

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2020-392

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

A61L 15/20 (2006.01)
A61L 15/22 (2006.01)
A61L 15/32 (2006.01)
A61L 15/42 (2006.01)
A61F 13/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



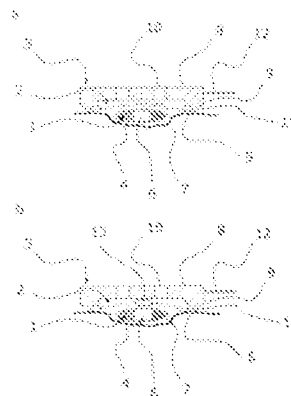
ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **02.07.2020**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **20.01.2021**
(Věstník č. 3/2021)

- (71) Přihlašovatel:
České vysoké učení technické v Praze, Praha 6,
Dejvice, CZ
- (72) Původce:
doc. PhDr. Ing. Jaroslav Průcha, CSc., Ph.D.,
Blovice, Hradiště, CZ
Mgr. Josef Skopalík, Ph.D., Velký Týnec, CZ
prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA, Praha 6,
Břevnov, CZ
prof. MUDr. Jaroslav Michálek, Ph.D., Brno, Dolní
Heršpice, CZ
MUDr. Tomáš Parák, Ph.D., Brno, Královo Pole,
CZ
- (74) Zástupce:
INPARTNERS GROUP, Ing. Dušan Kendereški,
Tuřanka 1519/115a, 627 00 Brno, Slatina

mesenchymálních kmenových buněk, který zahrnuje alespoň jeden faktor s proregenerativním a/nebo protizápalovým účinkem podporujícím hojení rány; (b) poskytnutí porézního konstrukt s kolagenovou kompozicí A zahrnující kolagen typu I a adsorpce uvedeného extraktu z mesenchymálních kmenových buněk na tento konstrukt za vzniku jádra (6) gelovitěho tělesa; (c) obalení jádra (6) gelovitěho tělesa kolagenovou kompozicí B v tekutém stavu při teplotě pod 20 °C, zahrnující kolagen typu I a/nebo autologní kolagen vzhledem k předmětnému pacientovi; a (d) zvýšení teploty nad 20 °C, zesíťování kolagenové kompozice B za vzniku v podstatě tuhého obalu (7) gelovitěho tělesa kolem jádra (6).



- (54) Název přihlášky vynálezu:
Třívrstevný krycí prostředek na ránu a způsob jeho výroby

- (57) Anotace:
Předmětem vynálezu je třívrstevný krycí prostředek na ránu, zejména chronickou ránu nebo ránu diabetického typu, zahrnující spodní (1), střední (2) a vrchní vrstvu (3). Spodní vrstva (1) je tvořena gelovitým tělesem sestávajícím jednak z jádra (6) zahrnujícího kolagenovou kompozici A a extrakt z mesenchymálních kmenových buněk, a jednak z obalu (7) zahrnujícího kolagenovou kompozici B, střední vrstva (2) je tvořena polymerní netkanou textilií a vrchní vrstva (3) je tvořena samonosným, mechanickým krytem. Spodní, střední i vrchní vrstva (1, 2, 3) je úplně nebo částečně průhledná nebo průsvitná. Předmětem vynálezu je dále použití uvedeného třívrstevného krycího prostředku na ránu v léčbě chronické rány nebo rány diabetického typu a rovněž způsob výroby uvedeného gelovitěho tělesa spodní vrstvy (1) třívrstevného krytu na ránu, který zahrnuje kroky: (a) hypoxické stimulace mesenchymálních kmenových buněk v kondicionovaném médiu za vzniku extraktu z

Třívrstevný krycí prostředek na ránu a způsob jeho výroby

Oblast techniky

5

Tento vynález spadá do oblasti zdravotnických prostředků, konkrétně do skupiny krycích prostředků použitelných v dermatologii a regenerativní medicíně sliznic a výstelkových tkání.

10

Dosavadní stav techniky

Dosavadní kryty chronických, zejména diabetických ran jsou v současném stavu techniky navrhovány jako:

15

a) planární tkaniny nebo tvarově flexibilní netkané textilie;

b) homogenní gelovité struktury nebo porézní neplanární tkaniny;

20

c) mikrosférické nasákové a houbovité entity určené pro přímý kontakt s povrchem rány; nebo

d) kryty se specifickou adicí molekulových komplexů činidel s antibakteriálním a antifungálním účinkem nebo s adicí makromolekul s funkcí bioaktivních a růstových faktorů.

Planární tkaniny nebo tvarově flexibilní netkané textilie (skupina a)

25

V této skupině se jako původní typy tkanin pro neexistenci alternativ dlouhou dobu používala klasická gáza. Později se začaly používat různé typy polymerů, zejména polymerů rostlinného původu např. celulóza a syntetických polymerů např. polylaktid (PCL) a polyvinylalkohol (PVA). Prakticky všechny vykazovaly v klinických studiích i následném použití v praxi větší či menší problém se zarůstáním do vrstev nově vytvářené kožní hmoty a nedokonalou biodegradaci v kombinaci s ulpíváním bakteriálních ložisek na tomto typu substrátu. Úpravy textilií v posledním desetiletí vedly k hydrofilizaci, jež měla zajistit prevenci zarůstání do tkaniva a prevenci nárůstu epidermální vrstvy v nesprávné lokaci nebo také prevenci adheze hydrofobních struktur z odumírající kůže a akceleraci mikrobiálního růstu (zejména PVA). Jiné úpravy textilií spočívaly v přidávku chitosanu či jiných bioaktivních vláken při procesu výroby tkané nebo netkané textilie (viz Jin SG, Yousaf AM, Kim KS et al. Influence of hydrophilic polymers on functional properties and wound healing efficacy of hydrocolloid based wound dressings. Int. J. Pharm. 501 (2016), 160–166; a Majd, Saeed Ahmadi, et al. Application of Chitosan/PVA Nano fiber as a potential wound dressing for streptozotocin-induced diabetic rats. International journal of biological macromolecules, 2016, 92: 1162-1168). Ačkoliv uvolňování chitosanových a jiných vláken mělo výrazné výsledky v preklinických studiích s ohledem na akceleraci uzavírání rány, stále však zůstal nedeřešený problematický čas rozpadu textilie v tkáni.

35

Specifickým příkladem v této skupině jsou „plastové“, více či méně průhledné kryty, které nemají bioaktivní látky – např. Suprasorb® a jeho deriváty dalších generací od společnosti Lohmann & Rauscher. Tento komerční výrobek a jeho deriváty mají jako základní vlastnost v literatuře akcentovanou transparentnost ve viditelné oblasti světla, avšak jedná se jen o prostý jednovrstevný kryt pro udržování vlhkého prostředí.

45

50

Homogenní gelovité struktury nebo porézní neplanární tkaniny (skupina b)

Do této skupiny patří škála polyuretanových houbovitých systémů (viz Rottmar, Markus et al. In vitro investigations of a novel wound dressing concept based on biodegradable polyurethane. Science and technology of advanced materials, 2015) a systémů podobné struktury na bázi kolagenových hub. Tyto struktury jsou totiž ideálně pórovité a s možností dobrého zachytu

55

fibroblastů i dalších typů podkožních buněk (viz Boyce, S. T.; Christianson, D. J.; Hansbrough, J. F. J Biomed Mater Res 1988, 22, 939–957). Dále bylo v preklinických i klinických studiích testováno několik variant systémů na bázi klasické želatiny, agarózy (viz Zarrintaj, Payam, et al. Agarose-based biomaterials for tissue engineering. Carbohydrate polymers, 2018, 187: 66-84), a modifikované agarózy (viz Neethu Ninan et al. Antibacterial and Anti-Inflammatory pH-Responsive Tannic Acid-Carboxylated Agarose Composite Hydrogels for Wound Healing, 2016). Tyto systémy měly za cíl díky své pórovitosti vždy zejména posloužit jako dobrý nástroj pro odvod exsudátu a vodnaté frakce obsahující bakterie či odumřelé imunitní buňky, které se hromadí na povrchu diabetické rány v určité ranější fázi hojení.

