

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

33 802

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/39 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2019-37022**
(22) Přihlášeno: **17.12.2019**
(47) Zapsáno: **27.02.2020**

- (73) Majitel:
Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, Praha 2,
Nové Město, CZ
Ústav struktury a mechaniky hornin AV ČR, v.v.i.,
Praha 8, Libeň, CZ
České vysoké učení technické v Praze, Praha 6,
Dejvice, CZ
- (72) Původce:
doc. MUDr. Tomáš Grus, Ph.D., Mníšek pod Brdy,
CZ
Ing. Tomáš Suchý, Ph.D., Praha 9, Střížkov, CZ
Ing. Monika Šupová, Ph.D., Praha 4, Háje, CZ
Ing. Hynek Chlup, Ph.D., Dobrochov, CZ
- (74) Zástupce:
Kania, Sedlák, Smola, s.r.o., Mendlovo náměstí
907/1a, 603 00 Brno, Staré Brno

- (54) Název užitého vzoru:
**Nanostrukturovaná vysoce porézní
kompozitní kolagenní pěna pro řízené
uvolňování aktivních látek**

Nanostrukturovaná vysoce porézní kompozitní kolagenní pěna pro řízené uvolňování aktivních látek

5 Oblast techniky

Předmětem technického řešení je nanostrukturovaná kompozitní kolagenní pěna s hemostatickými účinky, řízenou dobou degradace a schopná řízeného lokálního uvolňování aktivních látek, například antibiotik pro použití formou krytí ran v chirurgii, ortopedii, 10 traumatologii a plastické chirurgii.

Dosavadní stav techniky

15 Krvácení na větších plochách při chirurgických zákrocích je poměrně častým a velmi závažným problémem a v krajních případech může znamenat i ohrožení života pacienta. Dalším závažným problémem je proniknutí infekce do organismu. Při postoperační administraci antibiotik nastává problém systémového zatížení, často nedostatečného průniku do operační rány a v určitých 20 případech může dojít i k systémové toxicitě.

Jedním z řešení je použití lokálně antiseptického neadhezivního materiálu. Mimo podstatnou lokálně antiseptickou funkci může mít tento materiál současně také lokálně hemostatické a anestetické vlastnosti.

25 Kolageny izolované z velkých savců jako kráva, prase nebo kůň jsou hojně využívány v biomateriálovém inženýrství. Jejich nevýhodou jsou potenciální alergické reakce, kterými trpí 3 až 4 % populace. Řešení se nabízí v použití rybího kolagenu, který vykazuje excelentní biokompatibilitu. Izolace kolagenu z kůže ryb navíc nepředstavuje takové riziko přenosu různých 30 chorob, jako v případě extrakce z vepřové nebo hovězí kůže (BSE, PrPSc). Rybí kolagen vykazuje nižší reprodukovatelnost, co se týče jeho strukturních vlastností, v porovnání s kolageny izolovanými z velkých savců. Tento nedostatek je možné odstranit jeho chemickým síťováním pomocí sloučenin na bázi karborimidů, které jsou v chemii kolagenu běžně používány. Podmínky síťování ovlivňují výslednou míru zesíťení kolagenního materiálu, což má ve výsledku velký vliv 35 na jeho nasákavost a degradační vlastnosti ve fyziologickém prostředí. Síťovaný kolagen dobře odolává ionizujícímu záření, což umožňuje jeho sterilizaci běžně užívanými dávkami 25 kGy. Pomocí lyofilizačního procesu je možné dále vytvořit trojrozměrný materiál s danou porozitou. Kolagenní materiál je možné připravit rovněž ve formě nanovlákněných vrstev pomocí elektrostatického zvláknění. Jejich obrovskou výhodou je velký aktivní povrch, který dokáže 40 efektivně navázat velká množství chemických agens a zároveň je pozitivním faktorem pro adhezi, proliferaci a růst buněk.

Takto připravené materiály se obecně velmi osvědčily jako nosiče léčiv s řízenou elucí. Léčivo je možné do kolagenu inkorporovat přímo do roztoku před danými procesy zpracování nebo 45 dodatečnou impregnací hotového materiálu pomocí rozpouštědla, které jednak nedegraduje strukturu kolagenu a zároveň je schopno rozpustit požadované léčivo. Dodatečná impregnace se osvědčila jako nejefektivnější způsob, jelikož nedochází k předčasnému uvolňování léčiva během zpracování kolagenního materiálu.

