

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLového
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2007-54**
(22) Přihlášeno: **23.01.2007**
(40) Zveřejněno: **29.10.2008**
(Věstník č. 44/2008)
(47) Uděleno: **02.07.2009**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **12.08.2009**
(Věstník č. 32/2009)

(11) Číslo dokumentu:

300 805

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/16 (2006.01)
A61L 27/18 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 2003/0054035 A; US 6 428 802 B; WO 2005/047493 A; US 5 770 417 B

(73) Majitel patentu:

Ústav experimentální medicíny AV ČR, Praha 4 - Krč,
CZ

Ústav makromolekulární chemie AV ČR, Praha 6, CZ
Technická univerzita v Liberci, Liberec, CZ

(72) Původce:

Lesný Petr MUDr., Praha 6, CZ

Syková Eva Prof. MUDr. DrSc., Praha 6, CZ

Michálek Jiří Ing. CSc., Praha 4 - Komárov, CZ

Přádný Martin Ing. CSc., Horoměřice, CZ

Jirsák Oldřich Prof. RNDr. CSc., Liberec 30 - Ostašov,
CZ

Martinová Lenka Ing. CSc., Liberec, CZ

(74) Zástupce:

Inventia s.r.o., Ing. Marta Gabrielová, patentový
zástupce, Na Bělidle 3, Praha 5, 15000

(54) Název vynálezu:

**Biomateriál na bázi nanovláknenných vrstev a
způsob jeho přípravy**

(57) Anotace:

Biomateriál na bázi nanovláknenných vrstev sestává alespoň ze dvou nanovláknenných vrstev, porostlých na obou stranách souvisle živými buňkami, přičemž tyto vrstvy jsou vzájemně propojeny prorůstáním buněk. Nanovláknenné vrstvy jsou netkané a jsou tvořeny syntetickými polymery nebo kopolymery monomerů vybraných ze skupiny zahrnující estery kyseliny methakrylové, amidy kyseliny methakrylové, urethany, vinylalkohol a monomery odvozené od kyseliny mléčné a jejích derivátů, a způsobu jeho přípravy.

CZ 300805 B6

Biomateriál na bázi nanovláknenných vrstev a způsob jeho přípravy

Oblast techniky

5

Vynález se týká biomateriálu na bázi nanovláknenných vrstev a způsobu jeho přípravy.

Dosavadní stav techniky

10

Příprava různých forem pevných látek vyznačujících se přítomností pórů, respektive měrného povrchu odpovídajícího rozměrům strukturních jednotek systému v řádu několika nanometrů až stovek nanometrů je v současné době v popředí zájmu materiálového inženýrství. Prakticky všechny důležité vlastnosti takových systémů se odvozují právě od mimořádně velkého měrného
15 povrchu. Zatímco porézní materiály na bázi polymerů a nanomateriály připravované cestou organizovaných nadmolekulárních struktur jsou dlouhodobě zevrubně studovány, vláknům o průměru řádově v desítkách až stovkách nanometrů se věnuje zvýšená pozornost teprve v posledních pěti letech. Z těchto vláken lze přitom vytvářet vláknenné vrstvy dobrých mechanických vlastností přímo v průběhu procesu zvláknění. Mechanické vlastnosti i morfologie jsou příznivě ovlivněny
20 anizotropickým charakterem vláknenné vrstvy. Póry v takových vrstvách mají specifickou geometrii, díky níž jsou povrchy vláken dobře přístupné.

Nanovláknna jsou obecně popisována jako vlákna, jejichž průměr se pohybuje v submikronové oblasti, tedy v rozsahu do 1000 nm. Mají řadu výjimečných vlastností, jako je například velký
25 měrný povrch vláken, velká pórovitost vláknenné vrstvy a malý průměr pórů. Z hlediska buněčných kultur se struktura nanovláknenných vrstev přibližuje struktuře extracelulární matrix. Tomu odpovídají opakovaná pozorování vyšší adheze buněk k nanovláknům než k mikrovláknům nebo vrstvám identických polymerů [Schindler M, Ahmed I, Kamal J, Nur EKA, Grafe TH, Young Chung H, et al. A synthetic nanofibrillar matrix promotes in vivo-like organization and morpho-
30 genesis for cells in culture. *Biomaterials*. 2005 Oct; 26(28): 5624–31.; Rho KS, Neony L, Lee G, Seo BM, Park YJ, Hong SD, et al. Electrospinning of collagen nanofibers: effects on the behavior of normal human keratinocytes and early-stage wound healing. *Biomaterials*. 2006 Mar; 27(8): 1452–61.; Min BM, Lee G, Kim SH, Nam YS, Lee TS, Park WH. Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and
35 fibroblasts in vitro. *Biomaterials*. 2004 Mar–Apr; 25(7–8): 1 289–97].

Využití mikrovláken k vytvoření porézních trojrozměrných tkáňových náhrad obsahujících buňky je známo již od roku 1993; tato technologie sloužila nejprve k experimentální přípravě náhrad
40 kloubních chrupavek [Robinson D, Efrat M, Mendes DG, Halperin N, Nevo Z. Implants composed of carbon fiber mesh and bone-marrow-derived, chondrocyte-enriched cultures for joint surface reconstruction. *Bull Hosp Jt Dis*. 1993 Spring; 53(1): 75–82.]. Toto využití mikrovláken je chráněno patentem [US 5 759 830, US 5 770 417]. Prostorová síť mikrovláken zde zajišťuje mechanickou pevnost materiálu, udržuje jeho trojrozměrný tvar a vzájemné prostorové uspořádání buněk. Tato metoda však není aplikovatelná na netkané nanovláknenné textilie, protože při
45 dosažení porozity potřebné pro vmezezení buněk mezi vlákna (póry v řádech jednotek až desítek mikrometrů) by materiál vlastní vahou kolaboval.

Standardním postupem pro udržování kultur tkáňových i kmenových buněk je kultivace v monolayeru (růst v ploše); pro tuto kultivaci se využívá speciálně povrchově upravených materiálů, ke
50 kterým buňky adherují (tkáňový plastik, sklo povrchově upravené lamininem, polylysinem, tkáňový plastik porostlý inaktivovanými fibroblasty apod.). Alternativní metody kultivace zahrnují kultivaci v suspenzi nebo v materiálech na bázi řídkých gelů, např. MatriGel®. Všechny popsané metody kultivace mají své nevýhody. Růst buněk v kultuře v monolayeru je podmíněn jejich adhezí k materiálu, na němž jsou kultivovány; médium má přístup pouze k apikální (od
55 kultivačního povrchu odvrácené) vrstvy; vlastnosti buněk se mění po dosažení souvislé (kon-

fluentní) vrstvy; látky produkované buňkami se uvolňují do média a nezůstávají v okolí buněk. Výhodou kultivace v monolayeru je – kromě toho, že jde o velmi dobře standardizovaný postup – také možnost sledovat v mikroskopu jednotlivé buňky (obr. 1).

