

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2016-656

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

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)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **20.10.2016**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **02.05.2018**
(Věstník č. 18/2018)

- (71) Přihlašovatel:
Ústav struktury a mechaniky hornin AV ČR, v. v.
i., Praha 8, CZ
České vysoké učení technické v Praze, fakulta
strojní, Praha 6, 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

výroby takové vrstvy a způsob depenování
antibiotik pro jejich efektivnější uvolňování bez
zvyšování cytotoxicity. Tento způsob zahrnuje
impregnaci síťovaných sterilizovaných
kolagen/hydroxyapatitových vrstev antibiotiky ve
formě roztoku. Předmětem řešení jsou rovněž
ortopedické a zubní implantáty na bázi kovových
slitin elektrostaticky pokryté touto kompozitní
vrstvou na bázi kolagenových nanovláken s
integrovanými hydroxyapatitovými nanočásticemi a
antibiotikem nebo kombinací antibiotik.

- (54) Název přihlášky vynálezu:
**Nanokompozitní vrstva na bázi
kolagenových nanovláken a způsob její
přípravy**

- (57) Anotace:
Předmětem řešení je nanokompozitní vrstva
připravená kombinací elektrospiningu a
elektroblowingu kolagenového roztoku
obsahujícího nanočástice hydroxyapatitu a
polyethylenoxid, přičemž po přípravě a zesítní je
vrstva tvořena 75 až 100 hm. % vláken kolagenu
typu I, 5 - 15 hm. % hydroxyapatitu a 0 - 1 hm. %
polyethylenoxidu. Předmětem je dále způsob

Nanokompozitní vrstva na bázi kolagenových nanovláken a způsob její přípravy

Oblast techniky

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 nanostrukturovaná vrstva je biodegradovatelná, biokompatibilní a/nebo bioresorbovatelná. Tato vrstva je připravena kombinací elektrospiningu a elektroblovingu 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.

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 polymetylmetakrylát (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, vancomycin 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 maticí, navázaným léčivem a rozpouštějícím médiem a vzájemném uspořádání složek. Sledování uvolňování antibiotik in vitro se nejčastěji provádí pomocí UV spektrometrie nebo vysokoúčinné

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. Nanovláknenné vrstvy obohacené antibiotiky jsou velmi často připravovány přímým zvlákňováním z roztoku polymeru obsahující dané léčivo. Přestože jsou podmínky aplikované během elektrostatického zvlákňování 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 nanovláknenné vrstvy je nutné po elektrostatickém zvlákňování dále zesíťovat. Během tohoto procesu dochází k jejich vymývání a nanovláknenný 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 nanovláknna se střední hodnotou průměru 100 - 350 nm, přičemž uvedená nanovláknna obsahují 75 až 100 hm. % kolagenu typu I, s výhodou 85 až 100 hm. %, přičemž uvedená nanovláknna obsahují maximálně 1 hm. % polyethylenoxidu.

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

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

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 pufrům pro získání koncentrace 5 až 11 hm. % 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 – 1:2, následně se směs elektrostaticky zvlákňuje za vzniku nanokompozitní vrstvy, která se následně promyje fyziologickým roztokem nebo fosfátovým pufrům a poté vodou a usuší se.

Objasnění výkresů

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

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

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

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

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.

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

Popis příkladných provedení

Níže jsou uvedeny příklady provedení vynálezu, kde obecně je nanovrstva připravena elektrostatickým zvlákňováním kolagenu typu I, s případným přídavkem hydroxyapatitu ve frakci 50 – 250 nm, a s přídavkem polyethylenoxidu, jako 5 až 11 hm. %, s výhodou 8 hm. % 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 - 350 nm a případně do sebe integrovala homogenně rozptýlené nanočástice hydroxyapatitu. Vrstvu lze elektrostaticky nanášet přímo na povrch kovového implantátu.