Možnost zpracovávat kolagen do různých výsledných forem (vrstvy, pěny apod.), jeho snadná 50 a ekonomická dostupnost (odpadní materiál v potravinářství) spolu s jeho biokompatibilitou a zároveň hemokoagulačními vlastnostmi jej činí jako optimálního kandidáta pro využití v hemostatických pěnách pro krytí operačních a pooperačních ran.

Nejčastěji používaným antibiotikem v kolagenních lékových formách je gentamicin. V klinické 55 praxi našly tyto přípravky využití především ve stomatologii, břišní chirurgii a traumatologii.

- V poslední době se objevují také klinické studie z oblasti kardiochirurgie, které potvrzují efektivitu tohoto přístupu v prevenci pooperačních infekcí. Existují rovněž studie zabývající se využitím kolagenní matrice s tetracyklinem a metronidazolem v dentální chirurgii. Za účelem terapie periodontitidy jsou používány kolagenní matrice uvolňující chlorhexidin v dutině ústní.
- 5 V naprosté většině studií a klinicky používaných výrobků je základní matricí kolagen savčí (bovinní, nebo koňský). Vzácně je kromě savčího kolagenu za tímto účelem využíván i kolagen ze sladkovodních ryb - pouze pro aplikaci chlorhexidinu ve stomatologii. Dále jsou dostupná in vitro data a data ze zvířecích experimentů pro ciprofloxacin.
- 10 Z uvedeného vyplývá, že rybí kolagen, a to kolagen z mořských, nikoli sladkovodních ryb, je klinicky využíván jako matrice pro uvolňování léčiv zcela okrajově pouze pro terapii periodontitidy chlorhexidinem. Není používán pro léčbu antibiotiky. Další zajímavou možností, která není v současné době dostupná, by bylo použití vankomycinu v kolagenové pění. V klinické praxi je vankomycin používán převážně v lokální léčbě fraktur - byly použity
- 15 vankomycinem impregnované korálky a kostní alografty v kombinaci s cementem obsahujícím aminoglykosidy při náhradě kyčelního kloubu. Vankomycinem impregnované kolagenní pěny studovány nebyly. Vzhledem k tomu, že vankomycin, stejně jako aminoglykosidy nedostatečně penetruje do tkání je systémová aplikace k terapii infekcí pooperačních ran problematická. Lokální aplikace s postupným uvolňováním by v případě tohoto antibiotika byla obzvláště
- 20 vhodná, neboť na rozdíl od aminoglykosidů je jeho účinnost závislá nejenom na výši dosažených koncentrací, ale také na době, kdy koncentrace přesahuje MIC. Hodnota nejlépe korelující s klinickou odezvou při systémové terapii infekcí *Staphylococcus aureus* je AUC/MIC. Pokud by kolagenní lékové formy zajistily dlouhodobě adekvátní lokální koncentrace vankomycinu v ráně, bylo by možné tímto způsobem upustit od systémového použití dalších záložních antibiotik
- 25 (ceftarolinu, linezolidu) a jejich šetření pro závažnější infekce.

Lokální aplikace je vhodná především pro antibiotika s nízkou distribucí do tkání, čemuž odpovídají aminoglykosidy, vankomycin a nitrofurantoin. Nově umísťujeme tyto látky do kolagenní matrice z kolagenu sladkovodních ryb, což je lehce dostupný materiál s nižší

30 imunogenitou, než kolagen získávaný ze savců. Dosahujeme různé míry retardace podle povahy antibiotika, např. rychlé uvolnění a dosažení vysokých koncentrací u gentamicinu, nebo naopak pozvolné uvolňování vankomycinu

- tyto charakteristiky odpovídají rozdílnému mechanismu účinku antibiotik a rozdílným cílovým

35 farmakokinetickým parametrům (koncentračně x časově závislá antibiotika).

Mezi další nevýhody stávajících materiálů na bázi kolagenu je obtížná manipulace, protože tyto materiály ve styku s tělním prostředím ztrácejí soudržnost a při manipulaci mají tendenci se trhat

40 a rozpadat.

