

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

36 550

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61L 15/26 (2006.01)

A61L 15/44 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2022-40172**

(22) Přihlášeno: **25.08.2022**

(47) Zapsáno: **14.11.2022**

- (73) Majitel:
Ústav makromolekulární chemie AV ČR, v. v. i.,
Praha 6, Břevnov, CZ
Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha 4, Krč,
CZ
Technická univerzita v Liberci, Liberec, Liberec I-
Staré Město, CZ
- (72) Původce:
RNDr. Eduard Brynda, CSc., Praha 2, Vinohrady,
CZ
Ing. Tomáš Riedel, Ph.D., Jesenice, CZ
Mgr. Johanka Tábořská, Ph.D., Praha 10, Vršovice,
CZ
Mgr. Elena Filová, Ph.D., Praha 4, Modřany, CZ
Andreu Blanquer Jerez, 07559 Cala Bona (Son
Servera), Balearic Islands, ES
Ing. Věra Jenčová, Ph.D., Proseč pod Ještědem, CZ
Ing. Kristýna Havlíčková, Velešín, CZ
prof. Lukáš David, CSc., Liberec, Liberec VI-
Rochlice, CZ
doc. Ing. Eva Kuželová Košťáková, Ph.D., Turnov,
CZ
- (74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

- (54) Název užitného vzoru:
**Nanovlákný materiál pro krytí
diabetických ran**

Nanovláknenný materiál pro krytí diabetických ran

Oblast techniky

5

Předkládané technické řešení se týká oblasti vývoje zdravotnických prostředků pro léčbu kožních diabetických a jiných chronických ran. Jedná se o nanovláknenný kryt, který po aplikaci na ránu uvolňuje růstové faktory a cytokiny podporující hojení rány.

10

Dosavadní stav techniky

Syndrom diabetické nohy je závažnou pozdní komplikací diabetu, která je spojena s vysokou morbiditou a mortalitou, přičemž často vede k amputaci dolní končetiny. Amputaci u pacientů s diabetem v 85 % předchází vznik diabetického vředu (diabetic foot ulcer - DFU), jehož léčba, která obvykle vyžaduje pobyt v nemocnici, je nákladná a často neúspěšná. Během léčby bývá rána 2x nebo 3x týdně vyčištěna a překryta materiálem, který chrání její povrch proti mechanickému poškození, tvoří bariéru proti bakteriální kontaminaci a současně umožňuje průnik kyslíku a vodní páry, ale na rozdíl od suchých obvazů používaných na běžná poranění, trvale udržuje vlhké prostředí na povrchu i uvnitř rány. I když materiál splňuje výše uvedené požadavky (pasivní kryt), používaný postup vede k dlouhodobému hojení vředu s možností bakteriální infekce a poškození hojící se rány při často opakovaných výměnách krytu. Současný vývoj je proto zaměřen na konstrukci krytů aktivně urychlujících hojení diabetických vředů.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

70

75

80

85

90

95

Při zdravém hojení normální rány po zastavení krvácení krevním koagulem (fibrinová síť obsahující krevní destičky) je likvidována infekce a odstraněny zbytky poškozených tkání (zánětlivá fáze), v následující granulační fázi se v ráně tvoří nové krevní kapiláry (angiogeneze) a ránu postupně vyplní provizorní granulační tkání, v závěrečné epitelizační fázi se z okrajů rány šíří nové kožní buňky, které postupně překrývají místo poranění. Již na konci každého z procesů se mobilizují buňky, které se zúčastňují následující fáze hojení, např. endoteliální buňky podstatné pro angiogenezi nebo keratinocyty podstatné pro epitelizaci. Migrace a proliferace těchto buněk je stimulována růstovými faktory, které jsou prvotně uvolněny z aktivovaných krevních destiček a postupně z dalších buněk reagujících na stav hojící se rány. V diabetických vředech selhává přechod ze zánětlivé do granulační a epitelizační fáze. Snížené hladiny potřebných růstových faktorů v prostředí vředu patří mezi nejzávažnější příčiny bránící jeho zahojení. Zrychlené hojení diabetických vředů bylo pozorováno v experimentálních studiích při injekční aplikaci rekombinantních růstových faktorů na povrch vředu, zejména FGF, VEGF nebo PDGF, známé svým vlivem na angiogenesi a další procesy ve všech fázích hojení. Nevýhodou takového postupu je rychlá ztráta aktivity růstových faktorů v proteolytickém prostředí vředu. Lepších výsledků bylo dosaženo, když byly rekombinantní růstové faktory inkorporovány do různých krytů a uvolňovány po přiložení krytu na ránu. Nadějně výsledky byly získány při použití krytů, které obsahovaly soubor různých růstových faktorů a uvolněných aktivací krevních destiček. U krycích gelů připravovaných z roztoků destiček nebo destičkami obohacené krevní plazmy je aktivace destiček součástí procesu gelace. Jiný typ krytů používá inkorporaci lyzátu krevních destiček (LKD). Lyzát je získán uvolněním obsahu destiček při opakovaném zamražení a rozmražení koncentrované suspenze destiček. Vzhledem k tomu, že soubor růstových faktorů obsažený v destičkách je přirozeně nastaven na počáteční mobilizaci buněk pro první fázi hojení, množství faktorů uvolněných z destiček nemusí být dostatečné pro další fáze hojení. Při zdravém hojení jsou faktory potřebné pro tyto fáze produkovány jinými buňkami.

Podstata technického řešení

Podstata předkládaného technického řešení spočívá v nanovláknenném materiálu vhodném pro krytí ran, který obsahuje nanovláknennou membránu modifikovanou fibrinovou sítí obsahující

požadovanou koncentraci proteinů pocházejících z lyzátu krevních destiček (LKD proteiny) a požadovanou koncentraci přidaných růstových faktorů, přičemž LKD proteiny a růstové faktory se z krytu uvolňují ve vodném prostředí. Různé koncentrace proteinů z lyzátu krevních destiček a zvolených růstových faktorů v modifikovaném krytu jsou získány postupnou inkubací nanovláknenné membrány s roztokem (1) fibrinogenu, s roztokem (2) trombinu a s roztokem (3) obsahujícím fibrinogen, různé koncentrace lyzátu krevních destiček a různé koncentrace zvolených růstových faktorů.

