

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2011-424**
(22) Přihlášeno: **14.07.2011**
(40) Zveřejněno: **19.09.2012**
(Věstník č. 38/2012)
(47) Uděleno: **09.08.2012**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **19.09.2012**
(Věstník č. 38/2012)

(11) Číslo dokumentu:

303 453

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61L 31/12 (2006.01)
A61L 15/32 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
B32B 5/24 (2006.01)
D01D 5/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
B82Y 40/00 (2011.01)
B82B 1/00 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 20100233807; CN 101264349; WO 2010136983; CZ 20050225; CZ 20100373.

(73) Majitel patentu:

ELMARCO s.r.o., Liberec 9, CZ
PrimeCell a.s., Praha 1, CZ

(72) Původce:

Munzarová Marcela Ing., Železný Brod, CZ
Juklíčková Martina Mgr., Liberec 15, CZ
Floriš Tomáš Ing. Ph.D., Vnorovy, CZ
Kubešová Barbara MUDr., Brno, CZ
Štrajtová Lucie Mgr., Blansko, CZ
Matějková Eva RNDr., Děčín, CZ
Schůrek Lukáš Mgr., Šumperk, CZ
Schůrek Jakub Ing. Ph.D. MBA., Šumperk, CZ

(74) Zástupce:

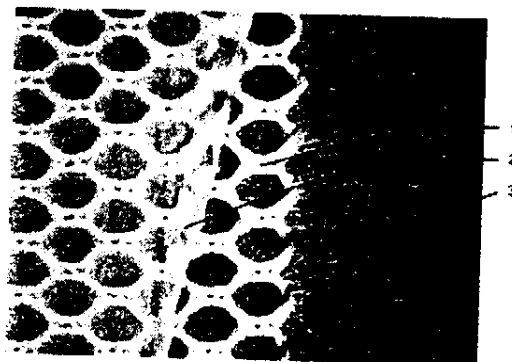
Ing. Dobroslav Musil, patentová kancelář, Ing.
Dobroslav Musil, Cejl 38, Brno, 60200

(54) Název vynálezu:

Substrát pro kultivaci buněk a způsob jeho výroby

(57) Anotace:

Substrát pro kultivaci buněk obsahujícího vrstvu (2) nanovláken z biologicky kompatibilního polymeru uloženou na nosné vrstvě (1), přičemž nosná vrstva (1) je tvořena mřížkou z biologicky kompatibilního materiálu a vrstva (2) nanovláken vyplňuje prostor jejich ok. Způsob výroby tohoto substrátu, u kterého se vrstva (2) nanovláken z biologicky kompatibilního polymeru ukládá na nosnou vrstvu (1) tvořenou mřížkou z biologicky kompatibilního materiálu elektrostatickým zvlákňováním polymerního systému v elektrickém poli vytvořeném mezi sběrnou elektrodou a proti ní uloženou zvlákňovací elektrodou protáhlého tvaru, přičemž ukládaná vrstva (2) nanovláken překrývá také oka mřížky.



CZ 303453 B6

Substrát pro kultivaci buněk a způsob jeho výroby

Oblast techniky

5 Vynález se týká substrátu pro kultivaci buněk obsahujícího vrstvu nanovláken z biologicky kompatibilního polymeru uloženou na nosné vrstvě.

10 Vynález se dále týká také způsobu výroby tohoto substrátu.

Dosavadní stav techniky

15 V odborné literatuře, například Anne J. Meinel: Optimization strategies for electrospun silk fibroin tissue engineering scaffolds, Biomaterials 30 (2009) 3058–3067, nebo Schofer M. D., Boudriot U., Wack C., Leifeld I., Gräbedüinkel C., Dersch R., Rudisile M., Wendorff J. H., Greiner A., Paletta J. R., Fuchs–Winkelmann S. J.: Influence of nanofibers on the growth and osteogenic differentiation of stem cells: a comparison of biological collagen nanofibers and synthetic PLLA fibers, Mater Sci Mater Med. 2009 Mar;20(3):767–74), i v řadě patentových spisů, například US 2010233807 bylo popsáno několik variant nanovláknenných substrátů pro kultivaci
20 buněk, které jsou dle konkrétního použitého typu buněk určeny například pro krytí povrchových ran, implantaci do těla pacienta, atd. Vzhledem k tomu, že jsou tyto substráty tvořeny pouze samostatnou vrstvou nanovláken, je jejich nevýhodou nedostatečná mechanická pevnost ve všech směrech namáhání, která značně komplikuje nejen nanášení buněk a jejich kultivaci, ale zejména
25 jakoukoliv manipulaci s těmito substráty, a tím i jejich praktické použití. Další nevýhodou pak je, že samostatná vrstva nanovláken není při použití ve vlhkém prostředí tvarově ani rozměrově stálá a ihned po namočení se samovolně smršťuje a/nebo svinuje.