Podstata technického řešení

Nevýhody hemostatických krycích materiálů na bázi kolagenu izolovaného z tkání velkých savců

45 jsou do značné míry překonány nanostrukturovanou vysoce porézní kompozitní kolagenní pěnou s řízeným rozpadem a s možností řízeného uvolňování aktivních látek, například antibiotik, která s výhodou obsahuje kolagen typu I izolovaný z kůže sladkovodních ryb, například z kapra obecného, který je dále s výhodou impregnovaný jednou nebo více aktivními látkami. Aktivní látky mohou být vybrány ze skupiny zahrnující antibiotikum, anestetikum, antiagregans,

50 antivirotikum, nebo jejich směs, s výhodou se jedná o antibiotikum, kterým může být například vankomycin, gentamicin, rifampicin, nitrofurantoin, nebo jejich kombinace.

Kolagenní kompozit pro řízené uvolňování aktivních látek podle tohoto technického řešení obsahuje kolagen typu I, který je uspořádán do alespoň dvou vrstev, přičemž jednou vrstvou je

55 vrstva vysoce porézní pěny a druhou vrstvou je nanovlákněná vrstva, přičemž vrstva vysoce

porézní pěny má otevřenou porozitu v rozmezí 70 až 90 % a střední hodnotu velikosti pórů 50 až 200 pm, kde alespoň 50 % objemu pórů je tvořeno póry o velikosti nad 80 μm , a přičemž průměr vláken nanovlákněné vrstvy v rozmezí 100 až 350 nm. S výhodou má vrstva vysoce porézní pěny otevřenou porozitu v rozmezí 80 až 90 %. Každá nanovlákněná vrstva má s výhodou tloušťku v rozmezí 0,2 až 0,5 mm. Celý kompozit má s výhodou tloušťku v rozmezí 0,5 až 5 cm, například 1 cm.

Kolagenní kompozit podle technického řešení je uspořádán do více než dvou vrstev, s výhodou alespoň do pěti vrstev, kde se pravidelně střídají vrstva vysoce porézní pěny s nanovlákněnou vrstvou, přičemž výhodné objemové množství všech nanovlákněných vrstev je v rozmezí 20 až 60 %

Ve výhodném provedení je kolagenní kompozit impregnovaný alespoň jednou aktivní látkou uvedenou výše, kde poměr kolagenu k celkovému množství aktivních látek v kolagenním kompozitu je 40 až 70 % hmotn. kolagenu na 30 až 60 % hmotn. aktivních látek.

Podstata tohoto technického řešení tedy spočívá v tom, že kombinuje kolagenové nanovlákněné vrstvy s průměrem vláken 100 až 350 nm s mikrostrukturovanou kolagenní pěnou s vysokou mírou otevřené porozity (70 až 90 %, výhodněji 80 až 90 %) a velikostí pórů v rozmezí 50 200 mm, kde alespoň 50 % objemu pórů je tvořeno póry o velikosti nad 80 μm , a je navržena tak, aby vykazovala udržitelné lokální uvolňování aktivních látek, jejichž celkové množství je 30 až 60 % hmotn. Řízeného uvolňování aktivních látek a řízeného rozpadu kolagenové pěny je dosaženo vytvářením optimálního množství příčných vazeb v molekule kolagenu při přípravě, a to buď fyzikálně, např. ozařováním, nebo chemicky, s výhodou aplikací N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylkarbodiimid hydrochloridu (EDC) a N-hydroxysukcinimidu (NHS) při její přípravě.

Základním přínosem tohoto technického řešení je skutečnost, že použitý kolagen izolovaný z kůže sladkovodních ryb má hemostatické účinky a jeho aplikace není spojená s rizikem alergické reakce nebo jiné nežádoucí imunitní odezvy organismu. Dalším podstatným přínosem tohoto technického řešení je také skutečnost, že umožňuje deponovat do nanostrukturovaného a mikrostrukturovaného povrchu s velkým specifickým povrchem a dostatečnou otevřenou porozitou biologicky aktivní látky podle očekávaného rozsahu poranění nebo poškození před operací, ale také podle uvážení operátora i během operace, a to impregnací kolagenní pěny např. do roztoku antibiotik. Zároveň resorbovatelný materiál umožňuje jeho postupné bezpečné vstřebávání do okolní tkáně, a tím i postupné účinné uvolňování v něm deponovaných biologicky aktivních látek. Zároveň se ale kompozit podle technického řešení oproti stavu techniky díky tomu, že se netrhá a nerozpadá, vyznačuje snazší manipulací a možností repozice.

