PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

309 204

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

A61L 15/32	(2006.01)
A61K 38/39	(2006.01)
B82Y 5/00	(2011.01)

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2021-55**
(22) Přihlášeno: **17.12.2019**
(40) Zveřejněno: **30.06.2021**
(Věstník č. 26/2021)
(47) Uděleno: **06.04.2022**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **18.05.2022**
(Věstník č. 20/2022)

(56) Relevantní dokumenty:
A.N. Halili et al:. Collagen Based Multilayer Scaffolds for Meniscus Tissue Engineering: In Vivo Test Results Biomaterials and Medical Applications 2 (1) DOI:10.4172/2577-0268.1000112 https://www.scitechnol.com/peer-review/collagen-based-multilayer-scaffolds-for-meniscus-tissue-engineering-in-vivo-test-results-e5gs.php?article_id=7159

WO 90/00060; EP 2803371 A1; WO 2013/173906 A1; CZ 2013-1079 A3.

(73) Majitel patentu:
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
PharmDr. Jan Hartinger, Ph.D., Praha 5, Smíchov, CZ

(74) Zástupce:
Kania, Sedlák, Smola, s.r.o., Mendlovo náměstí 907/1a, 603 00 Brno, Staré Brno

(54) Název vynálezu:

Kolagenní kompozit pro řízené uvolňování aktivních látek a způsob jeho přípravy

(57) Anotace:
Vynález se týká kolagenního kompozitu, který obsahuje alespoň jednu vrstvu vysoce porézní kolagenní pěny s alespoň jednu vrstvu kolagenních nanovláken, který je schopen řízeného lokálního uvolňování aktivních látek. Dále je předmětem vynálezu i způsob přípravy kolagenního kompozitu.

CZ 309204 B6

Kolagenní kompozit pro řízené uvolňování aktivních látek a způsob jeho přípravy

Oblast techniky

Předmětem vynálezu je kolagenní kompozit, v němž se střídá alespoň jedna vrstva vysoce porézní, degradovatelné kolagenní pěny s hemostatickými účinky s alespoň jednou vrstvou kolagenních vláken, a který je schopen řízeného lokálního uvolňování aktivních látek, například antibiotik, pro použití formou krytí ran v chirurgii, ortopedii, traumatologii a plastické chirurgii. Předmětem vynálezu je i způsob přípravy kolagenního kompozitu.

Dosavadní stav techniky

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 organismu, často nedostatečného průniku do operační rány a v určitých 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.

Kolageny izolované z tkání 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 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 karboimidů, které jsou v chemii kolagenu běžně používány. Podmínky síťování ovlivňují výslednou míru zesítění kolagenního materiálu, což má ve výsledku velký vliv 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 nanovlákenných vrstev pomocí elektrostatického zvlákňování. Jejich obrovskou výhodou je velký aktivní povrch, který dokáže 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 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 a ekonomická dostupnost (odpadní materiál v potravinářství) spolu s jeho biokompatibilními 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 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. 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 z mořských ryb – pouze pro aplikaci chlorhexidinu ve stomatologii. Dále jsou dostupná *in vitro* data a data ze zvířecích experimentů pro ciprofloxacin. 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 pěně. V klinické praxi je vankomycin používán převážně v lokální léčbě fraktur – byly použity 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 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 (ceftarolinu, linezolidu) a jejich šetření pro závažnější infekce.

Lokální aplikace je vhodná především pro antibiotika s nízkou distribucí do tkání, čemuž odpovídají aminoglykosidy, vankoymcin a nitrofurantoin. Nově umisťujeme tyto látky do kolagenní matrice z kolagenu sladkovodních ryb, což je lehce dostupný materiál s nižší 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 mechanizmu účinku antibiotik a rozdílným cílovým 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 a rozpadat.

Podstata vynálezu

Nevýhody hemostatických krycích materiálů na bázi kolagenu do značené míry překonává kolagenní kompozit, který obsahuje porézní kolagenní pěnu. Tento kolagenní kompozit obsahuje kolagen typu I, který je uspořádán do alespoň dvou vrstev, přičemž jednou vrstvou je vrstva vysoce porézní pěny a druhou vrstvou je nanovlákenná vrstva, přičemž vrstva vysoce porézní pěny má otevřenou porozitu v rozmezí 70 až 90 %, s výhodou 80 % až 90 %, a střední hodnotu velikosti pórů 50 až 200 µm, kde alespoň 50 % objemu pórů je tvořeno póry o velikosti nad 80 µm, a přičemž průměr vláken je v rozmezí 100 až 350 nm. Nanovlákenná vrstva má s výhodou tloušťku v rozmezí 0,2 až 0,5 mm. Ve výhodném provedení je kolagenní kompozit uspořádán do více než dvou vrstev, s výhodou do alespoň pěti vrstev, kde se pravidelně střídají vrstva vysoce porézní pěny s nanovlákennou vrstvou. Objemové množství všech nanovlákenných vrstev je v rozmezí 20 až 60 %. Kolagenní kompozit může dále obsahovat alespoň jednu aktivní látku, přičemž poměr kolagenu k celkovému množství aktivních látek v kolagenním kompozitu je 40 až 70 % hmotn. kolagenu na 30 až 60 % hmotn. aktivních látek. Aktivní látka je s výhodou vybrána ze skupiny

