

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

37 952

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61L 15/46 (2006.01)
A61L 15/34 (2006.01)
A61L 26/00 (2006.01)
A61F 13/02 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2024-42005**
(22) Přihlášeno: **30.05.2024**
(47) Zapsáno: **18.06.2024**

(73) Majitel:
Vysoké učení technické v Brně, Brno, Veveří, CZ
Masarykova univerzita, Brno, Brno-město, CZ

(72) Původce:
doc. Ing. Lucy Vojtová, Ph.D., Měnin, CZ
Ing. Eva Černá, Brno, Kohoutovice, CZ
Ing. Jana Brtníková, Ph.D., Brno, Komín, CZ
Mgr. Lukáš Vacek, Ph.D., Brno, Staré Brno, CZ
prof. MUDr. Filip Růžička, Ph.D., Brno, Soběšice, CZ
prof. MUDr. Břetislav Lipový, Ph.D., MBA,
LL.M., Syrovice, CZ
prof. RNDr. Roman Pantůček, Ph.D., Blansko, CZ

(74) Zástupce:
HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název užitého vzoru:
**Injektovatelný gel z přírodní pryskyřice s
bakteriofágy pro hojení infikovaných ran**

CZ 37952 U1

Injektovatelný gel z přírodní pryskyřice s bakteriofágy pro hojení infikovaných ran

Oblast techniky

5

Předmětem technického řešení je transparentní injektabilní hydrogel připravený z biokompatibilních a biodegradabilních polymerů, který je obohacen antimikrobiálně působícími bakteriofágy. Hydrogel je určen pro výplň kožních defektů a pro podporu léčby infikovaných kožních defektů s možností sledovat stav rány v procesu hojení.

10

Dosavadní stav techniky

Hojení kožních ran je komplexní proces, který zahrnuje interakci velkého množství buněk a enzymových systémů. Samotné hojení se za fyziologických i patofyziologických podmínek sestává ze čtyř navzájem se překrývajících fází: hemokoagulační, inflamatorní, proliferací a remodelační. Tento proces může být komplikován celou řadou vlivů ať již vnějších nebo vnitřních. Nejčastější příčinou narušení procesu hojení je přítomnost mikroorganismů v ráně, které vedou ke zpomalení nebo úplnému zastavení fázového postupu uzávěru rány, tedy perzistenci inflamatorní fáze. To vede k riziku rozvoje obtížně se hojících nebo nehojících se chronických ran. Aby se těmto nepříznivým vlivům zabránilo již v raném stádiu hojení, je vhodné používat antimikrobiální kryty ran, které již od aplikace na ránu potlačují a eliminují lokální infekci.

Ideální injektabilní hydrogel by měl být plně biokompatibilní, biodegradabilní a netoxický pro lidský organismus. Kromě odpovídajícího chemického složení by měl mít hydrogel také odpovídající mechanické vlastnosti jako původní kožní tkáň, tedy schopnost izolovat okolí rány od vnějších vlivů a zároveň zajistit vhodné prostředí pro migraci buněk a hydrataci rány. Dalším důležitým faktorem jsou antimikrobiální vlastnosti materiálu a jeho schopnost uvolňovat případnou obsaženou antibakteriální složku. Injektabilní hydrogelové kryty na bázi polysacharidů se v současné době používají k léčbě akutních a chronických nehojících se kožních ran, buď samotné nebo s přidávkou prohojivé či antimikrobiální složky. V současné době jsou dostupné antiseptické hydrogely zejména na bázi derivátů celulózy (hydroxyethylcelulóza) a polypropylenglykolu, mezi které lze zařadit hojivý gel Octenisept a Octenilin (antiseptikum octenidin dihydrochlorid), Rigenoma (aktivní onozidy, kyselina mléčná), Protosan (polyhexanid a betadin), Flamigel, Granudacyn. Nicméně injektabilní hydrogel na bázi polysacharidů s přidávkou antimikrobiální složky ve formě bakteriofágů v současnosti na trhu nenajdeme. Důvodem je, že bakteriofágy nejsou doposud ve většině zemí světa schváleny jako vhodný prostředek pro léčbu infekcí způsobených rezistentními kmeny bakterií. Nicméně mají však vysoký potenciál jako vhodná alternativa oproti dnes běžně používaným antibiotikům, na které si jsou bakterie schopny velmi rychle a čím dál častěji vytvořit rezistenci.

