

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

36 187

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

G09B 23/28 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)
D06M 101/32 (2006.01)
D06M 101/08 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2022-39862**
(22) Přihlášeno: **10.05.2022**
(47) Zapsáno: **28.06.2022**

- (73) Majitel:
Ústav experimentální medicíny AV ČR, v. v. i.,
Praha 4, Krč, CZ
InoCure s.r.o., Praha 1, Nové Město, CZ
- (72) Původce:
Mgr. Eva Filová, Ph.D., Praha 4, Modřany, CZ
MUDr. Ing. Karolína Vocetková, Ph.D., Praha 6,
Vokovice, CZ
Mgr. Veronika Hefka Blahnová, Praha 5,
Hlubočepy, CZ
Viktorie Sedláčková, MSc., Praha 2, Vinohrady,
CZ
Mgr. Eva Šebová, 96652 Tekovská Breznica, SK
Mgr. Matej Buzgo, Praha 4, Michle, CZ
Aiva Simaite, Praha 5, Stodůlky, CZ
Natalia Andrieva, Praha 2, Nové Město, CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

- (54) Název užitého vzoru:
**Model kožní tkáně pro toxikologické
testování a sada pro jeho přípravu**

Model kožní tkáně pro toxikologické testování a sada pro jeho přípravu

Oblast techniky

5

Technické řešení se týká modelu kožní tkáně pro pokročilé toxikologické testování a sady pro jeho přípravu. Model kožní tkáně je morfologicky věrný, a je určen pro ověření účinku nových léčiv, toxikologickou analýzu a hodnocení bioaktivity bez užití zvířecích modelů.

10

Dosavadní stav techniky

Modely tkání obecně dovolují sledování změn v buňkách tkáně v reálném čase, například buněčnou signalizaci, změny exprese proteinů, nebo poškození buněk. Mohou být používány mimo jiné pro hodnocení toxicity a bioaktivity látek, a mají potenciál alespoň částečně nahradit zvířecí modely.

Kultivace na plošných substrátech osetých tkáňovými buňkami vede k nefyziologickému buněčnému chování a špatné korelaci *in vitro/in vivo* výsledků. Kultivace na trojrozměrných substrátech s využitím vláknitých membrán imitujících přirozenou morfologii extracelulární matrix, podporují buněčnou adhezi na membráně a díky struktuře nano- nebo mikrovláken mají velký povrch pro buněčnou proliferaci.

Existuje stále pokračující potřeba vyvíjet nové a vhodné modely tkání, jejichž chování bude co nejvěrněji odpovídat fyziologické situaci v organismu. Zároveň je potřeba vyvíjet takové modely, které využívají buněčné kultury nezátížené variabilitou a etickými problémy, mimo jiné i proto, že se připravují zpřísněná legislativní omezení testování na zvířatech.

V současné době komerčně dostupné modely kožní tkáně, nabízené například firmami Episkin (Francie), Sterlab (Francie), MatTek (USA) a Phenion (Německo), využívají primární buňky izolované z dárců, což předznamenává zejména ekonomické a etické zatížení. Genoskin (Francie) využívá *ex vivo* model kožní tkáně (biopsie).

WO 2014/132063 popisuje trojrozměrnou (3D) membránu z kolagenu připraveného metodou tkáňového inženýrství, případně decelularizovaný kolagen, nativní bezbuněčný kolagen, kolagenu podobnou síť, které kombinuje s lidskými buňkami, např. fibroblasty, keratinocyty (izolovanými z biopsie), krevními buňkami – T-lymfocyty, od monocytů odvozenými dendritickými buňkami.

EP 1 290 145 popisuje tvorbu kožního ekvivalentu *in vitro* s použitím kyselého roztoku kolagenu, který se smíchá s buňkami, např. fibroblasty, a poté se neutralizuje a je v kontaktu s polykarbonátovou membránou, která snižuje kontrakci gelu.

Dále tyto modely využívají membrány pouze z polykaprolaktonu (Qi Liu et al., G Ital Dermatol Venereol 2018 Oct;153(5):636-643. doi: 10.23736/S0392-0488.17.05472-4), na které buňky nedostatečně adherují a model netvoří 3D strukturu, což snižuje reprodukovatelnost výsledků.

EP 0 418 035 popisuje ekvivalent kožní tkáně, připravený technikou tkáňového inženýrství, sestávající z hydratovaného kolagenového gelu s kontraktilem agens (fibroblasty). Kolagenový gel je v kontaktu s propustnou membránou, např. z polykaprolaktonu (PCL). Po maturaci vrstvy dermis (fibroblasty v kolagenovém gelu) se na gel nasadí keratinocyty tvořící vrstvu epidermis, čímž se model stává ekvivalentem kožní tkáně.

