých časopisech	34
11.5 Abstrakta a přehledové práce v recenzovaných sbornících	35
11.6 Kapitola v knize	36

2. 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 výrobcí, 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).

3. 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.

4. Úvod do problematiky

Léčivé přípravky pro moderní terapii používané v humánní medicíně jsou založeny na somatobuněčné, na 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 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 (1,11–14). V r. 2007 tedy prvně vzešel pojem „Léčivý přípravek moderní terapie“.

Cesta LPMT od prvotní ideje po registraci přípravku a jeho uvedení na trh je zdoluhavá. 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. Po získání všech potřebných dat je podána žádost o povolení ke klinickému hodnocení. Poté, co LPMT projde potřebnými fázemi klinického hodnocení, je možné získané údaje předložit v žádosti o jeho registraci, která je možná pouze centrálně, na evropské úrovni u Evropské lékové agentury (EMA). LPMT s platnou registrací na úrovni EMA může být běžně podáván pacientům v indikovaných případech ve všech státech EU. Existuje však také možnost aplikace neregistrovaného LPMT ve zdravotnických zařízeních, a to tzv. v rámci „Nemocniční výjimky“ (15).

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. 1 jsou shrnuty výhody a nevýhody použití LPMT (13).

Tab. č. 1: Výhody a nevýhody použití LPMT (13).

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*
Méně hospitalizací, komorbidit a přidružené léčby	*Tuto nevýhodu by bylo možné odstranit kryokonzervací

Výroba LPMT v ČR probíhá dle pokynu SÚKL VYR-43 a schváleného Evropskou komisí pro správnou výrobní praxi (67,68). 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.

Ačkoliv v ČR byly LPMT poprvé definovány v r. 2004, podstatně manipulované buněčné přípravky existovaly už před tímto datem a před samotnou regulací v rámci EU (2008). Jako příklad lze uvést kultivované lidské epidermální keratinocyty (4,16), které se využívaly především k léčbě popálenin ve formě epiteliálních blan na nosičích (17). 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“ (18,19).

V první polovině devadesátých let bylo použití autologních kultivovaných epidermálních keratinocytů do rutinní léčby popálenin zavedeno rovněž na Popáleninovém centru v Brně Bohunicích (20,21) a na Oddělení plastické chirurgie a popálenin v Hradci Králové (22,23). 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 (17). Běžná byla již tehdy kryokonzervace části meziprojektu (primokultury), pro případ selhání kultivace (24). Kromě popálenin byly keratinocyty úspěšně použity u dvou případů Lyellova syndromu (25). 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 (26) a o použití kompozitních dermoepidermálních štěpů (27,28). 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 (29,30). Po ukončení používání xenogenních krytů v ČR (31) se zájem o použití autologních keratinocytů opět zvýšil (32), ale zatím se v ČR neotevřela 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 Filipcem (33,34). Po ukončení této aktivity v důsledku nových regulačních pravidel byl v ČR v rámci klinické studie používán

přípravek Holoclar. Po jeho registraci v r. 2015 výrobce přípravku 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 (35).

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 (36–39). S těmito typy přípravků byly dosaženy výrazně lepší klinické výsledky než se suspenzí buněk (37,38). Kontrolované klinické studie jednoznačně prokázaly lepší výsledky této metody ve srovnání s alternativami, jako je známková plastika či mikrofraktury (39–42), a to i po dlouhodobém, až desetiletém sledování od implantace (43). Jedna ze studií sledovala i vliv kryokonzervace na fenotyp kultivovaných chondrocytů a prokázala jeho změny (44).

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 (45) 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 podpořena grantem IGA MZ ČR (46). Současně byly v rámci rutinní klinické praxe používány u úrazových defektů chrupavky chondrocyty zakotvené na nosiči (47). 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 (48).

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 Evropské lékové agentury pro používání léčivých přípravků moderní terapie obecně (14) a výrobu a kontrolu kultivovaných chondrocytů (49), 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, kde se problematikou dlouhodobě zabýval Handl, který byl i hlavním zkoušejícím a který úspěšně použil chondrocyty zakotvené v Tissue-Collu u 12 pacientů s hlubokými chondrálními defekty většími než 4 cm² (32,50). Na specifický léčebný program měla navazovat standardní studie, k její realizaci však nedošlo z důvodu vysokých nákladů na výrobu přípravků nehraných z prostředků zdravotního pojištění i na

povinné pojištění pacientů zařazených do studie. 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 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 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 na bázi hMSCs (Bioinova, a.s., Praha). 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 diferenciační schopnosti mesenchymálních buněk (51). Paralelně klinika využívala pro léčbu osteochondritis dissecans i alternativní metodu transchondrálního mikrodrillingu (52).

Počátkem tohoto tisíciletí upozornilo několik experimentálních prací na možnost léčby akutního infarktu myokardu intrakoronární aplikací buněk kostní dřeně (53,54). Pilotní studie provedené u pacientů s infarktem myokardu, kterým byly intrakoronárně aplikovány minimálně manipulované buňky autologní kostní dřeně prokázaly nadějně výsledky (55,56). Účinnost této léčby potvrdily i některé navazující kontrolované klinické studie (57,58). 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 (59). Výsledky obdobné studie po dvouletém, sledování publikovala rovněž Skalická et al. z pražského IKEM (60).

Podobně nadějně se jevila intramuskulární aplikace suspenze kostní dřeně při léčbě ischemické choroby dolních končetin, v ČR se touto problematikou zabývá např. Jalůvka (61). Hlavní metodou léčby kritické ischemie dolních končetin však stále zůstávají chirurgické rekonstrukce umělou protézou nebo čerstvým (62,63), nebo kryokonzervovaným alogenním cévním štěpem (64,65). 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 pojivových tkání, popřípadě osazených kultivovaným autologním cévním endotelem, při jejichž použití by imunosuprese nebyla nutná (66).