V praxi používané jsou tzv. hydrokoloidy, mezi něž patří komerční produkty CombiDERM, DuoDERM, Tagasorb nebo Alione. Do praxe se dostávají v posledních letech i alginátové pěnové systémy (Algisis a Melgisors), které však trpí tou nevýhodou, že je nutné je nejlépe denně měnit. Moderním testovaným řešením na diabetických ranách jsou v posledních dvou letech chitosanové hydrogely naložené kyselinou L-glutamovou (viz Thangavel, P., Ramachandran, B., Chakraborty, S. et al. Accelerated Healing of Diabetic Wounds Treated with L-Glutamic acid Loaded Hydrogels Through Enhanced Collagen Deposition and Angiogenesis: An In Vivo Study. Sci Rep 7, 10701 (2017)).

Důležitým, opakovaně publikovaným výsledkem jsou také nežádoucí tkáňové odpovědi po použití rozpustného kolagenu, které jasně upozorňují, že příprava kolagenového gelu pro kontakt s pokožkou a otevřenými ranami není jednouchá a musí být dbáno na finální stabilizaci pH (viz Castrow, F. F. and Kruil, E. A. Injectable Collagen Implant--Update, J. Am. Acad. Dermatol. 9:889-893 (1983); Labow, T. A., and Silvers, D. N Late Reactions at Zyderm Skin Test Sites, Cutis 35:154-158 (1984); and Cohen, I. K. Peacock, E. E. and Chvapil, M. Editorial on Zyderm. Plas. Reconstr. Surg., 73:1 (1984)).

Mikrosférické nasákové a houbovitě entity určené pro přímý kontakt s povrchem rány (skupina c)

U této skupiny lze jako mikroskopické entity označit klasické pudry, které byly historicky vyráběny vysušováním rostlinných extraktů nebo extraktů z xenobiotických zvířecích zdrojů. V posledních desetiletích byla patentována řada syntetických mikrostruktur a syntetických absorbentů, např. v československém patentu CS 233752 B1 popisujícím absorbující kryt na rány. Tyto prostředky mají zejména použití ve velmi rané fázi ošetření otevřené rány, a také u chronických mokvajících ran a ran silně mikrobiálně infiltrovaných.

Jako kryty na rány se také v mnoha formách používá kolagen. Různé formy kolagenových krytů na rány zahrnují kolagenové houby, jak jsou popsány v amerických patentech US 3157524 A, US 4746514 A, US 4950699 A a US 4320201 A, a polymerní kompozity kolagenu, které jsou popsány v americkém patentu US 3800792 A. Mnohé z těchto krytů však nejsou uspokojivé pro různé typy ran plné tloušťky. Kolagenové filmy a houby se snadno přizpůsobují různým tvarům rány. Dále některé kolagenové kryty na rány mají špatné absorpční vlastnosti tekutin a zvyšují sduřování tekutin v ráně. Tato skupina krytů ran se značně překrývá s moderními adovanými strukturami uvedenými níže (skupina d).

Použití krytů na rány složených z kolagenu typu I má omezený komerční úspěch z důvodu obtížnosti fyzické formy krytu. Houbovitě kryty lze obtížně aplikovat na hluboké rány, protože na zakřivených površích dobře nelnou. Kolagen ve formě částic dobře přilne k ránám kvůli svým vysokým povrchovým plochám, ale je obtížné ho použít jako suchý prášek kvůli jeho vysokému povrchovému náboji. Ve formě tenkých filmů vedou absorpční vlastnosti kolagenu k absorpci tekutin.

Kryty se specifickou adicí dalších činidel (skupina d)

- Moderní tkaniny, tkaninové vícevrstevné systémy a tkaninové systémy se specifickou adicí molekulových komplexů činidel s antibakteriálním a antifungálním účinkem lze ilustrovat na příkladech matric vyrobených z celulózy, PCL, 2-ethylhexyl-akrylátu nebo methyl-akrylátu. Jako nejvíce testované se v literatuře a výsledcích klinických studií objevují systémy s navázanými nanočásticemi stříbra, dále pak nanočásticemi zlata a oxidu ceričitého (viz Sood, R. Chopra, D.S. Optimization of reaction conditions to fabricate *Ocimum sanctum* synthesized silver nanoparticles and its application to nano-gel systems for burn wounds. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2018, 92, 575–589; Zgheib, C. Hilton, S.A. Dewberry, L.C. Hodges, M.M. Ghatak, S. Xu, J. Singh, S. Roy, S. Sen, C.K. Seal, S. et al. Use of Cerium Oxide Nanoparticles Conjugated with MicroRNA-146a to Correct the Diabetic Wound Healing Impairment. *Lasers Med. Sci.* 2019, 228, 107–115; a Arafa, M.G. El-Kased, R.F. Thermoresponsive gels containing gold nanoparticles as smart antibacterial and wound healing agents. *Sci. Rep.* 2018, 8, 13674).
- Objevují se však i nanotextilie a gelové produkty s adicí tradičních léčivých látek jako levandulový olej (viz Mori, H.M. Kawanami, H. Kawahata, H. Aoki, M. Wound healing potential of lavender oil by acceleration of granulation and wound contraction through induction of TGF-beta in a rat model. *BMC Complement. Altern. Med.* 2016, 16, 144).
- Na experimentální úrovni se biomedicínské laboratoře zabývají možností adovat krycí materiály růstovými faktory. Za vhodné externí přídavky růstových faktorů pro podporu dobrého hojení rány a eliminaci zánětlivých komplikací se označují v posledních letech směsi s vyváženými poměry PDGF a FGF a VEGF (viz Greenhalgh, David G., et al. PDGF and FGF stimulate wound healing in the genetically diabetic mouse. *The American journal of pathology*, 1990, 136.6: 1235).
- Nedávno klinicky testovaným multivrstevným výrobkem s uplatněním při léčbě chronických ran jsou nanovlákná poly-L-laktidu a želatiny (viz Ronghan He, Kun Wang, Jianhua Ren, Wenhui Zhang, Zhe Wang, Kunxue Deng, Yi Shi, Yuansen Luo, Yuyu Yuan, Tao Xu & Lei Zhu. Efficacy of a synthetic biomimetic skin substitute of PLLA/gelatin nanofiber membrane in facilitating chronic cutaneous wound healing, *Materials Technology*, 2019). Tato nanovlákná slouží zejména jako výborná bariéra proti bakteriální invazi. V klinické studii současné výsledky naznačily, že biomimetická náhrada byla bezpečná a účinná pro usnadnění chronického hojení kožních ran. Všechny 15 pacientů v této studii mělo těžké chronické rány s operativní zátěží, která se je pokoušela řešit. U pacientů, kteří podstoupili léčbu biomimetickou náhradou, byla všechna pozitivní klinická pozorování svědčící o jejich pozitivních účincích, včetně procenta kompletně zahojené rány, průměrné doby do úplného uzdravení, míry reoperace, klasifikace rány podle UT a skóre VAS.
- Z publikace Doillon et al. Fibroblast Growth on a Porous Collagen Sponge containing Hyaluronic Acid or Fibronectin (1987) je známá porézní kolagenová struktura s navázanou kyselinou hyaluronovou nebo fibronectinem a s odlišnou mikrostrukturou kolagenu, která se liší velikostí a podélným profilem pórů.
- V americkém patentu US 8703170 B2 je popsána hemostatická porézní kolagenová houba potažená a/nebo impregnovaná polyethylenglykolem nebo pentaerythritol-poly(ethylenglykol)ether-tetrasukcinimidyl glutarátem ve funkci síťovacího činidla a s absorbovanými bioaktivními látkami pro použití na krytí rány.
- V americkém patentu US 9533069 B2 je popsána hemostatická porézní kolagenová houba potažená thrombinem.
- V americké patentové přihlášce US 2011135726 A1 jsou popsány absorbující hydrogelové kompozity a kryty ran s laminární strukturou a absorbovanými bioaktivními látkami, např. TGF (transformující růstový faktor), PDGF (růstový faktor odvozený od trombocytů), KGF (keratinocytární růstový faktor, např. KGF-1 a KGF-2), VEGF (vaskulární endoteliální růstový faktor) nebo IGF (insulinový růstový faktor). Uvedený kryt je učen především jako odsávací prostředek pro absorpci exsudátu.

