

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

307 053

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2013-1079**
(22) Přihlášeno: **30.12.2013**
(40) Zveřejněno: **08.07.2015**
(Věstník č. 27/2015)
(47) Uděleno: **08.11.2017**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **20.12.2017**
(Věstník č. 51/2017)

A61L 27/02 (2006.01)
A61L 27/14 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
A61L 27/18 (2006.01)
A61L 27/34 (2006.01)
A61L 24/04 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

WO 2014112756; CA 2826771; RU 2476236; WO 2010036009; WO 2009029734.

(73) Majitel patentu:

hojení velkých defektů kostí in vivo.

Student Science, s. r. o., Horní Podluží, CZ
České vysoké učení v Praze, Fakulta
biomedicínského inženýrství, Kladno, CZ
Ústav experimentální medicíny Akademie věd
České republiky, v. v. i., Praha 4, CZ
Vysoké učení technické v Brně, Brno, CZ
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno,
Fakulta veterinární medicíny, Brno, Královo Pole,
CZ

(72) Původce:

prof. RNDr. Evžen Amler, CSc., Praha 7, CZ
Mgr. Eva Prosecká, Praha 4, CZ
Mgr. Michala Rampichová, Praha 6 - Ruzyně, CZ
Matej Buzgo, Turňa nad Bodvou, SK
Mgr. Andrea Míčková, Bratislava - Petržalka, SK
Mgr. Eva Filová, Ph.D., Praha 4 - Modřany, CZ
Mgr. Martin Plencner, Bratislava 5, SK
MVDr. Andrej Litvinec, Ph.D., Praha 6 - Lysolaje,
CZ
Ing. Lucy Vojtová, Ph.D., Měnin, CZ
prof. RNDr. Josef Jančář, CSc., Brno, CZ
prof. MVDr. Alois Nečas, Ph.D., MBA., Letovice,
CZ

(74) Zástupce:

Advokátní, znalecká a patentová kancelář, Mgr.
Václav Karlíček, Vinohradská 6, 120 00 Praha 2

(54) Název vynálezu:

**3 D kolagenové porézní kompozitní nosiče
pro akcelerovanou regeneraci kostí**

(57) Anotace:

Kolagenové porézní nosiče buněk obsahující
nanohydroxyapatit a nanovlákná polykaprolaktonu
dodatečně osazené mezenchymálními kmenovými
buňkami v přítomnosti roztoku bohatého na trombocyty.
Uvedený biokompozitní nosič je určen pro akcelerované

CZ 307053 B6

3 D kolagenové porézní kompozitní nosiče pro akcelerovanou regeneraci kostí

Oblast techniky

Vynález se týká složení kolagenových porézních nosičů buněk obsahujících nanohydroxyapatit a nanovlákna polykaprolaktonu dodatečně osazených mezenchymálními kmenovými buňkami v přítomnosti roztoku bohatého na trombocyty a způsobu jejich výroby. Uvedený biokompozitní nosič je určen pro akcelerované hojení velkých defektů kostí in vivo.

Dosavadní stav techniky

Současný stav léčby kostních defektů je přetrvávajícím problémem a výzvou pro lékaře a vědce po celém světě vzhledem k přetrvávajícím limitům dosavadní léčby (Zhang et al., 2012). Defekty kostí o kritické velikosti, kdy kost není schopna takto velký defekt reparovat sama, můžeme pozorovat u akutních zranění, při nutnosti náhrady kloubu s často potřebnou reoperací, u zlomenin u pacientek s osteoporózou či defekty kosti vzniklé po resekci nádoru. Současná léčba kostních defektů spočívá v použití autologního nebo alogenního štěpu kostní tkáně či požití protetických implantátů. Nicméně, tyto metody mají několik omezení, včetně bolesti, rizika imunitní reakce, přenosu nákazy a není zde často optimální interakce mezi tělem a implantovanými materiály (Pearce et al., 2007; Tu et al., 2009). Slibný nový přístup přináší kostní tkáňové inženýrství založené na kombinaci vhodných materiálů jako základního nosiče doplněného o systém dodávání léčiv či živin přímo do místa defektu a možné kombinace s autologními mezenchymálními kmenovými buňkami (MSC) diferencovanými do osteoblastů (Karageorgiou a Kaplan, 2005; Mao et al., 2005). Biomateriály jako biokeramika, biopolymery, kovy a jejich kompozity, byly popsány jako vhodné pro použití v kostním tkáňovém inženýrství (Dawson et al, 2008;.. Freed et al, 1998).

