

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

36 190

(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: **2022-39945**
(22) Přihlášeno: **30.05.2022**
(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
RNDr. Pavel Rössner, Ph.D., Černošice, CZ
Mgr. Zuzana Nováková, Praha 4, Modřany, 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 plicní tkáně pro toxikologické
testování a sada pro jeho přípravu**

Model plicní tkáně pro toxikologické testování a sada pro jeho přípravu

Oblast techniky

5

Technické řešení se týká modelu plicní tkáně pro pokročilé toxikologické testování a sady pro jeho přípravu. Model je morfologicky věrný plicní 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 imitují 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.

Uváděné nedostatky předkládané technické řešení odstraňuje.

30

Podstata technického řešení

V jednom aspektu je předmětem technického řešení model plicní tkáně, který obsahuje vláknennou membránu tvořenou vlákny z polykaprolaktonu (PCL) nebo ze směsi polykaprolaktonu (PCL) a acetátu celulózy (CA) v hmotnostním poměru v rozmezí 1:1 až 5:3, přičemž tloušťka vláken je v rozmezí 100 nm až 30 μ m, a uvedená membrána je pokrytá vrstvou lidských plicních embryonálních fibroblastů a popřípadě dále vrstvou makrofágů vzniklých diferenciací buněk lidské akutní monocytické leukémie.

40

Pro diferenciaci buněk lidské akutní monocytické leukémie se používá působení látky forbol 12-myristát 13-acetát (PMA, 100 nM po dobu 72 h).

V jednom výhodném provedení je vláknenná membrána tvořená vlákny polykaprolaktonu a pokrytá vrstvou kultury lidských plicních embryonálních fibroblastů.

45

V dalším výhodném provedení je vláknenná membrána tvořená vlákny polykaprolaktonu a pokrytá vrstvou lidských plicních embryonálních fibroblastů a vrstvou makrofágů vzniklých diferenciací buněk lidské akutní monocytické leukémie.

50

V ještě dalším výhodném provedení je vláknenná membrána tvořená vlákny ze směsi polykaprolaktonu (PCL) a acetátu celulózy (CA) v hmotnostním poměru v rozmezí 1:1 až 5:3, s výhodou 3,5:3 až 4,5:3, a pokrytá vrstvou kultury lidských plicních embryonálních fibroblastů.

V ještě dalším výhodném provedení je vláknenná membrána tvořená vlákny ze směsi polykaprolaktonu (PCL) a acetátu celulózy (CA) v hmotnostním poměru v rozmezí 1:1 až 5:3, s výhodou 3,5:3 až 4,5:3, a pokrytá vrstvou lidských plicních embryonálních fibroblastů a vrstvou makrofágů vzniklých diferenciací buněk lidské akutní monocytické leukémie.

5

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

10

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 3,8:3 až 4,2:3, výhodněji 3,9:3 až 4,1:3.

15

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

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 μ m.

20

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 μ m, nebo porézní mikrovláknenná membrána s vlákny o tloušťce 15 až 25 μ m.

25

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.

30

V některých provedeních může model plicní tkáně dále obsahovat inserty pro vícejamkovou destičku, přičemž v jednotlivých insertech jsou uchyceny vláknenné membrány pokryté vrstvou lidských plicních embryonálních fibroblastů a popřípadě dále vrstvou makrofágů vzniklých diferenciací buněk lidské akutní monocytické leukémie. Velikost insertů je typicky v rozmezí 1 cm až 3 cm.

35

V některých provedeních může model plicní tkáně dále obsahovat vícejamkovou destičku, v jejíchž jamkách jsou vloženy vláknenné membrány pokryté vrstvou lidských plicních embryonálních fibroblastů a popřípadě dále vrstvou makrofágů vzniklých diferenciací buněk lidské akutní monocytické leukémie. Velikost jamek je typicky v rozmezí 1 cm až 3 cm.

40

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

45

- vláknennou membránu tvořenou vlákny z polykaprolaktonu (PCL) nebo ze směsi polykaprolaktonu (PCL) a acetátu celulózy (CA) v hmotnostním poměru v rozmezí 1:1 až 5:3, s výhodou 3,5:3 až 4,5:3, přičemž tloušťka vláken je v rozmezí 100 nm až 30 μ m,

- zamražené lidské plicní embryonální fibroblasty,

50

a popřípadě dále i

- zamražené makrofágy vzniklé diferenciací buněk lidské akutní monocytické leukémie nebo zamražené buňky lidské akutní monocytické leukémie a látku forbol 12-myristát 13-acetát.