V americkém patentu US 5041292 A jsou popsány biodegradabilní hydrogelové matrice pro řízení uvolňování bioaktivních látek do rány. Matrice je vytvořena zesíťováním proteinové složky, která může zahrnovat albumin, kasein, fibrinogen, gama-globulin, hemoglobin, ferritin, elastin a sysntetické alfa-aminopeptidy, a sacharidové složky, která může zahrnovat heparin, jeho fragmenty, heparan, heparan-sulfát, chondroitin-sulfát, a jejich směsi, a dále absorpci zvolené bioaktivní látky.

Nevýhody dosavadních řešení

S ohledem na výše uvedené rozdělení lze celkově jako hlavní nevýhody skupiny a) a b) pro použití v klinické léčbě diabetických ran deklarovat nutnost převazu, neboť diabetické rány se u modelových malých i velkých savců hojí řádově týdny až měsíce a jen malá část zmíněných prostředků je vyrobena tak, aby se dokonale rozložila bez jakékoli indukce atypické kožní léze nebo zánětlivého ložiska nebo vzniku granulačního výrůstku v podkoží. I samotný převaz sebou nese u drtivé většiny dosavadních prostředků iritaci určité vrstvy zejména zarůstajícího lemu epidermální vrstvy uzavírajícího se kolem původní rány. Nevýhodou z pohledu biofyzikálních terapií je velmi omezená průhlednost, resp. i průsvitnost všech dosavadních krytů a prakticky nulová možnost kontroly nebo stimulace tkáně v ráně světelným paprskem. Tuto nevýhodu ještě nesou i kryty ze skupiny d).

Navíc, u krytů skupiny c) je propustnost pro plyny z dlouhodobého hlediska po nasáknutí exsudátem problematická. Celkově je referována z preklinických i klinických studií i u všech typů krytů skupin a) až d) i nedostatečná mechanická stabilita, tj. prohnutí s negativními tlakovými účinky na měkkou regenerující tkáň, i nedostatečná funkce mechanické opory proti náhodnému makroskopickému zdroji tlaku.

Dále lze konstatovat, že pokud již byly některé kryty ran navrhнутy jako transparentní, viz řešení popsané v americkém patentu US 5489262 A, jedná se o planární výrobky, které nejsou vhodné pro vyduté diabetické rány.

Ve stavu techniky tedy nejsou odborníkům v oboru k dispozici takové krycí prostředky pro chronické rány, zejména rány diabetického typu, které nevyžadují opakované převazy, zabezpečují průhlednost, resp. průsvitnost krytu, a zároveň disponují dostatečnou propustností pro plyny a mechanickou stabilitou.

Podstata vynálezu

Cílem vynálezu je poskytnout takový krycí prostředek pro chronické rány, zejména rány diabetického typu, který nebude vyžadovat opakované převazy, bude zabezpečovat průhlednost, resp. průsvitnost pro eventuální vizuální kontrolu hojení nebo pro aplikaci záření k terapeutické stimulaci hojení, a zároveň mít dostatečnou propustnost pro plyny a mechanickou stabilitu.

Výše uvedené nedostatky do jisté míry odstraňuje třívrstevný krycí prostředek na ránu, zejména chronickou ránu nebo ránu diabetického typu, zahrnující spodní, střední a vrchní vrstvu. Podstatou tohoto vynálezu je charakteristika jednotlivých vrstev, přičemž spodní vrstva je tvořena gelovitým tělesem sestávajícím jednak z jádra zahrnujícího kolagenovou kompozici A a extrakt z mesenchymálních kmenových buněk, a jednak z obalu zahrnujícího kolagenovou kompozici B, střední vrstva je tvořena polymerní netkanou textilií a vrchní vrstva je tvořena samonosným, mechanickým krytem. Střední i vrchní vrstva je přitom úplně nebo částečně průhledná nebo průsvitná.

S výhodou je extraktem z mesenchymálních kmenových buněk kondiciované médium hypoxicky stimulovaných mesenchymálních kmenových buněk, přičemž tento extrakt zahrnuje alespoň jeden

faktor s proregenerativním a/nebo protizápalovým účinkem podporujícím hojení rány, např. FGF, VEGF a/nebo PDGF. Mesenchymální kmenové buňky jsou vzhledem k předmětnému pacientovi autologní, allogenní nebo xenogenní. Výhodou oproti použití živých mesenchymálních kmenových buněk je zamezení produkce jiných faktorů v ráně při hojení a zamezení případné nekrózy buněk.

S výhodou kolagenová kompozice A tvoří porézní konstrukt zahrnující kolagen typu I, a případně chondroitin-6-sulfát, zatímco kolagenová kompozice B zahrnuje kolagen typu I a/nebo autologní kolagen vzhledem k předmětnému pacientovi. Kolagenová kompozice B je materiál tekutý při 0 až 4 °C a finálně gelovitý při 37 °C. Obě kolagenové kompozice A a B jsou přitom štěpitelné a postupně degradovatelné přirozeně se vyskytujícími enzymy na povrchu rány, např. metaloproteinázami. Z porézního konstrukt kolagenové kompozice A se tak postupně můžou uvolňovat adsorbované faktory extraktu z mesenchymálních kmenových buněk.

Gelovité těleso spodní vrstvy přitom s výhodou kopíruje tvar rány a je čočkovitého, sférického nebo elipsoidního tvaru.

Polymerní netkaná textilie střední vrstvy s výhodou zahrnuje nebo je tvořena polyvinylalkoholovou nanovláknennou textilií, představuje protiinfekční bariéru propouštějící plyny a vzdušnou vlhkost a volitelně může zahrnovat alespoň jeden průzor, např. z polydimethylsiloxanu.

Mechanický kryt vrchní vrstvy s výhodou zahrnuje nebo je tvořen polydimethylsiloxanem a konstrukčně zahrnuje vrchní krycí část v podstatě kruhového tvaru a spodní nosnou část v podstatě kružnicového tvaru, uspořádanou zespodu po obvodu krycí části. Krycí část může zahrnovat alespoň jeden otvor a nosná část může zahrnovat vícero nosných výstupků připomínajících zubovou řadu, s výhodou výstupků kuželovitého tvaru, vyčnívajících zespodu nosné části pro umístění podél vnějšího okraje rány.

