

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

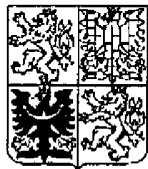
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

## 1876-98

(19)

ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **15. 10. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **16.10.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/731484**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11. 11. 98**  
(**Věstník č. 11/98**)

(86) PCT číslo: **PCT/CA97/00766**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 98/16266**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

**A 61 L 27/00**  
**A 61 L 31/00**

(71) Přihlášovatel:

ORGANOCEL CANADA LTEE., Québec, CA;

(72) Původce:

Woerly Stéphane, Québec, CA;

(74) Zástupce:

PATENTSERVIS PRAHA a.s., Jivenská 1,  
Praha 4, 14000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Implantovatelný hydrogel z akrylamidového kopolymeru pro terapeutické účely**

(57) Anotace:

Hydrogel je kopolymerem N-substituovaného metakrylátu nebo akrylamidu, látky tvořící příčné vazby, komplexního cukru nebo jeho derivátu, tkáňového adhezního peptidu nebo polymeru konjugovaného s protilátkami. Polymer je heterogenní, elasticky deformovatelný a má rovnovážný obsah vody alespoň 80 %. Lze jej použít například pro tkáňové regenerace a orgánové reparace ve vyvíjejícím se i dospělém nervovém systému. Je rovněž popsán způsob přípravy hydrogelu.

CZ 1876-98 A3

## Implantovatelný hydrogel z akrylamidového kopolymeru pro terapeutické účely

### Oblast techniky

Vynález se týká polymerního hydrogelu. Přesněji se tento vynález týká porézních implantovatelných polymerních hydrogelů pro terapeutické účely, které mohou být například použity pro vnitřní tkáňové náhrady jakéhokoliv parenchymatózního orgánu, pro hojení zranění, pro regenerace tkání, a obecně pro orgánové reparace, zvláště ve vyvíjejícím se i dospělém nervovém systému, a pro jiné podobné terapie. Vynález je zvláště zaměřen na polymerní hydrogel, který po implantaci vytvoří porézní matrix, kterou prostoupí biologické tekutiny a molekuly a vytvoří tzv. organoidní hydrogel, který je progresivně začleněn do hostitelské tkáně následným prorůstáním krevních cév a tkáně. Vynález se rovněž týká způsobu zavádění živých tkáňových buněk, prekurzorových buněk nebo geneticky modifikovaných buněk do takového polymerního hydrogelu, aby se vytvořily biohybridní materiály, které lze použít v trojrozměrných tkáňových kulturách nebo pro tkáňové rekonstrukce. Vynález se dále týká způsobu výroby polymerního hydrogelu podle tohoto vynálezu a biohybridních materiálů vyrobených způsobem uvedeným výše. Konečně se vynález týká způsobu léčby poškozených částí centrálního nervového systému, zvláště míchy a optického nervu, nebo periferních nervů, nebo jiných tkání pomocí implantace polymerového hydrogelu nebo biohybridních materiálů podle tohoto vynálezu do těchto tkání.

### Dosavadní stav techniky

Transplantace orgánů jsou v současnosti jediným způsobem léčby orgánových selhání, používané rovněž pro obnovení nebo zlepšení funkce a výkonnosti orgánů. Mezi některé

nevýhody orgánové transplantační léčby patří možnost přenosu onemocnění z donora na recipienta, nedostatek a omezená dostupnost donorových orgánů, a možné imunologické zkřížené reakce

Proto například transplantaci míchy nelze uskutečnit ani z klinického ani z biologického hlediska, a v důsledku toho neexistuje žádná dostupná léčba pro pacienty s poraněním míchy, přičemž jen v USA existuje 250 000 chronicky paralyzovaných pacientů a každým rokem přibývá dalších 10 000.

Na druhé straně implantací, transplantací, nebo injekcí buněk do organismu za účelem náhrady nebo obnovy chybějících buněk či části orgánových tkání nelze úspěšně dosáhnout správné tvorby nových tkání z důvodu nedostatku podpůrné extracelulární matrix, představující nezbytnou tkáňovou "kostru" pro expanzi a organizaci tkáně do integrální struktury v kontaktu s hostitelským orgánem. Kromě toho buňky potřebují být umístěny ve fyziologicky odpovídajícím prostředí, usnadňujícím difúzi živin, kyslíku, humorálních a buněčných komponent tak, aby se udržela vysoká životaschopnost a růstový potenciál buněk po implantaci.

Porézní hydrogely podle tohoto vynálezu jsou deformovatelné porézní polymerní matrice nasycené mezibuněčnou tekutinou nebo vodou a takto poskytují nezbytnou tkáňovou "kostru" a hydratovaný prostor, skrze který mohou buňky proliferovat a sestavit se do histologicky správné supracelulární struktury a vytvořit tak novou funkční tkáň.

Různé experimentální strategie intraspinálních transplantací byly popsány v literatuře jako pokusy napravovat poškození míchy (modely na zvířatech) s použitím různých implantačních materiálů, které lze rozčlenit do dvou širokých kategorií implantátů: (1) biologické tkáně a (2) protetické materiály.

V kategorii (1) se k přemostění míšni léze fetální nervovou tkání používá donorových tkáňových štěpů, ať už syngenních autoštěpů nebo homoštěpů, aloštěpů nebo xenoštěpů, buď v podobě (a) pevného štěpu (např. Bregman, Dev. Brain Res., 34, 265, 1987; Houle and Reier, J.

Comp. Neurol., 269, 535, 1988) nebo (b) suspenze zahrnující smíšené kultury buněk nervové tkáně (např. Goldberg and Berstein, J. Neuroscience Res., 19, 34, 1988; Hoovler and Wrathall, Acta Neuropathol., 81, 303, 1991); Schwannovy buňky rekombinované s kulturou senzoricých neuronů (Kuhlenge et al., J. Comp. Neurol., 293, 74, 1990); nezralé astrocyty (např. Bernstein and Goldberg, Res. Neurol. Neurosci., 2, 261, 1991); prekursorů buněk nervové tkáně (Monteros et al., Dev. Neurosci., 14, 98, 1992) a nesmrtelné buněčné linie (Zompa et al., Int. J. Dev. Neurosci., 11, 535, 1993); segment periferního nervu zahrnující pěstované buňky tkání jiných než nervových (Wrathall et al., Acta Neuropathol., 57, 59, 1982) nebo s embryonální nervovou tkání (Horvat et al., Res. Neurol. Neurosci., 2, 289, 1991). Objevené protetické materiály náležející do kategorie (2) zahrnují čisté kolagenové matrice (de la Torre and Goldsmith, Brain Res., Bull., 35, 418, 1994; Marchand and Woerly, Neurosci. 36, 45, 1990; Gelderg, Brain Res., 511, 80, 1990], které obsahují neuroaktivní látky (Goldsmith and de la Torre, Brain Res., 589, 217, 1992) nebo které zahrnují kultivované nervové štěpy (Bernstein and Goldberg, Brain Res. 377, 403, 1986); upravené nitrocelulózy implantáty (Schreyer a Jones, Dev. Brain Res. 35, 291, 1987; Houlé and Johnson, Neurosci. Lett. 103, 17, 1989); kolagenové implantáty (Paino et al., J. Neurocytol., 23, 433, 1991) a polymerní vodící kanály z poly(akrylonitril-vinyl chloridu) (Xu et al., J. Comp. Neurol., 351, 145, 1995) obalující Schwannovy buňky.

