

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392674** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2024.01.30

(22) Дата подачи заявки
2022.03.24

(51) Int. Cl. *A61L 15/40* (2006.01)
A61L 15/46 (2006.01)
A61L 15/56 (2006.01)
A61L 26/00 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A61L 27/60 (2006.01)

(54) **ОКРАШЕННОЕ БИОЛОГИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАН,
ОБЕСПЕЧИВАЮЩЕЕ МОНИТОРИНГ ПРОГРЕССА ЗАЖИВЛЕНИЯ**

(31) **63/165,630**

(32) **2021.03.24**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2022/052727**

(87) **WO 2022/201102 2022.09.29**

(71) Заявитель:

КЕРЕСИС ХФ (IS)

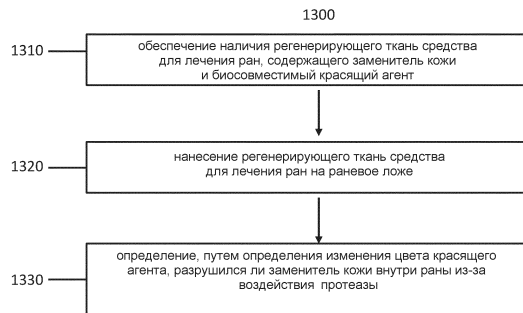
(72) Изобретатель:

**Сигурьонссон Гудмундур Фертрам
(US), Йоханнссон Гуннар (IS)**

(74) Представитель:

Хмара М.В. (RU)

(57) Предложены регенерирующее ткань средство для лечения ран, способ получения регенерирующего ткань средства для лечения ран и способ лечения ран с использованием регенерирующего ткань средства для лечения ран. Указанное регенерирующее ткань средство для лечения ран содержит заменитель кожи и краситель, добавленный к заменителю кожи. Краситель представляет собой биосовместимый краситель, разлагающийся под действием протеазы в обработанной ране.



202392674

A1

A1

202392674

ОКРАШЕННОЕ БИОЛОГИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАН, ОБЕСПЕЧИВАЮЩЕЕ МОНИТОРИНГ ПРОГРЕССА ЗАЖИВЛЕНИЯ

[1] ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5 [2] Настоящая заявка в целом относится к лечению ран и к способам стабилизации, защиты и/или заживления поврежденной ткани. Более конкретно, заявка относится к средствам лечения ран и способам, указывающим, произошло ли вращение в заменитель кожи в результате лечения раны.

10 [3] УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[4] Здоровая кожа выполняет несколько разных функций, включая защиту подлежащих тканей от истирания, микробов, потери воды и от повреждения ультрафиолетовым светом. Нервная система здоровой нормальной кожи обеспечивает тактильные ощущения при прикосновении, давлении и вибрации, 15 тепловые ощущения при тепле и холоде, а также болевые ощущения. Терморегуляция организма зависит от способности кожи потеть и регулировать приток крови к коже, увеличивая или уменьшая потерю тепла. Здоровая кожа включает три различных слоя тканей: тонкий наружный слой клеток, называемый эпидермисом, более толстый 20 средний слой соединительной ткани, называемый дермой, и внутренний подкожный слой. Тонкие наружные слои эпидермиса состоят из уплотненных, ороговевших, мертвых кератиноцитов, образующих барьер для потери воды и проникновения микробов. Мертвые кератиноциты происходят из живых кератиноцитов базального 25 слоя, расположенного над дермой, и отвечают за реэпителизацию кожи. Эпидермис не содержит нервов и кровеносных сосудов и получает воду и питательные вещества 30 путем диффузии из дермы. Дерма, расположенная под эпидермисом, состоит в основном из коллагеновых волокон и некоторых эластических волокон, из которых и те, и другие производятся фибробластами и вместе с водой и крупными молекулами протеогликанов составляют внеклеточный матрикс (ВКМ). Этот кожный слой обеспечивает механическую прочность и является основой для диффузии воды и 35 питательных веществ. Он содержит кровеносные сосуды, нервы, потовые железы, волосяные фолликулы и клетки, участвующие в иммунном функционировании, росте и восстановлении. Подкожный слой состоит из адипоцитов, образующих толстый слой жировой ткани.

[5] Рану можно рассматривать как нарушение структурной и функциональной 35 целостности кожи. Следовательно, термин «рана» может относиться к повреждениям, вызванным, например, разрезом, разрывом и/или разрушением кожи, таким как рваные раны, ссадины, разрезы, проколы, отрывы, ожоги и другие подобные травмы.

[6] После гемостаза, который часто следует за событием появления раны, рана при заживлении проходит следующие основные стадии: воспаление, пролиферацию и ремоделирование. Под хроническими ранами можно понимать раны, которые не смогли пройти нормальный процесс исцеления в аспектах порядка заживления и продолжительности. Хронические раны зачастую остаются в фазе воспаления.

[7] Часто в случае значительных ран (таких как раны, занимающие большие площади, или глубокие раны, большие или тяжелые ожоговые раны или в случае хронических ран), для способствования протеканию процесса заживления или для более скорого восстановления хотя бы некоторых из вышеперечисленных функций здоровой кожи, часто используют заменители кожи. Заменители кожи можно рассматривать в широком смысле как группу средств или материалов, обеспечивающих временную или постоянную окклюзию раны. Заменители кожи, в общем, можно разделить на биологические заменители кожи, синтетические заменители кожи или гибридные заменители кожи, включающие биологические и синтетические заменители кожи.

[8] Биологические заменители кожи часто имеют более интактную структуру внеклеточного матрикса, в то время как синтетические заменители кожи можно синтезировать и модулировать согласно конкретным требованиям и целям. Биологические заменители кожи и синтетические заменители кожи имеют свои преимущества и недостатки. Биологические заменители кожи позволяют создавать более естественную новую дерму и обеспечивают превосходные характеристики реэпителизации благодаря наличию базальной мембраны. Синтетические заменители кожи можно синтезировать химическим образом, и они обладают преимуществом увеличенного контроля над составом каркаса. Синтетические заменители кожи содержат синтетические биослои, включающие, например, синтезированную матрицу на основе коллагена или белка или компоненты на основе коллагена или белка в сочетании с силиконовыми компонентами. Гибридные заменители кожи можно частично синтезировать или создавать посредством живых клеток, а частично синтезировать химическим путем.

[9] Независимо от того, используются ли биологические, синтетические или гибридные заменители кожи, назначение этих заменителей заключается в обеспечении эффективного заживления ран, в надлежащий срок и без рубцов, а также в восстановлении функций кожи до состояния, максимально приближенного к состоянию, предшествовавшему возникновению раны.

[10] Примеры коммерчески доступных синтетических заменителей кожи включают Biobrane®, Dermagraft®, Integra®, Apligraf®, MatriDerm®, OrCel®, Hyalomatrix® и Renoskin®.

[11] В опубликованной американской заявке № 2003/0059460 на изобретение описан гибридный полимерный заменяющий кожу материал, содержащий синтетические и природные полимеры, который можно использовать для регенерации тканей живого организма. Данный гибридный материал содержит сшитый природный полимер и синтетический полимер, способный к биоразложению. Однако производство такого гибридного материала сопряжено с необходимостью выполнения ряда сложных технологических этапов. Кроме того, получающийся гибридный материал содержит как синтетические, так и природные материалы.

[12] Большинство современных продуктов для лечения ран представляют собой так называемые «влажно-высыхающие» повязки для ран, улучшающие заживление ран за счет поддержания надлежащего уровня влажности раны. Такие средства обычно накапливают раневой экссудат и подлежат регулярной замене.

[13] Биологические заменители кожи могут содержать, помимо прочего, кожные трансплантаты, включая аутологичные кожные трансплантаты, сингенные кожные трансплантаты, аллогенные кожные трансплантаты, ксеногенные кожные трансплантаты, такие как трансплантаты кожи свиньи, аллотрансплантаты трупной кожи и трансплантаты амниотической ткани.

[14] Кроме того, в последние годы появился новый класс биологических средств для трансплантации кожи, предназначенных для улучшения микроклимата раны путем снабжения пролиферирующих клеток защитным покровом. Обычно новые средства изготавливают из биологических материалов, содержащих интактный коллаген или восстановленный коллаген. В качестве примера можно назвать такие марки как Oasis, Matristem, Integra и Puracol. Медики часто называют эти продукты матриксными продуктами. Матриксные продукты вводят в рану, где они должны вызвать клеточный рост. Затем поверх раневой повязки накладывают вторичную влажно-высыхающую раневую повязку. Один из примеров матриксного продукта, получаемого из интактной децеллюляризированной рыбьей кожи, описан в американском патенте № 8613957 B2, выданном 24 декабря 2013г. Продукт из децеллюляризированной рыбьей кожи, описанный в этом патенте, служит в качестве каркасного материала, обеспечивающего интактный каркас, способствующий росту эндотелиальных и/или эпителиальных клеток. Децеллюляризованный каркасный материал из рыбьей кожи является биосовместимым, поэтому он может быть интегрирован хозяином. Продукт Omega3 Wound — это коммерчески доступный заменитель кожи, изготовленный из минимально обработанной кожи промысловой атлантической трески, выловленной в районе Исландии. Кожа рыб структурно подобна коже человека и состоит из трех основных слоев, включая эпидермис, дерму и гиподерму, при этом она содержит белки, липиды, жирные кислоты и другие биологически активные соединения, гомологичные коже

человека.

[15] Другие примеры биологических заменителей кожи раскрыты в американском патенте № 6541023, в котором описано применение пористых коллагеновых гелей, полученных из кожи рыб, для использования в качестве каркасов для тканевой инженерии. Приготовление коллагеновых гелей включает измельчение рыбьей кожи. Кроме того, в китайском патенте № 1068703 описан способ подготовки рыбьей кожи для использования при перевязке ожоговых ран, включающий отделение рыбьей кожи от тела рыбы и помещение кожи в консервирующий раствор, содержащий настойку йода, этанол, борнеол, сульфадиазин цинка и соляную кислоту в количествах, достаточных для установления значения pH на уровне 2,5-3. Однако указанными продуктами довольно сложно манипулировать на практике, поскольку продукт по патенту США № 6541023 имеет форму геля, а продукт по патенту Китая № 1068703 содержится в растворе.

[16] Кроме того, ряд продуктов внеклеточного матрикса для использования в медицинских целях был получен из кожи человека (ALLODERM® Regenerative Tissue Matrix (LifeCell)); фетальной бычьей дермы (PRIMATRIX™ Dermal Repair Scaffold (TEI Biosciences)); мочевого пузыря свиньи (MATRISTEM™ Extracellular Matrix Wound Sheet (Medline Industries, Inc.)); и подслизистой оболочки тонкой кишки свиньи (OASIS® Wound Matrix (Healthpoint Ltd.)).

[17] Как отмечено выше, во время заживления рана проходит три основные стадии: воспаление, пролиферацию и ремоделирование. На стадии воспаления организм выделяет в рану протеазы, удаляя тем самым из раны поврежденные ткани и дебрис. В некоторых случаях, когда в рану введен такой заменитель кожи как внеклеточный матрикс, протеазы начинают атаковать этот заменитель и разрушают его, как если бы заменитель кожи представлял собой поврежденную ткань или дебрис. В других случаях заменители кожи, такие как внеклеточный матрикс, функционируют штатным образом, способствуя росту клеток и обеспечивая покров для пролиферирующих новых клеток.

[18] Врачи-клиницисты, использующие матриксные продукты, обычно осматривают рану через 1–3 дня после первоначального нанесения матриксного продукта на раневое ложе. Однако авторы настоящего изобретения выявили существенную проблему, которая заключается в том, что практикующие врачи и специалисты не в состоянии легко и/или точно различать между собой деградировавший заменитель кожи, превратившийся в струп и гной, и заменитель кожи, такой как матрикс, который стал влажным и подвергается клеточному врастанию. Изобретатели обнаружили, что способность различать деградировавший заменитель кожи и заменитель кожи в ране, которая должным образом заживает, т.е. например, в

случае матричного заменителя кожи, через который прорастают клетки, является ключевым фактором для эффективного заживления ран. Если добавленный материал заменителя кожи деградировал, или деградировала его часть, то деградировавший материал заменителя кожи должен быть удален, а рана должна быть промыта для
5 удалення струпа и гноя, которые часто присутствуют в составе разложившегося заменителя кожи. После промывания и удаления струпа и гноя на рану можно нанести новый матриксный материал для ее лечения. Однако если будет установлено, что добавленный матриксный материал должным образом пронизывается в результате вставания клеток, матрикс оставляют на месте, и мониторинг матричного материала
10 продолжают до тех пор, пока рана не заживет должным образом.

[19] При лечении ран с использованием клеточного каркаса, полученного из рыбе́й кожи (например, описанного в патенте США № 8613957, выданном 24 декабря 2013г.), авторы настоящего изобретения обнаружили, что врачи и работники здравоохранения невольно ошибаются или по меньшей мере затрудняются в попытках
15 отличить каркас заживления ран от инфекции. Это может быть связано, по меньшей мере частично, с цветом и/или запахом, присущими каркасу для заживления ран, когда он начинает разрушаться и интегрироваться в окружающую ткань. Иногда он может иметь цвет, схожий с цветом инфицированной ткани (например, при гнойной инфекции). Также он может иметь легкий запах, который иногда можно
20 интерпретировать как запах, подобный запаху инфицированной ткани.

[20] Таким образом, авторы настоящего изобретения установили, что без эффективных и действенных средств по определению того, пронизывается ли заменитель кожи вставанием клеток, требуется осуществлять необязательные действия по удалению или замене повязки для осмотра раны, обнажению раны и
25 повторному наложению заменителя кожи, которые препятствует надлежащему заживлению раны.

[21] Следует добавить, что серьезную проблему при заживлении и лечении ран представляет собой инфекция. Например, в случае боевых ранений инфекция оказывает прямое влияние на заболеваемость и смертность раненых военнослужащих
30 в зоне боевых действий. В трети случаев именно инфекция является причиной длительного лечения и повышенного риска ампутации. Из-за различий в природе повреждения и из-за сложных окружающих условий, боевые ранения склонны к контаминации, что затрудняет лечение. Ранним признаком инфекции является бактериальный дисбаланс в ране. Типовые возбудители инфекции, обнаруживаемые в
35 ране на ранней стадии, включают в себя как грамположительные (G+), так и грамотрицательные (G-) штаммы. В случае инфекции наблюдают появление грамотрицательных бактерий и микроорганизмов с множественной лекарственной

резистентностью (МЛР). Существует острая необходимость в эффективном и немедленном вмешательстве, позволяющем снизить риск заражения, что принесет пользу солдатам и повысит их боевой дух в зоне боевых действий.

[22] Таким образом, авторы настоящего изобретения наметили дополнительную задачу, заключающуюся в том, что помимо предоставления механизма определения того, пронизывается ли заменитель кожи вращением клеток, заменитель кожи может сам по себе подавлять инфекцию или снижать вероятность ее возникновения.

[23] СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[24] В рамках решения вышеобозначенных задач, авторы изобретения раскрывают в настоящей заявке средство для лечения ран, которое является индикатором вращающихся клеток и включает в себя заменитель кожи и добавленный в него краситель. Краситель представляет собой биосовместимый краситель, разлагающийся под воздействием протеазы в обработанной ране.

[25] Кроме того, в заявке предложены способы лечения ран, включающие обеспечение наличия регенерирующей ткани композиции для лечения ран; нанесение указанной композиции на раневое ложе; и определение того, подвергся ли заменитель кожи разрушению в результате воздействия протеазы внутри раны, на основании определения изменения цвета красителя. Указанное регенерирующее средство для лечения ран содержит заменитель кожи и добавленный к заменителю кожи краситель. Краситель представляет собой биосовместимый краситель, разлагающийся под действием протеазы в обработанной ране.

[26] В изобретении предложен Способ получения регенерирующей ткани средства для лечения ран, включающий обеспечение наличия заменителя кожи и добавление к нему красителя. Указанный краситель представляет собой биосовместимый краситель, разлагающийся под действием протеазы в обработанной ране.

[27] Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, заменитель кожи представляет собой биологический заменитель кожи или синтетический заменитель, или гибрид биологических и синтетических заменителей кожи.

[28] Согласно по меньшей мере одному варианту осуществления изобретения, заменитель кожи представляет собой аутологичный кожный трансплантат, сингенный кожный трансплантат, аллогенный кожный трансплантат, ксеногенный кожный трансплантат или синтетический кожный трансплантат.

[29] Согласно по меньшей мере одному варианту осуществления изобретения, заменитель кожи содержит каркасный материал.

[30] Согласно по меньшей мере одному варианту осуществления изобретения,

заменитель кожи содержит каркасный материал, содержащий продукт внеклеточного матрикса.

[31] Согласно по меньшей мере одному варианту осуществления изобретения, продукт внеклеточного матрикса имеет форму частиц, листа или сетки.

5 [32] Согласно по меньшей мере одному варианту осуществления изобретения, заменитель кожи представляет собой каркасный материал, содержащий интактную децеллюляризованную рыбью кожу, содержащую материал внеклеточного матрикса.

[33] Согласно по меньшей мере одному варианту осуществления изобретения, краситель включает тиазиновый краситель или триарилметановый краситель, или 10 комбинацию тиазинового красителя и триарилметанового красителя.

[34] Согласно по меньшей мере одному варианту осуществления изобретения, краситель содержит метиленовый синий (МС) или генцианвиолет (ГВ), или комбинацию метиленового синего (МС) и генцианвиолета (ГВ).

[35] Согласно по меньшей мере одному варианту осуществления изобретения, 15 заменитель кожи подвергают лиофилизации, при этом краситель добавляют к заменителю кожи перед лиофилизацией или повторной лиофилизацией заменителя кожи.

[36] Согласно по меньшей мере одному варианту осуществления изобретения, краситель добавляют к заменителю кожи путем окрашивания заменителя кожи 20 раствором красителя, содержащим от 0,01 до 0,0001 мас.% красителя в деионизированной воде или в фосфатно-солевом буферном растворе.

[37] Согласно по меньшей мере одному варианту осуществления изобретения, краситель характеризуется наличием по меньшей мере одного свойства из антибиотического, антисептического, противомикробного, противовирусного, 25 противогрибкового, противопаразитарного, противовоспалительного и антиоксидантного свойств.

[38] Согласно по меньшей мере одному варианту осуществления изобретения, регенерирующее ткань средство также содержит добавленный активный агент, содержащий по меньшей мере один из антибиотиков, антисептиков, 30 противомикробных, противовирусных, противогрибковых, противопаразитарных, противовоспалительных агентов, антиоксидантов, лекарственных средств, белков, пептидов или их комбинации.

[39] Согласно по меньшей мере одному варианту осуществления изобретения, краситель не вызывает постоянного окрашивания раны при заживлении.

35 [40] Регенерирующие ткань средства и способы регенерации тканей, раскрытые в настоящей заявке, обеспечивают возможность мониторинга процесса заживления раны и предоставляют точные, эффективные и действенные средства для различения

между собой деградировавшего заменителя кожи, нанесенного на рану, и заменителя
кожи, который успешно пронизывается клетками при их врастании. Это позволяет
клиницисту или практикующему врачу легко различать между собой: (1) необходимость
5 промывания раны и удаления неудачно нанесенного заменителя кожи с
сопутствующими струпьями и гноем и (2) возможность оставления на месте
нанесенного заменителя кожи с добавленным к нему красителем, разлагающимся под
воздействием протеазы в обработанной ране. Краситель добавляют к заменителю
кожи, например, на стадии изготовления, причем цвет красителя определяется тем,
что он изменяется, удаляется или разрушается под действием по меньшей мере одной
10 протеазы в обработанной ране.

[41] Данное краткое изложение раскрывает в упрощенной форме принципы
изобретения, которые дополнительно описаны ниже в больших подробностях.
Настоящее краткое изложение не ставит своей целью идентифицировать ключевые или
существенные признаки заявленного объекта и его не следует трактовать как
15 определение объема испрашиваемой правовой охраны изобретения.

[42] Дополнительные признаки и преимущества изобретения изложены в
последующем описании. Они частично становятся очевидными из данного описания
или же могут быть поняты при практическом применении изобретения. Признаки и
преимущества изобретения могут быть получены и реализованы с помощью
20 инструментов и комбинаций, раскрытых в прилагаемой формуле. Эти и другие
особенности настоящего изобретения становятся более очевидными из ознакомления
с последующим описанием и приложенной формулой или же они могут быть поняты
при практическом применении изобретения, как изложено ниже.

[43] Указанные и другие признаки, аспекты и преимущества изобретения
25 становятся более понятными в результате рассмотрения нижеследующего описания,
прилагаемой формулы и сопроводительных фигур.

[44] КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[45] Фиг.1А, 1В, 1С, 1D, 1Е и 1F иллюстрируют варианты предложенного
30 заменителя кожи.

[46] Фиг.2А, 2В, 2С, 2D и 2Е иллюстрируют варианты предложенного
заменителя кожи, выполненного из децеллюляризированной рыбьей кожи.

[47] На фиг.3 показан цветной заменитель кожи, соответствующий одному из
вариантов изобретения.

[48] Фиг.4А, 4В и 4С иллюстрируют различные варианты заявленного
35 окрашенного заменителя кожи.

[49] На фиг.5 показан окрашенный заменитель кожи, соответствующий одному

из вариантов изобретения.

[50] Фиг.6А, 6В, 6С и 6D иллюстрируют протравленный и окрашенный заменители кожи, соответствующие различным вариантам осуществления изобретения.

5 [51] На фиг.7 показаны заявленные цветные заменители кожи, окрашенные при варьировании показателя рН.

[52] На фиг.8 показаны варианты заявленного окрашенного заменителя кожи.

[53] Фиг.9А и 9В иллюстрируют заявленный окрашенный заменитель кожи до и после воздействия коллагеназы.

10 [54] Фиг.10А и 10В изображают рану пациента до и после ее лечения в соответствии с заявленным способом.

[55] Фиг.11А и 11В изображают рану пациента до и после ее лечения в соответствии с заявленным способом.

15 [56] Фиг.12А, 12В, 12С, 12D, 12Е, 12F, 12G, 12Н, 12I, 12J, 12K, 12L и 12M изображают рану пациента до, во время и после ее лечения в соответствии с заявленным способом.

[57] На фиг.13 проиллюстрирован пример заявленного способа лечения раны с использованием регенерирующего ткань средства для лечения раны.

20 [58] Фиг.14А, 14В и 14С изображают результаты анализа ингибирования/снижения количества бактерий, соответствующие настоящему изобретению.

[59] На фиг.15А, 15В и 15С показано сравнение предложенных кожных трансплантатов.

[60] На фиг.16 показан вариант сшитого окрашенного каркасного материала.

25 [61] На фиг.17 показан другой вариант сшитого окрашенного каркасного материала.

[62] На фиг.18 показан другой вариант сшитого окрашенного каркасного материала.

30 [63] На фиг.19А и 19В показано сравнение прочности окраски сшитых окрашенных каркасных материалов.

[64] На фиг.20А, 20В, 20С и 20D показано сравнение прочности окраски сшитых окрашенных каркасных материалов, соответствующих другим вариантам осуществления изобретения.

35 [65] Фигуры чертежей необязательно выполнены в масштабе, но зато они способствуют лучшему пониманию компонентов. Фигуры иллюстрируют примеры выполнения изобретения, но не ограничивают объем его правовой охраны. На фигурах проиллюстрированы примеры заявленного средства для лечения ран, а также

различные его признаки и компоненты.

[66] ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

5 [67] Лучшее понимание различных вариантов настоящего изобретения можно получить из последующего описания, изложенного со ссылкой на сопроводительные фигуры, на которых одинаковые элементы обозначены одинаковыми номерами позиций.

[68] Хотя изобретение допускает самые разные модификации и альтернативные конструкции, упоминаемые ниже фигуры иллюстрируют лишь некоторые его варианты.
10 Следует понимать, что конкретные раскрытые варианты осуществления изобретения не ограничивают объем его правовой охраны, и даже наоборот - все модификации, альтернативные конструкции, комбинации и эквиваленты должны рассматриваться как попадающие в рамки и объем правовых притязаний.

[69] Используемые в заявке номера позиций предоставлены исключительно для
15 удобства и, следовательно, не ограничивают объем охраны или варианты осуществления.

[70] Следует понимать, что если в настоящей заявке явно не определен некий термин, обладающий неким разъясненным значением, то не следует считать, что его смысл ограничивается, прямо или косвенно, чем-то, что выходит за рамки простого или
20 обычного значения этого термина.

[71] Любой признак формулы изобретения, не содержащий в себе явного указания на «средство» для выполнения определенной функции или на «этап» для выполнения конкретной функции, не следует интерпретировать как признак, относящийся к «средству» или «этапу», как это указано в 35 U.S.C §112.

25

[72] Заменитель/заменители кожи

[73] Как описано выше, для способствования заживлению ран и для более быстрого восстановления по меньшей мере некоторых функций здоровой кожи, можно использовать множество заменителей кожи самых разных типов. Под заменителями
30 кожи в широком смысле понимают совокупность элементов или материалов, обеспечивающих временную или постоянную окклюзию раны. Заменители кожи обычно разделяют на биологические заменители кожи, синтетические заменители кожи и гибридные заменители кожи, включающие в себя биологические и синтетические заменители кожи.

35

[74] Примеры таких заменителей кожи показаны на фиг.1А-1F.

[75] На фиг.1А показан пример предложенного заменителя 100 кожи для лечения ран, который содержит измельченные, децеллюляризированные частицы 102

рыбьей кожи первого размера. На фиг.1В показан пример предложенного заменителя 110 кожи для лечения ран, который содержит измельченные, децеллюляризованные частицы 112 рыбьей кожи второго размера. На фиг.1С показан пример предложенного заменителя 120 кожи для лечения ран, который содержит измельченные, децеллюляризованные частицы 122 рыбьей кожи третьего размера. В вариантах, показанных на фиг.1А, 1В и 1С, децеллюляризованный каркасный материал из рыбьей кожи является биосовместимым и, следовательно, может быть интегрирован хозяином. Примером такого коммерчески доступного каркасного материала из децеллюляризованной рыбьей кожи служит продукт Omega3™ Wound от компании Kerecis. Как описано в патенте США № 8613957, его изготавливают из минимально обработанной кожи промысловой атлантической трески.

[76] Другие примеры пригодных к использованию заменителей кожи показаны на фиг.1D, 1E и 1F. На фиг.1D показан пример заменителя 130 кожи, полученного из обработанной кожи рыбы тилапии. Кожный трансплантат на основе тилапии может быть предоставлен в различных размерах, включая большой кожный трансплантат 132, средний кожный трансплантат 134 и небольшой кожный трансплантат 136. На фиг.1E показан пример трансплантатов 140 из свиной кожи, которые включают в себя несетчатый трансплантат 142 из свиной кожи и сетчатый трансплантат 144 из свиной кожи. Дополнительный пример заменителя кожи представлен на фиг.1F, изображающей синтетический заменитель 150 кожи, который в данном случае представляет собой биоинженерный заменитель кожи, образованный из двухслойной ткани 152. В этом неограничивающем примере двухслойная ткань 152 синтетического заменителя 150 кожи дермального слоя представляет собой гель бычьего коллагена типа I, засеянный живыми неонатальными фибробластами человека. Эпидермис представляет собой неонатальные кератиноциты. Клетки активно секретируют факторы роста, цитокины и белки внеклеточного матрикса (ВКМ). Неограничивающий пример такого синтетического заменителя кожи может включать продукт Apligraf™, который можно использовать для лечения язв диабетической стопы и венозных язв голени.

[77] Обратимся теперь к фиг.2А и 2В, на которых в качестве примера показаны фрагменты децеллюляризованной рыбьей кожи 200, 210. На фиг.2А показан типовой кусок децеллюляризованной рыбьей кожи 200, изготовленный, как описано в патенте США № 8613957. Его размер можно оценить в сравнении с руками 202 пользователя, на которые надеты перчатки. Очевидно, что размер децеллюляризованной рыбьей кожи 200 не ограничивает объем правовой охраны, и его можно выполнить или подогнать, или обрезать, чтобы он соответствовал размеру и форме раны, подлежащей лечению. Кроме того, хотя показанная децеллюляризованная рыба

кожа представляет собой не сетчатую рыбью кожу, также может быть использована сетчатая децеллюляризованная рыбья кожа.

5 [78] Следует понимать, что децеллюляризованную рыбью кожу можно измельчать, дробить или иным образом перерабатывать, придавая ей различные размеры и формы. Как показано на фиг.2В, группа листов 210 децеллюляризованной рыбьей кожи может иметь габариты и форму, аналогичные тем, что имеет децеллюляризованная рыбья кожа 200, показанная на фиг.2А (например, прямоугольные), или они могут иметь одинаковые габариты (например, подобно квадрату), такие как листы 220 децеллюляризованной рыбьей кожи, 10 проиллюстрированные на фиг.2В.

[79] Каркас 210, 220 из децеллюляризованной рыбьей кожи, изображенный на фиг.2А и 2В, при нахождении в лиофилизированной форме является по существу жестким и неэластичным. Каркас из децеллюляризованной рыбьей кожи может быть обработан по меньшей мере одним ферментом, повышающим его пластичность и/или 15 эластичность. В некоторых вариантах исполнения ферменты действуют путем расщепления взаимосвязанных компонентов внеклеточного матрикса, не оказывая существенного влияния на лечебные свойства, способствующие предохранению и/или стабилизации ран. В некоторых вариантах ферменты расщепляют ковалентные связи внутри и/или между эластинами, протеогликанами, коллагенами или другими 20 материалами внеклеточного матрикса, но модифицированная децеллюляризованная рыбья кожа сохраняет значительную часть содержимого внеклеточного матрикса, даже если частично удалена из его природной трехмерной структуры.

[80] В некоторых вариантах осуществления изобретения обработка ферментами 25 отрицательно влияет на применение модифицированной децеллюляризованной рыбьей кожи в качестве каркасного материала. Однако следует понимать, что потеря функции каркасного материала, как ни удивительно, не оказывает существенного влияния на использование децеллюляризованной рыбьей кожи в качестве материала для консервации и стабилизации ран. Таким образом, существует 30 возможность повышения пластичности и/или эластичности материала при сохранении состава внеклеточных компонентов, и хотя это может отрицательно повлиять на использование материала в качестве каркаса для заживления ран, модифицированная децеллюляризованная рыбья кожа, тем не менее, может действовать в качестве материала для консервации/стабилизации ран.

35 [81] Децеллюляризованный каркас из рыбьей кожи можно измельчить и предоставить в форме частиц. Следует понимать, что размер отдельных измельченных частиц может варьироваться в зависимости от типа и/или технологии

измельчения. Например, частицы децеллюляризированной рыбьей кожи могут быть созданы посредством струйного измельчения, применяемого для получения частиц с размером меньше заданного. В некоторых вариантах осуществления изобретения децеллюляризованную рыбью кожу разрезают, крошат или мелют на частицы, причем это можно выполнять контролируемым образом, чтобы получать однородные частицы, или выполнять грубо, создавая множество частиц разного размера.

[82] Фиг.2С иллюстрирует пример крупных частиц 232 партикуляризованной или измельченной децеллюляризированной рыбьей кожи 230, полученных в результате измельчения листа каркасного материала из децеллюляризированной рыбьей кожи с помощью измельчителя, например, измельчителя конопли. На фиг.2D показан пример нитяных хлопкоподобных волокон 242 партикуляризованной или измельченной децеллюляризированной рыбьей кожи 240, полученных в результате измельчения листа каркасного материала децеллюляризированной рыбьей кожи с помощью измельчителя, соответствующего вариантам настоящего изобретения. Фиг.2Е изображает пример небольших порошкообразных частиц 252 измельченной децеллюляризированной рыбьей кожи 250, полученных в результате измельчения листа каркасного материала из децеллюляризированной рыбьей кожи с помощью измельчителя, например, измельчителя конопли.

[83] Согласно изобретению, средство для лечения ран представляет собой или содержит партикуляризованные, в частности измельченные, децеллюляризованные частицы рыбьей кожи по меньшей мере одного заданного размера. Партикуляризованные, т.е. измельченные, децеллюляризованные частицы рыбьей кожи предназначены для создания каркасного материала, обеспечивающего миграцию клеток, а также их прилипание, пролиферацию и дифференцировку, для способствования восстановлению и/или замене ткани, как это описано в патенте США № 8613957, выданном 24 декабря 2013 года, соответствующая которому заявка была подана 6 октября 2010 года.

[84] Внеклеточный матрикс (ВКМ-матрикс) позвоночных представляет собой сложную структурную форму, окружающую и поддерживающую клетки. ВКМ-матрикс состоит из сложных смесей структурных белков (наиболее распространенным из которых является коллаген), а также других специализированных белков и протеогликанов. Каркасный материал, раскрытый в данной заявке, представляет собой по существу интактный бесклеточный каркас из натуральных биологических компонентов ВКМ-матрикса из рыбьей кожи. Каркас также может содержать липиды природного происхождения из рыбьей кожи. Нативная трехмерная структура, состав и функция дермального ВКМ-матрикса по существу не изменяются и обеспечивают каркасу возможности миграции, прилипания, пролиферации и дифференцировки

клеток, тем самым способствуя восстановлению и/или замене ткани.

[85] Предложенный каркасный материал получают из интактной рыбьей кожи. В качестве источника рыбьей кожи можно использовать любые виды рыб, включая костных и хрящевых. Например, источником может быть круглая рыба, такая как треска, пикша и сом; плоская рыба, такая как палтус, камбала и морской язык; лососевые, такие как лосось и форель; скумбриевые, такие как тунец; или мелкая рыба, такая как сельдь, анчоусы, макрель и сардины. В некоторых вариантах осуществления изобретения рыбью кожу получают из жирной холодноводной рыбы и/или рыбы, о которой известно, что она содержит большое количество жирных кислот омега-3. Примерами рыбы с высоким содержанием масла омега-3 являются лосось, сардель, тунец, сельдь, треска, сардина, макрель, угольная рыба, корюшка, сиг, рыба хоки и некоторые разновидности форели.

[86] Перед проведением обработки кожу снимают с рыбы. Если рыбья кожа принадлежит виду рыбы, имеющей чешую, ее следует почистить, чтобы удалить значительную часть чешуи или по меньшей мере удалить из чешуи гидроксиапатит. Фразы «значительная часть чешуи удалена» или «по существу свободна от чешуи» означают, что по меньшей мере 95%, предпочтительно по меньшей мере 99% и более предпочтительно 100% чешуи удалено с рыбьей кожи. Рыбья кожа «по существу без чешуи» может также относиться к коже видов рыб, не имеющих чешуи. Чешую удаляют либо перед любыми видами обработки, посредством чисто механического давления (например, с помощью ножа, вибрации с абразивами, давления воды, специализированного устройства для удаления чешуи, которое использует ту же механическую силу, что и ножи, или другого устройства давления, такого как шлифующее керамикой или пластмассой), либо после применения некоторой химической обработки (например, децеллюляризации), после которой применяют механическое давление, чтобы счистить чешуйки. Если кожу рыбы сначала обрабатывают химически и/или ферментативно (например, проводят обработку TRITON® X-100), то механическое давление, как правило, должно быть деликатным, поскольку после децеллюляризации кожа более уязвима к разрывам. Чешуйки можно удалять более чем за один этап, например, проводят частичное удаление до децеллюляризации с последующим дальнейшим удалением во время и/или после децеллюляризации. В альтернативном случае, чешую можно удалять исключительно с помощью химической обработки.

[87] После удаления чешуи рыбью кожу при необходимости замораживают перед децеллюляризацией. Рыбью кожу можно быстро заморозить, выдержав ее в жидком азоте или применив другое специальное оборудование для замораживания, позволяющее заморозить кожу до температуры -70°C или ниже, чтобы сохранить

коллагеновую структуру каркаса. В альтернативном случае, рыбную кожу можно заморозить в морозильной камере обычного типа, которая обычно имеется на рыбном заводе. Процесс замораживания позволяет лизировать или частично лизировать клетки, составляющие интактную кожу рыбы, и способствовать децеллюляризации 5 рыбьей кожи. Если рыбья кожа была заморожена, ее можно впоследствии разморозить для дальнейшей обработки.

