

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

36 189

(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: **2022-39937**
(22) Přihlášeno: **27.05.2022**
(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 Ročková, MSc., Praha 2, Vinohrady, CZ
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 střevní tkáně pro toxikologické
testování a sada pro jeho přípravu**

CZ 36189 U1

Model střevní tkáně pro toxikologické testování a sada pro jeho přípravu

Oblast techniky

5

Technické řešení se týká modelu střevní tkáně pro pokročilé toxikologické testování a sady pro jeho přípravu. Model je morfologicky věrný střevní tkáni, 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 vláknenných 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 nezatížené variabilitou a etickými problémy, mimo jiné i proto, že se připravují zpřísněná legislativní omezení testování na zvířatech.

V současné době je na trhu dostupný první model střevní tkáně od společnosti MatTek, který obsahuje lidské intestinální buňky od testovaných dárců (virové infekce, mykoplazmata), je tedy komplikovaný na získání buněk, testování a přípravu.

WO 2017/158609 navrhuje postup přípravy modelu střevní tkáně decelularizací a recelularizací vzorku střevní tkáně. WO 2018/089743 popisuje tvorbu umělé střevní tkáně vrstvením buněčných tkání. WO 2021/200235 navrhuje využití hydrogelových skafoldů z kolagenu nebo hyaluronové kyseliny, s extracelulární matrix, osazených epitelovými buňkami. Žádný z těchto typů modelů zatím nebyl prakticky využit.

Uváděné nedostatky předkládané technické řešení odstraňuje.

40

Podstata technického řešení

V jednom aspektu je předmětem technického řešení model střevní tkáně, který obsahuje vláknennou membránu tvořenou vlákny ze směsi polykaprolaktonu (PCL) a acetátu celulózy (CA) v hmotnostním poměru v rozmezí 12:1 až 1:1, přičemž tloušťka vláken je v rozmezí 100 nm až 30 μ m, a uvedená membrána je pokrytá vrstvou kokultury enterocytů a pohárkových buněk.

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

50

Acetát celulózy má s výhodou molekulovou hmotnost v rozmezí 25 až 35 kDa, výhodněji 28 až 32 kDa.

S výhodou je hmotnostní poměr polykaprolaktonu a acetátu celulózy v rozmezí 1:1 až 5:3, výhodněji 3,5:3 až 4,5:3, výhodněji 3,8:3 až 4,2:3, ještě výhodněji 3,9:3 až 4,1:3.

55

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

5 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 .

10 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.

15 Enterocyty a pohárkové buňky jsou s výhodou v poměru počtu buněk v rozmezí 6:4 až 8:2, s výhodou 7:3. Celková koncentrace buněk při nasazení je s výhodou v rozmezí 25 000 až 40 000 buněk/ cm^2 . Ve střevním modelu podle předkládaného technického řešení má s výhodou vrstva buněk 90% až 100% konfluenci.

20 V některých provedeních může model střevní tkáně dále obsahovat inserty pro vícejamkovou destičku, přičemž v jednotlivých insertech jsou upevněny vláknenné membrány pokryté vrstvou kokultury enterocytů a pohárkových buněk popsané výše. Velikost insertů (jejich průměr) je typicky v rozmezí 1 cm až 3 cm.

25 V některých provedeních může model střevní tkáně dále obsahovat vícejamkovou destičku, v jejichž jamkách jsou vloženy vláknenné membrány pokryté vrstvou kokultury enterocytů a pohárkových buněk popsané výše. Velikost jamek je typicky v rozmezí 1 cm až 3 cm.

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

- vláknennou membránu tvořenou vlákny ze směsi polykaprolaktonu a acetátu celulózy v hmotnostním poměru v rozmezí 3,5:3 až 4,5:3, přičemž tloušťka vláken je v rozmezí 100 nm až 35 30 μm ,

- zamražené buňky střevního epitelu - enterocyty, a

- zamražené buňky střevního epitelu - pohárkové buňky.

40 Zamražené buňky střevního epitelu – enterocyty a pohárkové buňky, mohou být v sadě obsaženy v jedné nádobce, již smíchané v daném poměru, nebo mohou být v sadě obsaženy ve dvou nádobkách, a uživatel je může před použitím smíchat v požadovaném poměru.