Tyto přístupy se přesně zaměřují na podporu axonální regenerace s použitím různých tkáňových substrátů jako zdrojů nových axonů nebo komplexních protetických substrátů pro podporu a vedení rostoucích axonů a opomíjejí klinicky závažnou otázku reparace míšni nebo mozkové tkáně pomocí regenerace velkého štěpu hostitelské tkáně a remodelace zhojené rány, např. po odstranění nekrotické nebo jizevnaté tkáně vytvořené po zranění.

Polymerní hydrogely byly objeveny jako implantáty v nervovém systému (Woerly et al., Biomaterials, 11, 97, 1990; Woerly et al., Biomaterials, 12, 197, 1991; Woerly et al., J. Neural

Transpl. Plast., 3, 21, 1992; Woerly et al., Cell Transpl., 2, 229, 1993; Woerly et al., J. Neural Transpl. Plast., 5, 245, 1995). Tyto hydrogely byly připraveny polymerizací volných radikálů ve vodě, s použitím persulfátu amonného a metabisulfitu sodného nebo persulfátu a kyseliny askorbové jako redoxních iniciátorů s hydroxyethylmetakrylátem (pHEMA), glycidylmetakrylátem (pGMA) nebo N-hydroxypropylmetakrylamidem (pHPMA) nebo sloučeninou obsahující uvedené monomery s agens vytvářejícím příčné vazby, kterým je buď etylenglykol a tetraethylenglykoldimetakrylát nebo metylenbisakrylamid. Tyto gely jsou typicky homogenní a opticky transparentní s bimodální porozitou včetně otevřených (dostupný objem pórů) a zavřených pórů, jak bylo prokázáno pomocí rtuťové porozimetrie a scanovacího elektronového mikroskopu. Porézni struktura těchto gelů je typicky tvořena paralelními válcovitými kapilárami s okrouhlým průřezem, jak je ukázáno na obr. 1, které mají průměrný poloměr pórů 7 až 13 mikrometrů. Frakční porozita se pohybuje mezi 50 až 85 % u pHEMA hydrogelů, 60 až 65 % u pGMA hydrogelů a 70 až 94 % u pHPMA hydrogelů. Nejméně 50 % objemu pórů představují póry o velikosti 1,2 až 4 mikrometry u pHEMA, 6 až 13 mikrometrů u pGMA a 10 až 14 mikrometrů u pHPMA. Bylo zjištěno, že jejich biologická aktivita závisí na vnesení nebo kopolymerizaci kolagenu do sítě obsahující příčné vazby. Žadatel provedl experimenty implantace do mozku, které ukázaly, že může být dosaženo určitého stupně tkáňové reparace podle stupně prorůstání tkáně do homogenní gelové matrice. Tato reakce se mění podle monomerního složení a přidávaných funkčních skupin. Homogenní hydrogely často vyvolávají vytvoření fibrózní kapsy, která má tendenci izolovat implantát od hostitele. Je to v důsledku jak mechanických vlastností gelů, které se neshodují dostatečně s vlastnostmi živé nervové tkáně, tak malé objemové frakce makropórů. V míše se tyto homogenní hydrogely nezačleňují do hostitelské tkáně a jsou rychle obklopeny pojivovou tkání a gliální jizvou bez prorůstání axonů nebo jiných tkáňových složek, jak je ukázáno na obr. 2. Dále je nutno brát v úvahu fyzikální činitel, omezující povrchovou plochu, která může vznikat a která představuje

významný parametr pro úspěšnou interakci tkáni vyvolanou válcovitými póry homogenního hydrogelu. Pro určitý objem gelu dosahuje povrchová plocha určité limitní hodnoty, která je dána maximálním poloměrem jednoho póru zaujímajícího celkový objemu gelu. Na druhé straně, zvyšování povrchové plochy zmenšováním velikosti pórů vede k poklesu celkového prázdného objemu, který je inkompatibilní s prorůstáním tkáně a akumulací biomasy.

Harvey a spolupracovníci (Brain Res., 671, 119, 1995) popisují houbovitý polymer z poly(2-hydroxyethylmetakrylátu), který se používá jako mozkový implantát pro regeneraci tkáně a růst axonů. Tento produkt je nejlepší používat s přídavkem kolagenu do polymerní sítě jako tkáňovým bioadhezivní faktorem a po přidání Schwannových buněk.

U.S. patent č. 4 902 295 popisuje způsob výroby umělé tkáně z buněk pankreatické tkáně. Způsob zahrnuje polymerizaci prekurzorů matrice, gelových prekurzorů a promotorů s živými buňkami ve vodní fázi. Všechny polymerové prekurzory a promotory jsou biologickými sloučeninami podléhajícími v těle rychlé biodegradaci, které po implantaci nevykazují dlouhodobou stabilitu.

Bellakomda, R.; Ranieri, J.P.; Bouche, N.; Aebischer, P. ("Hydrogel-Based Three-dimensional Matrix for Neural Cells", J. Biomed. Mat. Res. 1995, 29, 663-671) popisují techniku imobilizace buněk nervové tkáně v agaróze a gelech ekvivaletních s extracelulárním prostředím (Matrigel®).

Tyto materiály jsou biologické a biodegradovatelné.

Krewson, C.E.; Chung, S.W.; Dai, W.; Saltzman, W.M. ("Cell Aggregation and Neurite Growth in Gels of Extracellular Matrix Molecules". Biotechnol. Bioeng. 1994, 43, 555-562) popisují techniku, ve které jsou buňky P12 suspendovány v gelech tvořených čistým kolagenem nebo kolagenem v kombinaci s fibronektinem či lamininem, a v gelech z agarózy a kolagenu.

Tyto gely jsou biodegradovatelné.

Cascone, M. G.; Laus, M.; Ricci, D.; Sbarbati del Guerra, R. ("Evaluation of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels as a Component of Hybrid Artificial Tissues", *J. Mat. Sci. Mat. Med.* 1995, 6, 71-75) popisují technologii použití polyvinylalkoholových hydrogelů s fyzikálními příčnými vazbami, do kterých jsou fibroblastové buňky zavedeny během jednoho cyklu zmrazení a tání.

Wald, H. L.; Sarakinos, G.; Lyman M.D.; Mikos A. G.; Vacanti J. P.; Langer, R. ("Cell Seeding in Porous Transplantation", *Biomat.* 1993, 14, 270-278) popisují způsob uzavírání hepatocytů do degradovatelných polymerních pěn z poly L-mléčné kyseliny pomocí mikroinjekční techniky. Tato technika neposkytuje nedegradovatelnou matrix a nedovoluje rovnoměrnou distribuci buněk v polymerní matici.

Mikos, A.G.; Bao, Y.; Cima, L. G.; Ingber, D.E.; Vacanti, J.P.; Langer, R. ("Preparation of Poly(glycolic acid) Bonded Fiber Structures for Cell Attachment and Transplantation", *J. Biomed. Mat. Res.* 1993, 27, 183-189) popisují způsob vytvoření sítě z polyglykolové kyseliny s vazbou mezi vlákny na kultivaci hepatocytů. Tento polymer je biodegradovatelný a způsob vnášení buněk do matrice se liší od způsobu zvaného "entrapment".