Při přípravě se postupuje tak, že odvážené množství lyofilizovaného kolagenu a polyethylenoxidu (PEO) o molekulové hmotnosti v rozmezí 400 000 – 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 hodin, nejlépe alespoň 72 hodin. Dalším krokem přípravy je homogenizace za vysokých otáček v rozsahu 7000-15000 ot.min⁻¹, při níž je do roztoku přidán hydroxyapatit a ethanol. Takto připravená disperze je elektrostaticky zvlákňována v elektrickém poli v rozmezí 200 - 300 kV.m⁻¹, dávkování v rozmezí 100-200 µl.min⁻¹, relativní vlhkosti vzduchu nepřesahující 30% a teplotě nepřesahující 37 °C. Proces zvlákňování je s výhodou doplněn electroblowingem, resp. proudem vzduchu, s výhodou předehřátého na 20-25 °C, např. o rychlosti proudění 15-50 l.min⁻¹. Tento vzduch je přiváděn do oblasti obklopující ústí trysek a příznivě ovlivňuje tvorbu vláken z uvedeného roztoku. Stabilita vrstvy po zvlákňování je

zvýšena máčením v roztoku 95 hm. % 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 hm. % 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 85-100 hm. % kolagenu a 0-15 hm. % 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 hm. %. 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 hm. % hydroxyapatitu a 10 hm. % vankomycinu (L0, L5 a L15), elektrostatickým zvlákněním disperze kolagenu, 0, 5 a 15 hm. % hydroxyapatitu a 10 hm. % vankomycinu (E0, E5 a E15). Vliv jednotlivých metod přípravy a strukturních 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 zvlákněním 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 zvlákňováním 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-Drevek 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 $\sim 62 \text{ mg.l}^{-1}$ 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).

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).

PŘÍKLAD 1

Nanovrstva byla připravena elektrostatickým zvlákňováním kolagenu typu I jako 8 hm. % 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 puforem. 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 zvlákňována v elektrickém poli 250 kV.m⁻¹, dávkování 130 µl.min⁻¹, relativní vlhkosti vzduchu 25 % a teplotě 30 °C. Proces zvlákňování byl doplněn electroblowingem, resp. proudem vzduchu předehřátého na přibližně 24 °C o rychlosti proudění 35 l.min⁻¹. Stabilita vrstvy po zvlákňování byla zvýšena máčením v roztoku 95 hm. % 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 hm. % 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 hm. % kolagenu. Pro sterilizaci vrstvy byla využita ethylenoxidová sterilizace. Následně byla do vrstvy deponována antibiotika impregnací v disperzi ethanolu o koncentraci antibiotika 20 hm. %. 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 hm. % z celkové hmotnosti vrstvy. Po aplikaci disperze byla vrstva ponechána při pokojové teplotě do odpaření rozpouštědla.

PŘÍKLAD 2

Nanovrstva byla připravena elektrostatickým zvlákňováním kolagenu typu I jako 10 hm. % 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 puforem. 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 zvlákňována v elektrickém poli 280 kV.m⁻¹, dávkování 140 µl.min⁻¹, relativní vlhkosti vzduchu 25% a teplotě 27 °C. Proces zvlákňování byl doplněn electroblowingem, resp. proudem vzduchu předehřátého na 22 °C o rychlosti proudění 40 l.min⁻¹. Stabilita vrstvy po zvlákňení byla zvýšena máčením v 95 hm. % vodného roztoku ethanolu a EDC a NHS při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Na 1 g zvlákňového kolagenu připadá 0,800 g EDC a 0,200 g NHS smísené s 200 ml 95 hm. % alkoholu. Vrstva byla po zesíťování promyta v 0.1M Na₂HPO₄ po dobu 2 x 40 minut a nakonec 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 hm. % kolagenu a 5 hm. % hydroxyapatitu. Pro sterilizaci vrstvy byla použita ethylenoxidová sterilizace. Antibiotika byla do vrstvy deponována impregnací v disperzi vody o koncentraci antibiotika 30 hm. %. Jako 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 hm. % na celkovou hmotnost vrstvy. Po aplikaci disperze byla vrstva ponechána při pokojové teplotě do odpaření rozpouštědla.