- 5 Při kultivaci buněk na vláknech, nebo v makroporézních materiálech, jejichž velikost pórů se pohybuje v řádu desítek mikrometrů, se buňky chovají podobně jako v monolayeru – porůstají rovné plochy materiálu (obr. 2).

- 10 Vrstvy z netkané nanovlákněné textilie připravené metodou elektrospinningu je možné využít ke kultivaci buněk v monolayeru podobně jako například tkáňový plastik; první experimenty s buněčnými kulturami na nanovlákněných textiliích byly publikovány v roce 2002 [Li WJ, Laurencin CT, Catterson EJ, Tuan RS, Ko FK. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. J Biomed Mater Res. 2002 Jun 15; 60(4): 613–21.]. Systém pro kultivaci buněk na nanovlákněných vrstvách je chráněn patentem [US 6 790 455]. Očekávané prospěšné
15 využití nanovlákněných vrstev v biomedicině vedlo k podání souhrnné patentové přihlášky [WO 2005/025630], ve které však použití nanovláken pro konstrukci tkáňových náhrad není zmiňováno.

- 20 Řada autorů se pokoušela o vytvoření trojrozměrné tkáňové náhrady s využitím nanovláken. Patentováno bylo využití nanovlákněné vrstvy jako základu, na kterém jsou kultivovány buňky hladké svaloviny a na nich jsou poté vytvářeny další buněčné vrstvy oddělované biomateriálem (například na bázi polymeru) [US 6 428 802]. Zveřejněna byla i možnost vytvoření tkáňové náhrady pomocí kultivace buněk na rovnoběžných vrstvách ze sítě nanovláken a podkladové vrstvy (nosiče, v originále *substrate*). Tyto vrstvy dále mohou být od sebe odděleny libovolným
25 biomateriálem [WO 2005/047493]. Ani zde však není popsán vznik homogenní tkáně vzájemným propojením vrstev obsahujících buňky.

- Materiály na základě kopolymerů 2-hydroxyethylmethakrylátu (HEMA) již byly opakovaně připraveny. Tyto kopolymery jsou vysoce biokompatibilní a adheze buněk k jejich povrchům
30 závisí na jejich elektrickém náboji [Lesny P, Pradny M, Jendelova P, Michalek J, Vacik J, Sykova E. Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 4: Growth of rat bone marrow stromal cells in three-dimensional hydrogels with positive and negative surface charges and in polyelectrolyte complexes. Journal of materials science. 2006 Sep; 17(9): 829–33.].

35

Podstata vynálezu

- 40 Předmětem předloženého vynálezu je biomateriál na bázi nanovlákněných vrstev, jehož podstata spočívá v tom, že sestává alespoň ze dvou nanovlákněných vrstev, porostlých na obou stranách souvisle živými buňkami, přičemž tyto vrstvy jsou vzájemně propojeny prorůstáním buněk, přičemž nanovlákněné vrstvy jsou netkané a jsou tvořeny syntetickými polymery nebo kopolymery monomerů vybraných ze skupiny zahrnující estery kyseliny methakrylové, amidy kyseliny methakrylové, urethany, vinylalkohol a monomery odvozené od kyseliny mléčné a jejich derivátů.

45

S výhodou jsou monomery vybrány ze skupiny zahrnující 2-hydroxyethylmethakrylát, 2-ethoxyethylmethakrylát a 2-hydroxypropylmethakrylamid.

- 50 Znakem vynálezu je, že buňky jsou vybrány ze skupiny zahrnující buňky pojivové tkáně, buňky epitelové, buňky parenchymatózních orgánů a mezenchymální kmenové buňky derivované z kostní dřene nebo tukové tkáně. S výhodou jsou buňky vybrány ze skupiny zahrnující chondrocyty, fibroblasty, hepatocyty a mezenchymální kmenové buňky derivované z kostní dřene nebo tukové tkáně.

Schopnost polymeru formovat se do vláken, tedy zvláknovat se, je ovlivněna řadou procesních a materiálových parametrů, jako je například intenzita elektrického pole, elektrická vodivost, viskozita, molární hmotnost, povrchové napětí, koncentrace polymeru, rozpouštědlo, dielektrické vlastnosti polymerního roztoku, hydrofilnost/hydrofobnost, polymerizační stupeň a stupeň větvení polymeru nebo uspořádání experimentu. Vlastnosti zvlákněného materiálu ovlivňuje nejen chemické složení polymeru, ale i parametry zvláknování. Změnou uvedených parametrů lze ovlivnit nejen proces zvláknování, ale v určitých mezích i strukturu výsledné vrstvy a jemnost vláken. Pro každý polymerní roztok zvláknovaný metodou elektrostatického zvláknování je však třeba zvlášť hledat optimální procesní a systémové parametry, protože nalezené parametry jsou přenositelné jen ve velmi omezené míře.

Způsobem přípravy nanovláken syntetického polymeru nebo kopolymeru podle předloženého vynálezu může být metoda elektrostatického zvláknování „Nanospider“, při které jsou vlákna formována účinkem elektrostatického pole z tenké vrstvy polymerního roztoku, vynášené brodicím válečkem, který je zároveň kladnou elektrodou, a jsou ukládána na kolektor, který je zároveň protielektrodou [CZ 294274 (B6), WO 2005/024101].

Kontakt s molekulami extracelulární matrix a adheze k nim jsou pro většinu buněk velmi důležité faktory, které podmiňují jejich adhezi a růst v organismu. Kultivace buněk ve dvojrozměrných kultivačních systémech neodráží přirozené prostředí v organismu. Struktura nanovláknenné vrstvy je přirovnávána ke struktuře bazální membrány.

Buňky výrazně adherují na nanovláknenné vrstvy podle předloženého vynálezu tvořené polymery s nanovláknennou strukturou, a to i tehdy, když nejeví afinitu k vlastním polymerům bez nanovláknenné struktury. Po naočkování buněk na vrstvu nanovláken dojde v době dnů až týdnů (v závislosti na koncentraci buněk) k tomu, že buňky vrstvu nanovláken hustě porostou a jejich výběžky rostou i mezi vlákna. Je-li vrstva nanovláken dostatečně tenká (jednotky až desítky mikrometrů), přesahuje růst buněk až na opačnou stranu vrstvy; od tloušťky vrstvy cca 100 mikrometrů již buňky na druhou stranu vrstvy nepřesahují.

Předností buněčných kultur na nanovláknenných vrstvách je možnost oboustranného růstu buněk na nanovláknenné vrstvě. Buňky rostoucí na nanovláknenné vrstvě si současně zachovávají schopnost růstu v prostoru, která se projevuje tak, že při přiblížení dvou nanovláknenných vrstev, obsahujících buňky, k sobě dojde ke srůstu těchto vrstev.

