

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKAÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2016-656
 (22) Přihlášeno: 20.10.2016
 (40) Zveřejněno: 02.05.2018
 (Věstník č. 18/2018)
 (47) Uděleno: 23.02.2022
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: 06.04.2022
 (Věstník č. 14/2022)

A61L 27/24 (2006.01)
 A61L 27/02 (2006.01)
 B82Y 5/00 (2011.01)
 C08L 71/02 (2006.01)
 C08K 3/32 (2006.01)
 A61K 38/14 (2006.01)
 A61K 31/702 (2006.01)
 A61K 31/7036 (2006.01)
 B82Y 40/00 (2011.01)

(56) Relevantní dokumenty:

S.-H. Teng et al: „Collagen/hydroxyapatite composite nanofibers by electrospinning“ Materials Letters 62 (2008), 3055-3058; M. Iafisco et al: „Electrospun Nanostructured Fibers of Collagen-Biomimetic Apatite on Titanium Alloy“ Bioinorganic Chemistry and Application, Volume 2012, Article ID 123953 doi: 10.1155/2012/123953; T. Suchý et al: „The Sustainable Release of Vancomycin and Its Degradation Products From Nanostructured Collagen/Hydroxyapatite Composite Layers“ Journal of Pharmaceutical Sciences 105 (2016) 1288-1294; S.J. Matcher: "Second-Harmonic Generation" in Optical Techniques in Regenerative Medicine (S.P. Morgan et al eds.) CRC Press Boca Raton 2014 ISBN 13: 978-1-4398-5496-9; D.V. Shepherd et al: "The process of EDC-NHS cross-linking of reconstituted collagen fibres increases collagen fibrillar order and alignment" APL Materials 3 014902 (2015), doi: 10.1063/1.490087; V. Milleret et al.: "Tuning electrospinning parameters for production of 3D-fiber-fleeces with increased porosity for soft tissue engineering applications" European Cells and Materials 21, 286-303 (2011) DOI: 10.22203/eCM.v021a22 (ISSN 1473-2262); B. Wen et al. "An evaluation of BMP-2 delivery from scaffolds with miniaturized dental implants in a novel rat mandible model" Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials, May 2011, 97B (2), 315-326; Y. Zhou et al: "Greener synthesis of electrospun collagen/hydroxyapatite composite fibers with excellent microstructure for bone tissue engineering" International Journal of Nanomedicine 2015 (10) 3203-3215.
 CZ 28 981 U1.

(73) Majitel patentu:
 Ústav struktury a mechaniky hornin AV ČR, v. v.
 i., Praha 8, CZ
 České vysoké učení technické v Praze, Praha 6,
 Dejvice, CZ
 ProSpon spol. s r.o., Kladno, CZ
 Contipro a.s., Dolní Dobrouč, CZ

(72) Původce:
 Ing. Tomáš Suchý, Ph.D., Praha 9, CZ
 Ing. Monika Šupová, Ph.D., Praha 11, CZ
 Ing. František Denk, Praha 17, CZ
 Ing. Šárka Rýglová, Ph.D., Praha 10, CZ
 Ing. Margit Žaloudková, Ph.D., Černošice, CZ
 Ing. Zbyněk Sucharda, Praha 10, CZ
 MUDr. Rastislav Ballay, Praha 4, CZ
 doc. Ing. Lukáš Horný, Ph.D., Pardubice, CZ
 Ing. Zdeněk Čejka, Kladno, CZ
 Ing. Marek Pokorný, Ph.D., Jablonné nad Orlicí,
 CZ
 Ing. Kateřina Knotková, Ph.D., Choceň, CZ
 doc. RNDr. Vladimír Velebný, CSc., Žamberk, CZ

(74) Zástupce:
 KANIA*SEDLÁK*SMOLA Patentová kancelář,
 Ing. Veronika Zemanová, Mendlovo náměstí 1a,
 603 00 Brno

(54) Název vynálezu:
**Příprava nanokompozitní vrstvy na bázi
 kolagenových nanovláken**

(57) Anotace:
 Předmětem vynálezu je způsob výroby nanokompozitní
 vrstvy kombinací elektrospinningu a elektroblovingu
 kolagenového roztoku obsahujícího nanočástice

hydroxyapatitu a polyethylenoxidu, přičemž po přípravě
 a zesílení je vrstva tvořena 75 až 100 % hmotn. vlákny
 kolagenu typu I, 5 až 15 % hmotn. hydroxyapatitu a 0 až
 1 % hmotn. polyethylenoxidu. Dále způsob zahrnuje
 depenování antibiotik pro jejich efektivnější uvolňování
 bez zvyšování cytotoxicity a impregnaci síťovaných
 sterilizovaných kolagen/hydroxyapatitových vrstev
 antibiotiky ve formě roztoku.

Příprava nanokompozitní vrstvy na bázi kolagenových nanovláken

Oblast techniky

5

Předmětem tohoto vynálezu jsou ortopedické a zubní implantáty na bázi kovových slitin pokryté bioaktivní vrstvou kolagenu typu I a hydroxyapatitem, která se vyznačuje efektivním uvolňováním antibiotik. Bioaktivní submikron- a nano strukturovaná vrstva je biodegradovatelná, biokompatibilní a/nebo bioresorbovatelná. Tato vrstva je připravena kombinací elektrospiningu a elektroblowingu kolagenového roztoku obsahujícího nanočástice hydroxyapatitu. Hlavním předmětem tohoto patentu je metoda deponování antibiotik pro jejich efektivnější uvolňování bez zvyšování cytotoxicity. Tato metoda zahrnuje impregnaci síťovaných sterilizovaných kolagen/hydroxyapatitových vrstev antibiotiky ve formě roztoku.

