



SYNCHRONIZÁTOR BUNĚČNÉHO RŮSTU

přístroj k zajišťování produkce synchronizovaných adherentně rostoucích buněčných linií - dokončení vývojové fáze komerčního využití
PCT/CZ2010/000043

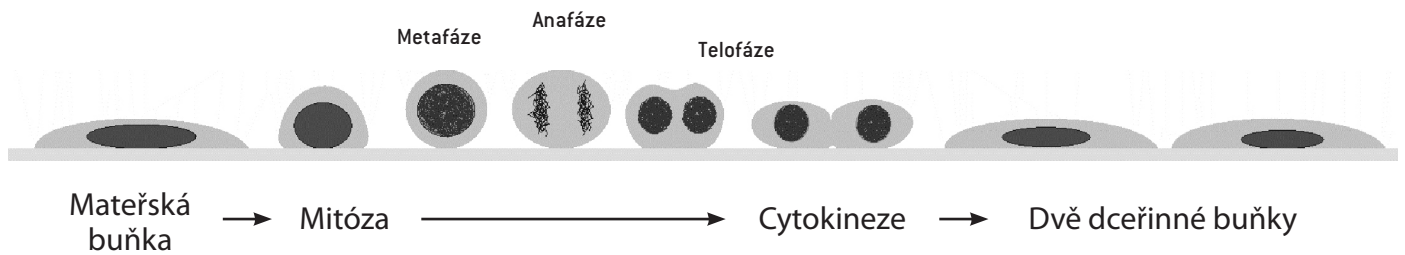
Indukce synchronního růstu buněčné populace kultivované v podmínkách in-vitro

Metoda byla objevena, zdokonalována a testována v roce 2009.

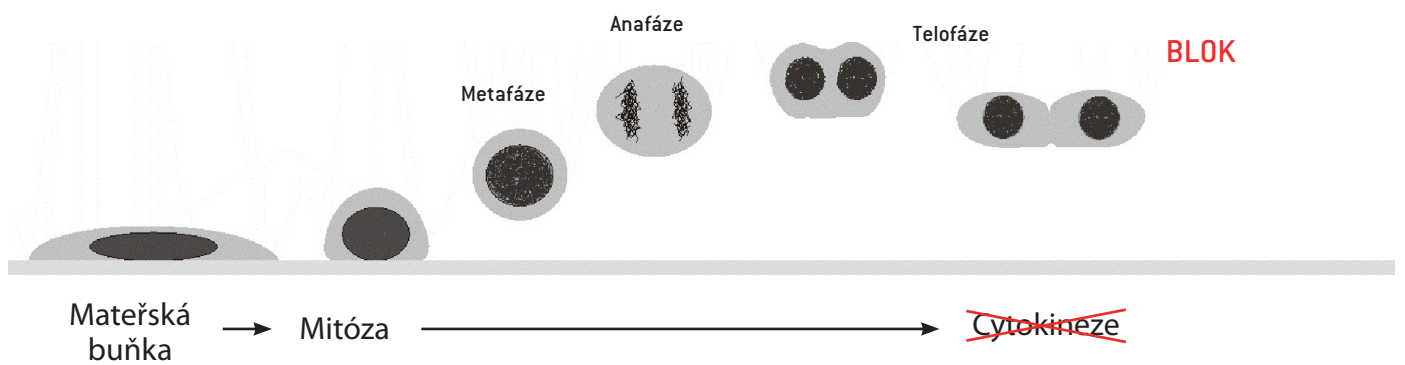
Prezentovaná technologie je primárně určena k zastavení buněčného růstu ve specifické fázi buněčného cyklu. Toho je dosaženo pomocí specializovaného přístroje. Koncepce přístroje vybaveného vlastní výkonnou baterií umožňuje použití uvnitř standardních buněčných inkubátorů a plnou kompatibilitu se standardním kultivačním plastem. Princip přístroje je postaven na speciální vibrační jednotce, která způsobuje definované kmitavé vychylování volně zavěšené plošiny. Tento pohyb rozpohybová kultivační médium v kultivační láhvi pevně přichycené k plošině pomocí elastických popruhů a působí silou na buňky rostoucí přisedle na dně kultivační nádoby. Buňky se slabou adhezí ke kultivační podložce jsou touto silou strhávány do suspenze. Jedná se převážně o buňky mitotické, kterým fyziologický stav probíhající mitózy nedovoluje plnohodnotnou adhezi k podložce.