Při přípravě nanostrukturované vysoce porézní kompozitní kolagenní pěny se postupuje tak, že se nejprve připraví nanovlákněná vrstva, a to například způsobem popsaným v české přihlášce vynálezu č. PV 2016-656. Vrstva se s výhodou připraví elektrostatickým zvlákněním, konkrétně 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 $^{\circ}\text{C}$ 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, následně se směs elektrostaticky zvlákněje za vzniku nanovlákněné vrstvy, která se následně promyje fyziologickým roztokem nebo fosfátovým pufrem a poté vodou a usuší se. Stabilita této vrstvy je před promytím s výhodou zvýšena fyzikálním či chemickým síťováním, např. 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. Následně se vrstva promyje, čímž se z ní vymyje pomocný polymer polyethylenoxid.

- 5 V dalším kroku je zvlákněná vrstva ponechána v 0,1 až 3 % hmotn. disperzi kolagenu a po jejím prosycení následuje zamražení a lyofilizace do dosažení konstantní hmotnosti. Stabilita kolagenové kompozitní pěny je po lyofilizaci s výhodou zvýšena chemickým síťováním pomocí EDC a NHS. Konečné objemové množství kolagenové nanovlákněné vrstvy v kompozitu je 20 až 60 %.

10

V případě více než dvou vrstev se nejprve připraví nanovlákněná vrstva a zesítuje se. Potom se dvě nebo více těchto zesítovaných nanovlákněných vrstev položí přes sebe a vloží se do disperze kolagenu, kde se máčí až do prosycení vrstev disperzí. Následuje zamražení a lyofilizace do dosažení konstantní hmotnosti. Stabilita takto získané kolagenové kompozitní pěny je po lyofilizaci s výhodou zvýšena chemickým síťováním pomocí EDC a NHS. Konečné objemové množství kolagenové nanovlákněné vrstvy v kompozitu je 20 až 60 %.

15

Ve výhodném provedení je posledním krokem přípravy impregnace kompozitu roztokem na bázi alkoholu obsahujícím odvážené množství aktivních látek, například antibiotik, s výhodou vybraných ze skupiny zahrnující vankomycin, gentamicin, rifampicin, nitrofurantoin, nebo jejich kombinace tak, aby jejich výsledné množství bylo 30 až 60 % hmotn. Impregnovaný kompozit může být poté zamražen a lyofilizován. Alternativně může být impregnace vybranými aktivními látkami uskutečněna teprve před aplikací kompozitu, pro což se použije vodný roztok aktivních látek nebo se aktivní látky smísí s fyziologickým roztokem a kompozit se aplikuje ihned, nebo až po odpaření kapalně fáze, tedy po dosažení konstantní hmotnosti kompozitu.

20

25

Doba rozpadu se řídí především dobou stabilizace (síťování). Čím kratší je doba síťování, tím rychlejší je rozpad kompozitu a tím kratší je i doba uvolňování aktivních látek, např. antibiotik.

30

Díky způsobu přípravy kompozitu podle technického řešení nedochází k separaci jednotlivých vrstev, vrstvy i při manipulaci v tělním prostředí zůstávají spojené a neoddělí se od sebe.

Kompozit podle technického řešení má následující výhody:

35

- programovatelný (řízený) rozpad pěny
- programovatelné (řízené) uvolňování aktivních látek
- elastická paměť, ohybová tuhost
- snazší manipulace s kompozitem, možnost repozice (netrhá se, nerozpadá se)
- snížené riziko alergické reakce nebo jiné nežádoucí imunitní odezvy organismu.

40

Kompozitní kolagenová pěna je vhodná především pro použití v chirurgii, ortopedii, v oblasti krytí ran, léčby bércových vředů apod. Zejména je vhodné její použití v případech známého zánětu nebo vysokého rizika infekce, kdy se pěna impregnovaná aktivními látkami použije pro léčbu zánětu / infekce a cílené dodání aktivních látek, například antibiotik. Kompozitní pěna poskytuje díky nanovláknům velký povrch, kde dochází k větší vazbě aktivních látek, většímu kontaktu s tělním prostředím, a tím i k rychlým, vysokým a dlouhodobým dávkám uvolňovaných aktivních látek.