5. Cíle disertační práce

Cílem disertační práce bylo představit možnosti použití 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 2) a nemobilizovaných mononukleárních buněk periferní krve pro výrobu registrovaného léčivého přípravku, ve druhém případě i po kryokonzervaci (část 1).
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 (část 5) základní suroviny pro výrobu 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).

6. Materiál a metodika

První část práce je věnována retrospektivní validační studii procesu opatrování a kryokonzervace výchozí suroviny pro výrobu LPMT – suspenze zralých mononukleárních buněk periferní krve pro výrobu registrovaných i hodnocených léčivých přípravků založených na principu využití modifikovaných T-lymfocytů exprimujících chimérický antigenní receptor (CAR-T).

Zhodnocení odběrů autologních nemobilizovaných mononukleárních buněk bylo provedeno na souboru 3 nemocných 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 nemobilizovaných mononukleárních buněk byla opatřena leukaferézou na přístroji Spectra Optia.

Zhodnocení procesu kryokonzervace mononukleárních buněk bylo provedeno na souboru koncentrátů odebraných od 16 dárců (9 žen a 7 mužů), věk průměr 40 let (21–68) nemobilizovaných mononukleárních buněk (lymfocytů dárce) určených k podání u pacientů po alogenní transplantaci k navození řízené reakce štěpu proti nádoru. Země původu koncentráту 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.

Druhá část práce je věnována přípravě kryokonzervačního protokolu pro hodnocení LPMT na bázi kryokonzervovaných hMSCs za podmínek SVP v rámci klinické studie EUDRA CT:2016-000926-21. Buňky byly vykultivovány u smluvního výrobce Bioinova, a.s., Praha, 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 dárce vyhověli v sérologických testech předepsaných vyhláškou MZ ČR č. 422/2008 Sb. v platném znění. Z odebrané kostní dřeně byly po 3–4 týdnech vykultivovány hMSCs (Bioinova, a.s., Praha) jako léčivý přípravek moderní terapie, který byl transportován zpět do FN HK a aplikován v podobě absorbovatelného proužku v rámci operačního výkonu s cílem efektivní regenerace a přihojení. Část vykultivovaných buněk byla 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 na souboru 6 dárců.

Třetí část práce se zabývá problematikou toxicity kryoprotektiva dimethylsulfoxidu (DMSO). Cílem retrospektivní studie bylo zhodnotit proces odmývání DMSO v koncentrátech mobilizovaných HPCs určených k autologní transplantaci u souboru pacientů s primární amyloidózou (n=3), sekundární amyloidózou jako komplikací mnohočetného

myelomu (n=9) nebo samotným mnohočetným myelomem (n=1). U všech pacientů bylo před vlastním podáním provedeno odmytí DMSO. Požadavky na zařazovací kritéria (kompletní dokumentace, iniciační 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). Požadovaná dávka HPCs k aplikaci byla rozdělena do více dnů. V rámci této studie jsem vyhodnotila vždy pouze na 1 promývací proces 100 ml kryovaku s cílem stanovit výtěžnost (recovery) a posoudit míru zátěže buněk promývacím procesem.

V poslední části práce popisují řešení skladování výchozích surovin pro výrobu geneticky modifikovaných přípravků moderní terapie a jejich transportu k výrobcí, dočasného skladování propuštěných registrovaných nebo hodnocených geneticky modifikovaných přípravků moderní terapie dodávaných výrobcem v kryokonzervovaném stavu a určených k použití v hematologii, v podmínkách Fakultní nemocnice Hradec Králové (FN HK) a transportu těchto přípravků na klinické pracoviště s ohledem na splnění požadavků výrobců, doporučení EBMT, požadavků FDA a zajištění genetické bezpečnosti.

7. Výsledky

Část 1 - Opatřování a kryokonzervace výchozí suroviny – nemobilizovaných mononukleárních buněk pro výrobu LPMT Kymriah

Tab. č. 2: Parametry odebrané suspenze nemobilizovaných MNC (n=5).

	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

Tabulka č. 3: Parametry kryokonzervované suspenze MNC – odhad z rozmrazených kontrolních vzorků (n=16).

	Objem (ml)	Koncentrace NC ($10^9/l$)	% MNC	Vitalita NC (%)	Vitalita MNC (%)	Počet vitálních CD3+ (10^6)
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

Tabulka č. 4: Výtěžnost MNC po rozmrazení (recovery, %), (n=16).

	% vitálních 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.

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 kriteriia 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

Vitalita a fenotypová čistota hMSCs před a po kryokonzervaci médiem obsahujícím DMSO je znázorněna v Tab. č. 5. Vitalita rozmrazených buněk ověřená trypanovou modří dosahovala parametrů čerstvých nekryokonzervovaných buněk ($\geq 90\%$) u všech 6ti pacientů.

Fenotypová čistota stanovená průtokovou cytometrií dosahovala parametrů nativních buněk v polovině případů, u pacientů 3, 5 a 6 byla fenotypová čistota pod 90 %.

Tab. č. 5: 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	nestanoveno	97	91	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

U pacienta č. 2 byly hMSCs také kryokonzervovány médiem neobsahujícím DMSO, Biofreeze (Tab. č. 6).

Tab. č. 6: 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

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

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

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

V Tab. č. 7 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 a CD34⁺ buněk ovlivněny nejsou, procento MNC se významně zvyšuje.