15

Dosavadní stav techniky

S ohledem na značná zdravotní rizika a vysoké náklady spojené s reoperacemi stávajících implantátů, zejména velkých kloubů, představuje prodloužení jejich životnosti funkcionalizací jejich povrchu velmi perspektivní a žádoucí směr vývoje v oblasti zdravotnické techniky. Vzhledem k tomu, že počet ortopedických operací tohoto typu v poslední dekádě celosvětově významně narostl, lze dosáhnout zavedením moderních typů náhrad s bioaktivním povrchem, modifikovaným za využití nanotechnologických řešení, díky vyšší odolnosti a osteointegraci implantátů jak zvýšení komfortu pro pacienta, tak i značných úspor ekonomických. Dodnes nejčastěji používané kovové náhrady na bázi titanu, titanových slitin, nerezové oceli, slitin chromu a kobaltu jsou biokompatibilní, avšak bioinertní. Často také podléhají různým formám koroze v tělním prostředí. Osteointegrace bioinertních kovových náhrad je problematická, jejich povrch je potřeba pro vhodnou fixaci s kostí dodatečně upravovat. Pro zvýšení fixace lze provést fyzikálně-chemickou, či morfologickou modifikaci povrchu endoprotézy. V současné době jsou pro chemické úpravy povrchu kovových náhrad používány především bioaktivní kalcium fosfáty, nejčastěji hydroxyapatit nebo fosforečnan vápenatý. Tyto biokeramické materiály vykazují ve spojení s kostí výborné vlastnosti dané povrchovou reaktivitou způsobenou mechanismem vytvářejícím styčnou mineralizovanou vrstvu mezi implantátem a kostní tkání. Toto rozhraní pak zajišťuje fyzikálně chemickou a mechanickou kohezi mezi implantátem a kostí. Použití těchto materiálů ve své původní formě je však limitované jejich mechanickými vlastnostmi nebo adhezí k povrchu implantátů. Další strategií je pokrytí polymerní vrstvou na bázi syntetických polymerů (alifatické polyestery a jejich kopolymery). Zvýšení bioaktivity povrchu lze dosáhnout pokrytím přírodními polymery (kolagen, želatina). Pokud jsou tyto přírodní polymery ve formě nanovláken doplněny kalcium fosfátem ve formě nanočástic, docílí se nano strukturovaného povrchu ideálního pro vhodnou adhezi a proliferaci kostních buněk. Další předností těchto kompozitních materiálů je možnost volby jednotlivých složek z pohledu jejich skladby a orientace, materiálových, fyzikálních a chemických charakteristik, kterými je možno dosáhnout širokého rozsahu mechanických a biologických vlastností.

Tyto bioaktivní vrstvy mohou sloužit současně jako lokální nosiče antibiotik (ATB) pro jejich postupné uvolňování při prevenci osteomyelitidy. Lokální aplikace antibiotik je více preferována, neboť umožňuje vyšší dávkování, výhodou je i kratší transport a minimální kolísání hladin ATB v krevním řečišti. Antibiotika tak působí i v avaskulárních zónách, bez zvýšení systémové toxicity. Antibiotikum pak může působit jak na zbývající planktonické formy bakterií, tak i na sesilní formy v biofilmu. Lokální nosiče antibiotik navíc vyplní "mrtvý prostor" po odstraněných nekrotických tkání infekcí postižené kosti.

Z nebiodegradabilních matric použitelných jako nosiče ATB je nejznámější polymethylmetakrylát (často používaný jako kostní cement). Jeho nevýhodou je neřízené až příliš rychlé uvolňování ATB v příliš vysokých koncentracích a nutnost další operace po skončení léčby (léčba probíhá

jako dvou kroková – vyhojení, finální implantace). Proto se v současnosti upírá pozornost na výzkum biodegradabilních systémů, jejichž aplikace předpokládá absenci sekundární operace. Tyto systémy navíc skýtají možnost regulace rychlosti uvolňování léků pomocí fyzikálně-chemického uspořádání matrice/nosičů a léků. Tento systém by měl umožnit uvolňování antibiotik v koncentracích, které překračují minimální inhibiční koncentrace pro většinu známých patogenů bez vedlejších účinků. Mezi nejvíce používaná antibiotika patří gentamicin, vankomycin a tobramycin nebo jejich kombinace.

Tempo řízeného uvolňování závisí na permeabilitě, chemické modifikaci matrice/nosič, tloušťka vrstvy, stupeň zesíťování matrice/nosiče, fyzikálně-chemických vlastnostech léčiva, interakce mezi polymerní matricí, navázaným léčivem a rozpouštějícím médiem a vzájemném uspořádání složek. Sledování uvolňování antibiotik *in vitro* se nejčastěji provádí pomocí UV spektrometrie nebo vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC). Biologické testování *in vitro*, které se provádí na osteoblastech nebo na mesenchymálních kmenových buňkách, charakterizují cytotoxicitu nejen samotného materiálu, ale umožňují přímo testovat, zda uvolněná koncentrace antibiotika není již inhibiční nebo zda použité metody přípravy (např. síťování kolagenu) neovlivnily biokompatibilitu studovaného materiálu. Bakteriální testy, charakterizující antibakteriální aktivitu materiálu, se provádějí často se třemi bakteriálními kmeny jako grampozitivní stafylokoky, gramnegativní pseudomonády a E-coli.

Antibiotika je možné deponovat několika různými metodami. Nejjednodušší metodou je prosté smíchání polymeru a antibiotika ve formě prášku nebo roztoků. Negativem tohoto postupu je použití organických rozpouštědel. Další běžnou metodou je smáčení polymeru v roztoku obsahujícím antibiotika. Nanovlákněné vrstvy obohacené antibiotiky jsou velmi často připravovány přímým zvlákněním z roztoku polymeru obsahující dané léčivo. Přestože jsou podmínky aplikované během elektrostatického zvláknění velmi významným aspektem pro stabilitu antibiotik, nejsou brány v úvahu. Některá antibiotika, jako např. vankomycin jsou citlivé na teplotu a je prokázáno, že již při pokojové teplotě se v roztoku během několika hodin přeměňují na antibioticky neaktivní formy léčiva, které nejsou běžně detekovány. Často používaná UV/Vis spektrometrie není schopna tyto antibioticky neaktivní formy stanovit a proto je nutné provádět tyto analýzy pomocí kapalinové chromatografie. Kolagenní nanovlákněné vrstvy je nutné po elektrostatickém zvláknění dále zesíťovat. Během tohoto procesu dochází k jejich vymývání a nanovlákněný nosič se tak stává méně efektivní, což v konečném důsledku s sebou nese i neefektivnost ekonomickou.