zahrnující antibiotikum, anestetikum, antiagregans, antivirotikum, nebo jejich směs, s výhodou je to antibiotikum nebo směs antibiotik, například vybrané ze skupiny zahrnující vankomycin, gentamicin, rifampicin, nitrofurantoin.

Vysoce porézní pěnou je degradovatelná kolagenní pěna pro řízené uvolňování aktivních látek, která obsahuje kolagen typu I a má otevřenou porozitu v rozmezí 70 až 90 % a střední hodnotu velikosti pórů 50 až 200 µm, kde alespoň 50 % objemu pórů je tvořeno póry o velikosti nad 80 µm. S výhodou pochází kolagen z kůže sladkovodních ryb, kde jsou imunitní reakce výrazně menší než u kolagenu savčího původu, zejména z tkání velkých savců. Pěna může být dále impregnovaná alespoň jednou aktivní látkou, která se uspořádá do pórů pěny, přičemž poměr kolagenu k celkovému množství aktivních látek v kolagenní pěně je 40 až 70 % hmotn. kolagenu na 30 až 60 % hmotn. aktivních látek. Aktivní látka je s výhodou vybrána ze skupiny zahrnující antibiotikum, anestetikum, antiagregans, antivirotikum, nebo jejich směs, s výhodou antibiotikum, například vankomycin, gentamicin, rifampicin, nitrofurantoin, nebo jejich směs. Pěna má s výhodou tloušťku v rozmezí 0,5 až 5 cm, například 1 cm.

Dalším podstatným přínosem kompozitu je také skutečnost, že umožnuje 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 operatéra 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.

Kolagenem typu I je ve všech provedeních vynálezu s výhodou kolagen izolovaný z kůže sladkovodních ryb, například z kůže kapra obecného.

Vysoce porézní pěna se vyznačuje řízeným rozpadem, řízenou porozitou a schopností řízeného uvolňování aktivních látek, zejména antibiotik. Tato kolagenová pěna má vysokou míru otevřené porozity 70 až 90 % obj., velikost pórů v rozmezí 50 až 200 µm a je navržená tak, aby vykazovala udržitelné lokální uvolňování aktivních látek, jejichž celkové množství je 30 až 60 % hmotn. Řízeného uvolňování aktivních látek, například antibiotik, a řízeného rozpadu kolagenové pěny je dosaženo vytvářením optimálního množství příčných vazeb v molekule kolagenu při její přípravě, a to buď fyzikálně, např. ozařováním, nebo chemicky, s výhodou aplikací *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylkarbodiimid hydrochloridu (EDC) a *N*-hydroxysukcinimidu (NHS). Rozpad nezesíťované vysoce porézní pěny bez nebo s aktivními látkami, například s antibiotiky, lze předpokládat v řádu 2 až 7 dnů. Pěna síťovaná po dobu 2 hodin se rozpadne do 2 týdnů. Pěna síťovaná po dobu 3 hodin se rozpadne do 4 týdnů. Pěna síťovaná po dobu 4 hodin se rozpadne do 6 týdnů. Tyto údaje se týkají pěny, která vychází ze způsobu přípravy při použití 1 % hmotn. disperze kolagenu. Při použití jiné výchozí koncentrace se mohou doby rozpadu lišit, ale odborník je zjistí rutinním experimentováním.

Doba řízeného rozpadu, kterou lze vybrat na základě požadované doby aplikace pěny, následně ovlivňuje dobu řízeného uvolňování aktivních látek, například antibiotik (viz příklady 2 až 4). U pěny (při použití 1% hmotn. disperze kolagenu při přípravě) zesíťované po dobu 2 hodin dochází k uvolňování antibiotik do deseti dnů. U pěny zesíťované po dobu 3 hodin dochází k uvolnění antibiotik do patnácti dnů. U pěny zesíťované po dobu 4 hodin dochází k uvolnění antibiotik do dvaceti dnů.