V dalším, nenárokovaném aspektu tohoto vynálezu je zde popsáný třívrstevný krycí prostředek použitý při léčbě chronických ran nebo ran diabetického typu.

Dalším aspektem tohoto vynálezu je způsob výroby uvedeného gelovitého tělesa spodní vrstvy, jak je zde popsána. Tento způsob zahrnuje kroky:

- a. hypoxické stimulace mesenchymálních kmenových buněk v kondiciovaném médiu za vzniku extraktu z mesenchymálních kmenových buněk, přičemž extrakt zahrnuje alespoň jeden faktor s proregenerativním a/nebo protizápalovým účinkem podporujícím hojení rány;
- b. poskytnutí porézního konstrukt s kolagenovou kompozicí A zahrnující kolagen typu I a adsorpce uvedeného extraktu z mesenchymálních kmenových buněk na tento konstrukt za vzniku jádra gelovitého tělesa;
- c. obalení jádra gelovitého tělesa kolagenovou kompozicí B v tekutém stavu při teplotě pod 20 °C (např. 0 až 4 °C), zahrnující kolagen typu I a/nebo autologní kolagen vzhledem k předmětnému pacientovi; a
- d. zvýšení teploty nad 20 °C (např. 37 °C), zesíťování kolagenové kompozice B za vzniku v podstatě tuhého obalu gelovitého tělesa kolem jádra.

Vzniklé gelovité těleso lze aplikovat přímo do rány pacienta jako spodní vrstvu. S výhodou jsou mesenchymální kmenové buňky použité v tomto způsobu vzhledem k předmětnému pacientovi autologní, allogenní nebo xenogenní. Obalení jádra gelovitého tělesa kolagenovou kompozicí B v tekutém stavu je dále s výhodou provedeno v modelovací formě, např. čočkovitého, sférického nebo elipsoidního tvaru, který odpovídá morfologii léčené rány pacienta.

Objasnění výkresů

- 5 Podstata vynálezu je dále objasněna na příkladech jeho uskutečnění, které jsou popsány s využitím připojených výkresů, kde:

Obr. 1 znázorňuje boční pohled v řezu na třívrstevný krycí prostředek na ránu bez (a) a s (b) čočkovitým průzorem ve střední vrstvě;

10

Obr. 2 znázorňuje mechanický kryt vrchní vrstvy v perspektivním spodním (a), spodním (b), bočním (c), perspektivním vrchním (d) a vrchním pohledu (e);

Obr. 3 znázorňuje kroky (a-c) výroby gelovitého tělesa spodní vrstvy v modelovací formě;

15

Obr. 4 znázorňuje snímky zarůstající fibrózní planární tkáně v modelu in vitro v čase 0 h a 24 h (a) a graf závislosti % zbytkové otevřené plochy v čase 0 h, 12 h a 24 h (b) u skupiny kontroly, krytu CTZ2 a předkládaného krytu; a

- 20 Obr. 5 znázorňuje graf závislosti % zbytkové plochy nezhojené diabetické rány v modelu in vivo v čase 0, 10 a 15 dnů u subjektu s kontrolou, komerčním krytem Nu-gel a předkládaným krytem.

Příklady uskutečnění vynálezu

25

Uvedená uskutečnění znázorňují příkladné varianty provedení vynálezu, která však nemají z hlediska rozsahu ochrany žádný omezující vliv.

Příklad 1: Struktura třívrstevného krycí prostředku

30

Na obr. 1a je znázorněn třívrstevný krycí prostředek na ránu, která je obecně tvořena centrální oblastí 4 a okrajem 5 rány. Samotný krycí prostředek zahrnuje spodní 1, střední 2 a vrchní vrstvu 3.

- 35 Spodní vrstva 1 je tvořena gelovitým tělesem sestávajícím jednak z jádra 6 zahrnujícího kolagenovou kompozici A a extrakt z mesenchymálních kmenových buněk, a jednak z obalu 7 zahrnujícího kolagenovou kompozici B. Gelovité těleso je s výhodou vloženo do centrální oblasti 4 rány a nepřesahuje přes okraj 5 rány. Na obr. 1a je uvedené gelovité těleso čočkovitého tvaru, přičemž jádro 6 se nachází v nejširší části čočkovitého gelovitého tělesa a obal 7 se nachází na jeho
- 40 okraji. Kolagenová kompozice A v jádru 6 může zahrnovat kolagen typu I, případně chondroitin-6-sulfát, zatímco kolagenová kompozice B v obalu 7 může zahrnovat kolagen typu I a/nebo autologní kolagen předmětného pacienta. Spolu s kolagenovou kompozicí A se v jádru 6 rovněž nachází extrakt z mesenchymálních kmenových buněk v podobě kondiciovaného média hypoxicky stimulovaných mesenchymálních kmenových buněk, které zahrnuje alespoň jeden faktor
- 45 s proregenerativním a/nebo protizápalovým účinkem podporujícím hojení rány. Uvedené mesenchymální kmenové buňky jsou vzhledem k předmětnému pacientovi autologní, allogenní nebo xenogenní.

- 50 Střední vrstva 2 je tvořena polymerní netkanou textilií zahrnující polyvinylalkoholová (PVA) nanovlákná a představuje protiinfekční bariéru propouštějící plyny a vzdušnou vlhkost. Textilie s výhodou překrývá gelovité těleso tak, že se dotýká pouze okraje 5 rány a nezasahuje do centrální oblasti 4 rány. V oblasti gelovitého tělesa je tato vrstva 2 na něm volně položena. Střední vrstva 2 je úplně nebo částečně průhledná nebo průsvitná, případně může zahrnovat průzor 13 z polydimethylsiloxanu (PDMS), viz obr. 1b.

55

Vrchní vrstva 3 je tvořena samonosným, mechanickým krytem zahrnujícím polydimethylsiloxan (PDMS). Mechanický kryt zahrnuje vrchní krycí část 8 v podstatě kruhového tvaru a spodní nosnou část 9 v podstatě kružnicového tvaru, uspořádanou zespodu po obvodu krycí části 8. Nosná část 9 zahrnuje vícero nosných výstupků 11, s výhodou kuželovitého tvaru, vyčnívajících zespodu nosné části 9 pro umístění podél vnějšího okraje 5 rány, přičemž nezasahuje do centrální oblasti 4 rány. Nosné výstupky 11 zamezují pohybu mechanického krytu mimo oblast rány, přičemž je v oblasti rány výhodné celý třívrstevný krycí prostředek ještě převázat vnějším obvazem. Mechanický kryt tedy představuje mechanickou ochranu rány před vnějšími tlaky. Vrchní vrstva 3 je rovněž úplně nebo částečně průhledná nebo průsvitná, případně může v krycí části 8 zahrnovat alespoň jeden otvor 10. Z krycí části 8 může rovněž vyčnívat úchyt 12 pro snadnou manipulaci. Na obr. 2a-e jsou znázorněny různé pohledy na mechanický kryt.

Příklad 2: Způsob získání extraktu z mesenchymálních kmenových buněk (MSC) a výroby jádra 6 gelovitého tělesa spodní vrstvy 1

MSC buňky z tukové tkáně podkoží daného organismu (pacienta nebo jiného subjektu) byly kultivovány nejméně 2 dny na miskách, konkrétně na kultivačních destičkách s kolagenovým filmem pro adhezenci MSC buněk. Jako první kultivační médium bylo použito DMEM s 10% FBS po dobu 48 až 72 hodin v celkovém objemu 5 ml na povrch 25 cm². Po dobu dalších 8 hodin bylo první kultivační médium vyměněno za druhé kultivační médium, MEM bez přídavku séra, a posledních 6 hodin z této kultivace byly buňky inkubovány v hypoxické atmosféře (atmosféra o složení 91 % N₂, 4 % O₂, 5 % CO₂) v inkubátoru.