55

Model plicní 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

lidské plicní embryonální fibroblasty a kultivují po dobu až 20 dní. V některých provedeních se dále na vláknennou membránu s vrstvou lidských plicních embryonálních fibroblastů osadí makrofágy vzniklé diferenciací buněk lidské akutní monocytické leukémie, a kultivují po dobu až 15 dní.

5

Lidské plicní embryonální fibroblasty se typicky nasazují na vláknennou membránu v množství v rozmezí 31 až 43 tisíc buněk/cm². V případě modelů obsahujících navíc vrstvu makrofágů vzniklých diferenciací buněk lidské akutní monocytické leukémie se tyto makrofágy nasazují až po 7 až 12 dnech kultivace fibroblastů, a to typicky v množství 62 až 69 tis. buněk/ cm².

10

Aplikace modelu plicní tkáně a sady pro jeho přípravu je zejména v oblasti farmacie, *in vitro* toxikologie a potravinářství, zejména například pro testy plicní 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 nebo při testování plicní toxicity látek. 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.

15

20 Objasnění výkresů

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

Obr. 2 je SEM snímek vláknenné membrány podle příkladu 2.

25

Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Příprava a charakterizace vláknenné membrány polykaprolakton : acetát celulózy

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 30 kDa acetátu celulózy (CA, Sigma Aldrich) ve směsi kyseliny octové a kyseliny mravenčí v hmotnostním poměru 1:1.

35

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 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

5 Výsledná vláknenná membrána měla tloušťku membrány 0,09 až 0,12 mm a tloušťku vláken 0,7 až 0,8 μm .

Příklad 2: Příprava a charakterizace vláknenné membrány z polykaprolaktonu

10 Byl připraven zásobní roztok:

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

15 Bylo předloženo 30 ml zásobního roztoku polykaprolaktonu, 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:

- 20 • 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
- 25 • Rychlost toku: 50 ml/h
- Teplota / Vlhkost: nastaveno 40 °C/0 %, naměřeno 45 °C/7 %
- 30 • Vzdálenost elektrody a kolektoru: 170 mm
- Zvlákněný objem: 20 ml

35 Výsledná vláknenná membrána měla tloušťku membrány 0,09 až 0,12 mm a tloušťku vláken cca 5 μm .

Příklad 3: Osazení vláknenné membrány buňkami

40 Vláknenná membrána z Příkladu 1 byla rozřezána a její části byly vloženy do insertů do jamek vícejambkové destičky.

45 Lidské plicní embryonální fibroblasty HEL12469 byly nasazeny v hustotě 35 tis. buněk / cm^2 . HEL12469 byly během kultivace kultivovány dle pokynů ECACC v médiu EMEM EBSS (10X, bez NaHCO_3 a bez L-Gln; Lonza 12-684F) obohaceném o 2,7% (hmotn.) roztok NaHCO_3 , a 2mM L-Glutamin (Lonza 17-605E), 1% neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich F7145) a 10% fetální bovinní sérum (FBS, Sigma-Aldrich F2442). Kultura byla kultivována 14 dní.

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

Příklad 4: Osazení vláknenné membrány buňkami

55 Vláknenná membrána z Příkladu 2 byla rozřezána a její části byly vloženy do insertů do jamek vícejambkové destičky.

Lidské plicní embryonální fibroblasty HEL12469 byly nasazeny v hustotě 35 tis. buněk /cm². HEL12469 byly během kultivace kultivovány dle pokynů ECACC v médiu EMEM EBSS (10X, bez NaHCO₃ a bez L-Gln; Lonza 12-684F) obohaceném o 2,7% (hmotn.) roztok NaHCO₃, a 2mM L-Glutamin (Lonza 17-605E), 1% neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich F7145) a 10% fetální bovinní sérum (FBS, Sigma-Aldrich F2442). Kultura byla kultivována 14 dní.

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

10 Příklad 5: Osazení vláknenné membrány buňkami

Vláknenná membrána z Příkladu 2 byla rozřezána a její části byly vloženy do jamek vícejamkové destičky.

15 Lidské plicní embryonální fibroblasty HEL12469 byly nasazeny v hustotě 35 tis. buněk/cm². HEL12469 byly během kultivace kultivovány dle pokynů ECACC v médiu EMEM EBSS (10X, bez NaHCO₃ a bez L-Gln; Lonza 12-684F) obohaceném o 2,7% (hmotn.) roztok NaHCO₃, a 2mM L-Glutamin (Lonza 17-605E), 1% neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich F7145) a 10% fetální bovinní sérum (FBS, Sigma-Aldrich F2442). Kultura byla kultivována 10 dní.