Při preventivním použití pěny s antibiotiky se s výhodou použije pěna s dobou rozpadu maximálně do dvou týdnů a s uvolňováním antibiotik maximálně do deseti dnů s výhodou čtyř dnů. V případech rizika vzniku zánětu, v potenciálně infekčním terénu (např. operace v třísle, v blízkosti genitálu, nebo laparoskopické odstranění žlučníku či slepého střeva) se s výhodou použije pěna s

dobou rozpadu maximálně čtyři týdny a s uvolňováním antibiotik maximálně do patnácti dnů, s výhodou deseti dnů. V případech infekce způsobené přítomností protetického materiálu, kde je vysoké riziko infekce, se s výhodou použije pěna s dobou rozpadu maximálně do osmi týdnů s výhodou šesti týdnů a s dobou uvolňování antibiotik po dobu maximálně padesáti dnů s výhodou dvaceti dnů dle citlivosti na vykultivované infekční agens.

Požadované porozity je dosaženo jednak koncentrací disperze kolagenu, z níž se pěna připravuje, a jednak teplotou zamražení výsledné pěny před lyofilizací a následnou impregnací aktivní látkou. Čím koncentrovanější je disperze kolagenu, tím menší póry vznikají, a čím nižší je teplota zamražení, tím menší póry vznikají.

Základním přínosem tohoto vynálezu 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 organizmu. Dalším podstatným přínosem tohoto vynálezu je skutečnost, že umožnuje deponovat do 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 operatéra i během operace, a to impregnací kolagenní pěny, např. v 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.

Při přípravě samotné vysoce porézní kolagenové pěny se postupuje tak, že se odvážené množství kolagenu smísí s deionizovanou vodou v koncentraci 0,1 až 3 % hmotn., s výhodou 0,5 až 1 % hmotn. kolagenu, kde se kolagen nechá nabobtnat při teplotě 5 až 15 °C po dobu 1 až 3 hodin. Výsledná disperze je po homogenizaci zamražena při -60 až -90 °C po dobu 3 až 8 hodin a lyofilizována do dosažení konstantní hmotnosti. Stabilita kolagenové pěny je po lyofilizaci s výhodou zvýšena chemickým síťováním pomocí EDC a NHS, načež se pěna opět zamrazí na -15 až -30 °C po dobu 5 až 7 hodin a lyofilizuje. Pro zajištění řízeného uvolňování aktivní látky do těla je posledním krokem přípravy impregnace pěny roztokem na bázi alkoholu obsahujícím odvážené množství aktivních látek, například antibiotik, která jsou s výhodou vybrána ze skupiny zahrnující vankomycin, gentamicin, rifampicin, nitrofurantoin, nebo jejich kombinace tak, aby jejich výsledné množství v roztoku bylo 30 až 60 % hmotn. Impregnovaná pěna se poté může použít v této formě, nebo může být zamražena a lyofilizována. Alternativně může být impregnace vybranými aktivními látkami uskutečněna teprve před aplikací pěny, pro což se použije vodný roztok aktivních látek nebo se aktivní látky smísí s fyziologickým roztokem a pěna se aplikuje ihned, nebo až po odpaření kapalné fáze, tedy po dosažení konstantní hmotnosti pěny. Tímto postupem je získána pěna s výsledným množstvím kolagenu 40 až 70 % hmotn. a 30 až 60 % hmotn. aktivních látek.

Při přípravě nanostrukturované vysoce porézní kompozitní kolagenní pěny se postupuje tak, že se nejprve připraví nanovlákenná vrstva, a to například způsobem popsaným v české přihlášce vynálezu PV 2016-656. Vrstva se s výhodou připraví elektrostatickým zvlákňováním, 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 °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 zvlákňuje za vzniku nanovlákenné 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 EDC a NHS, kde množství EDC na 1 g zvlákněného kolagenu je alespoň 0,625 g a množství NHS 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. Následně se vrstva promyje, čímž se z ní vymyje pomocný polymer

polyethylenoxid, zamrazí se na teplotu -60 až -90 °C po dobu 3 až 8 hodin a lyofilizuje. Tloušťka zvlákněné vrstvy je s výhodou v rozmezí 0,2 až 0,5 mm.