Uváděné nedostatky předkládané technické řešení odstraňuje.

Podstata technického řešení

V jednom aspektu je předmětem technického řešení model kožní tkáně, který obsahuje vláknennou membránu tvořenou vlákny ze směsi polykaprolaktonu (PCL) a acetátu ftalátu celulózy (CAP) v hmotnostním poměru v rozmezí 1,5:1 až 2,5:1, přičemž tloušťka vláken je v rozmezí 100 nm až 30 μm, a uvedená membrána je potažená vrstvou gelu kolagenu typu I s buňkami fibroblastů, která je dále pokrytá vrstvou keratinocytů.

S výhodou má polykaprolakton molekulovou hmotnost v rozmezí 40 až 85 kDa, výhodněji 78 až 82 kDa.

Acetát ftalát celulózy má s výhodou molekulovou hmotnost v rozmezí 2 až 3 kDa.

S výhodou je hmotnostní poměr polykaprolaktonu a acetátu ftalátu celulózy v rozmezí 1,8:1 až 2,2:1, výhodněji 1,9:1 až 2,1:1.

S výhodou je tloušťka vláken v rozmezí 150 nm až 25 μm, výhodněji 200 nm až 5 μm.

Membrána může obsahovat směs vláken o různých tloušťkách, např. membrána o kombinaci nanovláken a mikrovláken o tloušťkách 200 až 500 nm a 1 až 3 μm.

Alternativně může být vláknennou membránou nanovláknenná membrána s vlákny o tloušťce v rozmezí 300 až 800 nm, nebo mikrovláknenná membrána s vlákny o tloušťce 3 až 7 μm, nebo porézní mikrovláknenná membrána s vlákny o tloušťce 15 až 25 μm.

Tloušťka vláken je odečítána ze snímků SEM (skenovací elektronové mikroskopie).

S výhodou je tloušťka vláknenné membrány v rozmezí 0,03 až 1 mm, s výhodou 0,05 až 0,3 mm. Příliš silná vláknenná membrána brání efektivní difuzi nutrientů do kompartmentů membrány.

Tloušťka vrstvy kolagenového gelu je od 0,8 mm do 1,2 mm, s výhodou od 0,9 do 1,1 mm.

Fibroblasty v kolagenovém gelu odpovídají vrstvě dermis, a keratinocyty na povrchu kolagenového gelu vrstvě epidermis. Je výhodné, pokud fibroblasty i keratinocyty dosahují 90 až 100% konfluence.

Fibroblasty a keratinocyty mohou být v některých provedeních myší fibroblasty a myší keratinocyty.

Model kožní tkáně může dále obsahovat vícejamkovou destičku, v jejíchž jamkách jsou vloženy vláknenné membrány popsané výše.

V druhém aspektu je předmětem technického řešení sada pro přípravu modelu kožní tkáně, která obsahuje

- vláknennou membránu tvořenou vlákny ze směsi polykaprolaktonu a acetátu ftalátu celulózy v hmotnostním poměru v rozmezí 1,5:1 až 2,5:1, přičemž tloušťka vláken je v rozmezí 100 nm až 30 μm,

- roztok kolagenu typu I v 1N kyselině octové o koncentraci kolagenu alespoň 1,2 mg/ml,

- zásobní nádobku se zamraženými fibroblasty, a

- zásobní nádobku se zamraženými keratinocyty.

55

S výhodou je koncentrace kolagenu v 1N kyselině octové v rozmezí 1,2 mg/ml až 3,5 mg/ml.

V některých provedeních může sada dále obsahovat vícejamkovou destičku, v jejíž jamkách jsou vloženy vláknenné membrány popsané výše.

5

Model kožní tkáně podle předkládaného technického řešení lze připravit tak, že se připraví vláknenná membrána, vloží se do jamky či jiné nádoby, dále se roztok kolagenu smíchá s fibroblasty, a touto směsí se potáhne vláknenná membrána. Gel se ponechá ztuhnout, přidá se médium a fibroblasty se ponechají růst. Následně se na vrstvu gelu osadí keratinocyty a kokultura se dále kultivuje.

10

Aplikace modelu tkáně a sady pro jeho přípravu je zejména v oblasti farmacie, *in vitro* toxikologie, kosmetiky a potravinářství, zejména například testy (OECD 431), iritance (OECD 439) testované látky, změnu v integritě buněčné vrstvy následkem expozice, izolaci RNA pro následné analýzy. Takto vytvořené tkáně lze používat jako alternativy k testování na zvířatech při vývoji léčiv nebo kosmetiky. Model tkáně podle předkládaného technického řešení je fyziologicky relevantní. Jeho výhodou je dále to, že je dostupný ekonomicky, ale i snadno prakticky použitelný, neboť použité buňky nevyžadují vyšší úroveň biohazardu v laboratoři.