Mezi nejvýznamnější materiály s potenciálem pro klinické použití patří kolagen a Hydroxyapatit. Jsou to materiály přirozeně se vyskytující v lidském těle, vyznačují se tedy vynikající biokompatibilitou, vysokou osteokonduktivitou, tedy podporující tvorbu kostní tkáně a nejsou pro tělo toxické (Karageorgiou a Kaplan, 2005;.. Wang et al., 2006). Poskytují zdroj vápníku, fosfátu a důležitých iontů pro podporující tvorbu nové kostní tkáně (Burg et al., 2000; Sukhodub et al., 2004; Sachlos et al., 2006).

Nové možnosti v léčbě a pro vylepšení vlastností nosičů pro kostní tkáňové inženýrství přinášejí nové poznatky v oblasti růstových faktorů. Nalézt vhodné koncentrace růstových faktorů a způsob dodání růstových faktorů do místa určené klíčovým faktorem pro jejich použití v tkáňovém inženýrství. Nedávné studie prokázaly, že růstové faktory obsažené v krevních destičkách mají ideální vlastnosti pro tkáňové inženýrství a regenerativní medicínu (Bi et al, 2010; Kitoh et al, 2007). Navíc destičky lze použít autologně z trombocytárního koncentrátu (TRS) či celé plasmy, což přináší skvělé možnosti pro klinické využití. Z destiček se po jejich aktivaci uvolňuje velké množství různých faktorů jako je např. destičkový růstový faktor (PDGF), transformující růstový faktor (TGF α & β), fibroblastický růstový faktor (FGF), vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF), inzulínu podobný růstový faktor 1 (IGF-1), či epidermální růstový faktor (EGF) (Dohan Ehrenfest et al, 2009; Veillette et al, 2007; Wasterlain et al, 2012; Wrotniak et al, 2007). Současné studie potvrzují pozitivní účinek růstových faktorů z krevních destiček na rychlejší regeneraci poškozených tkání (Bi et al, 2010; Everts et al, 2006.). Krevní destičky mají komplexní účinek. Ovlivňují místní zánětlivou reakci, která je první reakcí na poškození tkáně a startuje proces hojení, podporují angiogenezi (Simpson et al., 2006), a podporují množení mezenchymálních buněk a jejich diferenciaci do buněk dané tkáně (Veillette et al., 2007).

Mnohé studie prokázaly, že kombinace vhodného materiálu, MSCs a PRP urychluje hojení a remodelaci kostní tkáně (Chen et al, 2010; Kitoh et al, 2007). Předmětem výzkumu však zůstává najít vhodnou metodu pro doručení růstových faktorů do místa defektu a jejich řízené uvolnění.

5 Ideální nosič pro kostní tkáňové inženýrství by měl být biokompatibilní, tedy netoxický pro tělo a nejlépe biodegradovatelný, kdy se nosič rozpadá úměrně se vznikem nové tkáně a v konečné fázi je novou tkání zcela nahrazen. Kromě ideálního chemického složení by měl mít podobné mechanické vlastnosti jako původní tkáň. Posledním neméně důležitým faktorem pro ideální nosič je jeho vnitřní struktura s dostatečně velkými póry pro migraci buněk a zejména živin i do
10 jeho středu a též propojenost těchto pórů je nezbytná též pro prorůstání cév. Přičemž velikost pórů není pro všechny buňky stejná. Specifická tkáň potřebuje specifické parametry. Za vhodnou velikost pórů pro buňky kostní tkáně (osteoblasty a osteoklasty) včetně nezbytné vaskularizace je považována velikost $> 300 \mu\text{m}$ (Karageorgiou 2005), zatímco pro fibroblasty byla prokázána velikost pórů mezi 6 až 20 mikrometry (Lowery 2010). U pěn z přírodních nebo syntetických
15 polymerů lze vhodnou metodou výroby dosáhnout požadovaných parametrů pro tvorbu nové kostní tkáně (Dawson 2009, Geigera 2003).