40

Podstata technického řešení

Předmětem tohoto technického řešení je transparentní injektabilní hydrogel pro hojení infikovaných ran, zejména povrchových ran. Hydrogel obsahuje přírodní polymer pryskyřice karaya, která je plně deacetylovaná, a syntetický polymer polyvinylalkohol a/nebo polyethylenglykol, dále plastifikátor glycerol, a vodu jako rozpouštědlo. Celková koncentrace pryskyřice karaya, syntetického polymeru (nebo směsi syntetických polymerů) a glycerolu ve vodě je v rozsahu 3 až 9,5 % hmotn. Hmotnostní poměr polymerů (pryskyřice karaya s polyvinylalkoholem a/nebo polyethylenglykolem) vůči glycerolu je v rozmezí 10:1 až 1:6. Hmotnostní poměr přírodního polymeru a syntetického polymeru (nebo směsi syntetických polymerů) je v rozmezí 1,5:1 až 1:1,5, s výhodou 1,25:1 až 1:1,2. Hydrogel dále obsahuje bakteriofágy, které jsou přidávány ve formě koncentrovaného roztoku, neovlivňují tedy finální koncentraci hydrogelu.

55

Pryskyřice karaya (angl. gum karaya) je biokompatibilní, biodegradabilní a má i mírné antimikrobiální vlastnosti. Pryskyřice karaya, popřípadě deacetylovaná, je používána v potravinářství pod kódem E416.

5

Pryskyřice karaya je přírodní vysokomolekulární polysacharid, který se získává ve formě pryskyřice ze stromu *Sterculia urens*, jedná se tedy o dostupný a obnovitelný zdroj materiálu s přirozenými antimikrobiálními vlastnostmi. Pryskyřice karaya je biologicky odbouratelný, netoxický pro lidský organismus, biokompatibilní, částečně degradabilní a resorbovatelný biopolymer, který je ve svém nativním stavu nerozpustný, avšak bobtnající v přítomnosti vody. Plný potenciál pryskyřice karayi lze využít po jeho chemické úpravě deacetylací, která podpoří rozpustnost polymeru, tedy jeho afinitu k vodě (deacetylaci lze ověřit pomocí infračervené spektroskopie). Úplnou deacetylací se získá ve vodě rozpustný biopolymer. Molární hmotnost deacetylované pryskyřice karayi je obvykle v rozmezí 2000 až 16000 kg/mol. Molární hmotnost deacetylované pryskyřice karayi lze stanovit pomocí metody SEC-MALS.

10
15

Polyvinylalkohol a polyethylenglykol jsou syntetické vodorozpustné polymery, které tvoří pevnou a elastickou trojrozměrnou polymerní síť, která zlepšuje mechanické vlastnosti.

Polyvinylalkohol je ve vodě rozpustný syntetický polymer vyráběný alkalickou hydrolyzou polyvinylacetátu. S výhodou se použije polyvinylalkohol v rozsahu molárních hmotností 10 až 130 kg/mol. V biomedicínských aplikacích je využíván pro své vhodné mechanické vlastnosti (vysoký elastický modul a mechanickou pevnost), chemickou stabilitu, biokompatibilitu, netoxicitu pro lidský organismus a schopnost tvořit zesíťovanou polymerní síť schopnou pojmout velké množství vody bez ztráty svých mechanických vlastností. V biomedicínských aplikacích je používán jako nosič léčiv, scaffold, biosenzor, nebo kryt ran.

20
25

Polyethylenglykol je syntetický ve vodě rozpustný polymer využívaný pro svou netoxicitu a biokompatibilitu v biomedicínském odvětví jako systém pro dopravu léčiv, v tkáňovém inženýrství a k modifikaci povrchů. S výhodou se využívá nízkomolekulární polyethylenglykol v rozsahu molárních hmotností 200 až 600 g/mol, který je v bezvodé formě tekutý. Polyethylenglykol má aktivní hydroxylovou skupinu na obou koncích polymerního řetězce a je hojně využíván, protože má schopnost tvořit funkční hydrogely v kombinaci s ostatními polymery. Mechanické schopnosti a bobtnání jsou ovlivněny molární hmotností polymeru, nízkomolekulární PEG zvyšuje bobtnání hydrogelů a pevnost v tlaku.

30
35

Plastifikátor glycerol napomáhá k elasticitě a transparentnosti materiálu. Jedná se o ve vodě rozpustnou a biokompatibilní chemickou molekulu. Glycerol je nízkomolekulární sloučenina, která je hojně používána jako plastifikátor, humektant, či pro své nemrznoucí vlastnosti jako kryoprotektivum. Ve vyšších koncentracích vykazuje glycerol baktericidní a virucidní aktivitu.