Mitotickým buňkám vyplaveným do suspenze kontinuální kmitavý pohyb média neumožňuje znovu adherovat a stávají se tak vynuceně suspenzními. Tato indukovaná kultivační změna v případě mitotických buněk vyvolá přerušování mitózy v pozdní telofázi. Jinými slovy nedojde k úplnému rozdělení mateřské buňky ve dvě dceřiné. Tento blok proliferace je v rozmezí 24 hodin netoxický a plně reverzibilní. Pokud je tedy takto zablokované telofázní buňce umožněno znovu usednout na kultivační podložku snadno dokončuje mitózu a pokračuje v buněčném růstu. Suspenze telofázních buněk vytvořená z normální populace pomocí přístroje je tedy ideálním základem nové buněčné populace u níž je z experimentálních důvodů vyžadovaná homogenita ve smyslu fáze buněčného cyklu.

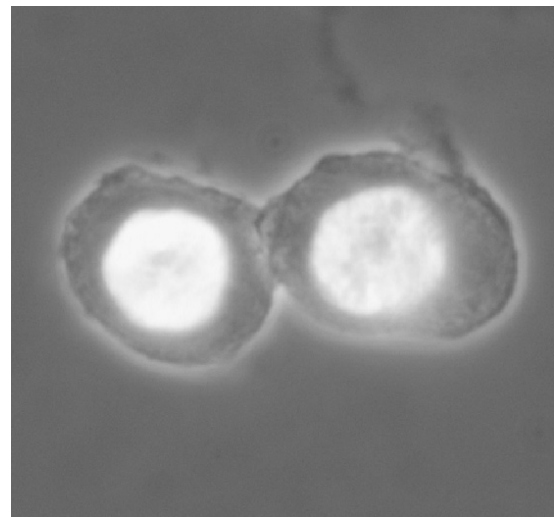
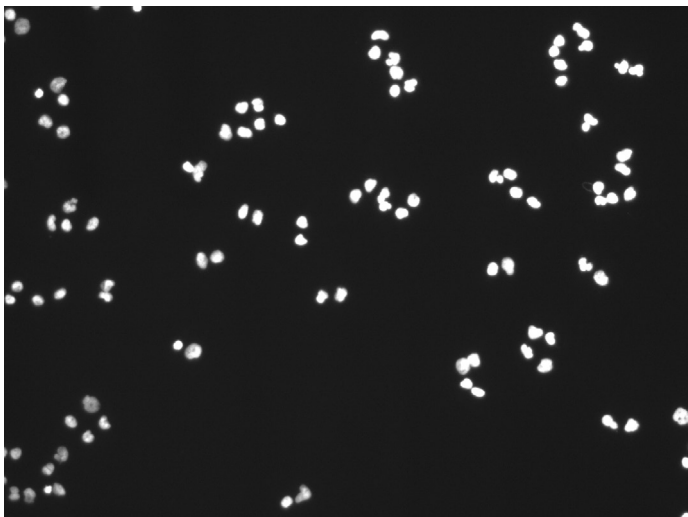
Normální růst



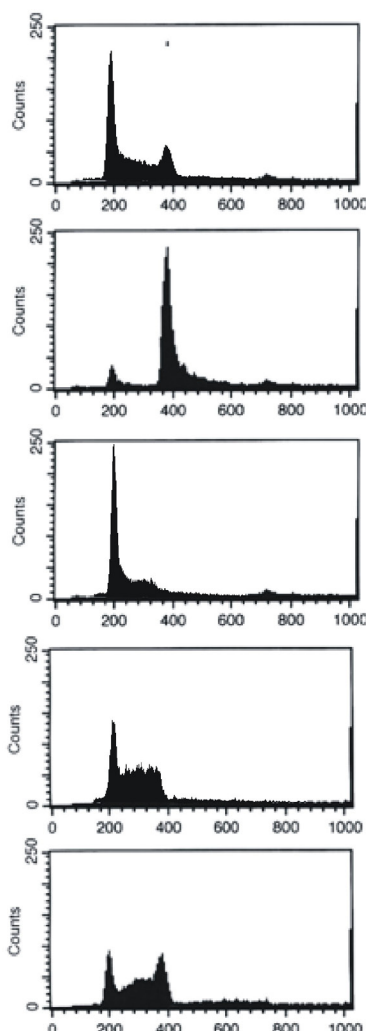
Aplikace přístroje



Obrázek: Schematické znázornění principu zablokování buněčného růstu v telofázi.