PŘÍKLAD 3

Nanovrstva byla připravena elektrostatickým zvlákňováním kolagenu typu I jako 8 hm. % 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 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 pufrém. Takto připravená směs byla vystavena teplotě 40 °C po dobu 92 hodin. Dalším krokem přípravy byla homogenizace za vysokých otáček 15000 ot.min⁻¹, při níž byl do roztoku přidán hydroxyapatit v hmotnostním poměru 15:85 na kolagen, a ethanol. Takto připravená disperze byla elektrostaticky zvlákňována v elektrickém poli 270 kV.m⁻¹, dávkování 150 µl.min⁻¹,

relativní vlhkosti vzduchu 26 % a teplotě 25 °C. Proces zvlákňování je doplněn electroblowingem, resp. proudem vzduchu předehřátého na 24 °C o rychlosti proudění 45 l.min⁻¹. Stabilita vrstvy po zvlákňování byla zvýšena máčením v roztoku 95 hm. % alkoholu s vodou a EDC a NHS při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Na 1 g zvlákňovaného kolagenu připadá 0,920 g EDC a 0,230 g NHS smísené s minimálně 250 ml 95 hm. % 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 vakuovým vymrazováním. Takto připravená vrstva obsahovala nanovlákná obsahující 85 hm. % kolagenu a 15 hm. % hydroxyapatitu. Pro sterilizaci vrstvy byla využita ethylenoxidová sterilizace. Antibiotika byla do vrstvy deponována impregnací v disperzi alkoholu o koncentraci antibiotika 30 hm. %. Jako antibiotikum byla použita kombinace gentamicinu a vancomycinu ve vzájemném hmotnostním poměru 1:1. Impregnace byla 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 hm. % na celkovou hmotnost vrstvy.

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.

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 stomatologii.

PATENTOVÉ NÁROKY

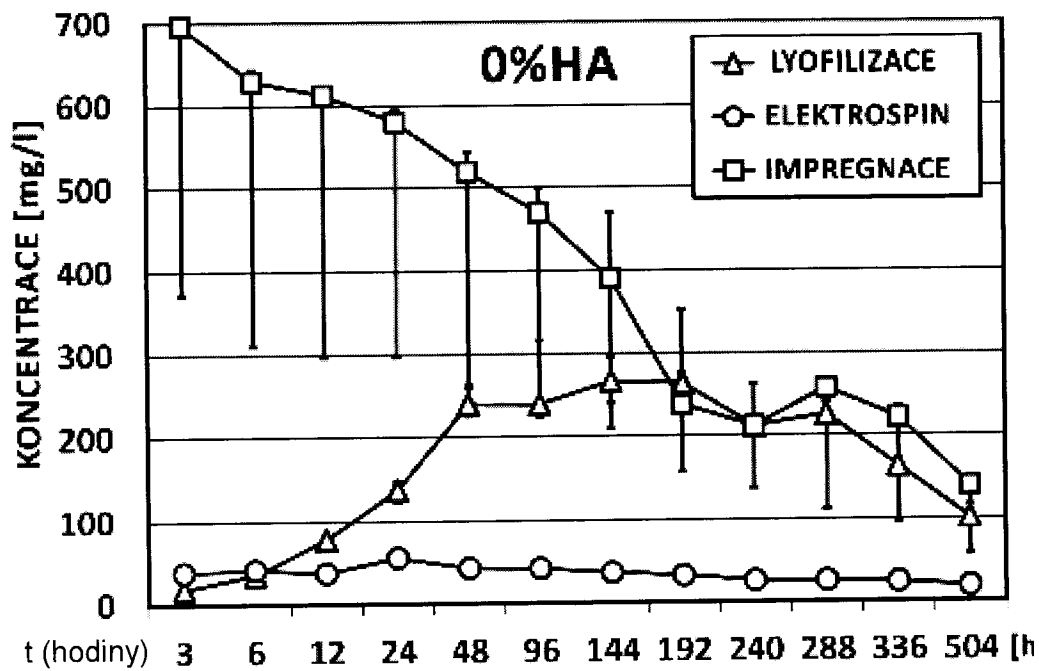
1. Nanokompozitní vrstva na bázi kolagenových nanovláken pro aplikace na ortopedické a zubní implantáty, která obsahuje nanovlákná se střední hodnotou průměru 100 - 350 nm, přičemž uvedená nanovlákná obsahují 75 až 100 hm. % kolagenu typu I, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedená nanovlákná obsahují maximálně 1 hm. % polyethylenoxidu.
2. Nanokompozitní vrstva podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že dále obsahuje 5 až 15 hm. % antibiotika vybraného ze skupiny vankomycin, gentamicin a tobramycin a jejich kombinace.
3. Nanokompozitní vrstva podle nároku 1 nebo 2, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že uvedená nanovlákná dále obsahují 5 až 15 hm. % hydroxyapatitu ve formě nanočástic o velikosti 50 – 250 nm.
4. Ortopedický nebo zubní implantát, který má alespoň část povrchu pokrytou nanokompozitní vrstvou podle kteréhokoli z předcházejících nároků.
5. Způsob přípravy vrstvy podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, 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 pufrům pro získání koncentrace 5 až 11 hm. % 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, následně se směs elektrostaticky zvláknuje za vzniku nanokompozitní vrstvy, která se následně promyje fyziologickým roztokem nebo fosfátovým pufrům a poté vodou a usuší se.
6. Způsob přípravy podle nároku 5, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že se nanokompozitní vrstva před promytím stabilizuje máčením v 95 hm. % 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 hm. % roztoku alkoholu ve vodě je alespoň 140 ml na 1 g zvlákněného kolagenu.