20

Objasnění výkresů

Obr. 1 je SEM snímek vláknenné membrány podle příkladu 1.

25

Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Příprava a charakterizace vláknenné membrány

30

Byly připraveny zásobní roztoky:

- 20% hmotn. roztok 80 kDa polykaprolaktonu (PCL, Sigma Aldrich) ve směsi kyseliny octové a kyseliny mravenčí v hmotnostním poměru 1:1.
- 20% hmotn. roztok 2,5 kDa acetátu ftalátu celulózy (CAP, Sigma Aldrich) ve směsi kyseliny octové a kyseliny mravenčí v hmotnostním poměru 1:1.

35

Bylo předloženo 20 ml zásobního roztoku polykaprolaktonu a 10 ml zásobního roztoku acetátu ftalátu celulózy, dále bylo přidáno 5 ml chloroformu a ještě 10 ml směsi kyseliny octové a kyseliny mravenčí v hmotnostním poměru 1:1. Výsledná směs byla promíchána a podrobena zvláknění metodou elektrostatického zvláknování (elektrospinning) za následujících podmínek:

40

- Elektroda: lineární průmyslová elektroda s ukládacím prvkem pohybující se na vzdálenost 320 mm rychlostí 40/100/100.
- Kolektor: rotující válec pokrytý pečicím papírem, otáčející se rychlostí 600 ot/min.
- Napětí: -30/+60 kV
- Rychlost toku: 50 ml/h
- Teplota / Vlhkost: nastaveno 40 °C/0 %, naměřeno 45 °C/7 %
- Vzdálenost elektrody a kolektoru: 170 mm

45

50

55

- Zvlákněný objem: 20 ml

Výsledná vlákenná membrána měla tloušťku membrány 0,09 až 0,12 mm a tloušťku vláken 0,729 μm . Její struktura je znázorněna na snímku ze skenovací elektronové mikroskopie na Obr. 1.

5

Příklad 2: Osazení vlákenné membrány buňkami

Vlákenná membrána z Příkladu 1 byla rozřezána a její části byly vloženy do jamek vícejamkové destičky.

10

Myší fibroblasty 3T3 i myší keratinocyty XB2 byly během pre-kultivace kultivovány dle pokynů ATCC v médiu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma Aldrich-D6429) obohaceném o 10 % fetálního bovinního séra (FBS) v případě 3T3 a o 20 % FBS v případě XB2.

15

Byl připraven roztok kolagenu typu I v 1N kyselině octové o koncentraci 2 mg/ml (je možné použít roztok kolagenu o koncentraci v rozmezí 1,2 mg/ml až 3,5 mg/ml). Tento roztok byl smíchán s myšími fibroblasty 3T3 (100000 buněk/100 μl), a směs byla potažena vlákenná membrána. Při 37 °C se po době cca 30 min vytvoří gel (tloušťka gelu cca 1 mm), následně se přidá médium (ATCC-PCS-201-030 nebo ATCC-PCS-201-041) a systém se ponechal za podmínek pro kultivaci fibroblastů. Po sedmi dnech kultivace, kdy fibroblasty dosáhly cca 95% konfluence, byla vrstva osazena myšími keratinocyty XB2 (26539 buněk/ cm^2). Kokultura byla kultivována dalších 7 dní, po kterých následovala 14denní kultivace na rozhraní voda/vzduch (médium ATCC-PCS-200-030 nebo ATCC-PCS-200-040 bylo dodáváno pouze pod spodní část inzertu).