30 Pro odstranění těchto nevýhod bylo navrženo uložení vrstvy nanovláken na nosnou vrstvu tvořenou například dle CN 101050418 membránou z dutých vláken, dle CN 101264349 tkanou textilií, či dle WO 2010136983 mikroporézní vrstvou. Tato řešení sice částečně odstraňují nevýhody substrátu tvořeného samostatnou vrstvou nanovláken, a však současně přináší jiné nevýhody. K nejpodstatnějším z nich patří zejména nemožnost nedestruktivního sledování a kontroly buněk
35 uložených na vrstvě nanovláken během jejich kultivace běžnými invertovanými, tj. optickými mikroskopy, neboť tato nosná vrstva brání průchodu světla. Jedinou možností tak v těchto případech je pouze zastavení kultivace uložených buněk, jejich usmrcení a následné sledování prostřednictvím imunohistochemických metod. Tímto způsobem však lze sledovat pouze malý vzorek substrátů, který není dostatečně reprezentativní

40 Dalším společným problémem všech dosud známých substrátů obsahujících vrstvu nanovláken je, že díky aktuálnímu stavu techniky v oblasti výroby nanovláken, dle kterého jsou nanovláknata většinou vytvářena zařízeními se zvlákňovací elektrodou tvořenu tryskou nebo kapilárou, mohou být tyto substráty vyráběny v podstatě pouze kusově nebo ve velmi malých sériích, přičemž se
45 jednotlivé kusy od sebe poměrně značně liší rovnoměrností vrstvy nanovláken, její plošnou hmotností a dalšími parametry. Díky tomu, že tyto substráty nelze vyrábět v opakující se kvalitě a provedení, není ani možné je dostatečně testovat, srovnávat, ani je podrobit předepsaným zkouškám například pro jejich využití jako léčiva, či je dále vyvíjet a vylepšovat.

50 Cílem vynálezu je navrhnout substrát pro kultivaci buněk, který měl vhodné mechanické vlastnosti pro manipulaci a praktické využití, vhodné biologické vlastnosti pro kultivaci buněk, a současně by umožňoval sledování kvality a/nebo množství těchto buněk jejich kultivace. Kromě toho je cílem vynálezu navrhnout způsob výroby takového substrátu, který by umožnil jeho výrobu v průmyslovém měřítku.

Podstata vynálezu

Cíle vynálezu se dosáhne substrátem podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že vrstva nanovláken z biologicky kompatibilního polymeru je uložena na nosné vrstvě tvořené mřížkou z biologicky kompatibilního materiálu, přičemž prostor ok této mřížky je překryt a vyplněn vrstvou nanovláken. Mřížka dodává substrátu požadované mechanické vlastnosti, zatímco vrstva nanovláken představuje vhodné prostředí pro uložení a následnou kultivaci buněk v podstatě libovolného typu. Díky této konstrukci lze sledovat uložené buňky během jejich kultivace nede-
 10 truktivně běžnými invertovanými mikroskopy, neboť mřížka nebrání průchodu světla do vrstvy nanovláken.

V případě, že se během ukládání vrstvy nanovláken na nosnou vrstvu nedosáhne jejich dostatečně pevného a odolného spojení prostřednictvím povrchových (mezimolekulárních) sil, mohou být
 15 obě vrstvy propojeny vhodným biologicky kompatibilním pojivem.

Ve výhodném provedení substrátu je nosná vrstva tvořena monofilamentní osnovní pleteninou z nebarveného polystyrenového hedvábí, která substrátu poskytuje vhodné mechanické vlastnos-
 20 ti, ale přitom v podstatě nijak nelimituje jeho elasticitu a tvarovou přizpůsobivost.