Podstata vynálezu

Nedostatky a nevýhody dosavadního stavu techniky jsou do značné míry eliminovány nanokompozitní vrstvou na bázi kolagenových nanovláken pro aplikace na ortopedické a zubní implantáty, která obsahuje nanovlákná se střední hodnotou průměru 100 až 350 nm, přičemž uvedená nanovlákná obsahují 75 až 100 % hmotn. kolagenu typu I, s výhodou 85 až 100 % hmotn., přičemž uvedená nanovlákná obsahují maximálně 1 % hmotn. polyethylenoxidu.

Nanokompozitní vrstva s výhodou dále obsahuje 5 až 15 % hmotn. antibiotika, s výhodou 7 až 12 % hmotn., nejlépe 9 až 11 % hmotn., přičemž antibiotikum je vybrané ze skupiny vankomycin, gentamicin a tobramycin a jejich kombinace.

V dalším výhodném provedení nanokompozitní vrstva dále obsahuje 5 až 15 % hmotn. hydroxyapatitu ve formě nanočástic o velikosti 50 až 250 nm.

Nedostatky dosavadního stavu techniky jsou rovněž do značné míry eliminovány ortopedickým nebo zubním implantátem, který má alespoň část povrchu pokrytou výše uvedenou nanokompozitní vrstvou a který je určený pro použití v humánním nebo veterinárním lékařství.

Předmětem vynálezu jsou tedy rovněž ortopedické a zubní implantáty na bázi kovových slitin pokryté bioaktivní kompozitní vrstvou na bázi kolagenových nanovláken s integrovanými hydroxyapatitovými nanočásticemi a antibiotikem nebo kombinací antibiotik.

- 5 Při výrobě nanokompozitní vrstvy se podle vynálezu postupuje tak, že se kolagen typu I a polyethylenoxid o viskozitně střední molekulové hmotnosti v rozmezí 400 000 až 900 000 v poměru polyethylenoxidu ku kolagenu v rozmezí 0,05 až 0,11 smíchá s fosfátovým pufrem pro získání koncentrace 5 až 11 % hmotn. kolagenu ve směsi, vzniklá směs se vystaví teplotě v rozmezí 32 až 42 °C po dobu alespoň 60 hodin, načež se homogenizuje mísením za současného
10 přidávání ethanolu v konečném objemovém poměru fosfátového pufru ku ethanolu 1:1 až 1:2, následně se směs elektrostaticky zvlákňuje za vzniku nanokompozitní vrstvy, která se následně promyje fyziologickým roztokem nebo fosfátovým pufrem a poté vodou a usuší se.

15 Objasnění výkresů

Vynález je dále podrobněji popsán pomocí příkladných provedení a výkresů, kde znázorňuje

- 20 obr. 1. Koncentrace uvolněné aktivní formy vankomycinu (medián, mezikvartilové rozpětí) z materiálů obsahujících 0 % hmotn. (obr. 1a), 5 % hmotn. (obr. 1b) a 15 (obr. 1c) % hmotn. hydroxyapatitu připravených třemi různými metodami.

- Obr. 2. Velikosti inhibičních zón materiálů připravených jednotlivými metodami s MRSA izoláty. označuje statisticky významné rozdíly (Mann-Whitney test, $p = 0,05$).

- 25 Obr. 3. Uvolňování aktivní formy vankomycinu z materiálů připravených impregnací v prostředí krevní plazmy (medián, mezikvartilové rozpětí). označuje statisticky významné rozdíly (Mann-Whitney test, $p = 0,05$).

- 30 Obr. 4. Velikosti inhibičních zón materiálů připravených impregnací s různou koncentrací hydroxyapatitu a pozitivní kontrola (kontrolní disky EUCAST). * označuje statisticky významné rozdíly (průměr, směrodatná odchylka, Mann-Whitney test, $p = 0,05$) ve srovnání s pozitivní kontrolou.

- 35 Obr. 5. Fluorescenční snímky osteoblastů kultivovaných 2 a 8 dní na impregnovaných vrstvách a vrstvách před impregnací (N0, N5 a N15).

40 Příklady uskutečnění vynálezu

- Níže jsou uvedeny příklady provedení vynálezu, kde obecně je nanovrstva připravena elektrostatickým zvlákňováním kolagenu typu I, s případným přídavkem hydroxyapatitu ve frakci 50 až 250 nm, a s přídavkem polyethylenoxidu, jako 5 až 11 % hmotn., s výhodou 8 % hmotn. roztoku ve fosfátovém pufru (0,01 M dihydrogenfosforečnan sodný, 0,0027 M chlorid draselný a 0,137 M chlorid sodný, pH 7,4 při 25 °C) a s následným přidáním ethanolu v poměru 1:1 (až 1:2) objemově k fosfátovému pufru. Vrstva a proces přípravy jsou navrženy tak, aby kolagenní vlákna vykazovala střední hodnotu průměru 100 až 350 nm a případně do sebe integrovala homogenně rozptýlené nanočástice hydroxyapatitu. Vrstvu lze elektrostaticky nanášet přímo na povrch kovového implantátu.