40

Zlepšení antibakteriálních vlastností hydrogelu je docíleno využitím biologických agens, které jsou schopny elimtovat i rezistentní druhy mikroorganismů. Bakteriofágy nebo také fágy, jsou viry napadající bakterie, kterých je využíváno v rámci biologické léčby pro takzvanou fágovou terapii. Využití fágové terapie je možností, jak efektivně potlačit a zamezit infekci s minimálním rizikem vzniku rezistence. Hlavní podstatou fágové terapie je eliminace specifického druhu, popř. kmene bakterie lytickým působením. Během tohoto procesu jsou fágy schopny se množit a eradikovat i těžké infekce bez vedlejších negativních efektů, které jsou běžné u antibiotik. Některé typy fágů jsou schopné cílit na specifické kmeny druhu *Staphylococcus aureus*, grampozitivní bakterie rezistentní vůči široké škále antibiotik a odpovědné za závažná onemocnění zahrnující např. kožní abscesy, či infekce ran. Aby bylo možné léčit tyto rány, je nutné najít vhodný kmen fága, jeho optimální koncentraci a vhodný nosič, který fágový kmen nebo fágový koktejl (směs různých kmenů fágů) bude vhodně komplementovat a působit společně v ráně. Například 812K1/420 je dsDNA fág vhodný pro léčbu stafylokokových infekcí, je biokompatibilní a netoxický pro organismus. Hydrogel podle technického řešení je tedy obzvláště výhodně obohacen jedním či více

45
50

kmeny fágů eliminujících kmeny bakterií rodu *Staphylococcus*, což zahrnuje např. kmeny fága K, fága Twort, fága JK2(=812K1/420), fága philPLA-RODI, fága 187 nebo fága SA97.

5 Injektabilní hydrogel lze připravit metodou mražení a následného rozmrazování v několika opakujících se cyklech. Výsledný injektabilní hydrogel je tixotropní, tedy vhodný k injekční aplikaci. Hydrogel je dlouhodobě stabilní při skladování v mrazu.

10 Použití injektabilních hydrogelů ran významně zvyšuje efektivitu hojení, jelikož materiál vyplní ránu a napodobuje vlastnosti extracelulární matrix kůže (pevnost a pružnost), izoluje okolí rány od vnějších vlivů a zamezuje narušení procesu hojení (tj. vzniku infekce).

Na animálním modelu hluboké infekce kůže a měkkých tkání prasete, při trvání experimentu po dobu 14 dní, byla potvrzena antimikrobiální účinnost injektabilního hydrogelového krytu rány podle předkládaného technického řešení, který potlačil bakteriální infekci v celé ploše a hloubce defektu kůže a měkkých tkání, a také urychlil hojení a regeneraci rány. Zároveň došlo k degradaci a resorpci materiálu v ráně.

20 Pro ověření a hodnocení antimikrobiálního efektu předkládaného technického řešení byly zvoleny dvě metody, a to otisky z povrchu ran a bioptický odběr tkání ran. Obě tyto metody vykazaly snížení množství patogenu v ranách o 2 až 3 řády (z původních více než 6 log CFU/g tkáně a více než 1000 CFU/25 cm² povrchu rány) v průběhu dvoutýdenních experimentů. Konkrétně hydrogel s fágovým preparátem vykázal snížení množství patogenu na povrchu rány na 42 ± 15 CFU/25 cm² povrchu rány a ve tkáni o $2,6 \pm 0,5$ log CFU/g tkáně, což odpovídá úspěšné léčbě infekce (snížení pod 4 log CFU/g tkáně).

25

Příklady uskutečnění technického řešení

Chemikálie:

30

Deacetylovaná pryskyřice karaya byla získána z komerčních zdrojů. Její molární hmotnost byla ověřena metodou SEC (velikostně separační chromatografie) s MALS (multi-angle light scattering) detektorem HELEOS-II a RI (refractive index) detektorem Optilab T-rEX – oba instrumenty od společnosti Wyatt Technology. Jako mobilní fáze byly použity ultračistá voda s 35 s přísadkou 200 ppm azidu sodného. Specifický inkrement indexu lomu $dn/dc = 0,145$ ml/g byl použit pro vyhodnocení výsledků. Pro separaci byly použity dvě kolony Ultrahydrogel Linear 300 x 8 mm společnosti Waters, průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min. Byla stanovena hmotnostní střední molární hmotnost $M_w = 3\ 800$ kg/mol.

40 Polyvinylalkohol byl získán z komerčních zdrojů, s molekulovou hmotností deklarovanou výrobcem 90 kg/mol.

Polyethylen glykol byl získán z komerčních zdrojů, s molekulovou hmotností deklarovanou výrobcem 400 g/mol (PEG400).