[88] Независимо от того, была ли рыба заморожена или нет, перед дальнейшей обработкой ее можно промыть буферным раствором. Например, рыбью кожу можно промыть 1-3 раза буферным раствором, содержащим при необходимости по меньшей 10 мере один антиоксидант (в частности, аскорбиновую кислоту (например, 50 мМ аскорбиновой кислоты), витамины А, С, Е и бета-каротин), антибиотики (например, стрептомицин и пенициллин), протеазы (например, диспазу II) и ингибиторы протеаз (например, антипаин, апротинин, бензамидин, бестатин, DFP, EDTA, EGTA, лейпептин, пепстатин, фосфорамидон и PMSF) для обеспечения дезинфекции и стабилизации 15 рыбьей кожи. Буферный раствор может иметь показатель pH, составляющий по меньшей мере 5,5, например 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения pH составляет от 7,0 до 9,0, например от 7,5 до 8,5. Буферный раствор также можно использовать в качестве среды, в которой рыбья кожа может храниться сроком от нескольких дней до 20 нескольких недель и более. В некоторых вариантах осуществления изобретения рыбью кожу хранят в буферном растворе при температуре около 4°C.

[89] После замораживания и/или промывания, и/или выдерживания в буферном растворе рыбью кожу обрабатывают по меньшей мере одним децеллюляризирующим раствором, чтобы удалить из рыбьей кожи клеточный материал, включая антигенный 25 материал, с минимальным повреждением или вообще без повреждения механической и структурной целостности и биологической активности природного внеклеточного матрикса.

[90] Термины «внеклеточный матрикс» или «ВКМ», используемые в настоящей заявке, относятся к неклеточному тканевому материалу, присутствующему в рыбьей 30 коже, который обеспечивает клеткам кожи структурную поддержку и выполняет другие важные функции. Упомянутый в заявке ВКМ-матрикс при необходимости включает матричный материал, составленный или полностью преобразованный из экстрагированных, очищенных или отделенных компонентов ВКМ (например, коллагена). Но в некоторых вариантах осуществления изобретения ВКМ-матрикс, 35 используемый в качестве заменителя кожи, все-таки может включать матриксный материал, составленный или полностью преобразованный из экстрагированных, очищенных или отделенных компонентов ВКМ (например, коллагена).

[91] Термины «бесклеточный», «децеллюляризованный», «децеллюляризованная рыба кожа» и т.п., используемые в настоящей заявке, относятся к рыба коже, из которой удалено значительное количество клеточного и нуклеинового кислотного содержимого, но оставлена сложная трехмерная
5 интерстициальная структура ВКМ. Согласно изобретению, «децеллюляризованная рыба кожа» может дополнительно обозначать рыба кожу, которая, помимо сложной трехмерной интерстициальной структуры ВКМ, не имеющей значительного количества клеточных и нуклеиновых кислот, включает полиненасыщенные жирные кислоты омега-3 (ПНЖК-кислоты).

10 [92] «Децеллюляризирующие агенты» представляют собой те агенты, которые эффективны при удалении значительного количества клеточного и нуклеинового кислотного содержимого из ВКМ. ВКМ-матрикс является «децеллюляризованным» или «по существу свободным» от клеток и нуклеиновых кислот (т.е. из него удалено их «значительное количество»), когда из него удалено по меньшей мере 50%
15 жизнеспособных и нежизнеспособных нуклеиновых кислот и другого клеточного материала. Некоторые варианты осуществления изобретения характеризуются тем, что удалено около 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5% или 100% жизнеспособных и нежизнеспособных нуклеиновых кислот и клеточного материала. Децеллюляризацию можно проверить,
20 например, протестировав обработанную рыба кожу на содержание ДНК. Удаление нуклеиновых кислот из ВКМ можно определить, например, посредством гистологического исследования ВКМ и/или биохимического анализа, такого как анализ PICOGREEN®, анализ дифениламина или ПЦР.

[93] Децеллюляризация разрушает клеточные мембраны и высвобождает
25 клеточное содержимое. Децеллюляризация может включать по меньшей мере одну физическую обработку, по меньшей мере одну химическую обработку, по меньшей мере одну ферментативную обработку или любую их комбинацию. Примерами физической обработки являются обработка ультразвуком, механическое перемешивание, механический массаж, механическое давление и
30 замораживание/размораживание. Примерами химических децеллюляризирующих агентов являются ионные соли (например, азид натрия), основания, кислоты, детергенты (например, неионогенные и ионные детергенты), окислители (например, перекись водорода и пероксикислоты), гипотонические растворы, гипертонические растворы, хелатирующие агенты (например, ЭДТА и ЭГТА), органические
35 растворители (например, три(н-бутил)фосфат), аскорбиновая кислота, метионин, цистеин, малеиновая кислота и полимеры, которые связываются с ДНК (например, поли-L-лизин, полиэтиленимин (ПЭИ) и полиамидоамин. (ПАМАМ)). Неионогенные

детергенты включают 4-(1,1,3,3-Тетраметилбутил)фенилполиэтиленгликоль, т-октилфеноксиполиэтоксизтанол, трет-октилфениловый эфир полиэтиленгликоля (TRITON® X-100) (Dow Chemical Co.). Ионные детергенты включают додецилсульфат натрия (SDS), дезоксихолат натрия, TRITON® X-200 и цвиттерионные детергенты (например, CHAPS). Другие подходящие децеллюляризирующие детергенты включают моноолеат полиоксиэтилен(20)сорбитана и моноолеат полиоксиэтилен(80)сорбитана (Твин 20 и 80), 3-[(3-хлорамидопропил)диметиламино]-1-пропансульфонат, октилглюкозид и додецилсульфат натрия. Примерами ферментативных децеллюляризирующих агентов являются протеазы, эндонуклеазы и экзонуклеазы. Протеазы включают сериновые протеазы (например, трипсин), треониновые протеазы, цистеиновые протеазы, аспартатные протеазы, металлопротеазы (например, термолизин) и протеазы глутаминовой кислоты. Децеллюляризацию обычно проводят при pH, составляющем по меньшей мере 5,5, например 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения показатель pH составляет от 7,0 до 9,0, например от 7,5 до 8,5.

[94] Один из примеров этапа децеллюляризации заключается в выдерживании рыбьей кожи в растворе, содержащем 1 М NaCl, 2% дезоксихолевой кислоты, 0,02% азиды натрия и 500 частей на миллион стрептомицина. В другом примере рыбью кожу выдерживают в первом децеллюляризирующем растворе, содержащем протеазу (например, 2,5 ед/мл диспазы II) и другие компоненты (например, 0,02% азиды натрия). Первый децеллюляризирующий раствор сливают, и затем обрабатывают рыбью кожу вторым децеллюляризирующим раствором, таким как раствор, содержащий детергент (например, 0,5% TRITON® X-100) и другие компоненты (например, 0,02% азиды натрия). В другом примере рыбью кожу сначала обрабатывают децеллюляризирующим раствором, содержащим детергент (например, 0,5% TRITON® X-100) и другие компоненты (например, 0,02% ЭДТА, азид натрия и/или дезоксиголевую кислоту), а затем выдерживают во втором децеллюляризирующем растворе, содержащем детергент, такой как SDS.

[95] Рыбью кожу можно выдерживать или не выдерживать при осуществлении встряхивания. Этап (этапы) децеллюляризации можно повторять по мере необходимости, сливая весь оставшийся децеллюляризирующий раствор и при необходимости промывая рыбью кожу буферным раствором (например, сбалансированным солевым раствором Хэнка), а затем снова обрабатывая рыбью кожу на другом этапе децеллюляризации. После удаления достаточного количества клеточного материала децеллюляризирующий раствор можно удалить (например, путем аспирации или осторожного выливания).

[96] После децеллюляризации рыбью кожу можно при необходимости промыть

водой, буферным раствором и/или соляным раствором. Примеры подходящих промывочных растворов включают фосфатно-солевой буфер Дульбекко (ФСБД), сбалансированный солевой раствор Хэнка (ССРХ), Medium 199 (M199, SAFC Biosciences, Inc.) и/или L-глутамин. Этап (этапы) промывки обычно проводят при pH, составляющем по меньшей мере 5,5, например 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения pH составляет от 7,0 до 9,0, например от 7,5 до 8,5.

[97] Рыбью кожу можно при необходимости отбелить для улучшения внешнего вида конечного продукта. Отбеливание можно проводить до, после и/или во время децеллюляризации. Например, по меньшей мере один отбеливающий агент можно включить в по меньшей мере один раствор для децеллюляризации и/или в по меньшей мере один буферный раствор. Примеры отбеливающих агентов включают сульфит натрия, перекись водорода, персульфат аммония, персульфат калия и персульфат натрия. В некоторых вариантах осуществления изобретения, если используется сильный отбеливающий агент, такой как персульфат (персульфаты), отбеливание и децеллюляризацию можно объединить в один этап, включающий выдерживание рыбьей кожи в смеси из по меньшей мере одного отбеливающего агента, загустителей и источников пероксида. Например, можно приготовить сухую отбеливающую смесь (см., например, «отбеливающие смеси», описанные в Примере 5), а затем добавить к этой сухой смеси воду, перекись водорода или их комбинацию, образовав тем самым отбеливающий раствор, который также может быть достаточен для осуществления децеллюляризации. Отбеливающие вещества (например, сульфит натрия, перекись водорода, персульфат аммония, персульфат калия и персульфат натрия) должны составлять около 40–60% от массы сухой смеси. К смеси можно добавить комбинацию ЭДТА и персульфатов для ускорения отбеливания и децеллюляризации.

[98] В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация ЭДТА в сухой смеси составляет около 0,25–5% в массовом соотношении. Перекись водорода может составлять около 15–25% смеси; источником пероксида может быть перкарбонат натрия и перкарбонат калия. В качестве источника пероксида также можно использовать пергидрат фосфата натрия и карбонат натрия или метасиликат магния и силикат кремния. Сухая смесь может также включать диоксид кремния и гидратированный диоксид кремния, например, 1-10% в массовом соотношении, и при необходимости по меньшей мере один стеарат (например, стеарат аммония, стеарат натрия и/или стеарат магния). Кроме того, сухая смесь может при необходимости включать загустители, такие как гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксиэтилцеллюлоза, альгин (т.е. альгинат), органические камеди (например, целлюлозу, ксантановую камедь), метасиликат натрия и их комбинации, которые

увеличивают вязкость раствора для отбеливания/децеллюляризации и защищают белковые волокна от повреждений. Отбеливание и/или отбеливание, скомбинированное с децеллюляризацией, обычно проводят при pH, составляющем по меньшей мере 5,5, например 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения pH составляет от 7,0 до 9,0, например от 7,5 до 8,5. После отбеливания и/или отбеливания, скомбинированного с децеллюляризацией, рыбу кожу при необходимости промывают раствором, содержащим L-глутамин, при условиях pH, описанных выше.

[99] В некоторых вариантах осуществления изобретения рыбу кожу обрабатывают расщепляющим ферментом. Подобно отбеливанию, расщепление можно проводить до, после и/или во время децеллюляризации. Подходящие ферменты включают протеазы, например сериновые протеазы, треониновые протеазы, цистеиновые протеазы, аспартат-протеазы, металлопротеазы и протеазы глутаминовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления изобретения пищеварительный фермент представляет собой сериновую протеазу, такую как трипсин. Расщепляющий фермент может представлять собой фермент, который действует в щелочной среде, ограничивает образование поперечных связей внутри ВКМ и смягчает кожу рыбы. Расщепление обычно проводят при pH по меньшей мере 5,5, например 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения pH составляет от 7,0 до 9,0, например от 7,5 до 8,5.

[100] Децеллюляризованную рыбу кожу при необходимости подвергают криоконсервации. Криоконсервация может включать погружение рыбьей кожи в криопротекторный раствор перед замораживанием. Криопротекторный раствор обычно содержит подходящий буфер, по меньшей мере один криопротектор и при необходимости растворитель, например органический растворитель, который в сочетании с водой подвергается минимальному расширению и сжатию. Примеры криопротекторов включают сахарозу, раффинозу, декстран, трегалозу, диметилацетамид, этиметилсульфоксид, этиленгликоль, глицерин, пропиленгликоль, 2-метил-2,4-пантандиал, некоторые антифризные белки и пептиды и их комбинации. В альтернативном случае, если децеллюляризованную рыбу кожу перед сублимацией подвергают быстрой заморозке (мгновенной заморозке), чтобы свести к минимуму образование кристаллов льда во время стадии замораживания, кожу при необходимости можно заморозить в буферном растворе, не содержащем криопротекторов. Криоконсервацию обычно проводят при pH, составляющем по меньшей мере 5,5, например 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 или более. В некоторых вариантах осуществления изобретения pH составляет от 7,0 до 9,0, например от 7,5 до 8,5.

[101] Децеллюляризованная рыбья кожа может быть упакована в стерильный контейнер, например, пакет или стеклянный флакон. В одном варианте используют пакет TYVEK®. Например, рыбью кожу можно выдержать в растворе криопротектора, упаковать в пакет TYVEK®, а затем поместить в сублимационную сушилку и заморозить со скоростью, соответствующей криопротектору.

[102] Децеллюляризованную рыбью кожу можно лиофилизировать (т.е. замораживать при низкой температуре и в условиях вакуума) таким образом, что вода будет последовательно удаляться из каждой фазы кристаллов льда без повторной кристаллизации льда. Во время лиофилизации воду обычно удаляют сначала сублимацией, а затем, при необходимости, десорбцией. Еще одним методом удаления лишней воды после обработки и перед стерилизацией является вакуумное прессование.

[103] В некоторых вариантах осуществления изобретения децеллюляризованную рыбью кожу стерилизуют до и/или после замораживания. Различные способы стерилизации хорошо известны в данной области техники. Например, децеллюляризованную рыбью кожу можно поместить в камеру с оксидом этилена и обработать оксидом этилена подходящими циклами. Другие методы стерилизации включают стерилизацию озоном, диоксидом углерода, газообразным формальдегидом или радиацией (например, гамма-излучением, рентгеновскими лучами, обработкой электронным лучом и субатомными частицами).

[104] В качестве альтернативы или в дополнение к замораживанию, сублимационной сушке и/или вакуумному прессованию воды, децеллюляризованную рыбью кожу можно консервировать в неводном растворе, таком как спирт.

[105] Полученный продукт (каркасный материал) представляет собой стерильную матрицу на основе коллагена, обладающую свойствами, которые могут способствовать регенерации, восстановлению и/или замене ткани (например, восстановлению, регенерации и/или росту эндогенной ткани). Термин «каркасный материал» в контексте рыбьей кожи относится к материалу, содержащему рыбью кожу, которая была децеллюляризована и, при необходимости, отбелена, расщеплена, лиофилирована и т.д., как обсуждалось выше. Каркасный материал может использоваться для создания интактного каркаса, поддерживающего эндотелиальные и/или эпителиальные клетки, и способен интегрироваться хозяином. Он является биосовместимым, не подвержен существенной кальцификации и может храниться и транспортироваться при температуре окружающей среды. Фраза «интегрированный хозяином» означает в данной заявке, что клетки и ткани пациента, в отношении которого ведется лечение с использованием каркасного материала, могут врастать в каркасный материал и что каркасный материал фактически

интегрируется/абсорбируется в тело пациента. Термин «биосовместимый» относится к материалу, который по существу нетоксичен в среде *in vivo* его предполагаемого использования и который по существу не отторгается физиологической системой пациента (т.е. не является антигенным).

5 [106] Это качество можно оценить по способности материала проходить тесты на биосовместимость, приведенные в стандарте № 10993 Международной
Организации по Стандартизации (ISO) и/или Фармакопее 23 США (USP) и/или
документе № G95-1 «Синей книги» Управления по Контролю за Продуктами и
Лекарствами США (FDA) озаглавленном «Использование международного стандарта
10 ISO-10993, Биологическая оценка медицинских изделий. Часть 1: Оценка и
тестирование». Обычно эти тесты измеряют токсичность, инфекционность,
пирогенность, способность оказывать раздражающее воздействие, реакционную
способность, гемолитическую активность, канцерогенность и/или иммуногенность
материала. Биосовместимая структура или материал при введении большинству
15 пациентов не вызывает существенной неблагоприятной, длительной или
усиливающейся биологической реакции или ответа и отличается от легкого
преходящего воспаления, которое обычно сопровождает хирургическое
вмешательство или имплантацию инородных предметов в живой организм.

[107] Каркасный материал содержит белки из внеклеточного матрикса (ВКМ)
20 рыбьей кожи. Компоненты ВКМ в каркасном материале могут включать, например,
структурные белки; адгезивные гликопротеины; протеогликаны; непротеогликановые
полисахариды; и матриклеточные белки. Примеры структурных белков включают
коллагены (наиболее распространенный белок в ВКМ), такие как фибриллярные
коллагены (типы I, II, III, V и XI); фаситные коллагены (типы IX, XII и XIV),
25 короткоцепочечные коллагены (типы VIII и X), коллаген базальной мембраны (тип IV) и
другие коллагены (типы VI, VII и XIII); эластин; и ламинин. Примеры адгезивных
гликопротеинов включают фибронектин; тенасцины; и тромбоспондин. Примеры
протеогликанов включают сульфат гепарина; сульфат хондроитина; и кератансульфат.
Примером непротеогликанового полисахарида является гиалуроновая кислота.
30 Матриклеточные белки представляют собой структурно разнообразную группу
внеклеточных белков, которые регулируют функции клеток посредством
взаимодействия с рецепторами клеточной поверхности, цитокинами, факторами роста,
протеазами и ВКМ. Примеры включают тромбоспондины (TSP) 1 и 2; тенасцины; и
SPARC (секретируемый белок, кислый и богатый цистеином).

35 [108] В некоторых вариантах осуществления изобретения децеллюляризация (и
другие необязательные этапы обработки) удаляют не все встречающиеся в природе
липиды из липидного слоя рыбьей кожи. Таким образом, каркасный материал может

содержать по меньшей мере один липид рыбьей кожи, в частности, липидного слоя рыбьей кожи. Например, каркасный материал может включать до примерно 25% липидов в массовом отношении (от сухой массы всего каркасного материала после лиофилизации), например 0,1%, 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23% или 24% липидов в массовом отношении. Присутствие липидов в каркасном материале можно проверить, например, при помощи экстракции органическим растворителем с последующей хроматографией. Примеры подходящих органических растворителей включают ацетон и хлороформ.

10 [109] Липиды в каркасном материале могут включать, например, жирные ацилы (т.е. жирные кислоты, их конъюгаты и производные); глицеролипиды; глицерофосфолипиды (т.е. фосфолипиды); сфинголипиды; сахаролипиды; поликетиды; стероловые липиды (т.е. стерины); некоторые жирорастворимые 15 витамины; преноловые липиды; и/или поликетиды. Примеры жирных ацилов включают насыщенные жирные кислоты, такие как полиненасыщенные жирные кислоты; жирные эфиры; жирные амиды; и эйкозаноиды. В некоторых вариантах осуществления изобретения жирные кислоты включают жирные кислоты омега-3, такие как эйкозапентаеновая кислота (EPA) и докозагексаеновая кислота (DHA) (в высокой концентрации обнаруженная в рыбьем жире). Другие жирные кислоты, содержащиеся в 20 рыбьем жире, включают арахидиновую кислоту, гадолеиновую кислоту, арахидоновую кислоту, масляную кислоту, капроновую кислоту, каприловую кислоту, каприновую кислоту, лауриновую кислоту, миристиновую кислоту, пальмитиновую кислоту, пальмитолеиновую кислоту, стеариновую кислоту, олеиновую кислоту, вакценовую кислоту, линолевую кислоту, альфа-линоленовую кислоту, гамма-линоленовую 25 кислоту, бегеновую кислоту, эруковую кислоту и лигноцериновую кислоту. Примеры глицеролипидов включают моно-, ди- и тризамещенные глицерины, такие как моноацилглицерины, диацилглицерины и триацилглицерины (т.е. моноглицериды, диглицериды и триглицериды). Примеры глицерофосфолипидов включают фосфатидилхолин; фосфатидилэтаноламин; и фосфатидилсерин. Примеры сфинголипидов включают фосфосфинголипиды и гликофинголипиды. Примеры 30 стероловых липидов включают холестерин; стероиды; и секостероиды (различные формы витамина D). Примеры преноловых липидов включают изопреноиды; каротиноиды; и хиноны и гидрохиноны, такие как витамины E и K.

35 [110] Каркасный материал может содержать по меньшей мере один добавленный активный агент (т.е. агент, который добавляют во время или после обработки каркасного материала), такой как антибиотик, антисептик, противомикробное средство, противовирусное, противогрибковое,

противопаразитарное и противовоспалительное средство. Указанный активный ингредиент может представлять собой соединение или композицию, облегчающие уход за ранами и/или способствующие заживлению тканей, например, антиоксидант или лекарственное средство. Это также может быть белок или белки и/или другие биологические препараты. Антибиотики, антисептики и противомикробные агенты могут быть добавлены в количестве, достаточном для придания каркасному материалу эффективных противомикробных свойств. В некоторых вариантах осуществления изобретения противомикробный агент представляет собой по меньшей мере один противомикробный металл, такой как серебро, золото, платина, медь, цинк или их комбинацию. Например, серебро можно добавить в каркасный материал во время обработки в ионной, металлической, элементарной и/или коллоидной форме. Серебро также можно использовать в сочетании с другими противомикробными препаратами. Противовоспалительные агенты могут быть добавлены в количестве, достаточном для уменьшения и/или ингибирования воспаления в области раны или ткани, на которую наносят каркасный материал.

[111] Каркасный материал можно использовать в высушенном виде. В альтернативном случае, каркасный материал можно регидратировать перед использованием. В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько каркасных материалов ламинируют друг с другом с образованием более толстого каркасного материала.

[112] Обычно каркасный материал имеет толщину примерно от 0,1 до 4,0 мм (в поперечном сечении), например, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0 или 3,5 мм. Толщина может зависеть от ряда факторов, включая вид рыбы, использованной в качестве исходного материала, обработку, лиофилизацию и/или регидратацию. Конечно, толщина пропорционально увеличивается, если изделие содержит более одного слоя каркасного материала.

[113] В предпочтительном случае измельченные децеллюляризованные частицы рыбьей кожи для лечения ран и варианты предложенного способа позволяют получить стерильную матрицу на основе коллагена, которая обладает свойствами, способствующими регенерации, восстановлению и/или росту ткани, такой как эндогенная ткань, и которая при этом выполнена с возможностью формирования по ране или добавления к ней, чтобы лучше соответствовать геометрии раны. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, измельченные, децеллюляризованные частицы рыбьей кожи выполнены с возможностью помещения внутрь раны, такой как подрытая или туннельная рана, способами, которые неприменимы в случае использования листовых материалов. Таким образом, измельченные децеллюляризованные частицы рыбьей кожи могут быть выполнены с

возможностью стимулирования интеграции, благодаря тому, что клетки и ткани пациента, в отношении которого проводят лечение с использованием каркасного материала, могут врастать в каркасный материал, а также тому, что каркасный материал фактически интегрируется/абсорбируется в организм пациента.

5 [114] Согласно изобретению, измельченные децеллюляризованные частицы рыбьей кожи могут быть выполнены с возможностью активного стимулирования заживления ран в качестве физического каркаса для проникновения в клетки, участвующие в заживлении/восстановлении ран, например, для врастания клеток и реваскуляризации. В предпочтительном случае, измельченные 10 децеллюляризованные частицы рыбьей кожи для лечения ран выполнены с возможностью сохранения трехмерной («3D») структуры децеллюляризованной рыбьей кожи с внеклеточным матриксом («ВКМ»), которая распознается, например, посредством гистологического анализа. Размеры измельченных частиц децеллюляризованной рыбьей кожи могут быть дополнительно подобраны таким 15 образом, чтобы облегчить формование, внедрение или иное нанесение измельченных частиц децеллюляризованной рыбьей кожи в полость раны с большей точностью, чем у известных способов лечения ран.

[115] Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, измельченные частицы децеллюляризованной рыбьей кожи имеют наибольший 20 размер в границах заданных максимальной пороговой величины и минимальной пороговой величины, который эффективен для сохранения матричной структуры децеллюляризованной рыбьей кожи и способствует регенеративному врастанию клеток в рану. Говоря другими словами, наибольший размер, такой как наибольший размер в длину, ширину и/или толщину измельченных децеллюляризованных частиц 25 рыбьей кожи, может быть меньше максимального размера, например, в 1 мм, но больше минимального размера, например, размера, при котором ВКМ разрушается. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, измельченные децеллюляризованные частицы рыбьей кожи получают путем использования листа децеллюляризованной рыбьей кожи, такого как описан выше, измельчения этого листа 30 децеллюляризованной рыбьей кожи и, при необходимости, отсеивания измельченных частиц до тех пор, пока измельченные децеллюляризованные частицы рыбьей кожи не окажутся в пределах заданных минимальных и максимальных пороговых значений размера.

35 [116] Измельченные децеллюляризованные частицы рыбьей кожи могут быть также выполнены с возможностью противостоять силам сдвига благодаря своим размерам, что позволяет измельченным децеллюляризованным частицам рыбьей кожи обеспечивать улучшенное лечение ран пациентов, которые перемещаются или

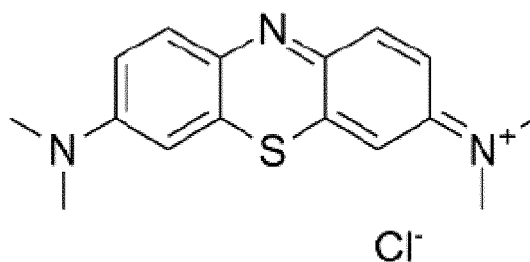
являются перемещаемыми между разными локациями или местами, или во время обычной деятельности пациента во время выздоровления, такой как ходьба.

[117] Согласно изобретению, измельченные децеллюляризованные частицы рыбьей кожи можно с успехом наносить местно и/или имплантировать в рану, чтобы обеспечить каркас для врастания клеток и реваскуляризации, с достижением при этом дополнительных преимуществ тканевого каркаса, таких как противовоспалительный барьер, восстановление мягких тканей, предотвращение растрескивания и других.

[118] Краситель (красители)

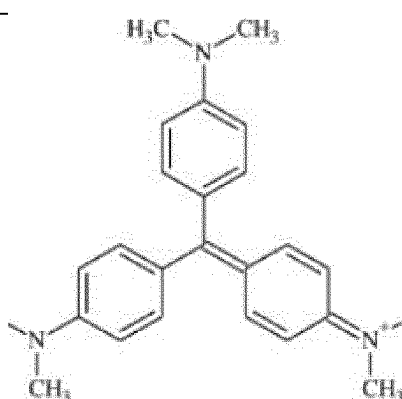
[119] Изобретение допускает использование разных вариантов красителя. В самом широком смысле рассматриваемый в данной заявке краситель представляет собой краситель или комбинацию красок или красителей, придающих такой цвет заменителю кожи, который меняется или пропадает в зависимости от изменений условий внутри раны во время процесса заживления или во время изменений в заместителе кожи. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения краситель разлагается при воздействии на него по меньшей мере одной протеазы внутри раны. При использовании такого красителя он теряет свой цвет во время разложения под действием одной или нескольких протеаз. Например, краситель может придавать заместителю кожи синий или фиолетовый цвет. Но при воздействии по меньшей мере одной протеазы внутри раны после нанесения средства для лечения ран, включающего заместитель кожи и краситель, цвет заместителя кожи этого средства для лечения ран ослабевает или теряется, в результате чего цвет нанесенного средства для лечения ран меняется на исходный цвет заместителя кожи или на другой цвет. Но изменение цвета красителя не ограничивается указанным и может включать в себя искажение цвета при изменении состояния внутри раны. Например, цвет, обеспечиваемый красителем, может иницироваться таким образом, что исходный цвет заместителя кожи не изменяется при нанесении или добавлении красителя. Но изменение цвета красителя может быть вызвано или иницировано изменением условий внутри раны, в результате чего заместитель кожи средства для лечения ран приобретает новый цвет или цвет, отличный от исходного цвета заместителя кожи.

[120] В качестве красителя можно использовать красители. Предпочтительным примером красителя является тиазиновый краситель, такой как метиленовый синий (МС). Структура метиленового синего (МС) представлена ниже:



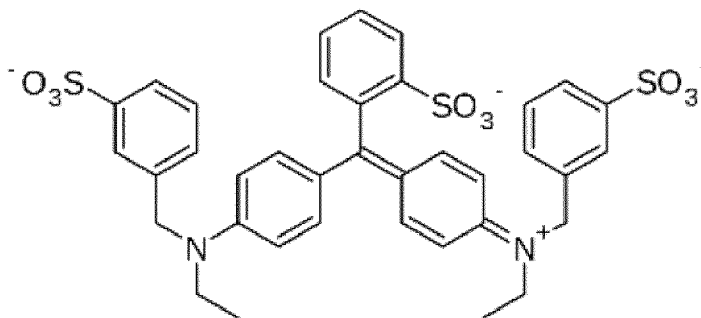
[121] Метиленовый синий (МС) также называют хлоридом метилтиониния или basic blue 9. МС представляет собой катионный тиазиновый краситель, используемый в различных областях, таких как окраска тканей, медицина и научные исследования. Его применяют при лечении метгемоглобинемии в дозе до 2 мг/кг в течение нескольких часов.

[122] Другой вариант красителя - триарилметановый краситель. Примером предпочтительного триарилметанового красителя является генцианвиолет (ГВ), имеющий следующую структуру:



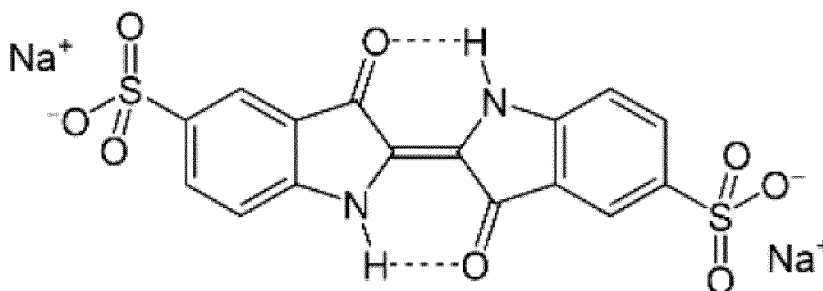
[123] Генцианвиолет (ГВ) также известен как кристаллический фиолетовый, метилвиолет 10В или хлорид гексаметилпарарозанилина. Он представляет собой триарилметановый краситель, обычно используемый для гистологического окрашивания по методу Грама. Топический генцианвиолет (ГВ) используется для лечения определенных типов грибковых инфекций полости рта (молочницы) и кожи.

[124] Другим вариантом красителя является бриллиантовый синий FCF (BB-FCF), имеющий следующую структуру:



[125] Бриллиантовый синий FCF (BB-FCF), который также называют Blue #1, представляет собой триарилметановый краситель, используемый в основном в качестве синего красителя для обработанных пищевых продуктов, лекарств, пищевых добавок и косметики. Он представляет собой одну из старейших красящих добавок, одобренных законом управления FDA, которая обычно считается нетоксичной и безопасной.

[126] Другим вариантом красителя является индигокармин (ИК), имеющий следующую структуру:



10

[127] Индигокармин (ИК), который также называют food blue 1, представляет собой органическую соль, полученную из индиго путем ароматического сульфирования, что делает соединение растворимым в воде. Он имеет синий цвет при pH ниже 11,4 и желтый выше 13,0, а также может использоваться в качестве окислительно-восстановительного индикатора, становящегося желтым при восстановлении.

[128] Авторы изобретения допускают использование и других красящих веществ или смесей, включая следующие.

[129] Порошок вайи (HUE-3023), представляющий собой краситель для шерсти, предложенный компанией The Woolery и имеющий INCI (международная номенклатура косметических ингредиентов от англ. «International Nomenclature of Cosmetic Ingredients») экстракта вайи. Это широко используемый химический краситель для пряжи и одежды, который обычно применяют при окраске в щелочной среде. Порошок вайи можно считать целесообразным красителем из-за его способности к связыванию с кератиновым белком.

25

[130] Красящая зеленая добавка D&C Green #5 Powder AN0725 изготовлена из натуральных материалов и обычно используется в косметических продуктах. Эта красящая добавка имеет обозначение INCI «Green #5». Порошок представляет собой краситель на водной основе, имеющий форму сухого порошка. Его выбирают в качестве красителя из-за его типичного косметического цвета на водной основе в форме порошка.

[131] Цветная добавка Ultra Marine Blue H9-03R1 используется в косметических продуктах, включая макияж глаз, мыло, лосьоны (но не в продуктах для губ). Эта красящая добавка основана на натуральных материалах и имеет название INCI Ultramarine Na₆Al₆Si₆O₂₄S₄. Эта цветная добавка может представлять собой диспергируемый в масле пигмент, не растворяющийся в воде или масле и имеющий номер CAS: 57455-37-5. Это сильный краситель, и его можно выбрать в качестве красителя, поскольку он считается очень эффективным в косметике и не растворяется в воде или масле после добавления в косметику. Однако эта красящая добавка может содержать остатки нежелательных веществ, что необходимо учитывать.

[132] Цветная добавка Liquid FD&C blue #1 используется в косметических продуктах, мыле, солях для ванн и бомбочках для ванн. Она изготовлена из натуральных материалов и имеет обозначение по INCI «blue #1». Эта красящая добавка может поставляться в виде предварительно смешанного красителя на водной основе. Это типичный косметический водорастворимый жидкий краситель.

[133] Цветная добавка Liquid D&C green #5 также используется в косметических продуктах, мыле, солях для ванн и бомбочках для ванн. Она изготовлена из натуральных материалов и имеет название Green No. 5 по INCI. Эта красящая добавка может поставляться в виде предварительно смешанного красителя на водной основе. Это типичный косметический водорастворимый жидкий краситель.

[134] Цветная добавка Liquid D&C green #6 oil AM4299 также используется в косметических продуктах, мыле, солях для ванн и бомбочках для ванн. Она изготовлена из натуральных материалов и имеет название по INCI: green No. 6 и каприловый/каприновый триглицерид. Эта цветная добавка поставляется в виде предварительно смешанной жидкой краски на масляной основе, соединенной, например, с фракционированным кокосовым маслом для увеличения срока хранения. Этот краситель рассматривают как продукт, который лучше реагирует с красителем на масляной основе, который тогда будет более стойким при стирке и не будет растворяться при гидратации. Однако следует отметить, что при использовании этого красителя следует применять средства, ослабляющие или устраняющие возможное стойкое окрашивание раны, которое может вызвать впечатление о наличии у пациента татуировки.

[135] Green Concentrated Food Coloring — это пищевой краситель, производимый компанией Rayner. Он имеет название INCI: Water, тартразин (E102) (1,87%), Brilliant blue FCF (E133) (0,13%), уксусная кислота. Его можно рассматривать в качестве красителя, поскольку он поставляется в предварительно смешанной смеси жидких пищевых красителей на водной основе. Данная красящая смесь считается безвредной.

[136] Garnier natural Color, mahogany — краска для волос производства Garnier, содержащая такие ингредиенты, как вода, децет-3, алурет-12, кокамид мипа, олет-30, гидроксид аммония, децет-5, глицерин, олеиновая кислота, олеиновый спирт, хлорид гексадиметрина 2, 4-диаминофонксиэтанол HCl, п-аминофенол, м-аминофенол, аскорбиновая кислота, гидроксиэтилцеллюлоза, метабисульфит натрия, этаноламин, масло зародышей triticum vulgare, масло зародышей пшеницы, тиоглицерин, поликвартерниум-6, толуол-2,5-диамин, поликварниум-67, 2-метил-5-гидроксиэтиламинофенол, тиолактат аммония, масло симмондсии китайской, масло семян жожоба, изопропаноламин, резорцин, ЭДТА, парфюмерная композиция. Этот краситель поставляется в виде предварительно смешанного набора для окрашивания волос. Краситель является еще одним вариантом красителя, поскольку он обладает способностью связывания с белками и вступает в реакцию с коллагеном каркаса или заменителя кожи.

[137] ELEA, color and care, black - это краска для волос производства ELEA. В ее состав входят вода, цетераловый спирт, цетерет-20 аммиака, хлорид цетримония, кокамдопропилбетан, олеиновая кислота, пропиленгликоль, ПЭГ-40, гидрогенизированное кастровое масло, п-фенилендиамин, 2,4-диаминофеноксиэтанол, HCl, семена vitis vinifera. масло метабисульфит натрия, эриторбиновая кислота, отдушка, кумарин, лимонен, линалоол, резорцин, тетранатрий ЭДТА. Этот краситель является еще одним вариантом красящего вещества, поскольку он создан для связывания с белками и вступает в реакцию с коллагеном каркаса или заменителя кожи.