Předmětem předloženého vynálezu je dále způsob přípravy biomateriálu podle předloženého vynálezu, sestávajícího alespoň ze dvou nanovláknenných vrstev navzájem propojených prorůstáním buněk, jehož podstata spočívá v tom, že se připraví syntetický polymer nebo kopolymer monomerů vybraných ze skupiny zahrnující estery kyseliny methakrylové, amidy kyseliny methakrylové, urethany, vinylalkohol a monomery odvozené od kyseliny mléčné a jejích derivátů, připravený syntetický polymer nebo kopolymer se zvlákni metodou elektrostatického zvláknování, následně se na metodou elektrostatického zvláknování připravenou zvlákněnou vrstvu syntetického polymeru nebo kopolymeru vysejí buňky a kultivují se za standardních podmínek pro pěstování tkáňových kultur do dosažení souvislého (konfluentního) pokrytí nanovláknenné vrstvy, a poté se alespoň dvě vrstvy zvlákněného syntetického polymeru nebo kopolymeru, porostlé buňkami, manuálně nebo automaticky naskládají na sebe a tato soustava vrstev se zatíží tlakem 0,5 až 2 kPa a kultivuje se za standardních podmínek pro pěstování tkáňových kultur po dobu 1 až 4 týdnů.

Standardní podmínky pro pěstování tkáňových kultur zahrnují použití kombinace média vhodného pro daný typ buněk, fetálního telecího séra nebo jeho náhrady, antibiotik, případně růstových faktorů, a kultivace probíhá v inkubátorech při 37 °C a 5 % CO₂, kultivační médium je měněno každé 2 až 3 dny.

S výhodou jsou monomery vybrány ze skupiny zahrnující 2-hydroxyethylmethakrylát, 2-ethoxyethylmethakrylát a 2-hydroxypropylmethakrylamid.

5 Znakem způsobu podle vynálezu je, že buňky jsou vybrány ze skupiny zahrnující buňky pojivové tkáně, buňky epitelové, buňky parenchymatózních orgánů a mezenchymální kmenové buňky derivované z kostní dřeně nebo tukové tkáně. S výhodou jsou buňky vybrány ze skupiny zahrnující chondrocyty, fibroblasty, hepatocyty a mezenchymální kmenové buňky derivované z kostní dřeně nebo tukové tkáně.

10 Celý postup podle vynálezu tedy spočívá v neoddělitelných procesech zahrnujících přípravu a charakterizaci polymeru, proces zvlákňení, osídlení nanovláken vhodnou buněčnou kulturou, kultivaci buněk na vrstvě nanovláken a zformování výsledného materiálu do podoby vhodné k vybrané aplikaci v tkáňovém inženýrství nebo konvenčním léčebném procesu.

15 Biomedicínální aplikace

V oblasti biomedicínálních aplikací je nutné brát zřetel na kvalitu použitého materiálu z několika úhlů pohledu. První hledisko jsou výsledné užité fyzikálně-chemické vlastnosti, jako jsou mechanické (pevnost, tvrdost, houževnatost, elasticita), botnací (rovnovážný obsah vody), transportní (permeabilita), optické (index lomu) a povrchové (drsnot, smáčivost, kontaktní úhel) vlastnosti. Dalšími podstatnými hledisky jsou pak fyzikální a chemická struktura materiálu, které významně ovlivňují biotoleranci materiálu v aplikacích v daném prostředí. Jedná se o požadovanou interakci materiálu s živou tkání, tedy buněčnou kulturou, dále o jeho chemickou stabilitu, respektive řízenou biodegradaci. Požadavky kladené na vlastnosti biomateriálů jsou často protichůdné a je nutno hledat kompromis mezi nimi. Proto také pro řadu aplikací existuje pouze úzký výběr vhodných chemických struktur.

30 Dalším problémem bioaplikací jsou nutné dlouhodobé testy vlastních účinků a zejména možných nežádoucích účinků použitých látek. Ze všech uvedených důvodů rezultuje přirozená snaha testovat v nových aplikacích již zavedené a tedy dlouhodobě užívané vyzkoušené materiály, které mají dobrý předpoklad vyhovět v testech toxicity, respektive snášenlivosti. V oblasti hydrogelů je takovým materiálem síťovaný poly(2-hydroxyethylmethakrylát) a některé jeho kopolymery nebo poly(2-hydroxypropylmethakrylamid).

35 Biomateriál podle předloženého vynálezu může být použit jako trojrozměrná orgánová náhrada: seskládáním nanovláknenných vrstev porostlých buňkami a jejich rovnoměrným zatížením je možné vytvořit trojrozměrné implantáty. Vhodnou kombinací parametrů zatížení, tloušťka vrstvy, procento plochy porostlé buňkami, počet vrstev a typy buněk v jednotlivých vrstvách – můžeme dosáhnout i vzniku relativně komplexních tkání. Příklad: kombinací vrstev porostlých hepatocyty a vrstev s buňkami endotelu lze vytvořit tkáňovou náhradu s podobným zastoupením buněk, jaké je v jaterní tkáni.

45 Přehled obrázků

Obr. 1 znázorňuje lidské stromální buňky kostní dřeně rostoucí v monolayeru na plastiku pro tkáňové kultury. Černá úsečka znázorňuje měřítko = 100 μm .

50 Obr. 2 znázorňuje lidské chondrocyty (šipka) rostoucí na povrchu polylaktidového vlákna o tloušťce 50 mikrometrů. Černá úsečka znázorňuje měřítko = 50 μm .

Obr. 3 ukazuje schéma přístroje pro elektrospinning. Použité vztahové značky: 1 – kovový válec, kladná elektroda, 2 – zvlákňovaná vrstva polymerního roztoku, 3 – rezervoár polymerního roztoku, 4 – textilní substrát (podpůrný materiál), 5 – směr vzniku nanovláken, 6 – záporná uzemněná elektroda, 7 – odsávání vzduchu a par.

Obr. 4 ukazuje strukturu nanovláknenné vrstvy zobrazenou elektronovým mikroskopem AQUA-SEM.

5 Obr. 5 znázorňuje růst lidských chondrocytů obarvených pomocí imunofluorescence CFDA-SE (karboxyfluorescein diacetát, sukcinimidyl ester) na vrstvě nanovláken; (A) z horní strany jsou viditelné celé buňky (šipka), (B) ze spodní strany jsou viditelné pouze jejich výběžky. Bílá úsečka znázorňuje měřítko = 100 μm .

10 Obr. 6 znázorňuje vznik tkáně v nanovláknenném implantátu připraveného stočením nanovláken do ruličky v míše laboratorního potkana a jejím vložení v podélné ose míchy (A,C,E,G,I) nebo kolmo na podélnou osu míchy (B,D,F,H,J,K,L).