45 **Příklad A:** 3% hmotn. injektabilní hydrogel na bázi pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu a glycerolu

Byl připraven polymerní roztok deacetylované pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu a glycerolu o hmotnostním poměru 4,5:4,5:1 ve vodě. Výsledná koncentrace roztoku byla 3 % hmotn. všech použitých složek (pryskyřice karaya, polyvinylalkohol, glycerol) ve vodě. Roztok byl po přidavku všech složek homogenizován po dobu 24 hodiny při teplotě 23 °C a následně byl fyzikálně síťován metodou opakovaného zmrazování a rozmrazování. Postup zmrazování a rozmrazování byl následující: polymerní roztok byl navážen do plastových nádob a poté byl v celém objemu rychle zmrazen pomocí kapalného dusíku na teplotu -196 °C, kde zůstal po dobu 30 minut. Následně byly 55 takto připravené hydrogely uskladněny při teplotě -20 °C. Před aplikací byl vzorek rozmrazen.

Příklad B: 3,5% hmotn. injektabilní hydrogel na bázi pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu a glycerolu

- 5 Byl připraven polymerní roztok deacetylované pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu a glycerolu o hmotnostním poměru 5:4:1 ve vodě. Výsledná koncentrace roztoku byla 3,5 % hmotn. všech použitých složek (pryskyřice karaya, polyvinylalkohol, glycerol). Roztok byl po přidavku všech složek homogenizován po dobu 24 hodiny při teplotě 23 °C a následně byl fyzikálně síťován metodou opakovaného zmrazování a rozmrazování. Postup zmrazování a rozmrazování byl
- 10 následující: polymerní roztok byl navážen do plastových nádob a poté byl v celém objemu rychle zmrazen pomocí kapalného dusíku na teplotu -196 °C, kde zůstal po dobu 30 minut. Následně byly takto připravené hydrogely uskladněny při teplotě -20 °C. Před aplikací byl vzorek rozmrazen.

15 Příklad C: 9,5% hmotn. injektabilní hydrogel na bázi pryskyřice Karaya, polyvinylalkoholu, polyethylenglykolu a glycerolu

- Byl připraven polymerní roztok deacetylované pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu, polyethylenglykolu a glycerolu o hmotnostním poměru 8:8:1:50 ve vodě. Výsledná koncentrace roztoku byla 9,5 % hmotn. všech použitých složek (pryskyřice karaya, polyvinylalkohol, polyethylenglykol, glycerol). Roztok byl po přidavku všech složek homogenizován po dobu
- 20 24 hodiny při teplotě 23 °C a následně byl fyzikálně síťován metodou opakovaného zmrazování a rozmrazování. Postup zmrazování a rozmrazování byl následující: polymerní roztok byl navážen do plastových nádob a poté byl v celém objemu rychle zmrazen pomocí kapalného dusíku na teplotu -196 °C, kde zůstal po dobu 30 minut. Následně byly takto připravené hydrogely uskladněny při teplotě -20 °C. Před aplikací byl vzorek rozmrazen.
- 25

Příklad 1: 3% hmotn. injektabilní hydrogel na bázi pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu a glycerolu s fágovým preparátem

- 30 Injektabilní hydrogel byl připraven dle poměrů a přípravy v příkladu A. Těsně před mražením byl do odváženého polymerního roztoku napipetován fágový preparát 812K1/420 v množství 5 µl/ml, čímž byla získána finální koncentrace $5 \cdot 10^7$ PFU/ml (PFU = plaky tvořící jednotky). Roztok byl homogenizován a následně byl fyzikálně síťován metodou opakovaného zmrazování a rozmrazování. Poté byly takto připravené hydrogely uskladněny při teplotě -20 °C pro zajištění
- 35 stability bakteriofága v hydrogelové matrici. Zesíťované hydrogely s fágy byly rozmrazeny vždy přímo před aplikací.

Příklad 2: 3,5% hmotn. injektabilní hydrogel na bázi pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu a glycerolu s fágovým preparátem

- 40 Injektabilní hydrogel byl připraven dle poměrů a přípravy v příkladu B. Těsně před mražením byl do odváženého polymerního roztoku napipetován fágový preparát 812K1/420 v množství 5 µl/ml, čímž byla získána finální koncentrace $5 \cdot 10^7$ PFU/ml. Roztok byl homogenizován a následně byl fyzikálně síťován metodou opakovaného zmrazování a rozmrazování. Poté byly takto připravené hydrogely uskladněny při teplotě -20 °C pro zajištění stability bakteriofága v hydrogelové matrici. Zesíťované hydrogely s fágy byly rozmrazeny vždy přímo před aplikací.
- 45

Příklad 3: 9,5% hmotn. injektabilní hydrogel na bázi pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu, polyethylenglykolu a glycerolu s fágovým preparátem

- 50 Injektabilní hydrogel byl připraven dle poměrů a přípravy v Příkladu C. Zamrazený hydrogel byl následně rozmrazen a do zesíťovaného hydrogelu byl napipetován fágový preparát 812K1/420 na finální koncentraci 10^8 PFU/ml. Hydrogel tak byl ihned připraven pro přímou aplikaci na ránu.