V dalším kroku je zvlákněná vrstva ponechána v 0,1 až 3 % hmotn. disperzi kolagenu po dobu 1 až 3 hodin při teplotě 15 až 25 °C a po jejím prosycení následuje zamražení na teplotu -60 až -90 °C po dobu 3 až 8 hodin a lyofilizace do dosažení konstantní hmotnosti, za vzniku kompozitní kolagenní pěny. Stabilita kolagenové kompozitní pěny je po lyofilizaci s výhodou zvýšena chemickým síťováním, například chemicky pomocí EDC a NHS. Konečné objemové množství kolagenové nanovlákenné vrstvy v kompozitu je 20 až 60 %.

V případě více než dvou vrstev se nejprve připraví nanovlákenná vrstva a zesíťuje se. Potom se dvě nebo více těchto zesíťovaných nanovlákenných 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 nanovlákenné vrstvy v kompozitu je 20 až 60 %.

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 kapalné fáze, tedy po dosažení konstantní hmotnosti kompozitu.

Podobně jako u vysoce porézní pěny, čím kratší je doba síťování, tím rychlejší je rozpad kompozitu a tím kratší je i doba uvolňování antibiotik.

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 aktivní 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.

Vysoce porézní pěna a kompozit podle vynálezu mají následující výhody:

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

Kolagenová pěna podle vynálezu se s výhodou použije zejména preventivně, s cílem rychlého uvolňování aktivních látek.

Objasnění výkresů

Obr. 1 znázorňuje kolagenovou pěnu připravenou z 1% hmotn. disperze kolagenu bez antibiotik (vlevo: 100násobné zvětšení, uprostřed: 500násobné zvětšení) a po impregnaci gentamicinem (zcela vpravo, 2000násobné zvětšení).

Obr. 2 znázorňuje sendvičovou kolagenovou pěnu s málo porézním jádrem, připraveným z 5 % hmotn. disperze kolagenu, a s vysoce porézními okrajovými částmi, připravenými z 1 % hmotn. disperze kolagenu, příprava dle příkladu 11. Zcela vpravo je snímek rozhraní přechodu mezi jádrem a okrajem.

Obr. 3 znázorňuje graf závislosti smluvního napětí na deformaci pro samotnou porézní pěnu, samotné tuhé jádro a pro sendvičovou pěnu (příprava dle příkladu 11). Z grafu je patrná několikanásobně zvýšená odolnost vůči deformaci u sendvičové pěny oproti samotné pěně.

Obr. 4 znázorňuje nanostrukturovanou vysoce porézní kompozitní pěnu připravenou prosycením pěti nanovlákenných vrstev 1 % hmotn. disperzí kolagenu. Snímek uprostřed ilustruje přechod mezi vlákny a porézní strukturou pěny. Snímek zcela vpravo ukazuje detail prosycení nanovlákenné vrstvy disperzí.

Příklady uskutečnění vynálezu

Definice

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

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.

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

Výraz "vysoce porézní" v kontextu tohoto vynálezu jsou ty pěny, které mají otevřenou porozitu v rozmezí 70 % až 90 %, s výhodou 80 % 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 vynálezu 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.

Příklad 1 – vysoce porézní pěna

Při přípravě vysoce porézní kolagenové pěny se obecně postupuje tak, že se odvážené množství kolagenu, s výhodou izolovaného z kůže sladkovodních ryb, například z kapra obecného, smísí s deionizovanou vodou v koncentraci 0,1 až 3 % hmotn., s výhodou 0,5 až 1 % hmotn. kolagenu. Po nabobtnání kolagenu při teplotě 5-15 °C po dobu 1-3 hodin je směs dvojnásobně homogenizována po dobu 1 až 20 minut při 5 až 15 000 ot/min s 20 minutovou prodlevou při teplotě 15 až 25 °C. Výsledná disperze je poté dávkována do forem, zamražena při teplotě -60 až -90 °C po dobu 3 až 8 hodin a lyofilizována do dosažení konstantní hmotnosti. Stabilita kolagenové pěny je po lyofilizaci zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. ethanolu a vody s EDC a NHS při teplotě 25 až 40 °C, s výhodou při 37 °C, po dobu 2 až 4 hodin. Na 1 g kolagenu připadá 0,5-1,5 g EDC a 0,125 až 0,750 g NHS smísené 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, zamražena na -15 až -30 °C po dobu 5 až 7 hodin a lyofilizována. Posledním krokem přípravy je impregnace pěny 95 % hmotn. roztokem ethanolu s vodou obsahujícím odvážené množství antibiotika vybraných ze skupiny zahrnující vankomycin, gentamicin, rifampicin, nitrofurantoin, nebo jejich kombinace tak, aby jejich výsledné množství bylo 60 % hmotn. Impregnovaná pěna může být poté zamražena na -60

až -90 °C, lyofilizována a nařezána na potřebné rozměry. Pěna může být také impregnována vybranými antibiotiky teprve před její aplikací, pro což se použije vodný roztok antibiotik nebo se antibiotika smísí s fyziologickým roztokem. Následně se pěna aplikuje buď nasáknutá impregnačním roztokem, nebo suchá, tedy až po odpaření kapalné fáze z pěny. Tímto postupem je získána pěna s výsledným množstvím kolagenu 40 % hmotn. a 60 % hmotn. antibiotik.