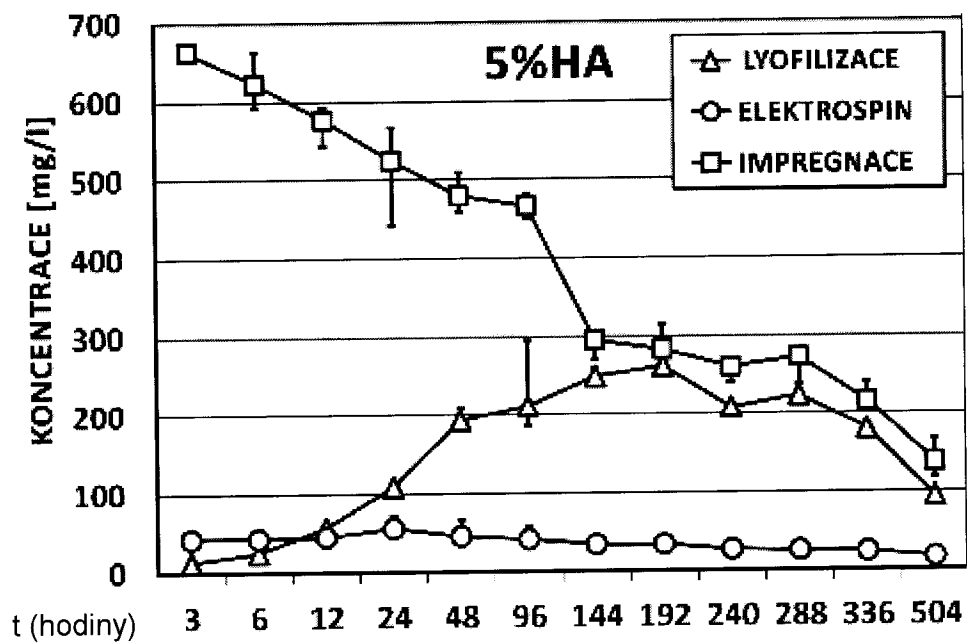
7. Způsob přípravy podle nároku 5 nebo 6, **vyznačující se tím, že** při homogenizaci se do roztoku současně přidává hydroxyapatit v množství 5 až 15 hm. %, vzhledem k množství kolagenu.

8. Způsob přípravy podle kteréhokoli z nároků 5 až 7, **vyznačující se tím, že** po usušení se vrstva impregnuje antibiotikem nebo směsí antibiotik vybraných ze skupiny vankomycin, gentamicin a tobramycin.