Na rozdíl od současných krytů, obsahujících buď pouze vybraný růstový faktor nebo LKD proteiny, takto modifikovaná membrána obsahuje současně jak LKD proteiny, tak i přidané vybrané růstové faktory. Díky třístupňové modifikační metodě přípravy uvedeného materiálu je možné nezávisle měnit koncentraci a typ vybraných růstových faktorů a koncentraci LKD proteinů v membráně pouhou změnou jejich koncentrací v inkubačním roztoku použitým v třetím kroku způsobu přípravy. Významná je možnost při výměně krytu rány použít membránu obsahující koncentrace LKD proteinů a růstových faktorů odpovídajících aktuálnímu stavu hojení rány.

Předmětem předkládaného technického řešení je tedy nanovláknenný materiál pro krytí ran, zejména pro krytí diabetických ran, který obsahuje nanovláknennou membránu, vyrobenou z poly(L-laktid-*stat*- ϵ -kaprolaktonu) a/nebo poly(ϵ -kaprolaktonu), jejíž vlákna jsou potažena a zesíťovaná fibrinem, do nějž jsou inkorporovány proteiny z lyzátu krevních destiček. S výhodou má tento materiál plošnou hmotnost v rozmezí od 10 do 40 g/m², výhodněji 22 ± 2 g/m², a tloušťku v rozmezí od 11 do 45 μm, s výhodou o tloušťce 25 ± 3 μm.

V jednom provedení je nanovláknenná membrána tvořena vlákny o průměru v rozmezí od 300 do 1900 nm z materiálu PLCL a PCL nebo jen PLCL nebo jen PCL, jež jsou potažena a zesíťována fibrinovou sítí, obsahující proteiny z lyzátu krevních destiček. S výhodou je koncentrace LKD proteinů v nanovláknenném materiálu v rozmezí od 30 do 900 μg/cm², s výhodou v rozmezí od 200 do 500 μg/cm², výhodněji v rozmezí od 300 do 450 μg/cm².

Nanovláknenný materiál dle předkládaného technického řešení obsahuje mezi LKD proteiny také růstový faktor PDGF. Koncentrace PDGF v nanovláknenném materiálu závisí na koncentraci lyzátu krevních destiček použité při přípravě materiálu. Typicky se koncentrace PDGF v nanovláknenném materiálu pohybuje v rozmezí od 8 do 30 pg/cm².

Ve výhodném provedení je nanovláknenná membrána vyrobená elektrostatickým zvlákňováním, výhodněji DC elektrickým zvlákňováním.

V jednom konkrétním provedení je nanovláknenná membrána pro přípravu nanovláknenného materiálu vyrobena ze směsi PCL (polykaprolakton) a PLCL (kopolymer poly(laktid-*stat*-polykaprolakton) 70/30 % mol.), v hmotnostním poměru 1:1 (PCL ku PLCL). Polymery se rozpustí v rozpouštědlovém systému Chloroform/Ethanol (8:2 % hmotn.) a elektricky zvlákní. S výhodou lze elektrické zvlákňování provést na zařízení Nanospider typ NS 1WS500U (Elmarco, CZ) s následujícími zvlákňovacími parametry: vzdálenost mezi elektrodami 190 mm, napětí -10 / +40 kV, rychlost pohybu cartridge EMW 480 mm/s, rychlost převíjení podkladové textilie 18 mm/min, velikost průvlastku 0,6 mm. Klimatické podmínky procesu (22 °C, rel. vlhkost- RH 50%) jsou regulovány klimatizačním systémem. Po přípravě je membrána sejmuta z podkladové textilie. Výsledná nanovláknenná membrána je tvořena sítí vláken s širokou distribucí průměrů v rozmezí od 400 do 1800 nm, měřeno aplikací NIS Elements software na měření průměru na 200 náhodně vybraných vláken v SEM snímku. Tloušťka nanovláknenné membrány měřená mikroskopem je v rozmezí od 22 do 28 μm.

V jednom provedení je nanovláknenná membrána pro přípravu nanovláknenného materiálu tvořena vlákny statistického kopolymeru poly(L-laktid-*stat*- ϵ -kaprolakton) 70:30 % mol. (PLCL) o průměru 1100 ± 800 nm.

V jednom provedení je nanovláknenná membrána pro přípravu nanovláknenného materiálu tvořena vlákny z poly(ϵ -kaprolaktonu) (PCL) o průměru vlákna 1200 ± 700 nm.

5 V jednom provedení je nanovláknenná membrána pro přípravu nanovláknenného materiálu tvořena směsí vláken z poly(L-laktid-*stat*- ϵ -kaprolaktonu) 70:30 % mol. a vláken z poly(ϵ - kaprolaktonu) v hmotnostním poměru 1:1 (PLCL/PCL) o průměru vlákna 1100 ± 700 nm (PLCL/PCL membrána).

10 Ve výhodném provedení nanovláknenný materiál obsahuje PLCL/PCL membránu o plošné hmotnosti v rozmezí od 18 do 26 g/m², s výhodou 22 ± 2 g/m², připravenou elektrostatickým zvlákněním vláken statistického kopolymery poly(L-laktid-*stat*- ϵ -kaprolakton) 70:30 % mol. a poly(ϵ -kaprolaktonu) v hmotnostním poměru 1:1 o průměru vlákna v rozmezí od 400 do 1800 nm, na jejichž povrchu je ukotvena fibrinová síť, obsahující proteiny lyzátu krevních destiček v množství od 200 do 550 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, s výhodou v množství od 380 do 520 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, výhodněji 15 450 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Tloušťka nanovláknenného materiálu je v rozmezí od 22 do 28 μm .

20 Ve výhodném provedení obsahuje nanovláknenný materiál vedle proteinů z lyzátu krevních destiček dále alespoň jeden růstový faktor, vybraný ze skupiny zahrnující FGF, VEGF, PlGF-2, a TGF- β 1, s výhodou jsou růstovými faktory FGF a/nebo VEGF. Růstový faktor PDGF je jednou ze složek LKD proteinů a je v nanovláknenném materiálu přítomný v množství od 8 do 30 pg/cm^2 , s výhodou v množství od 15 do 20 pg/cm^2 .

25 Ve výhodném provedení je koncentrace růstových faktorů v nanovláknenném materiálu v rozmezí od 2 do 110 ng/cm^2 , výhodněji od 3 do 90 ng/cm^2 , ještě výhodněji od 30 do 80 ng/cm^2 .