Příklad 4: 9,5% hmotn. injektabilní hydrogel na bázi pryskyřice karaya, polyvinylalkoholu, polyethylenglykolu a glycerolu s fágovým preparátem

- 5 Injektabilní hydrogel byl připraven dle poměrů a přípravy v Příkladu C. Zamrazený hydrogel byl následně rozmražen a do zesíťovaného hydrogelu byl napipetován fágový preparát 812K1/420 na finální koncentraci 10^9 PFU/ml. Hydrogel tak byl ihned připraven pro přímou aplikaci na ránu.

Příklad 5

- 10 Injektabilní hydrogely připravené v Příkladech A, B a v Příkladech 1 a 2 byly podrobeny reologickému měření, které testovalo, zda je smykově namáhaný viskózní materiál (injektabilní hydrogel) deformován, a zda je schopen se během relaxace (materiál není smykově namáhaný) navrátit do původní struktury, zda je tedy vhodný pro injektabilní aplikace. Při tomto testování byl viskózní hydrogel namáhán a snižovala se jeho viskozita, byl tedy více tekutý. Tixotropní chování bylo potvrzeno při relaxaci, kdy se viskozita materiálu vrací na původní hodnotu. Měření bylo prováděno tixotropní analýzou na Hybridním reometru Discovery 2 (DHR-2) vybaveného Peltierovou regulací teploty s použitím 20 mm geometrie v uspořádání deska-deska v oscilačním módu s mezerou 750 mm. Oscilační tixotropní měření bylo prováděno tříkrokově při konstantní frekvenci 1 Hz a teplotě 22 °C. V prvním kroku byl vzorek po dobu 120 s namáhán řízeným oscilačním napětím s deformací o hodnotě 0,1 %. Druhý krok byl proveden při deformaci 400 % po dobu 120 s. Během třetího kroku docházelo k relaxaci hydrogelu a jeho návratu na původní viskozitu při hodnotě deformace 0,1 % po dobu 600 s. Tato měření byla prováděna v různých časových intervalech v 1 dnu přípravy, po 14 dnech a 2 měsících.
- 25 Tabulka 1: Srovnání výsledků tixotropního chování injektabilního hydrogelu s bakteriofágy v různých časových intervalech.

Označení vzorku	1. den		14. den			2 měsíce			
	Deformace (%)								
	0,1	400	0,1	0,1	400	0,1	0,1	400	0,1
	Komplexní viskozita (Pa·s)								
Příklad A	1,62	0,60	1,39	1,71	0,57	1,2	2,78	0,68	2,20
Příklad B	2,03	0,71	1,58	2,48	0,82	1,9	4,21	1,05	3,63
Příklad 1	2,51	0,73	1,98	1,86	0,70	1,53	1,98	0,61	1,73
Příklad 2	1,62	0,60	1,39	1,34	0,66	1,10	2,18	0,82	1,99

- 30 Z výsledků reologického, tixotropního měření v Tabulce 1 je patrné, že injektabilní hydrogely samotné z Příkladů A a B i s bakteriofágy z Příkladů 1 a 2 mají tixotropní charakter, který je nezbytný pro injektabilní aplikace. Komplexní viskozita vzorku se při deformaci snižuje a vzorek je tekutý. Při následné relaxaci dochází ke zvýšení viskozity, tedy tuhosti gelu, přestože se vzorky nedostávají na původní hodnoty viskozity. Tato skutečnost je pozorována u všech testovaných vzorků ve všech časových intervalech. S delší dobou skladování dochází u všech vzorků ke zvýšení viskozity.

Příklad 6

- 40 Hydrolytická stabilita označovaná jako úbytek hmotnosti hydrogelu byla zkoumána v Příkladech A, B v rámci jednoho měsíce v prostředí fágového pufru obsahujícího vápenaté ionty. Vzorky byly testovány při teplotě 37 °C v inkubátoru v časových intervalech 1, 3, 7, 14 a 28 dní, kdy vzorek dosáhl maximální sorpce vody ve třetím dnu měření, tento den je udáván jako počátek úbytku hmotnosti hydrogelu, všechny vzorky byly měřeny v triplicátech. Úbytek hmotnosti hydrogelu byl vyhodnocen v procentech, kde je porovnávána hodnota maximální sorpce materiálu a jeho následná ztráta hmotnosti pomocí následující rovnice, kde w_{\max} představuje počáteční hmotnost a w_s je hmotnost hydrogelu v daném čase: Úbytek hmotnosti hydrogelu

$$[\%] = 100 - \frac{(w_{max} - w_s) \cdot 100}{w_{max}}$$

Tabulka 2: Srovnání výsledků úbytku hmotnosti jednotlivých vzorků.