Pro přípravu dobře použitelného extraktu z MSC byl jako filtrační a akumulační entita použit porézní konstrukt, což je válcovitý konstrukt kolagenové kompozice A, kde netekutý elastický kolagenový materiál obaluje vzduchové mikrokavity (soustava vzájemně propojených pórů se vzduchem) a konstrukt má houbovitou strukturu vykazující zejména nasákavost vody a tvarovou stabilitu. Porézní konstrukt je složen ze směsi kolagenu typu 1 (0,5 % hmotn., izolovaný z hovězích šlach od společnosti Integra LifeSciences) a chondroitin-6-sulfátu (0,05 % hmotn., izolovaný ze žraločích chrupavek od společnosti Sigma-Aldrich Chemical Co.). Tato původně tekutá suspenze surovin byla zmrazena technikou konstantní rychlosti ochlazování (viz F.J. O'Brien, B.A. Harley, I.V. Yannas, L.J. Gibson Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds. Biomaterials, 25 (2004), pp. 1077-1086) v nosných formách (válcovité formy průměru 8 mm a výšky 6 mm), přičemž byly připraveny konstrukty s velikostí pórů 40 až 60 μm (stanoveno pomocí metodiky vepsané koule na snímcích ze světelného a elektronového mikroskopu). Alternativně lze použít komerční produkt typu Gelfoam od společnosti Pfizer. Připravený porézní konstrukt kolagenové kompozice A byl následně sterilně vložen do injekční stříkačky a použit jako filtrační a absorpční entita určité frakce kultivačního média z MSC kultur.

Veškeré médium nad buňkami (tzv. kondiciované médium hypoxicky stimulovaných mesenchymálních kmenových buněk) bylo nasáto do 5 ml injekční stříkačky na jejímž konci u vstupního otvoru byl umístěn porézní konstrukt kolagenové kompozice A. Přes tento konstrukt byl extrakt pomalu několikrát protlačen (např. dvakrát profiltrován tam a zpět) tak, aby porézní konstrukt nebyl zdeformován, čímž byla zajištěna sorpce složek z extraktu z MSC. Do porézní struktury konstrukt ve spodní části stříkačky se tak dostává obohacená proteinová a exosomová frakce extraktu z MSC. Zbýlých 4,5 ml z profiltrovaného extraktu bylo akumulováno do zkumavky a po dobu 20 min. byl extrakt centrifugován při přetížení 15 000 g a následně bylo 4,8 ml supernatantu odejmuto a zbylých 0,2 ml pipetováno do středu porézního konstrukt kolagenové kompozice A, což dále zvyšuje koncentraci proteinové a exosomové frakce extraktu v konstruktu A. Vzniklé jádro 6 gelovitého tělesa bylo sterilně odebráno do modelovací formy 14, která je odlita z materiálu PDMS, např. čočkovitého tvaru co nejvíce tvarově podobnému cílové ráně na živém organismu.

Příklad 3: Způsob výroby obalu 7 gelovitého tělesa spodní vrstvy 1

Pro přípravu kolagenové kompozice B byl roztok ultračisté vody s 0,1 % kyseliny octové použit k naředění kolagenu typu I do finální koncentrace 1 mg/ml. Byl použit kolagen typu I od společnosti Life Technologies Corporation (kat. č. A10483), variantně lze však použít i autologní kolagen vyfiltrovaný z podkoží pacienta nebo xenogenní kolagen získaný z ocasní tkáně zvířecího subjektu, např. potkana. Směs byla umístěna na chlazenou podložku při teplotě 0 až 4 °C. Pomocí dokapávání 1M NaOH o kapkách o objemu 200 µl bylo zvýšeno pH z hodnoty 3 až na 6,5. V tento moment byla tekutá směs překapána do předpřipravené modelovací formy 14 umístěné v inkubátoru při 37 °C, kde předtím bylo do středu modelovací formy vloženo jádro 6 s kolagenovou kompozicí A a adsorbovaným extraktem z MSC (cca 5 mm vysoký válcovitý sloupec), viz obr. 3a.

Kolem jádra 6 v modelovací formě 14 je nutno vytvořit diskovité okolí. Uvedená forma 14 slouží na odlití a zatuhnutí finální gelovité kolagenové kompozice B do vhodného tvaru, který je optimalizovaný pro efektivní kontakt s tkání a vzhledem k primárnímu vydutí rány. Tekutá směs kolagenové kompozice B byla vrstvena kapáním tak, aby vrchní hladina dosáhla alespoň 2 mm nad horní hranu jádra 6 a netvořily se vzduchové kavity, vše bylo ponecháno v klidu ve formě při 37 °C a relativní vlhkosti vzduchu 90 % (obr. 3b). Po 2 hodinách došlo díky teplotě 37 °C k zesíťování a zatuhnutí kolagenové kompozice B, tj. k vytvoření obalu 7 kolem jádra 6 (obr. 3c). Struktura vzniknutého gelovitého tělesa může být pak udržována v daném skupenství za konstantní teploty 37 °C, nejlépe je však v řádu minut použita k aplikaci na ránu.

Příklad 4: Způsob výroby polymerní netkané textilie střední vrstvy 2

Polymerní netkaná textilie byla vyrobena kruhového tvaru (např. průměr 3,2 cm) za sterilních podmínek vystřížením z polyvinylalkoholové nanovlákněné textilie (např. s hustotou vláken 4,3 g/cm³). Lem textilie o šířce 3 mm byl po dobu 30 minut smočen ve vodném roztoku chitosanu (5 % hmotn., M_r = 100 000 až 300 000, od společnosti Acros Organics) ve sterilním fyziologickém roztoku pro stimulace rychlejšího růstu epidermis.

V případě opatření střední vrstvy 2 průzorem 13 byl před smočením lemu do středu textilie sterilním disekčním nástrojem vyseknut kruhový otvor, na který byl nakápnut tekutý PDMS s příměsí tvrdidla (Lukopren N1000). Uprostřed tak vznikl opticky průhledný čočkovitý útvar z průhledného PDMS.

Příklad 5: Způsob osazení rány třívrstevným krycím prostředkem

Gelovité těleso spodní vrstvy 1 z příkladu 3 bylo umístěno do centrální oblasti 4 rány tak, aby okraje gelovitého tělesa nepřesahovaly přes okraj 5 rány na zdravou tkáň a aby leželo výhradně na obnaženém podkoží rány. Gelovité těleso bylo dále pokryto flexibilní polymerní netkanou textilií z příkladu 4. Na ránu se spodní vrstvou 1 a střední vrstvou 2 je finálně přiložena vrchní vrstva 3 mechanického krytu tak, aby nosné výstupky 11 (v podobě zubů kuželovitého tvaru), nacházející se zespodu nosné části 9 umístěné po obvodu krycí části 8, byly opřeny o zdravou tkáň, tzn. nejméně 2 milimetry od okraje 5 rány. Obvodový spodní okraj mechanicky mírnou silou tedy přitlačuje polymerní netkanou textilií a krycí část 8 mechanického krytu a otvory 10 nejsou v přímém kontaktu s polymerní netkanou textilií. Mechanický kryt na zdravé kůži ulpívá poměrně silně a zubovitá řada nosných výstupků 11 se ukazuje jako dobrá prevence posunu eliminující excentrický posuv mimo půdorys rány. Na ležících pokusných zvířecích subjektech nebo pacientech postačoval tento mechanický kryt již dále nefixovaný, pro dlouhodobé zajištění polohy pohybujícího se subjektu nebo pacienta však je vhodné přes mechanický kryt ještě převázat vnější obvaz, např. elastický gázový prstenec.