Pro dosažení ideálních vlastností nosiče se jeví velmi slibně použití nanovláken. Poslední výzkumy ukazují, že použití materiálů ve formě vláken či nanovláken má pozitivní účinky na zlepšení
20 mechanických vlastností nosiče. Albanna et al. (2012) použil chitosanová vlákna pro zlepšení mechanických vlastností nosiče pro regeneraci srdečních chlopní. Guarina et al. použil nanovlákná ze směsi Polakaprolaktonu (PCL) a kyseliny poly- mléčné (PLGA) pro ovlivnění mechanických vlastností nosiče (Guarina et al., 2008). Nanovlákná nejenže mohou zlepšit svou přítomností mechanické vlastnosti nosiče, ale svou velikostí a tvarem jsou velmi podobná vláknům tvořících extracelulární hmotu a tím tvoří naprosto přirozené prostředí pro buňky (Ma et al, 2005, Lanutti 2007, Susan 2006, Li 2002). Navíc, výjimečná plocha povrchu nanovláken poskytuje vynikající podmínky pro adhezi a proliferaci buněk (Liang 2007, Noh 2006, Park 2004).

Nanovlákná byla též použita pro ovlivnění velikosti pórů, kdy Baker et al. sledoval vliv nanovláken na jejich velikost (Baker 2008). Ideální vlákna vyrobená elektrostatickým zvlákněním by měla mít velikost pórů okolo 10 až 500 μm (Blakeney 2011). Tyto parametry umožňují růst a diferenciaci lidských mezenchymálních kmenových buněk (MSC) diferencovaných do osteoblastů (Badami 2006, Schöfer 2008).

35 Elektrostatické zvláknění je jednoduchý proces přípravy vláken na submikronovém měřítku. Nanovlákná mohou být navíc modifikována a funkcionalizována pro zlepšení jejich biologických a biomechanických vlastností. Možnost funkcionalizace nanovláken přináší použití koaxiální elektrody, která umožňuje přípravu nanovláken typu jádro/plášť. Použití koaxiálního elektrostatického zvláknění umožňuje zapouzdření biologicky aktivních látek dovnitř vláken a jejich postupné uvolňování. Nanovlákná nabízejí mnohé použití pro biomedicínské aplikace.
40

V současné době je intenzivně zkoušeno zapouzdření léčiv či jiných molekul do nanovláken. Bolgen et al. zapouzdřil do nanovláken antibiotika (Bolgen 2007), Li et al. zapouzdřili do nanovláken růstové faktory (Li 2010), Xu et al., zapouzdřil do nanovláken cytostatika (Xu 2009),
45 Saraf et al. DNA (Saraf 2010), a Cao et al. siRNA (Cao 2010). Schopnost nanovláken udržovat aktivitu enzymů byla prokázána začleněním přírodních proteinů, jako jsou lipázy a kasein (Xie 2006), s křenovou peroxidázou (HRP) (Patel 2006), alkalické fosfatázy, a β -galaktosidázy (Dror 2008) zapouzdřených do různých nanovláken. Nedávno se dvěma skupinám vědců podařilo úspěšně zapouzdřit bakteriální buňky a viry do nanovláken (Zussman 2011, Klein 2009).

50 Koaxiální elektroda se skládá ze dvou kapilár, které jsou umístěny společně koaxiálně. Plášť je tvořen z jednoho polymerního materiálu vycházejícího z vnější jehly a současně z vnitřní jehly vychází polymerní materiál pro jádro. Materiály pro plášť a jádro se mohou lišit, mohou být např. různě rozpustné či biodegradovatelné, v čemž též spočívá princip řízeného dodávání léčiv či živin. Do jádra lze právě zapouzdřit bioaktivní látky, přičemž jejich aktivita je ochráněna i díky
55

plášti (Bazilevsky 2007). Uvolňovací kinetika zapouzdřených molekul je důležitý parametr pro úspěšné použití v tkáňovém inženýrství. Uvolnění zapouzdřených molekul z nanovláken závisí na parametrech, jako je interakce biomolekul s polymerní maticí, polymerní degradace a vlastnosti daných molekul (molekulová hmotnost a náboj) (Tiwari 2010).

