

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 30 612

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

**C08G 63/08** (2006.01)

**C07K 2/00** (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-33078**

(22) Přihlášeno: **23.11.2016**

(47) Zapsáno: **02.05.2017**

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

(72) Původce:  
prof. RNDr. Evžen Amler, CSc., Praha 7 -  
Holešovice. CZ  
Mgr. Věra Lukášová, Liberec, CZ  
Mgr. Matěj Buzgo, Turňa nad Bodvou, SK  
Mgr. Věra Sovková, Praha 8, CZ  
Mgr. Michala Rampichová, Ph.D., Praha 6. CZ  
Mgr. Veronika Blahnová, Dobříš, CZ  
Mgr. Andrea Míčková, Ph.D., Šamorín, SK  
MUDr. Ing. Karolína Vocetková, Velká Přílepy, CZ  
Mgr. Eva Filová, Ph.D., Praha 4, CZ

(74) Zástupce:  
Mgr. Václav Karlíček, advokát, soudní znalec,  
Vinohradská 6, 120 00 Praha 2

(54) Název užitného vzoru:  
**3D kompozitní gely pro řízenou diferenciaci  
buněk v podmínkách in vitro**

**CZ 30612 U1**

### 3D kompozitní gely pro řízenou diferenciaci buněk v podmínkách *in vitro*

#### Oblast techniky

Technické řešení se týká třídimenzionálního (3D) hydrogelového nosiče pro řízenou diferenciaci buněk připraveného na bázi kompozitního nosiče složeného ze složky gelové a ze složky kovalentně modifikovaných polykaprolaktonových (PCL) kapslí.

#### Dosavadní stav techniky

Jedním z hlavních požadavků kladených na vývoj třídimenzionálních (3D) nosičů, je možnost buněk migrovat do hloubky nosiče. 3D proto musí být vysoce porézní nebo obohaceny o specifické bioaktivní molekuly, aby bylo docíleno migrace buněk dovnitř nosiče. Bez dostatečného stimulu buňky adherují pouze na povrch nosiče a nedochází ke vzniku 3D tkáně. Vysoce porézní nosiče však nesplňují požadavky z hlediska mechanických vlastností buněčných nosičů. Obohacení méně porézních nosičů o bioaktivní molekuly vede, v dynamických kultivačních podmínkách, k migraci buněk do hloubky nosiče.

*In vitro* kultivace buněk na 3D buněčných nosičích při statických podmínkách nevykazuje dostatečné stimuly pro nově vytvářenou tkáň a to ani v případě, že bioaktivní molekuly se nachází uvnitř nosiče. Buňky při vrůstání do celého objemu nosiče nemají uvnitř nosiče dostatečné zásobené živinami a dochází zde k nekrózám. Inkubace buněk v bioreaktoru na 3D buněčných nosičích obohacených o bioaktivní molekuly stimuluje buněčnou diferenciaci. Navíc rovnoměrná inkorporace bioaktivních molekul uvnitř nosiče, a nejen na jeho povrchu, stimuluje prorůstání buněk do celého objemu nosiče. Užití biomimetických 3D nosičů obohacených o bioaktivní látky vede k buněčné diferenciaci a migraci buněk dovnitř nosiče. Vznikající tkáň pak ve své struktuře i mechanických vlastnostech připomíná plnohodnotnou tkáň.

Vhodnými bioaktivními molekulami pro použití při výrobě 3D biomimetických nosičů jsou krátké peptidové sekvence odvozené z aktivních oblastí molekul extracelulární matrix (ECM). Užití peptidů vykazuje řadu výhod v porovnání s používáním celých nativních proteinových struktur. Předchází se tak možné imunogenicitě, krátkému poločasů životnosti a vedlejším efektům spojeným s tumory. Funkcí peptidů je napodobit přirozenou ECM s důrazem na poskytnutí vazebných míst pro receptory přítomné na buňkách. Testována byla již celá řada aminokyselinových sekvencí odvozených z různých proteinů vyskytujících se v ECM. Například aminokyselinová sekvence RGD byla již mnohokrát testována s cílem navodit buněčnou diferenciaci. Ovšem u této sekvence byl prokázán vliv jak na osteogenní diferenciaci, tak na chondrogenní diferenciaci. Pro navození specifického typu buněčné diferenciace je třeba vhodně zvolit aminokyselinovou sekvenci se selektivním vlivem na buněčnou diferenciaci.

Použití aminokyselinové sekvence GTPGPQGIAGQRGVV, odvozené z řetězce  $\alpha$  kolagenu I, bylo již zaznamenáno v klinických studiích. Tato sekvence se označuje jako peptid P-15. P-15 kostní štěp je kombinací peptidu P-15 s OsteoGrafem. Užití peptidů s aminokyselinovou sekvencí odvozenou z proteinů ECM, vyskytujících se u daného buněčného typu, má výhody ve specifické buněčné diferenciaci. Protein BMP-2 indukuje expresi genů osteoblastů a mineralizaci ECM v primární kultuře lidských mesenchymálních kmenových buněk (hMSC). Peptidový fragment odvozený z BMP-2, konkrétně z kolenního epitopu residua 73-92, má aminokyselinovou sekvenci KIPKASSVPTEILSAYSTLYL a byl u něj prokázán vliv na osteogenní diferenciaci. Takzvané kolagen mimikující peptidy mají aminokyselinové sekvence GFOGER,  $(GPO)_4GFOGER(GPO)_4GCG$ ,  $(POG)_7Y$  (O značí hydroxyprolin). Tyto peptidy jsou odvozeny z kolagenu, molekuly hojně se vyskytující v ECM chondrocytů. POG tripeptid v opakující se sekvenci napodobuje triplhelikální strukturu kolagenu. GFOGER sekvence je navíc odvozena z residua 502-507  $\alpha 1$  kolagenního řetězce. Liu et al, prokázali efekt navázané aminokyselinové sekvence  $(GPO)_4GFOGER(GPO)_4GCG$  na chondrogenní diferenciaci hMSC. Taktéž Lee et al, prokázali vliv aminokyselinové sekvence  $(POG)_7Y$  na chondrogenní diferenciaci MSC.

