

# UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

## 36 206

(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: **2022-39944**  
(22) Přihlášeno: **30.05.2022**  
(47) Zapsáno: **12.07.2022**

- (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 jaterní tkáně pro toxikologické  
testování a sada pro jeho přípravu**

CZ 36206 U1

## Model jaterní tkáně pro toxikologické testování a sada pro jeho přípravu

### Oblast techniky

5

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

Uváděné nedostatky předkládané technické řešení odstraňuje.

30

### Podstata technického řešení

V jednom aspektu je předmětem technického řešení model jaterní tkáně, který obsahuje vláknennou membránu tvořenou vlákny 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  $\mu$ m, a uvedená membrána je pokrytá vrstvou buněk lidského jaterního karcinomu.

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

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 3,5:3 až 4,5:3, výhodněji 3,8:3 až 4,2:3, ještě výhodněji 3,9:3 až 4,1:3.

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

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  $\mu$ m, nebo porézní mikrovláknenná membrána s vlákny o tloušťce 15 až 25  $\mu$ m.

55

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

- 5 S výhodou je floušťka 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.

Koncentrace buněk při nasazení na nosič je v rozmezí 46 až 65 tisíc buněk/cm<sup>2</sup>. V jaterním modelu podle předkládaného technického řešení má s výhodou vrstva buněk 90% až 100% konfluenci.

- 10 V některých provedeních může model jaterní tkáně dále obsahovat inserty pro vícejamkovou destičku, přičemž v jednotlivých insertech jsou upevněny vláknenné membrány pokryté vrstvou buněk lidského jaterního karcinomu. Velikost insertů (jejich průměr) je typicky v rozmezí 1 cm až 3 cm.

- 15 V některých provedeních může model jaterní tkáně dále obsahovat vícejamkovou destičku, v jejichž jamkách jsou vloženy vláknenné membrány pokryté vrstvou buněk lidského jaterního karcinomu. Velikost jamek je typicky v rozmezí 1 cm až 3 cm.

- 20 V druhém aspektu je předmětem technického řešení sada pro přípravu modelu jaterní 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 floušťka vláken je v rozmezí 100 nm až 30 μm,

- 25 - zamražené buňky lidského jaterního karcinomu.

- 30 Model jaterní 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 buňky lidského jaterního karcinomu.

- 35 Aplikace modelu jaterní tkáně a sady pro jeho přípravu je zejména v oblasti farmacie, *in vitro* toxikologie a potravinářství, zejména například pro testy jaterní 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.

#### 40 Objasnění výkresů

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

#### 45 Příklady uskutečnění technického řešení

Příklad 1: Příprava a charakterizace vláknenné membrány

- 50 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.

5 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:

- 10 • 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
- 15 • Rychlost toku: 50 ml/h
- Teplota / Vlhkost: nastaveno 40 °C/0 %, naměřeno 45 °C/7 %
- Vzdálenost elektrody a kolektoru: 170 mm
- 20 • Zvlákněný objem: 20 ml

25 Výsledná vláknenná membrána měla tloušťku membrány 0,09 až 0,12 mm a tloušťku vláken 0,7 až 0,8  $\mu\text{m}$ . Její struktura je znázorněna na snímku ze skenovací elektronové mikroskopie na Obr. 1.

Příklad 2: Osazení vláknenné membrány buňkami

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

Buňky lidského jaterního karcinomu HepG2 se nasadí v hustotě 55 tisíc buněk / $\text{cm}^2$ .