- 50 Při přípravě se postupuje tak, že odvážené množství lyofilizovaného kolagenu a polyethylenoxidu (PEO) o molekulové hmotnosti v rozmezí 400 000 až 900 000 se smísí s fosfátovým pufrem. Hmotnostní poměr polyethylenoxidu ku kolagenu je 0,05 až 0,11, s výhodou 0,08. Takto připravená směs je vystavena teplotě 32 až 42 °C, nejlépe přibližně 37 °C po dobu alespoň 60
55 hodin, nejlépe alespoň 72 hodin. Dalším krokem přípravy je homogenizace za vysokých otáček v

rozsahu 7000 až 15 000 ot.min⁻¹, při níž je do roztoku přidán hydroxyapatit a ethanol. Takto připravená disperze je elektrostaticky zvláknována v elektrickém poli v rozmezí 200 až 300 kV.m⁻¹, dávkování v rozmezí 100 až 200 µl.min⁻¹, relativní vlhkosti vzduchu nepřesahující 30 % a teplotě nepřesahující 37 °C. Proces zvláknování je s výhodou doplněn electroblowingem, resp. proudem vzduchu, s výhodou přehřátého na 20 až 25 °C, např. o rychlosti proudění 15 až 50 l.min⁻¹. Tento vzduch je přiváděn do oblasti obklopující ústí trysek a příznivě ovlivňuje tvorbu vláken z uvedeného roztoku. Stabilita vrstvy po zvláknění je zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. alkoholu (např. ethanolu) s vodou a *N*-(3- dimethylaminopropyl)-*N*-ethylkarbodiimid hydrochloridem (EDC) a *N*-hydroxysukcinimidem (NHS) při teplotě 32 až 42 °C, s výhodou přibližně 37 °C po dobu 18 až 30 hodin, s výhodou přibližně 24 hodin, čímž dojde k zesíťování. Na 1 g zvlákněného kolagenu připadá minimálně 0,625 g EDC a 0,156 g NHS, tzn. ve vzájemném hmotnostním poměru EDC:NHS 4:1, smísené s minimálně 140 ml 95 % hmotn. alkoholu. Vrstva je po zesíťování promývána ve fyziologickém roztoku nebo fosfátovém pufru po dobu minimálně 2 x 30 minut a nakonec promyta v destilované vodě po dobu minimálně 30 minut. Během síťování a promývání vrstvy dojde v podstatě ke kompletnímu vymytí polyethylenoxidu. Sušení vrstvy je provedeno vakuovým vymrazováním. Takto připravené vrstvy obsahují 85 až 100 % hmotn. kolagenu a 0 až 15 % hmotn. hydroxyapatitu. Pro sterilizaci vrstvy lze využít ethylenoxidovou sterilizaci nebo gama záření se standardními parametry.

Dále jsou s výhodou deponována antibiotika. Antibiotika jsou do vrstvy deponována impregnací v disperzi ethanolu nebo vody nebo fyziologického roztoku o koncentraci antibiotika 10 až 50 % hmotn. Impregnaci lze provést buď ponořením implantátu s nanesenou vrstvou do disperze, nebo nanesením disperze na vrstvu štětcem, případně jejím rozprášením. Po aplikaci disperze je vrstva ponechána při pokojové teplotě do odpaření rozpouštědla. Jako antibiotika lze použít například gentamicin, vankomycin, tobramycin nebo jejich kombinace, například vankomycin a gentamicin v různém hmotnostním poměru. Efektivita impregnace je níže ukázána na příkladu s vankomycinem.

Impregnace vrstev (EI0, EI5 a EI15) byla vybrána jako optimální způsob deponování antibiotika ve srovnání s dalšími dvěma způsoby přípravy - lyofilizací disperze kolagenu, 0, 5 a 15 % hmotn. hydroxyapatitu a 10 % hmotn. vankomycinu (L0, L5 a L15), elektrostatickým zvláknováním disperze kolagenu, 0, 5 a 15 % hmotn. hydroxyapatitu a 10 % hmotn. vankomycinu (E0, E5 a E15). Vliv jednotlivých metod přípravy a strukturálních vlastností vrstev na kinetiku uvolňování vankomycinu bylo stanoveno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a její výsledky jsou uvedeny na obr. 1.

Nejvyšší koncentrace vankomycinu uvolněná z materiálu připraveného lyofilizací byla dosažena po 8 dnech, a to cca 250 mg.l⁻¹. Materiál připravený elektrostatickým zvláknováním vykázal maximální hodnotu po 24 hodinách, a to cca 60 mg.l⁻¹, zatímco materiál impregnovaný dosáhl nejvyšší koncentrace již po 3 hodinách, a to cca 700 mg.l⁻¹. Uvolněné koncentrace aktivní formy vankomycinu překročily minimální inhibiční koncentraci (16 mg.l⁻¹) 17 krát pro lyofilizovaný materiál, 4 krát pro materiál připravený elektrostatickým zvláknováním a 44 krát pro impregnovaný materiál. Koncentrace aktivní formy vankomycinu zůstává po dobu 21 dnů nad minimální inhibiční koncentrací u všech materiálů. Výsledky studia podobného materiálu v literatuře (Wachol-Drevěk 1996 a Tu a kol. 2012) uvádějí, že 90 % vankomycinu bylo uvolněno během 24 hodin a celková doba uvolňování dosáhla 4 dnů. Nejvyšší efektivitu vykazuje materiál impregnovaný, což prokázaly také předběžné testy antimikrobiální citlivosti (obr. 2).

U materiálu připraveného impregnací bylo také studováno uvolňování vankomycinu v krevní plazmě. Jak dokládá obr. 3, materiál i po 30 dnech stále dokáže uvolňovat ~ 62 mg.l⁻¹ aktivní formy vankomycinu, což téměř 4x překračuje minimální inhibiční koncentraci. Efekt koncentrace hydroxyapatitu není patrný.

Dále byl tento materiál podroben srovnávacím testům antimikrobiální citlivosti na čtyři bakteriální kmeny. Velikosti inhibičních zón jednotlivých bakteriálních kmenů jsou uvedeny na

obr. 4. Všechny studované materiály vykazaly antibakteriální aktivitu proti oběma izolátům *Staphylococci* a izolátům rezistentním na gentamycin. Velikost inhibičních zón byla srovnatelná s pozitivní kontrolou (standardní disk, EUCAST). Negativní kontrola (vzorek bez vankomycinu) vykazala nulovou inhibiční zónu (v grafu neuvedeno).