Označení příkladu	Čas (dny)			
	3	7	14	30
	Úbytek hmotnosti (%)			
Příklad A	0,00	13,06	15,59	32,87
Příklad B	0,00	7,86	5,35	33,09

5

Z výsledků z Tabulky 2 u Příkladů A a B je patrné, že hydrogel je v hydratovaném prostředí stabilní a své maximální sorpční kapacity dosáhne až po 3 dnech. Poté je injektabilní hydrogel dostatečně stabilní v časovém období 2 týdnů, kde je jeho úbytek hmotnosti v hodnotách 5 až 15 % a jeho stabilita následně klesá k hodnotám 33 % u obou měřených vzorků. Hydrogely jsou vhodné pro

10

Příklad 7

Injektabilní hydrogely obohacené fágovým preparátem z Příkladu 1 a 2 byly podrobeny dlouhodobé analýze (po dobu 3 měsíců), která determinuje jejich antibakteriální aktivitu vůči bakteriálnímu kmenu *Staphylococcus aureus* a zároveň udává informaci o stabilitě fágového preparátu v materiálu během skladování v delším časovém úseku. Měření probíhalo nepřímou metodou stanovení, která je založena na *in vitro* tvorbě plaku, která indikuje počet aktivních bakteriofágů metodou dvouvrstevného agaru. Před začátkem experimentu byly připraveny injektabilní hydrogely z Příkladu 1 a 2 tak, aby pokryly 3- měsíční měření v časových intervalech; den jedna, 14 dní, 2 a 3 měsíce. Všechny materiály byly skladovány v chladu při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, aby byla zachována stabilita fágového preparátu. Pro každý experiment byly vzorky (1 ml) nejprve rozmrazeny, následně bylo přidáno 500 μl masopeptonového bujónu, vzorek byl homogenizován a následně ponechán 30 minut v klidu. Poté byly vzorky ředěny desítkovým ředěním a vyočkovány na Petriho misky s masopeptonovým agarem pro zjištění množství aktivních fágových částic metodou dvojitého agaru. Po kultivaci bylo množství aktivních fágových částic porovnáno s množstvím aktivních částic v původním fágovém preparátu.

25

Tabulka 3: Srovnání výsledků antimikrobiální aktivity a stability fágového preparátu v injektabilním hydrogelu.

30

Označení příkladu	Čas (dny)			
	1	14	60	90
	Koncentrace bakteriofága PFU/ml			
Příklad 1	$2 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^6$
Příklad 2	$5 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^6$

Z Tabulky 3 vyplývá, že fágový preparát z Příkladu 1 a 2 si po celou dobu měření zachovává dostatečnou aktivitu a je schopen efektivně eliminovat stafylokokovou infekci. Nejvyšší koncentrace byla pozorována první den, kdy byly vzorky analyzovány hned po zamražení. Celkově si vyšší aktivitu zachovává bakteriofág v Příkladu 2, ale výsledky jsou srovnatelné. Koncentrace aktivních fágových částic během měření pozvolna klesá, ale i po 3měsíčním měření je koncentrace vyšší než $3 \cdot 10^6$ PFU/ml, která je označována jako dostatečná koncentrace pro léčbu infikovaných ran pomocí fágové terapie.

35

40

Příklad 8

Injektabilní hydrogely z příkladů A a B, a hydrogely obohacené bakteriofágy z příkladů 1 a 2 byly testovány z hlediska biokompatibility, která je nezbytná pro využití ve tkáňovém inženýrství. Pro měření byly použity fibroblastové buňky NIH-3T3. Biokompatibilita injektabilního hydrogelu byla vyhodnocena extrakčním testem, který sledoval účinek výluhových produktů z gelu (polymer a bakteriofágy) na použité buněčné kultury. Všechny typy hydrogelu a kontrola (samotná destička bez gelu) byly inkubovány po dobu 24 hodin s kompletním médiem DMEM v koncentraci 0,033 g/ml při pokojové teplotě. Buňky NIH-3T3 byly před zahájením testu nasazeny do 96jamkové destičky v hustotě 10^4 buněk/jamku. Po 24 hodinách inkubace bylo médium pro kultivaci buněk nahrazeno médiem s extraktem z testovaných injektabilních hydrogelů. Buňky se poté inkubovaly při teplotě 37 °C v atmosféře 5 % CO₂ po dobu 24 hodin. Médium s extraktem bylo následně odstraněno z 96 jamkové destičky a nahrazeno 100 µL čerstvého média DMEM a 50 µl tetrazoliového barviva XTT (XTT, 1 mg/ml v PBS, pH 7,4). Měření metabolické aktivity buněk probíhalo spektroskopickým měřením, kdy byla měřena absorbance po 4 hodinách inkubace při teplotě 37 °C pomocí destičkového readeru při vlnové délce 450 nm. Biokompatibilita gelů byla vyhodnocena jako procento životaschopných buněk ve srovnání s kontrolou.