5

Byl rovněž vyvinut systém pro řízené dodávání léčiv založený na koaxiálních nanovlákních se zapouzdřenými a-granulemi izolovanými z krevních destiček pro biomedicínské využití (Buzgo 2012) a systém dodávání léčiv založený na koaxiálních nanovlákních s inkorporovanými liposomy (Míčková 2012).

10

Kompozitní pěny z kolagenu typu I a hydroxyapatitu (HA) s vhodnou velikostí pórů byly rovněž již vyvinuty. Velikost pórů je závislá na koncentraci kolagenu I a HA. Tato pěna je obohacena o nanovlákněný systém sloužící jako systém pro zlepšení mechanických vlastností a dodávání živin s adherovanými či inkorporovanými růstovými faktory.

15

Navzdory výše popsanému stavu a určitému dosaženému pokroku, je léčba kostních defektů vytrvale přetrvávajícím problémem, zvláště vzhledem k trvalým omezením dosavadních léčebných možností.

20

Podstata vynálezu

Podstatou vynálezu je složení kolagenových porézních nosičů buněk modifikovaných nanočásticemi hydroxyapatitu (HAP) a nanovláknů polykaprolaktonu (PCL), dodávajícím nosiči (skafoldu) výjimečné pevnostní a elastické vlastnosti a možnost dodání živin do nitra nosiče. Porézní kompozitní nosiče jsou dodatečně osazeny autologními mezenchymálními kmenovými buňkami (MSC) v přítomnosti roztoku bohatého na trombocyty (TRS). Na základě uvedeného složení vznikne biokompozitní nosič, který je plně bioresorbovatelný a testováním in vivo prokázal akcelerované hojení velkých defektů kostí albínských králíků.

30

Příklady uskutečnění vynálezu

35 Příklad 1

Kompozitní nosič pro řešení kostních defektů je složený z 0,5 % bovinního kolagenu typu I a 50 % nanohydroxyapatitu. Jedná se o sterilní kompozitní nosič ve formě pěny v různých rozměrech určený pro klinické použití v zubním lékařství a chirurgii pro vnitřní řešení kostních defektů či vyplnění rány po extrakci zubů a následnou regeneraci kostní tkáně v místě defektu.

40

Příklad 2

45 Kompozitní nosič s adherovanými bioaktivními látkami v podobě trombocytu z TRS na jeho povrchu s/bez MSC pro řešení kostních defektů je složený z 0,5 % bovinního kolagenu typu I a 50 % nanohydroxyapatitu s adherovanými bioaktivními látkami na jeho povrchu a s možností následného obohacení o MSC. Jedná se o sterilní kompozitní nosič ve formě pěny v různých rozměrech určený pro klinické použití v zubním lékařství a chirurgii pro vnitřní řešení kostních defektů či vyplnění rány po extrakci zubů a následné regeneraci kostní tkáně v místě defektu.

50

Příklad 3

5 Kompozitní nosič s nanovláknny se zapouzdřenými bioaktivními látkami v podobě trombocytu či jejich složek (alfa granule) a s/bez adheřovanými bioaktivními látkami v podobě trombocytu z TRS na jeho povrchu s/bez MSC pro řešení kostních defektů. Kompozitní nosič je složený z 0,5 % bovinního kolagenu typu I a 50 % nanohydroxyapatitu obohacený o nanovláknennou složku s inkorporovanými bioaktivními látkami a též s možností obohacení bioaktivními látkami adheřovanými na povrchu nosiče podporujícími a urychlujícími regeneraci kostní tkáně a celkové zhojení rány. Kompozitní nosič může být následně obohacený též o MSC. Jedná se o sterilní kompozitní nosič ve formě pěny v různých rozměrech určený pro klinické použití v zubním lékařství a chirurgii pro vnitřní řešení kostních defektů či vyplnění rány po extrakci zubů a následně regeneraci kostní tkáně v místě defektu.