5

Impregnované vrstvy byly dále podrobeny testům cytotoxicity a cytokompatibility *in vitro* za použití kostních buněk (SAOS-2, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Německo). Buňky byly kultivovány jak v prostředí výluhů, tak přímo na vrstvách a byla posuzována jejich metabolická aktivita (MTS test), mikroskopicky byla vyšetřována jejich adheze a proliferace. Testy prokázaly, že uvolňovaná množství antibiotik nejsou toxická, vrstvy jsou cytokompatibilní. Na obr. 5 jsou pro ilustraci uvedeny snímky fluorescenčně barvených buněk po dvou a osmi denní kultivaci na vrstvách s vankomycinem, bez vankomycinu (N0, N5 a N15) a na pozitivní kontrole (PS).

15 Příklad 1

Nanovrstva byla připravena elektrostatickým zvlákněním kolagenu typu I jako 8 % hmotn. roztoku ve fosfátovém pufru a s následným přidáním ethanolu (1:1 objemově), do kterého byl přidán polyethylenoxid ve hmotnostním poměru PEO:kolagen 0,08. Kolagenní vlákna vykazovala střední hodnotu průměru přibližně 220 nm. Vrstva byla elektrostaticky nanášena přímo na povrch kovového implantátu. Při přípravě se postupovalo tak, že odvážené množství lyofilizovaného kolagenu a polyethylenoxidu o molekulové hmotnosti 900 000 se smísilo s fosfátovým pufrem. Takto připravená směs byla vystavena teplotě 37 °C po dobu 72 hodin. Dalším krokem přípravy byla homogenizace za vysokých otáček 10.000 ot.min⁻¹, při níž byl do roztoku přidán ethanol. Takto připravená disperze byla elektrostaticky zvlákněná v elektrickém poli 250 kV.m⁻¹, dávkování 130 µl.min⁻¹, relativní vlhkosti vzduchu 25 % a teplotě 30 °C. Proces zvláknění byl doplněn electroblowingem, resp. proudem vzduchu předehřátého na přibližně 24 °C o rychlosti proudění 35 l.min⁻¹. Stabilita vrstvy po zvláknění byla zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. ethanolu s vodou a EDC a NHS při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Na 1 g kolagenu připadalo 0,625 g EDC a 0,156 g NHS smísené s 140 ml 95 % hmotn. alkoholu. Vrstva byla po zesíťování promývána v 0.1M Na₂HPO₄ po dobu 2 x 30 minut a nakonec promývána v destilované vodě po dobu 30 minut. Během síťování a promývání vrstvy došlo v podstatě ke kompletnímu vymytí polyethylenoxidu. Sušení vrstvy bylo provedeno vakuovým vymrazováním. Takto připravená vrstva obsahovala 100 % hmotn. kolagenu. Pro sterilizaci vrstvy byla využita ethylenoxidová sterilizace. Následně byla do vrstvy deponována antibiotika impregnací v disperzi ethanolu o koncentraci antibiotika 20 % hmotn. Jako antibiotikum byl použit vankomycin. Impregnace byla provedena aplikací disperze antibiotika na nanosenou vrstvu štětcem tak, aby konečná koncentrace antibiotika ve vrstvě (po odpaření rozpouštědla) činila 8 % hmotn. z celkové hmotnosti vrstvy. Po aplikaci disperze byla vrstva ponechána při pokojové teplotě do odpaření rozpouštědla.

Příklad 2

Nanovrstva byla připravena elektrostatickým zvlákněním kolagenu typu I jako 10 % hmotn. roztoku ve fosfátovém pufru a ethanolu (1:1 objemově), do kterého byl přidán polyethylenoxid ve hmotnostním poměru 0,10 ku kolagenu. Kolagenní vlákna vykazovala střední hodnotu průměru 180 nm a integrovala do sebe homogenně rozptýlené nanočástice hydroxyapatitu ve frakci 170 nm. Vrstva byla elektrostaticky nanášena přímo na povrch kovového implantátu. Při přípravě se postupovalo tak, že odvážené množství lyofilizovaného kolagenu a polyethylenoxidu o molekulové hmotnosti 800 000 se smísilo s fosfátovým pufrem. Takto připravená směs byla vystavena teplotě 35 °C po dobu 88 hodin. Dalším krokem přípravy byla homogenizace za vysokých otáček 12 000 ot.min⁻¹, při níž byl do roztoku přidán hydroxyapatit v hmotnostním poměru 5:95 na kolagen, a ethanol. Takto připravená disperze byla elektrostaticky zvlákněná v elektrickém poli 280 kV.m⁻¹, dávkování 140 µl.min⁻¹, relativní vlhkosti vzduchu 25% a teplotě 27 °C. Proces zvláknění byl doplněn electroblowingem, resp. proudem vzduchu předehřátého

na 22 °C o rychlosti proudění 40 l.min⁻¹. Stabilita vrstvy po zvláknění byla zvýšena máčením v 95 % hmotn. vodného roztoku ethanolu a EDC a NHS při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Na 1 g zvlákněného kolagenu připadá 0,800 g EDC a 0,200 g NHS smísené s 200 ml 95 % hmotn. alkoholu. Vrstva byla po zesíťování promyta v 0.1M Na₂HPO₄ po dobu 2 x 40 minut a nakonec
 5 promyta v destilované vodě po dobu 30 minut. Během síťování a promývání vrstvy došlo v podstatě ke kompletnímu vymytí polyethylenoxidu. Sušení vrstvy bylo provedeno vakuovým vymrazováním. Takto připravená vrstva obsahovala 95 % hmotn. kolagenu a 5 % hmotn. hydroxyapatitu. Pro sterilizaci vrstvy byla použita ethylenoxidová sterilizace. Antibiotika byla do vrstvy deponována impregnací v disperzi vody o koncentraci antibiotika 30 % hmotn. Jako
 10 antibiotikum byl použit gentamicin. Impregnace byla provedena aplikací disperze antibiotika na nanosenou vrstvu štětcem tak, aby konečná koncentrace antibiotika ve vrstvě (po odpaření rozpouštědla) činila 10 % hmotn. na celkovou hmotnost vrstvy. Po aplikaci disperze byla vrstva ponechána při pokojové teplotě do odpaření rozpouštědla.