[138] Хотя в заявке описаны различные примеры и варианты красителей, это описание возможных красителей не является исчерпывающим и оно не должно рассматриваться как описание, исчерпывающее все возможные красящие агенты, красители или цветовые добавки.

[139] Добавление красителя к заменителю кожи

[140] В предпочтительном варианте осуществления изобретения в качестве красителя, добавляемого к заменителю кожи, используют метиленовый синий (МС), генцианвиолет (ГВ) или комбинацию метиленового синего (МС) и генцианвиолета (ГВ).

[141] В варианте осуществления, в котором метиленовый синий (МС) и генцианвиолет (ГВ) комбинируют друг с другом, их используют в равных массовых соотношениях. Но в других вариантах осуществления изобретения метиленовый синий (МС) и генцианвиолет (ГВ) комбинируют в неравных массовых соотношениях. Другие варианты реализации включают любую комбинацию из двух или более таких красителей, т.е. метиленового синего (МС) и генцианвиолета (ГВ) и других красителей. Ниже описаны иллюстративные примеры способов и вариантов осуществления.

[142] В первом варианте осуществления в качестве заменителя кожи используют децеллюляризованный каркасный материал из рыбьей кожи, изготовленный из минимально обработанной кожи промысловой атлантической трески, выловленной в районе Исландии. Для простоты, в последующих разделах, если не указано иное, этот каркасный материал, изготовленный из минимально обработанной кожи промысловой атлантической трески, выловленной в районе Исландии, называется просто «каркасом» или «каркасным материалом», представленным в качестве варианта заменителя кожи.

[143] Ниже описаны способы добавления по меньшей мере одного красителя к каркасу и повышения стойкости красителя (агентов).

[144] В предпочтительном варианте выполняют общий процесс добавления красителей метиленового синего (МС) и/или генцианвиолета (ГВ) к каркасу.

[145] В типовой процедуре используют 100 мл раствора красителя (либо на основе деионизированной воды, либо на основе фосфатно-солевого буфера (далее сокращенно упоминается как «ФСБ»), содержащего 0,001 мас.% каждого красителя (МС и ГВ) (всего 0,002 масс.% или 20 мг/л при использовании двух красителей (МС и ГВ)). К раствору добавляют фрагмент лиофилизированного каркаса размером примерно 4x4 см и массой 0,25–0,30 г и оставляют на 3 часа. Затем каркас Кгома вынимают из раствора и промывают водопроводной водой, а затем ополаскивают деионизированной водой и замораживают. Полученный окрашенный каркас 300 показан на фиг.3.

[146] При использовании МС и ГВ, как описано выше, общее количество обоих красителей в каркасе составляет примерно 1 мг/г. Тот же способ можно применять в отношении любой комбинации четырех упомянутых выше красителей (метиленовый синий (МС), генцианвиолет (ГВ), бриллиантовый синий FCF (BB-FCF) и индигокармин (ИК)) или с одним из этих четырех красителей, причем как с одинаковой общей концентрацией (0,002 мас.%), так и с концентрацией красителя (0,001 мас.%) в воде или растворе ФСБ. Незначительные изменения общей концентрации или объема раствора красителя будут давать одинаковую общую концентрацию в каркасах для любого отдельного красителя или другой комбинации красителей, перечисленных

выше. Спектрофотометр УФ-ВО может (и он использовался изобретателями) измерить (по степени концентрации) оптическую плотность красящих растворов до и после процесса окрашивания любым отдельным красителем или любой комбинацией красителей, чтобы определить их сходство в отношении адсорбции на каркасе.

5 [147] Фиг.4А, 4В и 4С изображают полученные каркасные материалы, окрашенные посредством 100 мл раствора красителя (на основе либо деионизированной воды, либо фосфатно-солевого буферного раствора (далее сокращенно «ФСБ»)), содержащие 0,001 мас.% МС в каркасном материале 410, показанном на фиг.4А, который выдерживали 24 часа; содержащие 0,001 мас.% ГВ в 10 каркасном материале 420, показанном на фиг.4В, который выдерживали 24 часа; и содержащие общее количество 0,001 мас.% комбинированной дозы 25/75 каркасного материала МС/ГВ 430, показанного на фиг.4С, который выдерживали 24 часа.

[148] В других вариантах осуществления изобретения использовали другие дополнительные комбинации красителей, включая: (1) ВВ-FCF и ИК, нанесенные 15 вместе с использованием той же экспериментальной установки, что использовалась выше (когда применяли МС и ГВ); (2) ВВ-FCF и/или ИК, наносимые до или после МС и/или ГВ для увеличения ресурса стойкости в условиях *in vivo*; и (3) ВВ-FCF и/или ИК в сочетании с МС и/или ГВ. В приведенных выше комбинациях растворителем может быть либо вода, либо ФСБ. Другие варианты осуществления изобретения включают 20 другие смеси растворителей, обсуждаемые в этом и в последующих разделах. На фиг.5 показан полученный каркас 510, окрашенный с помощью ВВ-FCF и ИК, нанесенных в той же массе, что и в вышеупомянутых примерах с красителями МС и ГВ, как указано выше, при 0,001 мас.% каждого красителя ВВ-FCF и ИК, с общей концентрацией 0,002 мас.%, и с выдерживанием в течение 3 часов.

25

[149] *Альтернативные способы с использованием протравителей*

[150] В других вариантах осуществления изобретения используют различные методы или закрепители краски, позволяющие повысить стойкость красителя или комбинации красителей, добавляемых в каркасный материал.

30 [151] Протравы или закрепители красок или фиксаторы представляют собой группу соединений, используемых в биологическом окрашивании и в текстильной промышленности, которые в основном состоят из металлов с валентностью два (соли). С той же целью часто используют такие соединения, как дубильная кислота или винный камень (калиевая соль винной кислоты), хотя обычно они не считаются 35 настоящими протравами.

[152] Выбор протравы часто зависит от используемого красителя, например, некоторые соли цинка могут использоваться с МС и йодом (KI + I₂) для ГВ. Йод также

используют в качестве протравы при окрашивании по Граму, хотя его скорее считают улавливающим агентом, чем настоящей протравой.

[153] Согласно одному из возможных определений, протрава - это ион поливалентного металла, образующий координационные комплексы с определенными красителями. Однако термин «протрава» не ограничивается в настоящей заявке указанным определением - как указано выше, некоторые другие композиции (например, дубильная кислота, винный камень, йод) также обычно рассматриваются специалистами в качестве протрав, несмотря на то, что они не подпадают под это определение.

[154] Протравы, как правило, можно применять в процессе окраски тремя способами: (1) предварительная протравка (хромирование), при которой подложку обрабатывают протравой, а затем красителем; (2) Метапротравливание (метахром), при котором протрава присутствует в красящем растворе с самого начала (этот процесс проще, чем пред-/постпротравливание, но подходит только для небольшого числа красителей); и (3) постпротравливание (последующее хромирование), при котором основу сначала обрабатывают красителем, а затем протравой.

[155] На фиг.6А и 6В показаны протравленные каркасные материалы, причем на фиг.6А показан подвергнутый постпротравливанию образец каркасного материала Крома 610, окрашенный комбинацией МС/ГВ в концентрации 0,002 мас.% с использованием квасцов, а фиг.6В показывает подвергнутый предварительному протравливанию образец каркасного материала 620, окрашенный комбинацией МС/ГВ в концентрации 0,002 мас.% с использованием квасцов. Квасцы, также известные как сульфат алюминия, являются одной из наиболее часто используемых протрав для текстиля, поскольку они обеспечивают хорошую стойкость различных красителей, а также увеличивают яркость и насыщенность цвета. Однако следует понимать, что это не единственная протрава, которую можно использовать в отношении каркаса. В других вариантах осуществления изобретения возможные протравы/соли включают, помимо прочего, NaCl, MgCl₂, MgSO₄, CaCO₃, CaCl₂, KCl, ZnCl₂, некоторые другие соли Zn или даже использование KI/I₂.

[156] Другие примеры изобретения, которые показаны на фиг.6С и 6D, относятся к вариантам метапротравливания, причем на фиг.6С каркасный материал 630 окрашен комбинацией МС/ГВ при общей концентрации 0,002 мас.%, куда добавлено 0,5 грамма CaCl₂, а на фиг.6D каркасный материал 640 окрашен комбинацией МС/ГВ при общей концентрации 0,002 мас.%, куда добавлено 0,5 грамма NaCl.

[157] Согласно изобретению, любую из указанных солей металла/протрав или комбинацию по меньшей мере двух солей металла/протрав используют с любым

красителем или любой комбинацией красителей, описанных выше, или с любой другой комбинацией красителей и методов окрашивания.

5 [158] Согласно изобретению, все три метода протравливания осуществляют в течение приблизительно 2 часов при температуре примерно 90°C. В случаях, когда это невозможно, каркасную основу можно выдержать в растворе при комнатной температуре вплоть до 48 часов и более. Результаты экспериментов, проведенных авторами настоящего изобретения, показывают, что нагревание каркаса в растворе хлорида натрия при температуре примерно 80°C в течение 2 часов может привести к 10 существенному распаду коллагена до более гелеобразной формы, что, скорее всего, связано с частичным разложением коллагена в желатин. Поэтому предпочтительным является «холодный метод» или гибридный метод, осуществляемый, например, при 10 приблизительно температуре 37°C в течение 12 часов.

[159] Метапротравливание в целом можно считать наиболее ограничивающим способом. Это связано со множеством факторов, в том числе с растворимостью 15 комплекса краситель-протрава, образующегося в процессе способа (известного как краситель-лак). Растворимость комплекса часто ниже, чем растворимость протравы и красителя по отдельности, что приводит к его осаждению, а это, в свою очередь, ограничивает возможности применения комбинаций протравы и красителя. Кроме того, при осуществлении метапротравливания время пребывания в растворе зависит от 20 времени протравливания, которое составляет примерно два дня при комнатной температуре. Поэтому процесс крашения может протекать дольше или при более высокой температуре. Было доказано, что интенсивность адсорбированного цвета напрямую связана со временем пребывания в растворе и, скорее всего, также коррелирует с температурой.

25 [160] Предпочтительные варианты осуществления изобретения включают предварительную или последующую протравку, при этом постпротравливание потенциально более благоприятно для целей настоящего изобретения, поскольку его можно применять без изменения текущих способов окраски и количественного 30 оценивания, при условии, что каркас не теряет значительной части цвета в процессе протравливания. Процесс предварительного протравливания может изменить скорость адсорбции красителя, поскольку во время адсорбции краситель-лак образуется непосредственно на поверхности каркаса. Кроме того, протрава может «проникнуть» в 35 раствор красителя, что может привести к осаждению или изменению интенсивности поглощения молекул красителя. В любом случае это может вызвать проблемы при измерении количества красителя, адсорбированного каркасом.

[161] Как указывалось ранее, квасцы являются предпочтительной протравой, но в других вариантах осуществления изобретения могут использоваться другие

протравы, включая, помимо прочего, соли металлов, такие как соли натрия, магния, калия и железа.

[162] *Крашение в градиенте pH или «сквозное крашение»*

5 [163] В соответствии с другими вариантами осуществления изобретения, окрашивание каркасов осуществляли путем «сквозного крашения». Данный процесс предполагает постепенное изменение показателя pH раствора красителя во время крашения от слабоосновного (pH 9–10) до слабокислого (pH 3–4). Этого можно добиться, либо используя различные слабые кислоты/основания (например, 10 аквакислоту/бикарбонат натрия), разбавленный раствор сильных кислот/оснований (например, HCl/NaOH), либо используя крайне малые количества концентрированных сильных кислот/оснований, либо комбинируя указанные методы. Этот процесс можно применять вместо любого из методов окрашивания, описанных в данной заявке, или вместе с ними. Явление сквозного окрашивания, вероятно, можно объяснить 15 ограниченной стабильностью третичной структуры белков (в данном случае коллагена) в диапазоне шкалы pH. Когда белок подвергается воздействию pH, с которым не может справиться, он деформируется, открывая структуру белка и обнажая для красителя возможные места связывания.

[164] На фиг.7 показаны различные результаты каркасных материалов, при 20 получении которых процесс крашения сопровождался градацией pH. Первым показан каркасный материал 710 после окрашивания комбинацией MC/ГВ с общей концентрацией 0,002 мас.% при применении градиента pH. Каркасный материал 720 показан после окрашивания MC с общей концентрацией 0,002 мас.% при применении градиента pH. Каркасный материал 730 показан после окрашивания комбинацией 25 MC/BB-FCF с общей концентрацией 0,002 мас.% при применении градиента pH. И каркасный материал 740 показан после окрашивания BB-FCF с общей концентрацией 0,002 мас.% при применении градиента pH.

[165] *Нетрадиционные методы окрашивания или закрепления красителя*

30 [166] В других вариантах осуществления изобретения используются нетрадиционные методы окрашивания или закрепления цвета. Ниже описано несколько нетрадиционных способов окрашивания, используемых в изобретении. В этих вариантах эффективность абсорбции цвета или степень закрепления определяли главным образом путем визуального осмотра.

35 [167] В некоторых вариантах осуществления изобретения в процессе крашения использовали альтернативный растворитель. Описанные выше способы крашения осуществляли с применением водного (на водной основе) растворителя для

красителей. Однако следует учесть, что четыре вышеупомянутых красителя (МС, ГВ, ВВ-FCF и ИК) растворимы во множестве различных растворителей, таких как этанол, и являются слегка липофильными, помимо способности растворяться в воде.

5 [168] Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения, МС и/или ГВ растворяют в этаноле, а лиофилизированный каркас окрашивают в этанольном растворе. Это приводит к гораздо более светлому окрашиванию по сравнению с аналогичным водным методом, даже если применяют более концентрированный раствор красителя и более длительное время окрашивания. Хотя в этих вариантах осуществления изобретения визуально можно обнаружить более светлую общую 10 окраску, эти варианты все же следует считать эффективными и даже предпочтительными, поскольку они позволяют улучшить стойкость цвета и понизить вероятность появления постоянного эффекта татуировки на ране, обеспечивая при этом возможность создания эффективного окрашенного заменителя кожи.

15 [169] В других вариантах осуществления изобретения красители растворяют в олеиновой кислоте, но в этих вариантах их растворимость ниже. Между тем, использование смеси олеиновая кислота/этанол в соотношении 70/30 дает более высокую растворимость. Было обнаружено, что результирующий цвет каркасов в целом получается темнее, чем для этанола и олеиновой кислоты при той же продолжительности процесса и концентрации красителя.

20 [170] В других вариантах осуществления изобретения использовали растительное масло. Также можно использовать рыбий жир/тресковый жир. Раствор красителя на основе масла/органического растворителя можно использовать при любой комбинации красителей. Кроме того, его можно применять в отношении предварительно протравленных каркасов с использованием различных масел, жирных 25 кислот, их солей и растворителей.

[171] В других вариантах осуществления изобретения обработку покрытия проводили после окрашивания. В этих вариантах наибольший интерес представляют покрытия на основе масла и сахара.

30 [172] В одном варианте осуществления изобретения смесь триглицеридов, моноглицеридов и свободных жирных кислот, полученных из рыбьего жира, использовали для нанесения покрытия путем распыления тонкой пленки на каркас после окрашивания. Образец приобрел некоторую устойчивость к экспериментам по обесцвечиванию и разрушению *in vitro* по сравнению с аналогичным образцом без покрытия. Эту методику можно также проводить с использованием подходящих 35 алкиловых эфиров жирных кислот.

[173] В других вариантах осуществления изобретения покрытия на основе сахара изготавливают из различных сахаров: либо простых сахаров (моносахаридов),

таких как рибоза, фруктоза или декстроза, либо двойных сахаров (дисахаридов), таких как сахароза или мальтоза. Выбранный сахар растворяют в водном растворе и погружают в него каркас перед повторной лиофилизацией. Невосстанавливающие сахара можно растворять в красящем растворе. Сахара могут повысить стабильность коллагена за счет дополнительного сшивания. Кроме того, сахара содержат большое количество групп -ОН, которые могут способствовать дополнительному связыванию молекул красителя за счет водородных связей или дипольных сил. Более того, азотсодержащие сахара, такие как N-ацетилглюкозамин, могут образовывать ковалентные связи со свободными аминокислотными/кислотными концами коллагена и некоторых красителей.

[174] Хотя почти все возможные способы и варианты осуществления изобретения, описанные в настоящей заявке выше, можно использовать в комбинации друг с другом, использование сразу нескольких компонентов каждой категории (например, двух или более протрав для увеличения яркости цвета, его стойкости и т.д.) может привести к повышению сложности и общей стоимости производства окрашенного каркаса, а также к возможным побочным эффектам.

[175] Таким образом, в качестве предпочтительных способов и вариантов изобретения, способных обеспечить создание подходящего практического образца, следует понимать варианты, аналогичные «базовому» процессу крашения. Наиболее заметной выявленной проблемой является проблема долговечности красителя в условиях *in vivo* (например, у мышей). Потенциальное улучшение заключается в проведении этапа протравливания, крашения в градиенте pH или их комбинации, которая может быть использована для увеличения связывания молекул красителя внутри коллагеновой матрицы каркаса. На фиг.8 показано сравнение двух предпочтительных вариантов окрашивания каркасов. Каркас 810 окрашен с использованием комбинации МС/ГВ при общей концентрации 0,002 мас.%, а каркас 820 окрашен с использованием комбинации МС/ГВ при общей концентрации 0,002 мас.% и с предварительной протравкой красителя.

[176] *Дегградация каркасов, катализируемая коллагеназой*

[177] При использовании каркаса в качестве биологической повязки, организм разделяет общий каркас на «пул» микроскопических фрагментов, способствующих восстановлению и росту пораженного участка. Для проверочных экспериментов выбрали раствор коллагеназы в ФСБ, чтобы имитировать процесс дегградации каркаса и его влияние на краситель (красители) в образцах каркаса. В природе и у людей в частности основной функцией коллагеназы является расщепление коллагена до уровня пептидов, что происходит, например, в поврежденных тканях кожи и что

помогает организму генерировать новые здоровые ткани.

[178] Для этой цели был приготовлен исходный раствор коллагеназы в ФСБ с концентрацией 0,50 мг/мл. В первом эксперименте исходный раствор разбавили до концентрации 10 или 100 мкг/мл. Всего было приготовлено 9 растворов с использованием либо ФСБ, либо «раствора, подобного плазме человека» в качестве основы раствора (10 мл), затем фрагменты каркасов были помещены в раствор и выдержаны при комнатной температуре в течение длительного периода времени.

[179] Авторы изобретения обнаружили, что неокрашенный каркас начинает разрушаться в растворе коллагеназы в ФСБ. Для плазмоподобной среды раствор, по-видимому, ингибировал коллагеназу, что было видно по сравнительному уровню разрушения каркаса примерно через 3 дня, даже в случае, когда концентрация коллагеназы в плазменном растворе была в 10 раз выше. За это время не наблюдалось больших изменений в каркасе, окрашенном комбинацией МС и ГВ при концентрации 0,002%.

[180] Для разрушения крашения МС/ГВ, применяли значительно более высокую концентрацию коллагеназы. Для этого использовали оригинальный раствор ФСБ с концентрацией 0,5 мг/мл. После того как фрагмент неокрашенного каркаса был протестирован для сравнения времени и уровня разрушения, протестировали ряд вариантов. Было обнаружено, что полный распад на микроскопические частицы занимает всего около 24 часов. Если обратиться к окрашенным образцам, какой показан на фиг.9А, то был протестирован первый образец 910 каркаса, окрашенный в 0,001 мас.% растворе МС/ГВ. В растворе коллагеназы 0,5 мг/мл полное расщепление этого образца заняло примерно 2 дня. Как можно видеть на фиг.9В, часть краски перетекла в раствор, однако большая часть красителя все еще связана с небольшими частицами коллагена 920.

[181] Следующие пять «прототипов», описанных в предыдущих разделах, были протестированы таким же образом. Испытуемые прототипы представляли собой каркасные материалы, окрашенные в: 1) 0,002 мас.% МС/ГВ в воде, 2) 0,002 мас.% МС/ГВ в ФСБ, 3) 0,002 мас.% МС/ВВ FCF в ФСБ, 4) 0,001 мас.% ИК в воде и 5) 0,002 мас.% МС/ГВ в воде, покрытой смесью триглицеридов, моноглицеридов и свободных жирных кислот, полученных из рыбьего жира. В течение следующих 4 дней образцы проверяли, во всех случаях, кроме одного (образец 4: 0,001 мас.% ИК в воде) полная деградация заняла 4 дня.

[182] В этих экспериментах было показано, что окрашенные каркасы (1–5, см. выше) распадались на микроскопические фрагменты, и во всех случаях значительная часть красителя оставалась на этих фрагментах. Это говорит о том, что красители прочно связываются с коллагеном/пептидами каркаса, а не только с поверхностью. Как

указано выше, во всех случаях, кроме одного (т.е. образец 4: 0,001 мас.% ИК в воде) разложение заняло примерно 4 дня, и между образцами, окрашенными МС/ГВ, не наблюдалось большой разницы. Образцы 3 и 4 немного отличались, образец 4, окрашенный ИК, почти полностью разрушился менее чем за 24 часа, оставив лишь
5 несколько небольших фрагментов. Образец 3 был более стабильным по сравнению с образцом 4, но распался быстрее и на более мелкие фрагменты, чем три других образца.

[183] В приведенных выше вариантах осуществления изобретения окраска каркасов обычно включала комбинацию метиленового синего (МС) и генцианвиолета
10 (ГВ) в равных массовых соотношениях. Однако это не является обязательным условием. Количество красителя можно регулировать для получения каркасов с определенным количеством красителя, чтобы количество красителя было ниже, а в некоторых случаях значительно ниже максимально разрешенного количества МС, объявленного FDA для этого типа продукта. Суммарное количество обоих красителей
15 МС/ГВ в каркасе составляет примерно 1 мг/г, но максимально допустимое количество может составлять 2 мг/г, 3 мг/г, 4, 5 мг/г, 6 мг/г, 7 мг/г, 8 мг/г, мг/г, 9 мг/г или даже 10 мг/г в некоторых вариантах осуществления изобретения.

[184] В некоторых вариантах осуществления изобретения на этапе добавления краски используют 100 мл раствора красителя (либо на основе деионизированной
20 воды, либо ФСБ), содержащего 0,001 мас.% каждой краски (всего 0,002 мас.% или 20 мг/л). Однако это количество краски в растворе красителя может быть увеличено или уменьшено для соблюдения требований, предъявляемых со стороны заменителя кожи, на который краска должна быть нанесена. Например, раствор красителя может содержать от 1,0 до 10,0 мас.% краски или красителя (либо на основе
25 деионизированной воды, ФСБ, либо какого-то другого растворителя красителя), от 1,0 до 20,0 мас.% краски или красителя (либо на основе деионизированной воды, ФСБ, либо какого-то другого растворителя красителя), от 1,0 до 0,01 мас.% краски или красителя (либо на основе деионизированной воды, ФСБ, либо какого-то другого
30 растворителя красителя), от 0,01 до 0,001 мас.% краски или красителя (либо на основе деионизированной воды, ФСБ, либо какого-то другого растворителя красителя), от 0,05 до 0,002 мас.% краски (либо на основе деионизированной воды, ФСБ, либо другого растворителя красителя), от 0,01 до 0,0002 мас.% краски (либо на основе деионизированной воды, ФСБ, либо какого-то другого растворителя красителя), от 0,01 до 0,0002 мас.% краски или красителя (либо на основе деионизированной воды, ФСБ,
35 либо какого-то другого растворителя красителя), в зависимости от краски и заменителя кожи, к которому следует добавлять краску или краситель.

[185] В раствор можно поместить фрагмент каркаса размером примерно 4x4 см

и весом 0,25-0,30 г и оставить на 3 часа. Но, как описано выше, размер каркасного материала и время, в течение которого каркасный материал выдерживается в красящем растворе, можно варьировать. Кроме того, разумеется, можно варьировать размер каркасного материала, а также можно вносить необходимые корректировки в 5 объем и концентрацию раствора красителя. Затем каркас вынимают из раствора и промывают водопроводной водой, а потом ополаскивают деионизированной водой, замораживают и сушат замораживанием, т.е. лиофилизируют.

[186] В некоторых вариантах осуществления изобретения обнаружено, что относительные количества МС и ГВ, адсорбируемые каркасом, будут меняться, если 10 вместо деионизированной воды в качестве основы раствора использовать ФСБ, причем они изменяются примерно с 60% ГВ и 40% МС по весу для водного раствора до примерно 40% ГВ и 60% МС по весу для ФСБ. Однако общее количество адсорбированных красок более или менее одинаково. Кроме того, при использовании МС и ГВ в сочетании можно использовать разные соотношения МС/ГВ, включая 15 соотношение МС 95/5, 90/10, 85/15, 80/20, 75/25, 70/30, 65/35, 60/40, 55/45, 50/50, 45/55, 40/60, 35/65, 30/70, 25/75, 20/80, 15/85, 10/90 и 5/95. Соотношение МС/ГВ можно варьировать от 10 до 50% МС, от 10 до 60% МС, от 10 до 70% МС, от 10 до 80% МС и от 10 до 90% МС, при этом оставшийся процент варьируется соответственно (от 90 до 50%, от 90 до 40%, от 90 до 30%, от 90 до 20% и от 90 до 10%). В предпочтительном 20 случае соотношение МС/ГВ составляет 50/50. В другом предпочтительном случае соотношение МС/ГВ составляет 75/25. И еще в одном предпочтительном случае соотношение МС/ГВ составляет 25/75.

[187] Помимо МС и ГВ, в других вариантах осуществления изобретения в качестве красок для заменителей кожи можно использовать пищевые красители или, 25 точнее сказать, активные соединения (краситель/пигмент) в пищевых красителях, причем их можно использовать как в сочетании с МС и ГВ, так и вместо них.

[188] В одном варианте осуществления изобретения используют жирорастворимую пищевую краску и водорастворимую пищевую краску. Красителем в жирорастворимой пищевой краске является E133 или Brilliant Blue FCF (BB-FCF), 30 который представляет собой водорастворимую молекулу с молекулярной структурой, очень похожей на ГВ. Этот краситель составлял примерно 40 вес.% пищевой краски, тогда как остальные добавки предназначались для «жирорастворимости». Красителем в водорастворимой краске был E132, или индигокармин (ИК), который составлял примерно 85% массы пищевой краски.

35 [189] Авторы изобретения обнаружили, что пищевые краски можно удалять как таковые из каркасного материала как путем ферментативного расщепления с использованием коллагеназы, так и путем выдерживания материала в растворе

приблизительно 1 М бикарбоната натрия.

[190] Благодаря механизму связывания вышеупомянутых красителей (которые, как было установлено, могут связываться не только с поверхностью, но и с коллагеном/пептидами каркасных материалов), можно осуществлять связывание, 5 посредством аналогичных механизмов связывания, аналогичных или подходящих красителей с другими заменителями кожи на основе коллагена или пептидов.

[191] Предложенный каркасный материал может быть получен из интактной рыбьей кожи, причем в качестве источника рыбьей кожи можно использовать любые виды рыб, включая костных или хрящевых рыб. Например, источником может быть 10 круглая рыба, такая как треска, пикша и сом; плоская рыба, такая как палтус, камбала и морской язык; лососевые, такие как лосось и форель; скумбриевые, такие как тунец; или мелкая рыба, такая как сельдь, анчоусы, макрель и сардины. Кроме того, с помощью предложенных комбинаций красителей, пигментов и/или других красителей можно аналогичным образом окрашивать и другие коллагеновые, пептидные и иные 15 содержащие белок заменители кожи, будь то биологические заменители кожи, синтетические заменители кожи или гибридные заменители кожи.

[192] Тестирование на мышах и пациентах и соответствующие результаты

[193] *Мыши*

20 [194] В качестве заменителя кожи были предложены различные варианты каркасного материала из децеллюляризированной рыбьей кожи, изготовленного из минимально обработанной кожи промысловой атлантической трески, выловленной в районе Исландии. Опять же, в последующих разделах, если не указано иное, «рыбья кожа», используемая в качестве каркасного материала и изготовленная из минимально 25 обработанной кожи промысловой атлантической трески, выловленной в районе Исландии, будет обозначаться термином «рыбья кожа» в качестве «каркаса» или «каркасного материала», представляемого как вариант заменителя кожи.

[195] В общей сложности были протестированы 52 мыши с использованием цветных каркасных материалов в качестве заменителя кожи.

30 [196] В первом пилотном исследовании (Пилотное исследование 1) обрабатывали 4 мышей.

[197] Пилотное исследование 1 включало следующее:

- 1) краситель 0,005 мас.% MC + 0,005 мас.% GB, свежеецеллюляризованную 35 рыбью кожу, окрашенную в воде в течение 3 часов перед лиофилизацией;
- и 2) краситель 0,010 мас.% MC + 0,010 мас.% GB, свежеецеллюляризованную 35 рыбью кожу, окрашенную в воде в течение 3 часов перед лиофилизацией.

[198] Во втором пилотном исследовании (Пилотное исследование 2)

обрабатывали 16 мышей.

[199] Пилотное исследование 2 включало следующее:

1) краситель 0,001 мас.% МС + 0,001 мас.% ГВ, свежеецеллюляризованную
5 рыбью кожу, окрашенную в воде в течение 24 часов перед погружением в
криосахарный раствор и лиофилизацией;

2) краситель 0,001 мас.% МС + 0,001% ГВ, лиофилизированную рыбью кожу,
окрашенную в воде в течение 3 часов перед погружением в криосахарный раствор и
лиофилизацией;

3) краситель 0,001 мас.% МС + 0,001 мас.% ГВ, лиофилизированную рыбью
10 кожу, окрашенную в воде в течение 3 часов перед погружением в минеральное масло
и лиофилизацией;

и 4) краситель 0,001 мас.% МС + 0,001 мас.% ГВ, лиофилизированную кожу
рыбы, окрашенную в воде в течение 3 часов перед лиофилизацией.

[200] В третьем пилотном исследовании (Пилотное исследование 3)
15 обрабатывали 32 мыши.

[201] Пилотное исследование 3 включало следующее:

краситель 0,001 мас.% МС + 0,001% ГВ, лиофилизированную рыбью кожу,
окрашенную в ФСБ в течение 3 часов перед лиофилизацией.

[202] Тестирования на мышах для каждого из Пилотных исследований 1, 2 и 3
20 дали следующие результаты. После использования окрашенной рыбьей кожи в
качестве каркасного материала не было обнаружено никаких неожиданных воспалений
или других побочных эффектов. Продукты обработки (каркасный материал)
разложились в обычное время, и раны зажили нормально. Что примечательно, не
было выявлено появления стойких или полустойких эффектов татуировки на ложе
25 раны.

[203] *Пациенты-люди*

[204] Трех пациентов (Пациента 1, Пациента 2 и Пациента 3) лечили с
использованием минимально обработанной кожи промысловой атлантической трески,
30 выловленной в районе Исландии, которая упоминается в этом разделе как «рыбья
кожа», «каркас» или «каркасный материал».

[205] У каждого из трех пациентов (Пациент 1, Пациент 2 и Пациент 3)
каркасный материал был изготовлен, как в вышеописанном Пилотном исследовании 3,
с красителем 0,001 мас.% МС + 0,001% ГВ, лиофилизированной рыбьей кожей,
35 окрашенной в растворе ФСБ в течение 3 часов до лиофилизации.

[206] 12 октября 2021г. Пациент 1 был обработан цветной рыбьей кожей, его
первая фотография показана на фиг.10А. Через 7 дней, 19 октября 2021г., та же рана

Пациента 1 была сфотографирована снова, она показана на фиг.10B.

[207] 25 октября 2021г. Пациент 2 был обработан цветной рыбьей кожей, его первая фотография показана на фиг.11A. Через 7 дней, 2 ноября 2021г, та же рана Пациента 2 была сфотографирована снова, она показана на фиг.11B.

5 [208] Наконец, с 20 января 2022г. по 10 февраля 2022 г. различные раны Пациента 3 обрабатывали цветной рыбьей кожей. Фиг.12A-12N изображают обработанные раны каждый раз при замене раневой повязки. На фиг.12A показано наложение цветной рыбьей кожи в день 0, а на фиг.12B показана та же рана в день 4. В день 6 наложили новую цветную рыбью кожу, что показано на фиг.12C, а на фиг.12D 10 показана обработанная рана через два дня, т.е. на 8-й день. В случае того же Пациента 3 новую цветную рыбью кожу накладывали на другую рану, что показано на фиг.12E, причем на фиг.12F показана та же самая рана через два дня, а на фиг.12G показана та же рана через пять дней. На фиг.12H показано нанесение новой окрашенной рыбьей кожи, на фиг.12I показан результат через два дня, а на фиг.12J 15 показан результат через 4 дня. Наконец, на фиг.12K показано наложение новой цветной рыбьей кожи, на фиг.12L показано результат заживания через два дня, а на фиг.12M показан результат заживания через 4 дня.

[209] У каждого из указанных выше Пациентов 1-3 после использования окрашенной рыбьей кожи не было зарегистрировано никаких воспалений, вызванных 20 присутствием медицинского изделия в организме, или каких-либо других нежелательных явлений. Применяемое лечение можно рассматривать как способствующее заживлению этих хронических ран. Кроме того, наложенная цветная рыбья кожа нормально разложилась в ране. Более того, после 5-го дня не было выявлено постоянного или полупостоянного эффекта татуировки на ложе раны.

25

[210] Дополнительные примеры

[211] Как отмечалось выше, при лечении ран с использованием продукта Kerecis™, представляющего собой клеточный каркас, полученный из рыбьей кожи (например, такого как описан в патенте США № 8613957), авторы настоящего 30 изобретения выявили существенную проблему, состоящую в том, что врачи-клиницисты непроизвольно ошибаются или по меньшей мере затрудняются в попытках отличить каркас для заживления ран от инфекции. Это может быть связано, по меньшей мере частично, с цветом и/или запахом, присущими каркасу для заживления ран, когда он начинает разрушаться и интегрироваться в окружающую ткань; иногда он 35 может иметь цвет, схожий с цветом инфицированной ткани (например, при гнойной инфекции), а также может иметь легкий запах, который некоторые могут интерпретировать как запах, аналогичный запаху инфицированной ткани. Таким

образом, изобретатели обнаружили существование проблемы в данной области техники, которую можно было бы решить в значительной мере за счет улучшения или усовершенствования известных продуктов.

5 [212] Одно из решений могло бы заключаться в придании ложной окраски клеточному каркасу, полученному из рыбьей кожи, чтобы его можно было легче идентифицировать в клинике и/или отличить от окружающей ткани при размещении в ложе раны. С этой целью в последующем описании представлены иллюстративные данные серии испытаний, направленных на идентификацию красителя, который способен оставаться стабильным с течением времени и который может быть включен 10 в каркас из рыбьей кожи на этапах обработки/изготовления.

[213] Первая серия экспериментов была проведена для определения стабильности различных красителей в растворе для децеллюляризации (называемом здесь «раствором Децелла»), используемом при обработке/изготовлении продуктов Kegercis™, представляющих собой клеточные каркасы, полученные из минимально 15 обработанной кожи промысловой атлантической трески, описанные в патенте США № 8613957. Раствор Децелла был приготовлен в соответствии с EBL M222, и была проверена стабильность 6 различных красителей, перечисленных в следующей таблице.

Тип цвета	Метиленовый синий	Желтый закат	Роамин В	Генциан фиолетовый	Красный очаровательный	Прочный зеленый
Концентрация порошка/раствора	раствор 1% мас./об.	90%	95%	Нет данных	80%	85%
Прочность раствора (на водной основе)	Нет данных	1% мас./об.	1% мас./об.	Нет данных	1% мас./об.	1% мас./об.

20 [214] Раствор Децелла был приготовлен в соответствии с EBL M222. Каждый краситель готовили до концентрации раствора 1% мас./об. (например, как указано в Таблице 1). По 50 мл раствора Децелла налили в каждую из 7 отдельных пластиковых пробирок, закрываемых соответствующей крышкой. Первая пробирка содержала только раствор Децелла, действовавший в качестве контрольного образца. Аликвоту по 0,5 мл каждого из 6 приготовленных красящих растворов по отдельности добавили 25 в соответствующую пробирку, содержащую 50 мл раствора Децелла. Любую реакцию или видимое изменение смеси отслеживали с течением времени.