Puerlacher, W.C.; Mooney, D.; Langer, R.; Upton, J.; Vacanti, J. P.; Vacanti, C. A. ("Design of Nasoseptal Cartilage Replacements Synthesized from Biodegradable Polymers and Chondrocytes, *Biomat.* 1994, 15, 774-778) a Freed, L. E.; Marquis, J. C.; Nohria, A. Emmanuel; Mikos, A. G.; Langer, R. ("Neocartilage Formation In Vitro and In Vivo Using Cells Cultured on Synthetic Biodegradable Polymers", *J. Biomed. Mat. Res.* 1993, 27, 11-23). Tyto reference popisují techniku zavádění chondrocytů do polyglykolové (PGA) nebo polymléčné (PLLA) kyseliny nebo do PGA-PLLA matic způsobem zvaným "capillary action". Výsledkem tohoto postupu jsou biodegradovatelné polymerní materiály, avšak buňky nejsou rovnoměrně distribuovány v polymeru a nelze kontrolovat denzitu buněk.

Cao, Y.; Vacanti, J.P.; Ma, X.; Paige, K.T.; Upton, J.; Chowanski, Z.; Schloo, B.; Langer, R.; Vacanti, C. A. ("Generation of Neo-Tendon Using Synthetic Polymers Seeded with

Tenocytes", *Transpl. Proc.* 1994, 26, 3390-3391) popisují způsob, kterým se tenocyty "zaočkovávají" do "vypouklé netkané sítě" ("embossed nonwoven mesh") tvořené kyselinou polyglykolovou.

Mooney, D.J.; Park, S.; Kaufman, P. M.; Sano, K.; McNamara, K.; Vacanti, J. P.; Langer, R.; ("Biodegradable Sponge for Hepatocyte Transplantation", *J. Biomed. Mat. Res.* 1995, 29, 959-965) a Takeda, T.; Kim, T. H.; Lee, S. K.; Langer, R.; Vacanti, J. O. ("Hepatocyte Transplantation in Biodegradable Polymer Scaffolds Using Baltimore Dog Model of Hyperuricosuria", *Transpl. Proc.* 1995, 27, 635-636) popisují způsob absorpce hepatocytů pomocí adsorpce a kapilárního působení (capillary action) na listy "plstěné" matrice vytvořené z polymeru kyseliny polyglykolové nebo do houbovité polymerní matrice vyrobené z kyseliny polymléčné a polyvinylalkoholu anebo z kyselin polymléčné a glykolové. Tento způsob poskytuje biodegradovatelné polymerní materiály, ale neumožňuje ani rovnoměrnou distribuci buněk v polymeru ani kontrolu buněčné denzity.

Woerly, S.; Plant, G. W.; Harvey, A. R. ("Cultured Rat Neuronal and Glial Cells Entrapped within Hydrogel Polymer Matrices: A Potential Tool for Neural Tissue Replacement", *Neurosci. Lett.* 1996, 205, 197-201) popisují způsob zachycení buněk nervové tkáně do homogenního průhledného polymerního gelu připraveného z poly[N-(2-hydroxypropyl)-metakrylamidu], který může obsahovat kolagen jako substrát pro připojení (attachment substrate). Tento způsob zahrnuje přidání buněčné suspenze k polymerové směsi a polymerizaci směsi buňky-polymer při teplotě místnosti nebo v inkubátoru při teplotě 37°C. Výsledný gel je opticky transparentní a buňky jsou náhodně rozptýlené uvnitř gelu obsahujícího příčné vazby. Imunocytochemické studie udávají, že viabilita buněk po 6-ti dnech v podmínkách in vitro se pohybuje mezi 0 a 6 %.

## Podstata vynálezu

Předmětem tohoto vynálezu je odstranění nedostatků dosavadních způsobů v oboru používaných použitím nebiologického protetického prostředku, jako je nedegradovatelný polymerní hydrogel, který plní funkci materiálu vyplňujícího volný prostor a stavební kostry stimuluje regeneraci tkáně, morfogenezi a remodelaci implantátu na integrovanou orgánovou strukturu (integrated structure-to-organ).

Dále se vynález týká zlepšení zhojení tkáně tak, aby došlo ke skutečné tvorbě tkáně, čehož je dosahováno kontrolou buněčné proliferace, infiltrací buněk a organizací tkáně uvnitř stabilní polymerové matrice.

Dále se vynález týká regenerace tkáně pomocí polymerových matic, což představuje významný klinický a ekonomický přínos při léčbě lidí s poraněním míchy (SCI) nebo mozku nebo lidí trpících vrozenými defekty míchy (spina bifida).

Dále se vynález týká přípravy polymerních maticí pro regeneraci optického nervu a periferních nervů.

Dále se vynález týká přípravy nedegradovatelné syntetické matrice z polymerního hydrogelu mající anizotropní porézní strukturu, efektivní povrchovou plochu a dobrou tkáňovou adhezivitu a kompatibilitu, která je navrhována pro použití při implantaci do měkkých tkáňových struktur, zvláště v nervovém systému, a která je progresivně zabudována do orgánu a stává se jeho součástí.

Dále se vynález týká přípravy syntetických polymerních maticí s kontrolovanou strukturou pórů, které nesou povrchově aktivní agens, pro terapeutické účely.

Hlavním předmětem vynálezu je příprava polymerní matrice připravené z nového, ve vodě nerozpustného polymerního hydrogelu, který je používán v nabobtnalém stavu jako protetický přípravek pro regeneraci tkáně při reparaci parenchymatózních orgánů.

Dále se vynález týká způsobu přípravy hydrogelového produktu ve formě mající tvar konečného protetického přípravku.

Dále se vynález týká odstranění jednoho nebo několika nedostatků způsobů používaných v oboru s cílem připravit polymerní neuroprotézu, kterou lze pomocí standardních chirurgických postupů implantovat do mozku nebo míchy.

Dále se vynález týká způsobu, který umožňuje vnesení buněk nebo geneticky modifikovaných buněk do sítě polymeru.

Dále se vynález týká přípravy polymerové směsi, kterou lze smíchat s živými buňkami a tak zkombinovat fyzikální charakteristiky polymerové matrice vykazující chování hydrogelového typu (porozita, stabilita, vodící povrchy, permeabilita) s vlastnostmi buněčných biologických faktorů (např. růstové faktory).

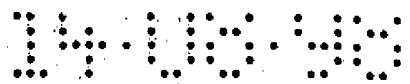
Dále se vynález týká výroby biohybridních přípravků, které lze použít jako náhradu části tkáně parenchymatózních orgánů.

Dalším předmětem vynálezu je trojrozměrný kultivační systém, který lze použít pro dlouhodobé kultivace různých buněk in vitro.

Dále se vynález týká přípravy podpůrných maticí pro připojení biologicky aktivních molekul ke tkáni nebo orgánům.

Dále se vynález týká přípravy porézních hydrogelů představujících deformovatelné porézní polymerní matrice nasycené mezibuněčnou tekutinou nebo vodou, které poskytují nezbytnou tkáňovou kostru a hydratovaný prostor skrze nějž mohou buňky proliferovat a sestavovat se do histologicky správné struktury nadbuněčné úrovně a vytvořit tak funkční tkáň.