15 Příklad 3

Nanovrstva byla připravena elektrostatickým zvlákněním kolagenu typu I jako 8 % hmotn. roztoku ve fosfátovém pufru a ethanolu (1:1 objemově), do kterého je přidán polyethylenoxid ve hmotnostním poměru 0,08 ku kolagenu. Kolagenní vlákna vykazovala střední hodnotu průměru
 20 310 nm a integrovala do sebe homogenně rozptýlené nanočástice hydroxyapatitu ve frakci 190 nm. Vrstva se elektrostaticky nanášela přímo na povrch kovového implantátu. Při přípravě se postupovalo tak, že odvážené množství lyofilizovaného kolagenu a polyethylenoxidu o molekulové hmotnosti 700 000 se smísilo s fosfátovým pufrem. Takto připravená směs byla vystavena teplotě 40 °C po dobu 92 hodin. Dalším krokem přípravy byla homogenizace za
 25 vysokých otáček 15 000 ot.min⁻¹, při níž byl do roztoku přidán hydroxyapatit v hmotnostním poměru 15:85 na kolagen, a ethanol. Takto připravená disperze byla elektrostaticky zvlákněná v elektrickém poli 270 kV.m⁻¹, dávkování 150 µl.min⁻¹, relativní vlhkosti vzduchu 26 % a teplotě 25 °C. Proces zvláknění je doplněn electroblowingem, resp. proudem vzduchu předehřátého na 24 °C o rychlosti proudění 45 l.min⁻¹. Stabilita vrstvy po zvláknění byla zvýšena máčením v
 30 roztoku 95 % hmotn. alkoholu s vodou a EDC a NHS při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Na 1 g zvlákněného kolagenu připadá 0,920 g EDC a 0,230 g NHS smísené s minimálně 250 ml 95 % hmotn. alkoholu. Vrstva je po zesíťování promyta v 0.1M Na₂HPO₄ po dobu 2 x 35 minut a nakonec promyta v destilované vodě po dobu 40 minut. Během síťování a promývání vrstvy došlo v podstatě ke kompletnímu vymytí polyethylenoxidu. Sušení vrstvy bylo provedeno
 35 vakuovým vymrazováním. Takto připravená vrstva obsahovala nanovlákna obsahující 85 % hmotn. kolagenu a 15 % hmotn. hydroxyapatitu. Pro sterilizaci vrstvy byla využita ethylenoxidová sterilizace. Antibiotika byla do vrstvy deponována impregnací v disperzi alkoholu o koncentraci antibiotika 30 % hmotn. Jako antibiotikum byla použita kombinace gentamicinu a vankomycinu ve vzájemném hmotnostním poměru 1:1. Impregnace byla
 40 provedena rozprášením disperze sprejem. Po aplikaci disperze byla vrstva ponechána při pokojové teplotě do odpaření rozpouštědla. Impregnace byla provedena aplikací disperze antibiotika na nanosenou vrstvu štětcem tak, aby konečná koncentrace antibiotika ve vrstvě (po odpaření rozpouštědla) činila 11 % hmotn. na celkovou hmotnost vrstvy.

45 Ačkoli byla popsána řada příkladných provedení, je zřejmé, že odborník z dané oblasti snadno nalezne další možné alternativy k těmto provedením. Proto rozsah vynálezu není omezen na tato příkladná provedení, ale spíše je dán definicí přiložených patentových nároků.

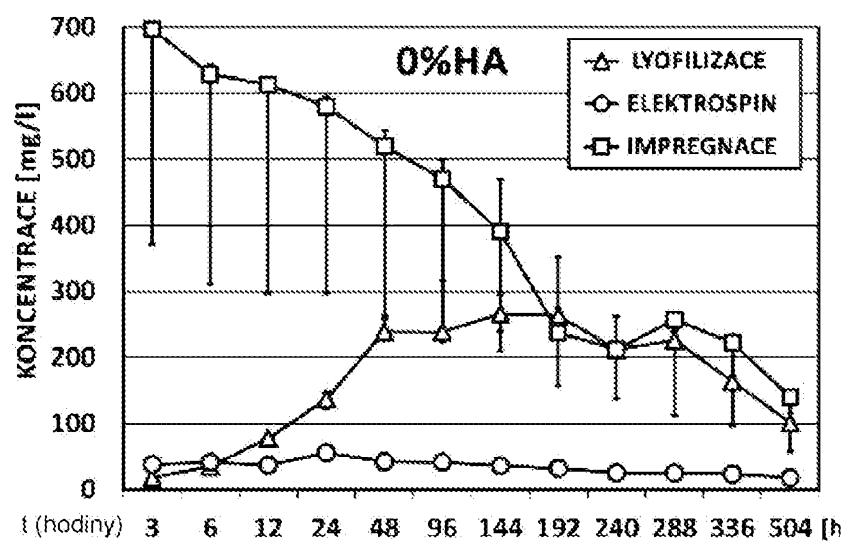
50 Průmyslová využitelnost

Ortopedické a zubní implantáty na bázi kovových slitin pokryté bioaktivní vrstvou kolagenu typu I, případně i s obsahem hydroxyapatitu a deponovaným antibiotikem připravenou způsobem podle tohoto vynálezu lze využít v humánní a veterinární medicíně, zejména v ortopedii a
 55 stomatologii.