Příklad 6: Test funkčnosti třívrstevného krycího prostředku *in vitro*

Funkčnost finálního třívrstevného krytu na ránu s adovanými bioaktivními faktory byla nejprve ověřena na modelu fibrózní planární tkáně *in vitro*. Jednalo se o klasický scratch test testující migraci fibroblastů do vytvořené mezery („scratch“) podle metodiky použité v publikaci Ninan

(2016) (skupina b ve stavu techniky) z důvodu dostatečně popsané a v oboru dobře zavedené metodiky scratch testů. Ve třech polystyrenových průhledných miskách (kruhovitá miska o poloměru 17 mm, výška 11 mm), byly *in vitro* připraveny stejné fibroblastické konfluentní vrstvy, na kterých byl vytvořen sterilním plastovým hrotem 1 mm široký model jizvy. Živné médium bylo
 5 použito dle publikace Ninan (2016) (tak aby sahalo do výšky 15 mm nad dno misky) První miska byla ponechána při zarůstání bez stimulace (kontrola), druhá miska byla modifikována smočením 1 ml hydrogelového kompozitu karboxylované agarózy, kyseliny taninové a zinečnaté soli s pH regulací (konkrétně byl použit hydrogel s označením CTZ2 dle Ninan (2016)) a třetí miska byla modifikována smočením gelovitěho tělesa zahrnujícího jádro 6 z kolagenové kompozice A a
 10 extraktu z MSC a obal 7 z kolagenové konstrukce B, vyrobeného dle postupu uvedeného výše. Smočení vždy spočívalo v ponoření síťovaného košíku typu “Cell Strainer 100 μ m“ výrobce BD Bioscience s daným hydrogelovým nebo kolagenovým tělesem, tak aby těleso bylo ponořeno do živného média a bylo 2 mm nad vrstvou fibroblastických buněk). Na obr. 4a jsou znázorněny snímky zarůstající fibrózní planární tkáň na začátku (0 h, úplně vlevo) a po 24 h (zbývající 3
 15 obrázky vpravo), přičemž výsledek měření po 24 h jasně ukazuje, že zacelení modelové jizvy ve vrstvě fibroblastů je nejefektivnější u třetí misky smočené směsí kolagenové kompozice A a B. Na obr. 4b je znázorněn graf závislosti % zbytkové otevřené plochy v čase 0 h, 12 h a 24 h u skupiny kontroly, krytu CTZ2 a předkládaného krytu.

20 Příklad 7: Test funkčnosti třívrstevného krycího prostředku *in vivo*

Funkčnost předkládaného krytu byla v tomto příkladu testována na pokusném zvířeti (ZDF potkan, 250 g, stáří 6 měsíců), které disponovalo patologií ve smyslu diabetické kožní rány. Zvířeti byla indukována rána v mezilopatkové oblasti zad pomocí stržení epidermis a dermis a obnažení
 25 podkožní tukové vrstvy (2,5 cm x 2,5 cm). Celkem bylo testováno šest subjektů – dva kontrolní, u kterých byla realizována ošetření třemi vrstvami gázy a fixačním obvazem bez aplikace farmakologické nebo jiné medikace (č. 1 a 2), dva s komerčním krytem Nu-gel, tj. hydrogelovým obvazem s alginátem sodným od společnosti Systagenix Wound management (č. 3 a 4) a dva s třívrstevným krytem na ránu podle tohoto vynálezu (č. 5 a 6). Tento komerční kryt byl zvolen na
 30 základě dlouholeté, certifikované a etablované pozice na trhu krycích prostředků.

Hodnocení efektu krytu spočívalo v manuálním měření velikosti rány v den 0, 5, 10 a 15 po indukci rány. Pro každou skupinu byla určena průměrná hodnota % zacelení rány a směrodatná odchylka. Na obr. 5 je znázorněn graf závislosti % plochy nezhojené diabetické rány v modelu *in vivo* v čase
 35 0, 10 a 15 dnů, přičemž u subjektu s předkládaným třívrstevným krytem lze pozorovat rychlejší a úplnější zacelení rány jako u subjektu s komerčním krytem Nu-gel.

40 Průmyslová využitelnost

Tento vynález lze využít jako krycí prostředky na rány, zejména chronické rány nebo rány diabetického typu, a to jak ve veterinární, tak humánní medicíně.