Pro možnost uložení a kultivace dvou různých a vzájemně oddělených druhů buněk na jednom substrátu, případně pro dosažení dvojnásobného množství buněk jednoho druhu, je v jedné z variant na nosné vrstvě substrátu uložena vrstva nanovláken z biologicky kompatibilního poly-
 25 meru z každé její strany. Spojení obou vrstev nanovláken v místech ok nosné vrstvy povrchovými silami navíc podstatně zvyšuje pevnost a odolnost jejich uložení na nosné vrstvě.

Vhodným materiálem nanovláken jsou s výhodou biologicky kompatibilní polymery ze skupiny želatina, chitosan, polyvinylalkohol(PVA), polykaprolakton, (PCL), polylaktid (PLA), polyamid (PA), polyuretan (PUR), kyselina poly(laktid-co-glykolová), jejich směsi nebo jejich kopolyme-
 30 ry, neboť se jedná o polymery, které jsou relativně snadno zvláknitelné.

Vrstva nanovláken může dle potřeby obsahovat alespoň jednu aktivní látku, která brání průniku nežádoucích mikroorganismů z vnějšího prostředí do substrátu nebo jeho okolí, jako například antibiotikum, antiseptikum, nebo stříbro, případně látku, která podporuje kultivaci a/nebo činnost
 35 buněk uložených na vrstvě nanovláken, jako například růstový faktor, vitamín, rostlinný extrakt, hormon, kortikoid, cytokin, apod.

Pro zabránění mechanického poškození substrátu, zejména vrstvy nanovláken je výhodné, pokud je tato vrstva před použitím substrátu překryta ochrannou vrstvou. Tou může být například vrstva
 40 polyetylenové (PE) fólie nebo vrstva netkané textilie typu spunbond.

Dle určení substrátu jsou na jeho vrstvě nanovláken uloženy a kultivovány například buňky ze skupiny keratinocyty, fibroblasty, epiteliální buňky, endoteliální buňky, osteocyty, mezen-
 45 chymální kmenové buňky, případně jejich kombinace.

Cíle vynálezu se dále dosáhne způsobem výroby substrátu podle vynálezu, jehož podstata spočí-
 vá v tom, že vrstva nanovláken z biologicky kompatibilního polymeru se ukládá na nosnou vrst-
 vu tvořenou mřížkou z biologicky kompatibilního materiálu elektrostatickým zvlákněním
 50 polymerního systému v elektrickém poli vytvořením mezi sběrnou elektrodou a zvlákněvací elektrodou protáhlého tvaru, přičemž vrstva nanovláken překrývá a vyplňuje také oka mřížky. Tento postup přitom zaručuje nejen vysokou rovnoměrnost uložené vrstvy nanovláken, ale sou-
 časně umožňuje výrobu substrátu podle vynálezu v průmyslovém měřítku.

Pro další zvýšení rovnoměrnosti vrstvy nanovláken, zejména při použití nosné vrstvy s nízkou
 55 elektrickou vodivostí, je vhodné zvýšit před uložení nanovláken její elektrickou vodivost nane-

sením zvodivovacího prostředku na její povrch a/nebo do její struktury. Vhodným zvodivovacím prostředkem je přitom například vodný roztok NaCl, Et₄NBr nebo Betainu.

5 V případě potřeby se na nosnou vrstvu před a/nebo během a/nebo po nanesení vrstvy nanovláken nanese biologicky kompatibilní pojivo, které zajistí jejich pevné a odolné spojení.

Vhodnou nosnou vrstvou je pak monofilamentní osnovní pletenina z nebarveného polyesterového hedvábí.

10

Přehled obrázků na výkrese

Na přiloženém výkrese je na obr. 1 fotografie vzájemně oddělených vrstev substrátu pro kultivaci buněk podle vynálezu ve variantě, kdy je nosná vrstva tvořená monofilamentní osnovní pleteninou a vrstva nanovláken je překryta ochrannou vrstvou tvořenou netkanou textilií typu spunbond, a na obr. 2 řez tímto substrátem s na sobě uloženými vrstvami.