Tabulka 4: Srovnání výsledků biokompatibility injektabilních hydrogelů a hydrogelů s fágovým preparátem.

Označení příkladu	Viabilita (%)
Kontrola	100,00
Příklad A	86,34
Příklad B	96,11
Příklad 1	84,58
Příklad 2	92,58

Z výsledků v Tabulce 4 vyplývá, že všechny vzorky Příklad A, B, 1 a 2 jsou vysoce biokompatibilní s hodnotami viability nad 84 % v porovnání s kontrolou. Navíc vzorky z Příkladu B a 2, které mají (až na přítomnost fágů) stejné chemické složení, mají viabilitu buněk přes 90 %, což je dělá ideálními pro využití v hojení jak neinfikovaných, tak infikovaných ran.

Příklad 9

In vivo testování na velkém animálním modelu bylo provedeno na Příkladech 3 a 4.

Injektabilní hydrogely na bázi pryskyřice Karaya připravené v příkladech 3 a 4 byly podrobeny testování na chirurgicky preformovaných defektech kůže plné tloušťky velkého animálního modelu (*Sus scrofa f. domestica*) z hlediska antimikrobiální aktivity vůči kmenu *S. aureus* (NRL/Atb 5921) získanému ze Sbírký mikroorganismů Národní referenční laboratoře pro stafylokoky. Bakteriální kmen byl kultivován přes noc v 50 ml Muellerova Hintonova bujónu (Merck, UK) při teplotě 37 °C. Tyto kultury byly poté dvakrát centrifugovány a resuspendovány v čerstvém PBS. Bakteriální kultury byly poté naředěny čerstvým PBS na finální koncentraci 2×10^9 CFU/ml.

Celkem byly do testovaného vzorku zvířat zařazeny 4 reprezentanti (*Sus scrofa f. domestica*), u kterých bylo vytvořeno celkem 80 kožních defektů o rozměrech 5x5 cm (20 defektů na každé zvíře) v oblasti zad simulující ztrátu kůže v plné tloušťce a poškození svalové fascie. Do těchto defektů bylo zavedeno stafylokokové inokulum a byla tak simulována komplikovaná infekce kůže a měkkých tkání tímto patogenem.

Po úspěšném navození infekce byly do těchto defektů aplikovány hydrogelové kryty obsahující fágy popsané ve srovnávacích příkladech 3 a 4. Délka celého experimentu byla 14 dní, během tohoto období došlo k re aplikacím identických hydrogelových krytů (příklad 3 a 4) 4., 7. a 11. den

po samotném navození infekční komplikace v oblasti rány. V těchto dnech probíhala zároveň mikrobiologická surveillance a získané vzorky (kvantitativní biopsie) z ran byly dále zpracovány standardními mikrobiologickými metodami a byla stanovena bakteriální nálož v konkrétních vzorcích.

5

V tabulce 5 je dokumentován terapeutický efekt injektabilních hydrogelů obsahujících fágy popsáných v příkladech 3 a 4 vedoucích k redukci bakteriální populace v konkrétních vzorcích. Statisticky signifikantní léčebný efekt byl zaznamenán 11. a 14. den experimentu ($p < 0,001$).

10 Tabulka 5: Srovnání výsledků antimikrobiální aktivity (stanoveno v CFU/ml \pm SD) aplikovaných injektabilních hydrogelů s fágy v rámci *in vivo* podmínek (simulované infekce kůže a měkkých tkání).