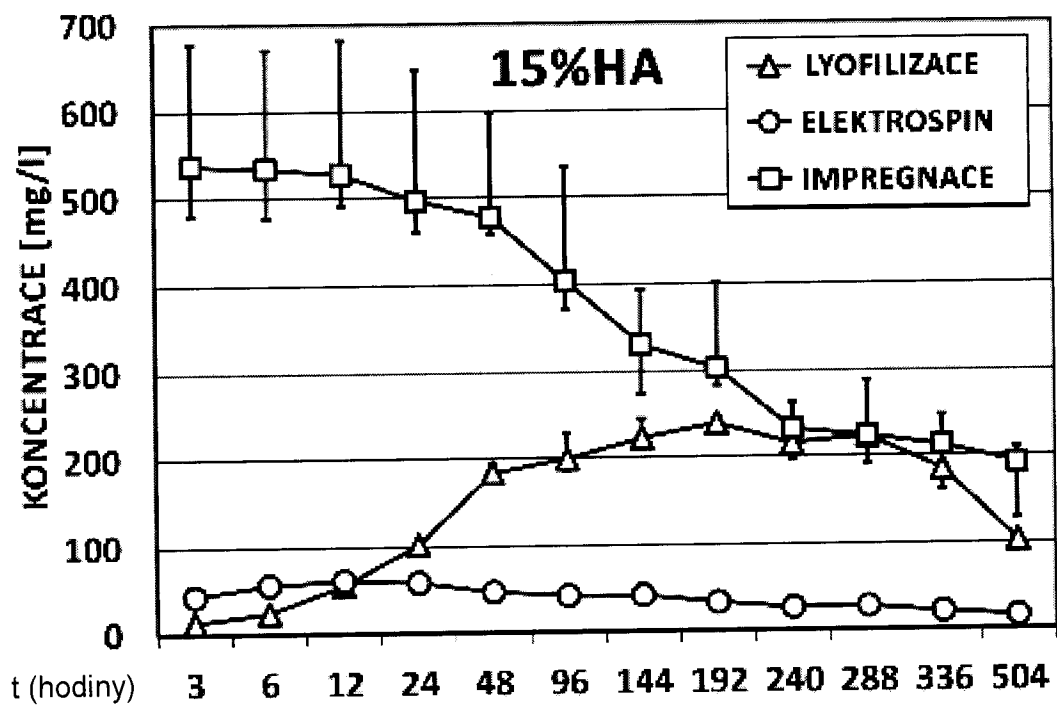
9. Způsob přípravy podle nároku 8, **vyznačující se tím, že** impregnace se provede namočením vrstvy do disperze nebo nanesením disperze na vrstvu nebo rozprášením disperze na vrstvu, přičemž disperze je disperzí antibiotik v alkoholu, vodě nebo směsi alkoholu s vodou.