V jednom provedení nanovláknenný materiál dle předkládaného technického řešení obsahuje růstový faktor FGF o koncentraci od 2 do 8 ng/cm^2 a/nebo VEGF o koncentraci od 11 do 100 ng/cm^2 .

30 V jednom výhodném provedení nanovláknenný materiál dle předkládaného technického řešení obsahuje nanovláknennou membránu definovanou výše, na jejímž povrchu je ukotvena fibrinová síť obsahující proteiny lyzátu krevních destiček v množství od 380 do 520 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, a dále růstový faktor FGF v množství od 2 do 5 ng/cm^2 .

35 V jiném výhodném provedení nanovláknenný materiál dle předkládaného technického řešení obsahuje nanovláknennou membránu definovanou výše, na jejímž povrchu je ukotvena fibrinová síť obsahující proteiny lyzátu krevních destiček v množství od 380 do 520 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, a dále růstový faktor VEGF v množství od 30 do 70 ng/cm^2 .

40 V jiném výhodném provedení nanovláknenný materiál dle předkládaného technického řešení obsahuje nanovláknennou membránu definovanou výše, na jejímž povrchu je ukotvena fibrinová síť obsahující proteiny lyzátu krevních destiček v množství od 380 do 520 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, a dále růstový faktor FGF v množství od 2 do 5 ng/cm^2 a růstový faktor VEGF v množství od 30 do 70 ng/cm^2 .

45 Bylo prokázáno, že nanovláknenný materiál podle předkládaného technického řešení dokáže uvolnit velkou část zachycených LKD proteinů a růstových faktorů během jednoho týdne do PBS.

50 V nejvýhodnějším provedení nanovláknenný materiál obsahuje PLCL/PCL membránu o plošné hmotnosti 22 g/m² tvořenou směsí vláken poly(L-laktid-*stat*- ϵ -kaprolaktonu) 70:30 % mol. a poly(ϵ -kaprolaktonu) v hmotnostním poměru 1:1 o průměru vlákna 1100 ± 700 nm, připravených elektrostatickým zvlákněním, na jejichž povrchu je ukotvena fibrinová síť obsahující proteiny z lyzátu krevních destiček v množství od 200 do 500 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ a dále růstový faktor FGF a/nebo VEGF v celkovém množství od 30 do 80 ng/cm^2 .

Nanovlákná membrána pro přípravu nanovláknenného materiálu je připravená elektrickým zvlákněním roztoku PCL (poly(ϵ -kaprolaktonu)), například Sigma; PCL80; Mn: 80 000 g/mol), PLCL (poly(L-laktid-*stat*- ϵ -kaprolaktonu) 70:30 % mol.) například Corbion, PURASORB PLC 7015; PLCL/PCL směsi PLCL a PCL, zejména v hmotnostním poměru 1:1. Polymery se rozpustí v organickém rozpouštědle, například v rozpouštědlovém systému Chloroform/Ethanol (8:2 % hmotn.). Elektrické zvláknování se provede s výhodou technologií Nanospider™ při použití vzdálenosti mezi elektrodami 190 mm, napětí -10 / +40 kV, rychlosti pohybu cartridge EMW 480 mm/s, rychlosti převíjení podkladové textilie 18 mm/min a velikosti průvlastu 0,6 mm. Zvláknovacím zařízením může být například Nanospider typ NS 1WS500U (Elmarco, CZ).

Lyzát krevních destiček (LKD) je roztok připravený centrifugací 2x zamrazeného (na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$) a rozmrazeného při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ de leukotizovaného trombocytárního koncentrátu připraveného z lidské krve (Freeze-thaw metoda). LKD obsahuje proteiny uvolněné Freeze-thaw metodou z krevních destiček, proteiny z krevní plazmy a citrátový antikoagulant. Příprava lyzátu krevních destiček je odborníkovi v oboru známá.

Nanovláknenný materiál podle předkládaného technického řešení je připravený způsobem, kdy se nanovlákná membrána nejprve inkubuje v roztoku fibrinogenu (krok 1), následně se inkubuje v roztoku trombinu (krok 2) a nakonec se tento materiál inkubuje s roztokem obsahujícím fibrinogen a lyzát krevních destiček (krok 3), popřípadě dále obsahujícím alespoň jeden růstový faktor vybraný ze skupiny zahrnující FGF, VEGF, PlGF-2 a TGF- β 1.

Krok 1 se s výhodou provede při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu alespoň 12 hodin. Roztok fibrinogenu (1) v kroku 1 má s výhodou koncentraci $5\text{ }\mu\text{g/ml}$, výhodněji se použije roztok fibrinogenu v TRIS pufru (Tris-HCl buffer $0,05\text{ M}$ pH 7,4, 2 mM CaCl_2).

Krok 2 se s výhodou provede při pokojové teplotě po dobu alespoň 1 hodiny. Roztok trombinu (2) má s výhodou koncentraci 2 NIH U/ml , výhodněji je rozpouštědlem TRIS pufr (stejná koncentrace jako v kroku 1).

Krok 3 se s výhodou provede při pokojové teplotě po dobu alespoň 2 hodin. Inkubační roztok (3) v kroku 3 je s výhodou TRIS pufr obsahující $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ fibrinogenu, $0,25\text{ U/ml}$ antitrombinu III, LKD v rozmezí od 1 do 90 % v/v. Inkubačním roztokem (3) může být také přímo LKD. Pokud inkubační roztok v kroku 3 obsahuje rovněž růstový faktor (zejména FGF a/nebo VEGF), pak je celková koncentrace růstových faktorů v inkubačním roztoku 3 s výhodou v rozmezí od 0,5 do $3\text{ }\mu\text{g/ml}$.

Po každém kroku 1, 2 a 3 se nanovlákná membrána opláchne TRIS pufrům a nakonec se membrána opláchne roztokem PBS (Phosphate-buffered saline pH 7,4).