[215] Растворы в соответствующих пробирках с соответствующими красителями контролировали и документировали с помощью фотографий в начале эксперимента, через 30 минут и через 24 часа выдерживания.

30 [216] Было обнаружено, что многие красящие агенты вначале были довольно

яркими в растворе Децелла. В первые 20 минут большинство красителей начало тускнеть, за исключением Метиленового Синего. Эта тенденция продолжалась, и через 24 часа все цветные растворы Децелла стали белыми или почти белыми, за исключением раствора Децелла с добавлением Метиленового Синего. Поэтому краска Метиленового Синего считается предпочтительным вариантом красителя, добавляемого на этапе децеллюляризации при производстве продукта Kerecis™, представляющего собой клеточный каркас, полученный из минимально обработанной кожи промысловой атлантической трески, описанный в патенте США № 8613957.

5 [217] Другой вариант осуществления изобретения, описанный со ссылкой на 10 фиг.13, относится к способу 1300 лечения раны с использованием средства для регенерации тканей. На этапе 1310 обеспечивают наличие регенерирующей ткань средства для лечения ран, содержащего заменитель кожи и краситель, который представляет собой биосовместимый краситель, разлагающийся под воздействием протеазы в обработанной ране. На этапе 1320 указанное регенерирующее ткань 15 средство для лечения ран наносят на раневое ложе. И на этапе 1330 определяют, путем определения изменения цвета красителя, разрушился ли заменитель кожи внутри раны из-за воздействия протеазы.

[218] Согласно следующему варианту способа, используют регенерирующее 20 ткань средство для лечения ран, включающее заменитель кожи, имеющий форму внеклеточного матрикса, окрашенного в синий цвет (например, МС/ГВ). Его вводят в ложе раны и сверху накладывают вторичную раневую повязку. В еще одном варианте способа при осмотре раны отмечают цвет раневого ложа. Если цвет синий, то регенерирующее ткань средство для лечения ран считают (корректно) интактным и делают вывод, что происходит (корректно или вероятно) вращение клеток. Если 25 средство для лечения ран больше не синеет, значит, оно стало отторгаться, и его необходимо вымыть и нанести на ложе раны новый материал.

[219] Используемый красящий материал должен быть биосовместимым и разлагаться при атаке протеазы на сам матрикс. Он также может быть непостоянным и 30 оставлять на ране после заживления постоянный цвет или «эффект татуировки».

30 [220] *Дополнительное тестирование*

[221] Первые цветовые тесты были проведены на децеллюляризированной 35 рыбьей коже. Были проведены испытания раневых продуктов на основе рыбьей кожи, чтобы увидеть, насколько их материал согласуется с различными химическими красителями. Цель заключалась в том, чтобы посмотреть, как волокнистый коллагеновый материал будет реагировать с различными красителями и по-разному ли он будет реагировать на влажные или сухие красители.

[222] *Схема испытаний*

[223] Для эксперимента использовали стеклянные миски, наборы иголок и закрытые пластиковые контейнеры. Эти тесты должны были ответить на вопросы о том, как коллагеновый материал реагирует с различными типами красителей, красители на масляной или на водной основе лучше реагируют с белком, выдерживают ли они промывку, и на каком этапе изготовления лучше всего окрашивать децеллюляризованный каркас из рыбьей кожи. Тестируемые различные красители/красящие агенты/пигменты/цветовые добавки включали порошок вайи (HUE-3023); красящую добавку D&C Green #5 Powder AN0725; красящую добавку Ultra Marine Blue H9-03R1; красящую добавку Liquid FD&C blue #1; красящую добавку Liquid D&C green #5; красящую добавку Liquid D&C green #6 oil AM4299; зеленый концентрированный пищевой краситель; и натуральный краситель Garnier, железосинеродистую медь.

15

[224] *Окраска перед лиофилизацией*

[225] Первый этап заключается в окрашивании децеллюляризованной рыбьей кожи перед лиофилизацией. Это делают для того, чтобы посмотреть, как материал реагирует с красками во влажном состоянии и как краситель будет реагировать при промывке и лиофилизации. Испытание проводили после этапа децеллюляризации при производстве продукта из децеллюляризованной рыбьей кожи для ран.

20

[226] Каркасы из децеллюляризованной рыбьей кожи выдерживали в течение 60 минут в химическом красителе, а затем промывали под струей проточной воды в течение 2 часов.

25

[227] *Окраска после лиофилизации*

[228] Второй этап этого теста заключается в окрашивании материала после лиофилизации. Это делают для того, чтобы увидеть, есть ли какая-либо разница в реакциях каркаса с краской после лиофилизации и является ли структура более открытой для химических красителей. Затем листы снова лиофилизируют.

30

[229] *Процедура испытания*

[230] 1 образец децеллюляризованной рыбьей кожи разрезали на небольшие фрагменты. Фрагменты соответственно помещали в красящие агенты: некоторые в неразбавленный жидкий агент, некоторые в смесь красящего порошка и воды/масла или в смесь красителя и проявителя краски для волос. Фрагменты оставляли на 2 часа, после чего их тщательно промывали, осматривали и фотографировали. То, что

35

казалось примечательным, замачивали в воде в закрытых контейнерах и перемешивали вплоть до следующего утра. Это делали для того, чтобы увидеть, перестанут ли цвета со временем растворяться в воде. Все фрагменты еще раз осмотрели и еще раз промыли. Замоченные в чистой воде, все растворы окрасились
5 через пять минут. Примечательные образцы отправляли на лиофилизацию (замораживание при -80°C) и лиофилизацию в сублимационной сушке.

[231] Лучше понять различные варианты осуществления изобретения можно из последующего описания, изложенного со ссылкой на сопроводительные фигуры, на которых одинаковые элементы обозначены одинаковыми номерами позиций.

10 [232] На фигурах представлены лишь некоторые иллюстративные варианты осуществления изобретения, однако оно допускает различные модификации и альтернативные конструкции. Следует понимать, что у авторов нет намерения ограничить изобретение какими-то конкретными вариантами, напротив, их намерение состоит в том, чтобы охватить все модификации, альтернативные конструкции,
15 комбинации и эквиваленты изобретения, отвечающие его сущности и попадающие под объем его правовой охраны.

[233] Используемые ссылочные номера предоставлены исключительно для удобства и, следовательно, не влияют на объем притязаний или варианты осуществления изобретения.

20 [234] Следует понимать, что, если в настоящей заявке в отношении какого-либо термина явно не определено, что он обладает неким указанным значением, то значения этого термина не следует ограничивать, прямо или косвенно, чем-то, выходящим за пределы его простого или обычного значения.

[235] Используемый в настоящей заявке термин «лечение» следует понимать
25 согласно его общему словарному определению. То есть термин «лечение» в широком смысле включает медицинскую помощь и/или лекарственные средства, назначаемые пациенту в связи с заболеванием или травмой. Как должно быть понятно специалистам в данной области, «лечение» включает использование химического, физического или биологического агента для сохранения или придания определенных
30 свойств чему-либо. Таким образом, под «лечением» можно понимать оказанную медицинскую помощь (т.е. в форме способа или серии предписанных действий), или же оно может относиться к лекарственному средству, используемому для поддержания определенного свойства или для придания этого свойства чему-либо.

35 [236] В качестве неограничивающего примера отметим, что раскрытая в настоящем документе децеллюляризованная рыбья кожа в форме частиц может называться «лечением», т.е. лекарственным средством, которое применяется для предохранения и/или стабилизации раны или которое может обеспечить любое другое

описанное благоприятное воздействие на место раны. Аналогично, в некоторых случаях «лечение» включает использование раскрытой децеллюляризированной рыбьей кожи в форме частиц в способах стабилизации и/или защиты раны.

5 [237] Термины «децеллюляризованная», «децеллюляризованная рыбья кожа», «бесклеточная рыбья кожа» и т.п., используемые в настоящей заявке, относятся к рыбьей коже, полученной любым способом, и включающей любой вариант осуществления изобретения, раскрытого в патенте США № 8613957, озаглавленном «Каркасный материал для лечения ран и/или других видов применения для заживления ран». Соответственно, термины «децеллюляризованная»,
10 «децеллюляризованная рыбья кожа», «бесклеточная рыбья кожа» и т.п., используемые в настоящей заявке, включают очищенную от чешуи рыбью кожу, из которой удалено существенное количество клеточного и нуклеиновокислотного содержимого, но оставлена сложная трехмерная интерстициальная структура нативного материала внеклеточного матрикса (ВКМ). В общем, описанная выше
15 децеллюляризация представляет собой более щадящую форму обработки, чем те, которые требуется выполнять и/или обычно выполняются на тканях млекопитающих, которые часто используют агрессивную химическую обработку и/или выдерживание в химикатах (например, антибиотиках).

20 [238] Способы децеллюляризации, описанные в патенте США № 8613957, приводят к получению каркасного материала, сохраняющего трехмерную структуру компонентов естественного внеклеточного матрикса, и это обстоятельство позволяет, в некоторых случаях, получать физическую среду, обеспечивающую миграцию и/или поддержку для стволовых клеток, а также других клеток, участвующих в процессе заживления ран, что способствует излечению раны. Нативная структура внеклеточных
25 компонентов, таких как коллаген, сохраняется в децеллюляризованном каркасном материале рыбьей кожи в дополнение к другим нативным компонентам, таким как полиненасыщенные жирные кислоты Омега-3 (ПНЖК).

30 [239] В качестве заменителя кожи можно также использовать и другие каркасные материалы, полученные из кожи/мембран млекопитающих, например, такие как средства для лечения ран на основе плаценты.

35 [240] Тем не менее, заменитель кожи на основе децеллюляризированной рыбьей кожи может быть предпочтительнее по причине отсутствия вероятности (или по меньшей мере по причине гораздо меньшей вероятности) передачи человеку заболевания от атлантической трески (*Gadus morhua*) и многих других видов рыб. Кроме того, децеллюляризованная рыбья кожа по всей видимости не содержит аллергенных компонентов, что значительно снижает риск аллергической или другой иммунной реакции. Благодаря пониженной вероятности передачи заболеваний и

аллергических реакций, децеллюляризованную рыбью кожу можно подвергать щадящей обработке, сохраняющей биологическую структуру и биологически активные соединения внеклеточного матрикса. Соответственно, децеллюляризованная рыбья кожа в процессе обработки лишается клеток кожи, но сохраняет естественную
5 трехмерную структуру внеклеточных компонентов, которая обеспечивает естественный каркас, способствующий заживлению ран. Напротив, каркасные материалы млекопитающих не имеют трехмерной структуры, лишены других естественных внеклеточных компонентов и не могут способствовать заживлению ран в той же мере или таким же образом, как это делает децеллюляризованная рыбья кожа.

10 [241] Несмотря на то, что и другие формы материалов на основе коллагена можно использовать в качестве биологического или синтетического заменителя кожи, восстановленные коллагеновые материалы желательнее не получать при помощи жестких физических и химических обработок, которые не позволяют сохранить их нативную трехмерную структуру, особенно в естественной среде других природных
15 внеклеточных компонентов. Как и в случае упомянутого выше каркасного материала, полученного из млекопитающих, отсутствие нативной структуры и/или среды трехмерного внеклеточного матрикса, обеспечиваемой восстановленными коллагеновыми материалами, может сделать заменитель кожи менее эффективным в аспекте заживления ран. Конечно, при выборе заменителя кожи необходимо учитывать
20 затраты на изготовление заменителя кожи и его консистенцию, а также другие факторы, так что использование таких восстановленных коллагеновых материалов действительно может быть предпочтительным в некоторых случаях или применениях.

[242] Дополнительные соображения по поводу частоты инфицирования

25 [243] Зачастую обработку ран приходится осуществлять в суровых условиях с задействованием персонала, не имеющего медицинской подготовки, например, в боевых ситуациях, непосредственно в зоне ранения или вблизи нее. Авторы изобретения выявили ярко выраженную потребность в антимикробных средствах широкого спектра действия, характеризующихся способностью к регенерации тканей,
30 бактериальной защитой и анальгетическими свойствами при обработке ран, например, в трансплантатах из рыбьей кожи. Изобретатели обнаружили, что продукт для лечения ран, который легко хранить и транспортировать и который может действовать как в качестве окончательного, так и в качестве временного средства лечения, будет особенно полезен, например, благодаря снижению необходимости эвакуации раненых
35 в боевых или чрезвычайных ситуациях.

[244] Как отмечалось выше, инфекция является серьезной проблемой при оказании помощи в случае ранений, полученных в боевых или чрезвычайных

ситуациях. Она влияет на заболеваемость и смертность раненых людей или военнослужащих на поле боя. Например, в трети случаев инфекция является причиной длительного лечения и повышенного риска ампутации. Из-за различий в природе повреждения и из-за сложных окружающих условий, боевые ранения склонны к контаминации, что затрудняет лечение. Ранним признаком инфекции является бактериальный дисбаланс в ране. Типовые возбудители инфекции, обнаруживаемые в ране на ранней стадии, включают в себя как грамположительные (G+), так и грамотрицательные (G-) штаммы. В случае инфекции наблюдают появление грамотрицательных бактерий и микроорганизмов с множественной лекарственной резистентностью (МЛР). Таким образом, авторы изобретения выявили острую потребность в эффективном и немедленном вмешательстве, позволяющем снизить риск заражения, что принесет пользу солдатам и персоналу служб экстренной помощи.

[245] Предложенное в изобретении регенерирующее ткань средство для лечения ран, которое в некоторых случаях может представлять собой синий противомикробный трансплантат из рыбьей кожи, предоставляет новый визуальный индикатор заживления ран. Предложенный в настоящем изобретении механизм лечения ран сохраняет преимущества предыдущих механизмов лечения, таких как трансплантация, которая ускоряет заживление ран и обеспечивает биологическое покрытие при ожогах, острых и хронических ранах. Но в дополнение к этому, предложенное в изобретении средство для лечения ран пропитано противомикробными агентами либо в форме противомикробных красителей, таких как метиленовый синий (МС) и генцианвиолет (ГВ), либо в виде дополнительного добавленного активного агента. Предложенное в изобретении средство для лечения ран со временем интегрируется в раневое ложе, высвобождая противомикробные агенты для предотвращения инфекции. Синий цвет кожного трансплантата способствует снижению числа необязательных повторных аппликаций, что, в свою очередь, минимизирует воздействия на рану и способствует заживлению раны, причем все это достигается без необратимого изменения цвета окolorаневой ткани.

[246] Традиционные первичные повязки, доступные в боевых или чрезвычайных ситуациях, можно использовать в качестве немедленного покрытия, применять в полевых условиях, в суровой обстановке, они могут использоваться самим пациентом или его компаньоном и часто могут использоваться с солевым раствором для промывки или дегидрирования. Однако традиционные первичные повязки не обеспечивают широкого антимикробного действия, и их необходимо менять ежедневно. Кроме того, традиционные повязки не интегрируются в ложе раны, не способствуют заживлению ран и не обеспечивают визуального указателя протекания интеграции при самостоятельном лечении или лечении со стороны других.

[247] Антимикробные серебряные повязки, которые также могут использоваться в боевых или чрезвычайных ситуациях, можно использовать в качестве экстренного покрытия, применять в полевых условиях, в суровой обстановке, они могут использоваться самим пациентом или его компаньоном и могут обеспечить широкий антимикробный эффект. Однако противомикробные серебряные повязки нельзя сочетать с физиологическим раствором для промывки или дегидрирования, их следует менять каждые 1–3 дня, не интегрировать с ложем раны, они не ускоряют заживление ран и не обеспечивают визуальный указатель протекания интеграции при самостоятельном лечении или лечении со стороны других.

[248] Для сравнения, средство для лечения ран по настоящему изобретению можно использовать в качестве немедленного покрытия, применять в полевых условиях, в суровой обстановке, они могут использоваться самим пациентом или его компаньоном и обеспечивают широкое антимикробное действие. Кроме того, средство для лечения ран по настоящему изобретению можно использовать с физиологическим раствором для промывки или регидратации, его необходимо менять только через 5–10 дней (на основе цветного визуального индикатора), и, что существенно, предложенное средство для лечения интегрируется в ложе для ран, способствует заживлению ран и обеспечивают удобный и эффективный визуальный указатель протекания интеграции при самостоятельном лечении или лечении со стороны других.

[249] Предложенное средство для лечения ран хорошо подходит для боевых условий или чрезвычайных ситуаций, поскольку оно учитывает и удовлетворяет потребности солдат и медицинского персонала в силу следующих причин:

Антимикробная активность: метиленовый синий МС является сильным противомикробным красителем, противодействующим G-бактериям. Он снижает бактериальную нагрузку в ранах и уменьшает гипергрануляцию. ГВ представляет собой противомикробный краситель, противодействующий G+ бактериям, и он может воздействовать на провоспалительные медиаторы.

Срок годности: средство для лечения ран стабильно при комнатной температуре более 3 лет и устойчиво к физическим нагрузкам. Впоследствии будет проверена его стабильность при длительном воздействии высокой температуры и влажности.

Упаковка: средство для лечения ран в предпочтительном случае индивидуально упаковано в вакуумно запечатанный пакет военного назначения из фольги, содержащий сухой стерилизованный лист рыбьей кожи. Пакеты небольшие, легкие, легко помещаются в кармане или медицинской сумке (рыбья кожа 100 см², 2г). Упаковка устойчива к

влажности и к суровым условиям окружающей среды. Продукт легко транспортировать, хранить, он поставляется в различных размерах.

5 Простота использования: Применение средства для лечения ран требует наличия лишь основных медицинских принадлежностей и ограниченных медицинских знаний. Краситель дает пользователям возможность различать между собой раневой гной/струпья и рыбью кожу в ложе раны, что упрощает последующее лечение.

10 Отсутствие пятен: в средстве для лечения ран используются красящие составы медицинского назначения с известными профилями крашения и распада. При регулярном местном использовании не наблюдалось появления пятен. Авторы изобретения установили, что даже если какой-либо пигмент абсорбируется, профиль его распада составляет от 6 до 12 дней.

15 Съёмность: средство для лечения ран не нужно снимать с раны. Заменитель кожи, такой как рыбья кожа, вовлекает в свою структуру нативные клетки человека, которые в конечном итоге преобразуют заменитель кожи, например рыбью кожу, в новую ткань. Однако при необходимости продукт можно легко удалить, захватив его пинцетом или стерев влажной марлей, когда рыбья кожа уже начала интегрироваться.

20 Использование в суровых условиях: средство для лечения ран можно использовать в месте повреждения или вблизи него как в качестве окончательного средства лечения ран, так и в качестве временного антимикробного покрытия. Заменитель кожи, такой как рыбья кожа, интегрируется медленно, что приводит к менее частым сменам повязок.

25 Ослабление боли: средство для лечения ран уникальным образом обеспечивает кожный покров раны, создавая внутреннюю среду тела. Трансплантат, который в случае рыбьей кожи богат жирными кислотами, в том числе Омега-3, помогает защитить открытые нервные окончания, уменьшает воспаление и положительно влияет на боль через липидные медиаторы.

30 [250] Важной целью настоящего изобретения является предоставление министерству обороны США и персоналу служб экстренной помощи инновационного решения для лечения ран в месте повреждения или вблизи него в виде антимикробного заменителя кожи, одобренного управлением FDA. Предложенное 35 средство для лечения ран обладает превосходными заживляющими свойствами и мощной противомикробной активностью. Средство для лечения ран можно применять в качестве окончательного средства для небольших и менее серьезных ран и в

качестве временного антимикробного покрытия для тяжелых травм, требующих обращения к более высоким уровням медицинской помощи. Кроме того, краситель позволяет медицинским работникам различать между собой интегрирующийся заменитель кожи и гной или материал некроза раны.

5 [251] Предложенное средство для лечения ран способствует заживлению ран благодаря комбинации следующих факторов: 1). Оно действует как внеклеточный матрикс, который интегрируется в рану, обеспечивая структурную поддержку клеткам-хозяевам для заживления и регенерации тканей. 2). МС и ГВ ингибируют G+ и G- бактерии, а также грибы, предотвращая тем самым образование биопленок и снижая 10 риск заражения. 3). Необходимость в меньшем количестве замен повязок обуславливает меньшую подверженность раны загрязнениям и механическим травмам, имеющим место быть при многократном снятии повязки. 4). Цвет помогает пользователям, не имеющим медицинского образования, подобрать оптимальные противомикробные препараты и повязку. 5). Биомолекулы, естественно 15 присутствующие в заменителе кожи, например, рыбьей коже (Омега-3 и коллаген), или добавленные активные вещества уменьшают боль, воспаление и кровотечение.

[252] Предложенное средство для лечения ран можно использовать в качестве окончательного и временного средства для случая небольших и крупных ран/ожогов в целях предотвращения инфекций, обеспечения покрытия и ускорения заживления.

20 [253] Предпочтительные варианты заменителей кожи, такие как децеллюляризованные, лиофилизированные трансплантаты рыбьей кожи, чрезвычайно эффективно иницируют и ускоряют естественный процесс заживления. Заменитель кожи, в частности физический каркас, а более предпочтительно физический каркас из рыбьей кожи, позволяет клеткам проникать внутрь себя и 25 обеспечивает биомолекулы для уменьшения воспаления и боли. Эти свойства были неоднократно продемонстрированы *in vitro*, *in vivo* и в клинических исследованиях. Кроме того, в следующем предпочтительном варианте рыба кожа богата природными Омега-3, которые, как было показано, действуют в качестве барьера для бактериальной инвазии, обладают противовирусным потенциалом, а также 30 бактериостатическим и антибактериальным действием.

[254] Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения, рыба кожа демонстрирует свойства защиты от бактерий. Возможно, наиболее убедительным доказательством способности неокрашенной рыбьей кожи уменьшать раневые инфекции является независимое исследование с участием 21 пациента, 35 проведенное в Институте Кюри в Париже, где уровень заражения донорских участков с расщеплением по толщине был снижен с 60% до 0% для средства из рыбьей кожи по лечению раны. Даже неокрашенный трансплантат из рыбьей кожи может действовать

как бактериальный барьер против золотистого стафилококка в течение срока до 48–72 часов при оптимальных условиях роста бактерий. Исследование *in vivo* на модели инфицированных мышей продемонстрировало, что рыба кожа может действовать как бактериальный барьер против *P. mirabilis*, одного из наиболее часто выявляемых штаммов МЛР при инфекциях, связанных с боевыми травмами.

[255] Метиленовый синий и генцианвиолет обеспечивают дополнительные антибактериальные свойства. Достижения в лечении ран привели к сочетанию антибактериальных агентов, таких как серебро, йод, полигексаметиленбигуанид (ПГМБ), с традиционными раневыми повязками. Хотя серебро и йод обладают сильным антибактериальным действием, длительное применение этих агентов приводит к высокому уровню цитотоксичности для клеток-хозяев. МС и ГВ одобрены управлением FDA, могут использоваться местно и демонстрируют превосходный результат при лечении хронических ран с местной инфекцией.

[256] Данные *in vitro* показали обнадеживающие результаты для контрольных образцов, соответствующих предпочтительным вариантам настоящего изобретения. Тесты основаны на ASTM E2149 и анализах зоны ингибирования Кирби-Бауэра. Оба анализа показали, что трансплантаты из рыба кожи, пропитанные МС и ГВ, эффективно ингибируют как *E. coli*, так и *Staphylococcus aureus* в растворе и на чашках с агаром.

[257] На фиг.14А и 14В показаны результаты (А) ASTM E2149 для *E. coli*, а на фиг.14С показаны результаты (В) анализа зоны ингибирования Кирби-Бауэра на *Staphylococcus aureus*. На фиг.14А и 14В показаны результаты применения антибактериальной рыба кожи, помещенной в суспензию *E. coli* и подвергаемой встряхиванию в течение 24 часов, при этом четко наблюдалось уменьшение количества бактерий между антимикробной рыба кожей (Диск 1) (фиг.14А) и исходной рыба кожей (Диск 2) (фиг.14Б). На фиг.14С (В) рыба кожа, обработанная различными концентрациями метиленового синего и генцианвиолета в диапазоне от 0,1% мас./об. (секция 1410), 0,5% мас./об. (секция 1420) и 1% мас./об. (секция 1430), показала четкие зоны ингибирования на пластинке с агаром, инокулированным *Staphylococcus aureus*, при этом на исходной рыба кожей зоны ингибирования не наблюдалось.

[258] Заявитель располагает обширными научными данными, демонстрирующими целебные свойства рыба кожи. Сюда входят два рандомизированных клинических исследования острых ран, в которых было показано, что рыба кожа обеспечивает более эффективное заживление по сравнению с продуктами на основе клеток и тканей млекопитающих (СТР), например (Oasis)17 и мембраной амниона/хориона человека, за время полного заживления, а также

клиническое исследование донорного сайта, в котором использование рыбьей кожи вдвое сократило время излечения пациентов. Что касается рыбьей кожи как иллюстративного и предпочтительного варианта изобретения, то имеется множество независимых публикаций о ряде случаев с чрезвычайно положительными результатами.

[259] Изготовление регенерирующего ткань средства для лечения ран, и в частности, регенерирующего ткань средства для лечения ран на основе рыбьей кожи, вполне эффективно в практическом плане. Дополнительный этап пропитки заменителя кожи антибактериальным красителем требует минимального вовлечения нового оборудования. МС и ГВ легкодоступны на рынке в фармацевтическом качестве.

[260] Варианты предложенного регенерирующего ткань средства для лечения ран, и, в частности, регенерирующего ткань средства для лечения ран, содержащего рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающего противомикробными свойствами, обеспечиваемыми либо красителем (агентами), либо дополнительными добавленными активными агентами, могут быть эффективными в случае использования в качестве временного антимикробного каркаса для лечения ран, включая: язвы, обусловленные синдромом диабетической стопы, артериальные язвы, пролежни, венозные язвы ног и травматические язвы. Считается, что в совокупности эти типы ран служат причиной 54% ампутаций голени в США, что является крайне удручающим показателем. Почти половина людей, перенесших ампутацию из-за сосудистого заболевания, умирает в течение пяти лет. Это выше, чем пятилетний уровень смертности от рака молочной железы, рака толстой кишки и рака простаты.

[261] В США действует следующий стандарт лечения хронических язв: Обычный или стандартный уход за установившимися хроническими ранами включает в себя следующие общие принципы, применимые к лечению всех типов ран: Удалить некротическую ткань путем хирургического вмешательства (обычно первичной хирургической обработки); Поддерживать баланс влаги путем выбора подходящей повязки для раны с обеспечением контроля экссудата; Принять меры по предотвращению раневых инфекций или по их лечению; Корректировать ишемию в области раны; В случае венозных язв на ногах применять некоторую форму компрессии; В случае язв, обусловленных синдромом диабетической стопы, применять некоторую форму разгрузки.

[262] Варианты предложенного регенерирующего ткань средства для лечения ран, и, в частности, регенерирующего ткань средства для лечения ран, содержащего рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающего противомикробными свойствами, обеспечиваемыми либо красителем (агентами), либо дополнительными добавленными активными агентами, могут быть более эффективными при лечении

хронических ран по сравнению со стандартом SOC, установленным для заменителей кожи, причем они потому более эффективны в лечении хронических ран по сравнению с SOC, поскольку обеспечивают временный каркас и сопротивление росту бактерий внутри повязки. Предполагается, что в контексте настоящей заявки стандарт 5 медицинского обслуживания определяется точно также как он определен управлением США по исследованиям и качеству в здравоохранении (управление AHRQ – от англ. Agency for Healthcare Research and Quality). Изделие-образец из децеллюляризированной рыбьей кожи для лечения ран, в рамках рандомизированного клинического исследования продемонстрировало возможность значительно более 10 быстрого исцеления по сравнению со стандартным лечением - коллагеновой повязкой. Изделие обеспечивает более эффективное лечение по сравнению с текущими стандартами лечения, определенными управлением AHRQ.

[263] Варианты предложенного регенерирующего ткань средства для лечения ран, и, в частности, регенерирующего ткань средства для лечения ран, содержащего 15 рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающего противомикробными свойствами, обеспечиваемыми либо красителем (агентами), либо дополнительными добавленными активными агентами, позволяют достичь такого же улучшения, какое предписано стандартом SOC, но помимо этого они демонстрируют устойчивость к росту бактерий и обладают определенными характеристиками временного каркаса.

[264] Хотя в предпочтительном случае предложенное регенерирующее ткань 20 средство для лечения ран содержит рыбью кожу в качестве заменителя кожи, следует понимать, что в нем можно использовать и другие заменители кожи, отличные от продуктов из рыбьей кожи или средств для лечения ран на основе рыбьей кожи, предлагаемых Kerecis™.

[265] В рамках расширенного сравнения отметим, что рассматриваемое 25 изделие обеспечивает более эффективное лечение по сравнению с только появляющимися средствами лечения. В эту заявку авторы включили в качестве заменителя кожи только появляющиеся средства лечения, которым присвоен Q-код в обозначениях отраслевого классификатора медицинских услуг (классификатора 30 HCPCS от англ. Healthcare Common Procedure Coding System).

[266] Как отмечалось выше, группа заменителей кожи, которые можно использовать в качестве заменителей кожи согласно настоящему изобретению, является большой и разнообразной. 2 февраля 2020 года была опубликована программа оценки технологий управления AHRQ, озаглавленная как «Заменители 35 кожи для лечения хронических ран», технический краткий проект с идентификатором WNDT0818, в таблице 2 на страницах 9–13 которой приведены 76 коммерчески доступных продуктов с небольшим анализом, сравнивающим их для внутренних целей.

Каждый из перечисленных заменителей кожи может представлять собой вариант заменителя кожи согласно настоящему изобретению.

[267] При выявлении более эффективных средств лечения основное внимание уделяют сравнению результатов лечения, антибактериальных свойств и характеристик временного каркаса, а также их влияния на использование.

[268] Сочетание противомикробного красителя с биоразлагаемым каркасом не должно оказывать негативного влияния по меньшей мере на основную функцию каждого из них, но потенциально такое сочетание может иметь синергетический аддитивный эффект.

[269] Под временным каркасом можно понимать тканевый каркас, который способствует регенерации ткани за счет врастания клеток, ревазуляризации и регенерации внеклеточного матрикса. Современные временные каркасы не препятствуют росту бактерий. Действительно, в некоторых случаях коллаген может служить питанием для бактерий. В настоящее время продукты временного каркаса не рекомендованы для использования при лечении ран.

[270] Антимикробный продукт предотвращает бактериальную колонизацию, но не факт, что он способствует созданию каркаса (для продуктов на основе серебра это может быть даже вредно из-за цитотоксических эффектов).

[271] Предложенные в изобретении регенерирующие ткань средства для лечения ран, и, в частности, регенерирующие ткань средства для лечения ран, содержащие рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающие противомикробными свойствами, обеспечиваемыми либо красителем (агентами), либо дополнительными добавленными активными агентами, обеспечивают то, что может называть «идентификацией изделия». Когда на рану наложили рассасывающуюся повязку, может быть трудно определить, что является активным, но частично абсорбирующим изделием, а что представляет собой материал раны, который следует удалить. Это обстоятельство может привести к несвоевременной смене повязки. В настоящее время ни один рассасывающийся раневой продукт не имеет цветовой маркировки.

[272] Сочетание каркаса и противомикробного красителя обеспечивает дополнительный синергетический эффект.

[273] Предложенное в изобретении регенерирующее ткань средство для лечения ран, и, в частности, регенерирующее ткань средство для лечения ран, содержащее рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающее противомикробными свойствами, обеспечиваемыми либо красителем (агентами), либо дополнительными добавленными активными агентами, представляет собой первый известный изобретателям продукт для лечения ран, который способен обеспечить

временный каркас и идентификацию рассасывающейся раневой повязки. В сочетании с противомикробной защитой он снижает вероятность возникновения бактерий, вызывающих воспаление или прорастающих в продукт, что может привести к ускоренному разрушению. Кроме того, возможность простой идентификации изделия позволяет более точно менять повязки.

[274] Временные каркасы можно сравнить с другими заменителями кожи. Временный каркас способствует вращанию клеток, реваскуляризации и регенерации внеклеточного матрикса. Поскольку область тканевой инженерии еще продолжает развиваться, критерии идеального кожного трансплантата сместились в сторону материала, который поддерживает интеграцию клеток и рост тканей. Каркас должен удовлетворять по меньшей мере одному из следующих, а предпочтительно всем следующим критериям: обеспечивать и стимулировать вращание клеток; обеспечивать равномерное пространственное распределение клеток; способствовать регенерации внеклеточного матрикса; способствовать реваскуляризации; не вызывать реакции на инородное тело; быстро интегрироваться в рану; быть механически прочным и стабильным.

[275] Авторы изобретения показали, что технология трансплантации рыбьей кожи, описанная в настоящей заявке, может обеспечить функцию временного каркаса. Кроме того, данные показывают, что результаты применения каркасов в отношении вращающихся клеток, реваскуляризации и регенерации внеклеточного матрикса более эффективны, чем у других известных изделий, таких как изделие с рассасывающимся коллагеном, например, Primatrix.

[276] На основании этих результатов можно утверждать, что раскрытые в заявке регенерирующие ткань средства для лечения ран, и, в частности, регенерирующие ткань средства для лечения ран, содержащие рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающие противомикробными свойствами, обеспечиваемыми либо красителем (агентами), либо дополнительными добавленными активными агентами, обеспечивают более эффективное лечение, действуя как временный каркас, чем стандартные медицинские средства.

[277] Добавление антимикробных агентов в исходную рыбью кожу обеспечивает противомикробную защиту изделия. Изобретатели обнаружили, что добавление надлежащих красителей не оказывает негативного влияния на фундаментальный каркасный эффект рыбьей кожи. МС и ГВ представляют собой органические красители, которые можно использовать для уменьшения количества микробов в клинических условиях с минимальной токсичностью для человека. МС и ГВ можно использовать местно для быстрой корректировки локализованной бактериальной нагрузки в ранах. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения

концентрацию МС и ГВ поддерживают на уровне, равном или менее 0,00025 г/г (0,01%), что ниже концентрации в Hydrofera Blue Ready (равной или менее 0,0035 г/г каждого цвета) и значительно ниже концентрации серийно выпускаемых агентов местного применения 1% МС и ГВ. Конечно, Hydrofera Blue Ready можно использовать в качестве другого варианта красителя. ГВ и МС можно использовать в сочетании с ферментативными агентами, факторами роста и гидрогелями, не ингибируя действие сопутствующих продуктов.

[278] Авторы изобретения обнаружили, что использование МС и ГВ в предложенном регенерирующем ткань средстве для лечения ран, и, в частности, регенерирующем ткань средстве для лечения ран, содержащем рыбью кожу в качестве заменителя кожи, не ухудшает каркасные эффекты рыбьей кожи. Добавление МС и ГВ в рыбью кожу можно осуществлять на заключительном этапе производственного процесса перед стерилизацией. Этот этап не влияет на внешний вид, материал, функционал, упаковку и стерилизацию изначальной рыбьей кожи.

[279] Недавно было проведено исследование (Stone II, Международный журнал молекулярных наук, 2021 г.), в котором сравнивали трансплантат рыбьей кожи с фетальной бычьей дермой (Primatrix) при лечении глубоких ожоговых ран частичной толщины (ЧТ) на доклинической свиной модели. Целью этого исследования было определить, насколько хорошо трансплантат рыбьей кожи действует на ЧТ ожоговые раны, как он интегрируется и улучшает ли долгосрочное заживление. Установлено, что в условиях исследования трансплантат рыбьей кожи быстрее интегрировался в ложе раны по сравнению с фетальной бычьей дермой. Трансплантат рыбьей кожи обеспечивал более быструю реэпителизацию. Начиная с 10-го дня до 28-го дня, особенно на 14-й день, разница между трансплантатом рыбьей кожи и фетальной бычьей дермой была значительной. Пересадка рыбьей кожи привела к увеличению кровотока и увеличению новообразованных кровеносных сосудов. Пересадка рыбьей кожи обусловила полное формирование эпидермиса по прошествии 21 дня. А трансплантация рыбьей кожи вызывала меньше воспалительных реакций (меньше инородных тел, меньше воспалительных клеток).

[280] Хотя результаты этого исследования доказывают, что трансплантаты из рыбьей кожи являются предпочтительными, продукт из фетальной бычьей дермы (Primatrix), конечно, тоже можно использовать в качестве эффективного заменителя кожи согласно настоящему изобретению, и при некоторых условиях или соображениях его также можно рассматривать в качестве предпочтительного варианта заменителя кожи, предложенного в настоящем изобретении.