Tab. č. 7: 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 a po rozmrazení

V Tab. č. 8 jsou uvedeny hodnoty mediánů klíčových parametrů po odmytí DMSO. Z uvedeného vyplývá, že samotný proces odmytí významně snižuje vitalitu MNC i CD34⁺ buněk, ostatní parametry významně ovlivněny nejsou.

Tab. č. 8: Vliv odmytí DMSO na parametry rozmrazeného koncentráту 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. 9 jsou uvedeny hodnoty mediánů klíčových parametrů při porovnání hodnot v čase leukaferézy 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. 9. Vliv celého procesu sběr, zmrazení, rozmrazení, odmytí DMSO na parametry rozmrazeného 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 při sběru a po odmytí

Byla zjištěna středně silná korelace ($r = 0,785$, $p = 0,002$) mezi počtem CFU-GM a počtem vitálních CD34⁺ buněk po procesu kryokonzervace a rozmrazení. Korelace mezi počtem CFU-GM a vitálních CD34⁺ buněk po odmytí DMSO byla rovněž středně silná ($r = 0,769$, $p = 0,00341$).

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

Na pracovišti Tkáňová ústředna jsme pro skladování geneticky modifikovaných LPMT zvolili kryokontejner s technologií „dry“ v parách kapalného dusíku v teplotách -175 °C až -195 °C . Uspořádání vnitřní vestavby zahrnující pravidlo „co rám, to druh přípravku koresponduje s doporučenými standardy (67,68). Teplota je snímána pomocí dvou teplotních čidel, která jsou umístěna v různých výškách, teploty jsou kontinuálně monitorovány a zaznamenávány. Kryokontejnery jsou pravidelně validovány autorizovanými firmami 1 x ročně podle pravidel platných ve výrobě léčiv, tzn. při striktním dodržování triády: instalační kvalifikace, operační kvalifikace a procesní validace. Prokázali jsme, že teplota skladování -150 °C požadovaná předpisy FDA pro LPMT je splněna. Je rovněž splněn požadavek výrobců LPMT na vyloučení přímého kontaktu vaku s kryokonzervovaným produktem s kapalnou fází dusíku.

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

Transport LPMT z místa uložení v rámci nemocnice na příslušnou kliniku je prováděn v jednodušších „dry shipperech“ vybavených dataloggerem při teplotě skladování doporučené výrobcem. 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. Prokázali jsme, že během transportu je udržována teplota pod hranicí $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ požadovaná předpisy FDA pro LPMT. I během transportu je splněn požadavek výrobců LPMT na vyloučení přímého kontaktu vaku s kryokonzervovaným produktem s kapalnou fází dusíku. Rozmrazování přípravku je prováděno na vodní lázni $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ teplé po vložením vaku s kryokonzervovaným přípravkem do sekundárního obalu. Je prováděno na klinickém pracovišti těsně před jeho aplikací.

8. Diskuse

8.1 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 (12). 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 rozdílnými 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 (69), která zahrnují řadu zásad SVP platných ve výrobě léčiv (70,71). 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 Holoclar, kde výrobce musí obdržet biopsie pacienta do 24 hodin a který má pouze 36hodinovou trvanlivost (72). Kryokonzervace výchozí suroviny za podmínek SVP by v takových případech byla 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 (11).

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. 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 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 hydroxyethyl škrob (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 % (73–76). Na našem pracovišti 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 (77). Zvolený kryokonzervační režim byl odvozen od dlouhodobě používaného protokolu pro konzervaci lymfocytů dárce (172), který zajišťuje vysokou vitalitu buněk po rozmrazení i vysokou výťažnost mononukleárních buněk a CD3⁺ buněk. 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 kapalného dusíku. Alarmové stavy se ani během skladování, ani během transportu LPMT nevyskytly.

Podařilo se i splnit podmínky stanovené povolením MŽP pro zacházení s geneticky modifikovanými organismy (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.

8.2 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 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 (78).

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 ($0,262-0,473 \times 10^8$). Tato variabilita nezpůsobila žádné selhání klinické aplikace, ale vedla ke značnému omezení počtu buněk dostupných pro použití v experimentech. Z tohoto důvodu jsme mohli provést testování klonogenity pouze ve dvou případech a rovněž pouze ve 2 případech použít kryoprotektivum neobsahující DMSO.

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 je umístěno do prostředí třídy C. To je v kontrastu s tvrzením

některých autorů (79), že pro kryokonzervaci LPMT nejsou zařízení pracující na bázi vstříkovaní 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 popsaná 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 (80). Překvapivě vysoká byla i vitalita a čistota buněk při použití kryoprotektiva bez DMSO, tyto výsledky by ovšem bylo nutné potvrdit na větším souboru.

Někteří autoři uvádějí protichůdné výsledky týkající se pozitivního nebo negativního imunoznačení (29). 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 (81).

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 použití DMSO.

Technologie kryokonzervace prezentovaná v této studii 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 odloženou 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.

8.3 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 (79,80), 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 (27). Pochybnosti byly odstraněny plným akceptováním použití DMSO ze strany SÚKL v r. 1996. Pokud dávka přesahovala doporučenou hodnotu, byly infuze rozděleny do několika dnů (27).

V současné době existují nové trendy, jejichž cílem je buď nalézt jiné, stejně účinné kryoprotektivní roztoky, nebo alespoň riziko nepříznivých reakcí snížit (82). Obecně se uvádí pravidlo „tří R“ – Replace, Reduce, Remove (83). 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.) (81). Pro vlastní odmývání DMSO po rozmrazení jsou k dispozici automatické promývací systémy pracující v uzavřeném systému. Ve srovnání s klasickým ručním odmýváním DMSO mají výhody - vyšší životaschopnost hematopoetických buněk a minimální riziko mikrobiální kontaminace. Nevýhodou je vysoká cena zařízení (84–87).