45 Model střevní tkáně podle předkládaného technického řešení lze připravit tak, že se připraví vláknenná membrána, vloží se do jamky či jiné nádoby, a následně se na vláknennou membránu osadí směs enterocytů a pohárkových buněk, a kokultura se dále kultivuje.

50 Aplikace modelu střevní tkáně a sady pro jeho přípravu je zejména v oblasti farmacie, *in vitro* toxikologie a potravinářství, zejména například pro testy střevní toxicity testované látky, testy viability buněk, 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, doplňků stravy či potravinových doplňků. 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.

Objasnění výkresů

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

Příklady uskutečnění technického řešení

10 Příklad 1: Příprava a charakterizace vláknenné membrány

Byly připraveny zásobní roztoky:

- 15 • 20% hmotn. roztok 80 kDa polykaprolaktonu (PCL, Sigma Aldrich) ve směsi kyseliny octové a kyseliny mravenčí v hmotnostním poměru 1:1.
- 20% hmotn. roztok 30 kDa acetátu celulózy (CA, Sigma Aldrich) ve směsi kyseliny octové a kyseliny mravenčí v hmotnostním poměru 1:1.

20 Bylo předloženo 20 ml zásobního roztoku polykaprolaktonu a 15 ml zásobního roztoku acetátu 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 zvláknění (elektrospinning) za následujících podmínek:

- 25 • Elektroda: lineární průmyslová elektroda s ukládacím prvkem pohybující se na vzdálenost 320 mm rychlostí 40/100/100.
- Kolektor: rotující válec pokrytý pečícím papírem, otáčející se rychlostí 600 ot/min.
Napětí: -30/+60 kV
- 30 • Rychlost toku: 50 ml/h
- Teplota / Vlhkost: nastaveno 40 °C/0 %, naměřeno 45 °C/7 %
- 35 • Vzdálenost elektrody a kolektoru: 170 mm
- Zvlákněný objem: 20 ml

40 Výsledná vláknenná membrána měla tloušťku membrány 0,09 až 0,12 mm a tloušťku vláken 0,7 až 0,8 μm . Její struktura je znázorněna na snímku ze skenovací elektronové mikroskopie na Obr. 1.

Příklad 2: Osazení vláknenné membrány buňkami

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

50 Střevní epitelové buňky, enterocyty Caco2 a pohárkové buňky HT-29, 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) a 1 % antibiotika penicilin-streptomycin (Sigma Aldrich-P4333).