[281] Кроме того, хотя это исследование было проведено на неокрашенной версии продукта из рыбьей кожи без антимикробных агентов МС и ГВ, степень

образовавшейся раны была классифицирована как глубокая ожоговая рана частичной толщины, которая повреждает как слои эпидермиса, так и дерму, и часто требует сложного продолжительного лечения. Роль рыбьей кожи в этом исследовании заключается в том, чтобы действовать не только как временное покрытие, но и как временный каркас для долгосрочного заживления. Это исследование дает много важных сведений об эффектах, производимых каркасом из оригинальной рыбьей кожи.

[282] Предложенное в изобретении регенерирующее ткань средство для лечения ран, и, в частности, регенерирующее ткань средство для лечения ран, содержащее рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающее противомикробными свойствами, обеспечиваемыми либо красителем (агентами), либо дополнительными добавленными активными агентами, предотвращает бактериальную колонизацию в рассматриваемом имплантате по сравнению с другими известными в настоящее время заменителями кожи.

[283] Фразу «бактериальная защита» можно понимать в смысле, что противомикробные препараты широкого спектра действия обеспечивают защиту от проникновения бактерий через повязку, поскольку это действие может уменьшить инфекцию и гарантировать, что временный каркас функционирует должным образом.

[284] Заменители кожи в широком смысле можно рассматривать как биоразлагаемые ткани, которые проникают в собственные клетки организма, а затем интегрируются, поглощаются или разрушаются. Большинство заменителей кожи обладают низкой естественной способностью отражать бактериальную инвазию и могут колонизоваться, если в ране присутствуют бактерии. Бактериальная колонизация заменителя кожи может привести к его более быстрому разрушению и снизить вероятность врастания клеток хозяина.

[285] Из 76 заменителей кожи приведены два других заменителя кожи, которые обеспечивают некоторые антибактериальные эффекты, а именно PriMatrix AG и PugarlyAM. Однако было обнаружено, что ни один из этих двух препаратов не обладает таким же антибактериальным спектром и противогрибковой активностью, как противомикробные агенты, используемые в предложенном регенерирующем ткань средстве для лечения ран, и, в частности, регенерирующем ткань средстве для лечения ран, содержащем рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающем противомикробными свойствами, обеспечиваемыми либо красителем (агентами), либо дополнительными добавленными активными агентами. Конечно, как отмечалось выше, PriMatrix AG и PugarlyAM по-прежнему можно рассматривать в качестве вариантов заменителей кожи, отвечающих настоящему изобретению. Действительно, при определенных обстоятельствах и условиях, они могут являться предпочтительными вариантами осуществления изобретения.

Hydrophera	Puraply AM	Kroma AM	Primatrix AG
Bacillus subtilis	Aspergillus niger	Escherichia coli**	Escherichia coli
Escherichia coli	Candida albicans	Pseudomonas aeruginosa**	
MRSA	Staphylococcus aureus	Candida albicans*	Methicillin Resistant Staphylococcus (MRSA)
VRE	MRSA	Bacillus subtilis*	Vancomycin Resistant Enterococcus faecalis (VRE)
Serratia marcescens	Pseudomonas aeruginosa	MRSA*	Serratia marcescens
Staph aureus	Escherichia coli	VRE*	Staphylococcus aureus,
Staph epidermidis		Serratia marcescens*	Staphylococcus epidermidis
Pseudomonas aeruginosa		Staph aureus**	Acinetobacter baumannii
Pseudomonas fluorescens		Staph epidermidis*	Listeria monocytogenes
Enterococcus faecalis		Pseudomonas aeruginosa*	Enterococcus faecium
Streptococcus pyogenes		Pseudomonas fluorescens*	Streptococcus pyogenes (Группа А)
Klebsiella pneumoniae		Enterococcus faecalis*	
Proteus mirabilis		Streptococcus pyogenes*	
Proteus vulgaris		Klebsiella pneumoniae*	
Enterobacter aerogenes		Proteus mirabilis*	
Yersinia enterocolitica		Proteus vulgaris*	
Candida albicans		Enterobacter aerogenes*	
Candida krusei		Yersinia enterocolitica*	
Candida glabrata		Candida krusei*	
		Candida glabrata*	
		Aspergillus niger*	

[286] Конечно, как отмечалось выше, PriMatrix AG и PuraplyAM по-прежнему

можно рассматривать в качестве вариантов заменителей кожи по настоящему изобретению, и действительно, при определенных обстоятельствах и условиях, они могут являться предпочтительными вариантами изобретения. Антибактериальный спектр рассматриваемого изделия сопоставим с Hydrofera Blue, представляющей собой повязку с эквивалентной концентрацией МС и ГВ.

[287] Предложенные в изобретении регенерирующие ткань средства для лечения ран, и, в частности, регенерирующие ткань средства для лечения ран, содержащие рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающие противомикробными свойствами, обеспечиваемыми либо красителем (агентами), либо дополнительными добавленными активными агентами, могут обеспечить то, что можно назвать термином «идентификация изделия» и что способствует оптимальному циклу применения. Под «идентификацией изделия» можно понимать красители, упрощающие идентификацию продукта, внедренного в раневое ложе.

[288] Заменители кожи перед применением характеризуются наибольшей прозрачностью или являются почти белыми, но при внедрении в ложе раны они становятся прозрачными, белыми или карамелизированными. В некоторых случаях этот внешний вид может быть неотличим от раневых струпьев, экссудата или биопленки, особенно для менее опытных пользователей. Это обстоятельство затрудняет определение того, полностью ли интегрировался заменитель кожи и нуждается ли он в замене, или же он все еще частично активен и может дольше оставаться в ране. Невозможность определить, имеется ли в ране активный заменитель кожи, может привести к трем возможным последствиям: (1) Струп в ране ошибочно принимают за коллагеновую повязку, что приводит к тому, что врач не удаляет струп из раны и, следовательно, заживление раны замедляется, а риск заражения увеличивается; (2) Активный продукт в ране ошибочно принимают за струп, что приводит к преждевременному удалению изделия врачом; и (3) Удаление активной временной каркасной ткани вместе с новыми клетками-хозяевами, которые выросли в нее.

[289] Активный продукт в ране ошибочно принимают за струпья. Это приводит к преждевременному повторному наложению изделия при ненужном вмешательстве и соответствующими издержками для пациента.

[290] Новое изделие, раскрытое в настоящей заявке, окрашено с использованием биосовместимых красителей, позволяющих просто и надежно отличать его от струпьев или другой ткани. Это достигается посредством описанных красителей, которые связывают цвет с трансплантатом.

[291] Предложенное изделие представляет прорывную технологию и инновационное применение технологии, которая потенциально может привести к

клиническому улучшению лечения хронических незаживающих ран и предотвратить возможные ампутации. Изделие предлагает трехмерную структуру, способствующую проникновению и пролиферации человеческих клеток, реваскуляризации и одновременному подавлению бактериальной колонизации на каркасе.

5 [292] Предложенные в изобретении регенерирующие ткань средства для
лечения ран, и, в частности, регенерирующие ткань средства для лечения ран,
содержащие рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающие
противомикробными свойствами, обеспечиваемыми либо красителем (агентами), либо
дополнительными добавленными активными агентами, обладают по меньшей мере
10 одной, а в предпочтительном случае всеми из следующих характеристик: обеспечение
стабильного рассасываемого каркаса, способствующего вращанию клеток и
реваскуляризации; обеспечение широкого спектра мер по борьбе с микроорганизмами,
часто присутствующими в ранах; способность не создавать токсичность для клеток-
хозяев и не ингибировать вращание клеток по аналогии с повязкой, содержащей
15 серебро; способность не вызывать мутацию бактерий, повышающую резистентность к
противомикробным препаратам, по аналогии с противомикробными повязками.

[293] Кроме того, изменение цвета повязки может происходить из-за истощения красителей, что может служить важным визуальным индикатором, указывающим на необходимость замены повязки.

20 [294] Заявитель располагает многочисленными данными о временных каркасах
in vitro и in vivo на ранее проверенном изделии Omega3 Wound. Данные изобретателей
показывают, что добавление красителей (противомикробных агентов) к каркасу не
ухудшает основные его функции, а оказывает синергетический аддитивный эффект.

[295] В исследовании in vitro (Magnusson, Military Medicine, 2017) по вращанию
25 клеток было обнаружено, что фибробласты инфильтрируют и реконструируют
трансплантат из рыбьей кожи в течение 12 дней в отличие от материала hНАСМ,
который демонстрировал худшую инфильтрацию фибробластов. Предложенные в
изобретении регенерирующие ткань средства для лечения ран, и, в частности,
регенерирующие ткань средства для лечения ран, содержащие рыбью кожу в качестве
заменителя кожи и обладающие противомикробными свойствами, обеспечиваемыми
30 либо красителем (агентами), либо дополнительными добавленными активными
агентами, сохраняют ту же пористую структуру и размер пор как у исходной рыбьей
кожи, что способствует проникновению клеток в каркас. В рамках решения проблемы
токсичности МС и ГВ для клеток, авторы изобретения провели предварительные тесты
35 на цитотоксичность и обнаружили, что МС и ГВ не вызывают никаких опасений по
поводу цитотоксичности. Кроме того, поскольку эталонное изделие Hydrofera Blue
Ready содержит более высокие концентрации МС и ГВ, но не вызывает каких-либо

проблем с цитотоксичностью, предложенные в изобретении регенерирующие ткань средства для лечения ран, и, в частности, регенерирующие ткань средства для лечения ран, содержащие рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающие противомикробными свойствами, обеспечиваемыми либо красителем (агентами), либо
5 дополнительными добавленными активными агентами, не должны оказывать какого-либо неблагоприятного воздействия на вращение клеток.

[296] Предварительные сравнительные исследования продемонстрировали эффективное влияние на антибактериальную способность предложенных в изобретении регенерирующих ткань средств для лечения ран, и, в частности,
10 регенерирующих ткань средств для лечения ран, содержащих рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающих противомикробными свойствами, обеспечиваемыми красителем (агентами) (МС/ГВ). Тест проводили с использованием трех микроорганизмов, наиболее часто встречающихся при раневых инфекциях: *E. coli*,
15 *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Методы тестирования варьировались от простых базовых анализов, таких как диффузия в агаровом диске, до более сложных промышленных стандартизированных тестов, таких как AATCC100 и ASTM E2149. Результаты диффузии на агаровом диске показали, что по сравнению с Omega3 Wound и Primatrix AG, предложенные в изобретении регенерирующие ткань средства для лечения ран,
20 содержащие рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающие противомикробными свойствами, обеспечиваемыми красителем (агентами) (МС/ГВ), продемонстрировали образование четко выраженной зоны ингибирования *S. aureus*. Диаметр зоны ингибирования составлял $17,25 \pm 0,5$ мм в случае предложенных в изобретении регенерирующих ткань средств для лечения ран, содержащих рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающих противомикробными свойствами,
25 обеспечиваемыми красителем (агентами) (МС/ГВ), $11,67 \pm 0,58$ в случае Primatrix AG, при этом на рыбью кожу никакого эффекта оказано не было, поэтому зона ингибирования имела тот же диаметр, что и диаметр образца (6 мм). Результаты оценки AATCC100 продемонстрировали высокую эффективность предложенных в изобретении регенерирующих ткань средств для лечения ран, содержащих рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающих противомикробными свойствами,
30 обеспечиваемыми красителем (агентами) (МС/ГВ), как *S. Aureus*, так и с *P. aeruginosa*. Степень ослабления для *P. aeruginosa* оценили примерно в 98%. Предложенные в изобретении регенерирующие ткань средства для лечения ран, содержащие рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающие противомикробными свойствами,
35 обеспечиваемыми красителем (агентами) (МС/ГВ), показали сильную антибактериальную эффективность как против *S. aureus*, так и против *P. aeruginosa*. Результаты теста ASTM E2149 продемонстрировали снижение роста в суспензии

E. coli при использовании Kroma Antimicrobial. На чашке с агаром образовалось 37 колоний с предложенными в изобретении регенерирующими ткань средствами для лечения ран, содержащими рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающими противомикробными свойствами, обеспечиваемыми красителем (агентами) (МС/ГВ), тогда как этих колоний было 445 и 491 в неокрашенной рыбьей коже и самой суспензии E. coli. Скорость ослабления роста составляла примерно 92-93% в пользу предложенных в изобретении регенерирующих ткань средств для лечения ран, содержащих рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающих противомикробными свойствами, обеспечиваемыми красителем (агентами) (МС/ГВ).

5
10 [297] Учитывая обнадеживающие результаты предварительных испытаний, полученные авторами изобретения, можно утверждать, что предложенные регенерирующие ткань средства для лечения ран, содержащие рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающие противомикробными свойствами, обеспечиваемыми красителем (агентами) (МС/ГВ), обеспечивают возможность более эффективного 15 противомикробного лечения ран различных типов.

[298] Коллагеновые каркасы широко используются для лечения хронических ран, способствуя их заживлению. Биоактивные раневые повязки имеют преимущество перед другими типами повязок, поскольку их биосовместимость и подобие ВМК-матрице усиливают прорастание клеток и регенерацию тканей.

20 [299] Авторы выявили и описали различные варианты осуществления изобретения, включая предпочтительный вариант с использованием временного каркаса из рыбьей кожи в сочетании с двумя противомикробными красителями для лечения ран в качестве эффективного барьера для противодействия микробной колонизации внутри каркаса. Временный каркас способствует реваскуляризации и 25 вращанию клеток и при этом подавляет микробную колонизацию повязки.

[300] Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения, предложенные регенерирующие ткань средства для лечения ран, содержащие рыбью кожу в качестве заменителя кожи и обладающие противомикробными свойствами, обеспечиваемыми красителем (агентами) (МС/ГВ), представляют собой бесклеточный 30 рассасывающийся матрикс из рыбьей кожи для лечения ран. Средство для лечения ран действует как временный каркас, способствующий реваскуляризации и вращанию клеток, подавляя при этом бактериальную колонизацию на каркасе. Изделие содержит два противомикробных агента, обеспечивающих противомикробную защиту широкого спектра действия, а именно метиленовый синий и генцианвиолет (кристалвиолет) на 35 каркасе. Предложенное изделие поставляется в виде стерильного интактного или сетчатого листа размером до 20 x 30 см. Антимикробные препараты широкого спектра действия создают барьер для проникновения бактерий через повязку, поскольку это

может способствовать уменьшению инфекции и обеспечивает надлежащее функционирование временного каркаса.

[301] *Показания к применению*

5 [302] Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения, предложенные регенерирующие ткань средства для лечения ран предназначены для использования в качестве антимикробного временного каркаса для лечения ран, включая: язвы диабетической стопы, артериальные язвы, пролежни, венозные язвы ног и травматические раны.

10

[303] *Состав изделия*

[304] Согласно предпочтительному варианту осуществления изобретения, предложенные регенерирующие ткань средства для лечения ран представляют собой медицинское изделие из рыбьей кожи, предназначенное для лечения ран.
15 Предложенный каркасный материал, иногда также называемый в заявке изделием, получен из кожи промысловой североатлантической трески (*Gadus morhua*) посредством стандартизированного контролируемого производственного процесса и поставляется в стерильной упаковке в виде термосвариваемого пакета следующих размеров: 16 мм. диск; 2x2 см; 2x4 см; 5x5 см; 10x10 см; 20x30 см. Изделие также
20 может быть предоставлено в парциализированной форме, как описано и показано выше.

[305] Изделие может содержать два противомикробных агента, такие как метиленовый синий и генцианвиолет (кристаллвиолет), обеспечивающих противомикробную защиту широкого спектра действия на каркасе. Концентрацию МС и
25 ГВ контролируют на уровне не более 0,00025 г/г (0,01%), но она может составлять до 0,1% и менее.

[306] В предпочтительном случае предложенное изделие со временем полностью интегрируется в окружающую ткань, что соответствует накоплению новой ткани-хозяина. В предпочтительном случае физические свойства предложенного
30 изделия способствуют вращанию клеток. Предпочтительно, чтобы предложенное изделие было биосовместимым, нешитым и биорезорбируемым, прочным и податливым. Его прочность на растяжение позволяет проводить фиксацию швами или скобами.

[307] Механизм действия рассматриваемого изделия можно разбить на три
35 основных случая: 1. Коллагеновая повязка: По существу эквивалентна продукту (K132343) из децеллюляризированной рыбьей кожи для лечения ран, обладающему следующими отличительными свойствами: 1.1. Он пропитан противомикробными

красителями, обеспечивающими: **2a**: «Бактериальный барьер»: противомикробные препараты широкого спектра действия создают защиту от проникновения бактерий через повязку, поскольку это может уменьшить инфекцию и гарантирует, что временный каркас функционирует должным образом. **2b**: «Идентификация изделия»

5 Красящие агенты облегчают идентификацию продукта при его размещении в раневом ложе. 2. «Временный каркас». Временный каркас, способствующий вращению клеток, реваскуляризации и регенерации внеклеточного матрикса. 2.1 Коллагеновая повязка. Предложенное изделие функционирует по существу эквивалентно децеллюляризованному продукту из рыбьей кожи для лечения ран, используемому в 10 качестве коллагеновой повязки, с тем же основным механизмом действия.

[308] Основная цель коллагенового каркаса — служить матрицей для воспроизведения внеклеточного матрикса (ВМК) здоровой ткани. Обеспечивая поддержку клеток, можно помочь в реконструкции многих различных типов тканей, что способствует заживлению ран. Каждый компонент ВМК необходим для каждой фазы 15 заживления ран. Компоненты ВМК играют ключевую роль в содействии пролиферации и дифференцировании клеток, управлении миграцией клеток и модуляции клеточных ответов. Экзогенные ВМК будут подвергаться естественному ремоделированию здоровой ткани в месте раны по мере ее разрушения и заменяться нативным коллагеном. Децеллюляризованная рыбья кожа продукта для лечения ран 20 восстанавливает функциональный ВМК при хронических ранах. Коллагеновая повязка также обеспечивает: (1) влажную среду раны, (2) контроль жидкости и (3) контроль транспирации жидкости.

[309] Децеллюляризованный продукт из рыбьей кожи для лечения ран можно использовать в качестве коллагеновой повязки, поскольку он по существу 25 эквивалентен многим свиным коллагеновым матрицам, прошедшим процедуру предпродажного уведомления 510k. Эффективность продукта в качестве коллагеновой повязки для лечения ран подтверждена исследованием, в котором его сравнивали с Oasis Wound Matrix, коллагеновой повязкой, полученной из млекопитающих. Исследование пришло к выводу, что повязка из рыбьего коллагена не уступает повязке 30 из свиного коллагена, что не выявлено никаких побочных реакций и что улучшение заживления ран происходит в течение 28 недель.

[310] Единственное техническое различие между продуктом из децеллюляризованной рыбьей кожи для лечения ран и рассматриваемым изделием 35 заключается в присутствии красителей. Нет данных или опубликованных данных о том, что какой-либо краситель разрушает коллагеновый каркас или образует с ним поперечные связи. Таким образом, по данным авторов изобретения, существует достаточно доказательств, чтобы утверждать, что рассматриваемое изделие, будь то

заменитель кожи на основе рыбьей кожи или другие заменители кожи, также будет служить каркасом для воспроизведения внеклеточного матрикса, способствующего вращанию клеток и реваскуляризации.

5 [311] В предпочтительных вариантах осуществления изобретения используются красители, демонстрирующие значительное противомикробное действие. Благодаря применению красителей, составляющих примерно 0,01% смеси метиленового синего (МС) и генцианвиолета (ГВ), два этих противомикробных агента обеспечивают противомикробную защиту широкого спектра действия как против грамотрицательных, так и против грамположительных бактерий. Во время контакта с бактериями, присутствующие в рассматриваемом изделии МС и ГВ уничтожают бактерии, что 10 делает маловероятным рост бактерий внутри изделия.

[312] Метиленовый синий входит в семейство фенотиазинов и является одним из первых одобренных управлением FDA терапевтических средств против малярии, когда имеется устойчивость к противомаларийным препаратам. МС 15 продемонстрировал *in vitro* свою бактериальную инактивацию в отношении широкого спектра микроорганизмов, включая *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *C. albicans*.

[313] Пигменты МС и ГВ действуют как индикаторы, позволяющие различать между собой изделие и струп в ране. Поскольку заменитель кожи представляет собой 20 рассасывающуюся повязку, цвет уведомляет врачей, когда повязка полностью интегрируется, и требуется второе наложение. Кроме того, цвет помогает уменьшить вероятность ошибочного снятия повязки, когда врачи проводят обработку ран. Неокрашенные коллагеновые повязки иногда трудно отличить от струпов, если они частично интегрированы.

[314] Например, на фиг.15А показан трансплантат в ране, превратившийся в 25 струп, наполненный бактериями. Для сравнения, на фиг.15В показан трансплантат из рыбьей кожи внутри раны, который интегрировался примерно на 50% и должен оставаться в ране. Однако, как можно видеть при сравнении струпа в ране, показанного на фиг.15А, с трансплантатом в ране, показанного на фиг.15В, трудно правильно и быстро отличить трансплантат, который вырастает, от трансплантата, 30 который превратился в струп. Для сравнения, на фиг.15С показан заменитель кожи, в данном случае трансплантат из рыбьей кожи, окрашенный красителями МС/ГВ. Из фиг.15С совершенно понятно, что показанный на ней трансплантат интегрируется, происходит его вращание, и этот трансплантат следует удерживать еще в течение недели, т.е. его не надо удалять.

35 [315] Исследование *in vitro* с добавлением фибробластов эмбриона мыши поверх рыбьей кожи показало, что каркас кожи очень пористый, и клетки способны мигрировать и пролиферировать в каркасе. В исследовании на животных рыбью кожу

накладывали на ожоговые раны, полученные на модели свиньи. Трансплантация рыбьей кожи привела к более быстрому заживлению ран и продемонстрировала лучший кровоток под рыбьей кожей, а также увеличение количества вновь образованных кровеносных сосудов. В том же исследовании на свиньях трансплантат из рыбьей кожи способствовал полному формированию эпидермиса через 21 день с более быстрой реэпителизацией и меньшей воспалительной реакцией.

[316] При нанесении на рану пациента предложенное изделие быстро интегрируется в рану, обеспечивая временный каркас для миграции и пролиферации клеток, при этом молекулы МС и ГВ ингибируют или устраняют микробную колонизацию на матрице. Обогащенные дермальные коллагеновые волокна способствуют вращанию клеток, ревакуляризации и регенерации внеклеточного матрикса, которые имеют решающее значение для более быстрого заживления ран.

[317] Окрашенный заменитель кожи, например, трансплантат из рыбьей кожи, со временем разрушается в организме. Вращание клеток первичных фибробластов с некоторым воспалительным компонентом в конечном итоге полностью реконструирует и разрушает исходный заменитель кожи (такой как трансплантат из рыбьей кожи) и его цвета.

[318] Ферментативный процесс заключается главным образом в гидролизе коллагена на более мелкие и легкие частицы и в разложении красящих веществ.

[319] Окрашенный заменитель кожи, например, трансплантат из рыбьей кожи, может иметь следующие характеристики: размер до 7x20 см или даже 20x40 см, может быть цельным или сетчатым, а также может иметь вид листов или частиц.

[320] Дополнительные примеры применения средства для лечения ран

[321] В еще одном примере способа или технологии изготовления предложенного регенерирующего ткань средства для лечения ран, применяли следующую процедуру.

[322] До нашего прихода образцы кожи в количестве десяти штук были заморожены пачкой.

[323] Был замешан и приготовлен красящий растворитель, включающий 0,01% и 0,005% раствор МС и ГВ.

[324] Чтобы иметь чистую воду, использовали раковину, которую предварительно прокипятили и проверили на количество бактерий.

[325] Сначала был создан 1% исходный раствор.

[326] ГВ: 650 мг фармацевтического качества (USP), SA-1290002, LOT G1K417, SP1098511 (Distica).

[327] МС: Метиленовый синий, гидратированный для микроскопии, ≥97%,0%,

Sigma-Aldrich 66720-100 г, партия № BCBZ4929.

[328] 0,4 г МС + 0,4 г ГВ добавили к 40 мл чистой (еще теплой) воды в прокипяченной колбе. Заметим, что осталось 250 мг ГВ.

5 [329] Две 2-литровые бутылки наполнили 2л чистой/кипяченой воды (измерялась по весу). Из одной бутылки чистой пипеткой отобрали 10 мл воды, из другой - 20 мл. Эти объемы были заменены исходным раствором для создания растворов МС и ГВ с концентрацией 0,005% и 0,01%, соответственно. После приготовления окончательных растворов вода в бутылках была довольно горячей на ощупь, что могло повлиять на результаты окрашивания.

10 [330] Заметим, что эти два соединения сильно окрасили все поверхности, а следовательно требовалось тщательно очистить все поверхности водой и этанолом.

[331] Затем из морозильной камеры извлекали экземпляры рыбьей кожи и поместили на лед для транспортировки вместе с красящим раствором. Все это перенесли в камеру зоны повышенного риска рядом с сублимационной сушилкой.
15 Экземпляры рыбьей кожи разморозили под проточной водой из крана камеры высокого риска. Когда они стали мягкими и податливыми, их разрезали на две более короткие части, поскольку экземпляры кожи были довольно большими и длинными. 5 экземпляров рыбьей кожи (10 половинок) поместили в два алюминиевых лотка для окрашивания.

20 [332] Около 700 мл раствора Крома поместили в каждый лоток с маркировкой 0,01 и 0,005% соответственно. Затем два лотка поместили в пластиковые пакеты, которые загнули, чтобы уменьшить риск проливания, и поместили на 2 часа на шейкер, характеризующийся скоростью 30 об/мин.

25 [333] Примерно через 20–30 минут экземпляры кожи начали перемещать с места на место стерильными щипцами, чтобы обеспечить равномерное окрашивание. Примерно через 20 минут стало очевидно, что красящие растворы теряют плотность и становятся более прозрачными, поскольку рыбья кожа впитывает краситель. Чтобы скорректировать это, в каждый лоток добавили около 300 мл красящего раствора, т.е. есть конечный объем окрашивания составил около 1000 мл.

30 [334] Часть как исходных окрашивающих растворов, так и остатков использованных красящих растворов сохраняют в пробирках емкостью 50 мл для возможного количественного определения концентрации в дальнейшем. Это, в сочетании с измерениями размеров и веса рыбьей кожи после сублимационной сушки, может позволить количественно оценить примерное поглощение цвета рыбьей кожей.

35 [335] Сублимационная сушилка была запущена сразу после 18:00, так как подготовка ее к работе заняла около 45 минут.

[336] Сублимационная сушилка не запустилась из-за компьютерной ошибки.

Таким образом, окрашивание заняло около 3 часов (заметим, что шейкер возвращается к исходной скорости встряхивания, которая быстрее, через 3 часа). Экземпляры кожи тщательно промыли проточной водопроводной водой в помещении повышенного риска в течение 10–15 мин.

5 [337] Оставшийся красящий раствор определенно снова немного посветлел, и была небольшая разница в цвете двух партий рыбьей кожи: 0,01% был настоящим джинсовым темно-синим, а 0,005% больше напоминал средне-синий джинсовый оттенок. Образцы оставшейся красящей жидкости собирали в пробирки емкостью 50 мл, в случае если количественное определение было возможно. Обе партии заняли 10 около 1 и 1/2 тарелки, так что всего у нас было три полных тарелки. Более сильно окрашенная кожа находилась на левой стороне общей тарелки.

[338] Сублимационную сушку начали около 8:30 вечера и оставили на ночь.

[339] Утром рыбью кожу лиофилизировали и упаковывали для нестерильного использования. Оставшиеся 0,01 и 0,005% растворы (комнатной температуры) 15 использовали для повторения еще одной партии на следующий день.

[340] Дополнительные примеры изготовления прототипа средства для лечения ран

20 [341] Требуется изготовить два прототипа окрашенной кожи трески с двумя разными концентрациями метилинового синего и генцианвиолета. Концентрация окрашивающих растворов составляет 0,01% водного раствора (мас./об.); Метилиновый синий (50%) и генцианвиолет (50%) и 0,005% водный раствор (вес/об); Метилиновый синий (50%) и генцианвиолет (50%).

25 [342] Материал: 10 экземпляров кожи трески, очищенных от чешуи и обесклетченных, партия DC 21039A; 1 литр 0,01% водного раствора по объему; Метилиновый синий (50%) и генцианвиолет (50%); 1 литр 0,005% водного раствора; Метилиновый синий (50%) и генцианвиолет (50%); 10 алюминиевых лотков; Ножницы; Маленькие пакеты Тайвек; Большие пакеты Тайвек; Большие полиэтиленовые пакеты; шейкер; Герметик.

30 [343] Изготовление прототипа: все экземпляры кожи трески были получены с производства в свежем состоянии в один и тот же день. Заморожены при -80 С в течение 5 часов. Экземпляры кожи трески были слишком большими, чтобы поместиться в алюминиевые лотки, поэтому их разрезали на две части, в результате чего в общей сложности получилось 20 частей кожи трески.

35 [344] Прототип в 0,01% растворе

[345] 1 литр 0,01% раствора налили в алюминиевый лоток с маркировкой МС-ГВ 0,01%, в лоток равномерно уложили 10 кусков трески так, чтобы раствор покрывал

кожу. Лоток поместили в пластиковый пакет, чтобы свести к минимуму риск проливания краски, затем лоток поместили в шейкер Pro:40 на 3 часа.

[346] Прототип в 0,005% растворе

5 [347] 1 литр 0,005% раствора налили в алюминиевый лоток с маркировкой MS-ГВ 0,005%, в лоток равномерно положили 10 кусков трески так, чтобы раствор покрывал кожу. Лоток поместили в полиэтиленовый пакет, чтобы свести к минимуму риск проливания краски, затем лоток поместили в шейкер при температуре рго:40 на 3,5 часа.

[348] Начало окраски на шейкере: 15:40 ± 10 мин.

10 [349] Окончание окраски на шейкере: 19:05 ± 5 мин.

[350] Начало промывки: 19:05 ± 5 мин.

[351] Остановка промывки в: 19: 20 ± 5 мин.

15 [352] Сублимационная сушка: все экземпляры рыбной кожи растягивали на стальных пластинах и помещали сверху еще одну пластину. Программа сублимационной сушки: SvavaColor – общая продолжительность 10 часов.

[353] Упаковка: Визуальный осмотр и испытания на изгиб показали наличие чистых и сухих окрашенных экземпляров кожи трески, готовых к упаковке. Экземпляры были упакованы в пакеты Тайвек, малые и большие пакеты для образцов, промаркированы и запечатаны.

20 [354] В отношении этих прототипов оскребку кожи не производили.

[355] *Сшивание для улучшения устойчивости окраски и механических свойств средства для лечения ран*

25 [356] В дополнительных вариантах осуществления изобретения авторы обнаружили, что сшивание заменителя кожи, например, каркасного материала, может дополнительно улучшить свойства заменителя кожи, включая повышение стойкости красителя, окрашивающего заменитель кожи, усиление механических свойств материала заменителя кожи, повышение стойкости заменителя кожи к ферментативному и химическому разложению и увеличение срока службы красителя,
30 добавляемого к заменителю кожи, в биологических условиях, например, в обработанной ране. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения основная цель сшивания заменителя кожи, например, каркасного материала, состоит в том, чтобы получить окрашенный продукт, сохраняющий свой цвет в течение по
35 меньшей мере одного дня после нанесения на рану, а предпочтительно, в течение трех дней после нанесения на рану, и еще предпочтительнее до 8–10 дней, еще лучше до 14 дней после нанесения на рану.

[357] Как описано в настоящей заявке, сшивание заменителя кожи и/или

заменителя кожи с добавленным красителем можно осуществлять различными способами, например, путем облучения или химическими средствами.

[358] Химическое сшивание или модификаторы

5 [359] В одном варианте осуществления изобретения заменитель кожи сшивают путем обработки заменителя кожи сшивающим агентом. В другом варианте белки заменителя кожи модифицируют иным образом путем обработки заменителя кожи агентом, модифицирующим белок.

10 [360] Согласно изобретению, химический сшивающий агент предназначен для по меньшей мере одной из следующих групп: первичные амины ($-NH_2$); карбоксилы ($-COOH$); сульфгидрилы ($-SH$) или карбонилы ($-CHO$) или какая-либо другая группа. Таким образом, сшивающий агент может быть, например, реакционноспособным по отношению к амину, реакционноспособным по отношению к карбоксил-амину, реакционноспособным по отношению к сульфгидрилу и/или реакционноспособным по 15 отношению к альдегиду.

[361] В первом варианте осуществления сшивающий агент представляет собой простой сахар или моносахарид. Можно использовать альтернативные сахара, включая глюкозу, фруктозу или галактозу. Например, сшивающий агент может представлять собой рибозу или включать ее. Можно использовать альтернативные 20 сахара, включая глюкозу, фруктозу или галактозу. Также можно применять сложные сахара, дисахариды.

[362] В другом варианте осуществления сшивающий агент представляет собой природный или синтетический сшивающий агент. Например, в одном из вариантов изобретения сшивающий агент включает или представляет собой генипин.

25

[363] Пример 1 – Сшивание рибозой

[364] Далее представлен первый пример, в котором в качестве сшивающего агента используют рибозу.

30 [365] В соответствии с этим примером готовят стандартный (исходный) раствор рибозы. Для этого приготовили 0,2 М (молярный) раствор рибозы в ФСБ, содержащем 0,05% (мас./об.) азида натрия для предотвращения роста бактерий. Могут быть использованы и другие концентрации рибозы, а также другие агенты, предотвращающие рост бактерий. В этом примере раствор включает по массе 30,03 г рибозы, 9,55 г предварительно смешанного стандартного ФСБ и 50 мг азида натрия. 35 Сухие ингредиенты взвешивают с использованием прецизионных массов, добавляют в мерную колбу емкостью 1 л и заливают деионизированной водой до отметки 1,00 л. Ингредиенты перемешивают до полного растворения, после чего раствор готов к

использованию.

[366] В этом примере в качестве заменителя кожи используют продукт клеточного каркаса Kerecis™, полученный из рыбьей кожи. В общем, можно обрабатывать каркасы любого размера и/или количества, даже включая каркасный материал в виде частиц. Контейнер, в котором в раствор добавляют каркасный материал, может быть большим, и объем раствора рибозы полностью покрывает образцы. В этом примере материал каркаса разрезали на куски 4x8 см². Пять (5) кусков или образцов вырезали из более крупного образца так, чтобы длинная сторона (8 см) была параллельна длине кожи трески. Затем образцы погрузили примерно в 250 мл раствора рибозы на срок от 3 до 6 дней при комнатной температуре. Первый образец вынули через 3 дня, следующие два — через 5 дней и последние два — через 6 дней. Также был подготовлен дополнительный образец того же размера, путем его погружения примерно в 80 мл на 40 часов.

[367] После того, как каждый образец вынули из раствора рибозы, его промыли проточной водой, а затем поместили в водяную баню на два дня, чтобы смыть непрореагировавшую рибозу вместе с ФСБ и азидом натрия. Воду периодически меняли (один или два раза в день), чтобы улучшить процесс промывки. Затем образцы частично высушили и заморозили для дальнейшей обработки.

[368] Способы окрашивания каркасов, сшитых рибозой: При окрашивании каркасов, сшитых рибозой, использовали два общих подхода. Первый можно охарактеризовать как мета-окрашивание, при котором к сшивающему раствору добавляют МС и ГВ. В этом способе один фрагмент каркаса размером 4x8 см² погрузили на 24 часа в раствор, состоящий из 98 мл стандартного/исходного раствора рибозы (такого же, какой описан выше) и 1 мл исходного раствора каждого красителя (МС/ГВ), причем эти исходные растворы составляли 0,1% масс., поэтому концентрация МС/ГВ в растворе была равной 0,002%. После комбинированного процесса сшивания/окрашивания образец промыли таким же образом, как описано выше для случая сшивания, сначала под водопроводной водой, а затем выдерживали в воде два дня, чтобы получить образец 1610, показанный на фиг.16. Показанный на фиг.16 образец 1610 представляет собой метаокрашенный, сшитый рибозой и окрашенный каркас, выдержанный в течение 24 часов в «мета» растворе.