Nanovláknenný materiál podle předkládaného technického řešení může obsahovat různou koncentraci LKD proteinů v závislosti na koncentraci lyzátu krevních destiček v inkubačním roztoku (3). Ve výhodném provedení se v kroku 3 použije inkubační roztok (3) obsahující pouze lyzát krevních destiček (100 % v/v) nebo obsahující fibrinogen, antitrombin a od 5 do 90 % v/v lyzátu krevních destiček, nejvýhodněji fibrinogen, antitrombin a 20 % v/v lyzátu krevních destiček. (20 % v/v LKD znamená, že roztok (3) byl připraven rozpuštěním fibrinogenu a antitrombinu v roztoku získaném smícháním LKD a TRIS pufru v objemovém poměru 1:4. Tímto způsobem se získá největší množství LKD proteinů zachycených v nanovláknenném materiálu i největší množství LKD proteinů uvolněných do PBS během jednoho týdne, a je tím dosaženo největší životaschopnosti buněk HSVEC kultivovaných *in vitro* v blízkosti takto připraveného nanovláknenného materiálu.

Stejně jako v případě LKD proteinů, i koncentrace růstových faktorů v nanovláknenném materiálu závisí na jejich koncentraci v inkubačním roztoku v kroku 3. S výhodou se v kroku 3 použije inkubační roztok obsahující od 0,8 do $1,2\text{ }\mu\text{g/ml}$ FGF a/nebo od 0,8 do $1,2\text{ }\mu\text{g/ml}$ VEGF.

Nanovláknenné membrány modifikované inkubací s roztoky obsahujícími koncentrace růstových faktorů v inkubačním roztoku kroku 3, které byly vyšší než výše uvedený rozsah, již podstatně nezvyšovaly životaschopnosti buněk HSVEC kultivovaných v jejich blízkosti. Výhodou je v tomto případě úspora nákladných růstových faktorů.

5

Objasnění výkresů

Obr. 1: Schéma třístupňové modifikace vláken v nanovláknenné membráně postupně inkubací v roztoku fibrinogenu, během které je povrch nanovláken v membráně, pokryt adsorbovaným fibrinogenem (Krok 1), inkubací v roztoku trombinu, během které se trombin nekovalentně váže na fibrinogen adsorbovaný v předchozím kroku (Krok 2), inkubací v roztoku obsahujícím Fbg, lyzát krevních destiček (LKD) a popřípadě alespoň jeden růstový faktor VEGF a FGF, během které navázaný trombin mění fibrinogen z inkubačního roztoku na fibrin, jehož samovolnou polymerací se vytváří fibrinová síť obsahující inkorporované LKD proteiny a popřípadě růstové faktory (Krok 3).

Obr. 2: Skenovací elektronová mikroskopie nemodifikované PLCL/PCL membrány (A) a PLCL/PCL membrány modifikované inkubačním roztokem 3 obsahujícím fibrinogen a 20% v/v LKD a vysušené lyofilizací (B.) Histogram četnosti průměrů 200 vláken náhodně vybraných v SEM snímku.

Konfokální mikroskopie PLCL/PCL membrány modifikované inkubačním roztokem 3 obsahujícím pouze fibrinogen (C) a PLCL/PCL membrány modifikované inkubačním roztokem 3 obsahujícím fibrinogen a 20% v/v LKD (D). Fibrin a LKD proteiny v modifikovaných membránách byly fluorescenčně označeny fluorescaminem.

Obr. 3: Testování životaschopnosti endoteliálních buněk HSVECs a keratinocytů. (A) Životaschopnost HSVECs vysazených na kolagenem potažené dno jamky v 24-jamkové kultivační destičce se skleněným dnem a kultivovaných v médiu, do kterého byl ponořen vzorek modifikované PLCL/PCL membrány (B). Kultivace keratinocytů vysazených na povrchu modifikované PLCL/PCL membrány (C).

Příklady uskutečněného technického řešení

Příklad 1 Příprava nanovláknenného materiálu na bázi PLCL/PCL membrány uvolňující LKD proteiny.

PLCL/PCL membrána o plošné hmotnosti $22 \pm 4 \text{ g/m}^2$ byla vyrobena ze směsi PCL (polykaprolakton, Sigma; PCL80; Mn: 80 000 g/mol) a PLCL (kopolymer poly(laktid-*stat*-polykaprolakton), 70/30 % mol., Corbion; PURASORB PLC 7015) v hmotnostním poměru 1:1. Polymery byly rozpuštěny v rozpouštědlovém systému Chloroform/Ethanol (8:2 % hmotn.). Elektrické zvlákňování probíhalo na zařízení Nanospider typ NS 1WS500U (Elmarco, CZ), zvlákňovací parametry: vzdálenost mezi elektrodami 190 mm, napětí -10 / +40 kV, rychlost pohybu cartridge EMW 480 mm/s, rychlost převíjení podkladové textilie 18 mm/min, velikost průvlastu 0,6 mm. Klimatické podmínky procesu (22 °C, RH 50%) byly regulovány přesně řízeným klimatizačním systémem NS AC150/1000/2000 (Elmarco). Po přípravě byla membrána opatrně sejmuta z podkladové textilie.

50

Membrána byla tvořena sítí vláken s širokou distribucí průměrů $1100 \pm 700 \text{ nm}$ (Obr. 2A a histogram). (Distribuce průměrů byla vyhodnocena aplikací NIS Elements software na měření průměru 200 náhodně vybraných vláken v SEM snímku.) Tloušťka membrány měřená mikroskopem byla $25 \pm 3 \text{ }\mu\text{m}$.

55

Příprava lyzátu krevních destiček (LKD): Pro přípravu LKD byl používán deleukotizovaný trombocytární koncentrát (TK) připravovaný podle standardního protokolu v Krajské nemocnici v Liberci, a.s. z citrátem antikoagulované plné krve odebírané čtyřem dárčům stejné krevní skupiny. TK obsahoval $600-900 \times 10^6$ krevních destiček a 30 v/v % krevní plazmy. LKD byl
5
připraven 2x opakovaným zmrazením na teplotu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ a rozmrazením TK na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, při kterém praskly buněčné membrány krevních destiček (Freeze-thaw metoda), a následným odstraněním zbytků membrán centrifugací. LKD obsahoval proteiny uvolněné z destiček a proteiny z krevní plazmy (LKD proteiny). I když bylo LKD používáno pro modifikaci PLCL/PCL membrány vždy normováno ředěním na koncentraci destiček 600×10^6 v 1 ml TK, pohybovaly se koncentrace LKD
10 proteinů v širokém rozmezí, v důsledku různého složení krve od různých dárců.