Den experimentu	Den 4	Den 7	Den 11	Den 14
Kontrolní rány	6,1 \pm 0,37	6,4 \pm 1,08	6,8 \pm 0,64	7,2 \pm 0,38
Příklad 3	6,5 \pm 0,93	5,9 \pm 0,15	3,9 \pm 0,39	3,8 \pm 0,64
p-hodnota (kontrola vs. příklad 3)	0,206	0,447	<0,001	<0,001
Příklad 4	7,1 \pm 0,16	5,5 \pm 0,11	4,4 \pm 0,36	4,6 \pm 0,72
p-hodnota (kontrola vs. příklad 4)	0,004	0,104	<0,001	<0,001

15

Průmyslová využitelnost

Technické řešení se týká transparentního, porézního a nevstřebatelného injektovatelného hydrogelu pro podporu hojení kožních ran a zajištění antimikrobiálních vlastností. Tento injektabilní hydrogel je podle technického řešení určen pro klinickou aplikaci přímo na rány v rámci primárního krytí zajišťujícího optimální prostředí pro reepitelizaci. Díky gelové konzistenci umožňuje maximální kontakt s lůžkem rány i u obtížně strukturovaných hlubokých defektů. Dále je možno tento injektabilní hydrogel v případě potřeby také personalizovat z pohledu posílení antimikrobiální kompetence a použít jej jak u ran různé etiologie s vysokým rizikem rozvoje lokálních infekčních komplikací (preventivní administrace) tak u ran s již rozvinutou lokální infekcí (terapeutická administrace).

25

NÁROKY NA OCHRANU

- 5 1. Injektabilní hydrogel pro hojení infikovaných ran, **vyznačující se tím**, že obsahuje přírodní polymer pryskyřici karaya, která je plně deacetylovaná a syntetický polymer polyvinylalkohol a/nebo polyethylenglykol, dále plastifikátor glycerol, vodu a bakteriofágy, přičemž koncentrace polymerů a glycerolu ve vodě je v rozsahu 3 až 9,5 % hmotn., hmotnostní poměr polymerů vůči glycerolu je v rozmezí 10:1 až 1:6, a hmotnostní poměr přírodního polymeru a syntetického polymeru nebo směsi syntetických polymerů je v rozmezí 1,5:1 až 1:1,5.
- 10 2. Injektabilní hydrogel pro hojení infikovaných ran, **vyznačující se tím**, že obsahuje přírodní polymer pryskyřici karaya, která je plně deacetylovaná a syntetický polymer polyvinylalkohol a/nebo polyethylenglykol, dále plastifikátor glycerol, vodu a bakteriofágy, přičemž koncentrace polymerů a glycerolu ve vodě je v rozsahu 3 až 9,5 % hmotn., hmotnostní poměr polymerů vůči glycerolu je v rozmezí 10:1 až 1:6, hmotnostní poměr přírodního polymeru a syntetického polymeru nebo směsi syntetických polymerů je v rozmezí 1,5:1 až 1:1,5, molární hmotnost polyvinylalkoholu je v rozmezí 10 až 130 kg/mol a molární hmotnost polyethylenglykolu je 200 až 600 g/mol.
- 15 3. Injektabilní hydrogel pro hojení infikovaných ran, **vyznačující se tím**, že obsahuje přírodní polymer pryskyřici karaya, která je plně deacetylovaná a syntetický polymer polyvinylalkohol a/nebo polyethylenglykol, dále plastifikátor glycerol, vodu a bakteriofágy, přičemž koncentrace polymerů a glycerolu ve vodě je v rozsahu 3 až 9,5 % hmotn., hmotnostní poměr polymerů vůči glycerolu je v rozmezí 10:1 až 1:6, a hmotnostní poměr přírodního polymeru a syntetického polymeru nebo směsi syntetických polymerů je v rozmezí 1,5:1 až 1:1,5, molární hmotnost polyvinylalkoholu je v rozmezí 10 až 130 kg/mol a molární hmotnost polyethylenglykolu je 200 až 600 g/mol, a bakteriofág je vybrán ze skupiny kmenů fága K, fága Twort, fága 812K1/420, fága philPLA-RODI, fága 187 a fága SA97.
- 20 4. Injektabilní hydrogel pro hojení infikovaných ran, **vyznačující se tím**, že obsahuje přírodní polymer pryskyřici karaya, která je plně deacetylovaná a syntetický polymer polyvinylalkohol a/nebo polyethylenglykol, dále plastifikátor glycerol, vodu a bakteriofágy, přičemž koncentrace polymerů a glycerolu ve vodě je v rozsahu 3 až 9,5 % hmotn., hmotnostní poměr polymerů vůči glycerolu je v rozmezí 10:1 až 1:6, a hmotnostní poměr přírodního polymeru a syntetického polymeru nebo směsi syntetických polymerů je v rozmezí 1,25:1 až 1:1,2, molární hmotnost polyvinylalkoholu je v rozmezí 10 až 130 kg/mol a molární hmotnost polyethylenglykolu je 200 až 600 g/mol, a bakteriofág je vybrán ze skupiny kmenů fága K, fága Twort, fága 812K1/420, fága philPLA-RODI, fága 187 a fága SA97.
- 25 30