Naše předchozí studie provedené u pacientů s mnohočetným myelomem, kteří podstoupili autologní transplantaci prokázaly, že dávky DMSO na kg aplikované při transplantaci v jsou naprostě většině případů hluboce pod maximální povolenou denní dávkou (85). 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. To je důvod, proč za posledních 5 let bylo na našem pracovišti odmyto DMSO pouze u 13 pacientů. 3 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 dávkou CD34⁺ buněk na kg hmotnosti příjemce. Toto snížení vitality může být projevem kryokonzervací vyvolané oddálené buněčné smrti. Naše výsledky potvrzují že odmývání by mělo být omezeno pouze v indikovaných případech, což je v souladu s doporučením EDQM, 2019 (121). Podání tohoto produktu nese 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 ve skupině CD34⁺ buněk jsou srovnatelné s výsledky skupiny Yang et al., 2005 (166).

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

Při dodání geneticky modifikovaných LPMT propuštěných pro klinické použití kvalifikovanou osobou výrobce existuje možnost jejich krátkodobého skladování v dry shipperech kurýrních společností 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. 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 (67). 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.

8.5 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 vyelití kapaliny nádoba drží teplotu $\leq -150\text{ °C}$ až po dobu 10 dní. Požadavky na teplotu transportu LPMT se liší u jednotlivých výrobců v rozsahu -120 °C až -150 °C . Požadavky na teplotu skladování a transport přípravku se 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.

Ačkoliv některá pracoviště využívají metodu suchého rozmrazování při definované teplotě (88), standardem zatím zůstává rozmrazování ve vodní lázni temperované na $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Léčivé přípravky jsou rozmrazovány ve dvojbalu (prevence úniku obsahu kryovaku do vodní lázně) (89). V našich podmínkách se plně osvědčilo vložení kryovaku s LPMT do zevního sterilního obalu Steriking, což je metoda, která byla dlouho používána při rozmrazování minimálně manipulovaných krvetvorných buněk.

9. Závěry

- V posledních pěti letech prodělalo využití kryokonzervačních metod ve výrobě LPMT rychlý rozvoj.
- Ještě letech 2016–18 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 a 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 r. 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 byly dosaženy dílčí cíle disertační práce.

9.1 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.

9.1.1 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. S touto eventualitou náš standardní pracovní postup pro zpracování suspenze mononukleárních buněk počítá. Vyšetření sterility bylo ve všech případech s výsledkem: „Sterilní“.

9.1.2 Zhodnocení kryokonzervace mononukleárních buněk

Výsledky potvrzují úspěšnost kryokonzervačního procesu. Výtěžnost vitálních jaderných, mononukleárních a CD3⁺ pozitivních buněk je přibližně 75 % a životaschopnost (vitalita) po rozmrazení nad 90 %.

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.

9.2 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 % (mean 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.

9.3 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 práce Yang H. et al., 2005 (90). Z uvedeného vyplývá, že před samotným podáním přípravku by měly být známy zároveň výsledky CFU-GM, protože optimální hladiny CFU-GM jsou podmínkou časného připojení štěpu.

9.4 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.

10. Použitá literatura

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. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature*. 3. únor 1977;265(5593):421–4.
5. Matoušková 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. 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>
10. 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%Alkonn%C3%A9%20normy%20pro%20materi%C3%Ally%20pro%20tk%C3%A1%C5%88ov%C3%A9%20in%C5%BEen%C3%BDrstv%C3%AD.pdf
11. Morrow D, Ussi A, Migliaccio G. Addressing Pressing Needs in the Development of Advanced Therapies. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017;5:55.
12. 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.
13. 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.
14. 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
15. 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.

16. 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.
17. Andreassi L, Casini L, Trabucchi E, Diamantini S, Rastelli A, Donati L, et al. Human keratinocytes cultured on membranes composed of benzyl ester of hyaluronic acid. *Wounds*. 1991;3:116–26.
18. Matoušková E, Bucek S, Vogtová D, Veselý P, Chaloupková A, Broz 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Měříčka 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.
23. Klein L, Mericka P, Hošek F. Zajištění péče o termické úrazy na našem pracovišti. *Vojen Zdr Listy*. 1994;64:147–9.
24. Straková H, Měříčka 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.
25. Klein L, Měříčka 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.
26. Měříčka 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.
27. Měříčka 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).
28. 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.
29. Měříčka P, Straková H, Cermák P, Stěpanová V, Hradecký Z, Drahosová M. New safety assurance for biological skin covers. *Acta Chir Plast*. 2002;44(1):23–9.
30. Klein L, Königová R, Mišička P. Xenografts in burns treatment. *Burns*. únor 2007;33(1):S85.
31. Mericka P. Current trends in safety assurance for tissue grafts used in burn treatment. *Acta Chir Plast*. 2006;48(2):51–8.
32. 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.
33. Jirsová K. Příprava rohovky pro transplantaci: historie, současnost, budoucnost [Internet]. 2014 [citován 20. květen 2022]. Dostupné z: <http://site.ebrary.com/id/10852868>

34. 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.
35. Azuara-Blanco A, Pillai CT, Dua HS. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol.* 1. duben 1999;83(4):399–402.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.* březen 2003;85-B(2):223–30.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. Pavlata J, Urban K, Karpaš K, Měřička P, Straková H, Brtková J. Reconstruction of the joint surface. *Acta Medica.* 2002;45:64–5.