LKD použité v Příkladech 1 a 2 bylo charakterizováno koncentrací fibrinogenu (Fbg), který je nejdůležitějším stavebním prvkem při tvorbě fibrinové sítě, fibronektinu, který kovalentní vazbou na fibrin zpevňuje fibrinový klot při hemostázy a hraje důležitou roli interakcí s buňkami
15 v následujících fázích hojení rány, a růstových faktorů FGF, VEGF a PDGF, které se uplatňují ve všech fázích hojení, zejména tvorbou krevních mikrokapilár umožňujících u diabetických ran přechod z chronického zánětu fáze do následující proliferací fáze. Hodnoty výše uvedených složek v připraveném LKD jsou uvedeny v Tabulce 1.

20 Tabulka 1

Fibrinogen [mg/ml]	FGF [pg/ml]	VEGF [pg/ml]	PDGF-BB [ng/ml]	Fibronektin [μg/ml]
$0,9 \pm 0,5$	70 ± 20	70 ± 20	13 ± 3	40 ± 5

Modifikace PLCL/PCL membrány fibrinem a LKD proteiny: Kruhové vzorky o ploše $1,9\text{ cm}^2$ vyseknuté z membrány byly umístěny do 70 % v/v etanolu, ozářeny UV světlem po dobu 30 minut
25 a následně 5 dnů namočený ve sterilní deionizované vodě s každodenní výměnou při pokojové teplotě (PT). Vzorek byl přemístěn do jedné z misek 24-miskové kultivační destičky naplněné sterilním Tris pufrem (TB). Po 3 výměnách byl TB odsát a nahrazen 0,3 ml roztoku fibrinogenu (Fbg, $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ v TB) (roztok 1), ve kterém by vzorek inkubován přes noc při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následující modifikace pak byla prováděna při PT. Po trojnásobném opláchnutí Tris pufrem byl vzorek
30 inkubován v roztoku trombinu (2 NIH U/ml in TB) (roztok 2) 1 hodinu při PT a po dalším opláchnutí TB byl vzorek inkubován v jednom z roztoků 3 po dobu 2 hodin při TP. Roztoky 3 obsahovaly $200\text{ }\mu\text{g/ml}$ Fbg, antitrombin III (ATIII, $0,25\text{ U/ml}$) a LKD o koncentraci 0, 1, 5, 10, 20, 50 a 100 % v/v v Tris puftru (Tris-HCl buffer $0,05\text{ M}$ pH 7,4, 2 mM CaCl_2). (Bylo tedy připraveno sedm různých nanovlákných materiálů, lišících se množstvím LKD proteinů. Tyto modifikované
35 membrány byly dále označeny jako Fb, Fb1, Fb5, Fb10, Fb20, Fb50 a Fb100). Po závěrečném opláchnutím TB byl vzorek opláchnut a dále uchovávan v PBS (Phosphate-buffered saline pH 7,4). Schéma třístupňové modifikace PLCL/PCL vláken v nanovlákném materiálu postupnou inkubací s roztokem 1, 2 a 3 je znázorněno na Obrázku 1.

40 Modifikované membrány byly charakterizovány množstvím proteinů imobilizovaných v membráně ihned po přípravě (čas T0) a po 1 týdnu (po 168 hodinách, čas T168) inkubace v PBS při PT, které bylo měřeno proteinovým kitem (Micro BCATM Protein Assay Kit) (Tabulka 2). Množství proteinů zachycených v membráně zahrnovalo fibrin vytvořený z Fbg rozpuštěného v inkubačním roztoku 3, fibrin vytvořený z Fbg pocházejícího z LKD a ostatní LKD proteiny.

45

Tabulka 2: Koncentrace proteinů v membránách modifikovaných s použitím roztoku 3 obsahujícím různé koncentrace LKD. Koncentrace proteinů po modifikaci – T0 a po 186 hodinách v PBS – T168.

	Fb	Fb1	Fb5	Fb10	Fb20	Fb50	Fb100
T0 [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	19 \pm 2	76 \pm 12	153 \pm 8	240 \pm 15	450 \pm 66	190 \pm 19	250 \pm 50
T168 [$\mu\text{g}/\text{cm}^2$]	16 \pm 3	49 \pm 2	47 \pm 3	47 \pm 7	35 \pm 4	23 \pm 1	21 \pm 1

5

Nejvyšší množství proteinů imobilizovaných v čerstvě modifikované membráně (450 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) a největší množství proteinů (415 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), které se uvolnilo během sedmi dnů inkubace do PBS, bylo získáno v membráně Fb20. Po propláchnutí deionizovanou vodou a vysušení lyofilizací. Plošná hmotnost a tloušťka modifikovaných membrán se v rámci chyby měření nelišila od plošné hmotnosti a tloušťky nemodifikované membrány (25 \pm 3 μm , 22 \pm 4 g/m^2).

10

Na Obrázku 2 je vidět, že při inkubaci nanovláčkové membrány v roztoku 3 obsahujícím pouze 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fbg a ATIII, 0,25 U/ml v TB byl povrch jednotlivých nanovláček v membráně (Fb) pokryt fibrinovou sítí. Při inkubaci v roztoku fibrinogenu obsahujícím 20% v/v LKD se fibrinová síť obsahující fibrin a LKD proteiny vytvořila i v prostoru mezi nanovláčkami (Fb20).

15

Příklad 2 Příprava nanovláčkového materiálu na bázi PLCL/PCL membrány uvolňující růstové faktory

20

Stejná PLCL/PCL membrána byla postupně inkubovaná s roztokem 1 a 2 jako v Příkladu 1. Následně byly připraveny modifikované membrány inkubací s jedním z roztoků 3 po dobu 2 hodin při TP, které obsahovaly 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fbg, antitrombin III (ATIII, 0,25 U/ml) a 20 % v/v LKD v TB (roztok LKD 20% v/v) nebo LKD 20% v/v s přidávanými růstovými faktory.

