

PATENTNI ZAHTEJEVI

1. Postupak mjerenja udjela vijabilnih stanica u staničnoj populaciji održavanoj u mediju za kulturu stanica, **naznačen time** da se postupak sastoji od:

- (a) određivanja enzimске aktivnosti stabilne stanične smrti (Y) u dijelu kondicioniranog medija stanične kulture koji ne sadržava stanice iz populacije stanica;
- (b) narušavanja integriteta membrane stanica u dijelu medija stanične kulture koji sadržava populaciju stanica;
- (c) određivanja enzimске aktivnosti stabilne stanične smrti (X) u stanicama i kondicioniranom mediju navedenog dijela medija stanične kulture koji sadrži stanice iz populacije stanica; i
- (d) usporedbe razine enzimске aktivnosti stabilne stanične smrti (X) u stanicama i kondicioniranom mediju dijela medija stanične kulture koji sadrži stanice prema razini enzimске aktivnosti stabilne stanične smrti (Y) u dijelu kondicioniranog medija stanične kulture koji ne sadržava stanice;

pri čemu se udio vijabilnih stanica u populaciji stanica može izračunati prema formuli:

$$\frac{X - cY}{X + Y}$$

pri čemu

$$c = \frac{1-f}{f}$$

i f je udio ukupnog kondicioniranog medija koji se nalazi u dijelu kondicioniranog medija stanične kulture koji ne sadržava stanice iz populacije stanica.

2. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time** da postupak je postupak mjerenja udjela vijabilnih stanica u produktu preinačenog-tkiva održavanom u mediju za kulturu stanica, te pri čemu se postupak sastoji od:

- (a) određivanja enzimске aktivnosti stabilne stanične smrti (Y) u dijelu kondicioniranog medija stanične kulture koji ne sadrži stanice produkta preinačenog-tkiva;
- (b) narušavanja integriteta membrane stanica u dijelu medija stanične kulture koji sadrži stanice produkta preinačenog-tkiva;
- (c) određivanja enzimске aktivnosti stabilne stanične smrti (X) u stanicama i kondicioniranom mediju navedenog dijela medija stanične kulture koji sadrži stanice produkta preinačenog-tkiva; i
- (d) usporedbe razine enzimске aktivnosti stabilne stanične smrti (X) u dijelu medija stanične kulture koji sadrži stanice i kondicionirani medij produkta preinačenog-tkiva prema razini enzimске aktivnosti stabilne stanične smrti (Y) u dijelu kondicioniranog medija stanične kulture koji ne sadržava stanice produkta preinačenog-tkiva, pri čemu udio vijabilnih stanica u produktu preinačenog-tkiva se može izračunati prema formuli:

$$\frac{X - cY}{X + Y}$$

pri čemu

$$c = \frac{1-f}{f}$$

i f je udio ukupnog kondicioniranog medija koji je prisutan u dijelu kondicioniranog medija stanične kulture koji ne sadržava stanice iz populacije stanica.

3. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time** da postupak je postupak mjerenja udjela vijabilnih stanica u produktu preinačenog-tkiva održavanoj u mediju za kulturu stanica, te pri čemu se postupak sastoji od:

- (a) pripreme dijela uzorka produkta preinačenog-tkiva koji sadržava stanice i proporcionalnu količinu kondicioniranog medija stanične kulture;
- (b) određivanja enzimске aktivnosti stabilne stanične smrti (Y) u dijelu kondicioniranog medija stanične kulture koji ne sadrži stanice produkta preinačenog-tkiva iz dijela uzorka pripremljenog u koraku (a);
- (c) narušavanja integriteta membrane stanica u dijelu uzorka produkta preinačenog-tkiva pripremljenog u koraku (a);
- (d) određivanja enzimске aktivnosti stabilne stanične smrti (X) u stanicama i kondicioniranom mediju dijela uzorka produkta preinačenog-tkiva pripremljenog u koraku (a); te
- (e) usporedbe razine enzimске aktivnosti stabilne stanične smrti određene u koracima (b) i (d), pri čemu kada je omjer ukupnog postotka stanica prema ukupnom postotku kondicioniranog medija stanične kulture u dijelu uzorka 1:1, udio vijabilnih stanica u produktu preinačenog-tkiva se može izračunati prema formuli:

$$\frac{X - cY}{X + Y}$$

pri čemu

$$c = \frac{1-f}{f}$$

i f je udio ukupnog uzorka kondicioniranog medija koji je prisutan u dijelu kondicioniranog medija stanične kulture koji ne sadržava stanice iz populacije stanica;

i pri čemu kada je omjer postotka stanica prema postotku kondicioniranog medija stanične kulture u dijelu uzorka odstupa od 1:1, udio vijabilnih stanica u produktu preinačenog-tkiva se može izračunati prema formuli:

$$\frac{X - cY}{X + Y + 2Y(\alpha - 1)}$$

pri čemu

$$c = \frac{1-f}{f}$$

i f je udio ukupnog uzorka kondicioniranog medija koji je prisutan u dijelu kondicioniranog medija stanične kulture koji ne sadrži stanice iz populacije stanica;

i pri čemu α je omjer postotka ukupnih stanica prema postotku ukupnog kondicioniranog medija koji je prisutan u uzorku.

4. Postupak prema zahtjevu 3, **naznačen time** da se membranski integritet stanica u dijelu uzorka produkta preinačenog-tkiva poremećuje smicanjem, sonikacijom, niskim barometarskim tlakom, visokom temperaturom, niskom temperaturom, kemijskom ili enzimskom lizom, ili agensima za membransko razdvajanje.

5. Postupak prema zahtjevu 4, **naznačen time** da se membranski integritet stanica u dijelu uzorka produkta preinačenog-tkiva poremećuje dodavanjem amfifila.

6. Postupak prema zahtjevu 5, **naznačen time** da amfil je saponin.

7. Postupak prema zahtjevu 1, **naznačen time** da postupak je postupak mjerenja udjela vijabilnih stanica u produktu preinačenog-tkiva održavanoj u mediju za kulturu stanica, te pri čemu se postupak sastoji od:

(a) pripreme dijela produkta preinačenog-tkiva koji sadržava stanice i proporcionalnu količinu kondicioniranog medija stanične kulture;

(b) pripreme dijela kondicioniranog medija stanične kulture, pripremljenog u koraku a), koji ne sadržava stanice produkta preinačenog-tkiva;

(c) dodavanja saponina, te bis-(Ala-Ala-Phe)-Rodamin-110 u uzorke pripremljene u koracima a) i b); te

(d) određivanja fluorescencija koje odgovaraju cijepanom bis-(Ala-Ala-Phe) Rodamin-110 u uzorcima pripremljenim u koracima a) i b), pri čemu su stanice ljudski kondrociti, održavani u matrici u gustoći od između 1.5×10^4 i 6×10^6 stanica/cm².

8. Postupak mjerenja citotoksičnosti tretmana sa stanicama u produktu preinačenog-tkiva održavanoj u mediju za kulturu stanica **naznačen time** da se sastoji od:

(a) primjene tretmana na produkt preinačenog-tkiva;

(b) određivanja enzimске aktivnosti stabilne stanične smrti (Y) u dijelu kondicioniranog medija stanične kulture koji ne sadrži stanice produkta preinačenog-tkiva;

(c) narušavanja integriteta membrane stanica u dijelu medija stanične kulture koji sadrži stanice produkta preinačenog-tkiva;

(d) određivanja enzimске aktivnosti stabilne stanične smrti (X) u stanicama i kondicioniranom mediju navedenog dijela medija stanične kulture koji sadrži stanice produkta preinačenog-tkiva; i

(e) usporedbe razine enzimске aktivnosti stabilne stanične smrti (X) u dijelu medija stanične kulture koji sadrži stanice produkta preinačenog-tkiva prema razini enzimске aktivnosti stabilne stanične smrti (Y) u dijelu kondicioniranog medija stanične kulture koji ne sadržava stanice produkta preinačenog-tkiva,

pri čemu je citotoksičnost tretmana proporcionalna prema razlici u udjelu vijabilnih stanica u obrađenom produktu preinačenog-tkiva prema neobrađenom produktu preinačenog-tkiva, te pri čemu se udio vijabilnih stanica u produktu preinačenog-tkiva može izračunati prema formuli:

$$\frac{X - cY}{X + Y}$$

pri čemu

$$c = \frac{1-f}{f}$$

i f je udio ukupnog kondicioniranog medija koji je prisutan u dijelu kondicioniranog medija stanične kulture koji ne sadržava stanice iz populacije stanica.