PATENTOVÉ NÁROKY

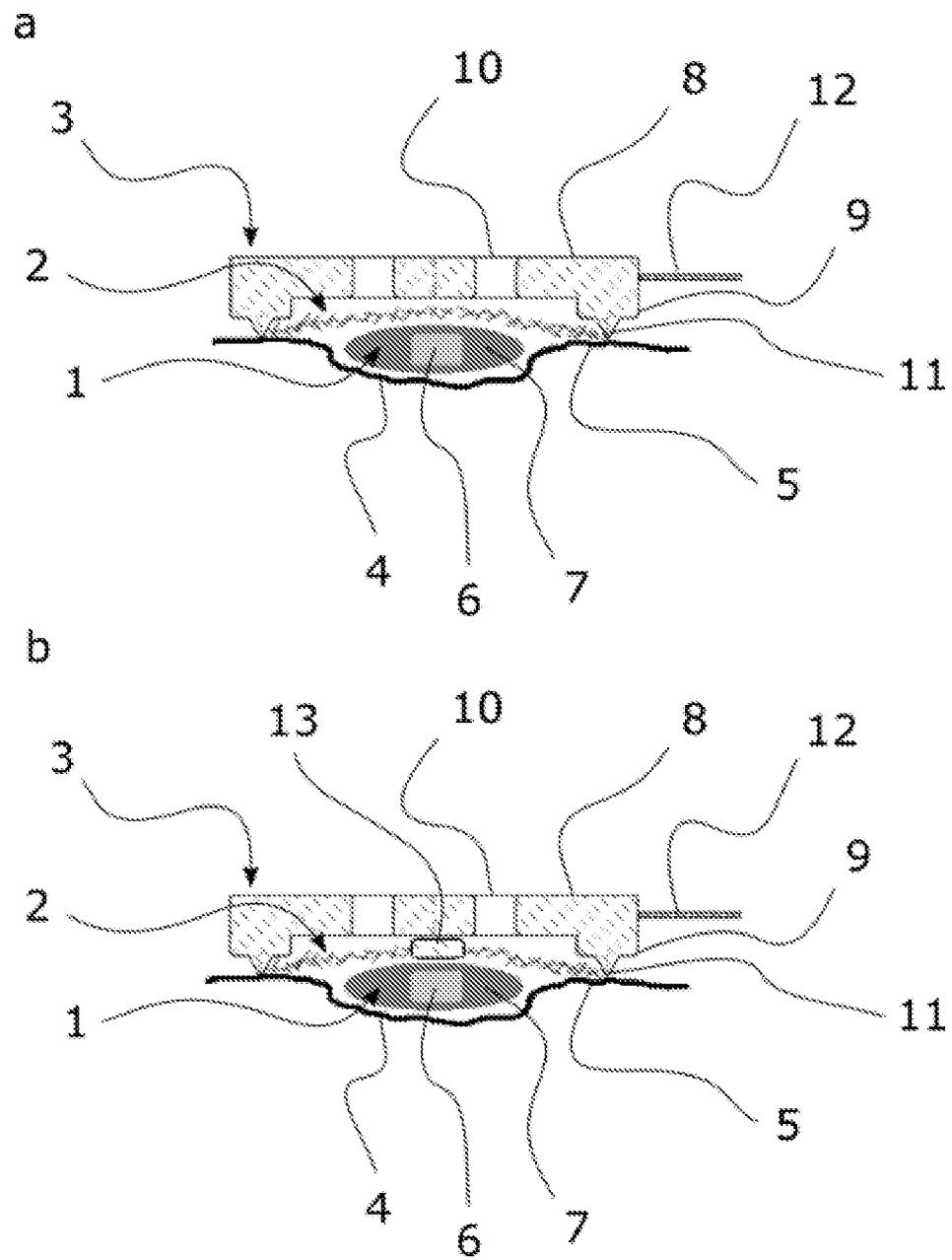
1. Třívrstevný krycí prostředek na ránu, zejména chronickou ránu nebo ránu diabetického typu, zahrnující spodní (1), střední (2) a vrchní vrstvu (3), **vyznačující se tím**, že spodní vrstva (1) je tvořena gelovitým tělesem sestávajícím jednak z jádra (6) zahrnujícího kolagenovou kompozici A a extrakt z mesenchymálních kmenových buněk, a jednak z obalu (7) zahrnujícího kolagenovou kompozici B, střední vrstva (2) je tvořena polymerní netkanou textilií a vrchní vrstva (3) je tvořena samonosným, mechanickým krytem, přičemž spodní, střední i vrchní vrstva (1, 2, 3) je úplně nebo částečně průhledná nebo průsvitná.
2. Třívrstevný krycí prostředek na ránu podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že extraktem z mesenchymálních kmenových buněk je kondicionané médium hypoxicky stimulovaných mesenchymálních kmenových buněk, zahrnující alespoň jeden faktor s proregenerativním a/nebo protizápalovým účinkem podporujícím hojení rány, přičemž mesenchymální kmenové buňky jsou vzhledem k předmětnému pacientovi autologní, allogenní nebo xenogenní.
3. Třívrstevný krycí prostředek na ránu podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že kolagenová kompozice A zahrnuje kolagen typu I, zatímco kolagenová kompozice B zahrnuje kolagen typu I a/nebo autologní kolagen vzhledem k předmětnému pacientovi, přičemž obě kolagenové kompozice A a B jsou štěpitelné enzymy na povrchu rány.
4. Třívrstevný krycí prostředek na ránu podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že gelovité těleso spodní vrstvy (1) je čočkovitého, sférického nebo elipsoidního tvaru.
5. Třívrstevný krycí prostředek na ránu podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že polymerní netkaná textilie střední vrstvy (2) zahrnuje polyvinylalkoholová nanovlákná.
6. Třívrstevný krycí prostředek na ránu podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že střední vrstva (2) je tvořena materiálem, který tvoří protiinfekční bariéru propouštějící plyny.
7. Třívrstevný krycí prostředek na ránu podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že střední vrstva (2) zahrnuje alespoň jeden průzor (13).
8. Třívrstevný krycí prostředek na ránu podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že mechanický kryt vrchní vrstvy (3) zahrnuje polydimethylsiloxan.
9. Třívrstevný krycí prostředek na ránu podle kteréhokoliv z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že mechanický kryt zahrnuje vrchní krycí část (8) v podstatě kruhového tvaru a spodní nosnou část (9) v podstatě kružnicového tvaru, uspořádanou zespodu po obvodu krycí části (8), přičemž krycí část (8) zahrnuje alespoň jeden otvor (10) a nosná část (9) zahrnuje vícero nosných výstupků (11), s výhodou kuželovitého tvaru, vyčnívajících zespodu nosné části (9) pro umístění podél vnějšího okraje (5) rány.
10. Způsob výroby gelovitého tělesa spodní vrstvy (1) třívrstevného krytu na ránu podle nároků 1 až 4, **vyznačující se tím**, že zahrnuje kroky:
 - a. hypoxické stimulace mesenchymálních kmenových buněk v kondicionálním médiu za vzniku extraktu z mesenchymálních kmenových buněk, který zahrnuje alespoň jeden faktor s proregenerativním a/nebo protizápalovým účinkem podporujícím hojení rány;
 - b. poskytnutí porézního konstrukt s kolagenovou kompozicí A zahrnující kolagen typu I a adsorpce uvedeného extraktu z mesenchymálních kmenových buněk na tento konstrukt za vzniku jádra (6) gelovitého tělesa;

- c. obalení jádra (6) gelovitého tělesa kolagenovou kompozicí B v tekutém stavu při teplotě pod 20 °C, zahrnující kolagen typu I a/nebo autologní kolagen vzhledem k předmětnému pacientovi; a
- 5 d. zvýšení teploty nad 20 °C, zesíťování kolagenové kompozice B za vzniku v podstatě tuhého obalu (7) gelovitého tělesa kolem jádra (6).
11. Způsob podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že mesenchymální kmenové buňky jsou vzhledem k předmětnému pacientovi autologní, allogenní nebo xenogenní.
- 10 12. Způsob podle nároku 10 nebo 11, **vyznačující se tím**, že obalení jádra (6) gelovitého tělesa kolagenovou kompozicí B v tekutém stavu je provedeno v modelovací formě (14).
- 15 13. Způsob podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že tvar modelovací formy (14) pro vytvoření gelovitého tělesa je přizpůsoben tvaru rány pacienta.