15

Příklady provedení vynálezu

20

Substrát pro kultivaci buněk podle vynálezu obsahuje vrstvu polymerních nanovláken, která je uložena na nosné vrstvě tvořené mřížkou, přičemž vyplňuje prostory jejich ok. Vrstva polymerních nanovláken je vytvořena z biologicky kompatibilního, zvláknitelného polymeru, například z želatiny, chitosanu, polyvinylalkoholu (PVA), polykaprolaktonu (PCL), polylaktidu (PLA), polyamidu (PA), polyuretanu (PUR), kyseliny poly(laktid-co-glykolové) (PLGA), apod., jejich směsí nebo jejich kopolymerů, a díky své struktuře, která v podstatě napodobuje mezibuněčnou strukturu živých organismů, představuje vhodné prostředí pro kultivaci lidských i zvířecích buněk. Její plošná hmotnost se před uložením buněk s výhodou nachází v intervalu od cca 0,03 do 5 g/m², kdy již těmto buňkám poskytuje dostatečnou oporu, a je relativně odolná proti otěru či protržení, avšak ještě je prostupná pro světlo, takže umožňuje sledování množství a/nebo kvality 30 uložených buněk během jejich kultivace prostřednictvím běžných invertovaných (optických, světelných) mikroskopů. V případě potřeby může být plošná hmotnost vrstvy polymerních nanovláken i větší, avšak její prostupnost pro světlo se v takovém případě značně snižuje.

30

35 Dle požadavků může dále vrstva polymerních nanovláken obsahovat alespoň jednu aktivní látku, která stimuluje kultivaci a/nebo aktivitu na ní uložených buněk, jako například růstový faktor, vitamín, rostlinný extrakt, hormon, kortikoid, cytokin, či jinou látku se stejným nebo podobným účinkem, a/nebo látku která brání zanesení nežádoucích mikroorganismů do substrátu nebo jeho okolí, jako například antibiotika, antiseptika, nanočástice stříbra, apod. Tato látka je přitom ve vrstvě polymerních nanovláken, uložena jako integrální součást nanovláken a/nebo jeho nano- 40 částice a/nebo mikročástice, které jsou v nanovlákních zafixovány a vystupují na jejich povrch, a/nebo jako nanočástice a/nebo nanovlákní a/nebo mikročástice a/nebo mikrovlákní uložená volně na a/nebo mezi jejími nanovlákní a/nebo k nim připojená prostřednictvím fyzikální a/nebo chemické vazby, a/nebo jako její impregnace, a/nebo vrstva a/nebo film na jejím povrchu. Pro 45 zakomponování přímo do polymerních nanovláken se přitom tato látka a/nebo její prekurzor například dle postupu popsaného v EP 1869232 přidá, případně úplně nebo částečně rozpustí, do kapalného roztoku nebo taveniny polymeru, ze kterého se následně elektrostatickým zvlákněním vytvářejí polymerní nanovlákní.

50

Nosná vrstva substrátu je tvořena mřížkou z biologicky kompatibilního materiálu. Konkrétní materiál a parametry mřížky se přitom volí dle předpokládaného použití substrátu, a pro různé aplikace tak může být mřížka vytvořena například z kovu, plastu, či textílie, resp. z textilních vláken, a to jako pravidelná nebo nepravidelná. Tato nosná vrstva pak substrátu poskytuje požadované mechanické vlastnosti, podporuje a vyztužuje vrstvu polymerních nanovláken, čímž 55 například brání jejímu samovolnému svinutí či smrštění při zvlhčení, a přitom současně umož-

ňuje prostřednictvím svých ok průnik světla do této vrstvy a sledování na ní uložených buněk. Ve variantách, kdy je nosná vrstva tvořena mřížkou z textilních vláken, navíc v podstatě nijak neomezuje elasticitu a tvarovou přizpůsobitelnost substrátu, a tedy ani možnosti jeho použití. Průměr ok mřížky se s výhodou pohybuje v rozmezí od 0,5 mm do 25 mm, kdy mřížka nijak neomezuje průchod světla, a vrstva polymerních nanovláken je přitom ještě dostatečně zpevněná i v prostoru jejich ok. Pro některé aplikace pak může být průměr ok mřížky i větší, avšak v takových případech je vrstva polymerních nanovláken díky své relativně velké ploše a minimálním mechanickým vlastnostem zejména v prostoru ok mřížky značně náchylná k přetržení, resp. protržení.

Při požadavku na kultivaci dvou různých a vzájemně oddělených druhů buněk na jednom substrátu, případně pro kultivaci dvojnásobného množství buněk jednoho druhu, je na nosné vrstvě substrátu uložena vrstva polymerních nanovláken z biologicky kompatibilního polymeru z každé její strany. Tím se současně podstatně zvýší pevnost a odolnost uložení obou vrstev polymerních nanovláken na nosné vrstvě, neboť tyto vrstvy k sobě v prostoru jejich ok přilnou a díky svému velkému povrchu se spojí relativně velkými povrchovými (mezimolekulárními) silami.