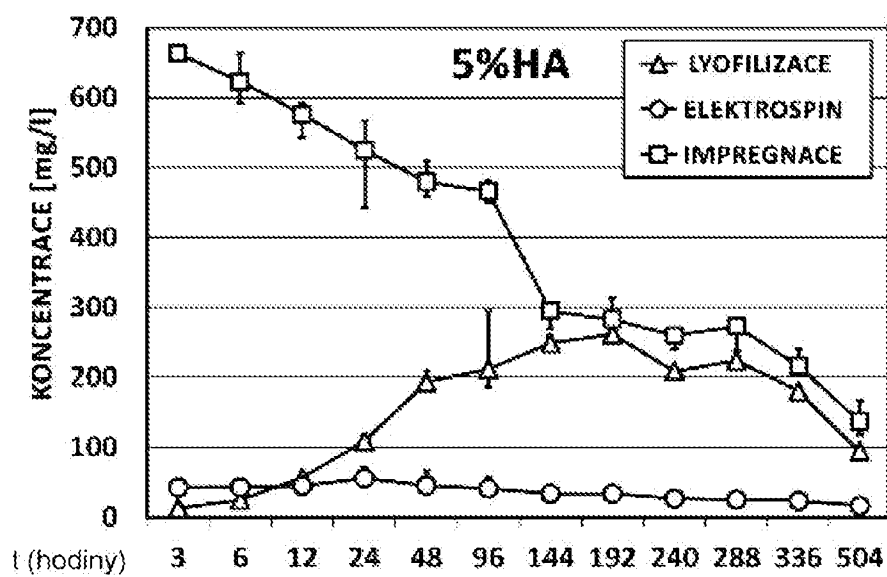
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob výroby bioaktivní nanokompozitní vrstvy na bázi kolagenových nanovláken, **vyznačující se tím**, že se kolagen typu I a polyethylenoxid o viskozitně střední molekulové hmotnosti v rozmezí 400 000 až 900 000 v hmotnostním poměru polyethylenoxidu ku kolagenu v rozmezí 0,05 až 0,11 smíchá s fosfátovým pufrem pro získání koncentrace 5 až 11 % hmotn. kolagenu ve směsi, vzniklá směs se vystaví teplotě v rozmezí 32 až 42 °C po dobu alespoň 60 hodin, načež se homogenizuje mísením za současného přidávání ethanolu v konečném objemovém poměru fosfátového pufru ku ethanolu 1:1 až 1:2 a při homogenizaci se do roztoku současně přidává hydroxyapatit v množství 5 až 15 % hmotn. vzhledem k množství kolagenu, následně se směs elektrostaticky zvláknuje za vzniku nanokompozitní vrstvy, která se následně promyje fyziologickým roztokem nebo fosfátovým pufrem a poté vodou a usuší se.
2. Způsob výroby podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se nanokompozitní vrstva před promytím stabilizuje máčením v 95 % hmotn. roztoku alkoholu ve vodě s přídavkem *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylkarbodiimid hydrochloridu a *N*-hydroxysukcinimidu, kde množství *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylkarbodiimid hydrochloridu na 1 g zvlákněného kolagenu je alespoň 0,625 g a množství *N*-hydroxysukcinimidu na 1 g zvlákněného kolagenu je alespoň 0,156 g, a kde množství 95 % hmotn. roztoku alkoholu ve vodě je alespoň 140 ml na 1 g zvlákněného kolagenu.
3. Způsob výroby podle kteréhokoliv z nároků 1 až 2, **vyznačující se tím**, že po usušení se vrstva impregnuje antibiotikem nebo směsí antibiotik vybraných ze skupiny vankomycin, gentamicin a tobramycin.
4. Způsob výroby podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že impregnace se provede namočením vrstvy do disperze nebo nanesením disperze na vrstvu nebo rozprášením disperze na vrstvu, přičemž disperze je disperzí antibiotik v alkoholu, vodě nebo směsi alkoholu s vodou.