[369] Согласно второму способу, заключающемуся в пост-окрашивании, соблюдали те же условия, что обсуждались ранее для «стандартного процесса окрашивания», т.е. после того, как каркас прошел процесс сшивания и промывки, образец окрашивали в течение 3 часов в 0,002 мас.% растворе МС/ГВ в ФСБ, для этого фрагмент каркаса размером 4x4 см² окрашивали в 100 мл раствора. Это можно сделать с использованием предварительно сшитого каркаса независимо от времени

сшивания, например, в течение 24 часов, 40 часов, 5 дней или 6 дней. На фиг.17 показан пост-окрашенный каркас 1710, сшитый рибозой, выдержанный в течение 40 часов после 3-часового стандартного процесса окрашивания в 0,002% растворе МС/ГВ ФСБ.

5 [370] Другие примеры и варианты способа могут включать модификации приведенных выше примеров сшивки рибозой. Процесс метаокрашивания может быть изменен по меньшей мере двумя путями. Первое изменение может включать увеличение или уменьшение времени выдерживания в растворе. Второй может включать изменение концентрации красителя или рибозы в растворе. Поскольку 10 абробрция красителя происходит относительно медленно и напрямую зависит от концентрации красителя в растворе, то может быть целесообразным, например, снизить концентрацию МС и ГВ в растворе, если мета-окрашивание проводилось, например, 48 часов, если концентрация красителя в каркасе должна быть такой же, как для 24-часового процесса, описанного выше. На практике возможна любая комбинация 15 показателей времени и концентрации (в пределах разумного), которая даст уникальный результат.

[371] В случае вышеописанного пост-окрашивания время сшивания каркаса можно изменить. Если происходит изменение концентрации красителя в каркасе, то можно также изменить концентрацию красителя и/или время выдержки в растворе 20 красителя.

[372] Пример 2. Сшивание генипином.

[373] Во втором примере, как ранее отмечалось, в качестве сшивающего агента используют генипин. Примерная процедура сшивания описана ниже.

25 [374] Готовят раствор для сшивания генипином. В соответствии с этим примером готовят 0,3% (мас./об.) раствора генипина в ФСБ. 200 мл раствора готовят путем растворения 0,60 г генипина в 200 мл предварительно приготовленного раствора ФСБ (9,55 г готового порошка ФСБ/1 л). Раствор перемешивают до тех пор, пока не исчезнут твердые частицы.

30 [375] В этом примере в качестве заменителя кожи снова используют продукт клеточного каркаса Kerecis™, полученный из рыбьей кожи. В общем, можно обрабатывать каркасы любого размера и/или количества, даже включая каркасный материал в виде частиц. В этом примере использовали культуральный планшет с лунками объемом 15 мл. В каждую лунку помещали кусок каркаса/коллагена площадью 35 2x2 см² и добавляли раствор генипина. Каждую лунку полностью заполняли 15 мл общего раствора. Затем планшет закрывали крышкой и герметизировали перед погружением в водяную баню с температурой 37°C на 24 часа. Отметим, что можно

задействовать любой другой источник тепла, если температура постоянно составляет 37°C, а испарение предотвращается за счет герметизации сосуда или повторной конденсации раствора. После выдерживания каркасов в течение 24 часов в растворе их промыли водой и заморозили. В этом примере сшивание генипином сделало
5 каркасы синевато-черными, а также вынудило каркасный материал свернуться. Также наблюдалась явная разница в жесткости образцов.

[376] Подобно сшиванию и окрашиванию рибозой, в этом примере также были исследованы два способа: окрашивание во время сшивания и после него, т.е. мета- и пост-окрашивание. В этом примере использовали шесть лунок, четыре из которых
10 содержали только 15 мл 0,3% раствора генипина, а две содержали также МС и ГВ (мета-окрашивание). Растворы мета-красителей готовили путем добавления в лунку по 150 мкл каждого исходного раствора красителя (0,1 мас.%), после чего добавляли 14,7 мл раствора генипина. За исключением добавления МС/ГВ, все шесть лунок были одинаковыми и подвергались одинаковой обработке в процессе сшивания.

[377] Процедура пост-окрашивания каркасов, сшитых генипином, такая же, как и для каркасов, сшитых рибозой. Образец погружают в 0,002% раствор МС/ГВ, ФСБ на 3 часа, причем на каждые 2x2 см², подлежащие окрашиванию, используют 25 мл раствора. В этом случае окрашивали 2 куска каркаса размером 2x2 см², поэтому для
15 изготовления образца 1810, показанного на фиг.18, было использовано 50 мл раствора. На фиг.18 показан образец 1810, представляющий собой пост-окрашенный генипиновый каркас, окрашенный в 0,002 мас.% раствора МС/ГВ ФСБ в течение 3 часов. После окрашивания образцы промывали, частично сушили и замораживали.

[378] Другие варианты и примеры способа могут включать модификации приведенных выше примеров перекрестного сшивания генипином. Изменения, которые
25 можно внести в процесс окрашивания образцов каркаса, сшитого генипином, по существу такие же, как и для способа с применением рибозы, описанного ранее. То есть независимо от применяемого процесса (мета- или пост-), можно вносить изменения, касающиеся времени воздействия и концентрации красителя.

[379] На фиг.19А и 19В показано сравнение вариантов улучшения стойкости окрашивания при помощи химического сшивания. На фиг.19А показано сравнение
30 фрагментов 19-С, 19-В и 19-А в чашках 1930, 1920 и 1910, соответственно. Каждый из образцов, из которых выделены фрагменты 19-С, 19-В и 19-А, представлял собой полученный из рыбьей кожи продукт клеточного каркаса Kerecis™, который выдерживали в 0,002% растворе МС/ГВ ФСБ в течение 3 часов. Образец, из которого выделен фрагмент 19-С, был сшит 0,3% раствором генипина в соответствии с
35 приведенным выше примером 2. Образец, из которого выделен фрагмент 19-В, был сшит раствором рибозы в соответствии с приведенным выше примером 1. Образец, из

которого выделен фрагмент 19-А, не был сшит, а только окрашен в 0,002% растворе МС/ГВ в ФСБ в течение 3 часов.

[380] Для сравнения, на фиг.19А показаны фрагменты 19-С, 19-В и 19-А в соответствующих чашках 1930, 1920 и 1910 после окрашивания, причем образцы 19-С и 19-В прошли этап сшивания. Впоследствии в каждую чашку 1930, 1920 и 1910 в равных количествах и равных концентрациях добавляли раствор бикарбоната с рН, равным 8. Фрагменты 19-С, 19-В и 19-А держали в чашках 1930, 1920, и 1910, соответственно, в течение 48 часов при температуре 37°C, в результате чего через 48 часов получают те же самые фрагменты 19-С, 19-В и 19-А, как показано на фиг.19В.

[381] Как можно видеть, стойкость окраски фрагментов 19-С и 19-В, которые были соответственно сшиты генипином (19-С) и рибозой (19-В), была заметно улучшена по сравнению с фрагментом 19-А, который изначально был окрашен аналогичным образом, но не был сшит. Сшитые фрагменты 19-С и 19-В ясно показывают, что их окрашивание происходит быстрее и лучше сохраняется.

[382] Кроме того, стоит отметить, что в обоих случаях, т.е. для рибозы и генипина, также можно менять концентрацию и время сшивания. Это влияет на конечный цвет для обеих процедур при мета-окрашивании, но имеет гораздо больший эффект в случае генипина, поскольку цвет, получаемый непосредственно в результате сшивания, является чрезвычайно темным и концентрированным при применении описанного выше способа. Если уменьшить время пребывания в растворе, концентрацию или температуру, это приведет к меньшему сшиванию и к более светлому оттенку, что было доказано несколькими исследованиями.

[383] Сшивание облучением

[384] В другом варианте осуществления изобретения заменитель кожи сшивают путем облучения материала заменителя кожи электромагнитным излучением. В первом примере заменитель кожи, например каркасный материал, облучают ультрафиолетовым (УФ) излучением.

[385] Пример УФ-сшивки

[386] В соответствии с примером, основанным на УФ-излучении, 0,1% исходный раствор метиленового синего (МС) готовили путем добавления 200 мл стерильной воды к 200 мг МС и перемешивания до растворения красителя. Раствор ФСБ готовили путем смешивания одного литра жидкого 10х ФСБ с 8,8 литрами водопроводной воды и перемешивания.

[387] Опять в качестве заменителя кожи использовали продукт клеточного каркаса Kerecis™, полученный из рыбьей кожи. В общем, можно обрабатывать каркасы

любого размера и/или количества, включая даже измельченный каркасный материал, диаметр которого составляет всего 1 мм. В этом примере использовали 14 кусков разрезанной рыбьей кожи размером 4x8 см и две неразрезанные рыбы кожи. Вся рыбья кожа была предварительно соскоблена для удаления плоти, чешуи и фасций.

5 [388] ФСБ и часть исходного раствора поместили в большой контейнер и перемешали до однородного состояния. Количество каждого раствора составляло: исходный ФСБ - 8,8 л; исходный краситель - 200 мл.

[389] После приготовления красящего раствора в раствор поместили экземпляры кожи и перемешали их, следя за тем, чтобы экземпляры не слипались.

10 [390] Экземпляры кожи удерживали в красящем растворе в течение 3,5 часов и перемешивали каждый час. Был задействован УФ-шкаф, причем экземпляры кожи разложили по его лоткам.

[391] В качестве источника УФ-излучения использовали УФ-светильник мощностью 15 Вт (254 нм), который был ввинчен внутрь шкафа, чтобы лотки могли 15 находиться под светом во время облучения. Внутренняя часть шкафа была покрыта алюминиевой фольгой, чтобы переотражать свет от стен к коже. Лотки располагали на расстоянии примерно 12 см от источника света. Хотя в этом примере использовали УФ-свет, представляющий собой почти монохроматическое УФ-излучение, в других вариантах осуществления изобретения можно использовать другие УФ-источники 20 различной мощности и длины волны, причем как с монохроматическим УФ-излучением, так и с полихроматическим УФ-излучением, при этом УФ-излучение имеет длину волны в диапазоне от около 10 нм до около 400 нм.

[392] В результате были получены следующие образцы: Образец А, который 25 изъят из окрашивающего раствора на основе МС, помещен в раствор ФСБ (без цвета) и подвергнут воздействию УФ-излучения; Образец В, который помещен в окрашивающий раствор МС и подвергся воздействию УФ-излучения, находясь в указанном окрашивающем растворе МС; и образец С, который помещен в красящий раствор, но не подвергся воздействию УФ-излучения. Другими словами, экземпляры 30 кожи Образца А можно рассматривать как аналог сшивки пост-окрашивания, при которой экземпляры кожи Образца А окрашивали в цветном растворе на основе МС, а затем сшивали УФ-излучением при нахождении только в растворе ФСБ. Для сравнения, экземпляры кожи Образца В можно считать аналогом мета-окрашивания в том смысле, что экземпляры кожи Образца В выдерживались в красящем растворе на основе МС, будучи сшитыми под действием УФ-излучения. При этом экземпляры кожи 35 образца С можно считать контрольными, так как они были окрашены в красящем растворе на основе МС, но не подвергались воздействию УФ-излучения ни во время, ни после окрашивания. В качестве контрольного эталона, экземпляры кожи образца С

хранились в УФ-шкафу, но в затемненной части шкафа, где они не подвергались воздействию УФ-излучения. Таким образом, экземпляры кожи образца С были обработаны при одинаковых условиях касательно температуры, переворачивания и времени по сравнению со сшитой кожей образца А и образца В.

5 [393] Экземпляры кожи находились в соответствующих жидких растворах в течение 6 часов. Экземпляры кожи плавали на поверхности, поэтому их переворачивали с одной стороны на другую, чтобы гарантировать, что обе стороны одинаково подвергаются воздействию ультрафиолетового света. Это также было сделано для того, чтобы экземпляры кожи в лотках, не подвергавшиеся воздействию 10 УФ-света (в темноте), претерпевали такой же процесс обработки, как и кожа, находящаяся под УФ-светом. При переворачивании кожи УФ-свет отключали примерно на 5–10 мин.

[394] Во время переворачивания кожи измеряли температуру жидкого раствора. Максимальная температура через 5 часов составляла менее 25°C, поэтому был 15 сделан вывод, что УФ-свет не нагревает раствор и кожу до степени, требующей систему охлаждения.

[395] После этапа облучения экземпляры кожи собрали с лотков и поместили в три отдельных пакета, по одному для каждого из образцов А, В и С. Экземпляры кожи промыли в течение нескольких минут в холодной воде и поместили на стальную 20 пластину перед вводом в сублимационную сушилку. Кожа находилась в сублимационной сушилке всю ночь.

[396] Экземпляры кожи собрали в три отдельных пакета, каждый экземпляр запечатали в пакет Тайвек.

25 [397] Некоторые части различных образцов стерилизовали с использованием оксида этилена.

[398] Образец А: Экземпляры кожи образца А окрашивали в красящем растворе МС, из которого они затем были вынуты, промыты и помещены в раствор ФСБ под воздействием УФ-света. Изначально раствор ФСБ не имел цвета, но в конце воздействия УФ-излучения стало ясно, что краска, используемая ранее при окраске 30 кожи, вытекла из нее и окрасила раствор ФСБ. Окончательный цвет кожи стал более светло-голубым и даже немного зеленым по сравнению с другими прототипами, которые были более темно-синими.

[399] Образцы В и Образцы С: После завершения сшивания экземпляров кожи Образца В не было видимой разницы между окрашенными кожами Образца В, которые 35 находились под УФ-светом (Образец В) во время выдерживания в цветном растворе на основе МС, по сравнению с экземплярами кожи образца С, которые не подвергались воздействию ультрафиолетового света, как можно видеть на фиг.20А,

где сравнивается экземпляр 20-B образца В с экземпляром 20-C образца С. Также на фиг.20А для сравнения представлен экземпляр 20-A образца А. Кожи образца В и образца С имели очень схожий цвет, и не было видимых различий, в том числе тактильных, в текстуре рыбьей кожи.

5 [400] Образцы жидких растворов не собирали для количественного определения цвета. Прототипы были созданы только для тестирования ультрафиолетового излучения и его воздействия на кожу рыбы.

[401] Позже можно будет применить другие способы измерения количества цвета в коже путем расщепления части рыбьей кожи ферментами и измерения 10 количества цвета в этом растворе.

[402] В качестве средства сравнения стойкости окраски сшитых образцов определяли утечку краски из фрагмента каждого образца, выдерживая образцы в растворе основания и кислоты (кислота/основание) при 37°C. Кроме того, образцы сравнивали с другими прототипами, изготовленными ранее с использованием 15 различных протравителей и окрашенных при постепенном изменении показателя pH раствора. Результат показал, что образцы, сшитые УФ-излучением, сохраняли цвет дольше, чем многие другие прототипы.

[403] На фиг.20А-20D показано сравнение вариантов улучшенного сохранения окраски благодаря сшиванию под действием УФ-излучения. На фиг.20А показано 20 сравнение фрагментов, взятых из образцов С, В и А, включая фрагмент образца С, помеченный как 20-С и помещенный в чашку 2030; фрагмент образца В, помеченный как 20-В и помещенный в чашку 2020; и фрагмент образца А, помеченный как 20-А и помещенный в чашку 2010. На фиг.20В показаны фрагменты 20-С, 20-В и 20-А в соответствующих чашках 2030, 2020 и 2010 после выдерживания в кислотном-основном 25 растворе той же концентрации в течение 24 часов. На фиг.20С показаны фрагменты 20-С, 20-В и 20-А в соответствующих чашках 2030, 2020 и 2010 после выдерживания в кислотном-основном растворе той же концентрации в течение 48 часов. На фиг.20D показаны фрагменты 20-С, 20-В и 20-А в соответствующих чашках 2030, 2020 и 2010 после выдерживания в кислотном-основном растворе той же концентрации в течение 72 30 часов. Как можно видеть, стойкость окраски фрагментов 20-В и 20-А, которые подверглись воздействию УФ-излучения, заметно улучшена по сравнению с фрагментом 20-С, который был окрашен аналогичным образом, но не подвергся воздействию УФ-излучения. Это особенно наглядно подтверждают фиг.20С и 20D, соответствующие выдержке 48 часов и 72 часа в кислотном-основном растворе. И через 35 48, и через 72 часа образцы 20-В и 20-С все еще сохраняли некоторый цвет, в то время как через 72 часа несшитый образец 20-С стал почти белым или вернулся к своему первоначальному цвету. Сравнение образцов 20-В и 20-А через 48 часов и 72

часа показывает, что мета-окрашивание образца В, при котором рыбью кожу, находящуюся в красящем растворе на основе МС, окрасили с применением УФ-излучения, позволяет получить рыбью кожу, цвет которой по-видимому несколько более устойчив к воздействию кислотно-основного раствора. Говоря другими словами, цвет фрагмента 20-В оказался немного темнее, чем цвет фрагмента 20-А, после 48 и 72 часов пребывания в растворе кислоты/основы.

[404] Другие варианты и примеры способа могут включать, помимо прочего, варьирование красителя, интенсивности УФ-излучения, изменение длины волны или диапазона длин волн УФ-излучения, изменение времени окрашивания, концентрации красителя и времени воздействия УФ-излучения.

[405] Посредством приведенных примеров и описанных вариантов авторы изобретения показали, что характеристики окрашенного заменителя кожи, например, окрашенного каркасного материала, могут быть дополнительно улучшены в аспектах, включающих повышение стойкости красителя, окрашивающего заменитель кожи, улучшение механических свойств материала заменителя кожи, улучшение стойкости заменителя кожи к ферментативному и химическому разложению и увеличение срока службы красителя, добавленного к заменителю кожи, в биологических условиях, например, в обработанной ране.

[406] Комбинируемость вариантов и признаков

[407] В настоящей заявке раскрыты различные примеры, варианты и особенности изобретения, которые, если не являются противоречащими друг другу или не указано иное, следует понимать как комбинируемые с другими примерами, вариантами и особенностями изобретения, раскрытыми в настоящей заявке.

[408] В дополнение к вышесказанному, дополнительные варианты и примеры изобретения включают следующее:

[409] 1. Регенерирующее ткань средство для лечения ран, включающее: заменитель кожи; и добавленный к заменителю кожи краситель, представляющий собой биосовместимый краситель, разлагающийся под воздействием протеазы в обработанной ране.

[410] 2. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из вышеуказанного п.1 и нижеуказанных п.п.3–14 или их комбинации, в котором заменитель кожи представляет собой биологический заменитель кожи или синтетический заменитель, или гибрид биологического и синтетического заменителя кожи.

[411] 3. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из вышеуказанных п.п.1-2 и нижеуказанных п.п.4–14 или их комбинации, в котором

заменитель кожи представляет собой аутологичный кожный трансплантат, сингенный кожный трансплантат, аллогенный кожный трансплантат, ксеногенный кожный трансплантат или синтетический кожный трансплантат.

5 [412] 4. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из вышеуказанных п.п.1-3 и нижеуказанных п.п.5–14 или их комбинации, в котором заменитель кожи содержит каркасный материал.

[413] 5. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из вышеуказанных п.п.1-4 и нижеуказанных п.п.6–14 или их комбинации, в котором заменитель кожи содержит каркасный материал, содержащий продукт внеклеточного 10 матрикса.

[414] 6. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из вышеуказанных п.п.1-5 и нижеуказанных п.п.7–14 или их комбинации, в котором продукт внеклеточного матрикса имеет форму частиц, листа или сетки.

15 [415] 7. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из вышеуказанных п.п.1-6 и нижеуказанных п.п.8–14 или их комбинации, в котором заменитель кожи представляет собой каркасный материал, содержащий интактную децеллюляризованную рыбью кожу, содержащую материал внеклеточного матрикса.

[416] 8. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из вышеуказанных п.п.1-7 и нижеуказанных п.п.9–14 или их комбинации, которое 20 подвергают сшиванию до, после или во время добавления красителя к заменителю кожи.

[417] 9. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из вышеуказанных п.п.1-8 и нижеуказанных п.п.10–14 или их комбинации, в котором краситель включает тиазиновый краситель или триарилметановый краситель, или 25 комбинацию тиазинового красителя и триарилметанового красителя.

[418] 10. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из вышеуказанных п.п.1-9 и нижеуказанных п.п.11–14 или их комбинации, в котором краситель содержит метиленовый синий (МС) или генцианвиолет (ГВ), или комбинацию метиленового синего (МС) и генцианвиолета (ГВ).

30 [419] 11. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из вышеуказанных п.п.1-10 и нижеуказанных п.п.12–14 или их комбинации, в котором заменитель кожи лиофилизирован, при этом краситель добавлен к заменителю кожи перед лиофилизацией или повторной лиофилизацией заменителя кожи.

35 [420] 12. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из вышеуказанных п.п.1-11 и нижеуказанных п.п.13–14 или их комбинации, в котором краситель добавлен к заменителю кожи путем окрашивания заменителя кожи раствором красителя, содержащим от 0,01 до 0,0001 мас.% красителя в

деионизированной воде или в фосфатно-солевом буферном растворе.

[421] 13. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из вышеуказанных п.п.1-12 и нижеуказанному п.14 или их комбинации, в котором краситель характеризуется наличием по меньшей мере одного свойства из
5 антибиотического, антисептического, противомикробного, противовирусного, противогрибкового, противопаразитарного, противовоспалительного и антиоксидантного свойств.

[422] 14. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из вышеуказанных п.п.1-13 или их комбинации, в котором краситель не вызывает стойкого
10 окрашивания раны при ее заживлении.

[423] 15. Способ лечения ран, включающий: обеспечение наличия регенерирующего ткань средства для лечения ран по любому из пп. 1 – 14 или их комбинации; нанесение указанного средства на раневое ложе; и определение того, подвергся ли заменитель кожи разрушению в результате воздействия протеазы внутри
15 раны, на основании определения изменения цвета красителя.

[424] 16. Способ получения регенерирующего ткань средства для лечения ран, включающий: обеспечение наличия заменителя кожи; и добавление к заменителю кожи красителя, представляющего собой биосовместимый краситель, разлагающийся под действием протеазы в обработанной ране.

[425] 17. Способ по любому из вышеуказанного п.16 и нижеуказанных п.п.18–20 или их комбинации, в котором заменитель кожи представляет собой биологический заменитель кожи или синтетический заменитель, или гибрид биологических и синтетических заменителей кожи, и/или заменитель кожи представляет собой аутологичный кожный трансплантат, сингенный кожный трансплантат, аллогенный
20 кожный трансплантат, ксеногенный кожный трансплантат или синтетический кожный трансплантат, и/или заменитель кожи содержит каркасный материал, и/или заменитель кожи содержит каркасный материал, содержащий продукт внеклеточного матрикса.

[426] 18. Способ по любому из вышеуказанных п.п.16-17 и нижеуказанных п.п.19–20 или их комбинации, в котором заменитель кожи представляет собой
30 каркасный материал, содержащий интактную децеллюляризованную рыбью кожу, содержащую материал внеклеточного матрикса.

[427] 19. Способ по любому из вышеуказанных п.п.16-18 и нижеуказанного п.20 или их комбинации, в котором краситель содержит метиленовый синий (МС) или генцианвиолет (ГВ), или комбинацию метиленового синего (МС) и генцианвиолета (ГВ).

[428] 20. Способ по любому из вышеуказанных п.п.16-19 или их комбинации, в котором краситель добавляют к заменителю кожи путем окрашивания заменителя кожи раствором красителя, содержащим от 0,01 до 0,0001 мас.% красителя в
35

деионизированной воде или в фосфатно-солевом буферном растворе.

[429] Сокращенный список терминов и определений

5 [430] Ниже приведены определения некоторых терминов, упрощающие понимание объема и содержания предшествующего описания и последующей формулы изобретения.

[431] В настоящей заявке термин «основной материал» может подразумевать любой материал, известный в данной области техники, который может действовать в качестве носителя терапевтических средств и который может дополнительно или 10 альтернативно обеспечивать и/или пассивно регулировать влажность в ране и/или в окружающей ее зоне.

[432] Термин «биосовместимый полимер» относится к полимерному материалу, не причиняющему вред организму человека. Биосовместимый полимер включает в себя любой синтетический или натуральный полимерный материал, который не 15 выделяет вредных для организма человека веществ и не вызывает побочных эффектов, таких как раздражение кожи (даже при прямом контакте с местом раны) или любого другого негативного влияния на организм человека.

[433] Виды «Уровней» относятся в настоящей заявке к местам и/или типам медицинской помощи, оказываемой военнослужащим. Уровень I имеет отношение к 20 самопомощи и помощи со стороны товарищей, а также к военно-полевой медицинской помощи, оказываемой на поле боя или в местах, удаленных от персонала/объектов Уровня II. Уровень II означает расширенную помощь при травмах, оказываемую врачами, помощниками врача или другим квалифицированным медицинским персоналом. Помощь Уровня II часто оказывают в полевом госпитале. Уровень III 25 относится к медицинской помощи, оказываемой на уровне военно-медицинской службы, и обычно включает реконструктивную и окончательную хирургию по спасению жизни, конечностей и зрения. Такая помощь может быть оказана в полевом госпитале, оснащенном необходимым оборудованием. Уровень IV относится к сложной хирургии и длительному периоду выздоровления (например, более двух недель) и обычно 30 предоставляется в региональных стационарных больницах. Уровень V относится к травмам и/или процедурам, требующим обширной реабилитации и ухода за выздоравливающим; Лечение Уровня V проводится в стационарных больницах континентальной части США. Хотя вышеизложенная система «Уровней» наиболее актуальна для военного персонала и военных программ лечения, систему «Уровни» 35 можно также при необходимости распространить по аналогии на места и/или программы лечения, соответствующие гражданским и/или местным правоохранительным органам.

[434] Термин «рана», используемый в настоящей заявке, охватывает обобщенный случай повреждения тканей. Таким образом, термин «рана» включает в себя повреждения, вызванные например, порезом, разрывом и/или сдиранием кожи, такие как рваные раны, ссадины, разрезы, проколы, отрывы и другие подобные повреждения. Раны могут иметь любой размер, форму или степень. Например, порез бумагой является примером небольшого правильного пореза относительно небольшой степени, тогда как ударная волна, приводящая к серьезной рваной ране, охватывающей одну или несколько частей тела, является примером относительно более крупной раны большей степени. Однако каждый из приведенных выше примеров подпадает под объем термина «рана», используемого в заявке.

[435] Термин «рана» дополнительно охватывает случай нарушения подлежащих тканей, например, вызванного травматическим повреждением. Таким образом, термин «рана» включает комбинацию множества различных ран. Например, травматическую ампутацию, вызванную взрывной волной, обычно можно назвать раной, хотя она представляет собой целую совокупность различных рваных ран, ссадин, отрывов и проколов. Кроме того, под раной можно понимать любое повреждение подлежащей ткани, обусловленное вышеупомянутой взрывной волной. Термин «рана» также используется для обозначения повреждений ткани, вызванных ожогами (например, термическими и/или химическими ожогами). Более того, термин «рана» охватывает травмы, возникшие в результате, например, язв диабетической стопы, венозных язв ног, хирургических операций, пролежней и других причин.

[436] Термин «травматическая рана» относится в настоящей заявке к любой ране, возникшей в результате физического повреждения, нарушающего как кожу, так и подлежащие ткани. Огнестрельная рана является одним из неограничивающих примеров травматической раны, поскольку она связана с проколом (т.е. разрывом) кожи и разрывами или иным повреждением подлежащих тканей. В качестве еще одного неограничивающего примера упомянем ударную или взрывную волну, обычно приводящую к травматическому ранению (ранениям). Многие (но не все) раны, полученные во время военных действий, можно охарактеризовать как травматические в силу характера военных действий и связанных с ними травм. «Травматическая рана» может включать кровоточащие раны, раны с обнажением костей и/или сухожилий, тяжелые ожоги, глубокие раны тканей (например, асимметричные раны глубоких тканей) и/или раны большой площади поверхности.

[437] Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (управление FDA) одобрило продукт Omega3 Wound для использования при лечении ран, включая хронические раны, ожоговые раны, а также для восстановления мягких тканей. В отличие от других продуктов животного

происхождения, рыбья кожа не несет риска передачи заболеваний человеку, поэтому в ее отношении можно проводить щадящую обработку, при которой сохраняется ее структура и биологически активный состав. Продукт Omega3 Wound продемонстрировал преимущества перед каркасом, полученным из тонкой кишки свиньи, заключающиеся в более быстром закрытии раны и меньшем времени заживления. Данный трансплантат из рыбьей кожи был использован в отношении большого числа хронических и острых ран различной этиологии и он показал надлежащие безопасность и эффективность. Учитывая сложную и неблагоприятную обстановку во время боевых действий, следует использовать целостный подход, при котором передовые технологии лечения ран сочетаются с методами профилактики инфекций. Важно, чтобы новая технология учитывала и удовлетворяла потребности военных и медицинского персонала.

[438] Следует понимать, что любые изменения и/или модификации признаков изобретения, а также дополнительные варианты применения проиллюстрированных в нем принципов, которые очевидны специалисту данной области техники, ознакомившемуся с настоящей заявкой, и которые могут быть перенесены на проиллюстрированные варианты осуществления изобретения без отхода от его сущности, должны рассматриваться как подпадающие под объем правовой охраны изобретения, определенный приложенной формулой. Таким образом, хотя в настоящей заявке раскрыты конкретные аспекты и варианты осуществления изобретения, допускаются и другие аспекты и варианты реализации. Несмотря на то, что в настоящей заявке раскрыты только некоторые компоненты и способы, при практическом осуществлении изобретения можно использовать целый ряд способов и компонентов, подобных или эквивалентных вышеописанным.

[439] Также следует понимать, что системы, устройства, продукты, наборы, способы и/или процессы, соответствующие одним вариантам настоящего изобретения, могут включать в себя, нести в себе или иным образом воплощать в себе свойства и признаки (например, компоненты, элементы, средства, части и/или фрагменты), описанные со ссылкой на другие варианты осуществления изобретения, раскрытые и/или проиллюстрированные в настоящей заявке. Соответственно, различные признаки определенных вариантов изобретения могут быть совмещены, объединены, скомбинированы и/или включены в другие варианты осуществления изобретения. Таким образом, раскрытие определенных признаков применимо к некому конкретному варианту осуществления изобретения не следует истолковывать как ограничение их применения или как включение этих признаков лишь в этот конкретный вариант осуществления изобретения. Напротив, следует понимать, что другие варианты осуществления изобретения также могут включать в себя указанные признаки,

элементы, части и/или фрагменты и при этом они не выходят за объем притязаний настоящего изобретения.

5 [440] Более того, если не указано, что некий признак требует наличия другого признака в сочетании с ним, то любой признак, описанный в настоящей заявке, можно объединить с любым другим признаком, относящимся к тому же или другому варианту осуществления изобретения. Кроме того, чтобы избежать избыточного усложнения проиллюстрированных вариантов изобретения, в настоящей заявке подробно не описываются различные общеизвестные аспекты проиллюстрированных систем, способов, устройств и т.п. Однако следует понимать, что эти аспекты подразумеваются 10 раскрытыми в настоящей заявке.

[441] Следует понимать, что вовсе необязательно, что некий отдельно взятый вариант осуществления изобретения способен обеспечить все цели или преимущества настоящего изобретения. Специалистам в данной области техники должно быть понятно, что предложенные в изобретении экзоскелеты и способы их изготовления 15 могут быть реализованы таким образом, чтобы будут обеспечивать одно преимущество или группу описанных здесь преимуществ, но не обеспечивать другие описанные здесь цели или преимущества.

[442] Специалисту в данной области должно быть понятно, что некоторые из раскрытых в заявке признаков могут быть взаимозаменяемыми. Помимо описанных в 20 заявке вариантов, специалист в данной области техники может выбрать и скомбинировать другие известные эквиваленты для каждого признака, создав тем самым экзоскелет и способ его изготовления, соответствующие принципам настоящего изобретения.

[443] Хотя в настоящей заявке описаны лишь некоторые иллюстративные 25 варианты осуществления изобретения и примеры пассивного поясничного экзоскелета, специалистам в данной области техники должно быть понятно, что настоящее изобретение не ограничивается рамками конкретно раскрытых вариантов этого пассивного поясничного экзоскелета, а включает в себя и другие альтернативные варианты и/или их очевидные модификации и эквиваленты. Предполагается, что 30 настоящее изобретение не ограничено раскрытыми вариантами реализации, описанными выше, и может быть расширено на другие применения, которые также могут характеризоваться описанными здесь признаками.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Регенерирующее ткань средство для лечения ран, содержащее:
заменитель кожи;
и краситель, добавленный к указанному заменителю кожи, представляющий собой биосовместимый краситель, разлагающийся под действием протеазы в обработанной ране.
2. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по п. 1, в котором заменитель кожи представляет собой биологический заменитель кожи или синтетический заменитель, или гибрид биологического и синтетического заменителей кожи.
3. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из пп. 1-2, в котором заменитель кожи представляет собой аутологичный кожный трансплантат, сингенный кожный трансплантат, аллогенный кожный трансплантат, ксеногенный кожный трансплантат или синтетический кожный трансплантат.
4. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из пп. 1-3, в котором заменитель кожи содержит каркасный материал.
5. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из пп.1-4, в котором заменитель кожи содержит каркасный материал, содержащий продукт внеклеточного матрикса.
6. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из пп.1-5, в котором продукт внеклеточного матрикса имеет форму частиц, листа или сетки.
7. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из пп. 1-6, в котором заменитель кожи представляет собой каркасный материал, содержащий интактную децеллюляризованную рыбью кожу, где указанная интактная децеллюляризованная рыбья кожа содержит материал внеклеточного матрикса.
8. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из пп. 1-7, где указанное средство для лечения ран подвернуто сшиванию до, после или во время добавления красителя к заменителю кожи.
9. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из пп. 1-8, в котором краситель включает тиазиновый краситель или триарилметановый краситель,

или комбинацию тиазинового красителя и триарилметанового красителя.

10. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из пп. 1-9, в котором краситель включает метиленовый синий (МС) или генцианвиолет (ГВ), или комбинацию метиленового синего (МС) и генцианвиолета (ГВ).

11. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из пп. 1-10, в котором заменитель кожи лиофилизирован, при этом краситель добавлен к заменителю кожи перед лиофилизацией или повторной лиофилизацией заменителя кожи.

12. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из пп. 1-11, в котором краситель добавлен к заменителю кожи путем окрашивания заменителя кожи раствором красителя, содержащим от 0,01 до 0,0001 мас.% красителя в деионизированной воде или в фосфатно-солевом буферном растворе.

13. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из пп. 1-12, в котором краситель характеризуется наличием одного или более из антибиотического, антисептического, противомикробного, противовирусного, противогрибкового, противопаразитарного, противовоспалительного и антиоксидантного свойств.

14. Регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из пп. 1 - 13, в котором краситель не вызывает стойкого окрашивания раны при ее заживлении.

15. Способ лечения ран, включающий стадии, на которых:
берут регенерирующее ткань средство для лечения ран по любому из пп. 1-14;
наносит указанное средство для лечения ран на раневое ложе;
и определяют, подвергся ли заменитель кожи разрушению в результате воздействия протеазы в ране, на основании определения изменения цвета красителя.

16. Способ получения регенерирующего ткань средства для лечения ран, включающий:

берут заменитель кожи;

и добавляют к указанному заменителю кожи краситель, причем указанный краситель представляет собой биосовместимый краситель, разлагающийся под действием протеазы в обработанной ране.

17. Способ по п. 16, в котором

заменитель кожи представляет собой биологический заменитель кожи или

синтетический заменитель, или гибрид биологического и синтетического заменителей кожи,

и/или заменитель кожи представляет собой аутологичный кожный трансплантат, сингенный кожный трансплантат, аллогенный кожный трансплантат, ксеногенный кожный трансплантат или синтетический кожный трансплантат,

и/или заменитель кожи включает каркасный материал,

и/или заменитель кожи включает каркасный материал, включающий продукт внеклеточного матрикса.

18. Способ по любому из пп. 16-17, в котором заменитель кожи представляет собой каркасный материал, содержащий интактную децеллюляризованную рыбью кожу, где указанная интактная децеллюляризованная рыбья кожа содержит материал внеклеточного матрикса.

19. Способ по любому из пп. 16-18, в котором краситель включает метиленовый синий (МС) или генцианвиолет (ГВ), или комбинацию метиленового синего (МС) и генцианвиолета (ГВ).