15 A,B – přehledné barvení hematoxylinem–eosinem, obdélníky označují výřezy s vysokou a s nízkou denzitou buněk které jsou dále zobrazeny ve větším měřítku. Měřítka = 500 μm .

C,D – detaily vrůstání tkáně s vysokou denzitou buněk, barvení hematoxylinem–eosinem. Měřítka = 100 μm .

20

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

25

Kopolymer 2-hydroxyethylmethakrylátu (25,5 g) s 2-ethoxyethylmethakrylátem (60 g) byl připraven oxidačně redukční radikálovou polymerací monomerů účinkem persíranu amonného (0,5 g) a pyrosiřičitanu sodného (0,5 g) ve vodně – ethanolickém roztoku (380 g ethanolu, 170 g vody) při 23 °C po dobu 7 dnů. Poté byl vzniklý kopolymer vysrážen do vody (3 l), vysušen a rozpuštěn v ethanolu na koncentraci 16,6 %. Molární hmotnost kopolymeru byla $6,78 \cdot 10^5$ g/mol, vnitřní viskozita 27,1.

30

Příklad 2

35

Polymer 2-ethoxyethylmethakrylátu (85,5 g) byl připraven oxidačně redukční radikálovou polymerací monomeru účinkem persíranu amonného (0,5 g) a pyrosiřičitanu sodného (0,5 g) ve vodně – ethanolickém roztoku (380 g ethanolu, 170 g vody) při 23 °C po dobu 7 dnů. Poté byl vzniklý polymer vysrážen do vody (3 l), vysušen a rozpuštěn v absolutním ethanolu na koncentraci 16,1 %. Molární hmotnost kopolymeru byla $6,78 \cdot 10^5$ g/mol, vnitřní viskozita 26,9.

40

Příklad 3

45

Poly(2-hydroxypropylmethakrylamid) byl připraven srážecí polymerací 10 g monomeru účinkem 0,1 g azobis(isobutyronitrilu) při 60 °C po dobu 8 h. V 40 g acetonu, následným promytím polymeru acetonem a vysušením. Molární hmotnost polymeru byla $8,2 \cdot 10^5$.

50

Příklad 4

Roztok kopolymeru podle příkladu 1 byl zvlákněn metodou elektrostatického zvláknování (elektrospinningu) na laboratorním modelu zařízení pro technologii Nanospider. Schéma přístroje je znázorněno na obr. 3 a podrobně bylo popsáno již dříve [CZ 294274 (B6), WO 2005/024101]. Zvláknění probíhalo při napětí 25 kV.

55

Příklad 5

5 Polyuretan o molární hmotnosti 2000 (lineární polykarbonátový diol a alifatický isophorondiizokyanát) (Larithane LS1086 od firmy Novotex, Itálie) byl zvlákněn z 15% hmotn. roztoku dimethylformamidu s 1 % hmotn. tetraethylamoniumbromidu (vztaženo na polyuretan) metodou elektrostatického zvláknování (elektrospinningu) na laboratorním modelu zařízení pro technologii Nanospider. Zvláknění probíhalo při 25 kV.

10

Příklad 6

15 Polyvinylalkohol se stupněm hydrolyzy 80 ± 8 % (Sloviol R – Chemické závody Nováky, Slovensko) byl zvlákněn z 12 % hmotn. vodného roztoku spolu s glyoxalem 3 % hmotn.) a kyselinou trihydrogenfosforečnou (4,5 % hmotn.) metodou elektrostatického zvláknování (elektrospinningu) na laboratorním modelu zařízení pro technologii Nanospider. Zvláknění probíhalo při 25 kV.

Následně byla vláknenná vrstva zahřáta na 140 °C po dobu 3 minut, při čemž došlo k zesílení a tím stabilizaci vláken proti rozpouštění ve vodě.

20

Příklad 7

25 Kopolymer kyseliny mléčné a glykolové – (typ 7525DL HIGH IV od firmy Lakeshore Biomaterials Birmingham, AL) byl zvlákněn z 15% hmotn. roztoku v dichlormethanu a acetonu (4:1) metodou elektrostatického zvláknování (elektrospinningu) na laboratorním modelu zařízení pro technologii Nanospider. Zvláknění probíhalo při 25 kV.

30

Příklad 8

16,6% ethanolický roztok polymeru podle příkladu 1, jehož vodivost byla upravena přidavkem nasyceného roztoku chloridu sodného na 260 $\mu\text{S/cm}$, byl zvlákněn metodou elektrostatického zvláknování (elektrospinningu) na laboratorním modelu zařízení pro technologii Nanospider. Povrchové napětí polymerního roztoku bylo 27,07 mN/m, napětí při zvláknění 30 kV. Vzniklá nanovláknenná struktura je dokumentována na obr. 4 (fotografie z mikroskopu AQUASEM ve velkém zvětšení).

35

40

Příklad 9

16,1% vodně – ethanolický roztok (66,3 % ethanolu) polymeru podle příkladu 2, jehož vodivost byla upravena přidavkem nasyceného roztoku chloridu sodného na 260 $\mu\text{S/cm}$, byl zvlákněn metodou elektrostatického zvláknování (elektrospinningu) na laboratorním modelu zařízení pro technologii Nanospider. Povrchové napětí polymerního roztoku bylo 26,9 mN/m, napětí při zvláknění 34 kV.

45

Příklad 10

50

16,8% vodný roztok polymeru podle příkladu 3, jehož vodivost byla upravena (přidavkem nasyceného roztoku chloridu sodného na 270 $\mu\text{S/cm}$, byl zvlákněn metodou elektrostatického zvláknování (elektrospinningu) na laboratorním modelu zařízení pro technologii Nanospider. Povrchové napětí polymerního roztoku bylo 26,2 mN/m, napětí při zvláknění 31 kV.

55

Příklad 11

Vrstva nanovláken podle příkladů 1 a 4 o ploše 5 mm^2 a tloušťce $50 \text{ }\mu\text{m}$ byla na jednu hodinu ponořena do suspenze chondrocytů, označených plazmatickým barvivem CFDA, o koncentraci 1×10^6 buněk/ml a kultivována po dobu 2 dní ve standardních podmínkách pro pěstování tkáňových kultur (médiu DMEM/F12 1:1, 10% FCS, penicilin+streptomycin, inkubátor s 5 % CO_2 , 37°C). Po uplynutí této doby byla vrstva nanovláken hustě porostlá z obou stran chondrocyty. Na obr. 5 je ukázán růst buněk z horní (A) a ze spodní (B) strany nanovlákené vrstvy.