Pro ochranu vrstvy polymerních nanovláken před mechanickým poškozením je výhodné, pokud je substrát alespoň z jedné své strany doplněn ochrannou vrstvou, tvořenou například průhlednou polyesterovou (PE) fólií, vrstvou netkané textilie spunbond, apod. Tato ochranná vrstva plní svoji funkci zejména při skladování substrátu a manipulaci s ním, a před uložením buněk na vrstvu polymerních nanovláken nebo před aplikací substrátu se z něj odstraní.

Na přiloženém výkrese je na obr. 1 a 2 vyfotografován substrát pro kultivaci buněk podle vynálezu v provedení, kdy je jeho nosná vrstva 1 tvořená monofilamentní osnovní pleteninou. Konkrétně se přitom jedná o osnovní pleteninu CHS 100 vytvořenou z nebarveného polyesterové hedvábní, která byla v ČR schválena Institutem pro testování a certifikaci, a.s., Zlín, ČR pro použití jako síťka pro chirurgické účely. Jejím výrobcem je Výzkumný ústav pletářský, a.s., Brno, ČR. Tato osnovní pletenina má velikost ok 1 mm, její tloušťka má střední hodnotu 0,34 mm, a její pevnost při přetrhu ve směru osnovy je 230 N na 5 cm šířky. Struktura a materiál pleteniny přitom umožňují vratnou deformaci při relativním prodloužení do 5 %. Vrstva 2 polymerních nanovláken je v tomto provedení tvořena nanovláknem z polykaprolaktonu (PLC) o molekulové hmotnosti 100 000, jehož dodavatelem je pod katalogovým číslem 1031 firma Scientific Polymer Products, Inc., Ontario, USA. Její plošná hmotnost dosahuje hodnoty 0,3 g/m². Takto vytvořený substrát je dále ze strany nosné vrstvy 1 překryt ochrannou vrstvou 3 netkané textilie typu spunbond.

Aby bylo rozložení a kultivace buněk uložených na substrátu podle vynálezu rovnoměrné v celé jeho ploše, musí být dostatečně rovnoměrná i vrstva 2 polymerních nanovláken. V současnosti se přitom nejvyšší rovnoměrnosti dosáhne vytvořením vrstvy polymerních nanovláken 2 elektrostatickým zvlákňováním polymerního systému – kapalného roztoku nebo taveniny polymeru s případným přídavkem alespoň jedné aktivní látky, která má být zakomponována do polymeru nanovláken a/neb o jejího prekursoru, v elektrickém poli vytvořeném mezi sběrnou elektrodou a zvlákňovací elektrodou protáhlého tvaru – například válcem (viz např. EP 1673493) nebo strunou (viz např. EP 2059630 nebo EP 2173930), apod. V případě, že se polymerní nanovláknem během elektrostatického zvlákňování ukládají na elektricky nevodivý podklad, nebo na podklad s nízkou elektrickou vodivostí, je pro dosažení vyšší rovnoměrnosti jejich vrstvy dále výhodné, pokud se elektrická vodivost takového podkladu před uložením polymerních nanovláken zvýší (viz např. WO 2007054039). Díky tomu je možné z podkladu odvádět elektrický náboj nanášený na něj nabitými polymerními nanovláknem, takže nedochází k jeho koncentraci a tím k odpuzování následujících polymerních nanovláken. Jako podklad přitom může být použita buď přímo nosná vrstva 1 substrátu, nebo jiný materiál, ze kterého se uložená vrstva 2 polymerních nanovláken sejme a přenesena na nosnou vrstvu 1.

Při výrobě substrátu vyfotografovaného na obr. 1 a obr. 2 slouží nosná vrstva 1 tvořená monofilamentní osnovní pleteninou jako podklad pro uložení vrstvy 2 polymerních nanovláken, přičemž je uložena nebo vedena v elektrickém poli mezi sběrnou elektrodou a zvlákňovací elektro-