Dále se vynález týká přípravy složky pro systémy určené pro kontrolované uvolňování léků a makromolekul, zvláště protizánětlivých látek jako je indometacin, stimulatory cytokinů, jako jsou bakteriální lipopolysacharidy, steroidy, jako např. metylprenisolon, a neuroaktivní faktory, jako např. růstové faktory pro fibroblasty.



Dále se vynález týká přípravy materiálu se silnými bioadhezivními a hemostatickými vlastnostmi, který je vhodný pro umístění uvnitř parenchymatózního orgánu, pro rychlé připojení a zároveň pro hemostázu.

Hlavním předmětem vynálezu je příprava polymerové matrice s dostatečnou mechanickou a chemickou stabilitou, aby vydržela dlouhodobou implantaci v organismu bez degradace, která může jinak poškodit nově utvořenou síť tkáně, která prorostla do matrice při nahrazování části orgánu.

Dále se vynález týká přípravy matrice vykazující mechanickou poddajnost, která dovoluje operatérovi řezat, upravit velikost a jinak zacházet s polymerovou maticí, aniž by došlo ke změně vnitřní struktury a mechanických vlastností matrice.

Dále se vynález týká přípravy materiálu, který je schopen bobtnání, a vykazuje vysokou kapacitu bobtnání ve vodném prostředí, který dokáže absorbovat značná množství látek biologicky zajímavých pro účel tohoto vynálezu, jako jsou adhezní molekuly (např. CAM a L1 molekuly) nebo "navádějící" (guidance) molekuly (např. semaforiny nebo netriny rozpuštěné ve vhodném roztoku), takže uvedené molekuly jsou následně adsorbovány na povrch sítě polymerové matrice.

Podle tohoto vynálezu jsou připravovány nové hydrofilní polymerní hydrogely, schopné vytvořit porézní, měkké polymerní matrice s vysokou absorpční schopností, které jsou elasticky deformovatelné a mají rovnovážný obsah vody alespoň 80 %, výhodně alespoň 96 %.

Podle tohoto vynálezu jsou rovněž připravovány polymerní směsi, které lze míchat s živými buňkami.

Vynález se týká polymerního hydrogelu pro terapeutické účely, který je kopolymerem zahrnujícím (a) N-substituovaný metakrylamid nebo akrylamid, (b) agens vytvářející příčné vazby, a (c) polymerizovatelný materiál vybraný ze skupiny zahrnující cukr, derivát cukru, tkáňový adhezní peptid, molekuly proteinů tkáňové diferenciací (např. kostní morfogenetické

proteiny) a konjugát polymeru s protilátkami proti lipidovým derivátům, který je elasticky deformovatelný, a má rovnovážný obsah vody alespoň 80 %, výhodněji alespoň 96 %

Výhodně je N-substituovaný metakrylamid nebo akrylamid (a) vybrán ze skupiny zahrnující N-monoalkyl- a N,N-dialkylmetakrylamidy a akrylamidy, agens vytvářející příčné vazby, (b) zahrnuje akrylamid nebo jeho prekurzor a polymerizovatelný materiál, (c) představuje cukr, který je vybrán ze skupiny obsahující glukosamin, N-acetylglukosamin a N-acetyl derivát neuraminové kyseliny a jejich polymerové formy jako je polysialová kyselina.

Vynález se rovněž týká způsobu přípravy polymerního hydrogelu pro terapeutické použití, který zahrnuje (a) rozpuštění agens tvořícího příčné vazby v póry vytvářejícím rozpouštědle obsahujícím polymerizační iniciátor na bázi volných radikálů (free radical polymerization initiator) za vytvoření roztoku, (b) přidání N-substituovaného metakrylamidu nebo akrylamidu k roztoku připravenému v bodě (a) za vytvoření směsi, a (c) přidání roztoku cukru, derivátu cukru, tkáňového adhezního peptidu, morfogenetických proteinů nebo odvozených bioaktivních peptidů nebo konjugátu polymeru s protilátkami proti derivátům lipidů k směsi, získané v bodě (b).

Podle výhodného provedení, způsob zahrnuje rozpuštění azobisisobutyronitrilu a metylenbisakrylamidu v rozpouštědle za vytvoření roztoku, smíchání roztoku s N-2-(hydroxypropyl)metakrylamidem, přidání glukosaminu nebo N-acetylglukosaminu nebo N-acetylneuraminové kyseliny ke směsi, a odstranění reziduálních produktů s nízkou molekulovou hmotností a stopových množství iniciátoru z uvedené směsi.

Podle dalšího provedení, způsob rovněž zahrnuje přidání živých tkáňových buněk nebo geneticky modifikovaných buněk k produktu získanému v bodě (c) a zachycení buněk pomocí polymerizace uvnitř uvedeného produktu.

Podle dalšího provedení, obsahuje polymerní hydrogel podle tohoto vynálezu buňky nebo geneticky modifikované buňky, které jsou do něj vpolymerovány.

Podle dalšího provedení se vynález týká způsobu léčby poškozených mozkových tkání nebo poranění míchy odstraněním poškozených mozkových tkání nebo míchy u člověka nebo zvířete a nahrazením poškozených mozkových tkání nebo míchy polymerním hydrogелеm podle tohoto vynálezu.

Hydrogel podle tohoto vynálezu obsahuje kovalentní příčné vazby, je neprůhledný a heterogenní, a výhodně vykazuje strukturu jasně oddělených fází, tvořenou částicemi polymeru o velikosti 1 až 10 mikrometrů, výhodně 3 až 5 mikrometrů, takže vznikne oblast s relativně hrubou porozitou (makropóry), ve které se hydrogel stýká s tkání hostitele, a oblast s relativně jemnou porozitou (mezopóry), kde se hydrogel stýká s prorůstající tkání.

Výsledkem je výhodná houbovitá struktura obsahující makropóry; s frakční porozitou, například, nejméně 80 až 90 % (objem rtuťové intruze k celkovému objemu gelu); s oblastí specifického povrchu v rozsahu výhodně stovek metrů čtverečních na gram gelu; se střední hodnotou průměru póru (objemem), např. přibližně 15 až 35 mikrometrů; s objemem pórů rovným nebo větším než 10 mikrometrů (90 až 95 % frakční porozity hydrogelu), zatímco největší frakce celkového objemu pórů gelu má charakter pórového režimu od 10 do 50 mikrometrů; a s hyperporézním charakterem od 20 do 30 mikrometrů (frakční porozita gelu alespoň 50 % objemu gelu).

Makrostrukturu a porozitu hydrogelů lze měnit tím, že kontrolujeme velikost částic a porézní strukturu, které závisejí na složení a vlastnostech použitého porotvorného rozpouštědla, na objemové frakci polymeru, na interakci mezi polymerem a rozpouštědlem, na polymerizační teplotě a na vlastnostech použitého monomeru tvořícího příčné vazby. Úspěšná akumulace biomasy a buněčná interakce je výsledkem takové optimální povrchově-objemové interakce, jak dokládají výsledky rtuťové porozimetrie vyplývající z mikroporozity a mezoporozity částic polymeru.



oboru, v množstvích pohybujících se od 0,01 do 2 hmotnostních % vzhledem ke kopolymeru nebo terpolymeru; (iv) komplexních cukrů jako jsou glukosamin nebo N-acetylglukosamin nebo N-acetylgalaktosamin nebo kyselina N-acetylneuraminová nebo kyselina polysialová nebo jiné deriváty cukrů nebo tkáňové adhezni oligopeptidy obsahující sekvence jako je Arg-Gly-Asp, Ile-Lys-Val-Ala-Val, Ala-His-Ala-Val-Ser-Glu, Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg, oligopeptidy odvozené od molekul uplatňujících se při diferenciaci tkání (např. kostní morfogenetické proteiny) nebo konjugát polymeru s protilátkami proti myelinu a lipidům asociovaným s axonem a jejich deriváty v rozpouštědle, výhodně v acetonu/dimethylsulfoxidu, acetonu nebo acetonu/etanolu.