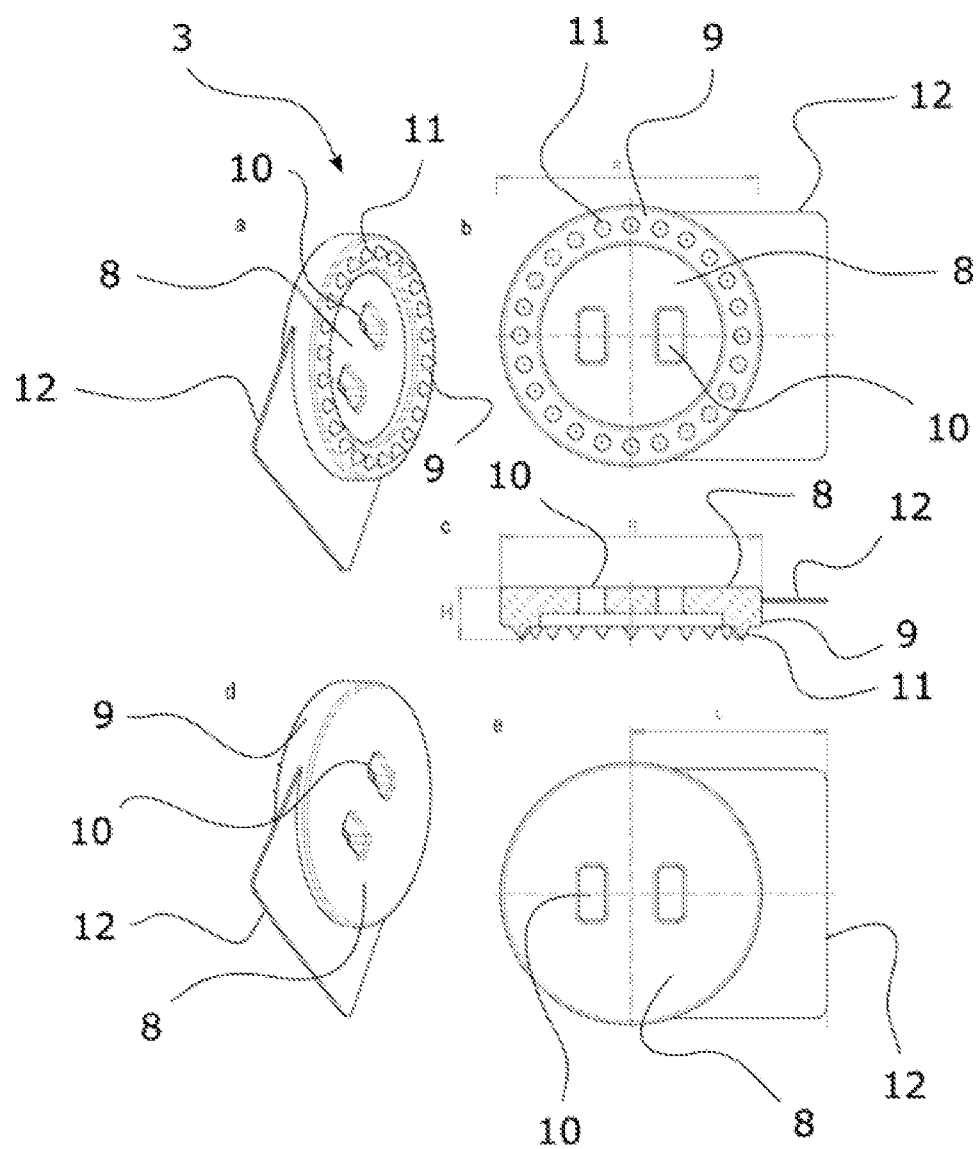
4 výkresy

Seznam vztahových značek

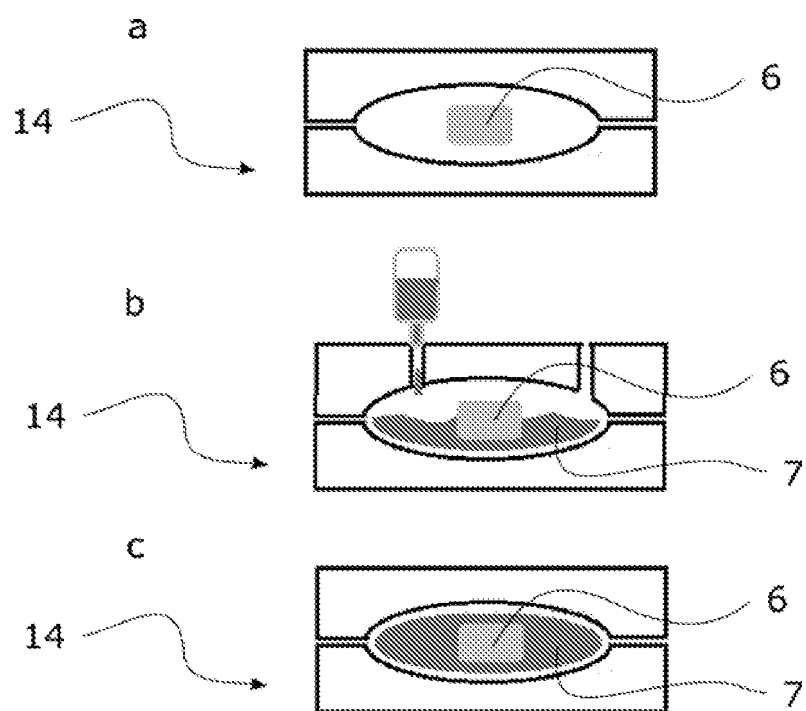
- 1 spodní vrstva (gelovité těleso)
- 2 střední vrstva (polymerní netkaná textilie)
- 3 vrchní vrstva (mechanický kryt)
- 4 centrální oblast rány
- 5 okraj rány
- 6 jádro gelovitého tělesa
- 7 obal gelovitého tělesa
- 8 krycí část mechanického krytu
- 9 nosná část mechanického krytu
- 10 otvor
- 11 nosný výstupek
- 12 úchyt
- 13 průzor
- 14 modelovací forma



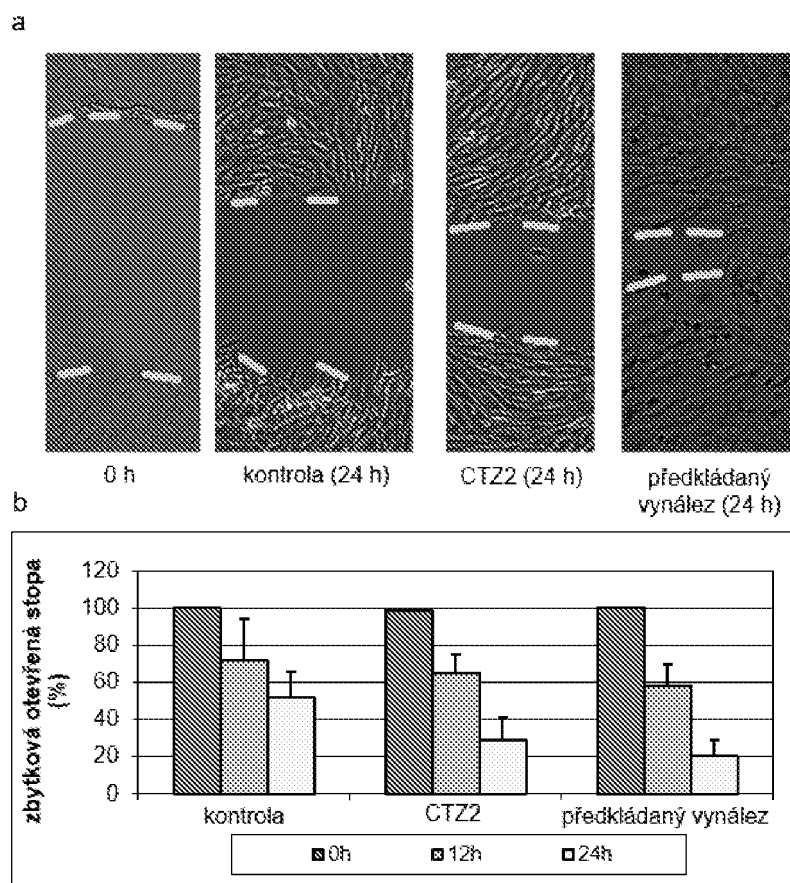
Obr. 1



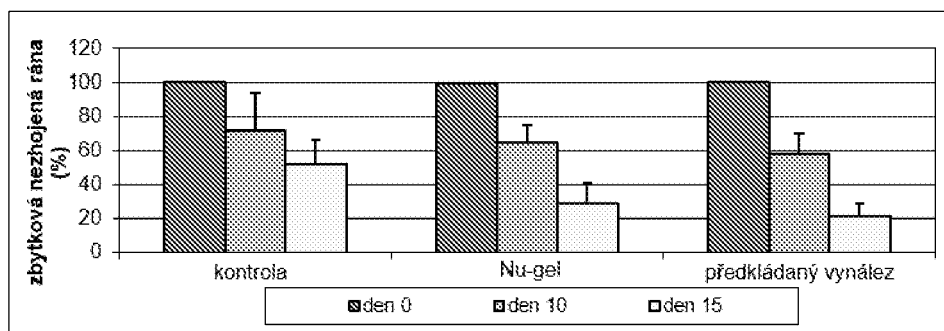
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5