47. 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.
48. 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.
49. 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
50. Handl M. Závěrečná zpráva specifického léčebného programu – klinická část, Ortopedická klinika. LFUK, FN Motol, Praha; 2013.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. Pudil R, Vojádek J, Filip S, Mericka P, Sťásek 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.

60. Skalicka H, Horak J, Kobyłka P, Palecek 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.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. Špaček M, Měřička 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.
65. Špaček M, Měřička P, Janoušek L, Dalecká M, Benda A, Krs O, et al. Comparison of Different Thawing Protocols in Human Cryopreserved Venous Grafts. *Ann Vasc Surg*. duben 2020;64:347–54.
66. 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.
67. 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.
68. 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>
69. 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>
70. Chrz V, editor. Increased qualitative and quantitative requirements put on haematopoietic cell establishments as the result of the COVID-19 pandemic-own experience. In Paris, France: International Institute of Refrigeration; 2021. (Refrigeration science and technology).
71. 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.
72. 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>
 73. 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.
 74. 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.
 75. 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.
 76. 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>
 77. 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.
 78. 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
 79. Morris GJ, Acton E. Controlled ice nucleation in cryopreservation--a review. *Cryobiology*. duben 2013;66(2):85–92.
 80. Baust JG, Gao D, Baust JM. Cryopreservation: An emerging paradigm change. *Organogenesis*. červenec 2009;5(3):90–6.
 81. 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.
 82. 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*. březen 2020;15(3):1463–91.
 83. 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
 84. 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.

85. 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.
86. 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>
87. Adamusová. Automatizované promývání transplantátů krvetvorných buněk pro autologní použití.
88. 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.
89. 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.
90. 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.

11. Přehled publikační činnosti autora

11.1 Původní vědecké práce v impaktovaných časopisech

Jandová M, Měřička P, Fišerová M, Landfeld A, Paterová P, Hobzová L, Jarkovská E, Kacerovský M, Houška M. Quantitative Risk Assessment of *Bacillus cereus* Growth during the Warming of Thawed Pasteurized Human Banked Milk Using a Predictive Mathematical Model. *Foods*. 2022; 11(7):1037. <https://doi.org/10.3390/foods11071037> (IF=4,121, Q2)

Jandová M, Měřička P, Fišerová M, Landfeld A, Paterová P, Hobzová L, Jarkovská E, Kacerovský M, Houška M. *Bacillus cereus* as a Major Cause of Discarded Pasteurized Human Banked Milk: A Single Human Milk Bank Experience. *Foods*. 2021; 10(12):2955. <https://doi.org/10.3390/foods10122955> (IF=4,121, Q2)

Měřička P, Janoušek L, Benda A, Lainková R, Sabó J, Dalecká M, Prokšová P, Salmay M, Špunda R, Pecha O, **Jandová M**, Gregor J, Štěrba L, Špaček M, Lindner J. Cell Viability Assessment Using Fluorescence Vital Dyes and Confocal Microscopy in Evaluating Freezing and Thawing Protocols Used in Cryopreservation of Allogeneic Venous Grafts. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021; 22(19):10653. <https://doi.org/10.3390/ijms221910653> (IF=6,01, Q1)

Jandová M, Šponer P, Vokurková D, Bauer PO, Filipová A, Filip S, Měřička P. New Cryopreservation Technology of hMSCs: First Preclinical Results Using DMSO-containing Medium. *CryoLetters*. 2020; 41(1):50-56. (IF=1,066, Q4)

Rotková J, Šuláková R, Korecká L, Zdražilová P, **Jandová M**, Lenfeld J, Horák D, Bílková Z. Laccase immobilized on magnetic carriers for biotechnology applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 2009; 321(10):1335-1340. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2009.02.034> (IF=3,097, Q2)

11.2 Přednášky a plakátová sdělení na odborných akcích

Jandová M, Měřička P, Gregor J, Lánská M, Vokurková D, Fátorová I, Bezrouk A, Radocha J. Influence of the Me₂SO removal on key parameters of cryopreserved autologous peripheral progenitor cells (HPC) concentrates a retrospective study in patients with primary or secondary amyloidosis. Cold in Biology and Medicine: Current problems in Cryobiology, Transplantology, and Biotechnology online conference, Kharkiv, Ukraine, 25.5.2022.

Měřička P, Gregor J, **Jandová M**, Lánská M, Vokurková D, Fátorová I, Paterová P, Radocha J. Cryopreservation of peripheral blood progenitor cells for unrelated allogeneic transplantation experience from the first and second wave of the COVID-19 pandemic. 57th Meeting of Society for Low temperature Biology, Brusel, Belgie, online, 3.-5.11.2021.

Měřička P, Gregor J, **Jandová M**, Brandejs D, Lánská M, Radocha J, Kučera T, Guňka I, Grofová M, Trlica J, Bartoš MC, Špaček M. Impact of the COVID-19 Pandemic on the Donation and Banking Activities of the Tissue Establishment – Experience of the Tissue Bank University Hospital Hradec Králové. 57th Meeting of Society for Low Temperature Biology, Brussel, Belgium, online, 3.-5.11.2021.

Měřička P, **Jandová M**, Gregor J, Lánská M, Vokurková D, Fátorová I, Paterová P, Radocha J, Štěřba L. Cryopreservation of non-mobilized peripheral blood mononuclear cells (PBMC) - current situation and future perspectives. 56th Meeting of the Society of Low Temperature Biology, Brussels, Belgium, online, 7.-9.10.2020.