20 Následně byly nasazeny makrofágy vzniklé diferenciací buněk lidské akutní monocytické leukémie v hustotě 62 tis. buněk/cm². Diferenciace byla vyvolána působením látky forbol 12-myristát 13-acetát (PMA, 100 nM po dobu 72h). Makrofágy byly během kultivace kultivovány v médiu EMEM EBSS (10X, bez NaHCO₃ a bez L-Gln; Lonza 12-684F) obohaceném o 2,7% (hmotn.) roztok NaHCO₃, a 2mM L-Glutamin (Lonza 17-605E), 1% neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich F7145) a 10% fetální bovinní sérum (FBS, Sigma-Aldrich F2442). Po 24 hodinách kultivace je model připraven pro testy.

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

Příklad 6: Osazení vláknenné membrány buňkami

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

40 Lidské plicní embryonální fibroblasty HEL12469 byly nasazeny v hustotě 35 tis. buněk/cm². HEL12469 byly během kultivace kultivovány dle pokynů ECACC v médiu EMEM EBSS (10X, bez NaHCO₃ a bez L-Gln; Lonza 12-684F) obohaceném o 2,7% (hmotn.) roztok NaHCO₃, a 2mM L-Glutamin (Lonza 17-605E), 1% neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich F7145) a 10% fetální bovinní sérum (FBS, Sigma-Aldrich F2442). Kultura byla kultivována 10 dní.

45 Následně byly nasazeny makrofágy vzniklé diferenciací buněk lidské akutní monocytické leukémie v hustotě 62 tis. buněk/cm². Diferenciace byla vyvolána působením látky forbol 12-myristát 13-acetát (PMA, 100 nM po dobu 72h). Makrofágy byly během kultivace kultivovány v médiu EMEM EBSS (10X, bez NaHCO₃ a bez L-Gln; Lonza 12-684F) obohaceném o 2,7% (hmotn.) roztok NaHCO₃, a 2mM L-Glutamin (Lonza 17-605E), 1% neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich F7145) a 10% fetální bovinní sérum (FBS, Sigma-Aldrich F2442). Po 24 hodinách kultivace je model připraven pro testy.

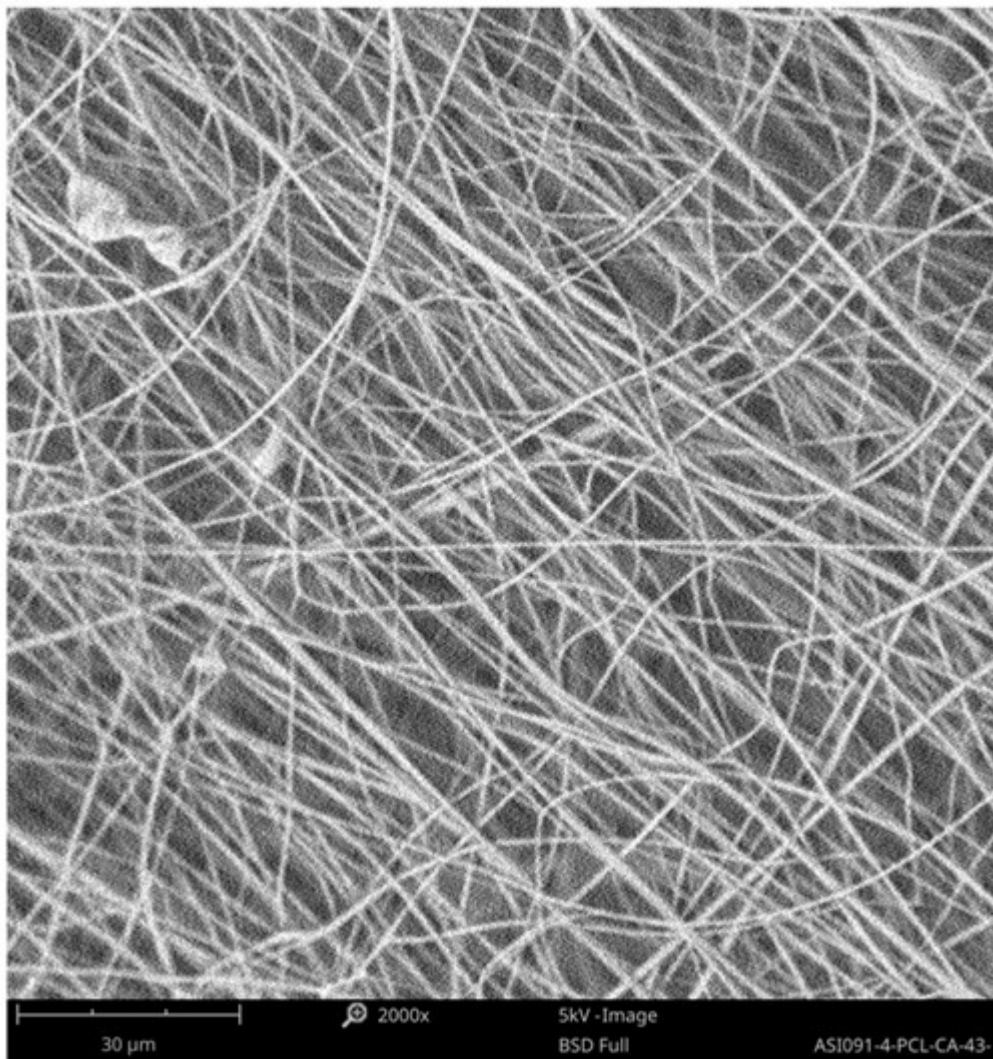
50 Pro hodnocení toxicity byla k médiu přidávána testovaná látka v roztoku, buňky byly zcela ponořené v médiu.