9. Postupak prema bilo kojem zahtjevu od 1, 2, 3, ili 8, **naznačen time** da stanice su stanice sisavca.

10. Postupak prema zahtjevu 9, **naznačen time** da su stanice ljudske.

11. Postupak prema zahtjevu 10, **naznačen time** da su stanice kondrociti.

12. Postupak prema zahtjevu 9, **naznačen time** da se stanice uzgajaju na matrici.
13. Postupak prema zahtjevu 9, **naznačen time** da su stanice prisutne u gustoći od između 1.5×10^4 i 6×10^6 stanica/cm².
14. Postupak prema bilo kojem zahtjevu od 1, 2, 3, 7, ili 8, **naznačen time** da su stanice prisutne u visokoj gustoći od barem 2.0×10^5 stanica/cm².
- 5 15. Postupak prema zahtjevu 14, **naznačen time** da su stanice prisutne u količini od između 2×10^5 i 6×10^6 stanica/cm².
16. Postupak prema bilo kojem zahtjevu od 1, 2, 3, 7, ili 8, **naznačen time** da se enzimska aktivnost stabilne stanične smrti mjeri pomoću koraka koji se sastoje od:
 - (a) kontakta uzorka sa supstratom enzimске aktivnosti stabilne stanične smrti pri čemu je supstrat konjugiran na odlaznu skupinu koja se može otkriti; i
 - 10 (b) otkrivanja odlazne skupine, pri čemu je količina otkrivenih odlaznih skupina proporcionalna sa razinom enzimске aktivnosti stabilne stanične smrti.
17. Postupak prema zahtjevu 16, **naznačen time** da odlazna skupina je kromogena, luminogena, ili fluorescentna.
18. Postupak prema zahtjevu 17, **naznačen time** da odlazna skupina je fluorescentna.
- 15 19. Postupak prema zahtjevu 18, **naznačen time** da odlazna skupina je Rodamin-110.
20. Postupak prema zahtjevu 16 **naznačen time** da supstrat je bis-(Ala-Ala-Phe)-Rodamin-110.
21. Postupak prema zahtjevu 18, **naznačen time** da odlazna skupina je derivat kumarina.
22. Postupak prema zahtjevu 21, **naznačen time** da odlazna skupina je AMC.
23. Postupak prema zahtjevu 22, **naznačen time** da supstrat je Ala-Ala-Phe-AMC.
- 20 24. Postupak prema zahtjevu 16, **naznačen time** da dodatno sadrži korak dodavanja agensa koji modulira signal odlazne skupine koju se može otkriti.
25. Postupak prema zahtjevu 24, **naznačen time** da agens koji modulira signal odlazne skupine, slabi signal odlazne skupine.
26. Postupak prema zahtjevu 25, **naznačen time** da agens koji slabi signal odlazne skupine je fenol crveno.
- 25 27. Postupak prema zahtjevu 26, **naznačen time** da je agens fenol crveno prisutan u koncentraciji do 500 mg/L.
28. Postupak prema bilo kojem zahtjevu od 1, 2, 3, 7 ili 8, **naznačen time** da enzimska aktivnost stabilne stanične smrti je proteolitička.
29. Postupak prema zahtjevu 28, **naznačen time** da enzimska aktivnost stabilne stanične smrti sadrži jednu ili više tripeptidil peptidaza.
- 30 30. Postupak prema bilo kojem zahtjevu od 1, 2, 3, 7, ili 8, **naznačen time** da je enzimska aktivnost stabilne stanične smrti oboje i nekrotična i programirana enzimska aktivnost stabilne stanične smrti.
31. Postupak prema zahtjevu 30, **naznačen time** da je enzimska aktivnost stabilne stanične smrti programirana enzimska aktivnost stabilne stanične smrti.
32. Postupak prema zahtjevu 30, **naznačen time** da je enzimska aktivnost stabilne stanične smrti nekrotična stabilna enzimska aktivnost.
- 35