Měřička P, Gregor J, **Jandová M**, Lánská M, Vokurková D, Fátorová I, Paterová P, Radocha J, Štěřba L. Cryopreservation of allogeneic haematopoietic progenitor cells (HPC) concentrates before transplantation - temporary or perspective solution. 56th Meeting of the Society of Low Temperature Biology, Brussels, Belgium, online, 7.-9.10.2020.

Měřička P, **Jandová M**, Gregor J, Štěřba L. New recommendations for the quality and safety of tissues and cells for clinical application and its significance for the practice of Tissue Establishments performing cryopreservation. 16th Cryogenics 2021 - IIR International Conference, Praha, ČR, 5.-7.10.2021.

Měřička P, Gregor J, **Jandová M**, Lánská M, Radocha J, Štěřba L. Increased qualitative and quantitative requirements put on haematopoietic cell establishments as the result of the COVID-19 pandemic – own experience. 16th Cryogenics 2021 - IIR International Conference, Praha, ČR, 5.-7.10.2021.

Měřička P, **Jandová M**. Význam dokumentu Rady Evropy: „Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application“ pro praxi tkáňových zařízení zabývajících se kryokonzervací buněk a tkání pro klinické transplantace 2. konference „Metodologie studia živých organismů při teplotách pod bodem mrazu“ a workshop „Kryokonzervace tkání a buněk“ Česko-slovenské biologické společnosti, z.s., Sekce pro biologii nízkých teplot, Hradec Králové, ČR 14.-15.9.2020.

Filip S, **Jandová M**, Měřička P, Filipová A, Kopeček M. Kryokonzervace buněk pro 3D biotisk – představa a současné možnosti. 2. konference „Metodologie studia živých organismů při teplotách pod bodem mrazu“ a workshop „Kryokonzervace tkání a buněk“ Česko-slovenské biologické společnosti, z.s., Sekce pro biologii nízkých teplot, Hradec Králové, ČR, 14.-15.9.2020.

Filipová A, **Jandová M**, Filip S, Šinkorová Z. Klonogenní analýza mesenchymálních kmenových buněk pro klinickou praxi. 2. konference „Metodologie studia živých organismů při teplotách pod bodem mrazu“ a workshop „Kryokonzervace tkání a buněk“ Česko-slovenské biologické společnosti, z.s., Sekce pro biologii nízkých teplot, Hradec Králové, ČR, 14.-15.9.2020.

Špaček M, Měřička P, Janoušek L, Benda A, Dalecká M, Špunda R, Hrubý J, Honegrová B, **Jandová M**, Slížová D, Krs O, Lindner J. Porovnání rozmrazovacích protokolů u humánních kryokonzervovaných safén – experimentální studie. 2. konference „Metodologie studia živých organismů při teplotách pod bodem mrazu“ a workshop „Kryokonzervace tkání a buněk“ Česko-slovenské biologické společnosti, z.s., Sekce pro biologii nízkých teplot, Hradec Králové, ČR, 14.-15.9.2020.

Měřička P, Špaček M, Janoušek L, Benda A, Sabó J, Dalecká M, Špunda R, Hrubý J, Honegrová B, Gregor J., **Jandová M**, Štěrba L, Lindner J. Stanovení vitality buněk cévní stěny kryokonzervovaných cévních štěpů pomocí vitálních barviv a konfokální mikroskopie. 2. konference „Metodologie studia živých organismů při teplotách pod bodem mrazu“ a workshop „Kryokonzervace tkání a buněk“ Česko-slovenské biologické společnosti, z.s., Sekce pro biologii nízkých teplot, Hradec Králové, ČR, 14.-15.9.2020.

Gregor J, Měřička P, **Jandová M**, Lánská M, Radocha J, Kacerovský M, Štěpán M. Postavení kryokonzervačních metod v hematologických transplantačních programech. 2. konference „Metodologie studia živých organismů při teplotách pod bodem mrazu“ a workshop „Kryokonzervace tkání a buněk“ Česko-slovenské biologické společnosti, z.s., Sekce pro biologii nízkých teplot, Hradec Králové, ČR, 14.-15.9.2020.

Jankovičová K, Vokurková D, **Jandová M**. Stanovení počtu a životnosti kmenových krvetvorných buněk v leukaferetických vzorcích metodou průtokové cytometrie. 2. konference „Metodologie studia živých organismů při teplotách pod bodem mrazu“ a workshop „Kryokonzervace tkání a buněk“ Česko-slovenské biologické společnosti, z.s., Sekce pro biologii nízkých teplot, Hradec Králové, ČR, 14.-15.9.2020.

Měřička P, Gregor J, **Jandová M**, Honegrová B, Lánská M, Vokurková D, Fátorová I, Radocha J. 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. 2. konference „Metodologie studia živých organismů při teplotách pod bodem mrazu“ a workshop „Kryokonzervace tkání a buněk“ Česko-slovenské biologické společnosti, z.s., Sekce pro biologii nízkých teplot, Hradec Králové, ČR, 14.-15.9.2020.

Jandová M, Měřička P, Lánská M. Kazuistika: Odmytí DMSO u pacienta s primární amyloidózou ledvin pro autologní transplantaci periferních kmenových buněk. 2. konference „Metodologie studia živých organismů při teplotách pod bodem mrazu“ a workshop „Kryokonzervace tkání a buněk“ Česko-slovenské biologické společnosti, z.s., Sekce pro biologii nízkých teplot, Hradec Králové, ČR, 14.-15.9.2020.