Příklad 2 – vysoce porézní pěna

Odvážené množství kolagenu se smísí s deionizovanou vodou v koncentraci 1 % hmotn. kolagenu. Po nabobtnání kolagenu při teplotě 10 °C po dobu 2 hodin je směs dvojnásobně homogenizována po dobu 10 minut při 10 000 ot/min s 20 minutovou prodlevou při teplotě 20 °C. Výsledná disperze je poté dávkována do forem, zamražena při teplotě -70 °C po dobu 6 hodin a lyofilizována do dosažení konstantní hmotnosti. Stabilita kolagenové pěny je po lyofilizaci zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. ethanolu a vody s EDC a NHS při teplotě 30 °C po dobu 2 hodin. Na 1 g kolagenu se použil 1 g EDC a 0,250 g NHS smísené se 150 ml 95 % hmotn. roztoku ethanolu s vodou. Po zesíťování kolagenu je pěna promývána 1 M hydrogen fosforečnanem disodným po dobu alespoň 30 minut a dále promyta alespoň 20 minut v destilované vodě, zamražena na -20 °C po dobu 6 hodin a lyofilizována. Posledním krokem přípravy je impregnace pěny 95 % hmotn. roztokem ethanolu s vodou obsahujícím odvážené množství gentamicinu tak, aby jeho výsledné množství v roztoku bylo 45 % hmotn. Impregnovaná pěna se pak zamrazí na -70 °C, lyofilizuje a nařeže na potřebné rozměry. Tímto postupem je získána pěna s výsledným množstvím kolagenu 55 % hmotn. a 45 % hmotn. antibiotika.

Příklad 3 – vysoce porézní pěna

Postupuje se stejně jako v příkladu 2, ale doba síťování je 3 hodiny.

Příklad 4 – vysoce porézní pěna

Postupuje se stejně jako v příkladu 2, ale doba síťování je 4 hodiny.

Příklad 5 – vysoce porézní pěna

Postupuje se jako v příkladu 2 s výjimkou posledního kroku přípravy, tj. impregnace pěny roztokem obsahujícím aktivní látku. Pěna se zamrazí na -70 °C, lyofilizuje a nařeže na potřebné rozměry. Tímto postupem je získána pěna sestávající z čistého kolagenu.

Příklad 6 – vysoce porézní pěna

Odvážené množství kolagenu se smísí s deionizovanou vodou v koncentraci 1,5 % hmotn. kolagenu. Po nabobtnání kolagenu při teplotě 15 °C po dobu 1 hodiny je směs dvojnásobně homogenizována po dobu 15 minut při 8000 ot/min s 20 minutovou prodlevou při teplotě 15 °C. Výsledná disperze je poté dávkována do forem, zamražena při teplotě -80 °C po dobu 4 hodin a lyofilizována do dosažení konstantní hmotnosti. Stabilita kolagenové pěny je po lyofilizaci zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. ethanolu a vody s EDC a NHS při teplotě 25 °C po dobu 3 hodin. Na 1 g kolagenu se použilo 0,7 g EDC a 0,2 g NHS smísené se 140 ml 95 % hmotn. roztoku ethanolu s vodou. Po zesíťování kolagenu je pěna promývána 0,8 M hydrogen fosforečnanem disodným po dobu alespoň 30 minut a dále promyta alespoň 20 minut v destilované vodě, zamražena na -30 °C po dobu 5 hodin a lyofilizována. Posledním krokem přípravy je impregnace pěny 95 % hmotn. roztokem ethanolu s vodou obsahujícím odvážené množství vankomycinu tak, aby jeho výsledné množství v roztoku bylo 45 % hmotn. Impregnovaná pěna se pak zamrazí na -80 °C, lyofilizuje a nařeže na potřebné rozměry. Tímto postupem je získána pěna s výsledným množstvím kolagenu 55 % hmotn. a 45 % hmotn. antibiotika.