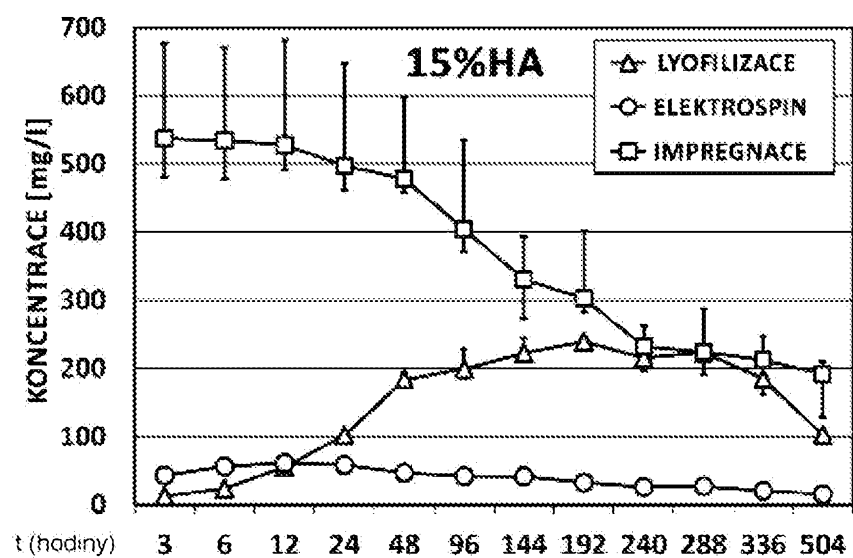
4 výkresy



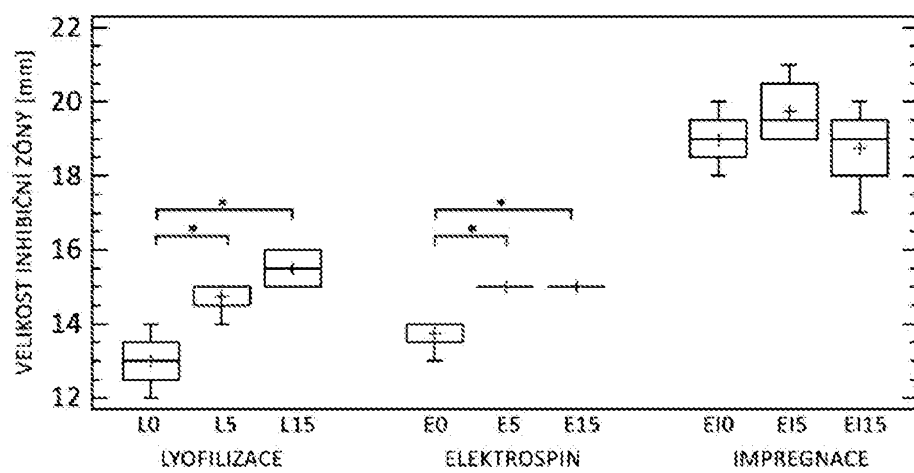
Obr.1a



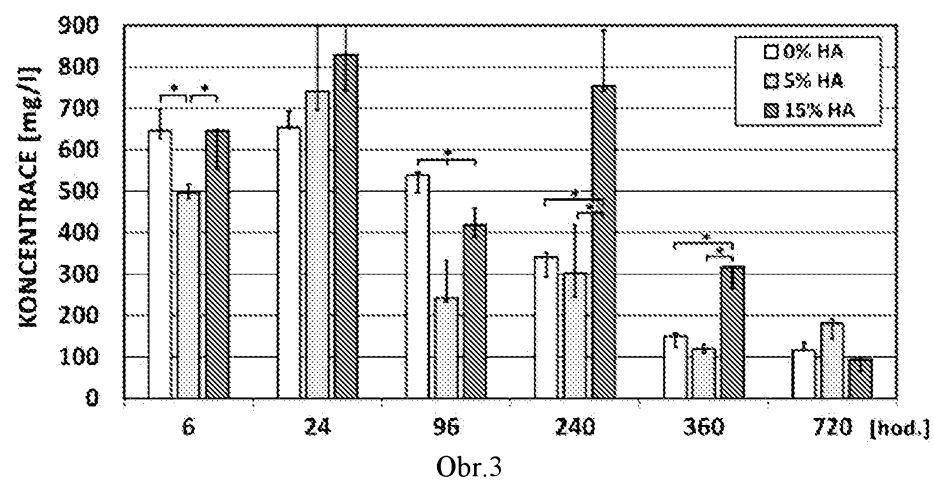
Obr.1b



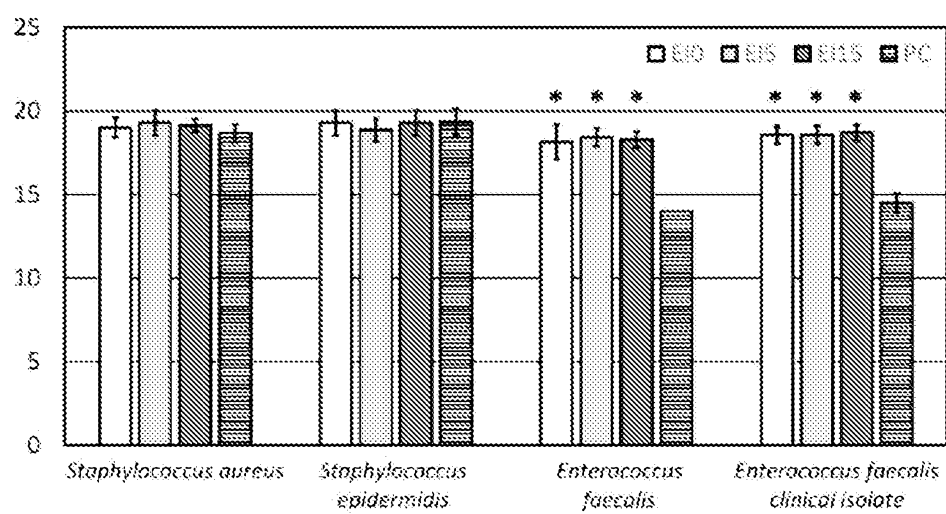
Obr.1c



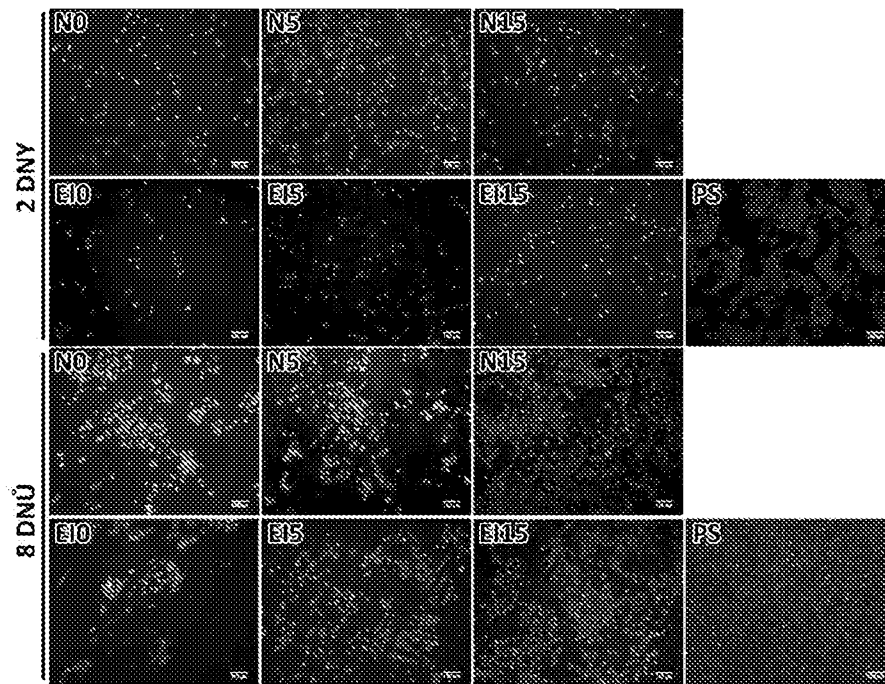
Obr.2



Obr.3



Obr.4



Obr.5