Jandová M, Měřička P, Šponer P, Vokurková D, Filipová A, Horynová A, Filip S. New Cryopreservation technology for autologous cultured human mesenchymal stromal cells (hMSCs) – initial experience. 15th Cryogenics 2019 - IIR International Conference, Praha, ČR, 7.-11.4.2019.

Měřička P, Straková H, Honegrová B, Lánská M, Vokurková D, Brandejs D, **Jandová M**, Gregor J, Šponer P, Filip S, Štěrba L. Own experience from the 22 year lasting process of harmonization of the european union safety and quality requirements for harvesting

processing and distribution of human cells and tissues used for clinical transplantation. 15th Cryogenics 2019 - IIR International Conference, Praha, ČR, 7.-11.4.2019.

Jandová M, Šponer P, Vokurková D, Bauer P, Filipova A, Filip S, Mericka P. New cryopreservation technology of hMSCs – first preclinical results using DMSO containing or DMSO-free medium. 55th Scientific Conference of Society for Low Temperature Biology, Seville, Spain, 2.-4.10.2019.

Jandová M, Rabasová J, Balíček P. Vzácné strukturální aberace chromozomu 18 na pracovišti OLG FN HK. Regionální semnář Oddělení lékařské genetiky Fakultní nemocnice Hradec Králové, ČR, 8.2.2019.

Měřička P, Straková H, Honegrová B, Lánská M, Vokurková D, Brandejs D, **Jandová M**, Gregor J, Šponer P, Filip S, Štěrbá L. Vliv změn legislativy Evropské unie na kryokonzervační technologie - zkušenosti tkáňového zařízení Fakultní nemocnice Hradec Králové. VII. český transplantační kongres, Olomouc, ČR, 15.-16.10. 2018.

Měřička P, Straková H, Honegrová B, Lánská M, Vokurková D, Maisnar V, Brandejs D, **Jandová M**, Gregor J, Žák P, Štěrbá L. Retrospektivní analýza zatížení pacientů infuzí kryoprotektiva dimethylsulfoxidu (DMSO) při autologní transplantaci krvetvorných buněk při léčbě mnohočetného myelomu. VII. český transplantační kongres, Olomouc, ČR, 15.-16.10. 2018.

Měřička P, Straková H, Honegrová B, Lánská M, Vokurková D, Maisnar V, Brandejs D, **Jandová M**, Gregor J, Žák P, Štěrbá L. Retrospective analysis of dimethylsulphoxide load in autologous peripheral progenitor cell transplantation in multiple myeloma. 54th Meeting of the Society of Low Temperature Biology, Praha, ČR, 6.-7.9.2018.

Měřička P, Straková H, Honegrová B, Lánská M, Vokurková D, Brandejs D, **Jandová M**, Gregor J, Šponer P, Filip S, Štěrbá L. Impact of changes of the european union legislation on cryopreservation technologies – experience of the Tissue Bank University Hospital Hradec Kralové. 54th Scientific Conference of Society for Low Temperature Biology, Praha, ČR, 6.-7.9.2018.

11.3 Abstrakta publikovaná v zahraničních časopisech

Jandová M, Stacey G, Lánská M, Vokurková D, Fátorová I, Gregor J, Belada D, Radocha J, Měřička, P, Fuller B. Cryopreservation techniques in manufacturing, transport and storage of CAR-T therapy products – initial experience and some ideas for future improvements. *Cryobiology*, 2022 (in print).

Jandová M, Měřička P, Gregor J, Lánská M, Vokurková D, Fátorová I, Bezrouk A, Radocha J. Influence of the Me₂SO removal on key parameters of cryopreserved autologous peripheral progenitor cells (HPC) concentrates a retrospective study in patients with primary or secondary amyloidosis. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 2022 (in print).

Měřička P, Gregor J, **Jandová M**, Lánská M, Vokurková D, Fátorová I, Paterová P, Radocha J. Cryopreservation of peripheral blood progenitor cells for unrelated allogeneic transplantation experience from the first and second wave of the COVID-19 pandemic. *CryoLetters*, 2022 (in print).

Měřička P, Gregor J, **Jandová M**, Brandejs D, Lánská M, Radocha J., Kučera T, Guňka I, Grofová M, Trlica J, Bartoš MC, Špaček M. Impact of the COVID-19 Pandemic on the Donation and Banking Activities of the Tissue Establishment – Experience of the Tissue Bank University Hospital Hradec Králové. *CryoLetters*, 2022 (in print).

Měřička P, **Jandová M**, Gregor, J, Lánská M, Vokurková D, Fátorová I, Paterová P, Radocha J, Štěrba L. Cryopreservation of non-mobilized peripheral blood mononuclear cells (PBMC) - current situation and future perspectives. *CryoLetters*, 2021; 42(6):376-377.

Měřička P, Gregor J, **Jandová M**, Lánská M, Vokurková D, Fátorová I, Paterová, P., Radocha, J, Štěrba, L. Cryopreservation of allogeneic haematopoietic progenitor cells (HPC) concentrates before transplantation - temporary or perspective solution. *CryoLetters*, 2021; 42(6):372.

Jandová M, Šponer P, Vokurková D, Bauer P, Filipova A, Filip S, Mericka P. New cryopreservation technology of hMSCs – first preclinical results using DMSO containing or DMSO-free medium. *CryoLetters*; 2020, 41(3):173.

Měřička P, Straková, H, Honegrová B, Lánská M, Vokurková D, Brandejs D, **Jandová M**, Gregor J, Šponer P, Filip S, Štěrba L. Impact of changes of the european union legislation on cryopreservation technologies – experience of the Tissue Bank University Hospital Hradec Kralove. *CryoLetters*, 2019; 40(5):259.