Příklad 7 – vysoce porézní pěna

Odvážené množství kolagenu se smísí s deionizovanou vodou v koncentraci 3 % hmotn. kolagenu. Po nabobtnání kolagenu při teplotě 12 °C po dobu 2,5 hodin je směs dvojnásobně homogenizována po dobu 20 minut při 15 000 ot/min s 20 minutovou prodlevou při teplotě 25 °C. Výsledná disperze je poté dávkována do forem, zamražena při teplotě -90 °C po dobu 3 hodin a lyofilizována do dosažení konstantní hmotnosti. Stabilita kolagenové pěny je po lyofilizaci zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. ethanolu a vody s EDC a NHS při teplotě 40 °C po dobu 2 hodin. Na 1 g kolagenu se použilo 1,4 g EDC a 0,7 g NHS smísené se 160 ml 95 % hmotn. roztoku ethanolu s vodou. Po zesíťování kolagenu je pěna promývána 1,5 M hydrogen fosforečnanem disodným po dobu alespoň 30 minut a dále promyta alespoň 20 minut v destilované vodě, zamražena na -30 °C po dobu 5 hodin a lyofilizována. Posledním krokem přípravy je impregnace pěny 95 % hmotn. roztokem ethanolu s vodou obsahujícím odvážené množství směsi vankomycinu a gentamicinu v poměru 1:1 tak, aby jejich výsledné množství bylo 30 % hmotn. Impregnovaná pěna je poté zamražena na -90 °C, lyofilizována a nařezána na potřebné rozměry. Tímto postupem je získána pěna s výsledným množstvím kolagenu 70 % hmotn. a 30 % hmotn. antibiotik.

Příklad 8 – vysoce porézní pěna

Odvážené množství kolagenu se smísí s deionizovanou vodou v koncentraci 0,5 % hmotn. kolagenu. Po nabobtnání kolagenu při teplotě 15 °C po dobu 3 hodin je směs dvojnásobně homogenizována po dobu 20 minut při 5000 ot/min s 20 minutovou prodlevou při teplotě 25 °C. Výsledná disperze je poté dávkována do forem, zamražena při teplotě -60 °C po dobu 8 hodin a lyofilizována do dosažení konstantní hmotnosti. Stabilita kolagenové pěny je po lyofilizaci zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. ethanolu a vody s EDC a NHS při teplotě 25 °C po dobu 4 hodin. Na 1 g kolagenu se použilo 1,2 g EDC a 0,7 g NHS smísené se 160 ml 95 % hmotn. roztoku ethanolu s vodou. Po zesíťování kolagenu je pěna promývána 0,5 M hydrogen fosforečnanem disodným po dobu alespoň 30 minut a dále promyta alespoň 20 minut v destilované vodě, zamražena na -15 °C po dobu 7 hodin a lyofilizována. Posledním krokem přípravy je impregnace pěny 95 % hmotn. roztokem ethanolu s vodou obsahujícím odvážené množství směsi vankomycinu, gentamicinu a nitrofurantoinu v poměru 1:1:1 tak, aby jejich výsledné množství bylo 30 % hmotn. Impregnovaná pěna je poté zamražena na -60 °C, lyofilizována a nařezána na potřebné rozměry. Tímto postupem je získána pěna s výsledným množstvím kolagenu 70 % hmotn. a 30 % hmotn. antibiotik.

Příklad 9 – vysoce porézní pěna

Maximální doby rozpadu kolagenové pěny a maximální doby uvolňování aktivních látek (zde antibiotik)

Tab. 1 Dosažená maximální doba rozpadu kolagenové pěny při použití EDC v koncentraci 0,5 až 1,5 g (na 1 g kolagenu) podle použité teploty a doby expozice v síťovacím systému 95 % hmotn. roztoku ethanolu s vodou EDC a NHS. NHS je k EDC v hmotnostním poměru 1:4. Základní parametry postupu jsou dle příkladu 2.

dosažená maximální doba degradace	doba síťování při teplotě 15-25°C	doba síťování při teplotě 30-40°C	maximální doba uvolňování antibiotik
2 týdny	6 hodin	2 hodiny	10 dnů
4 týdny	9 hodin	3 hodiny	15 dnů
6 týdnů	12 hodin	4 hodiny	20 dnů