25

Nanovláčkové materiály označené jako Fb20, Fb20+FGF, Fb20+VEGF nebo Fb20+FGF+VEGF byly získány použitím roztoku 3 obsahujícího LKD 20% v/v, LKD 20% v/v s přidáním FGF 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, LKD 20% v/v s přidáním VEGF 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nebo LKD 20% v/v s přidáním FGF 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a VEGF 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

30

Množství růstových faktorů v nanovláčkovém materiálu po přípravě a uvolněných do PBS během jednoho týdne (Tabulka 3) bylo měřeno VEGF Human ELISA Kitem (KHG0111), FGF-2 Human ELISA Kitem (KHG0021). Ma PDGF-BB Human ELISA Kitem (Cat. No. BMS2071). Množství destičkového růstového faktoru (PDGF-BB), který pocházel z LKD použitého pro přípravu Fb20 (Tabulka 1), bylo měřeno Ma PDGF-BB Human ELISA Kitem (Cat. No. BMS2071) (Tabulka 3).

35

Tabulka 3: Množství růstových faktorů v nanovláčkovém materiálu

	ihned po přípravě (T0)	Po 7 dnech v PBS (T168)	úbytek růstových faktorů po inkubaci v PBS
Koncentrace FGF v Fb20+FGF	3,1 \pm 0,9 ng/cm^2	0,5 \pm 0,25 ng/cm^2	84 %
Koncentrace FGF v Fb20+FGF+VEGF	3,8 \pm 0,8 ng/cm^2		
Koncentrace FGF v Fb20	pod 15 pg/cm^2	n.a.	n.a.

Koncentrace VEGF v Fb20+VEGF	40 ±15 ng/cm ²	0,7 ± 0,18 ng/cm ²	98 %
Koncentrace VEGF v Fb20+FGF+VEGF	50 ±14 ng/cm ²		
Koncentrace VEGF v Fb20	pod 5 pg/cm ²	n.a.	n.a.
Koncentrace PDGF-BB v Fb20	17 ±1 pg/cm ²	4 ±1 pg/cm ²	76 %

Vzhledem k velmi nízkým koncentracím FGF a VEGF v LKD byly koncentrace těchto faktorů v membránách modifikovaných roztoky (3) obsahujícími pouze LKD pod citlivostí detekční metody.

5

Přítomnost FGF a VEGF neovlivnila v mezích chyby celkovou koncentraci proteinů v membránách (450 ± 66 µg/cm²). Plošná hmotnost a tloušťka modifikovaných membrán se v rámci chyby měření nelišila od plošné hmotnosti a tloušťky nemodifikované membrány (25 ± 3 µm, 22 ± 4 g/m²).

10

Příklad 3 Vliv nanovláknenných materiálů dle předkládaného technického řešení na životaschopnost (metabolickou aktivitu) lidských endoteliálních buněk HSVECs a keratinocytů

Vliv PLCL/PCL membrán připravených v Příkladech 1 a 2 na životaschopnost lidských endoteliálních buněk HSVECs kultivovaných na kolagenu v přítomnosti membrány a na životaschopnost keratinocytů vysazených a kultivovaných na membráně byl testován v uspořádání znázorněném na Obrázku 3.

Životaschopnost HSVECs kultivovaných v blízkosti modifikovaných PLCL/PCL membrán:
 Primární HSVECs (Provitro, Cat. No. 1210121, passages 3–4) byly vysazeny na kolagenem potažené dno jamky v 24-jamkové kultivační destičce se skleněným dnem (IBL Baustoff+Labor GmbH) v množství 20,000 buněk na jamku a kultivovány za standardních podmínek (37 °C a 5% CO₂) v médiu EGM-2 (EGM-2, Cat. No. C-22111 od PromoCell) bez přidání růstových faktorů, ale doplněném 2% fetálním hovězím sérem, heparinem, kyselinou askorbovou a hydrocortisonem.
 Po 2 hodinách byla suspenze buněk v misce nahrazena 1 ml EGM-2 média, do kterého byl ponořen vzorek nanovláknenného materiálu o ploše 1,9 cm² modifikovaný podle Příkladu 1 nebo 2 (Obr. 3B). Životaschopnost HSVECs vyjádřená jejich metabolickou aktivitou byla testována pátý den po kultivaci proliferačním testem (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega Corporation). Hodnoty absorbance světla o vlnové délce 450 nm (Tabulka 4 a 5, graf v Obr. 3A), které byly měřeny v médiu, byly úměrné počtu živých buněk na kolagenu.

30

Tabulka 4: Metabolická aktivita HSVECs testována pátý den kultivace na kolagenu v blízkosti membrán obsahujících různé koncentrace LKD proteinů.

	Fb	Fb1	Fb5	Fb10	Fb20	Fb50	Fb100
Absorbance	0,260	0,242	0,238	0,277	0,433	0,223	0,223
S.D.	0,02	0,03	0,03	0,06	0,06	0,02	0,03

35

Membrány označené jako Fb, Fb1, Fb5, Fb10, Fb20, Fb50 a Fb100 byly připraveny dle Příkladu 1, tedy modifikovány s použitím inkubačního roztoku 3 obsahujícího 200 µg/ml Fbg, antitrombin III (ATIII, 0,25 U/ml) a LKD o koncentraci 0, 1, 5, 10, 20, 50 a 100 % v/v. Koncentrace LKD proteinů ve vzorcích membrán před ponořením do média byly stejné jako koncentrace T0 v Tabulce 2 (Příklad 1).

40

Statisticky signifikantní nejvyšší životaschopnost (Obr. 2, graf) byla dosažena v blízkosti membrány Fb20 obsahující 450 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ LKD proteinů, která byla modifikována inkubačním roztokem 3 obsahujícím 20 % v/v LKD.

- 5 Tabulka 5: Metabolická aktivita HSVECs testovaná pátý den kultivace na kolagenu v blízkosti membrán obsahujících LKD proteiny a růstové faktory

Membrána	Bez modifikace	Fb20	Fb20+FGF+VEGF
Absorbance	0,463 \pm 0,07	0,721 \pm 0,04	0,916 \pm 0,08

- 10 Membrány označené jako Fb20 a Fb20+FGF+VEGF byly připraveny dle Příkladu 2. Membrána Fb20 byla modifikována s použitím inkubačního roztoku 3 obsahujícího TB, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fbg, antitrombin III (ATIII, 0,25 U/ml), 20 % v/v LKD a membrána Fb20+FGF+VEGF byla modifikována s použitím inkubačního roztoku 3 obsahujícího 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fbg, antitrombin III (ATIII, 0,25 U/ml), 20 % v/v LKD, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FGF a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VEGF.