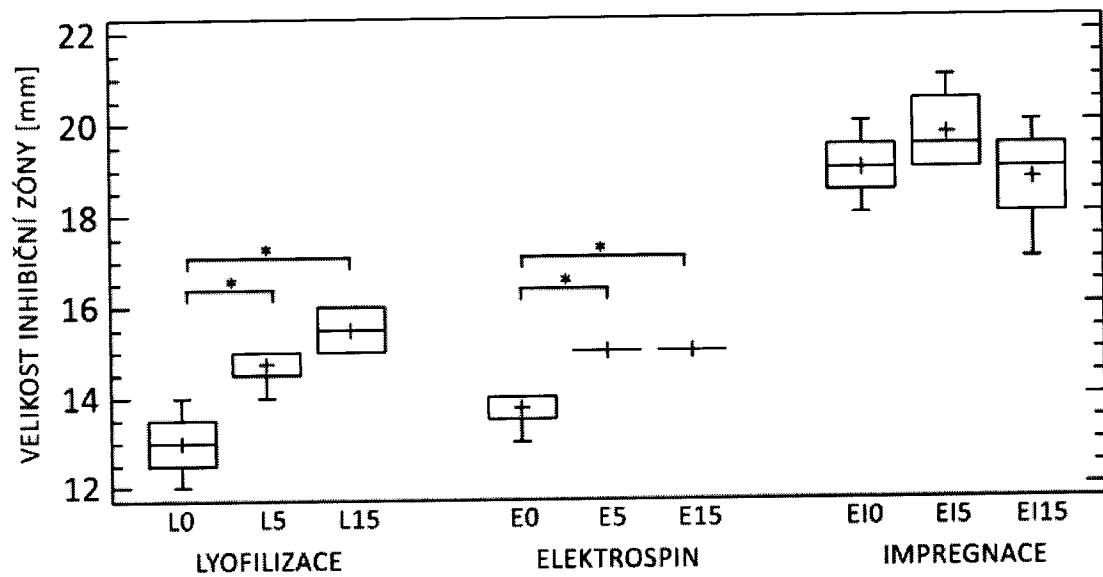
Obr. 1a



Obr. 1b

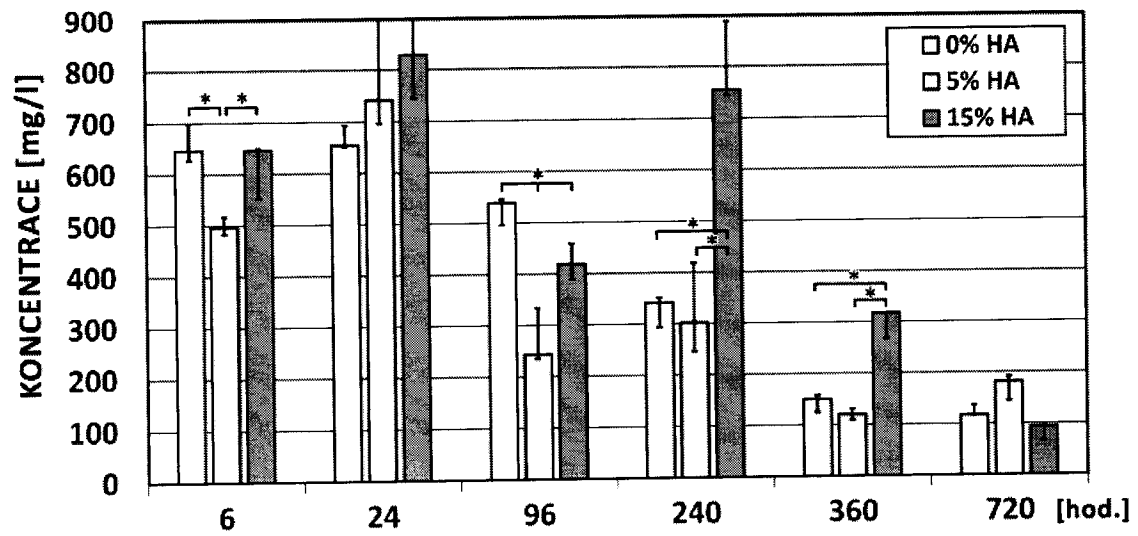


Obr. 1c