15

Příklad 4

20 Kompozitní nosič s nano/mikro částicemi se zapouzdřenými bioaktivními látkami v podobě trombocytu či jejich složek (alfa granule) připravených mletím z nanovláken a s/bez adheřovanými bioaktivními látkami v podobě trombocytu z TRS na jeho povrchu a s/bez MSC pro řešení kostních defektů. Kompozitní nosič je složený z 0,5 % bovinního kolagenu typu I a 50 % nanohydroxyapatitu obohacený o nanovláknennou složku v podobě definovaných mikro či nano částic s inkorporovanými bioaktivními látkami a též s možností obohacení bioaktivními látkami adheřovanými na povrchu nosiče podporujícími a urychlujícími regeneraci kostní tkáně a celkové zhojení rány. Kompozitní nosič může být následně obohacený též o MSC. Jedná se o sterilní kompozitní nosič ve formě pěny v různých rozměrech určený pro klinické použití v zubním lékařství a chirurgii pro vnitřní řešení kostních defektů či vyplnění rány po extrakci zubů a následně regeneraci kostní tkáně v místě defektu.

30

Příklad 5

35 Způsob výroby kompozitního nosiče pro řešení kostních lézí po extrakci zubu. 5 % bovinní kolagen typu I (VÚP Brno, ČR) je vysušen lyofilizací při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Získaný 100% kolagen je naředěn ultračistou vodou na 2 hmotn.% a homogenizována dezintegrátorem po dobu 10 minut při 5000 ot/min. Vzniklá vodná suspenze je následně centrifugována po dobu 5 min při 3000 x g pro odstranění bublin vzduchu. Pak je přidán hydroxyapatitový prášek (s průměrnou velikostí částic 350 um) tak, aby výsledný hmotnostní poměr kolagen:HAP byl 1:1. Po homogenizaci byla suspenze rozlita do 12-ti jamkové kultivační destičky a zmrazena při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 h. Poté byly vzorky lyofilizovány při $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$, 15 Pa, 24 h. Po vysušení jsou vzorky přímo v kultivační misce síťovány etanolovým roztokem N-(3-dimethylamino propyl)-N'-etylcarbodiimidu hydrochloridu (EDC) a N-hydroxysukcinimidu (NHS) o molárním poměru 2:1 po dobu 2 h. Po síťování je síťovací roztok odstraněn a nahrazen 0,1 M roztokem $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{ H}_2\text{O}$ po dobu 30 min a poté 30 min ultračistou vodou. Po promytí jsou vzorky opět zmrazeny při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ po 24 h a následně lyofilizovány při $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ a 15 Pa po dobu 24 hodin. Kompozitní nosič je poté umístěn do kultivační destičky, ve které je sterilizován. Suché vzorky jsou skladovány v lednici při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby použití.

50

Příklad 6

55 Příklad výroby kompozitního nosiče pro vnitřní použití pro řešení kostních lézí. 5 % bovinní kolagen typu I (VÚP Brno, ČR) byl vysušen lyofilizací při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Získaný 100% kolagen je naředěn ultračistou vodou na 2 hmotn.% a homogenizován dezintegrátorem po dobu 10 minut při 5000 ot/min. Vzniklá vodná suspenze je následně centrifugována po dobu 5 min při 3000 x g pro

odstranění bublin vzduchu. Pak je přidán hydroxyapatitový prášek (s průměrnou velikostí částic 350 μm) tak, aby výsledný hmotnostní poměr kolagen:HAP byl 1:1. Po homogenizaci je suspenze rozlita do 12-ti jamkové kultivační destičky a zmrazena při -18 °C po dobu 24 h. Poté jsou vzorky lyofilizovány při -55 °C, 15 Pa, 24 h. Po vysušení jsou vzorky přímo v kultivační misce sítovány etanolovým roztokem N-(3-dimethylamino propyl)-N'-etylcarbodiimidu hydrochloridu (EDC) and N-hydroxysukcinimidu (NHS) o molárním poměru 2:1 po dobu 2 h. Po sítování je sítovací roztok odstraněn a nahrazen 0,1 M roztokem Na₂HPO₄.12 H₂O po dobu 30 min a poté 30 min ultračistou vodou. Po promytí jsou vzorky opět zmrazeny při -18 °C po 24 h a následně lyofilizovány při -55 °C a 15 Pa po dobu 24 hodin. Kompozitní nosič je poté umístěn do kultivační destičky, ve které je sterilizován. Suché vzorky byly skladovány v lednici při 4 °C do doby použití.