- 15 Membrána Fb20 obsahovala 450 \pm 66 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ proteinů. Membrána Fb20+FGF+VEGF obsahovala 450 \pm 66 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ proteinů včetně 3,8 \pm 0,8 ng/cm^2 FGF a 50 \pm 14 ng/cm^2 VEGF.

- 20 *Životaschopnost keratinocytů kultivovaných na PLCL/PCL membránách:* Lidské keratinocyty byly izolovány z kůže od dárců odebrané ve Fakultní nemocnici Královské Vinohrady. Keratinocyty byly vysazeny na povrch vzorku nanovláčenného materiálu o ploše 1,9 cm^2 modifikovaného podle Příkladu 2 a kultivovány za standardních podmínek (37 $^\circ\text{C}$ and 5% CO_2) ve směsi média DME; Invitrogen) a Ham's Nutrient Mixture F-12 Medium (ratio 3:1) doplněnou 10% fetálního hovězího séra (FBS; Life Technologies), 10 ng/ml epidermálního růstového faktoru, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ insulinu a 0,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hydrokortisonu (Obr. 3 C). Metabolická aktivita keratinocytů byla testována sedmý a čtrnáctý den kultivace stejně jako u HSVECs (Tabulka 6).

Tabulka 6: Metabolická aktivita keratinocytů kultivovaných na modifikovaných membránách.

Membrána	7 den		14 den	
	Absorbance	S.D.	Absorbance	S.D.
Bez modifikace	0,06	0,00	0,07	0,00
Fb	0,11	0,00	0,11	0,08
Fb20	0,12	0,02	0,61	0,11
Fb20+FGF+VEGF	0,10	0,03	0,68	0,06

- 30 Membrány označené jako Fb, Fb20 byly modifikovány s použitím inkubačního roztoku 3, který vždy obsahoval 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fbg, antitrombin III (ATIII, 0,25 U/ml) v TB. Inkubační roztok 3 pro přípravu Fb20 obsahoval navíc % v/v LKD a pro přípravu Fb20+FGF+VEGF obsahoval navíc % v/v LKD. Membrána Fb20+FGF+VEGF byla modifikována s použitím inkubačního roztoku 3 obsahujícího 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Fbg, antitrombin III (ATIII, 0,25 U/ml), 20 % v/v LKD, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ FGF a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ VEGF.

- 35 Membrána Fb obsahovala 19 \pm 2 fibrinu, Fb20 obsahovala 450 \pm 66 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ proteinů, Fb20+FGF+VEGF obsahovala 450 \pm 66 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ proteinů včetně 3,8 \pm 0,8 ng/cm^2 FGF a 50 \pm 14 ng/cm^2 VEGF.

- 40 Obrázek 3 znázorňuje uspořádání testu simulujícího vliv nanovláčenného materiálu pokrývající povrch diabetického vředu na endoteliální buňky tvořící krevní kapiláry během vzniku provizorní granulační tkáně uvnitř rány (Obr. 3B) a testu simulujícího vliv membrány na keratinocyty přerůstající povrch rány v závěrečné fázi hojení (Obr. 3C).

Průmyslová využitelnost

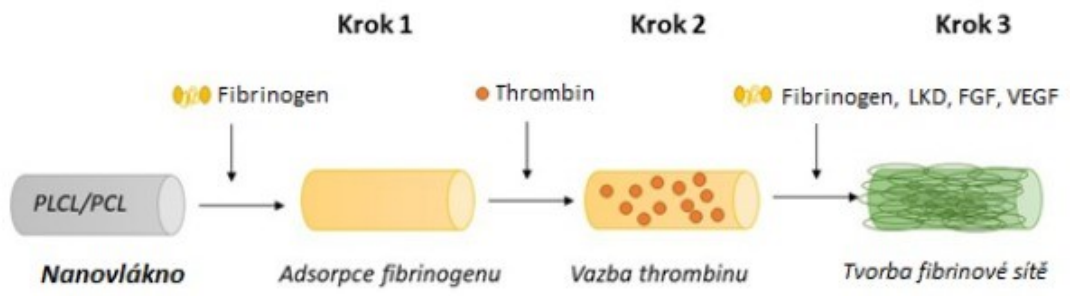
- 5 Navržený kryt je aktuálně využitelný na pracovištích zabývajících se vývojem a testováním zdravotnických prostředků pro léčbu kožních diabetických ran a po předklinických zkouškách ve výrobním podniku.

Seznam použitých zkratk

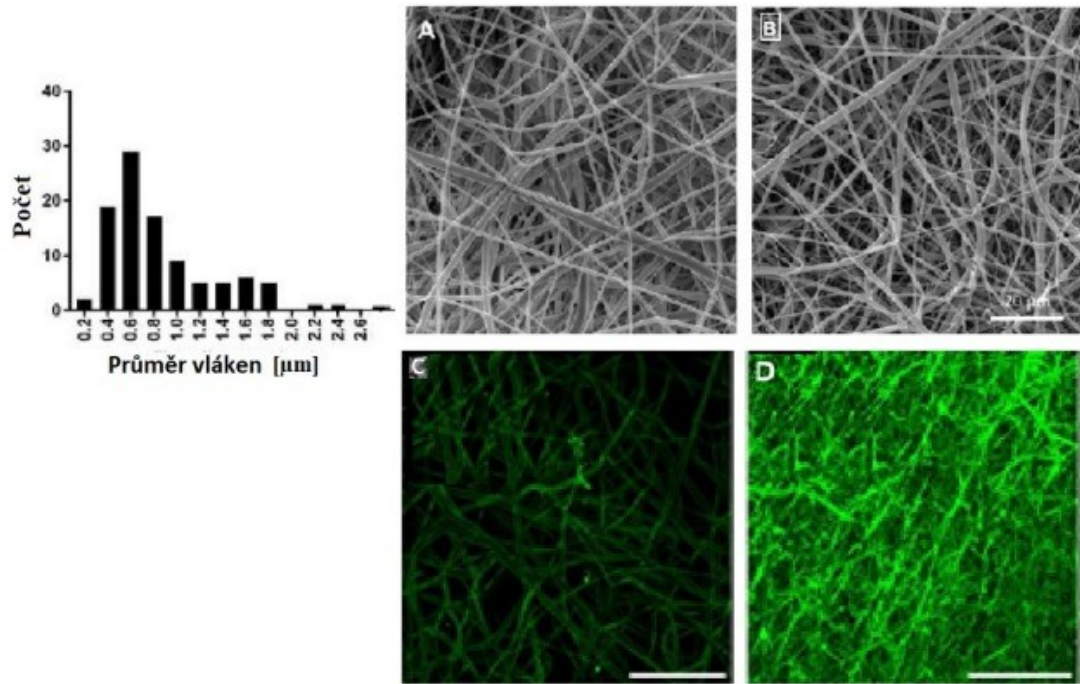
- 10 PLCL/PCL membrána - membrána tvořená směsí vláken z poly(L-laktid-*stat-ε*-kaprolakton) (PLCL) a poly(ϵ -kaprolakton) (PCL)
- Fbg – fibrinogen
- Fb - fibrinová síť
- LKD - lyzát lidských krevních destiček
- 15 LKD proteiny - proteiny obsažené v lyzátu lidských krevních destiček
- PBS - fosfátem pufovaný fyziologický roztok, pH 7.4
- TB - Tris pufr (Tris–HCl buffer 0,05 M pH 7,4, 2 mM CaCl₂)
- FGF - fibroblastový růstový faktor
- VEGF - vaskulární endotelový růstový faktor
- 20 PDGF - destičkový růstový faktor
- HSVEC - lidské endoteliální buňky *safenózní žíly*
- Fb20 - membrána modifikovaná inkubací v roztoku 3 obsahujícím Fbg a 20% v/v lyzátu lidských krevních destiček
- DC elektrické zvlákňování – elektrostatické zvlákňování stejnosměrným proudem
- 25 PT – pokojová teplota udržovaná klimatizací v okolí 23 °C
- PIGF-2 - placenta growth factor 2
- TGF- β 1 - transforming growth factor β 1
- EGM-2 médium - endothelial cell growth medium (růstové médium pro endoteliální buňky)