Obrázek: Mikroskopický snímek ukazující dvoujadernost (telofázi) buněk suspenzní frakce.



1. Normální populační profil lidské buněčné linie U-2-OS pěstované v in-vitro podmínkách.

2. Frakce suspenzních buněk získaná užitím přístroje (aplikace vibrací po 24hodin). Majoritu populace tvoří dvoujaderné buňky (viz. Obr.3) na profilu patrná jako výrazný pík v oblasti „400“.

3. Po čtyřech hodinách od vysazení suspenzní frakce buňky dokončily mitózu a pomalu začínají přecházet do S-fáze.

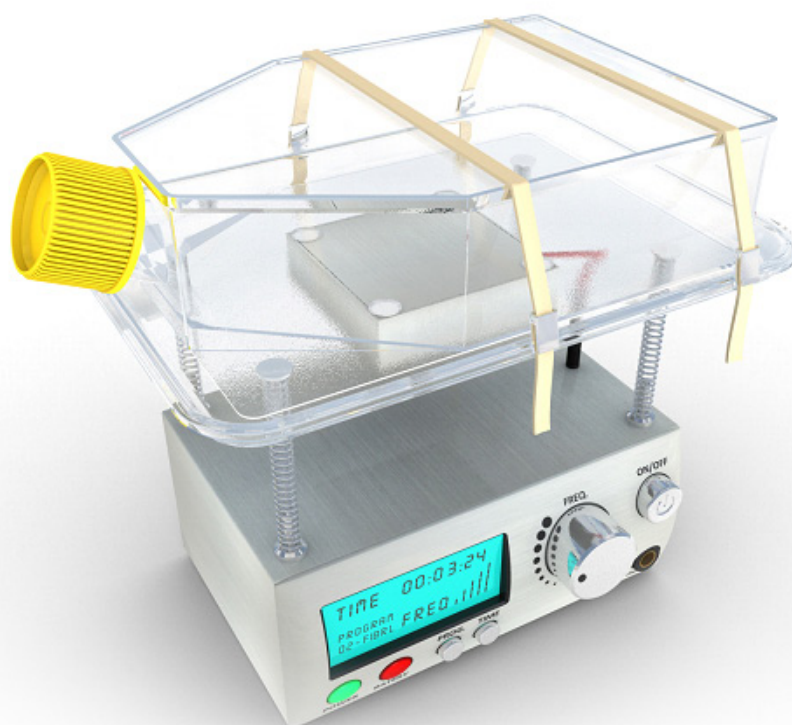
4. Po deseti hodinách od vysazení suspenzní frakce je majorita buněk v S-fázi.

5. Po šestnácti hodinách od vysazení suspenzní frakce většina buněk dokončuje S-fázi a začíná vstupovat do mitózy (M-fáze).

Obrázek: Analýza buněčného cyklu suspenzní frakce vysazené na novou kultivační misku

Metoda i přístroj jsou chráněny PCT/CZ2010/000043. K dispozici je i funkční prototyp, který prokázal proveditelnost řešení v praxi a jeho účinnost. Přístroj je tvořen třemi základními částmi:

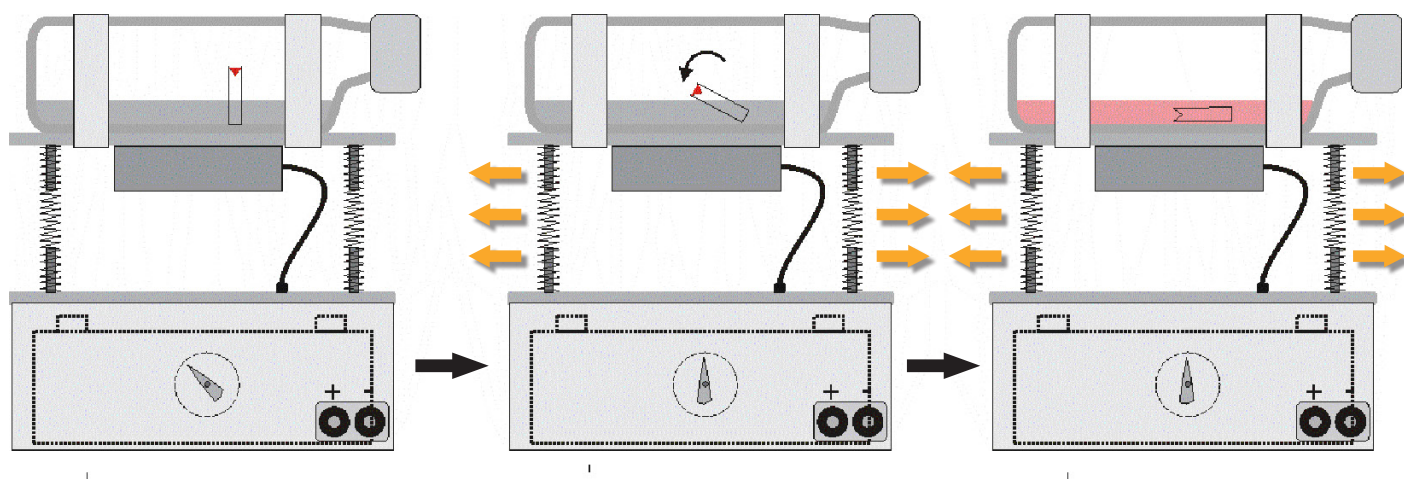
- volně zavěšenou plošinou s úchyty pro uchycení kultivačních nádob (kultivační nádoby nejsou součástí přístroje ani patentové ochrany)
- vibrační jednotkou pevně spojenou s plošinou
- podstavcem s bateriovým zdrojem a regulátorem vibrační jednotky



Obrázek: Možné řešení designu přístroje

Další využití synchronizátoru: automatický dávkovač chemikálií k buněčným kulturám pěstovaným v podmínkách in-vitro:

Přístroj má krom své primární funkce (viz výše) ještě další využití zvyšující tak jeho případné uplatnění v laboratorní praxi. Princip je opět postaven na periodickém kmitavém vychylování volně zavěšené plošiny. Tento pohyb rozpohybovává kultivační médium v kultivační láhvi pevně přichycené k plošině pomocí elastických popruhů, které působí silou na labilně stojící patronu z inertního materiálu s obsahem chemického aditiva. Patrona je působením této síly převrhnuta čímž dojde ke styku chemického aditiva s kultivačním médiem. Přetrvávající kmitavý pohyb navíc způsobí dokonalé promíchání aditiva s kultivačním médiem. V kombinaci s časovačem umožňující programování doby sepnutí vibrace a její délky tak přístroj umožňuje dávkovat chemikálii nezávisle na přítomnosti laboranta. Jedná se o velmi přínosnou aplikaci, umožňující plně přizpůsobení se nárokům buněk nezávisle na pracovní době laboranta. Tato funkce do jisté míry nahrazuje velmi nákladné robotické systémy a je zahrnuta v kalkulaci ve studii firmy Trystom.



Obrázek: Schematické znázornění aplikace přístroje jako automatického dávkovače chemikálií k buněčné populaci pěstované v podmínkách in-vitro

Předpokládané náklady na přípravu výroby:

Předpokládané náklady vynaložené před začátkem sériové výroby (vychází ze zpracované analýzy konstrukčních a výrobních nákladů u firmy Trystom, spol. s r.o.):

- 1.) náklady na dořešení mechanické konstrukce a elektronického modulu v odhadované výši **EUR 3300**
- 2.) náklady na výrobu nového prototypu včetně předvýrobní přípravy v odhadované výši **EUR 1200**
- 3.) náklady na validaci přístroje, včetně zátěžových testů, testů odolnosti a životnosti, testy elektrické bezpečnosti a elektromagnetické kompatibility, vystavení ES prohlášení a CE certifikátu v odhadované výši **EUR 3400 – 4800**



Předpokládané náklady na sériovou výrobu:

Synchronizátor bude obsahovat: baterii, motorek, vibrační desku s pružným ukotvením, vodotěsnou skříň řídicí jednotku motoru, řídicí desku, display, ovládací prvky, dobíjecí modul, nabíječku. Přístroj bude balen v papírové krabici s pěnovými transportními výplněmi a dodáván po hodinovém „zahořovacím provozu“ se zárukou 24 měsíců.