Příklad 7

Způsob výroby kompozitního nosiče s nanovlákný a s bioaktivními látkami v podobě adhezních trombocytů z trombocytárního koncentrátu (TRS) a osazený MSC pro řešení kostních lézí po extrakci zubu. 5 % bovinní kolagen typu I (VÚP Brno, ČR) byl vysušen lyofilizací při -70 °C. Získaný 100% kolagen je naředěn ultračistou vodou na 2 hmotn. % a homogenizován dezintegrátorem po dobu 10 minut při 5000 ot/min. Vzniklá vodná suspenze je následně centrifugována po dobu 5 min při 3000 x g pro odstranění bublin vzduchu. Pak je přidán hydroxyapatitový prášek (s průměrnou velikostí částic 350 μm) tak, aby výsledný hmotnostní poměr kolagen:HAP byl 1:1. Po homogenizaci dezintegrátorem jsou přidána nanovlákná. Po homogenizaci je suspenze rozlita do 12-ti jamkové kultivační destičky a zmrazena při -18 °C po dobu 24 h. Poté jsou vzorky lyofilizovány při -55 °C, 15 Pa, 24 h. Po vysušení jsou vzorky přímo v kultivační misce sítovány etanolovým roztokem N-(3-dimethylamino propyl)-N'-etylcarbodiimidu hydrochloridu (EDC) a N-hydroxysukcinimidu (NHS) o molárním poměru 2:1 po dobu 2 h. Po sítování je sítovací roztok odstraněn a nahrazen 0,1 M roztokem Na₂HPO₄.12 H₂O po dobu 30 min a poté 30 min ultračistou vodou. Po promytí jsou vzorky opět zmrazeny při -18 °C po 24 h a následně lyofilizovány při -55 °C a 15 Pa po dobu 24 hodin. Kompozitní nosič je poté umístěn do kultivační destičky, ve které je sterilizován. Suché vzorky jsou skladovány v lednici při 4 °C do doby použití.

Za sterilních podmínek je poté k nosiči přidán přímo na operačním sále roztok trombocytů a takto inkubován při pokojové teplotě po dobu 30 minut, pro jejich adhezi na nosič. Následně jsou na nosič nasazeny MSC o koncentraci 10⁶/cm². Nosič je poté implantován do rány.

Příklad 8

Způsob výroby kompozitního nosiče s nanovlákný a s bioaktivními látkami v podobě adhezních trombocytů z trombocytárního koncentrátu (TRS) a osazený MSC pro vnitřní použití pro řešení kostních lézí. 5 % bovinní kolagen typu I (VÚP Brno, ČR) byl vysušen lyofilizací při -70 °C. Získaný 100% kolagen je naředěn ultračistou vodou na 2 hmotn. % a homogenizován dezintegrátorem po dobu 10 minut při 5000 ot/min. Vzniklá vodná suspenze je následně centrifugována po dobu 5 min při 3000 x g pro odstranění bublin vzduchu. Pak je přidán hydroxyapatitový prášek (s průměrnou velikostí částic 350 μm) tak, aby výsledný hmotnostní poměr kolagen:HAP byl 1:1. Po homogenizaci dezintegrátorem jsou přidána nanovlákná. Po homogenizaci je suspenze rozlita do 12-ti jamkové kultivační destičky a zmrazena při -18 °C po dobu 24 h. Poté byly vzorky lyofilizovány při -55 °C, 15 Pa, 24 h. Po vysušení jsou vzorky přímo v kultivační misce sítovány etanolovým roztokem N-(3-dimethylamino propyl)-N'-etylcarbodiimidu hydrochloridu (EDC) a N-hydroxysukcinimidu (NHS) o molárním poměru 2:1 po dobu 2 h. Po sítování je sítovací roztok odstraněn a nahrazen 0,1 M roztokem Na₂HPO₄.12 H₂O po dobu 30 min a poté 30 min ultračistou vodou. Po promytí jsou vzorky opět zmrazeny při -18 °C po 24 h a následně lyofilizovány při -55 °C a 15 Pa po dobu 24 hodin. Kompozitní nosič je poté

umístěn do kultivační destičky, ve které je sterilizován. Suché vzorky jsou skladovány v lednici při 4 °C do doby použití.