Alkylové skupiny mají výhodně jeden až dva atomy uhlíku, např. C1 až C2 hydroxyalkylové a aminoalkylové radikály. Termín N-substituovaný, tak jak je zde užíván, zahrnuje C1-8 substituenty, které obsahují OH, aminoskupinu nebo jejich kombinaci.

Reakce se obecně provádí při teplotě 40 až 60 stupňů Celsia v polymerizačních nádobách sestávajících se z uzavřených ampulí po dobu přibližně 12 hodin.

Krátký popis obrázků.

Obr. 1 je mikroskopické zobrazení homogenního gelu;

Obr. 2 je mikroskopické zobrazení homogenního gelu implantovaného do míchy;

Obr. 3 je mikroskopické zobrazení heterogenního gelu HPMA;

Obr. 4 je mikroskopické zobrazení gelu z obr.3 implantovaného do nervové tkáně.

#### Příklady provedení vynálezu

Vynález je vysvětlen pomocí následujícího Příkladu.

## Příklad 1

AIBN (azobisisobutyronitril) (1,2 hmotnostních %) a metylenbisakrylamid (1 molární %) jsou rozpuštěny v bezvodém acetonu. Roztok je smíchán s N-2-(hydroxypropyl)metakrylamidem v objemovém poměru 30 % HPMA se směsí aceton/dimetylsulfoxid (objemový poměr 93:7). N-metakryloylglukosamin (5 hmotnostních %) nebo 1-metyl-2-metakryloylamidoetyl-2-acetamido-2-deoxy-beta-D-glukosid (6,5 hmotnostních %) nebo 2-[1-metyl-2-metakryloylamidoetyl] 5-acetamido-3,5-dideoxy-D-glycero-alfa-D-galacto-2-nonulopyranosidonová kyselina (5,2 hmotnostních %) nebo metakryloyl-glycylglycylargynylglycylasparagová kyselina (1,4 hmotnostních %) jsou rozpuštěny v dimetylsulfoxidu a přidány k polymerizační směsi. Směs je důkladně homogenizována a pomocí injekční stříkačky vpravena do ampulí. Reakční směs je poté probublána dusíkem a ampule jsou zataveny v plameni. Z důvodu zabránění odpaření rozpouštědla, může být směs nejprve zmrazena ve směsi suchého ledu a etanolu a poté ampule zatavena. Zatavené ampule jsou potom ponořeny na dobu 24 hodin do vodní lázně o teplotě 50 stupňů Celsia.

Výhodně podle tohoto vynálezu jsou reziduální produkty o nízké molekulové hmotnosti, jako jsou nezreagované monomery, oligomery nezřetězené do sítě a stopová množství iniciátoru, odstraněny z hydrogelového produktu před jeho použitím. Toho lze dosáhnout ponořením xerogelů do etanolu na dobu 20 hodin, potom do směsi etanol/voda (1:1 v/v) na dobu 20 hodin a posléze do destilované vody na dobu 1 týdne, kdy je voda často vyměňována, dokud není dosaženo rovnováhy z hlediska bobtnání a extrakční reakce je pomalá, nejlépe nulová. Dalším důležitým aspektem tohoto vynálezu je snaha vyhnout se kontaminaci. Příprava polymerního gelu se výhodně provádí v laminárním boxu (biohazard chamber) vybavené vzdušným filtrem. Promývací kroky jsou s výhodou prováděny s použitím sterilních materiálů a gely jsou uskladněny při teplotě 4 stupně Celsia ve sterilní destilované vodě.

Aby bylo možné vytvořit hybridní přípravek zahrnující jak polymerní přípravek tak buňky donorové tkáně, lze buňky inokulovat do pórzní struktury polymerního hydrogelu pomocí mikrovpičů do polymerní sítě Hamiltonovou injekční stříkačkou obsahující uvedenou suspenzi buněk. Vnesení buněk do uvedeného polymerního hydrogelu lze provést jak in vitro tak in vivo, jestliže dodržíme správný čas po implantaci hydrogelu do oblasti cílového orgánu. Buňky lze izolovat z lidského mozku nebo svalové tkáně nebo z materiálu z pitvy.

## Příklad 2

Inokulace buněk do PHPMA hydrogelu in vitro.

Neurony byly izolovány z cerebrálních hemisfér potkaních embryí zbavených mozkových plen a cév v DMEM, které byly rozděleny na malé fragmenty tkáně. Tkáně byly mechanicky odděleny pomocí Pasteurovy pipety v centrifugační zkumavce obsahující DMEM. Supernatant byl oddělen a sedimentované fragmenty tkáně byly dále rozbity pomocí Pasteurovy pipety, jejíž špička byla zúžena a začištěna v plameni. Po několika cyklech střídavé resuspendace a disociace buněk, byly spojené supernatanty zcentrifugovány a buňky zkoncentrovány na hodnotu  $10^6$  buněk na 100 mikrolitrů media. Frakce je udržována na ledu, dokud není použita pro zachycení buněk (cell entrapment). Aby bylo dosaženo účinného a spolehlivého průniku buněk do polymerního hydrogelu, buňky byly nabrány do Hamiltonovy injekční stříkačky připojené na mikromanipulační zařízení a inokulovány za minimálního poškození tlakem v potřebné koncentraci do nabobtnalých PHPMA hydrogelů pod binokulární lupou za aseptických podmínek. Hydrogely obsahující buňky jsou udržovány v minimálním objemu kultivačního media a inkubovány při 37 stupních Celsia a 5 % CO<sub>2</sub> ve zvlhčené atmosféře. Když buňky dosáhly vhodného stupně růstu, lze hybridní přípravek transplantovat do mozku, aby se usnadnila reparace tkáně a její zhojení.



Polymerní strukturu lze rovněž smíchat s živými buňkami a tím kombinovat fyzikální charakteristiky polymerní matrix s chováním hydrogelového typu (porozita, stabilita, vodící povrchy, permeabilita) a buněčných biologických faktorů (např. růstových faktorů).

Vnesení buněk do polymerní matrice je dosaženo způsobem "gel-entrapment" při teplotě nižší než 0 stupňů Celsia, tj. kryopolymerizací, kdy vzniká pórézní matrice v níž jsou buňky imobilizovány a mohou tak dosáhnout reorganizace, růstu a/nebo diferenciaci pro následnou transplantaci. Solventem by měl být izotonický roztok nebo medium pro kultivaci tkání typu, který je běžně používán v buněčných a tkáňových kulturách, a který je kombinován s vhodným kryoprotektantem (glycerol/dimetylsulfoxid nebo glycerol nebo DMSO nebo polyvinylpyrrolidon nebo hydroxyetylškrob, karboxymetylcelulosa). Způsob dovoluje kontrolu konečných buněčných densit, které mají hodnotu od několika buněk až do těch, které se blíží buněčné densitě tkáně, tj. přibližně  $10^9$  až  $10^{10}$  buněk na  $\text{cm}^3$ . Způsob rovněž dovoluje měnit a kontrolovat porozitu matrice tím, že se mění rychlost chlazení a teplota polymerizační směsi obsahující buňky (tekutý dusík nebo chlazený izopentan). Způsob poskytuje makropórézní houbovitou strukturu typickou pro kryogel s velikostí pórů, která dovoluje difuzi živin a makromolekul (např. růstových faktorů) k buňkám a od buněk zachycených v polymerní gelové matrici i migraci buněk, a dovoluje vytvořit takový objem póru, který je vhodný pro účinnou akumulaci biomasy, její expanzi (buněčné dělení) a organizaci (vzájemný kontakt buněk) během vývoje a maturace tkáně.