Příklad 12

Na vrstvu nanovláken o ploše 5 mm^2 a tloušťce $50 \text{ }\mu\text{m}$ připravenou podle příkladů 1 a 4 byly vysety potkaní buňky olfaktorické glie (OEG); vrstva byla stočena do roličky o tloušťce $1,5 \text{ mm}$ a délce 1 mm a vložena do míchy laboratorního potkana. Po uplynutí 2 týdnů buňky pojivové tkáně a cévy masivně prorostly do implantované nanovlákené roličky. V okolní tkáni nedošlo k zánětlivé infiltraci. Z proximálního i distálního okolí implantátu (roličky) prorůstala u implantátů, jejichž osa byla totožná s osou míchy, i vlákna nervových buněk; u implantátů, které byly kolmé na osu míchy vlákna nervových buněk prorůstala jen minimálně (obr. 6).

Příklad 13

Na vrstvu nanovláken připravenou podle příkladů 1 a 4 o ploše 5 mm^2 a tloušťce $50 \text{ }\mu\text{m}$ byly vysety potkaní stromální buňky kostní dřeně v koncentraci $1 \times 10^4/\text{cm}^3$. Buňky byly obarveny phalloidinem (červeně) a jádra dobarvena DAPI (modře). Za sedm dní porostly obě buněčné kultury (srovnatelně navzájem) nanovlákenou vrstvou srovnatelně jako při růstu na standardním polystyrenu upraveném pro růst tkáňových kultur (obr. 7).

Příklad 14

Pět jednotlivých vrstev nanovláken připravených podle příkladu 1 a 4 o ploše 5 mm^2 a tloušťce $50 \text{ }\mu\text{m}$ bylo ponořeno na 1 h do suspenze lidských chondrocytů o koncentraci 1×10^6 buněk/ml a kultivováno po dobu 2 dní ve standardních podmínkách pro pěstování tkáňových kultur (médiu DMEM/F12 1:1, 10% FCS, penicilin + streptomycin; inkubátor 5 % CO_2 a 37°C) tak, aby chondrocyty porostly obě strany každé vrstvy netkané nanovlákené textilie. Vrstvy byly poté naskládány na sebe, rovnoměrně zatíženy (1 kPa) a kultivovány po následující tři týdny opět za stejných standardních podmínek jako předchozí kultivace. Po této době v materiálu vznikla řídká mezenchymální tkáň prorostlá všemi vrstvami nanovláken (obr. 8).

Příklad 15

Pět jednotlivých vrstev nanovláken připravených podle příkladů 1 a 4 o ploše 5 mm^2 a tloušťce $50 \text{ }\mu\text{m}$ bylo ponořeno na 1 h do suspenze lidských stromálních buněk kostní dřeně o koncentraci 1×10^6 buněk/ml a kultivováno po dobu 2 dní ve standardních podmínkách pro pěstování tkáňových kultur (médiu DMEM/F12 1:1, 10% FCS, penicilin + streptomycin; inkubátor 5 % CO_2 a 37°C) tak, aby buňky porostly obě strany každé vrstvy netkané nanovlákené textilie. Vrstvy byly poté naskládány na sebe, rovnoměrně zatíženy (1 kPa) a kultivovány po následující dva týdny za stejných standardních podmínek jako předchozí kultivace. Po této době buňky propojily jednotlivé vrstvy nanovlákené textilie (obr. 9).

Příklad 16

Na vrstvu nanovláken připravenou podle příkladů 1 a 4 o ploše 1 cm^2 a tloušťce $50 \text{ }\mu\text{m}$ byly
 5 vysety stromální buňky kostní dřeně a mezenchymální buňky derivované z tukové tkáně v koncentraci $1 \times 10^5 / \text{cm}^3$. Po 3 dnech kultivace ve standardních podmínkách pro pěstování tkáňových kultur buňky porostly celou vrstvu nanovláken; zobrazení v konfokálním mikroskopu po obarvení phalloidinem ukázalo, že buňky porůstají souvisle (konfluentně) vrstvu nanovláken (obr. 10A) a vysílají výběžky do vrstvy nanovláken (obr. 10B). V místech, kde byla nanovláčenná vrstva zvlněná, porůstaly buňky její povrch (obr. 10C); buňky rostly i na okraji nanovláčenné vrstvy, kde byla koncentrace buněk nejnižší (obr. 10D).

Příklad 17

15 Stejný experiment jako v příkladu 16 byl zopakován s vrstvou nanovláken připravenou podle příkladů 3 a 10 o ploše 1 cm^2 a tloušťce $50 \text{ }\mu\text{m}$. 3D zobrazení v konfokálním mikroskopu po obarvení buněk phalloidinem prokázalo obdobný růst, jako v předchozím případě (obr. 10E), v místech na okrajích rostly na povrchu vrstvy izolované buňky (obr. 10F).

20

Příklad 18

Na vrstvách nanovláken připravených podle příkladů 2 a 9 (obr. 11A) a 3 a 10 (obr. 11B) byly
 25 kultivovány za standardních podmínek pro pěstování tkáňových kultur mezenchymální buňky derivované z tukové tkáně laboratorního potkana po dobu 4 dnů. Poté byly buňky obarvené phalloidinem. Buňky porostly konfluentně vrstvu nanovláken.

Příklad 19

30

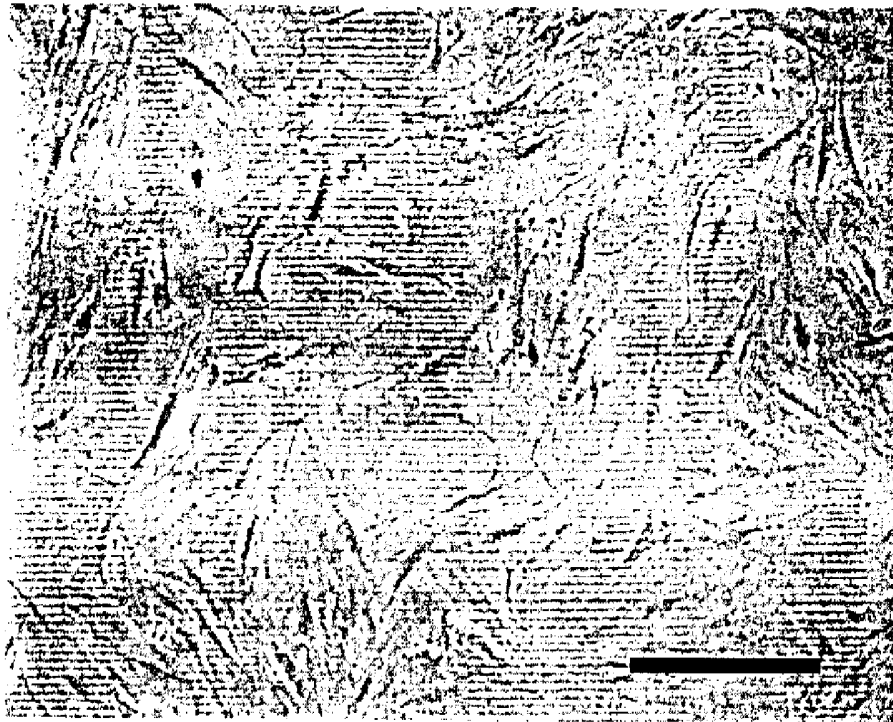
10 jednotlivých vrstev nanovláken připravených podle příkladů 1 a 4 o ploše 10 mm^2 a tloušťce $50 \text{ }\mu\text{m}$ bylo ponořeno na 1 h do suspenze lidských chondrocytů o koncentraci 1×10^6 buněk/ml a kultivováno po dobu 2 dní ve standardních podmínkách pro pěstování tkáňových kultur (médiu DMEM/F12 1:1, 10% FCS, penicilin + streptomycin; inkubátor 5 % CO_2 a 37°C tak,
 35 aby chondrocyty porostly obě strany každé vrstvy netkané nanovláčenné textilie. Vrstvy byly poté naskládány na sebe, nerovnoměrně zatíženy (0 až 2 kPa) a kultivovány po následující tři týdny opět za stejných standardních podmínek jako předchozí kultivace.