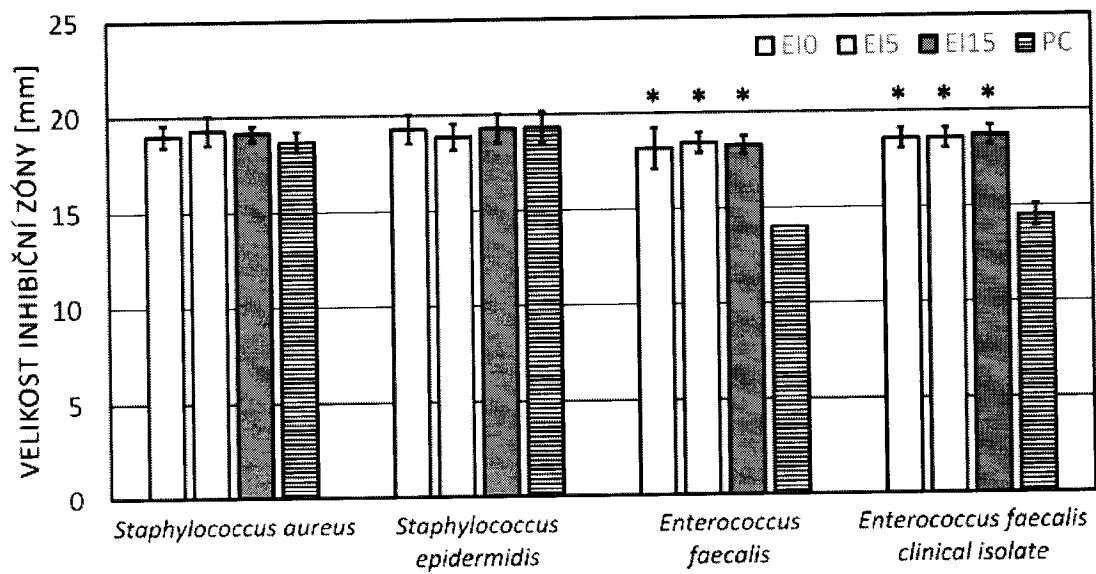


Obr. 2

20.10.18

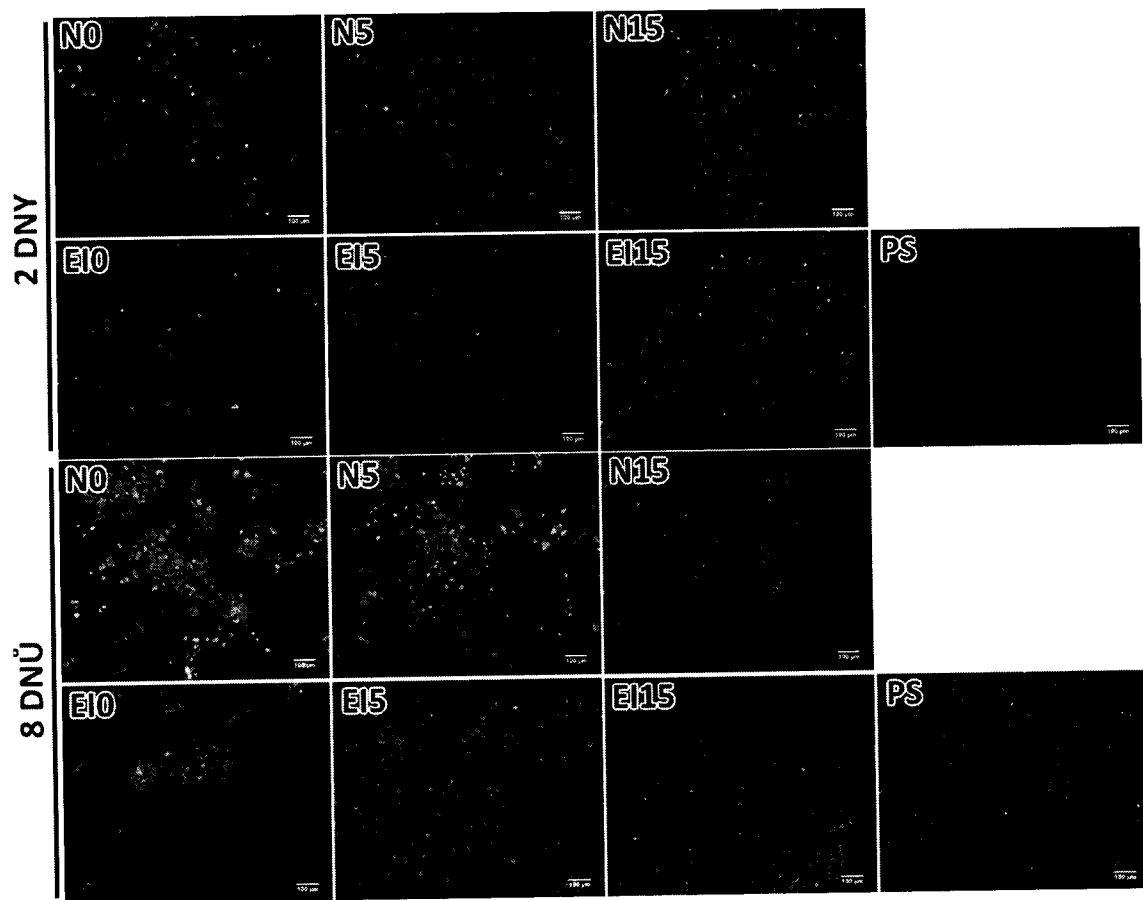


Obr. 3



Obr. 4

20.10.16



Obr. 5