Měřička P, Straková H, Honegrová B, Lánská M, Vokurková D, Maisnar V, Brandejs, D, **Jandová M**, Gregor J, Žák P, Štěrba L. Retrospective analysis of dimethylsulphoxide load in autologous peripheral progenitor cell transplantation in multiple myeloma. *CryoLetters*, 2019, 40(5), 264-265.

11.4 Abstrakta publikovaná v českých časopisech

Měřička P, **Jandová M**. Význam dokumentu Rady Evropy: „Guide to the quality and safety of tissues and cells for human application“ pro praxi tkáňových zařízení zabývajících se kryokonzervací buněk a tkání pro klinické transplantace *Zpravodaj Česko-slovenské biologické společnosti, z. s.*, 2020; 30(2): 32. ISSN 1805–9619.

Filip S, **Jandová M**, Měřička P, Filipová A, Kopeček M. Kryokonzervace buněk pro 3D biotisk – představa a současné možnosti. *Zpravodaj Česko-slovenské biologické společnosti, z. s.*, 2020, 30(2):34. ISSN 1805–9619.

Filipová A, **Jandová M**, Filip S, Šinkorová Z. Klonogenní analýza mesenchymálních kmenových buněk pro klinickou praxi. *Zpravodaj Česko-slovenské biologické společnosti, z. s.*, 2020; 30(2):34-35. ISSN 1805–9619.

Špaček M, Měříčka P, Janoušek L, Benda A, Dalecká M, Špunda R, Hrubý J, Honegrová B, **Jandová M**, Slížová D, Krs O, Lindner J. Porovnání rozmrazovacích protokolů u humánních kryokonzervovaných safěn – experimentální studie. *Zpravodaj Česko-slovenské biologické společnosti, z. s.*, 2020; 30(2):35-36. ISSN 1805–9619.

Měříčka P, Špaček M, Janoušek L, Benda A, Sabó J, Dalecká M, Špunda R, Hrubý J, Honegrová B, Gregor J., **Jandová M**, Štěrba L, Lindner J. Stanovení vitality buněk cévní stěny kryokonzervovaných cévních štěpů pomocí vitálních barviv a konfokální mikroskopie. *Zpravodaj Česko-slovenské biologické společnosti, z. s.*, 2020; 30(2):36-37. ISSN 1805–9619.

Gregor J, Měříčka P, **Jandová M**, Lánská M, Radocha J, Kacerovský M, Štěpán M. Postavení kryokonzervačních metod v hematologických transplantačních programech. *Zpravodaj Česko-slovenské biologické společnosti, z. s.*, 2020; 30(2):37. ISSN 1805–9619.

Jankovičová K, Vokurková D, **Jandová M**. Stanovení počtu a životnosti kmenových krvetvorných buněk v leukaferetických vzorcích metodou průtokové cytometrie. *Zpravodaj Česko-slovenské biologické společnosti, z. s.*, 2020, 30(2):38. ISSN 1805–9619.

Měříčka P, Gregor J, **Jandová M**, Honegrová B, Lánská M, Vokurková D, Fátorová I, Radocha J. 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. *Zpravodaj Česko-slovenské biologické společnosti, z. s.*, 2020; 30(2):39. ISSN 1805–9619.

Jandová M, Měříčka P, Lánská M. Kazuistika: Odmytí DMSO u pacienta s primární amyloidózou ledvin pro autologní transplantaci periferních kmenových buněk. *Zpravodaj Česko-slovenské biologické společnosti, z. s.*, 2020; 30(2):39-40. ISSN 1805–9619.

11.5 Abstrakta a přehledové práce v recenzovaných sbornících

Měříčka P, **Jandová M**, Gregor J, Štěrba L. New recommendations for the quality and safety of tissues and cells for clinical application and its significance for the practice of Tissue Establishments performing cryopreservation. In 16th Cryogenics 2021 IIR International conference, Refrigeration Science and Technology Proceedings, 2021, 167-171. ISBN: 978-2-36215-047-0.

Měříčka P, Gregor J, **Jandová M**, Lánská M, Radocha J, Štěrba L. Increased qualitative and quantitative requirements put on haematopoietic cell establishments as the result of the COVID-19 pandemic – own experience. In 16th Cryogenics 2019 IIR International conference, Refrigeration Science and Technology, Proceedings, 2021, 173-177. ISBN: 978-2-36215-047-0.

Měřička P, Straková H, Honegrová B, Lánská M, Vokurková D, Brandejs D, **Jandová M**, Gregor J, Šponer P, Filip S, Štěřba L. Own experience from the 22 year lasting process of harmonization of the european union safety and quality requirements for harvesting processing and distribution of human cells and tissues used for clinical transplantation. In: 15th Cryogenics 2019 IIR international conference, Refrigeration Science and Technology, Proceedings, 2019, 280-286. ISBN: 978-2-36215-025-8.280.

11.6 Kapitola v knize

Acker J, Bondarovykh M, Brunote R, Buriak I, Fuller B, Glasmacher B, Goltsev A. Gregor J, Gryshkov O, Herrity K, Honegrova B, Hunt C, **Jandova M**, Johnstone B, Kilbride P, Lanska M, Mann J, Mericka P, Musall K, Mutsenko V, Mykhailova O, Petrenko Y, Radocha J, Sherry A, Stacey G, Sterba L, Vokurkova D, William N, Woods E. Preservation and Storage of Cells for Therapy: Current Applications and Protocols. In: Gimble J.M., Marlot D., Oreffo R.O.C., Wolbank S., Redl H. (eds.) *Tissue Engineering and Regeneration. Cell Engineering and Regeneration*. Springer, 2022.