dou. Vzhledem k její zanedbatelné elektrické vodivosti se její elektrická vodivost před uložením vrstvy 2 polymerních nanovláken z vyšší, s výhodou na hodnotu $5,3 \times 10^{10} \Omega$, nanesením vhodného zvodivovacího činidla, například vodného roztoku NaCl, Et₄NBr nebo Betainu, na její povrch a/nebo do její vnitřní struktury. Během elektrostatického zvlákňování se pak polymerní nanovláčka ukládají přednostně na vláknech osnovní pleteniny, která představují fyzickou překážku v jejich pohybu ke sběrné elektrodě, avšak postupně zaplňují a překrývají také prostory jejich ok. Přitom se s osnovní pleteninou díky svému velkému povrchu a tím i velkým povrchovým (mezi-molekulárním) silám, a případně i díky dopadu na ni v ne zcela ztuhlém stavu, relativně pevně spojují. Pokud však není takto vytvořené spojení dostatečné pro uvažované použití substrátu, je možné nanášet na nosnou vrstvu 1 před a/nebo během a/nebo po nanesení vrstvy 2 polymerních nanovláken vhodného biologicky kompatibilního pojivo, případně obě vrstvy propojit jiným vhodným postupem, například dle CZ PV 2010-373.

Substrát podle vynálezu se přitom buď vyrábí přímo v požadované velikosti nebo tvaru, nebo se připraví textilní kompozit obsahující nosnou vrstvu 1 a vrstvu 2 polymerních nanovláken například v podobě pásu, ze kterého se jednotlivé substráty v požadované velikosti a tvaru vyseknou, vyříznou, či jinak oddělí.

Díky dlouhodobě stabilnímu a rovnoměrnému procesu elektrostatického zvlákňování při použití technologie Nanospider™ společnosti Elmarco je možné oběma těmito způsoby, na rozdíl od řešení známých ze stavu techniky, připravovat substráty pro kultivaci buněk opakovatelně ve stejné kvalitě, provedení a se stejnou plošnou hmotností vrstvy 2 polymerních nanovláken. Díky tomu je možné tyto substráty nejen vyrábět v průmyslovém měřítku či je podrobit potřebným testům pro použití jako léčivo, ale také vzájemně srovnávat jejich různé varianty a dále je vyvíjet.

Substrát podle vynálezu je možné použít pro krytí povrchových ran, přičemž je výhodné, pokud jsou na jeho vrstvě nanovláken uloženy keratinocyty (tzv. hlavní pokožkové buňky), fibroblasty (buňky vazivové tkáně), mezenchymální kmenové buňky, apod., případně kombinace těchto buněk. Kromě toho je možné použít tento substrát také jako implantát pro implantaci do těla příjemce, přičemž v tomto případě je výhodné pokud jsou na jeho vrstvě nanovláken uloženy osteocyty (základní buňky kosti), endoteliální buňky, mezenchymální kmenové buňky, apod., případně jejich kombinace, přičemž tyto buňky mohou být jak autologní, kdy je jejich dárce příjemce implantátu, tak alogenní, kdy je jejich dárce jiná osoba. Kromě toho může být substrát využit také bez předem uložených buněk, kdy představuje prostor pro osídlení buňkami pacienta. Před jeho aplikací a případně před uložením buněk je přitom nezbytné, aby se substrát vhodným způsobem, který nevyvolá degradaci materiálu nosné vrstvy 1 a/nebo vrstvy nanovláken 2 a/nebo v ní uložené aktivní látky, sterilizoval, a to například UV zářením, gama zářením, případně jiným způsobem.

V provedení substrátu podle vynálezu s nanesenými buňkami probíhá nanášení buněk na vrstvu 2 polymerních nanovláken například ve formě jejich suspenze v živném roztoku vhodného typu, která se pipetou rovnoměrně nakape na povrch vrstvy 2 polymerních nanovláken. Po uložení přílnou tyto buňky k polymerním nanovláčkám a kopírují formují do jedné nebo více vrstev. Typ uložených buněk ani koncentrace, ve které jsou nanášeny, přitom nejsou limitovány žádnými parametry substrátu, ale pouze předpokládaným účelem jeho použití. Použité materiály přitom zajišťují, že během kultivace a při použití substrátu se z něj neuvolňují žádné látky, které by ovlivňovaly kultivaci uložených buněk, s výjimkou látek cíleně zakomponovaných do vrstvy 2 polymerních nanovláken, nebo zatěžovali organismus pacienta. Před aplikací substrátu je výhodné, pokud se buňky uložené na vrstvě 2 polymerních nanovláken kultivují v požadovaném kultivačním médiu s definovanými podmínkami, čímž se podpoří a/nebo ověří jejich životaschopnost po aplikaci substrátu. Délka kultivace je přitom volí podle toho, zda je předpokládaným využitím substrátu požadováno, aby se buňky na vrstvě 2 polymerních nanovláken dále množily, či nikoliv. Kultivační médium s výhodou odpovídá typu použitých buněk, přičemž lze postupně použít několik různých médií. Před použitím substrátu podle vynálezu je pak výhodné, pokud se z něj přebytečné kultivační médium/média nechá odkapat.