Příklad 10 – sendvičová kolagenová pěna

Při přípravě sendvičové kolagenové pěny se obecně postupuje tak, že se odvážené množství kolagenu, s výhodou izolovaného z kůže sladkovodních ryb, například z kapra obecného, smísí s deionizovanou vodou, po nabobtnání kolagenu při teplotě 5 až 15 °C po dobu 1 až 3 hodin je směs dvojnásobně homogenizována po dobu 1 až 20 minut při 5 až 15 000 ot/min s 20 minutovou prodlevou při teplotě 15 až 25 °C. Koncentrace kolagenové disperze pro přípravu jádra je 4 až 8 % hmotn. Koncentrace pro přípravu okrajových částí je 0,1 až 3 % hmotn., s výhodou 0,1 až 1 % hmotn. V prvním kroku je výsledná 4 až 8 % hmotn. disperze dávkována do forem, zamražena při teplotě -60 až -90 °C po dobu 3 až 8 hodin a lyofilizována do dosažení konstantní hmotnosti. Ve druhém kroku je tuhé jádro impregnováno 0,1 až 3% hmotn. disperzí kolagenu ve formě a takto ponecháno 1-3 hodiny při teplotě 15 až 25 °C, zamraženo při teplotě -60 až -90 °C po dobu 3 až 8 hodin a lyofilizováno do dosažení konstantní hmotnosti, za získání sendvičové kolagenové pěny s málo porézním jádrem a vysoce porézními okrajovými vrstvami. Stabilita kolagenové sendvičové pěny je po lyofilizaci zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. ethanolu a vody s EDC a NHS při teplotě 25 až 40 °C, s výhodou 30 až 40 °C, nejvýhodněji při 37 °C po dobu 2 až 4 hodin. Na 1 g kolagenu připadá 0,5-1,5 g EDC a 0,125 až 0,750 g NHS smísené 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, zamražena na -15 až -30 °C po dobu 5 až 7 hodin a lyofilizována. Konečné objemové množství málo porézního jádra v sendvičové pěně je 40 až 60 %. Posledním krokem přípravy podle výhodného provedení je impregnace sendvičové pěny 95 % hmotn. roztokem ethanolu s vodou obsahujícím odvážené množství aktivních látek, například antibiotik vybraných ze skupiny zahrnující vankomycin, gentamicin, rifampicin, nitrofurantoin, nebo jejich kombinace tak, aby jejich výsledné množství bylo 30 až 60 % hmotn. Impregnovaná pěna může být poté zamražena a lyofilizována. Sendvičová pěna může být také impregnována vybranými antibiotiky 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 60 % hmotn. a 40 až 60 % hmotn. antibiotik.

Příklad 11 – sendvičová kolagenová pěna

Při přípravě sendvičové kolagenové pěny se postupuje tak, že se odvážené množství kolagenu smísí s deionizovanou vodou v koncentraci 5 % hmotn. kolagenu, po nabobtnání kolagenu při teplotě 10 °C po dobu 2 hodin je směs dvojnásobně homogenizována po dobu 10 minut při 10 000 ot/min s 20 minutovou prodlevou při teplotě 20 °C. Výsledná 5% hmotn. disperze je dávkována do forem, zamražena při teplotě -80 °C po dobu 6 hodin a lyofilizována do dosažení konstantní hmotnosti, za vzniku tuhého, málo porézního jádra. Ve druhém kroku je tuhé jádro impregnováno 1% hmotn. disperzí kolagenu ve formě, přičemž objemový poměr obou disperzí (disperze pro přípravu jádra a disperze pro přípravu okrajových částí) je 1:1, a takto je ponecháno 2 hodiny při teplotě 20 °C, zamraženo při teplotě -80 °C po dobu 6 hodin a lyofilizováno do dosažení konstantní hmotnosti za získání sendvičové pěny sestávající z málo porézního jádra a vysoce porézních okrajových vrstev. Stabilita kolagenové sendvičové pěny je po lyofilizaci 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 se použil 1 g EDC a 0,250 g NHS smísené se 150 ml 95 % hmotn. roztoku ethanolu s vodou. Po zesíťování kolagenu je pěna promývána 1 M hydrogen fosforečnanem disodným po dobu alespoň 30 minut a dále promyta alespoň 20 minut v destilované vodě, zamražena na -20 °C po dobu 6 hodin a lyofilizována. Konečné objemové množství málo porézního jádra v sendvičové pěně je 50 %. Posledním krokem přípravy je impregnace sendvičové pěny 95 % hmotn. roztokem ethanolu s vodou obsahujícím odvážené množství antibiotik vybraných ze skupiny zahrnující vankomycin, gentamicin, rifampicin, nitrofurantoin, nebo jejich kombinace tak, aby jejich výsledné množství bylo 45 % hmotn. Impregnovaná pěna může být poté zamražena a lyofilizována. Tímto postupem je získána pěna s výsledným množstvím kolagenu 55 % hmotn. a 45 % hmotn. antibiotik.

Příklad 12 – sendvičová kolagenová pěna

Postupuje se stejně jako v příkladu 11, ale doba síťování je 3 hodiny.