45

50

Objasnění výkresů

55

Obr. 1 znázorňuje nanostrukturovanou vysoce porézní kompozitní pěnu připravenou prosycením pěti nanovlákněných vrstev 1 % hmotn. disperzí kolagenu. Snímek uprostřed ilustruje přechod mezi vlákny a porézní strukturou pěny. Snímek zcela vpravo ukazuje detail prosycení nanovlákněné vrstvy disperzí.

Příklady uskutečnění technického řešení

5 Definice

Kolagenová pěna v kontextu tohoto technického řešení je synonymem pro pojem „kolagenová houba“, tedy porézní materiál na bázi kolagenu.

10 Pod pojmem „otevřená porozita“, resp. „otevřené póry“ se rozumí prostor, který komunikuje s povrchem výrobku, tedy se zevním prostředím. Může jít o jednotlivé póry propojené s povrchem, ale i o vzájemně propojené póry, z nichž alespoň jeden navíc komunikuje i s povrchem výrobku.

15 Pod pojmem „uzavřená porozita“, resp. „uzavřené póry“ se rozumí tzv. osamocené póry neboli póry, které nejsou propojeny s vnějším povrchem výrobku.

20 Výraz "vysoce porézní" v kontextu tohoto technického řešení jsou ty pěny, které mají otevřenou porozitu v rozmezí 70 % až 90 % a velikost pórů v rozmezí 50 až 200 μm , přičemž alespoň 50 % objemu pórů je tvořeno póry o velikosti nad 80 μm , s výhodou nad 100 μm .

Výraz "málo porézní" v kontextu tohoto technického řešení jsou ty pěny, které mají otevřenou porozitu v rozmezí 70 % až 90 % a velikost pórů v rozmezí 20 až 80 μm , přičemž alespoň 50 % objemu pórů je tvořeno póry o velikosti pod 50 μm .

25

Příklad 1

Při přípravě nanostrukturované vysoce porézní kompozitní kolagení pěny se obecně postupuje tak, že je nejprve připravena nanovlákněná kolagenová vrstva, a to elektrostatickým zvlákněním 5 až 11 % hmotn., s výhodou 6 až 10 % hmotn. roztoku kolagenu s obsahem polyethylen oxidu (PEO; Mr 400 000 až 900 000) v poměru PEO ku kolagenu v rozmezí 0,05 až 0,11, fosfátového pufru a ethanolu (1:1 až 1:2 objemově). Zvláknění probíhá v elektrostatickém poli 200 až 300 $\text{kV}\cdot\text{m}^{-1}$ s dávkováním 100 až 200 $\mu\text{l}/\text{min}$ a teplotě ne vyšší než 37 °C. Stabilita vrstvy je zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. ethanolu a vody s EDC a NHS při teplotě 25 až 40 °C, s výhodou 37 °C po dobu 2 až 4 hodin. Na 1 g kolagenu připadá 0,5 až 1,5 g EDC a 0,125 až 0,750 g NHS smíšené se 140 až 160 ml 95 % hmotn. roztoku ethanolu s vodou. Po zesíťování kolagenu je vrstva promývána 0,5 až 1,5 M hydrogen fosforečnanem disodným po dobu alespoň 30 minut a dále promyta alespoň 20 minut v destilované vodě. Při tomto procesu dojde k vyplavení pomocného polymeru. Dále je vrstva zamrazena na -15 až -30 °C po dobu 5 až 7 hodin a lyofilizována. V dalším kroku je zvlákněná vrstva, resp. několik přes sebe položených vrstev, ponecháno v 0,1 až 3 % hmotn. disperzi kolagenu po dobu 1 až 3 hodin při teplotě 15 až 25 °C. Za těchto podmínek dojde k prosycení zvlákněné vrstvy / zvlákněných vrstev kolagenovou disperzí, po čemž následuje zamrazení na teplotu -60 až -90 °C po dobu 3 až 8 hodin a lyofilizace do dosažení konstantní hmotnosti, za získání kolagenové kompozitní pěny. Stabilita kolagenové kompozitní pěny je po lyofilizaci zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. ethanolu a vody s EDC a NHS při teplotě 25 až 40 °C po dobu 2 až 4 hodin. Na 1 g kolagenu připadá 0,5 až 1,5 g EDC a 0,125 až 0,750 g NHS smíšené se 140 až 160 ml 95 % hmotn. roztoku ethanolu s vodou. Po zesíťování kolagenu je pěna promývána 0,5 až 1,5 M hydrogen fosforečnanem disodným po dobu alespoň 30 minut a dále promyta alespoň 20 minut v destilované vodě, zamrazena na -15 až -30 °C po dobu 5 až 7 hodin a lyofilizována. Konečné objemové množství kolagenové nanovlákněné vrstvy v kompozitu je 20 až 60 %. Posledním, volitelným krokem přípravy je impregnace kompozitní pěny 95 % hmotn. roztokem ethanolu s vodou obsahujícím odvážené množství aktivních látek, například antibiotik, s výhodou vybraných ze skupiny zahrnující vankomycin, gentamicin, rifampicin, nitrofurantoin, nebo jejich kombinace tak, aby jejich výsledné množství bylo 30 až 60 % hmotn. Impregnovaná pěna může