Po této době v části materiálu, která byla zatížena vyšším tlakem než 0,5 kPa, vznikla řídká
 40 mezenchymální tkáň prorostlá všemi vrstvami nanovláken a došlo k ukládání extracelulární matrix (obr. 12A); v nezatížené části materiálu nedošlo k propojení vrstev (obr. 12B).

45

PATENTOVÉ NÁROKY

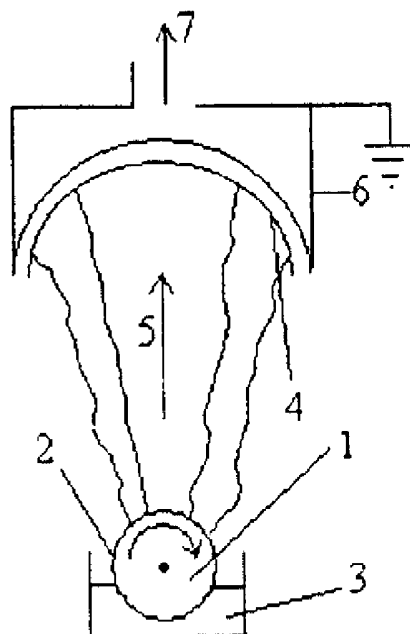
- 5 1. Biomateriál na bázi nanovláknenných vrstev, **v y z n a ě n ý t í m**, že sestává alespoň ze dvou nanovláknenných vrstev, porostlých na obou stranách souvisle živými buňkami, přičemž tyto vrstvy jsou vzájemně propojeny prorůstáním buněk, přičemž nanovláknenné vrstvy jsou netkané a jsou tvořeny syntetickými polymery nebo kopolymery monomerů vybraných ze skupiny zahrnující estery kyseliny methakrylové, amidy kyseliny methakrylové, urethany, vinylalkohol a monomery odvozené od kyseliny mléčné a jejích derivátů.
- 10 2. Biomateriál podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že monomery jsou vybrány ze skupiny zahrnující 2-hydroxyethylmethakrylát, 2-ethoxyethylmethakrylát a 2-hydroxypropylmethakrylamid.
- 15 3. Biomateriál podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a ě n ý t í m**, že buňky jsou vybrány ze skupiny zahrnující buňky pojivové tkáně, buňky epitelové, buňky parenchymatózních orgánů a mezenchymální kmenové buňky derivované z kostní dřene nebo tukové tkáně.
- 20 4. Biomateriál podle nároku 3, **v y z n a ě n ý t í m**, že buňky jsou vybrány ze skupiny zahrnující chondrocyty, fibroblasty, hepatocyty a mezenchymální kmenové buňky derivované z kostní dřene nebo tukové tkáně.
- 25 5. Způsob přípravy biomateriálu podle nároku 1, **v y z n a ě n ý t í m**, že se připraví syntetický polymer nebo kopolymer monomerů vybraných ze skupiny zahrnující estery kyseliny methakrylové, amidy kyseliny methakrylové, urethany, vinylalkohol a monomery odvozené od kyseliny mléčné a jejích derivátů, připravený syntetický polymer nebo kopolymer se zvlákni metodou elektrostatického zvlákňování, následně se na metodou elektrostatického zvlákňování připravenou zvlákněnou vrstvu syntetického polymeru nebo kopolymeru vysejí buňky a kultivují se za standardních podmínek pro pěstování tkáňových kultur do dosažení souvislého pokrytí nanovláknenné vrstvy buňkami, a poté se alespoň dvě vrstvy zvlákněného syntetického polymeru nebo kopolymeru, porostlé buňkami, manuálně nebo automaticky naskládají na sebe a tato soustava vrstev se zatíží tlakem 0,5 až 2 kPa a kultivuje se za standardních podmínek pro pěstování tkáňových kultur po dobu 1 až 4 týdnů.
- 30 6. Způsob podle nároku 5, **v y z n a ě n ý t í m**, že monomery jsou vybrány ze skupiny zahrnující 2-hydroxyethylmethakrylát, 2-ethoxyethylmethakrylát a 2-hydroxypropylmethakrylamid.
- 35 7. Způsob podle nároku 5 nebo 6, **v y z n a ě n ý t í m**, že buňky jsou vybrány ze skupiny zahrnující buňky pojivové tkáně, buňky epitelové, buňky parenchymatózních orgánů a mezenchymální kmenové buňky derivované z kostní dřene nebo tukové tkáně.
- 40 8. Způsob podle nároku 7, **v y z n a ě n ý t í m**, že buňky jsou vybrány ze skupiny zahrnující chondrocyty, fibroblasty, hepatocyty a mezenchymální kmenové buňky derivované z kostní dřene nebo tukové tkáně.
- 45