NÁROKY NA OCHRANU

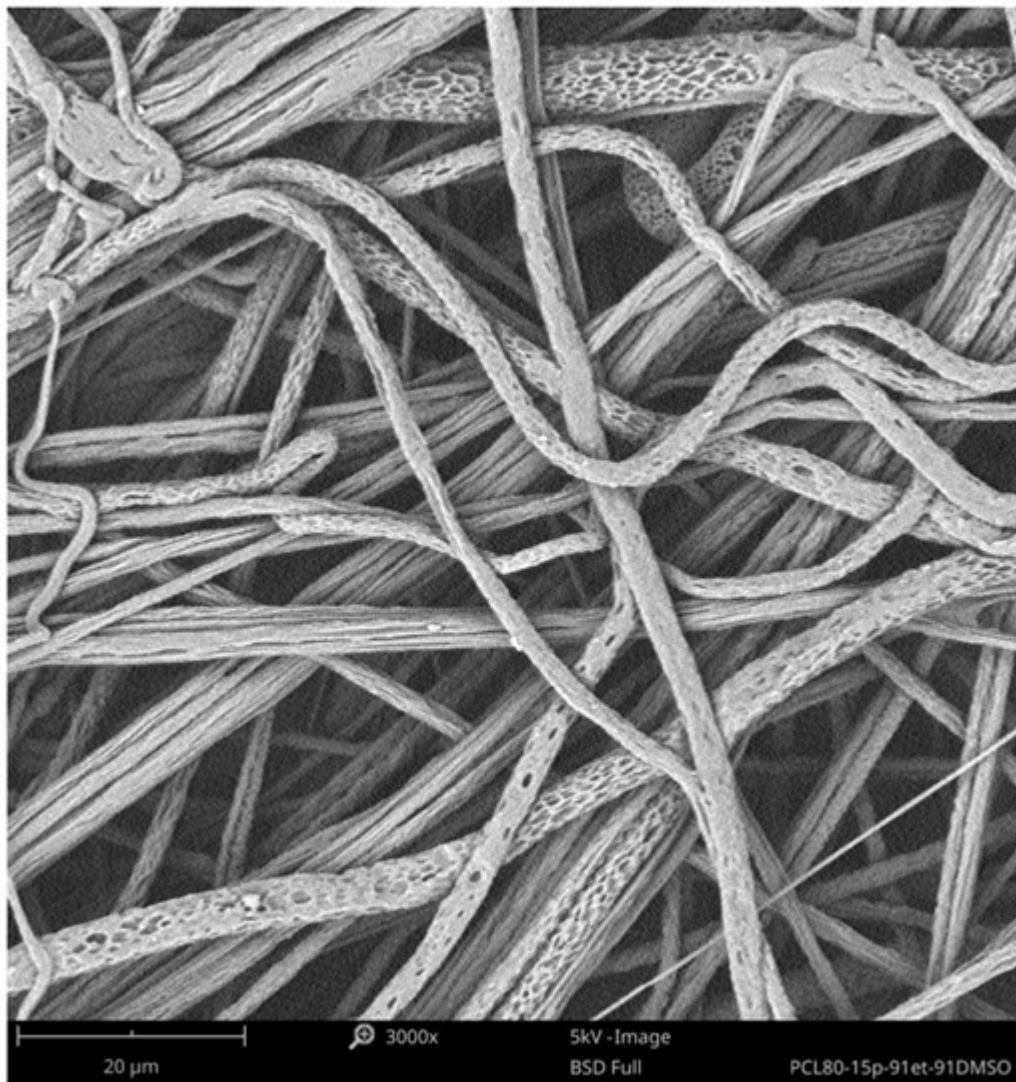
- 5 1. Model plicní tkáně, **vyznačující se tím**, že obsahuje vláknennou membránu tvořenou vlákny z polykaprolaktonu nebo ze směsi polykaprolaktonu a acetátu celulózy v hmotnostním poměru v rozmezí 1:1 až 5:3, přičemž tloušťka vláken je v rozmezí 100 nm až 30 μ m, a uvedená vláknenná membrána je pokrytá vrstvou lidských plicních embryonálních fibroblastů a popřípadě dále vrstvou makrofágů vzniklých diferenciací buněk lidské akutní monocytické leukémie.
2. Model plicní tkáně podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že vláknenná membrána je tvořena vlákny polykaprolaktonu a pokrytá vrstvou kultury lidských plicních embryonálních fibroblastů.
- 10 3. Model plicní tkáně podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že vláknenná membrána je tvořena vlákny polykaprolaktonu a pokrytá vrstvou lidských plicních embryonálních fibroblastů a vrstvou makrofágů vzniklých diferenciací buněk lidské akutní monocytické leukémie.
4. Model plicní tkáně podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že vláknenná membrána je tvořena vlákny ze směsi polykaprolaktonu a acetátu celulózy v hmotnostním poměru v rozmezí 1:1 až 5:3 a pokrytá
15 vrstvou kultury lidských plicních embryonálních fibroblastů.
5. Model plicní tkáně podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že vláknenná membrána je tvořena vlákny ze směsi polykaprolaktonu a acetátu celulózy v hmotnostním poměru v rozmezí 1:1 až 5:3 a pokrytá vrstvou lidských plicních embryonálních fibroblastů a vrstvou makrofágů vzniklých diferenciací buněk lidské akutní monocytické leukémie.