### Příklad 3

Zachycení astrocytů v gelu pomocí kryopolymerizace HPMA.

Astrocyty byly získány inkubací mozkové kůry dvoudenních potkanů v roztoku obsahujícím 0,1 % trypsin-EDTA, 0,001 % DNasu v HEPES-pufrovaném DMEM po dobu 30 minut při teplotě 37 stupňů Celsia a mechanické disociaci. Byl proveden výsev buněk s použitím umělohmotných lahví ( $10^6$  buněk na 10 ml) a kultura byla udržována při teplotě 37 stupňů Celsia v DMEM obsahujícím 10 % fetální bovinní sérum. Po 7 dnech kultivace in vitro byly astrocyty sklizeny a resuspendovány v Hankově vyváženém roztoku solí (HBSS, pH 7,4) obsahujícím 20 % glycerol, zkoncentrovány na hodnotu  $10^6$  na 100 mikrolitrů a uchovávány při teplotě 6 stupňů Celsia. Zachycení buněk (entrapment procedure) bylo provedeno v laminárním boxu za použití sterilních materiálů. Prepolymerizační roztok obsahoval 0,69 g N-(2-hydroxypropyl)metakrylamidu a 0,010 g metylenbisakrylamidu rozpuštěných v objemu 2,3 ml HBSS obsahujícího 20 % glycerol, a jako iniciátory persulfát amonný (100 mg/ml HBSS;  $4,3 \times 10^{-3}$  M) s N,N,N',N'-tetrametyletylendiaminem rozpuštěného v HBSS (1:1 v/v HBSS;  $3,3 \times 10^{-5}$  M). pH bylo upraveno na hodnotu 7,0 pomocí 0,1 N HCl a kyslík byl z prepolymerizačního roztoku odstraněn pomocí dusíku. Roztok byl před použitím ochlazen na teplotu 4 stupně Celsia. Buňky byly resuspendovány ve směsi prepolymeru o vysoké hustotě ( $10^6$  buněk na ml) a směs byla důkladně míchána a injektována pomocí Hamiltonovy injekční stříkačky mezi dvě předchlazené skleněné desky oddělené mezerou 0,75 mm zajištěné pomocí silikonkaučukového těsnícího prostředku. Konečný objem byl 3 ml. Forma byla zchlazena na teplotu -170 stupňů Celsia během 1 minuty ponořením do tekutého dusíku a buňky byly ponechány v tekutém dusíku po dobu 3 minut předtím než byla převedena do vodní lázně ochlazené na -15 stupňů Celsia. Polymerizační reakce probíhala po dobu 5 hodin v chlazené vodní lázni, poté byla forma ohřata v lázni o teplotě 37 stupňů Celsia až došlo k roztátí polymeru. Po rozbití ledu byl gel vyňat z formy, omyt pomocí HBSS aby bylo odstraněno kryoprotektivní agens a nezreagované reakční produkty a upraven do okrouhlého tvaru o průměru 0,8 mm. Gelové disky byly inkubovány při

teplotě 37 stupňů Celsia a 5 % CO<sub>2</sub> ve zvlhčené atmosféře v DMEM obsahujícím 10 % FBS a 1 % antibiotikum (streptomycin-penicilin).

Tento přístup přípravy hybridních tkání s polymerním hydrogelem má dvě hlavní výhody v porovnání s postupem popsáným Woerlym et al. (1996): prevenci poškození buněčné membrány polymerizací při nízké teplotě a tvorbu krystalů ledu okolo buněk, která má za následek vyšší porozitu a pevnou pórovou strukturu (heterogenní hydrogel). Výsledkem je to, že buňky jsou zachyceny uvnitř polymerní matrice, která představuje strukturální oporu pro vznik oblastí s velkým vnitřním povrchem, dostatečné volné prostory pro buněčnou expanzi a zvýšenou permeabilitu. Kromě toho může být směs buněk a polymeru uchovávána ve zmraženém stavu pro následné polymerizace, tak jak je popsáno výše.

V kterémkoli stadiu vývoje buněk se výsledná hybridní matrice skládá z pevné fáze, která obsahuje pórézní matici, buňky a buněčnou extracelulární matici a tekutou fázi odpovídající buněčnému kultivačnímu mediu a extracelulárním tekutinám.

Jak ocení odborník v daném oboru, tento způsob je odlišný od takzvaného způsobu enkapsulace buněk (cell encapsulation), který používá mikroenkapsulační nebo makroenkapsulační techniky a kde buňky jsou jednoduše uzavřeny v membráně polymeru, která má okrouhlý tvar o různém poloměru.

V této přihlášce termín "buňka" nebo "buňky" zahrnuje fragmenty tkáně, shluky buněk, jednotlivé buňky embryonálního, neonatálního nebo dospělého původu, geneticky modifikované buňky, buď primární nebo "nesmrtelné" (immortalized) buňky, nesmrtelné buněčné linie původem buď z existujících nádorových buněčných linií nebo nesmrtelné prekurzorové buněčné linie, kmenové nebo progenitorové buňky, a prekurzorové buněčné linie selektované na růstový faktor z kterýchkoli tkání a orgánů. Způsob a produkt tohoto vynálezu jsou vhodné pro přípravu řady umělých tkání nebo orgánů pro transplantaci nebo trojrozměrných kultivačních systémů.

## Test 1

Biologická tolerance polymerních hydrogelů podle tohoto vynálezu byla studována pomocí implantace příčně rozřiznuté míchy a v mozkových lézích potkanů. Vzorčky pro testování byly odebírány od 1 týdne do 10 měsíců po implantaci. Biologická tolerance byla vynikající. Makroskopicky se gely integrují do hostitelské tkáně a vykazují dobrou stabilitu, a v některých případech se hostitelský orgán zdá být intaktní. Z mikroskopického hlediska studie ukázaly, že toto složení polymerního gelu podporuje restrukturalizaci tkáně a regeneraci axonů v místě implantace v hemi- a úplně příčně rozřiznuté míše potkanů, a tak se docílí až 100 % restaurace kontinuity tkáně (obr. 4). Data lze sumarizovat takto: (i) integrace hydrogelu a restaurace orgánové kontinuity, hydrogel udržuje objem léze konstantní, takže se nová tkáň může vyvinout a nahradit lézi adhezí jejího pórézního povrchu k ráně; (ii) hladký povrch s celkovým dostupným polymerním povrchem; (iii) minimální tvorba jizev a nepřítomnost cystických kavitací v přilehlé hostitelské tkáni; (iv) vrůstání gliální tkáňové sítě do polymerní sítě posilující připojení implantátu k hostitelskému organismu; (v) vrůstání buněk heterogenního původu; (vi) vrůstání kapilár; (vii) depozice molekul extracelulární matrix (kolagen, fibronectin a laminin) na povrch polymerní sítě, které může být sledováno imunohistochemickými metodami, a (viii) axonální růst skrz bioimplantát. Studie explantovaných hydrogelů prováděné pomocí infračervené spektroskopie ukazují, že infračervené spektrum nativního hydrogelu (neimplantovaného) je nahrazeno typickými infračervenými charakteristikami lipidních a bílkovinných sloučenin, které jsou podobné přilehlé míšní tkáni, což potvrzuje, že elementy míšní tkáně jsou integrovány do pórézní sítě hydrogelu.

