

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

30 686

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

C12M 3/00 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2016-32290**
(22) Přihlášeno: **15.04.2016**
(47) Zapsáno: **18.05.2017**

- (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 Sovková, Praha, CZ
Mgr. Jana Daňková, Bystřec, CZ
Mgr. Eva Filová, Ph.D., Praha 4, CZ
Mgr. Martin Pienčner, Ph.D., Bratislava, SK
Mgr. Michala Rampichová, Ph.D., Praha 6, CZ
Mgr. Věra Lukášová, Liberec, CZ
Mgr. Andrea Míčková, Ph.D., Šamorín, SK
MUDr. Ing. Karolína Vocetková, Velká Přílepy, CZ
- (74) Zástupce:
Mgr. Václav Karlíček, advokát, Mgr. Václav
Karlíček, advokát, soudní znalec, Vinohradská 6,
120 00 Praha 2

- (54) Název užitého vzoru:
**Variabilní kit pro kultivaci buněčných
struktur v kultivačních destičkách**

CZ 30686 U1

Variabilní kit pro kultivaci buněčných struktur v kultivačních destičkách

Oblast techniky

5 Technické řešení se týká variabilního kitu pro přímé použití v kultivačních destičkách připraveného na bázi polykaprolaktonových (PCL) nanovláken různých průměrů s následnou jednoduchou možností dodání lipozomálního systému s postupně se uvolňujícími stimulačními látkami určenými pro řízenou kultivaci a/nebo diferenciaci buněk.

Dosavadní stav techniky

10 Kultivace buněčných kultur má již poměrně dlouhou historii. Se zvyšujícími se znalostmi se zvyšuje i poptávka po nových, lepších, přirozenějších řešeních. Ze stejného důvodu jsme nyní přítomni u obrovského rozvoje v oblasti regenerativní medicíny a tkáňového inženýrství. Což přináší i vysokou poptávku po komerčně dostupných produktech jak pro základní výzkum, tak i pro klinickou praxi. Způsob testování a přípravy tkáňových kultur se neustále vyvíjí a zdokonaluje. Od prvotního používání skleněného povrchu (již před rokem 1956), přes použití polystyrenového materiálu, se dnes dostáváme ke zcela novému přístupu, imitujícímu přirozené podmínky živého organismu, a to použití nanovláken.

15 Již od roku 1970 se vědci soustředili na sledování procesů adheze, migrace a funkce buněk v buněčné kultuře in vitro a uvědomovali si nedostatky polystyrenu. Začali proto s různými modifikacemi jeho povrchu, od použití purifikovaných proteinů jako je kolagen, laminin či fibronectin a mukopolysacharidy po použití biologických materiálů jako je extracelulární matrix. 20 Toto však velmi zvyšuje cenu kultivačního procesu a obnáší mnoho dalších kroků, prodlužujících tento proces. Nanovláknata jsou budoucností v léčbě pacientů v mnoha oblastech jako je regenerativní medicína, diagnostika, řízené dodávání léčiv a zvýšení efektivity léčby.

25 Regenerativní medicína je jednou z nejdynamičtěji se rozvíjejících oblastí na poli medicíny. Jejím hlavním cílem je přirozené zhojení, náhrada poškozené tkáně. Jedním z klíčových faktorů v regenerativní medicíně je nalezení vhodného materiálu pro podpůrnou síť (nosič), tvořící podporu pro buňky a nově vznikající tkáň.

30 Nanovláknata byla již mnohokrát prokázána jako velmi vhodný materiál pro pěstování buněčných kultur. Díky unikátním vlastnostem, jako je jejich tvar, variabilita použití přírodních či syntetických polymerů, nebo jejich kombinace, či jejich ne/degradabilita, mohou být „ušity“ na míru daným potřebám. Poskytují tak reálné, přirozené podmínky pro buněčné kultury a živé tkáně, a mohou tak poskytnout reálný model jako je v živém organismu, což je tak nezbytné pro vývoj v oblasti regenerativní medicíny a tkáňového inženýrství. Navíc, umožňují adhezi různých bioaktivních molekul (Dahlin et al. 2011, Martins et al. 2010) Hlavní problematikou je vývoj vhodného systému pro doručení bioaktivních molekul do místa určení, potřeby, zachování jejich aktivity, a navíc jejich řízené uvolnění (Ji et al. 2011).

35 Takovým systémem je funkcionalizace nanovláken bioaktivními látkami naplněných v nano/mikro partikulích a jejich adhezí na povrch nanovláken (Ruggeri et al. 2013). Takto imobilizované nano/mikro částice interagují s cílovými buňkami (v místě defektu, či s buňkami v buněčné kultuře). Díky této vzájemné interakci buňky - nosič, dochází k postupnému uvolnění bioaktivních látek z nosiče a lokálnímu účinku. Do těchto molekul lze inkorporovat různé bioaktivní molekuly např. pro podporu adheze, migrace, proliferace či cílené diferenciaci buněk (Anitua et al. 2008).