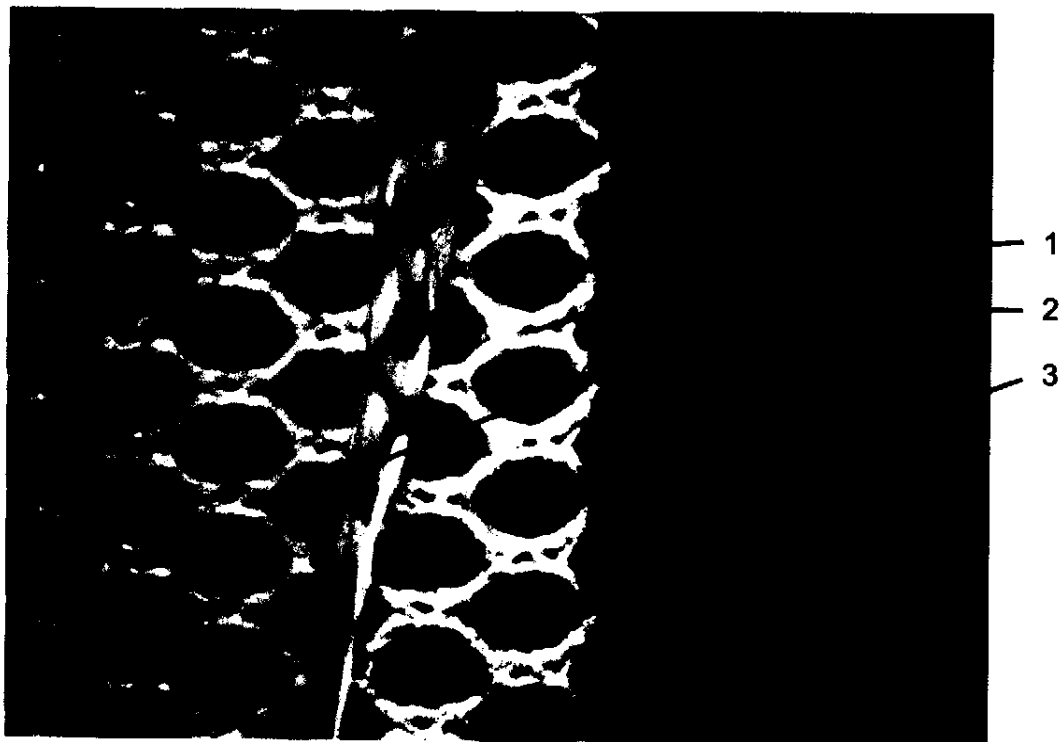
PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Substrát pro kultivaci buněk obsahující vrstvu (2) nanovláken z biologicky kompatibilního polymeru uloženou na nosné vrstvě (1), **vyznačující se tím**, že nosná vrstva (1) je tvořena mřížkou z biologicky kompatibilního materiálu a vrstva (2) nanovláken překrývá a vyplňuje prostor jejích ok.
- 10 2. Substrát podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že nosná vrstva (1) je s vrstvou (2) nanovláken propojena biologicky kompatibilním pojivem.
- 15 3. Substrát podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že nosná vrstva (1) je vytvořena monofilamentní osnovní pleteninou z nebarveného polyesterového hedvábí.
- 20 4. Substrát podle libovolného z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že na nosné vrstvě (1) je z každé její strany uložena vrstva (2) nanovláken z biologicky kompatibilního polymeru.
- 25 5. Substrát podle libovolného z nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že vrstva (2) nanovláken je vytvořena z polymeru ze skupiny želatina, chitosan, polyvinylalkohol (PVA), polylaktid (PLA), polykaprolakton (PCL), polyamid (PA), polyuretan (PUR), kyselina polylaktid-co-glykolová), jejich směsi nebo jejich kopolymery.
- 30 6. Substrát podle libovolného z nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že vrstva (2) nanovláken obsahuje alespoň jednu aktivní látku ze skupiny antibiotika, antiseptika, stříbro-růstové faktory, vitamíny, rostlinné extrakty, hormony, kortikoidy, cytokiny.
- 35 7. Substrát podle libovolného z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že vrstva (2) nanovláken je z vnější strany překryta ochrannou vrstvou (3).
- 40 8. Substrát podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že ochranná vrstva (3) je tvořena polyetylenovou fólií nebo netkanou textilií typu spunbond.
- 45 9. Substrát podle libovolného z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že na vrstvě (2) nanovláken jsou uloženy buňky ze skupiny keratinocyty, fibroblasty, epiteliální buňky, endoteliální buňky, osteocyty, mezenchymální kmenové buňky, nebo jejich kombinace.
- 50 10. Způsob výroby substrátu pro kultivaci buněk podle libovolného z předcházejících nároků, **vyznačující se tím**, že vrstva (2) nanovláken z biologicky kompatibilního polymeru se ukládá na nosnou vrstvu (1) tvořenou mřížkou z biologicky kompatibilního materiálu elektrostatickým zvlákňováním polymerního systému v elektrickém poli vytvořeném mezi sběrnou elektrodou a proti ní uloženou zvlákňovací elektrodou protáhlého tvaru, přičemž ukládaná vrstva (2) nanovláken překrývá také oka mřížky.
- 55 11. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že elektrická vodivost nosné vrstvy (1) se před nanosením nanovláken zvýší nanosením zvodivovacího prostředku na její povrch a/nebo do její struktury.
12. Způsob podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že zvodivovacím prostředkem je vodný roztok NaCl, Et₄NBr nebo Betainu.
13. Způsob podle libovolného z nároků 9 až 12, **vyznačující se tím**, že před uložením vrstvy (2) nanovláken a/nebo během něj a/nebo po něm se na nosnou vrstvu (1) nanese biologicky kompatibilní pojivo.