20. Способ по любому из пп. 16-19, в котором краситель добавляют к заменителю кожи путем окрашивания заменителя кожи раствором красителя, содержащим от 0,01 до 0,0001 мас.% красителя в деионизированной воде или в фосфатно-солевом буферном растворе

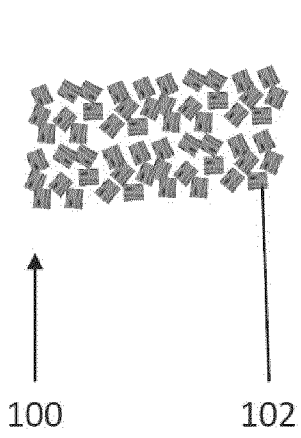


Fig. 1A

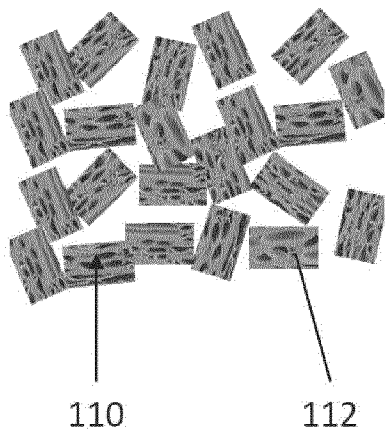


Fig. 1B

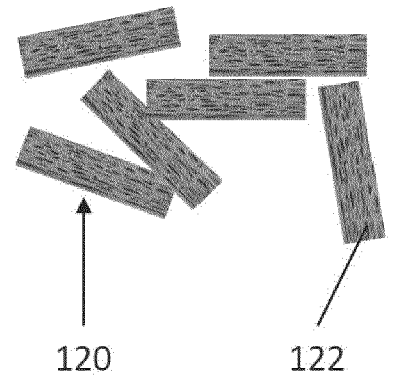


Fig. 1C

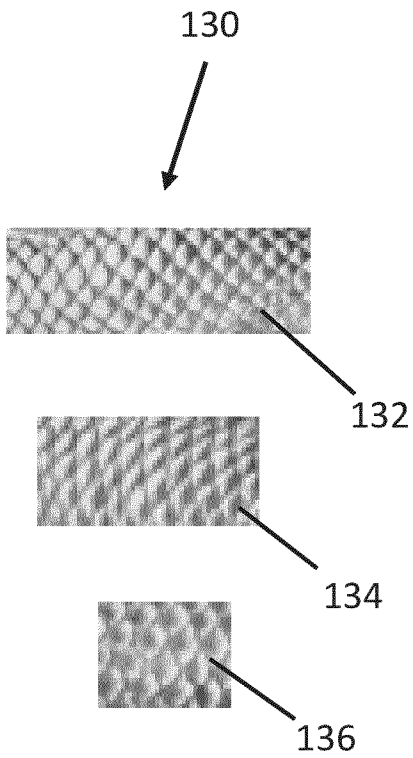


Fig. 1D

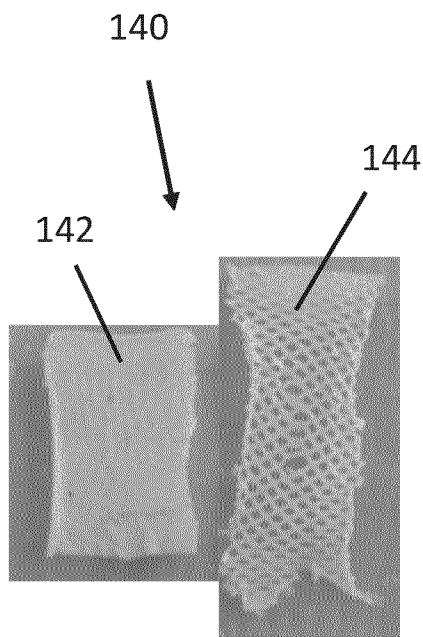


Fig. 1E

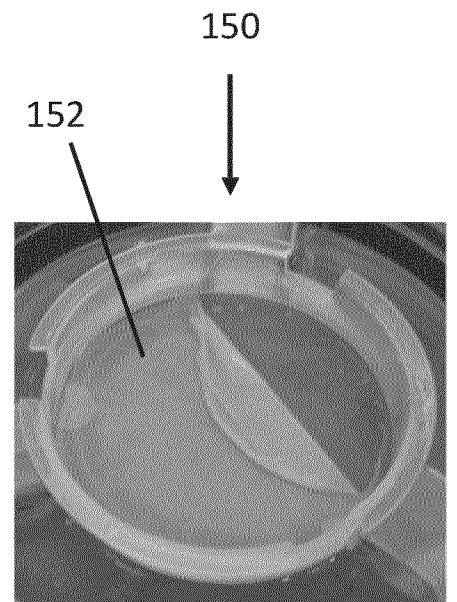


Fig. 1F

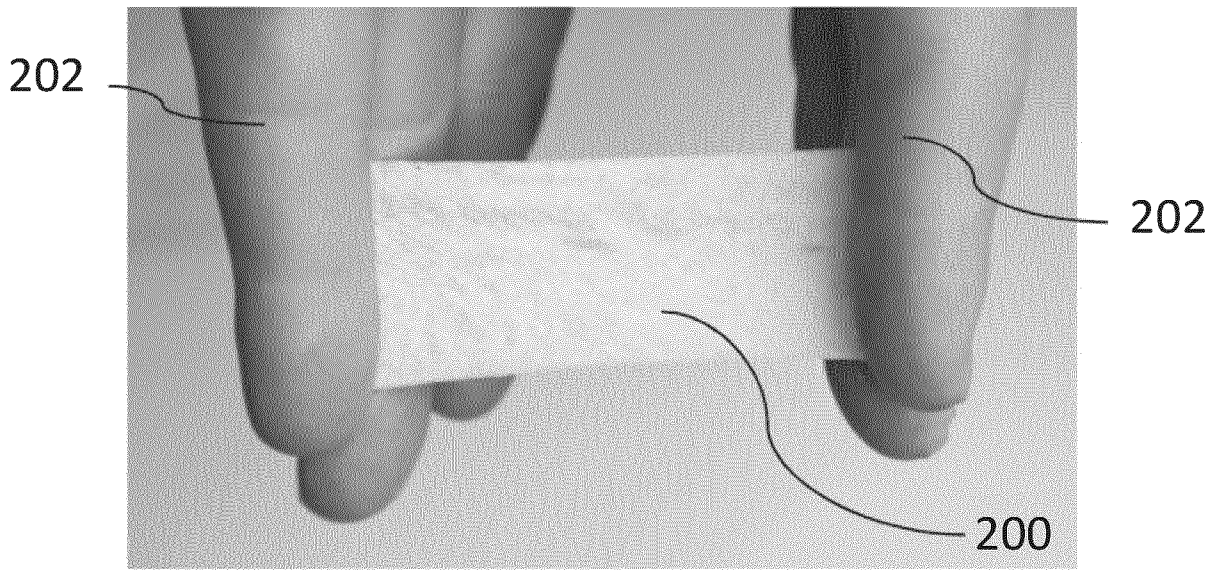


Fig. 2A

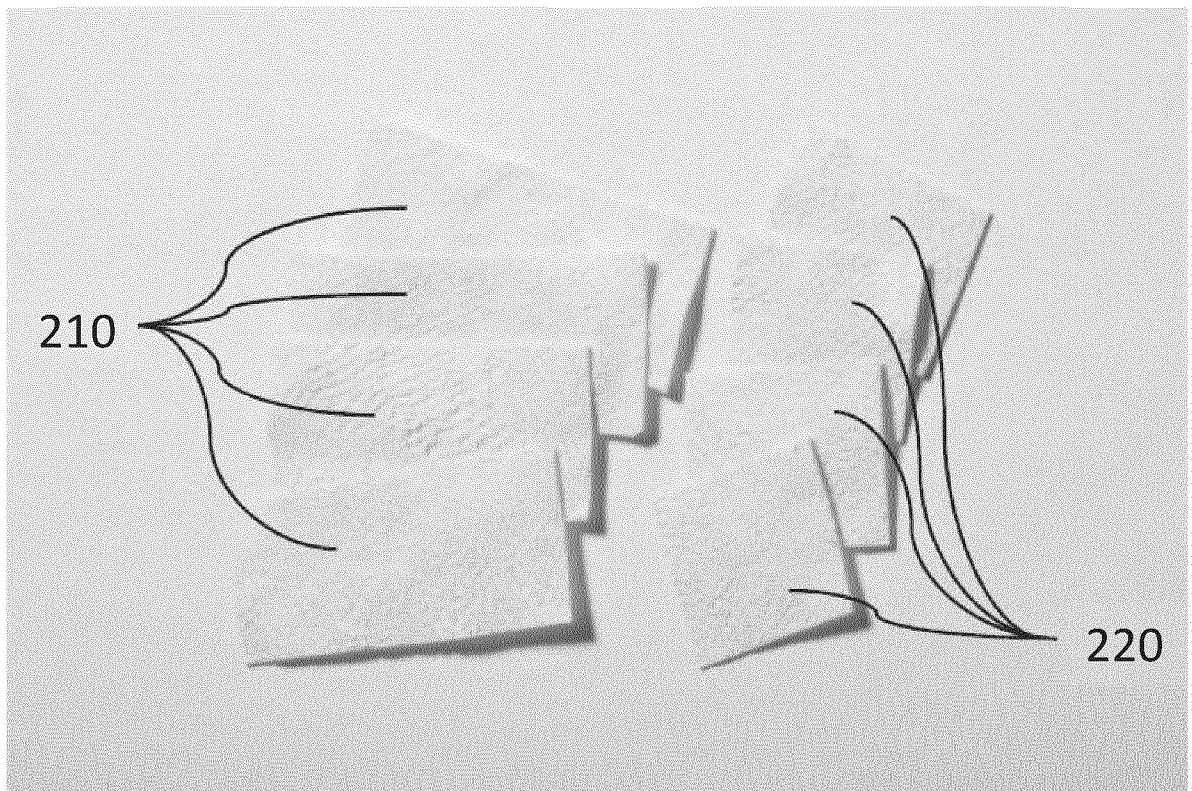


Fig. 2B

Fig. 2C

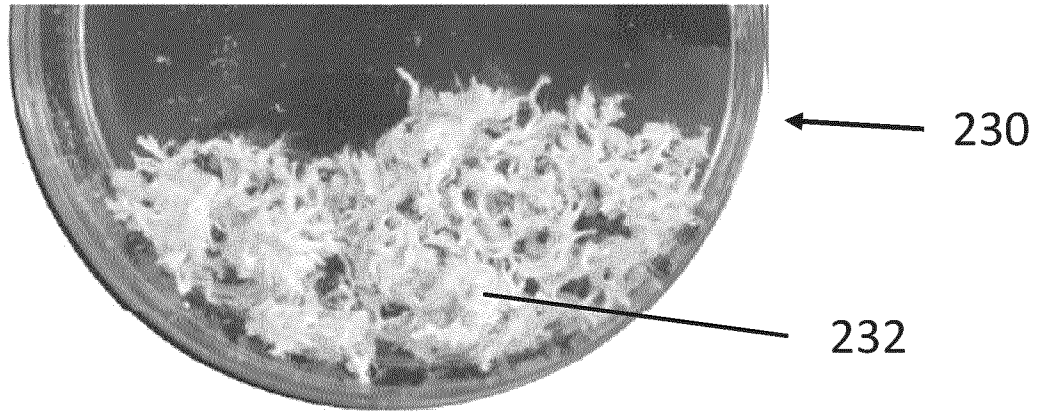


Fig. 2D

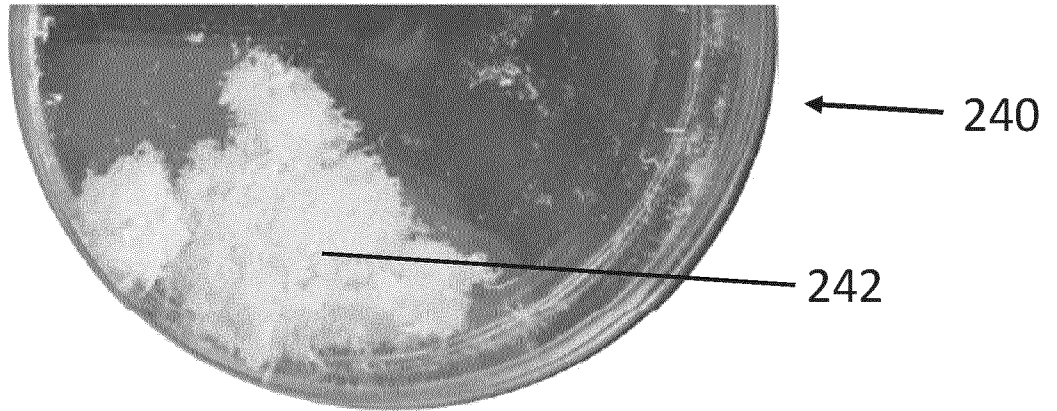
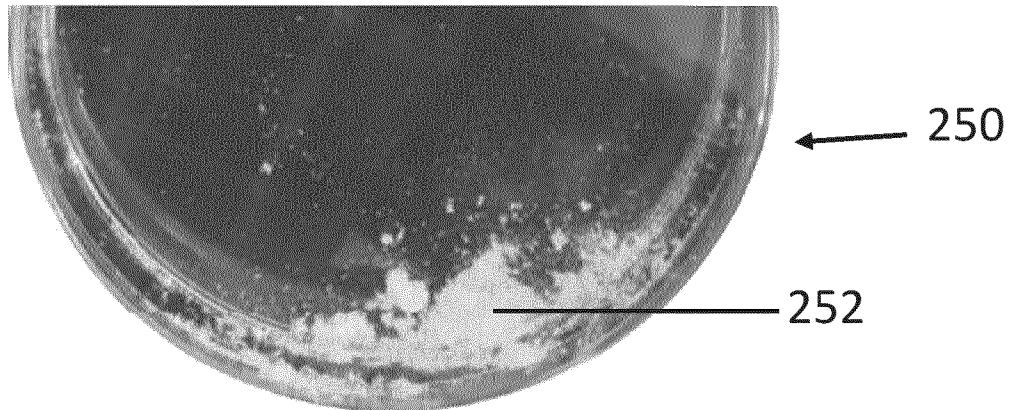