20

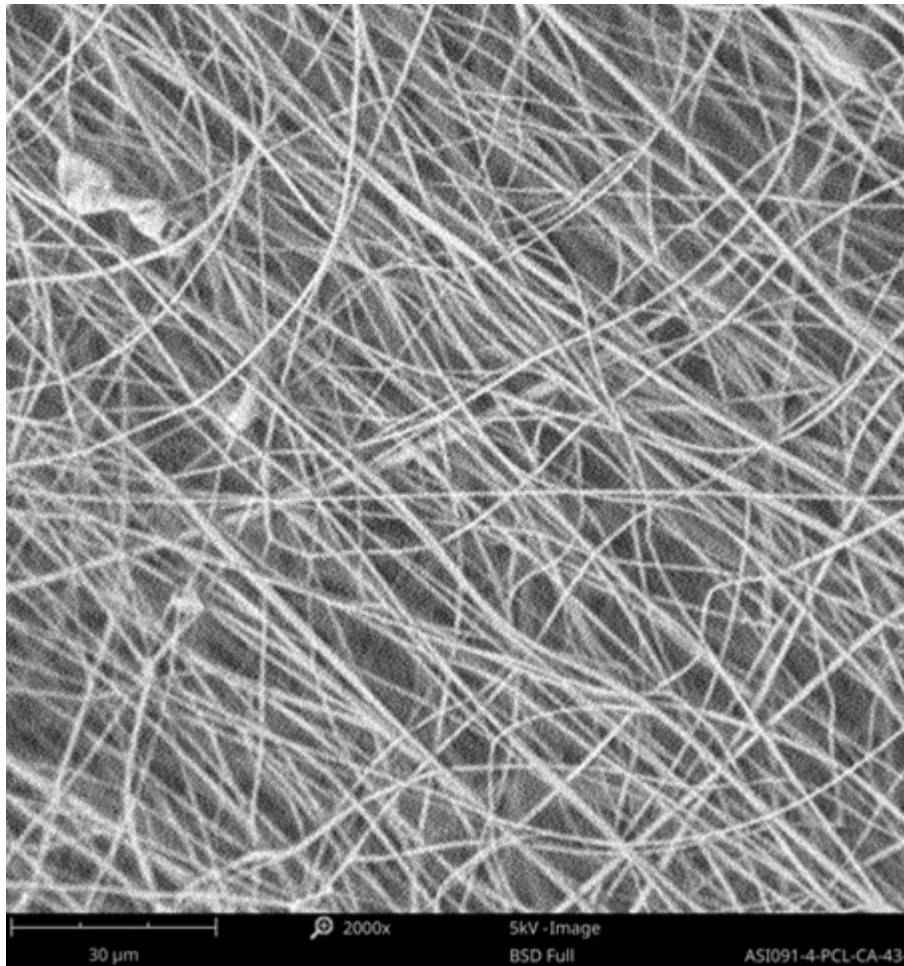
25

Pro hodnocení toxicity byla k médiu přidávána testovaná látka v roztoku, buňky byly zcela ponořené v médiu.

NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Model kožní tkáně, **vyznačující se tím**, že obsahuje vláknennou membránu tvořenou vlákny ze směsi polykaprolaktonu a acetátu ftalátu celulózy v hmotnostním poměru v rozmezí 1,5:1 až 2,5:1, přičemž tloušťka vláken je v rozmezí 100 nm až 30 μm , a uvedená membrána je potažená vrstvou gelu kolagenu typu I s buňkami fibroblastů, která je dále pokrytá vrstvou keratinocytů.
2. Model kožní tkáně podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že hmotnostní poměr polykaprolaktonu a acetátu ftalátu celulózy je v rozmezí 1,8:1 až 2,2:1, výhodněji 1,9:1 až 2,1:1.
- 10 3. Model kožní tkáně podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že polykaprolakton má molekulovou hmotnost v rozmezí 40 až 85 kDa, s výhodou 78 až 82 kDa.
4. Model kožní tkáně podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že acetát ftalát celulózy má molekulovou hmotnost v rozmezí 2 až 3 kDa.
- 15 5. Model kožní tkáně podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že membrána obsahuje směs vláken o různých tloušťkách, s výhodou membrána obsahuje kombinaci nanovláken a mikrovláken o tloušťkách 150 až 250 nm a 1 až 3 μm .
6. Model kožní tkáně podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že membrána je vybrána ze skupiny nanovláknenná membrána s vlákny o tloušťce v rozmezí 300 až 800 nm, mikrovláknenná membrána s vlákny o tloušťce 3 až 7 μm , a porézní mikrovláknenná membrána s vlákny o tloušťce 15 až 25 μm .
- 20 7. Model kožní tkáně podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že tloušťka vláknenné membrány je v rozmezí 0,03 až 1 mm, s výhodou 0,03 až 0,3 mm.
8. Model kožní tkáně podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že tloušťka vrstvy kolagenu typu I je v rozmezí od 0,8 mm do 1,2 mm, s výhodou od 0,9 do 1,1 mm.
- 25 9. Sada pro přípravu modelu kožní tkáně podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že obsahuje
- vláknennou membránu tvořenou vlákny ze směsi polykaprolaktonu a acetátu ftalátu celulózy v hmotnostním poměru v rozmezí 1,5:1 až 2,5:1, přičemž tloušťka vláken je v rozmezí 100 nm až 30 μm ,
 - roztok kolagenu typu I v 1N kyselině octové o koncentraci kolagenu alespoň 1,2 mg/ml,
 - 30 - zásobní nádobku se zamraženými fibroblasty a
 - zásobní nádobku se zamraženými keratinocyty.

1 výkres



Obr. 1