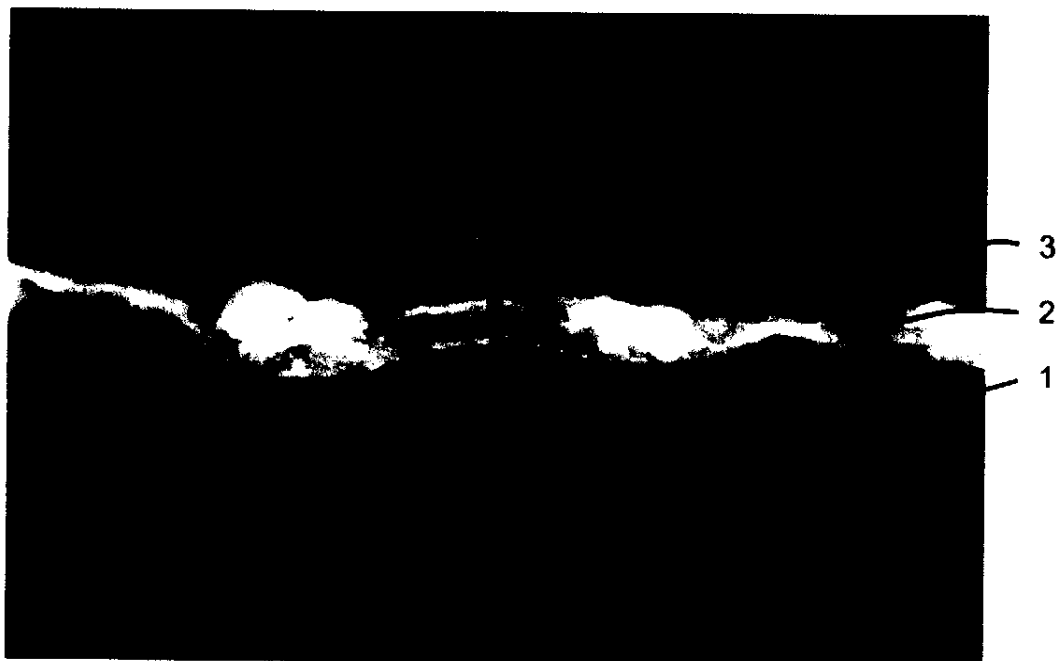
14. Způsob podle libovolného z nároků 9 až 13, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že nosná vrstva (1) je tvořena monofilamanetní osnovní pleteninou z nebarveného polyesterového hedvábí.

5

1 výkres



Obr. 1



Obr. 2

Konec dokumentu