5 Za sterilních podmínek je poté k nosiči přidán přímo na operačním sále roztok trombocytu a takto inkubován při pokojové teplotě po dobu 30 minut, pro jejich adhezi na nosič. Následně jsou na nosič nasazeny MSC o koncentraci $10^6/\text{cm}^2$. Nosič je poté implantován do rány.

10 Za sterilních podmínek je poté k nosiči přidána přímo na operačním sále suspenze MSC o koncentraci $10^6/\text{cm}^2$. Nosič je poté implantován do rány.

Průmyslová využitelnost

15 Kolagenové porézní kompozitní nosiče pro akcelerovanou regeneraci kostí, kupř. ve formě pěny v různých rozměrech, jsou určeny pro klinické použití s výhodou v zubním lékařství a chirurgii pro vnitřní řešení kostních defektů či vyplnění rány po extrakci zubů a následné regeneraci kostní tkáně v místě defektu.

20

PATENTOVÉ NÁROKY

25 **1.** Kolagenové porézní kompozitní nosiče pro akcelerovanou regeneraci kostí, **v y z n a ě u - j í c í s e t í m**, že jsou tvořeny z 20 až 99 hmotn. % kolagenu obecně typu I – XXI, s výhodou bovinní kolagen typu I a z 1 až 80 hmotn. % bioaktivními anorganickými nanočásticemi ze skupiny fosfátových solí, s výhodou nanohydroxyapatitu.

30 **2.** Kolagenové porézní kompozitní nosiče pro akcelerovanou regeneraci kostí, **v y z n a ě u - j í c í s e t í m**, že jsou vytvořeny z 20 až 99 hmotn. % kolagenu obecně typu I – XXI, s výhodou bovinní kolagen typu I a z 1 až 80 hmotn. % biodegradovatelnými nanovláknky či nano/mikro částicemi ze skupiny biopolymerů, syntetických polymerů nebo jejich směsí.

35 **3.** Kolagenové porézní kompozitní nosiče pro akcelerovanou regeneraci kostí, podle některého z výše uvedených nároků, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že vedle kolagenu typu I – XXI, anorganické nanočástice ze skupiny fosfátových solí, s výhodou nanohydroxyapatit, a nanovláknenné složky obsahuje alespoň jednu pomocnou látku ze skupiny zahrnující růstové faktory, antibiotika, bakteriostatické nebo farmakologicky účinné látky.

40

4. Způsob výroby kolagenového porézního kompozitního nosiče uvedeného v nároku 1 pro akcelerovanou regeneraci kostí, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že vodný roztok kompozitní směsi, která se skládá z 20 až 99 hmotn. % kolagenu obecně typu I – XXI, s výhodou bovinní kolagen typu I, bioaktivní anorganické částice ze skupiny fosfátových solí, s výhodou hydroxyapatit a nanovláknenné složky, je zmrazen, usušen sublimací za sníženého tlaku – lyofilizací – a následně zesíťován.

45

5. Způsob výroby kolagenového porézního kompozitního nosiče pro akcelerovanou regeneraci kostí, podle nároku 5, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že chemické síťování probíhá v etanolovém roztoku etylcarbodiimidu hydrochloridu a N–hydroxysukcinimidu v libovolném poměru.

50

6. Způsob výroby kolagenového porézního kompozitního nosiče pro akcelerovanou regeneraci kostí, podle nároků 5 a 6, **v y z n a ě u j í c í s e t í m**, že kompozitní nosič je po chemickém síťování opět zmražen a lyofilizován.

5

10

Konec dokumentu