45 Stále lepší porozumění funkce a účinku bioaktivních molekul (růstové faktory či signální dráhy) otevírá další možnosti v terapeutických řešeních. Mezi hlavní růstové faktory podílející se na regeneraci kostní, chrupavčité či myogenní tkáně se řadí rodina Kostních morfogenických proteinů (IBMPs), rodina Transformačních růstových faktorů (TGF- β 1, β 2), Inzulínu podobný růstový faktor 1 (IGF-1), destičkami dodaný růstový faktor (PDGF), základní fibroblastický růstový faktor (bFGF), Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) či Epidermální růstový faktor (EGF) (Wasterlain et al. 2012).

Hlavním cílem je vyvinutí úspěšného systému pro doručení těchto molekul do místa určení a jejich řízené uvolnění v souladu s charakteristikou dané tkáně (Ji et al. 2011). Efektivní systém pro dodání bioaktivních molekul dodá tyto molekuly stále aktivní a v dostatečné koncentraci, a je schopen látky uvolňovat řízeně (pozdvolna či najednou) bez vedlejších negativních účinků a toxicity v místě účinku (Zamani et al. 2013). V posledních letech byly vyvinuty a použity různé metody. Mezi velmi slibné a účinné se jeví použití nanovláken v kombinaci s adhezaními nano/mikro částicemi (Lima et al. 2012; Sill and von Recum 2008).

Nano/mikro částice jako jsou lipozomy byly již použity pro systém cíleného dodávání bioaktivních látek pro jejich schopnost enkapsulovat a pozvolna uvolňovat různé bioaktivní substance (např. nízko či, vysokomolekulární terapeutika, růstové faktory, signální molekuly, antigeny či DNA) při zachování jejich aktivity. Navíc lipozomy jsou již schváleny US Food and Drug Administration (FDA) pro tyto účely použití, a též používány v klinické praxi. Jsou již úspěšně používány v oblasti vakcín (pro dodání hepatitis A virusu-Epaxal® či pro dodání viru chřipky-Inflexal®). Též již bylo testováno několik přípravků jako systém pro doručení protinádorové terapie (Doxil®, Myocet® or Lipo-dox®).

Lipozomy mají vysokou kapacitu enkapsulovat bioaktivní látky, což patří mezi jednu z jejich největších výhod. Avšak, jsou zde stále určité překážky pro jejich širší použití vzhledem k např. jejich nízké stabilitě a možné akumulaci v jednom místě (Wang et al. 2010). Kombinace lipozomů s polymerním nosičem pomáhá vyřešit tyto komplikace. Funkcionalizace pomocí fyzikální adsorpce na povrch polykaprolaktonových (PCL) nanovláken se již ukázala jako vhodná metoda pro aplikace v tkáňovém inženýrství (Filova et al., 2013).

Vysoká poptávka současnosti je po komerčních systémech umožňujících imitaci přirozených podmínek v lidském organismu. Poptávka po systému umožňujícím kultivaci buněčných typů tkání či řízenou diferenciaci mezenchymálních kmenových buněk, a vytváření tak organických modelů pro sledování jejich funkce je nezbytný pro posun jak základního výzkumu tak pro použití pro klinickou praxi. Zejména v oblasti klinické praxe uspokojit současné nároky na systém, který by byl aplikovatelný přímo na operačním sále a jednoduchý k přípravě je žhavým předmětem výzkumu mnoha komerčních firem. Tato vysoká poptávka po kvalitních komerčních systémech není uspokojována zvláště z důvodu doposud ne zcela uspokojujících technických řešení této problematiky.

Podstata technického řešení

Podstatou technického řešení je vytvoření komplexu nanovláken a stimulačních molekul a to v podobě kitu pro přímé, okamžité použití. Tento systém je vhodný nejen pro použití v oblasti výzkumu v laboratorních podmínkách, ale též pro použití v klinické praxi v regenerativní medicíně.

Podstatou technického řešení je přímo použitelný variabilní kit pro buněčnou kultivaci v kulturačních destičkách pro automatickou detekci typicky s použitím ELISA Reader.

Kit je založen na nanovlákních připravených z PCL pomocí elektrospinningu.

Předností tohoto řešení oproti dosavadním řešením (např. 3D Biotek, Nanofiber Solutions, Electrospinning company) je, že umožňuje řízenou diferenciaci buněk, která umožňuje rychlé a jednoduché směřování osudu buněk pomnožovaných na nosičích do vhodných směrů.

Kit je složen:

a. ze strukturované nanosítě nebo mikrosítě na bázi PCL s volitelným průměrem vláken. Tato vlákna, mohou být chemicky modifikována na svém povrchu vazbou bioaktivních látek. Tato modifikovaná vlákna se následně umísťují do jamek kulturačních destiček.

b. ze strukturované nanosítě nebo mikrosítě popsané v bodě a, a z kulturačního media doplněného o lipozomální roztok s obsahem proliferačních látek, typicky vhodných koncentrací BMP-2 či TGF-beta.

Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1

Variabilní kit pro kultivaci buněčných kultur v kultivačních destičkách pro osteogenní diferenci-
 aci mesenchymálních kmenových buněk sestávající z nanovláknenného nosiče vyrobeného z poly-
 5 kaprolaktonu (PCL), který je funkcionalizován druhou složkou kitu, kterou tvoří roztok lipozomů
 na bázi fosfatydylocholinu (PC) s enkapsulovanou aktivní látkou kostního morfologického pro-
 teinu 2 (BMP-2) v koncentraci 1 ng/ml až 1 000 ng/ml.

Příklad 2

Variabilní kit pro kultivaci buněčných kultur v kultivačních destičkách pro osteogenní kultivaci
 10 mesenchymálních kmenových buněk sestávající z nanovláknenného nosiče vyrobeného z poly-
 kaprolaktonu (PCL), který je funkcionalizován druhou složkou kitu, kterou tvoří roztok lipozomů
 na bázi fosfatydylocholinu (PC) s enkapsulovanou aktivní látkou transformujícího růstového fak-
 toru beta (TGF-beta) v koncentraci 1 ng/ml až 1 000 ng/ml.

Příklad 3

Variabilní kit pro kultivaci buněčných kultur v kultivačních destičkách pro osteogenní diferenci-
 aci mesenchymálních kmenových buněk sestávající z nanovláknenného nosiče vyrobeného z poly-
 15 kaprolaktonu (PCL), který je funkcionalizován druhou složkou kitu, kterou tvoří roztok lipozomů
 na bázi fosfatydylocholinu (PC) s enkapsulovanou aktivní látkou kostního morfologického pro-
 teinu 2 (BMP-2) v koncentraci 1 ng/ml až 1 000 ng/ml a transformujícího růstového faktoru beta
 20 (TGF-beta) v koncentraci 1 ng/ml až 1 000 ng/ml.

Příklad 4

Variabilní kit pro kultivaci buněčných kultur v kultivačních destičkách pro chondrogenní kulti-
 vaci mesenchymálních kmenových buněk z nanovláknenného nosiče vyrobeného z polykaprolak-
 25 tonu (PCL), který je dále funkcionalizován druhou složkou kitu, kterou tvoří roztok lipozomů na
 bázi fosfatydylocholinu (PC) s enkapsulovanou aktivní látkou, kterou tvoří inzulínu podobný rů-
 stový faktor (IGF-1) v koncentraci 1 ng/ml až 1 000 ng/ml.

Příklad 5

Variabilní kit pro kultivaci buněčných kultur v kultivačních destičkách pro myogenní kultivaci
 30 mesenchymálních kmenových buněk z nanovláknenného nosiče vyrobeného z polykaprolaktonu
 (PCL), který je dále funkcionalizován druhou složkou kitu, kterou tvoří roztok lipozomů na bázi
 fosfatydylocholinu (PC) s enkapsulovanou aktivní látkou, kterou tvoří fibroblastový růstový faktor
 (FGF-2) v koncentraci 1 ng/ml až 1 000 ng/ml.

Příklad 6

Variabilní kit pro kultivaci buněčných kultur v kultivačních destičkách pro kultivaci mesenchy-
 35 málních kmenových buněk či diferencovaných buněk sestávající z nanovláknenného nosiče vyro-
 beného z polykaprolaktonu (PCL). Tento nosič je komponován z tenkých nanovláken, typicky
 200 až 500 nm, a ze silnějších vláken, typicky 2 000 až 5 000 nm, a může být dále modifikován
 proliferačními či diferenciacními faktory, typicky TGF-beta nebo BMP-2 nebo IGF-1 nebo
 FGF-2.

40

N Á R O K Y N A O C H R A N U

1. Variabilní kit pro kultivaci buněčných kultur v kultivačních destičkách, **v y z n a ě u j í c í**
s e t í m, že obsahuje nanovláknenný nosič tzn. strukturovanou nanosíť a/nebo mikrosíť vyrobe-
 nou z polykaprolaktonu (PCL) s volitelným průměrem vláken.

2. Variabilní kit pro kultivaci buněčných kultur v kultivačních destičkách podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že povrch nanovláknemého nosiče je modifikován vazbou bioaktivních látek BMP-2, TGF-beta, IGF-1 nebo FGF-2.
- 5 3. Variabilní kit pro kultivaci buněčných kultur v kultivačních destičkách podle nároku 1 a 2, **vyznačující se tím**, že nanovláknena jsou funkcionalizována lipozomy, které jsou obohaceny o růstový faktor TGF-beta nebo IGF-1 nebo FGF-2 a diferenciační faktor BMP-2 pro řízenou proliferaci a diferenciaci buněk.

Konec dokumentu