55

být poté zamražena a lyofilizována. Impregnace vybranými antibiotiky může být uskutečněna teprve před její aplikací, pro což se použije vodný roztok antibiotik nebo se antibiotika smísí s fyziologickým roztokem a pěna se aplikuje po jejich odpaření, tedy po dosažení konstantní hmotnosti pěny. Tímto postupem je získána pěna s výsledným množstvím kolagenu 40 až 70 % hmotn. a 30 až 60 % hmotn. antibiotik.

Příklad 2

Při přípravě nanostrukturované vysoce porézní kompozitní kolagenní pěny se postupuje tak, že se nejprve připraví nanovlákněná kolagenová vrstva elektrostatickým zvlákněním 8% hmotn. roztoku kolagenu s fosfátovým pufrům a ethanolom (1:1 objemově), do kterého je přidán polyethylenoxid v hmotnostním poměru 0,08 ku kolagenu (Mr 700 000). Zvláknění probíhá v elektrostatickém poli 270 kV.m⁻¹, dávkování 150 μl.min⁻¹ a při teplotě 25 °C. Stabilita vrstvy je zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. ethanolu a vody s EDC a NHS při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin. Na 1 g kolagenu připadá 1 g EDC a 0,250 g NHS smíšené se 150 ml 95 % hmotn. roztoku ethanolu s vodou. Po zesíťování kolagenu je vrstva promývána 1M hydrogen fosforečnanem disodným po dobu alespoň 30 minut a dále promyta alespoň 20 minut v destilované vodě. Při tomto procesu dojde k vyplavení pomocného polymeru. Dále je vrstva zamražena na -25 °C po dobu 6 hodin a lyofilizována. V dalším kroku je zvlákněná vrstva ponechána v 1 % hmotn. disperzi kolagenu po dobu 2 hodin při teplotě 25 °C. Za těchto podmínek dojde k prosycení zvlákněné vrstvy kolagenovou disperzí, po čemž následuje zamražení na teplotu -80 °C po dobu 5 hodin a lyofilizace do dosažení konstantní hmotnosti. Stabilita kolagenové kompozitní pěny je po lyofilizaci opět zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. ethanolu a vody s EDC a NHS při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin. Na 1 g kolagenu připadá 1 g EDC a 0,250 g NHS smíšené se 150 ml 95 % hmotn. roztoku ethanolu s vodou. Po zesíťování kolagenu je pěna promývána 1M hydrogen fosforečnanem disodným po dobu alespoň 30 minut a dále promyta alespoň 20 minut v destilované vodě, zamražena na -25 °C po dobu 6 hodin a lyofilizována. Objemový poměr vlákněné vrstvy a disperze je 2:3, a proto i objemový poměr vlákněné vrstvy a pěny ve výsledném kompozitu je 2:3, tj. konečné objemové množství kolagenové nanovlákněné vrstvy v kompozitu je 40 %. Posledním krokem přípravy je impregnace kompozitní pěny 95 % hmotn. roztokem ethanolu s vodou obsahujícím odvážené množství vankomycinu tak, aby jeho výsledné množství bylo 45 % hmotn. Impregnovaný kompozit se poté zamrazí na -25 °C po dobu 6 hodin a lyofilizuje. Tímto postupem je získána kompozitní pěna s výsledným množstvím kolagenu 55 % hmotn. a 45 % hmotn. antibiotik.