Obr. 1



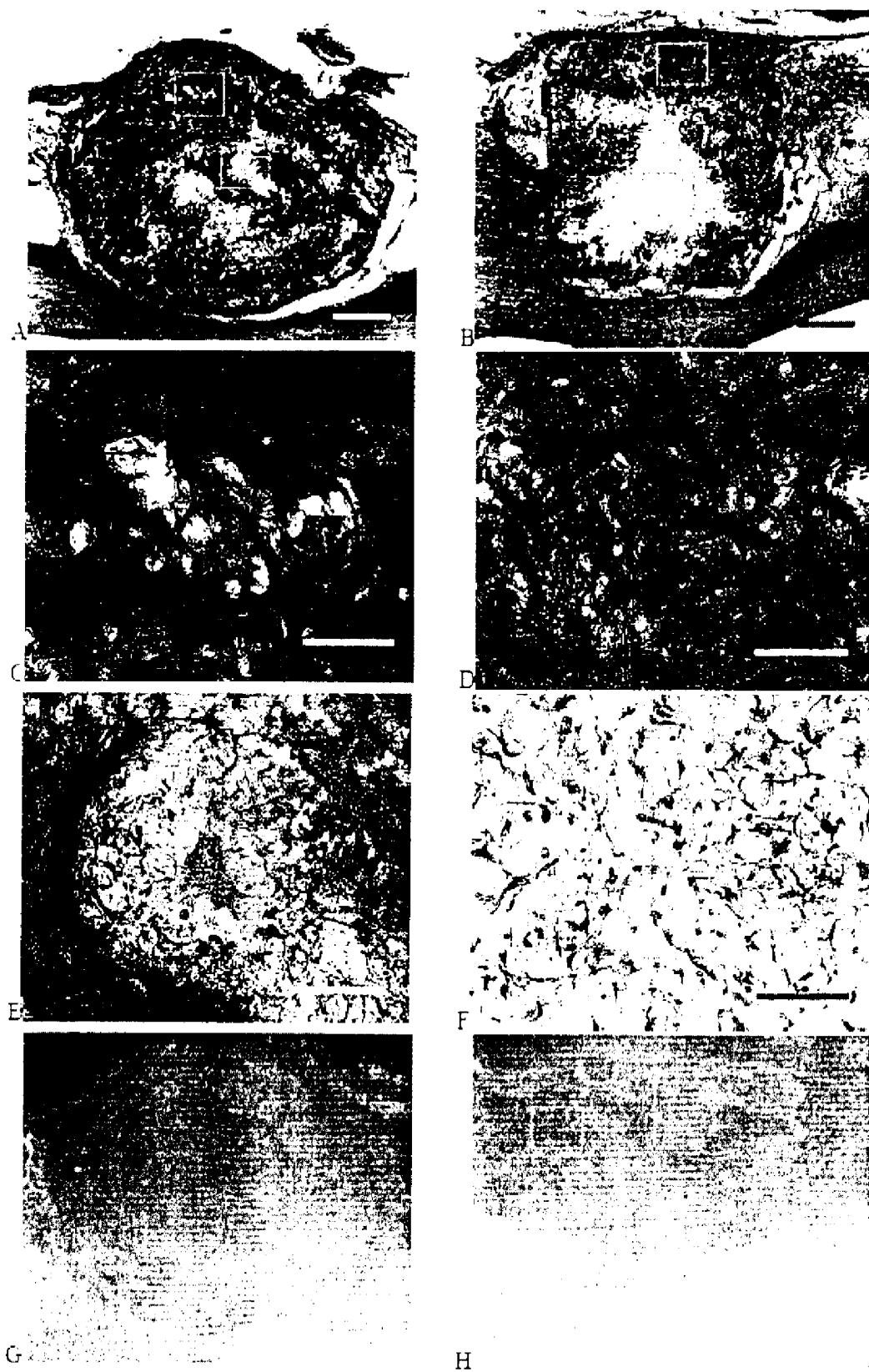
Obr. 2



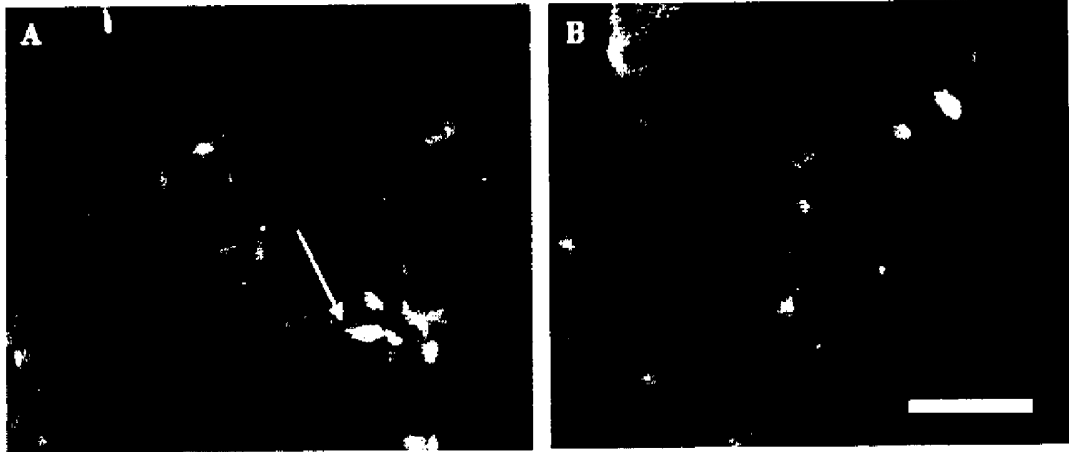
Obr. 3



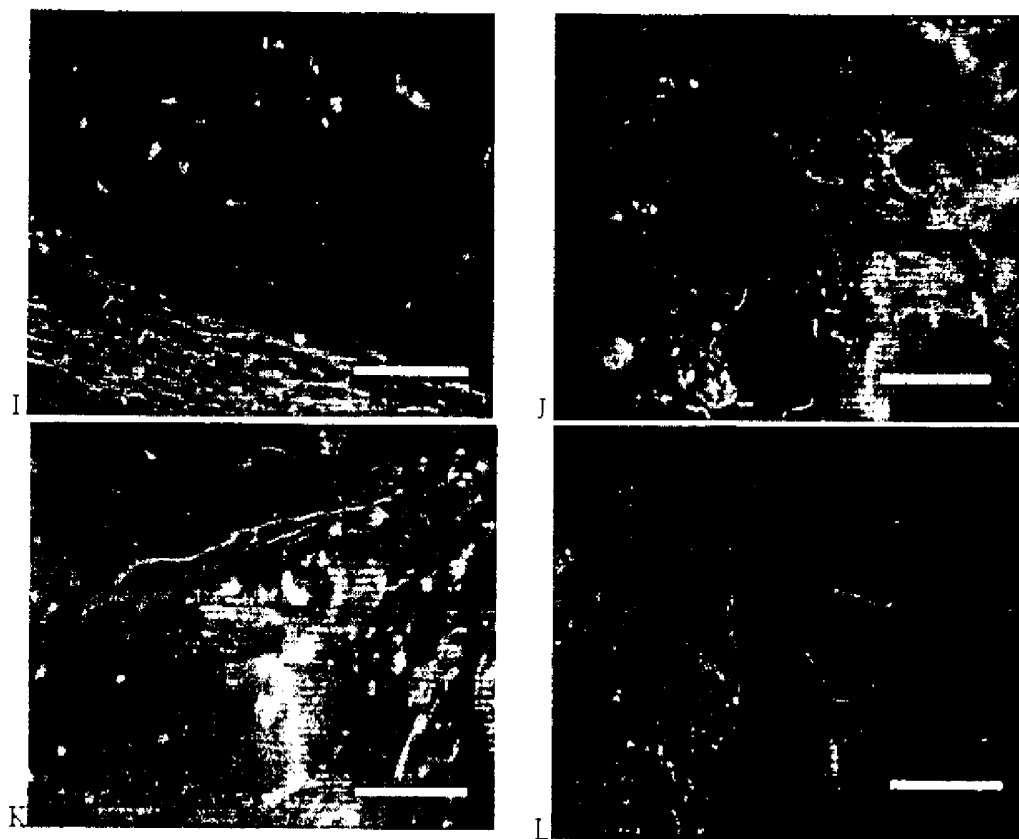
Obr. 4



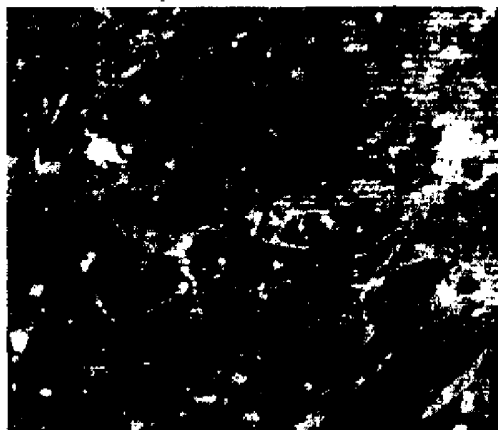
Obr. 6



Obr. 5



Obr. 6 (pokrač.)



10x



20x