Fig. 2E



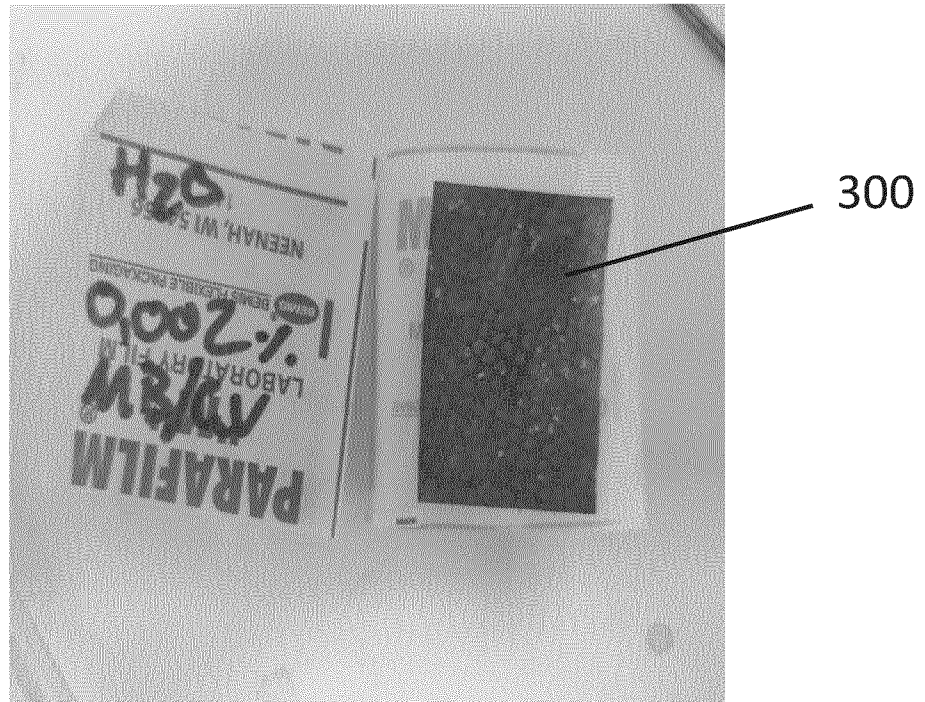


Fig. 3

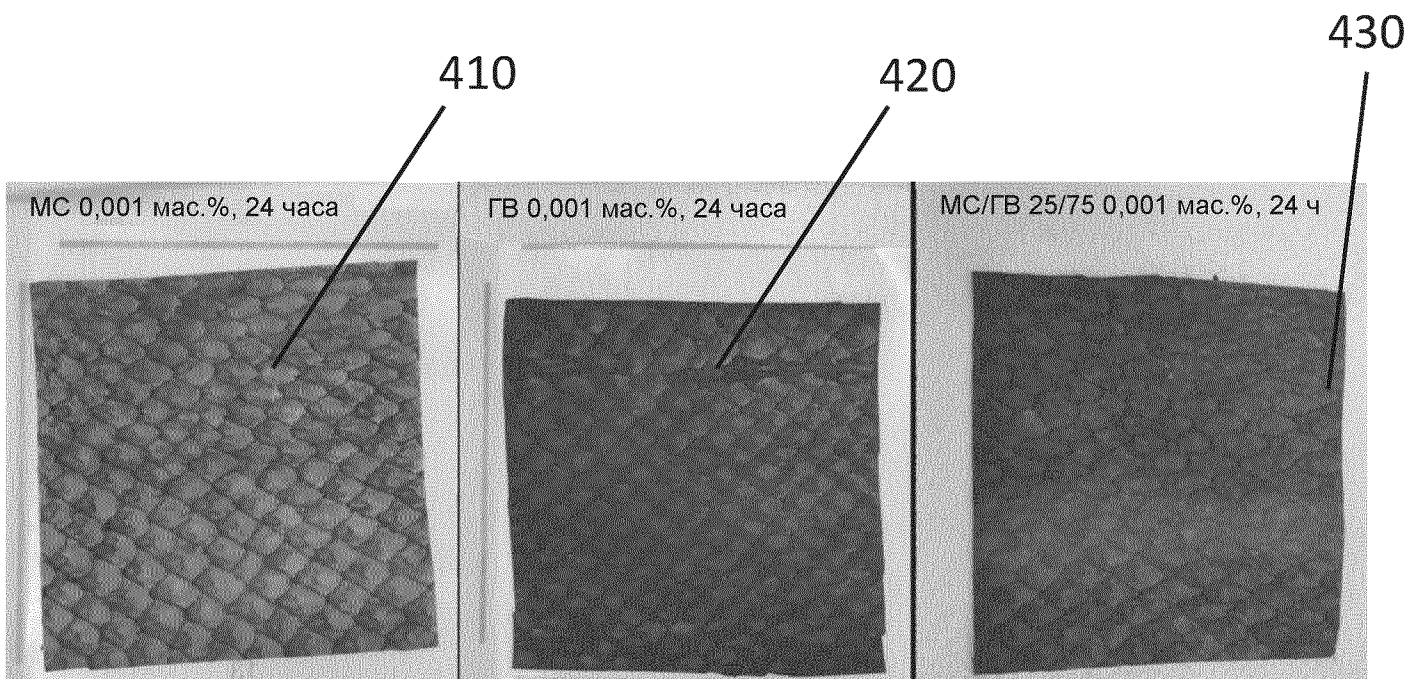


Fig. 4A

Fig. 4B

Fig. 4C

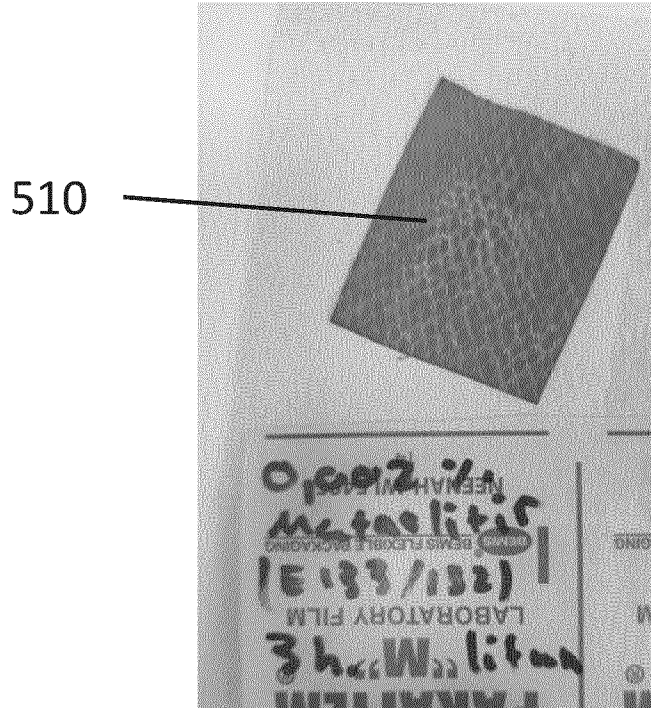


Fig. 5

610

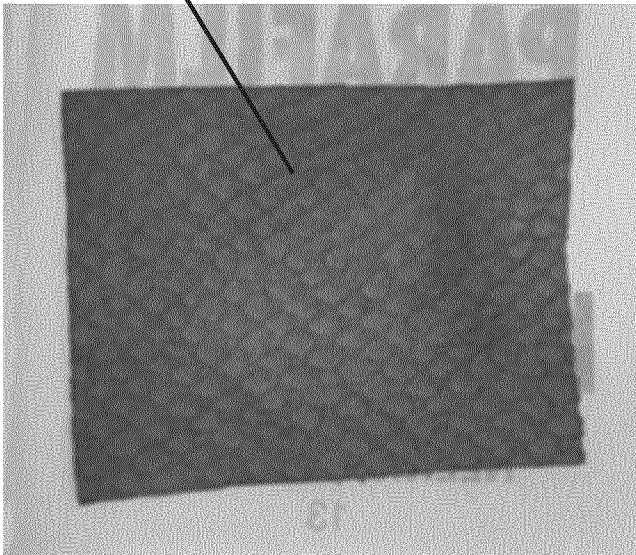


Fig. 6A

620

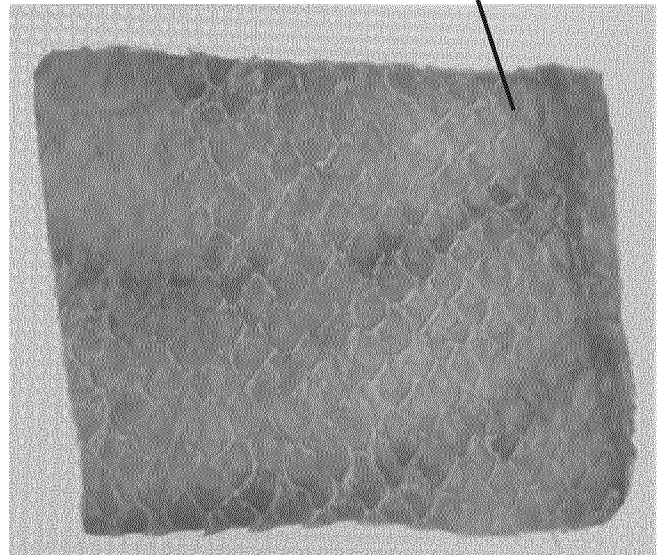


Fig. 6B

630

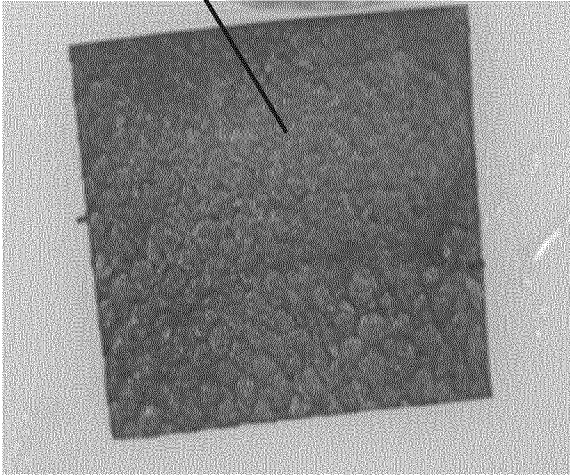


Fig. 6C

640

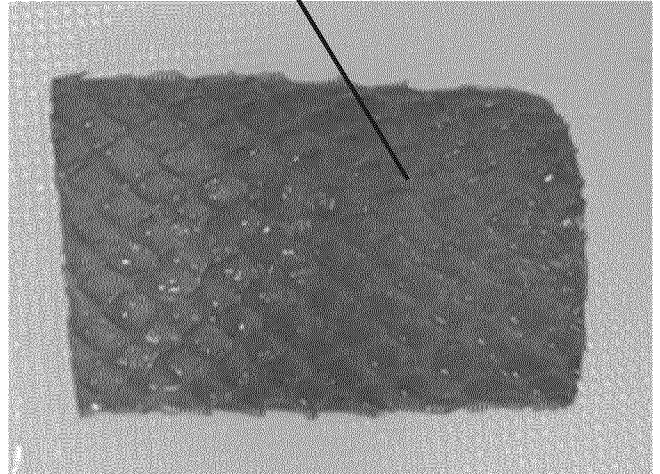


Fig. 6D

710

720

730

740

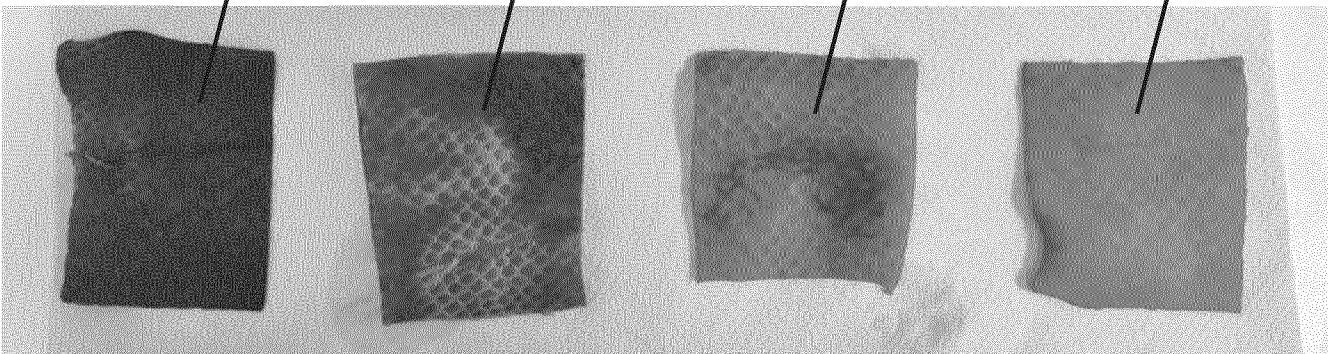


Fig. 7

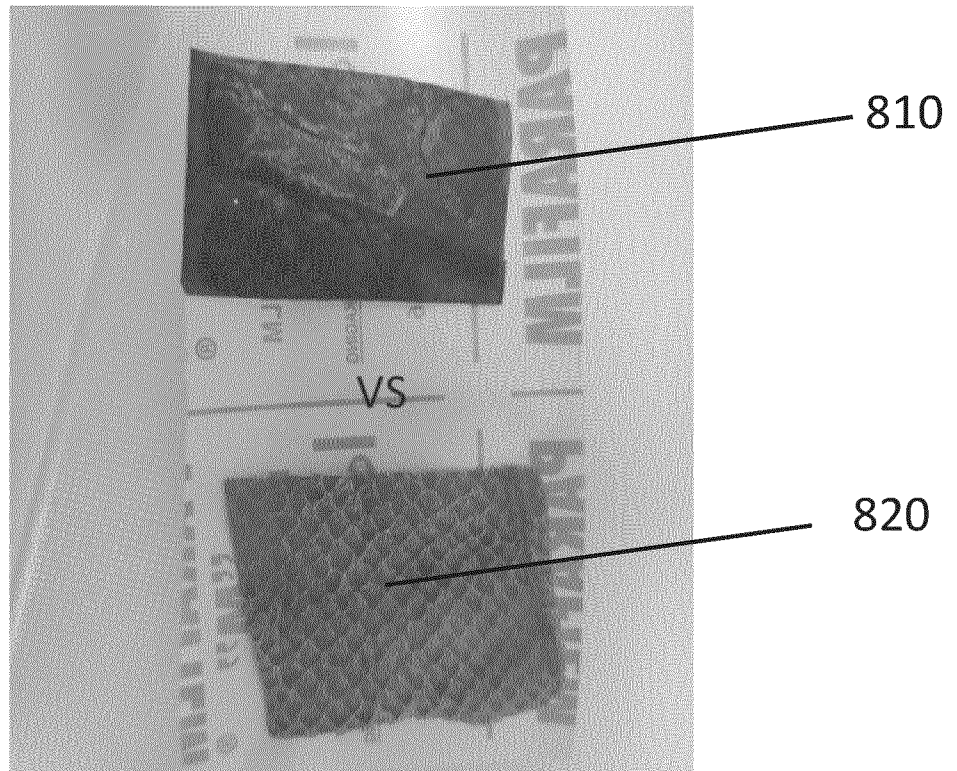


Fig. 8

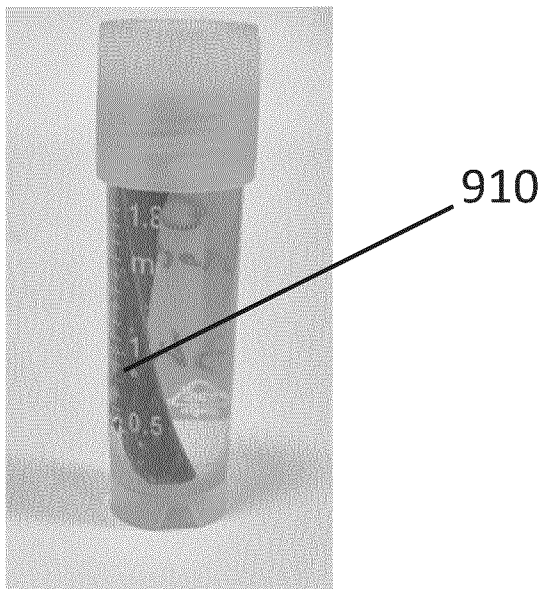


Fig. 9A

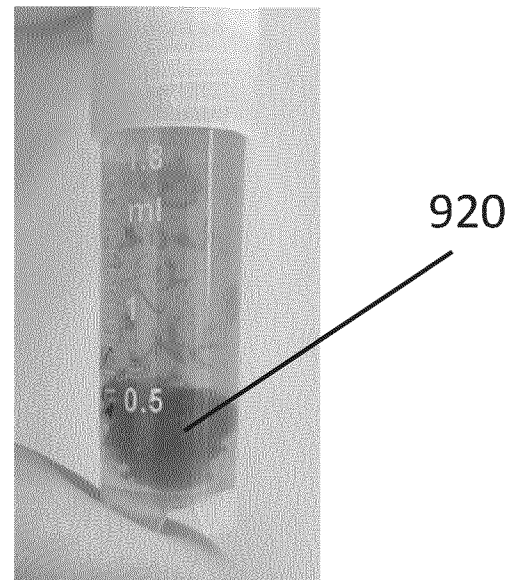


Fig. 9B

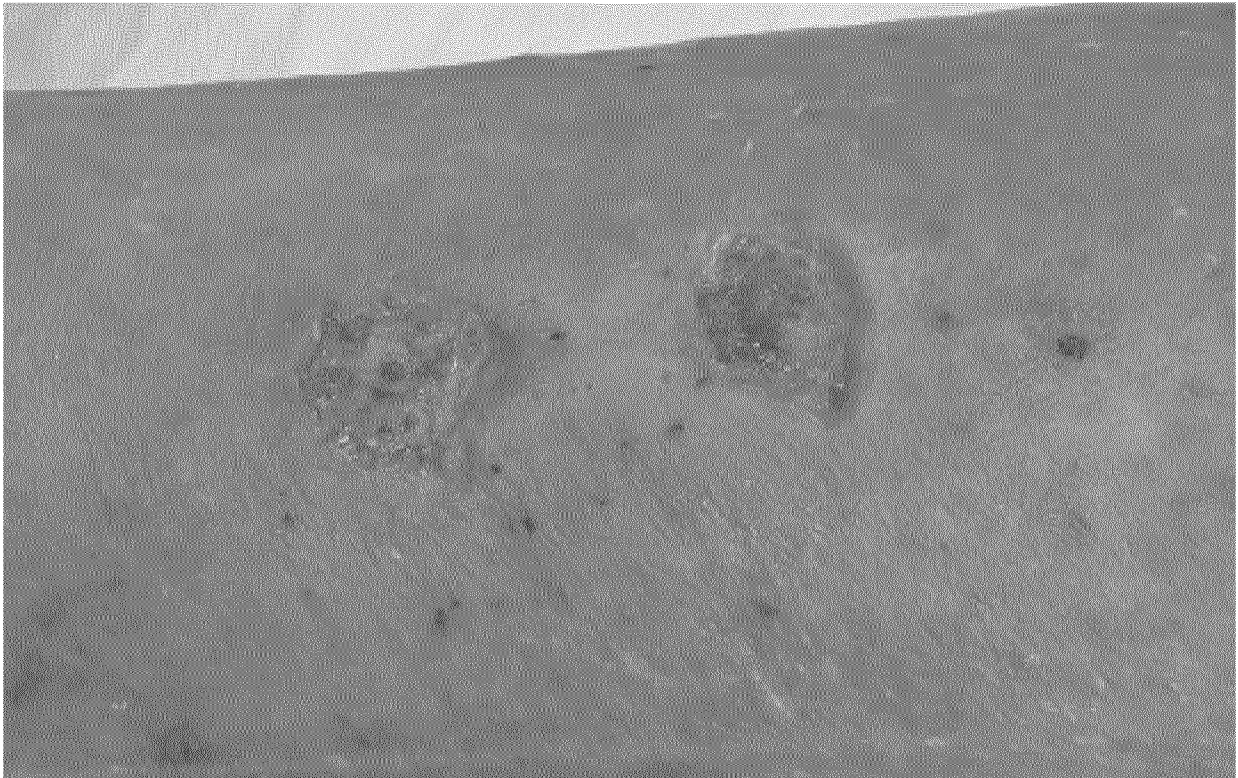


Fig. 10A



Fig. 10B

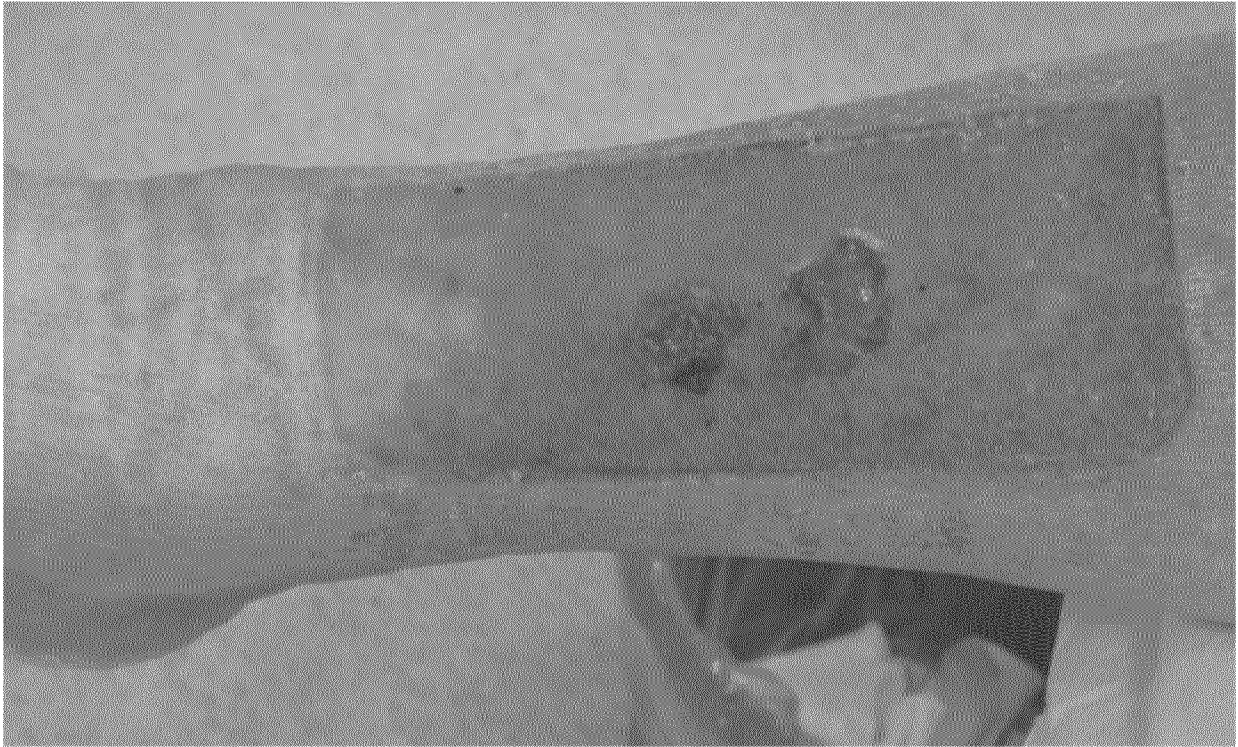


Fig. 11A

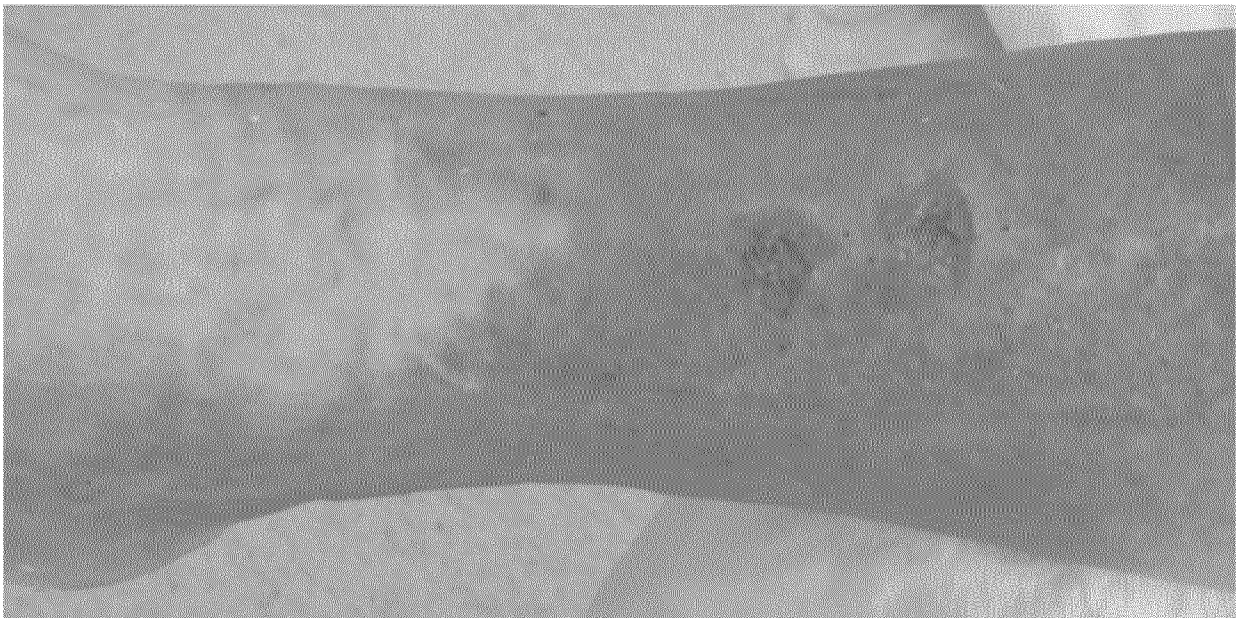


Fig. 11B



Fig. 12A



Fig. 12B



Fig. 12C



Fig. 12D



Fig. 12E



Fig. 12F



Fig. 12G

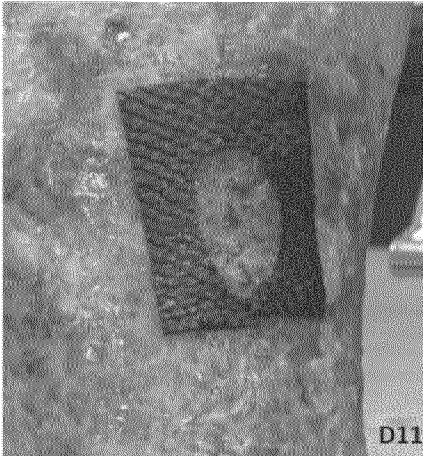


Fig. 12H

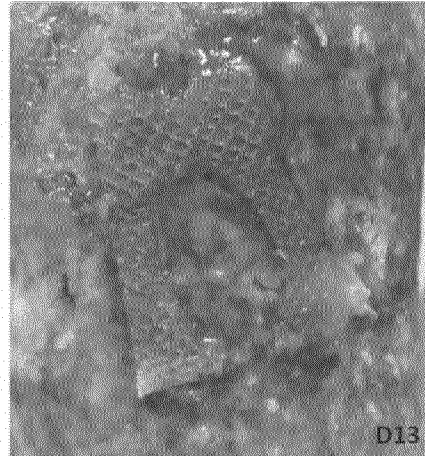


Fig. 12I



Fig. 12J

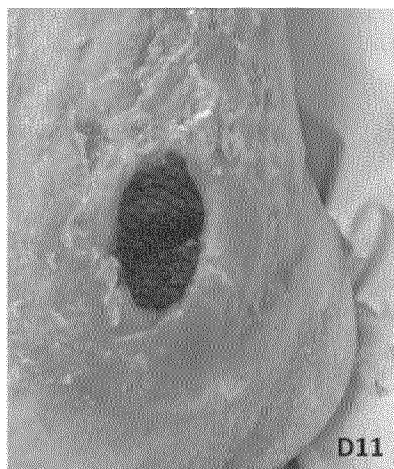


Fig. 12K

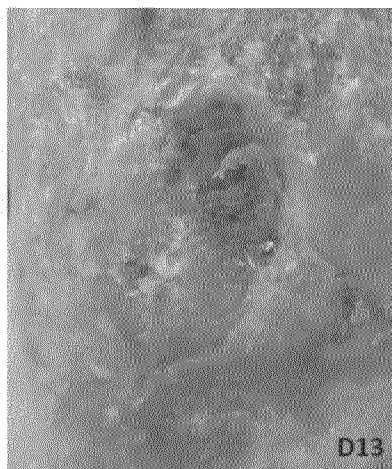


Fig. 12L

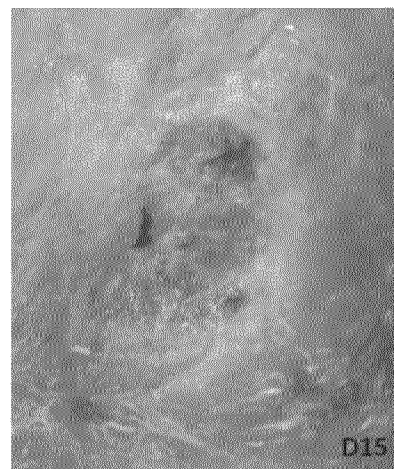


Fig. 12M

1300

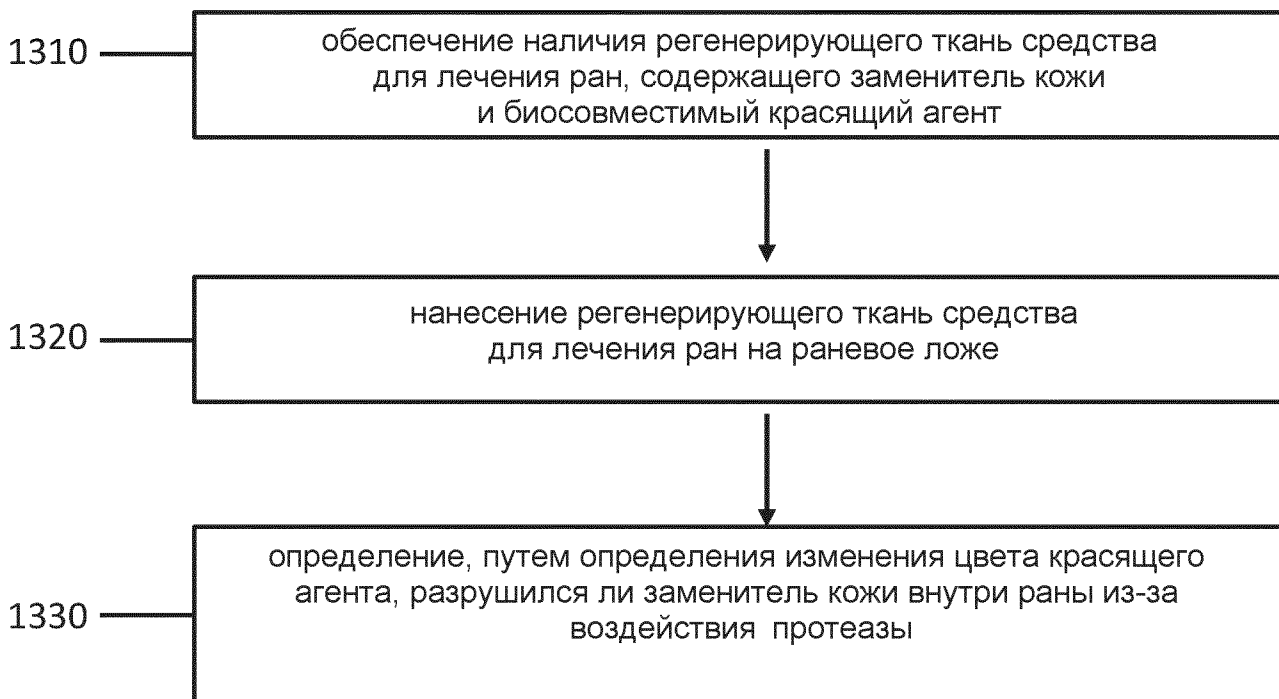


Fig. 13

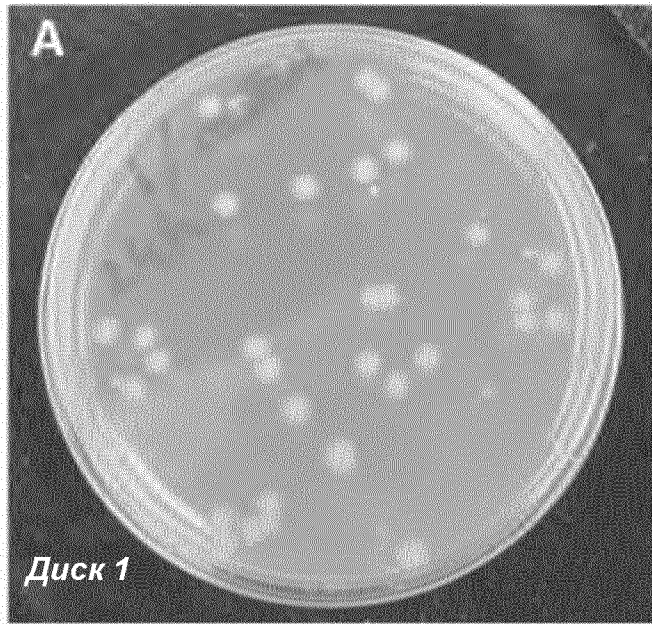


Fig. 14A

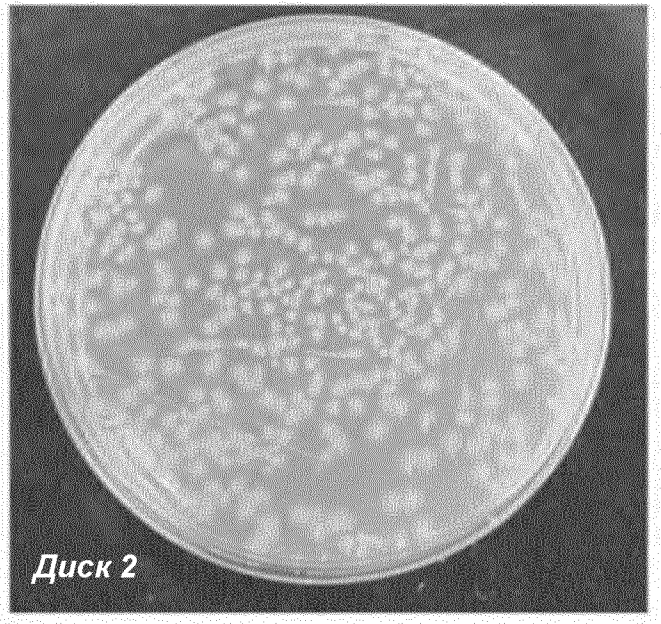


Fig. 14B

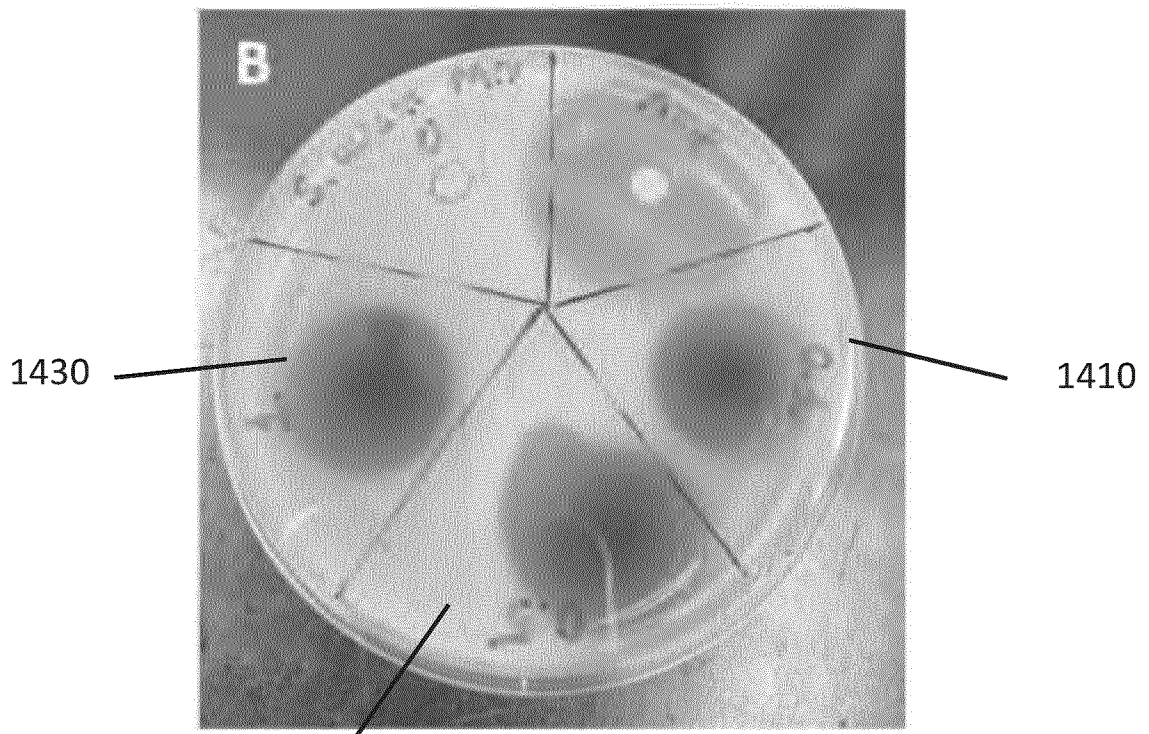


Fig. 14C

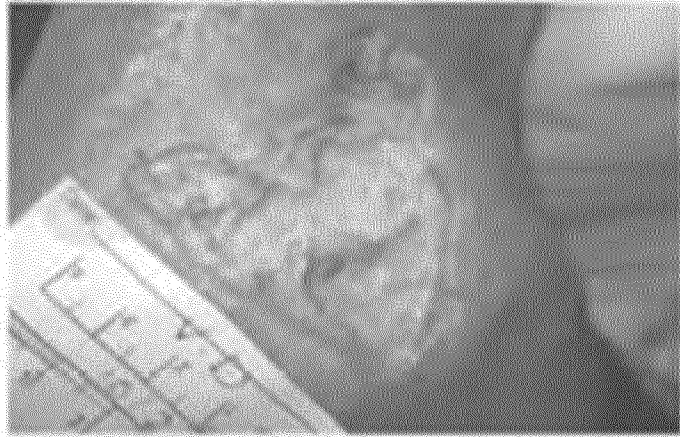


Fig. 15A

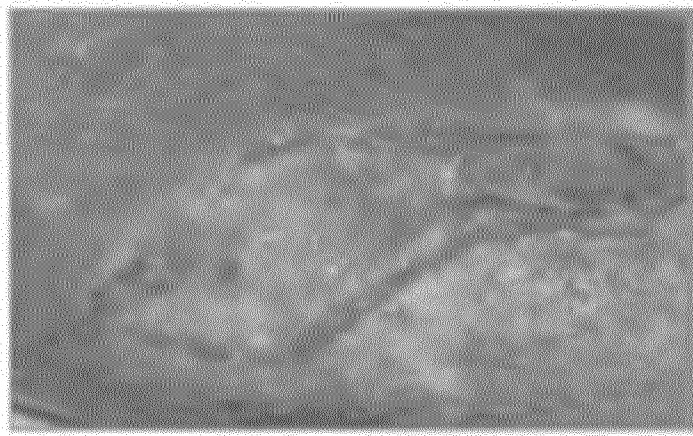


Fig. 15B

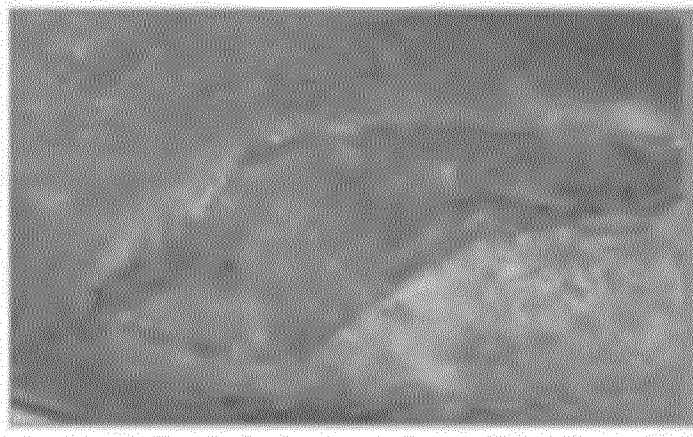


Fig. 15C

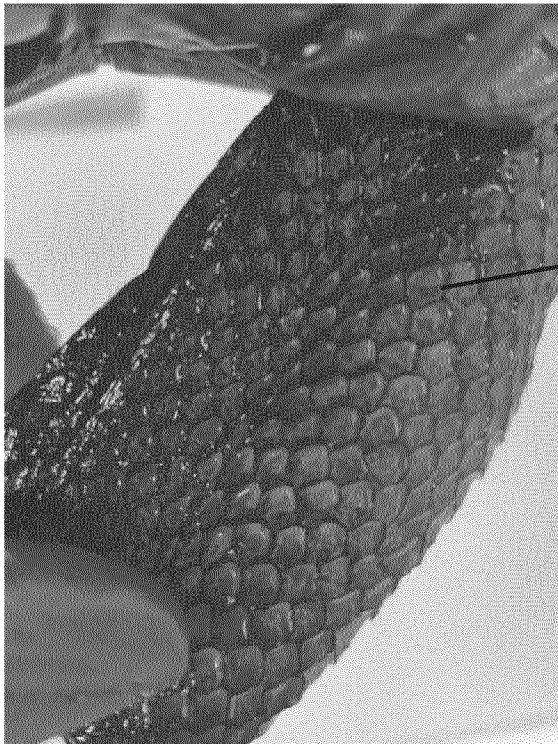


Fig. 16

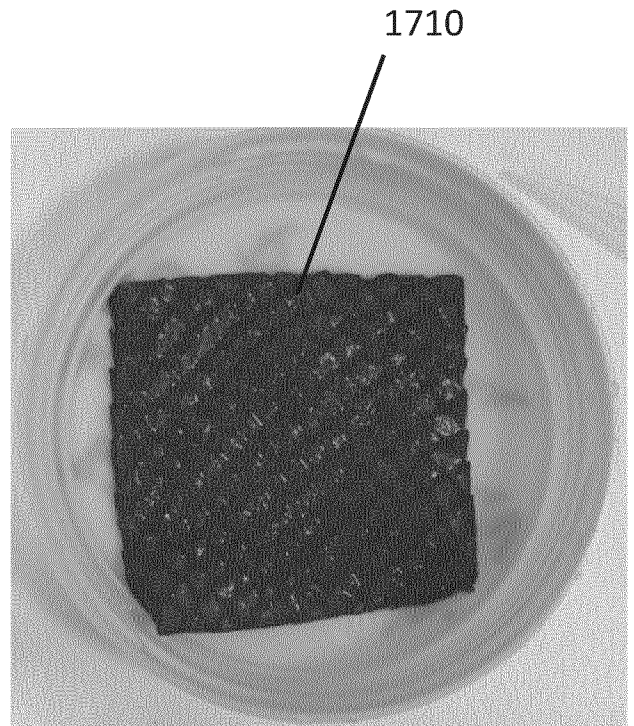


Fig. 17



Fig. 18

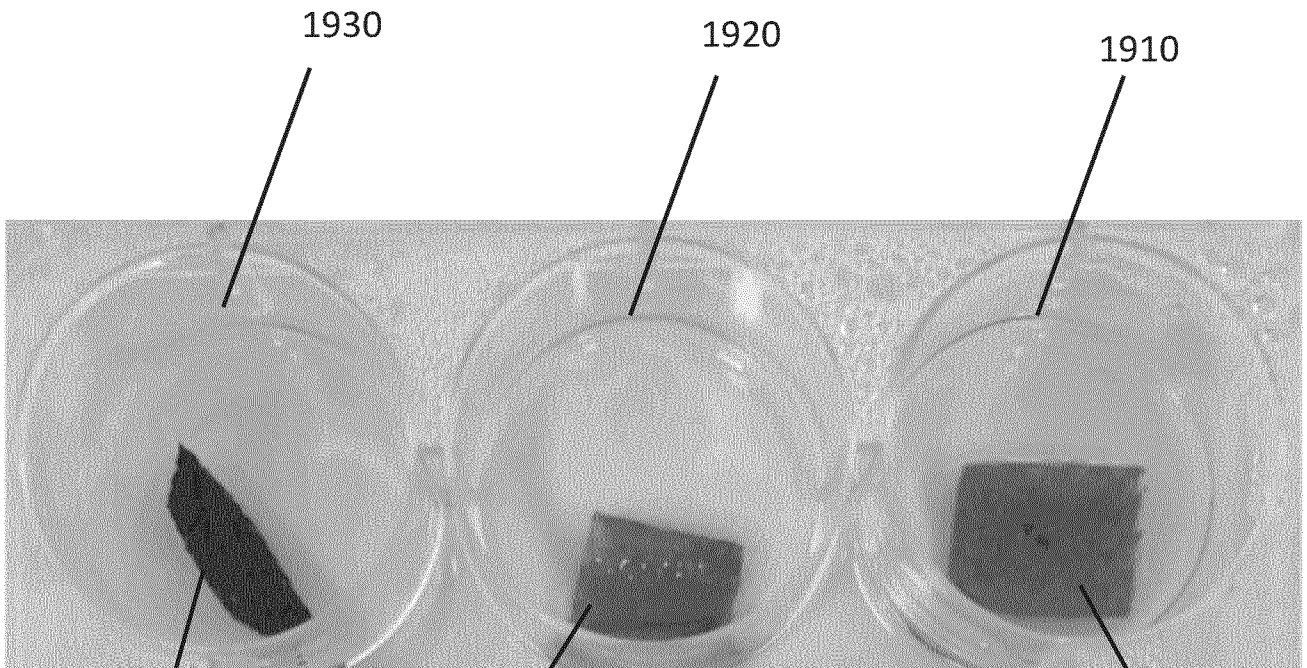


Fig. 19A

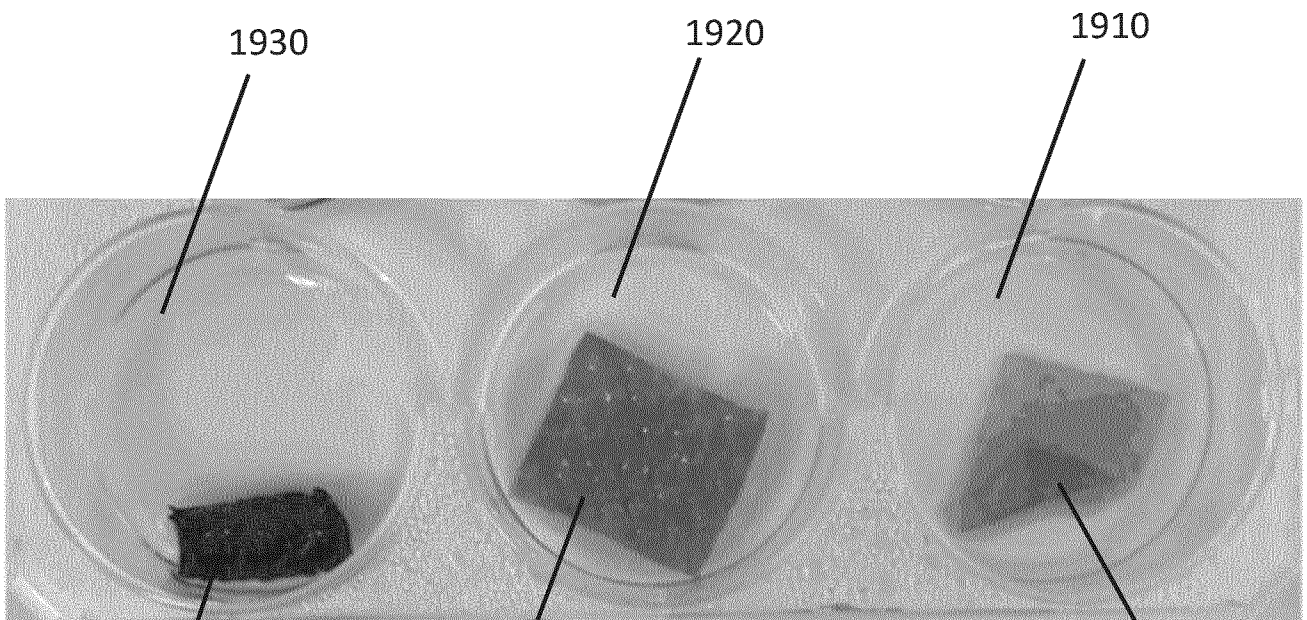


Fig. 19B

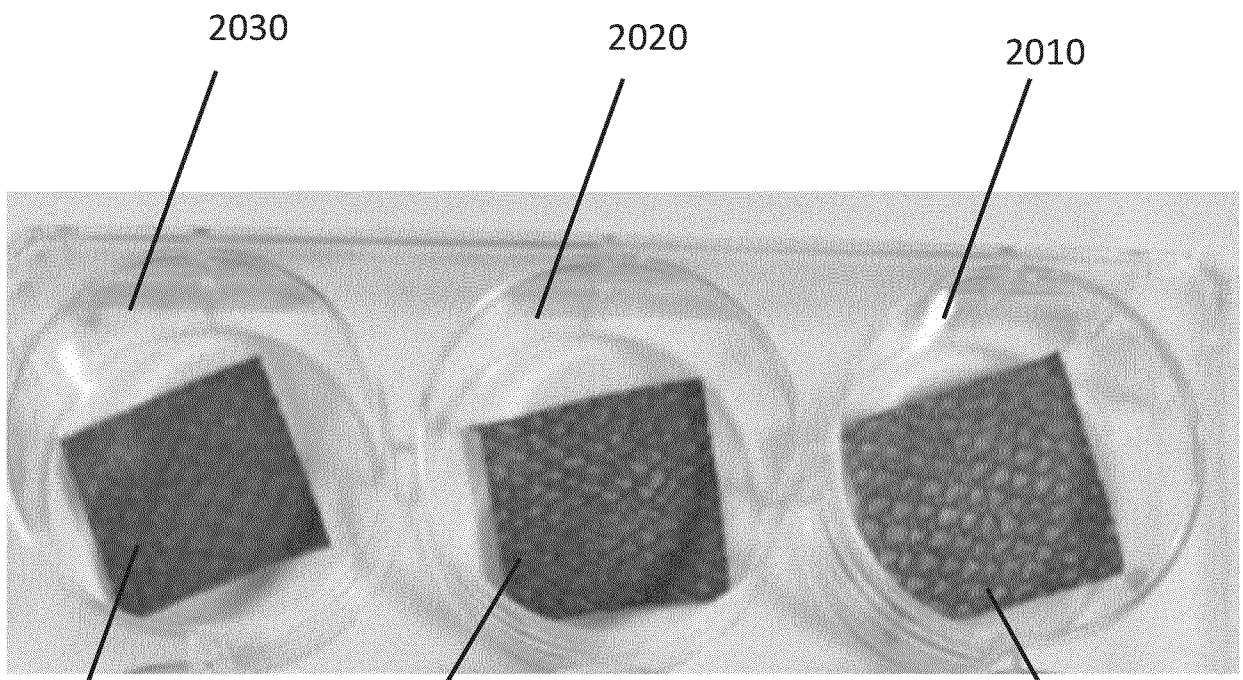


Fig. 20A

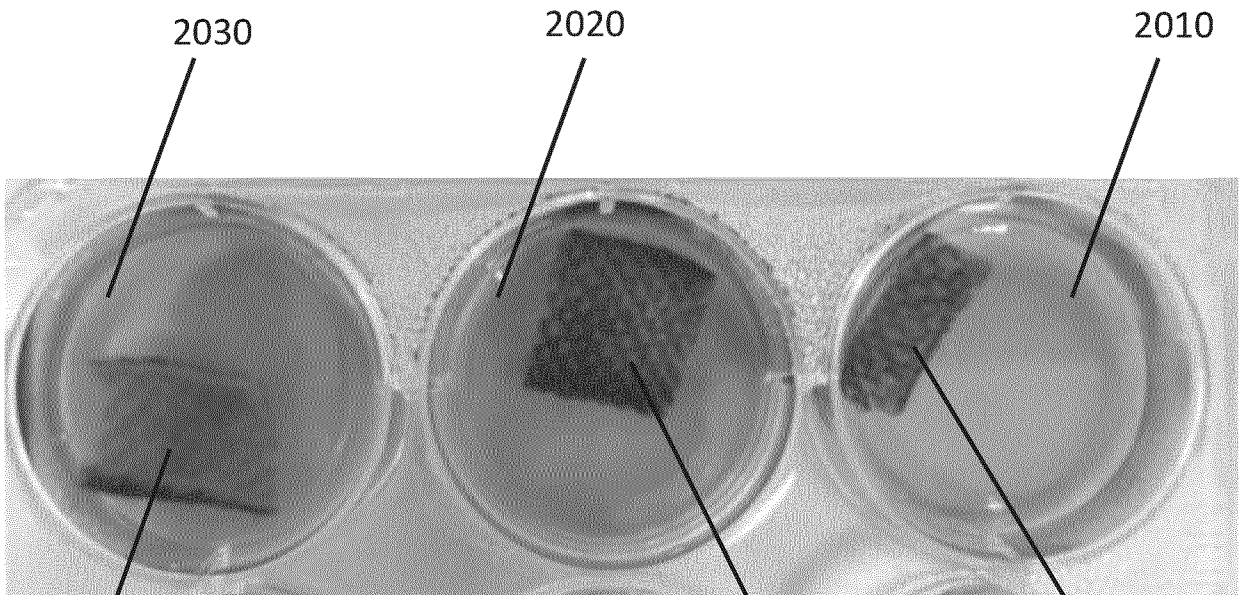


Fig. 20B

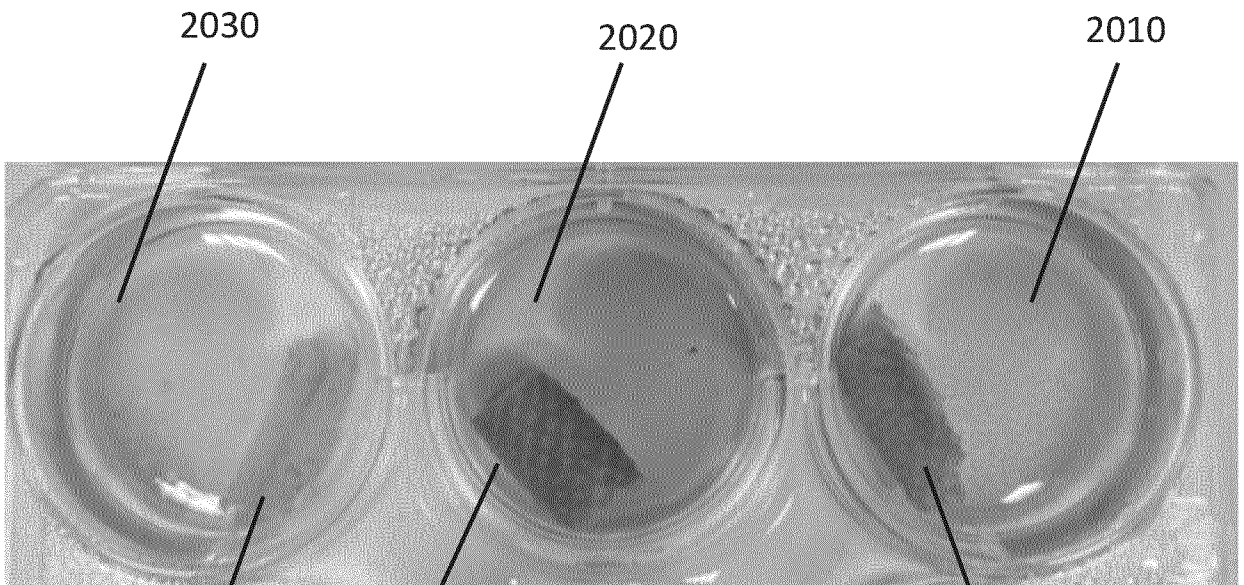


Fig. 20C

20-C

20-B

20-A

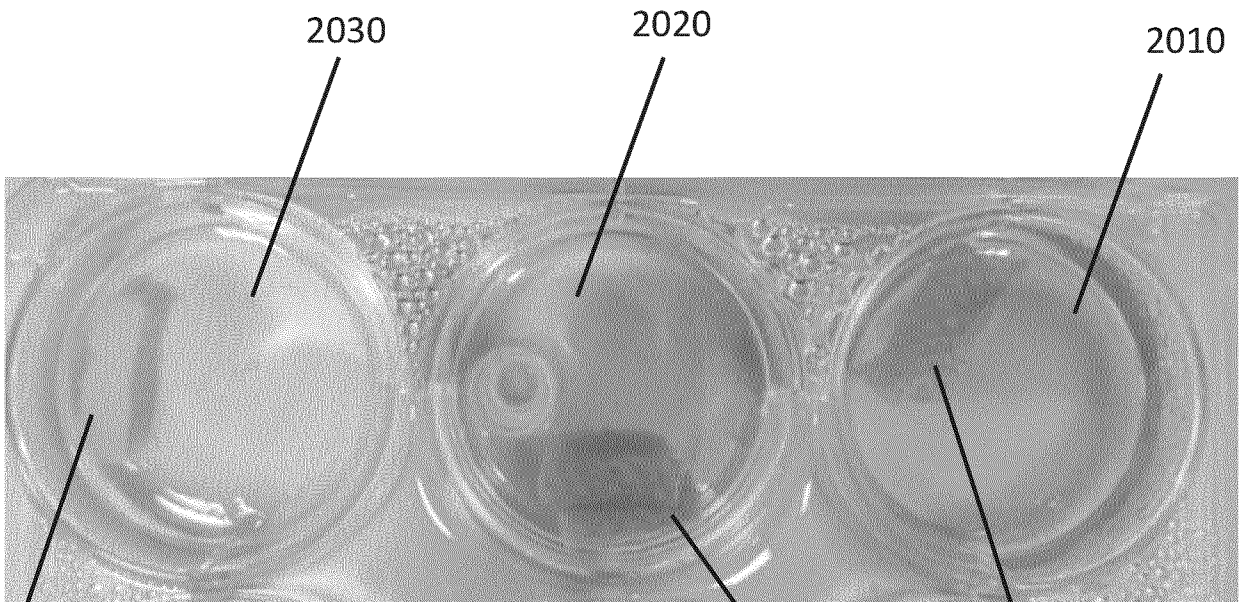


Fig. 20D

20-C

20-B

20-A