NÁROKY NA OCHRANU

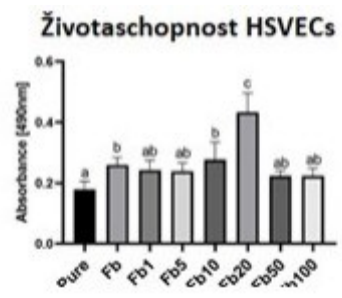
- 5 1. Nanovláknenný materiál pro krytí ran, **vyznačený tím**, že obsahuje nanovláknennou membránu z poly(L-laktid-*stat-ε*-kaprolaktonu) a/nebo poly(*ε*-kaprolaktonu), jejíž vlákna jsou potažena a zesíťovaná fibrinem, do nějž jsou inkorporovány proteiny lyzátu krevních destiček.
2. Nanovláknenný materiál podle nároku 1, **vyznačený tím**, že má plošnou hmotnost v rozmezí od 10 do 40 g/m², s výhodou 22 ± 2 g/m².
3. Nanovláknenný materiál podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 2, **vyznačený tím**, že má tloušťku v rozmezí od 10 do 50 μm, s výhodou od 11 do 45 μm, výhodněji 25 ± 3 μm.
- 10 4. Nanovláknenný materiál podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 3, **vyznačený tím**, že koncentrace proteinů lyzátu krevních destiček v nanovláknenném materiálu je v rozmezí od 30 do 900 μg/cm², s výhodou v rozmezí od 200 do 500 μg/cm², výhodněji v rozmezí od 300 do 450 μg/cm².
- 15 5. Nanovláknenný materiál podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 4, **vyznačený tím**, že dále obsahuje alespoň jeden růstový faktor, vybraný ze skupiny zahrnující FGF, VEGF, PlGF-2 a TGF-β1, s výhodou je růstovým faktorem FGF a/nebo VEGF.
6. Nanovláknenný materiál podle nároku 5, **vyznačený tím**, že celková koncentrace růstových faktorů v nanovláknenném materiálu je v rozmezí od 2 do 110 ng/cm².
- 20 7. Nanovláknenný materiál podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 6, **vyznačený tím**, že nanovláknenná membrána sestává z vláken o průměru v rozmezí od 300 do 1900 nm z materiálu poly(L-laktid-*stat-ε*-kaprolaktonu) a/nebo poly(*ε*-kaprolaktonu).
8. Nanovláknenný materiál podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 7, **vyznačený tím**, že nanovláknenná membrána je tvořena sítí nanovláken poly(L-laktid-*stat-ε*-kaprolaktonu) 70:30 % mol. o průměru vlákna v rozmezí od 300 do 1900 nm.
- 25 9. Nanovláknenný materiál podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 7, **vyznačený tím**, že nanovláknenná membrána je tvořena sítí nanovláken poly(*ε*-kaprolaktonu) o průměru vlákna v rozmezí od 500 do 1900 nm.
- 30 10. Nanovláknenný materiál podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 7, **vyznačený tím**, že nanovláknenná membrána je tvořena směsí nanovláken poly(L-laktid-*stat-ε*-kaprolaktonu) 70:30 % mol. a poly(*ε*-kaprolaktonu) v hmotnostním poměru 1:1 a o průměru vlákna v rozmezí od 400 do 1800 nm.
11. Nanovláknenný materiál podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 10, **vyznačený tím**, že má plošnou hmotnost 22 ± 2 g/m² a nanovláknenná membrána sestává z vláken poly(L-laktid-*stat-ε*-kaprolaktonu) 70:30 % mol. a/nebo poly(*ε*-kaprolaktonu) o průměru vlákna v rozmezí od 300 do 1900 nm, na jejichž povrchu je ukotvena fibrinová síť, obsahující proteiny lyzátu krevních destiček v množství od 200 do 500 μg/cm².
- 35 12. Nanovláknenný materiál podle nároku 11, **vyznačený tím**, že dále obsahuje růstový faktor FGF a/nebo VEGF v celkovém množství od 30 do 80 ng/cm².



Obr. 1

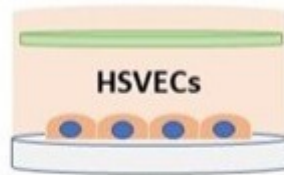


Obr. 2



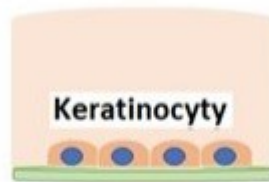
Obr. 3A

Modifikovaná membrána



Sklo pokryté kolagenem

Obr. 3B



Modifikovaná membrána

Obr. 3C