Krátké peptidy mohou být snadno použity pro povrchovou funkcionalizaci nosičů díky své menší velikosti a jednoduché modifikaci N- či C-konce. Tím je docíleno jednodušší imobilizace a při-

tomné peptidy jsou prezentovány na povrchu biomateriálu ve vysoké a konstantní hustotě, při zanechané funkčnosti a bioaktivitě. Z těchto důvodů se předpokládá, že peptidy v kombinaci s biomateriály jsou způsobilé pro užití v regenerativní terapii. Existuje celá řada peptidů, které již byly úspěšně navázány na nosiče. Možností vazby peptidů na nosič je více druhů v závislosti na typu nosiče. RGD byla již konjugován s mnoha typy nosičů, například s polyethylenoxidem (PEO), polykaprolaktonem (PCL), kyselinou poly-L-mléčnou (PLLA) a chitosanem. Liu et al. prokázali efekt navázané aminokyselinové sekvence (GPO)<sub>4</sub>GFOGER(GPO)<sub>4</sub>GCG.

#### Podstata technického řešení

Podstatou technického řešení je přímo použitelný 3D kompozitní nosič pro řízenou diferenciaci buněk, složený z kolagenové gelové složky a z polykaprolaktonových (PCL) kapslí modifikovaných navázanými peptidy, dle níže popsané metody. Nosič je možné využít zejména pro *in vitro* laboratorní experimenty.

Polykaprolakton (PCL) je biodegradabilní, biokompatibilní a pro lékařské účely schválený polymer. Z tohoto polymeru jsou pomocí elektrostatického zvlákňování připraveny nanovlákněné vrstvy, které jsou povrchově modifikovány.

Účinnou a lehce proveditelnou metodou povrchové modifikace polykaprolaktonového (PCL) nosiče je modifikace povrchu polykaprolaktonových (PCL) nanovláken pomocí hydroxidu sodného, což vede k hydrolyze esterové vazby v polykaprolaktonových (PCL) nanovlákněch. Vznikne karboxylátový ion, který se aktivuje pomocí karbodiimidu/N-hydroxysuccinimidu (EDC/NHS) chemie. Vzniklý NHS ester napomáhá vzniku kovalentní peptidové vazby mezi karboxylátovým iontem a aminoskupinou peptidu. Výsledkem tohoto postupu je biomimetický nanovlákněný nosič s navázanými peptidy, které slouží k aktivaci signálních drah adheovaných buněk prostřednictvím aktivace specifických buněčných receptorů.

Kapsle jsou vytvořeny pomocí kryogenního mletí z polykaprolaktonových (PCL) nanovláken. Tyto kapsle jsou po povrchové modifikaci pomocí kovalentní vazby peptidu smíchány s TISSEEL Lyo gelem.

Peptidy jsou zvoleny s ohledem na navození osteogenní diferenciaci, pak je povrch modifikován peptidem odvozeným z BMP-2 proteinu.

Přidání kapslí modifikovaných peptidy jednak přispívá k vytvoření biomimetického nosiče, ale také zlepšuje mechanické vlastnosti nosiče a rovněž napomáhá k lepší stabilitě/rozpadu vytvořeného 3D nosiče.

#### Příklady uskutečnění technického řešení

##### Příklad 1

3D kompozitní gel, příkladně TISSEEL, pro řízenou osteogenní diferenciaci hMSC, obsahující rozemletá nebo rozdrcená polykaprolaktonová (PCL) nanovlákná s adheovaným proteinem BMP-2 v koncentraci 100 mg/1ml umístěný v jamkách destičky v kultivačním médiu obsahujícím přísávek 10% FBS, 1% Penicilin/Streptomycin (100 IU/mL and 100 µg/mL, resp.), 100nM dexamethasone, 10mM β-glycerol fosfátu a 50 µg/ml askorbát-2-fosfátu.

##### Příklad 2

3D kompozitní gel, příkladně TISSEEL, pro řízenou osteogenní diferenciaci buněk osteosarkomových linií, obsahující rozemletá nebo rozdrcená polykaprolaktonová (PCL) nanovlákná s adheovaným proteinem BMP-2 v koncentraci 100 mg/1ml umístěný v jamkách destičky v kultivačním médiu obsahujícím přísávek 10% FBS, 1% Penicilin/Streptomycin (100 IU/mL and 100 µg/mL, resp.), 100nM dexamethasone, 10mM β-glycerol fosfátu a 50 µg/ml askorbát-2-fosfátu.

Průmyslová využitelnost

3D kompozitní nosič pro řízenou diferenciaci buněk, je možné využít, mimo jiné, zejména pro *in vitro* laboratorní experimenty.

**NÁROKY NA OCHRANU**

- 5 **1.** 3D kompozitní kolagenový hydrogelový materiál pro řízenou osteogenní diferenciaci lidských mezenchymálních kmenových buněk hMSC, který je umístěn v jamkách destičky určené pro použití v bioreaktoru, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že obsahuje rozmělněná polykaprolaktonová nanovlákna s adherovaným proteinem BMP-2 v koncentraci 50 až 200 mg/1ml hydrogelu.

---

Konec dokumentu

---