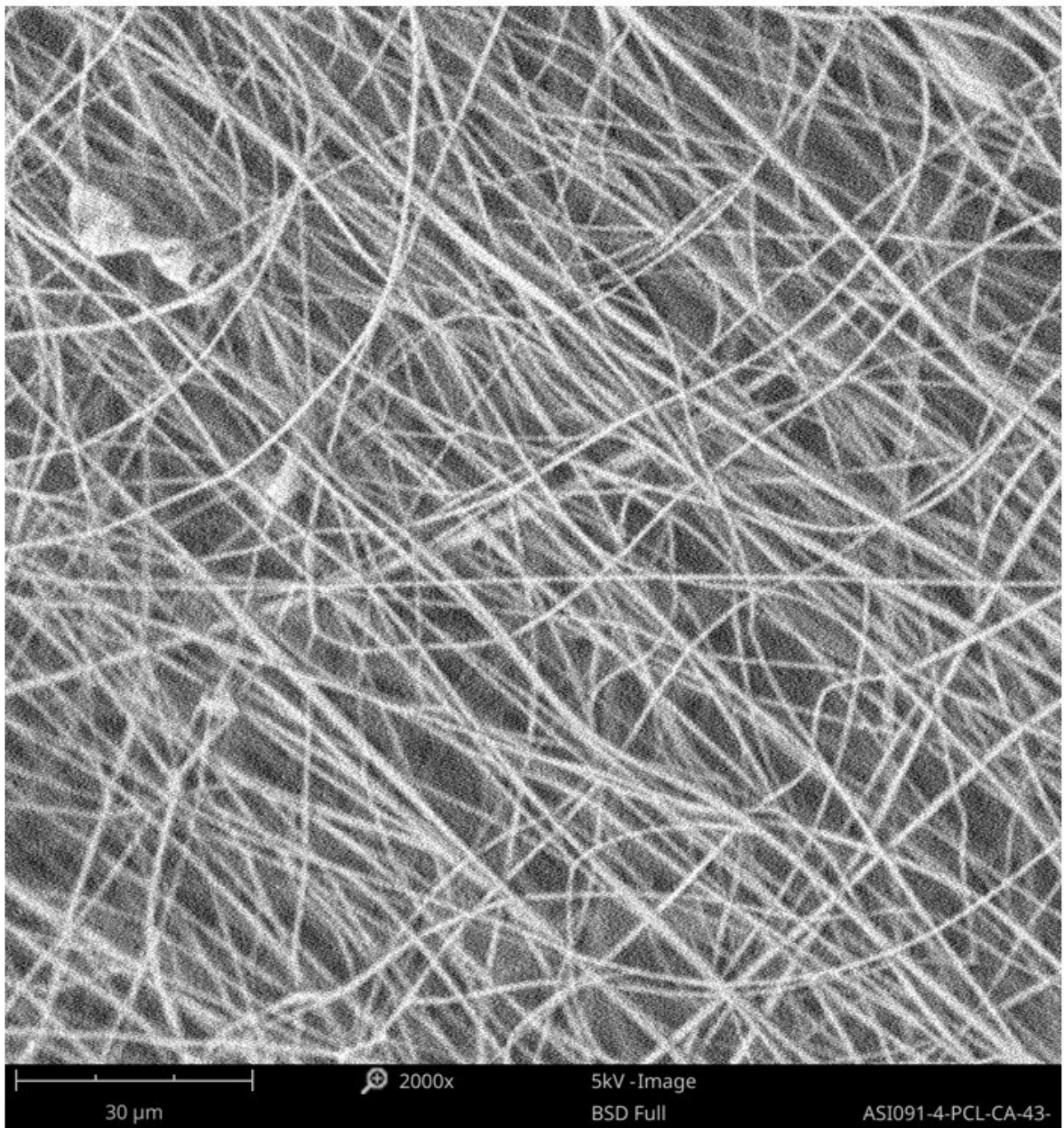
35 HepG2 byly kultivovány dle pokynů ECACC v médiu EMEM EBSS (10X, bez  $\text{NaHCO}_3$  a bez L-Gln; Lonza 12-684F) obohaceném o 2,7%  $\text{NaHCO}_3$  7,5% (Lonza 17-613E), 2mM L-Glutamin (Lonza 17-605E), 1% neesenciální aminokyseliny (Sigma-Aldrich F7145) a tepelně inaktivované 10% fetální bovinní sérum (FBS, Sigma-Aldrich F2442). Kultura byla udržována 7 dní.

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

## NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Model jaterní tkáně, **vyznačující se tím**, že obsahuje vláknennou membránu tvořenou vlákny 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  $\mu\text{m}$ , a uvedená membrána je pokrytá vrstvou buněk lidského jaterního karcinomu.
2. Model jaterní 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 jaterní 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 jaterní 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 jaterní 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  $\mu\text{m}$ .
6. Model jaterní 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  $\mu\text{m}$ , a porézní mikrovláknenná membrána s vlákny o tloušťce 15 až 25  $\mu\text{m}$ .
- 20 7. Model jaterní 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 jaterní 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 buněk lidského jaterního karcinomu jsou umístěny v jamkách destičky.
- 25 9. Model jaterní 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 buněk lidského jaterního karcinomu.
10. Model jaterní tkáně podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, **vyznačující se tím**, že vrstva buněk lidského jaterního karcinomu má konfluenci 90 až 100 %.
- 30 11. Sada pro přípravu modelu jaterní 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 1:1 až 5:3, přičemž tloušťka vláken je v rozmezí 100 nm až 30  $\mu\text{m}$  a
- 35 - zamražené buňky lidského jaterního karcinomu.

1 výkres



Obr. 1