Odhadovaná výrobní cena:

Roční objem	Výrobní dodávka	Cena za kus
10 – 100ks	10ks	EUR 380*
100 – 1000ks	100ks	EUR 270*
1000 – 10000ks	1000ks	EUR 100*

* za podmínky výroby v ČR

Všechny ceny jsou uváděny bez DPH.

Předpokládaná prodejní cena:

Předpokládaná prodejní cena s ohledem na výrobky podobných konstrukčních nároků EUR 1200 – 2000.

Zákazníci:

Laboratoře základního a aplikovaného výzkumu využívající živočišné buněčné linie pěstované v podmínkách *in-vitro*.

Předpokládaný odbyt:

Desítky tisíc kusů celosvětově.

Výpočet odbytu:

Postaven na odhadu odbytu pro Českou republiku, který provedla tři nezávislá pracoviště splňující podmínku případného koncového zákazníka. Toto číslo bylo vztaženo na celkový počet patentů třídou odpovídající prezentovanému technickému řešení pro ČR a další země.

Počet patentů v třídě c12m3/00 c12m3/02 c12n5/02
(ve které je zaříděna prezentovaná technologie)

Země	Počet patentů	Odhadovaný odbyt
Česká republika	18	desítky kusů
Německo	1289	tisíce kusů
Japonsko	4369	tisíce kusů
USA	7045	desítky tisíc kusů

Jaké výhody mám oproti konkurenci:

Metoda	Univerzál- nost	Toxicita	Výtěžek	Čistota popu- lace	Nároky na provedení	Náklady
Chemická inhibice	Vysoká	Vysoká	Vysoký	Střední	Vysoké	Nízké
Sérová nedostateč- nost	Nízká	Střední	Vysoký	Vysoká	Nízké	Nízké
Elutriace	Vysoká	Nízká	Vysoký	Nízká	Vysoké	Vysoké
Buněčný sorting	Vysoká	Střední	Střední	Vysoká	Vysoké	Vysoké
Vytřepání mitóz	Vysoká	Nízká	Nízký	Vysoká	Střední	Nízké
PCT 2010/000043	Vysoká	Nízká	Vysoký	Vysoká	Nízké	Nízké

Tabulka: Srovnání výhod a nevýhod standardních synchronizačních metod vůči prezentované technologii (zeleně = pozitiva, červeně = negativa)

Konkurenční produkt neexistuje. Mechanický synchronizátor buněk není v nabídce žádné firmy.



Celkové shrnutí vlastností mého technického řešení:

- nová metoda produkce synchronizovaných adherentně rostoucích buněčných linií bez použití toxických chemikálií
- reálná prodejní cena přístroje v „psychologické“ hranici pro nákup (nejedná se o investici)
- žádný speciální spotřební materiál, používají se běžné kultivační lahve
- možnost dalších aplikací (automatický dávkovač chemikálií, univerzální bateriová třepačka)

Podmínky poskytnutí licence:

Podmínky poskytnutí licence budou projednány na osobním jednání.

Kontakty:

Univerzita Palackého v Olomouci, Křížkovského 8, 771 47 Olomouc, Česká republika

IČ: 619 89 592 DIČ: CZ61989592

Mgr. Martin Mistrík, Ph.D.

spoluvynálezce přístroje a metody

Přírodovědecká fakulta, Laboratoř genomové integrity

email: martin.mistrík@upol.cz

telefon: 585 634 873

Martin Šimo

projektový manažer

Vědeckotechnický park Univerzity Palackého v Olomouci

email: martin.simo@vtpup.cz

telefon: 585 631 438