- 20 6. Model plicní tkáně podle nároku 4 nebo 5, **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.
7. Model plicní tkáně podle kteréhokoliv z nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že polykaprolakton má molekulovou hmotnost v rozmezí 40 až 85 kDa, s výhodou 78 až 82 kDa.
- 25 8. Model plicní tkáně podle kteréhokoliv z nároků 1, 4 až 6, **vyznačující se tím**, že acetát celulózy má molekulovou hmotnost v rozmezí 25 až 35 kDa.
9. Model plicní tkáně podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje vícejamkovou destičku, v jejíchž jamkách jsou vloženy uvedené vláknenné membrány pokryté vrstvou lidských plicních embryonálních fibroblastů a popřípadě dále vrstvou makrofágů vzniklých diferenciací buněk lidské akutní monocytické leukémie.
- 30 10. Model plicní tkáně podle kteréhokoliv z nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje inserty pro vícejamkovou destičku, přičemž v jednotlivých insertech jsou uchyceny uvedené vláknenné membrány pokryté vrstvou lidských plicních embryonálních fibroblastů a popřípadě dále vrstvou makrofágů vzniklých diferenciací buněk lidské akutní monocytické leukémie.
- 35 11. Sada pro přípravu modelu plicní tkáně podle kteréhokoliv z nároků 1 až 10, **vyznačující se tím**, že obsahuje
- vláknennou membránu tvořenou vlákny z polykaprolaktonu nebo ze směsi polykaprolaktonu a acetátu celulózy v hmotnostním poměru v rozmezí 1:1 až 5:3, přičemž tloušťka vláken je v rozmezí 100 nm až 30 μ m,
 - zamražené lidské plicní embryonální fibroblasty a popřípadě i

- zamražené makrofágy vzniklé diferenciací buněk lidské akutní monocytické leukémie nebo zamražené buňky lidské akutní monocytické leukémie a látku forbol 12-myristát 13-acetát.

2 výkresy



Obr. 1



Obr. 2