## Test 2

Kryopolymerizační postup dovoluje vytvářet heterogenní gely s fixovanou makropórézní strukturou, v níž jsou buňky imobilizovány. Studie, které používají techniku značení buněk, jako například buněčné značení nebo imunocytochemické metody, ukazují, že buňky jsou



rovnoměrně rozmístěné v síti polymeru a na různých úrovních v gelech, a to buď jako jednotlivé izolované buňky, nebo jako malé shluky složené z několika buněk. Buňky, které přežívají se pozitivně barví pomocí imunometod během třítýdenní inkubace in vitro a vykazují antigenní profily vyvíjejících se buněk nervové tkáně. Proto astrocyty, které jsou izolovány z neonatálního mozku potkanů, lze zakotvit v hydrofilních hydrogelech pomocí kryopolymerizační reakce s vysokou hladinou retence a zakotvené buňky přežívají a normálně diferencují, podobně jako v podmínkách jednovrstevné kultury: po 10 dnech in vitro činí životnost imobilizovaných buněk 90 %, jak je stanoveno pomocí techniky značení buněk. Kromě toho jsou buňky funkční, neboť syntetizují laminin a fibronektin v polymerní matici, podobně jako v jednovrstevných kulturách.

Polymerní hydrogel byl vyvinut převážně jako nástroj napomáhající růstu tkáně (tissue expander) a jako templát na němž se tkáň vytváří (tissue formation template) za účelem nápravy defektu tkáně nebo tkáňového deficitu parenchymatózního orgánu, což je situace, která může být důsledkem traumatu, chirurgické manipulace nebo vrozené malformace, a tato metoda podpoří tvorbu nové, funkčně integrované tkáně, která dále vytváří patřičný orgán. S použitím této metody rovněž počítáme při léčbě poranění, remodelaci tkání, regeneraci tkání, rozvoji tkání parenchymatózních orgánů jako jsou játra, pankreas, kůže a svaly. Lze ji rovněž použít v kombinaci s jinými materiály pro regeneraci a hojení kostní tkáně.

Jiným použitím polymerního hydrogelu je vývoj postupů umožňujících terapii specifických lidských neurologických poruch a uvedený polymerní hydrogel lze použít dvěma různými způsoby podle povahy a typu onemocnění a rozsahu funkčního defektu. Za prvé, polymerní hydrogel lze použít jako templát pro regeneraci tkáně nebo jako nosič buněk po inkorporaci buněčného štěpu. S polymerním hydrogelem podle tohoto vynálezu se například počítá pro použití při léčbě dědičných defektů nebo defektů vzniklých poškozením specifických oblastí mozku a míchy ve stadiu vývoje anebo v dospělosti (např. poranění míchy). Typicky tento postup spočívá v odstranění poškozené tkáně, tkáně jizvy nebo jiné nefunkční části

nervové tkáně a v nahrazení mozkové tkáně nebo tkáně míchy polymerním hydrogelem popsaným výše. Polymerní hydrogel podle tohoto vynálezu je rovněž užitečný pro rekonstrukci neuronálních okruhů spojených s axonálními drahami v centrálním nervovém systému ve vyvíjejícím se nebo dospělém organismu. Lze jmenovat, například, septo-hipokampální okruhy, které se podílejí na funkci paměti, která je poškozena například při Alzheimerově chorobě, nebo nigro-striatální okruhy podílející se na Parkinsonově chorobě, nebo část striata podílející se na Huntingtonově chorobě, nebo hormonálně/reprodukční dysfunkce zahrnuté v hypofýzo-hypothalamovém systému. Postup spočívá v chirurgickém odstranění defektní části mozkové tkáně a implantaci gelu podle tohoto vynálezu, výhodně dohromady se štěpem nervových buněk za účelem indukce tvorby nových funkčních axonálních okruhů. Podobně lze léčit malformace, které mají za následek špatnou funkci míšních okruhů (např. spina bifida), a to tak, že odstraníme abnormálně vytvořenou část orgánu a tuto defektní část nahradíme neurogelem podle tohoto vynálezu, výhodně spolu se štěpem nervových buněk. Další použití hydrogelu podle tohoto vynálezu spočívá v léčbě optického nervu a periferních nervů tím, že stejným způsobem indukujeme opětný růst axonů uvnitř polymerního hydrogelu podle tohoto vynálezu.

Je třeba říci, že tento vynález není žádným způsobem omezen na výhodná provedení popsaná výše, a že lze uvažovat o modifikacích v rámci ducha a zaměření tohoto vynálezu.

#### Průmyslová využitelnost

Vynález týká porézních implantovatelných polymerních hydrogelů pro terapeutické účely, které mohou být například použity pro vnitřní tkáňové náhrady jakéhokoliv parenchymatózního orgánu, pro hojení zranění, pro regenerace tkání, a obecně pro orgánové reparace, zvláště ve vyvíjejícím se i dospělém nervovém systému, a pro jiné podobné terapie.

Vynález je zvláště zaměřen na polymerní hydrogel, který po implantaci vytvoří porézní matici, kterou prostoupí biologické tekutiny a molekuly a vytvoří tzv. organoidní hydrogel, který je progresivně začleněn do hostitelské tkáně následným prorůstáním krevních cév a tkáně.

Vynález se rovněž týká způsobu zavádění živých tkáňových buněk, prekurzorových buněk nebo geneticky modifikovaných buněk do takového polymerního hydrogelu, aby se vytvořily biohybridní materiály, které lze použít v trojrozměrných tkáňových kulturách nebo pro tkáňové rekonstrukce. Vynález se dále týká způsobu výroby polymerního hydrogelu podle tohoto vynálezu a biohybridních materiálů vyrobených způsobem uvedeným výše. Konečně se vynález týká způsobu léčby poškozených částí centrálního nervového systému, zvláště míchy a optického nervu, nebo periferních nervů, nebo jiných tkání pomocí implantace polymerového hydrogelu nebo biohybridních materiálů podle tohoto vynálezu do těchto tkání.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Polymerní hydrogel pro terapeutické použití, vyznačující se tím, že je kopolymerem (a) N-substituovaného metakrylamidu nebo akrylamidu, (b) agens vytvářejícího příčné vazby a (c) kopolymerizovatelného materiálu vybraného ze skupiny zahrnující komplexní cukr, cukerný derivát, tkáňově adhezni peptid a konjugát polymeru s protilátkami proti derivátům lipidů, uvedený polymerní hydrogel je heterogenní, pružně deformovatelný a má rovnovážný obsah vody alespoň 80 %.