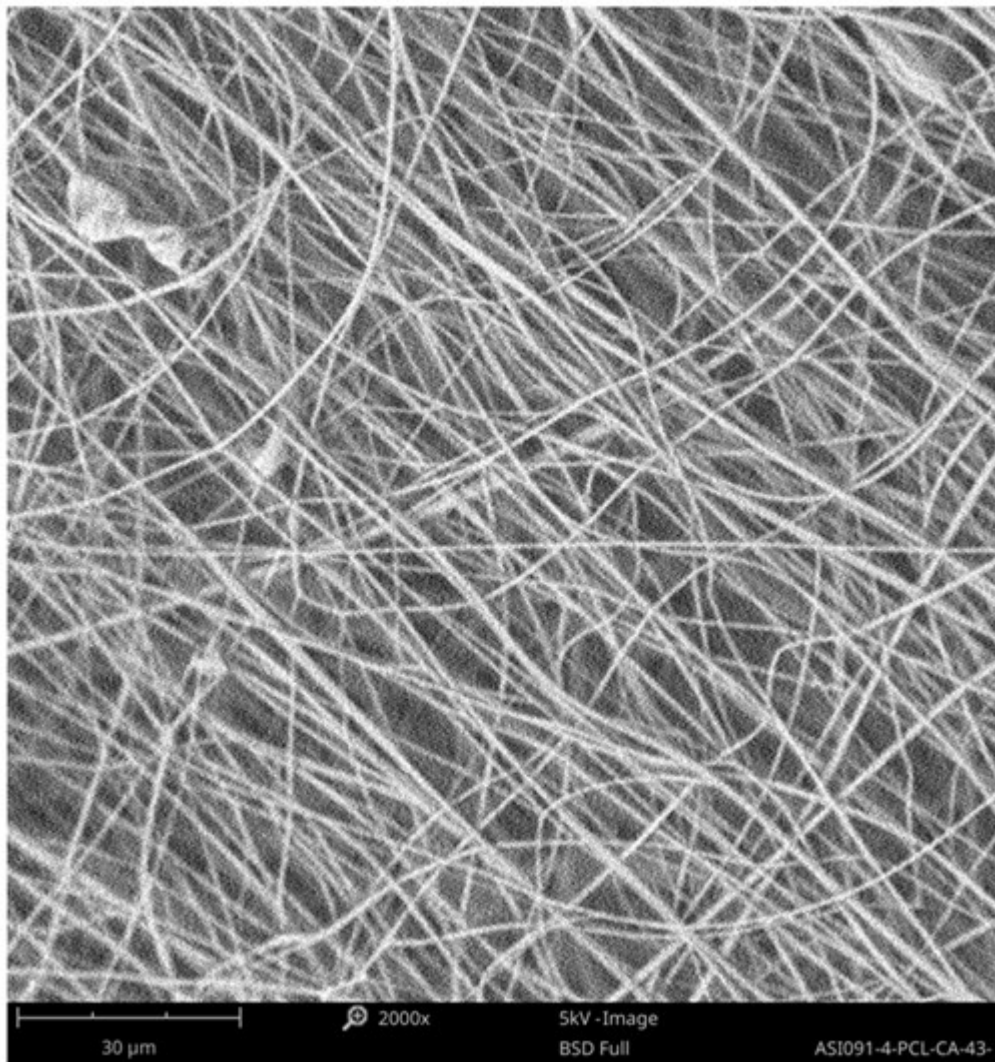
Buňky Caco2 a HT-29 byly nasazeny v poměru počtu buněk 7:3 Caco2:HT-29, v celkové koncentraci 32480 buněk/cm². Kokultura byla kultivována dalších 14 dní.

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

NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Model střevní tkáně, **vyznačující se tím**, že obsahuje vláknennou membránu tvořenou vlákny ze směsi polykaprolaktonu a acetátu celulózy v hmotnostním poměru v rozmezí 12:1 až 1:1, přičemž tloušťka vláken je v rozmezí 100 nm až 30 μm , a uvedená membrána je pokrytá vrstvou kokultury enterocytů a pohárkových buněk.
2. Model střevní tkáně podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že hmotnostní poměr polykaprolaktonu a acetátu celulózy je v rozmezí 3,8:3 až 4,2:3, výhodněji 3,9:3 až 4,1:3.
- 10 3. Model střevní 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 střevní tkáně podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že acetát celulózy má molekulovou hmotnost v rozmezí 25 až 35 kDa.
- 15 5. Model střevní 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 střevní 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 střevní 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 střevní tkáně podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje vícejamkovou destičku s jamkami o průměru v rozmezí 1 cm až 3 cm, přičemž uvedené vláknenné membrány pokryté vrstvou kokultury enterocytů a pohárkových buněk jsou umístěny v jamkách destičky.
- 25 9. Model střevní tkáně podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje inserty pro vícejamkovou destičku, přičemž v jednotlivých insertech jsou upevněny uvedené vláknenné membrány pokryté vrstvou kokultury enterocytů a pohárkových buněk.
- 30 10. Model střevní tkáně podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, **vyznačující se tím**, že kokultura enterocytů a pohárkových buněk má konfluenci 90 až 100 %.
11. Sada pro přípravu modelu střevní tkáně podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, **vyznačující se tím**, že obsahuje
- vláknennou membránu tvořenou vlákny ze směsi polykaprolaktonu a acetátu celulózy v hmotnostním poměru v rozmezí 12:1 až 1:1, přičemž tloušťka vláken je v rozmezí 100 nm až 30 μm ,
 - zamražené enterocyty a
 - zamražené pohárkové buňky.
- 35

1 výkres



Obr. 1