Příklad 3

Při přípravě nanostrukturované vysoce porézní kompozitní kolagenní pěny se postupuje tak, že se nejprve připraví nanovlákněná kolagenová vrstva jako v příkladu 2. Stabilizace, zamražení a lyofilizace se provede také jako v příkladu 2. Výsledná vrstva se nařeže na menší díly, například 5 x 10 cm, které se položí na sebe (5 nanovlákněných vrstev leží na sobě) a vloží se do 1 % hmotn. disperze kolagenu na dobu 2 hodin při teplotě 25 °C. Za těchto podmínek dojde k prosycení zvlákněných vrstev kolagenovou disperzí, po čemž následuje zamražení na teplotu -70 °C po dobu 6 hodin a lyofilizace do dosažení konstantní hmotnosti. Stabilita kolagenové kompozitní pěny je po lyofilizaci opět zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. ethanolu a vody s EDC a NHS při teplotě 37 °C po dobu 2 hodin. Na 1 g kolagenu připadá 1 g EDC a 0,250 g NHS smíšené se 150 ml 95 % hmotn. roztoku ethanolu s vodou. Po zesíťování kolagenu je pěna promývána 1M hydrogen fosforečnanem disodným po dobu alespoň 30 minut a dále promyta alespoň 20 minut v destilované vodě, zamražena na -25 °C po dobu 6 hodin a lyofilizována. Objemový poměr všech vlákněných vrstev k disperzi je 2:3, a proto i objemový poměr vlákněných vrstev a pěny ve výsledném kompozitu je 2:3, tj. konečné objemové množství kolagenových nanovlákněných vrstev v kompozitu je 40 %. Posledním krokem přípravy je impregnace kompozitní pěny 95 % hmotn. roztokem ethanolu s vodou obsahujícím odvážené množství směsi vankomycinu a gentamicinu tak, aby jejich výsledné množství bylo 30 % hmotn. Impregnovaný kompozit se poté zamrazí na -25 °C po dobu 6 hodin a lyofilizuje. Tímto

postupem je získána kompozitní pěna s výsledným množstvím kolagenu 70 % hmotn. a 30 % hmotn. antibiotik.

Příklad 4

5

Postupuje se stejně jako v příkladu 2, ale doba každého síťování (stabilizace) je 3 hodiny.

Příklad 5

10

Postupuje se stejně jako v příkladu 2, ale doba každého síťování (stabilizace) je 4 hodiny.

Příklad 6

Při přípravě nanostrukturované vysoce porézní kompozitní kolagenní pěny se postupuje tak, že se nejprve připraví nanovlákná kolagenová vrstva jako v příkladu 2. Stabilizace, zamražení a lyofilizace se provede také jako v příkladu 2. Následně se šest takto připravených vrstev položí na sebe a vloží se do 0,8 % hmotn. disperze kolagenu na dobu 3 hodin při teplotě 20 °C. Za těchto podmínek dojde k prosycení nanovlákných vrstev kolagenovou disperzí, po čemž následuje zamražení na teplotu -80 °C po dobu 4 hodin a lyofilizace do dosažení konstantní hmotnosti. Stabilita kolagenové kompozitní pěny je po lyofilizaci opět zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. ethanolu a vody s EDC a NHS při teplotě 30 °C po dobu 3 hodin. Na 1 g kolagenu připadá 1,40 g EDC a 0,350 g NHS smíšené se 150 ml 95 % hmotn. roztoku ethanolu s vodou. Po zesíťování kolagenu je pěna promývána 1,2M hydrogen fosforečnanem disodným po dobu alespoň 30 minut a dále promyta alespoň 20 minut v destilované vodě, zamražena na -30 °C po dobu 6 hodin a lyofilizována. Objemový poměr všech vlákných vrstev k disperzi je 1:4, a proto i objemový poměr vlákných vrstev a pěny ve výsledném kompozitu je 1:4, tj. konečné objemové množství kolagenových nanovlákných vrstev v kompozitu je 20 %. Posledním krokem přípravy je impregnace kompozitní pěny 95 % hmotn. roztokem ethanolu s vodou obsahujícím odvážené množství gentamicinu tak, aby jeho výsledné množství bylo 50 % hmotn. Impregnovaný kompozit se poté zamrazí na -25 °C po dobu 6 hodin a lyofilizuje. Tímto postupem je získána kompozitní pěna s výsledným množstvím kolagenu 50 % hmotn. a 50 % hmotn. antibiotik.