2. Polymerní hydrogel podle nároku 1, vyznačující se tím, že (a) N-substituovaný metakrylamid nebo akrylamid jsou vybrány ze skupiny zahrnující N-monoalkyl- a N,N-dialkylmetakrylamidy a akrylamidy, (b) uvedené agens vytvářející příčné vazby zahrnuje akrylamid nebo jeho prekursory, a (c) uvedený polymerizovatelný materiál je cukr, který je vybrán ze skupiny obsahující glukosamin, N-acetylglukosamin a N-acetylderivát kyseliny neuraminové.

3. Polymerní hydrogel podle nároku 2, vyznačující se tím, že uvedený alkyl obsahuje 1 až 2 atomy uhlíku.

4. Polymerní hydrogel podle nároku 3, vyznačující se tím, že uvedený alkyl je hydroxyalkylový nebo aminoalkylový radikál.

5. Polymerní hydrogel podle nároku 1, vyznačující se tím, že uvedený rovnovážný obsah vody je alespoň 96 %.

6. Polymerní hydrogel podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený hydrogel obsahuje kovalentní příčné vazby, je v podstatě netransparentní a tvoří heterogenní materiál.

7. Polymerní hydrogel podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený hydrogel vykazuje strukturu jasně oddělených fází zahrnující jednak oblast s relativně hrubou porozitou tvořenou částicemi polymeru o rozměru 1 až 10 mikrometrů, tam, kde hydrogel má nasedat na hostitelskou tkáň, a oblast s relativně jemnou porozitou, tam, kde se očekává jeho kontakt s vrůstající tkání.

8. Polymerní hydrogel podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že má makroporézní strukturu s frakční porozitou alespoň 80 až 90 %, oblastí specifického povrchu alespoň 100 čtverečních metrů na gram, středním průměrem póru přibližně 15 až 35 mikrometrů, pórovým objemem pórů měřících alespoň 10 mikrometrů rovnajícím se 100 % frakční porozity hydrogelu a hyperporézním charakterem v rozsahu 20 až 30 mikrometrů.

9. Způsob přípravy polymerního hydrogelu pro terapeutické použití, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje (a) rozpuštění agens vytvářejícího příčné vazby v solventu s volným iniciátorem radikálové polymerizace tak, že se vytvoří roztok, (b) přidání N-substituovaného metakrylamidu nebo akrylamidu k roztoku získanému v kroku (a) tak, že se vytvoří směs, (c) přidání roztoku polymerizovatelného materiálu zahrnujícího komplexní cukr, derivát komplexního cukru, tkáňově adhezivní peptid nebo konjugát polymeru s protilátkami proti derivátům lipidů ke směsi získané v kroku (b) za podmínek, které umožní vznik uvedeného polymerního gelu.



10. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje rozpuštění azobisisobutyronitrilu a metylenbisakrylamidu v uvedeném rozpouštědle tak, aby došlo k vytvoření roztoku, smíchání tohoto roztoku s N-2-(hydroxypropyl)metakrylamidem, přidání glukosaminu nebo N-acetylglukosaminu nebo N-acetylneuraminové kyseliny a odstranění nízkomolekulárních reziduálních produktů a stop iniciátoru z výsledného roztoku.

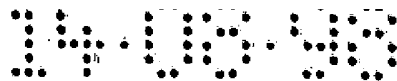
11. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedené agens tvořící příčné vazby je vybráno ze skupiny zahrnující akrylamid, jeho prekurzory a agens vytvářející příčné vazby na bázi divinylu.

12. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený iniciátor polymerizace je vybrán ze skupiny zahrnující azobisisobutyronitril, peroxidy, kyselinu askorbovou, peroxysulfáty a substituované azosloučeniny, a je používán v koncentraci 0,01 až 2 hmotnostní % vzhledem k vytvářenému polymernímu hydrogelu.

13. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený roztok polymerizovatelného materiálu obsahuje komplexní cukr.

14. Způsob podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený komplexní cukr je vybrán ze skupiny zahrnující glukosamin, N-acetylglukosamin, N-acetylderiváty kyseliny neuraminové, kyselinu polysialovou a galaktosen.

15. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený roztok polymerizovatelného materiálu obsahuje tkáňově adhezní peptid.



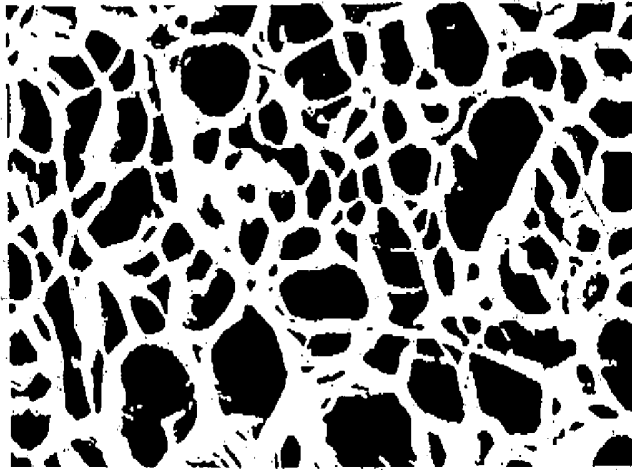
16. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený roztok polymerizovatelného materiálu obsahuje konjugát polymeru s protilátkami proti derivátům lipidů.
17. Způsob podle nároku 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se provádí při teplotě 40 až 60 stupňů Celsia po dobu 12 hodin.
18. Způsob podle nároku 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje přidání živých tkáňových buněk nebo geneticky modifikovaných buněk k produktu, získanému v kroku (c) a uskutečnění polymerizace uvedených buněk s daným produktem.
19. Kopolymerizovaný polymerní hydrogel podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že živé tkáňové buňky nebo geneticky modifikované buňky jsou s ním polymerizovány.
20. Způsob léčby poškozených mozkových tkání nebo míchy, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje odstranění uvedených poškozených mozkových tkání nebo míchy u člověka nebo zvířete, a nahrazení poškozených mozkových tkání nebo míchy polymerním hydrogelem podle nároku 1.
21. Kopolymerní hydrogel pro terapeutické použití, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený hydrogel je kopolymerem (a) N-substituovaného metakrylamidu nebo akrylamidu, (b) agens vytvářejícího příčné vazby, a (c) polymerizovatelného, tkáňově adhezního materiálu.

22. Způsob léčby jizvy a poškozené nebo funkčně defektní tkáně u savců, v y z n a č u j í c í s e t í m, že zahrnuje odstranění uvedené jizvy a poškozené nebo funkčně poškozené tkáně, a jejich nahrazení polymerním hydrogelem podle nároku 1.

23. Způsob podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se použije pro rekonstrukci neuronových okruhů, které jsou spojeny s axonálními drahami v centrálním nervovém systému.

24. Způsob podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se použije pro léčbu traumatických poranění optického nervu a periferních nervů.

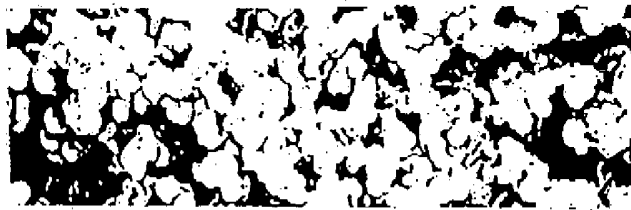
1/1



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3