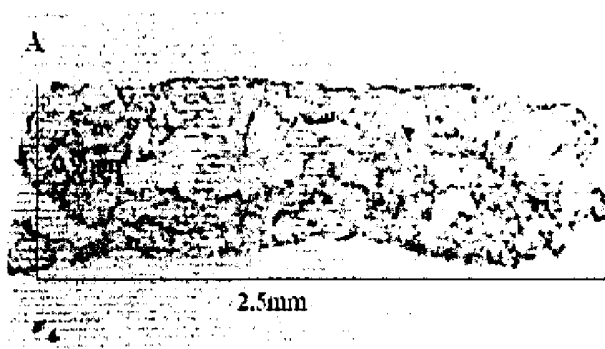


40x



63x

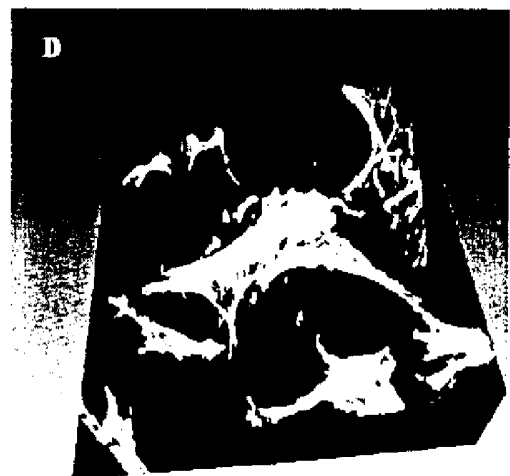
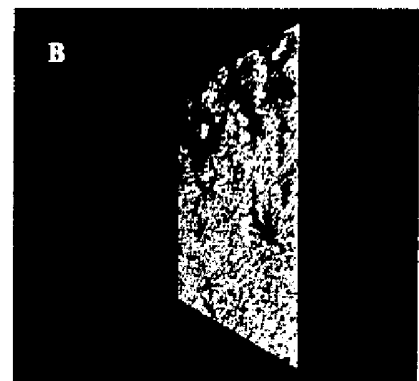
Obr. 7



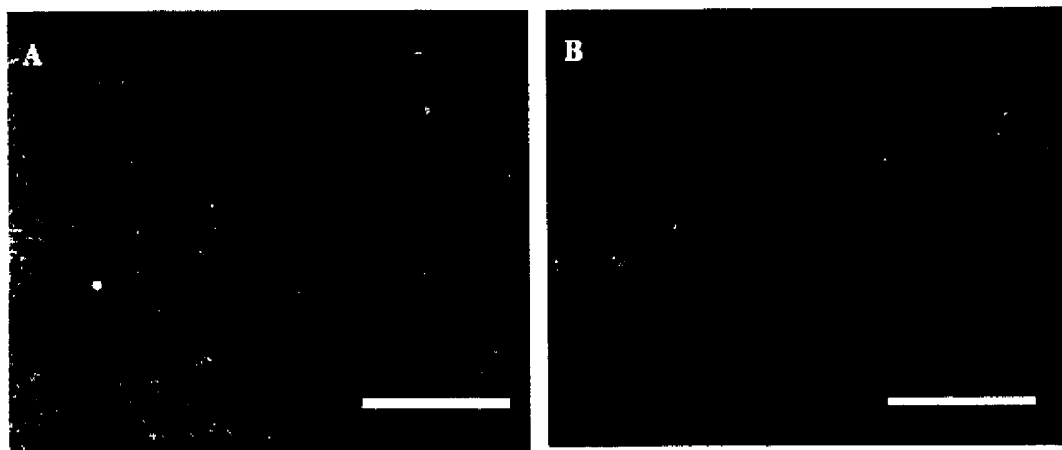
Obr. 8



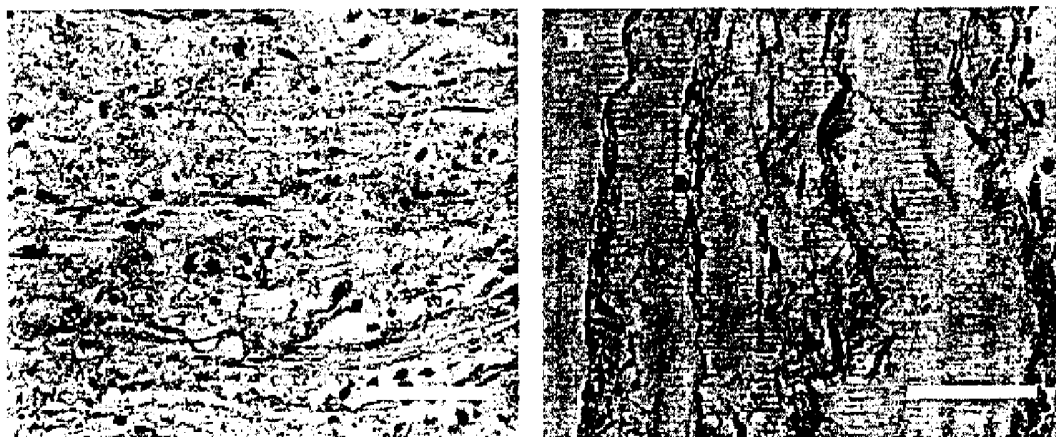
Obr. 9



Obr. 10



Obr. 11



Obr. 12