35 Průmyslová využitelnost

Nanostrukturované vysoce porézní kompozitní kolagenní pěny s hemostatickými účinky, s řízenou dobou degradace a s řízeným lokálním uvolňováním antibiotik podle tohoto užitého vzoru lze využít v humánní a veterinární medicíně, zejména v chirurgii, ortopedii, traumatologii a plastické chirurgii. Kompozitní kolagenová pěna impregnovaná antibiotiky je vhodná zejména pro použití při vysokém riziku infekce, přičemž se vyznačuje rychlým a dlouhodobým uvolňováním antibiotik.

45

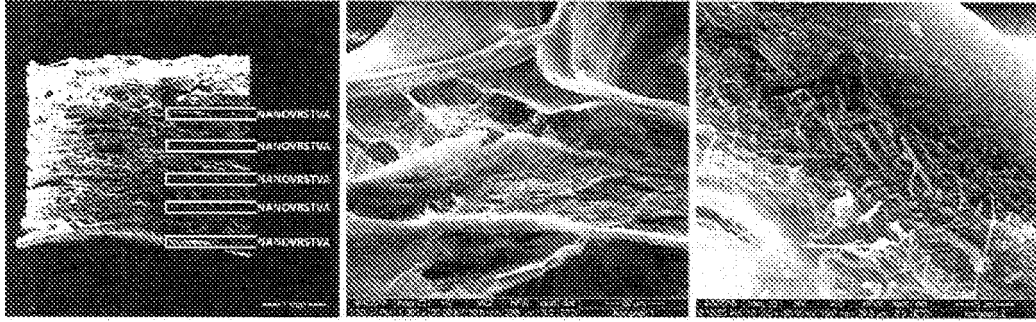
NÁROKY NA OCHRANU

1. Kolagenní kompozit pro řízené uvolňování aktivních látek, **vyznačující se tím**, že obsahuje kolagen typu I, který je uspořádán do alespoň dvou vrstev, přičemž jednou vrstvou je vrstva vysoce porézní pěny a druhou vrstvou je nanovlákná vrstva, přičemž vrstva vysoce porézní pěny má otevřenou porozitu v rozmezí 70 až 90 % a střední hodnotu velikosti pórů 50 až 200 μm, kde 50 až 100 % objemu pórů je tvořeno póry o velikosti nad 80 μm, a přičemž průměr vláken v nanovlákné vrstvě je v rozmezí 100 až 350 nm.

55

2. Kolagenní kompozit podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že vrstva vysoce porézní pěny má otevřenou porozitu v rozmezí 80 až 90 %.
- 5 3. Kolagenní kompozit podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že nanovlákná vrstva má tloušťku v rozmezí 0,2 až 0,5 mm.
4. Kolagenní kompozit podle kteréhokoli z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že kolagenem typu I je kolagen izolovaný z kůže sladkovodních ryb.
- 10 5. Kolagenní kompozit podle kteréhokoli z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že je uspořádán do více než dvou vrstev, s výhodou do alespoň pěti vrstev, kde se pravidelně střídají vrstva vysoce porézní pěny s nanovláknou vrstvou.
- 15 6. Kolagenní kompozit podle kteréhokoli z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že množství všech nanovlákných vrstev je v rozmezí 20 až 60 % obj.
7. Kolagenní kompozit podle kteréhokoli z předchozích nároků, **vyznačující se tím**, že je impregnovaný alespoň jednou aktivní látkou a že poměr kolagenu k celkovému množství aktivních látek v kolagenním kompozitu je 40 až 70 % hmotn. kolagenu na 30 až 60 % hmotn. aktivních látek.
- 20 8. Kolagenní kompozit podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že aktivní látka je vybrána ze skupiny zahrnující antibiotikum, anestetikum, antiagregans, antivirotikum, nebo jejich směs.
- 25 9. Kolagenní pěna podle nároku 8, **vyznačující se tím**, že aktivní látkou je antibiotikum vybrané ze skupiny zahrnující vankomycin, gentamicin, rifampicin, nitrofurantoin, nebo jejich směs.

1 výkres



Obr. 1