Příklad 13 – sendvičová kolagenová pěna

Postupuje se stejně jako v příkladu 11, ale doba síťování je 4 hodiny.

Příklad 14 – sendvičová kolagenová pěna

Postupuje se jako v příkladu 11 s výjimkou posledního kroku přípravy, tj. pěna se neimpregnuje roztokem obsahujícím aktivní látku. Pěna se zamrazí na -70 °C, lyofilizuje a nařeže na potřebné rozměry. Tímto postupem je získána sendvičová pěna sestávající z čistého kolagenu.

Příklad 15 – sendvičová kolagenová pěna

Odvážené množství kolagenu se smísí s deionizovanou vodou v koncentraci 4 % hmotn., po nabobtnání kolagenu při teplotě 15 °C po dobu 1 hodiny je směs dvojnásobně homogenizována po dobu 15 minut při 8000 ot/min s 20 minutovou prodlevou při teplotě 15 °C. V prvním kroku je výsledná 4% hmotn. disperze dávkována do forem, zamražena při teplotě -75 °C po dobu 4 hodin a lyofilizována do dosažení konstantní hmotnosti, za získání tuhého jádra. Ve druhém kroku je tuhé jádro impregnováno 0,6% hmotn. disperzí kolagenu ve formě, přičemž poměr disperze pro přípravu jádra k disperzi pro přípravu okrajových vrstev je 2:3, a takto ponecháno 1 hodinu při teplotě 25 °C, zamraženo při teplotě -75 °C po dobu 4 hodin a lyofilizováno do dosažení konstantní hmotnosti za získání sendvičové pěny sestávající z málo porézního jádra a vysoce porézních okrajových vrstev. Stabilita kolagenové sendvičové pěny je po lyofilizaci zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. ethanolu a vody s EDC a NHS při teplotě 37 °C po dobu 3 hodin. Na 1 g kolagenu se použilo 0,7 g EDC a 0,2 g NHS smísené se 140 ml 95 % hmotn. roztoku ethanolu s vodou. Po zesíťování kolagenu je pěna promývána 0,8 M hydrogen fosforečnanem disodným po dobu alespoň 30 minut a dále promyta alespoň 20 minut v destilované vodě, zamražena na -30 °C po dobu 5 hodin a lyofilizována. Konečné objemové množství málo porézního jádra v sendvičové pěně je 40 %. Posledním krokem přípravy je impregnace sendvičové pěny 95 % hmotn. roztokem ethanolu s vodou obsahujícím odvážené množství antibiotik vybraných ze skupiny zahrnující vankomycin, gentamicin, rifampicin, nitrofurantoin, nebo jejich kombinace tak, aby jejich výsledné množství bylo 30 % hmotn. Impregnovaná pěna může být poté zamražena a lyofilizována. Tímto postupem je získána pěna s výsledným množstvím kolagenu 70 % hmotn. a 30 % hmotn. antibiotik.

Příklad 16 – sendvičová kolagenová pěna

Odvážené množství kolagenu se smísí s deionizovanou vodou v koncentraci 7 % hmotn., po nabobtnání kolagenu při teplotě 12 °C po dobu 2,5 hodin je směs dvojnásobně homogenizována po dobu 20 minut při 15 000 ot/min s 20 minutovou prodlevou při teplotě 25 °C. V prvním kroku je výsledná 7% hmotn. disperze dávkována do forem, zamražena při teplotě -85 °C po dobu 3 hodin a lyofilizována do dosažení konstantní hmotnosti, za získání tuhého jádra. Ve druhém kroku je tuhé jádro impregnováno 1% hmotn. disperzí kolagenu ve formě (poměr disperze pro přípravu jádra k disperzi pro přípravu okrajových vrstev je 3:2) a takto ponecháno 2,5 hodiny při teplotě 25 °C, zamraženo při teplotě -85 °C po dobu 3 hodin a lyofilizováno do dosažení konstantní hmotnosti za získání sendvičové pěny sestávající z málo porézního jádra a vysoce porézních okrajových vrstev. Stabilita kolagenové sendvičové pěny je po lyofilizaci zvýšena máčením v roztoku 95 % hmotn. ethanolu a vody s EDC a NHS při teplotě 37 °C po dobu 3 hodin. Na 1 g kolagenu se použilo 1,4 g EDC a 0,7 g NHS smísené se 160 ml 95 % hmotn. roztoku ethanolu s vodou. Po zesíťování kolagenu je pěna promývána 1,5 M hydrogen fosforečnanem disodným po dobu alespoň 30 minut a dále promyta alespoň 20 minut v destilované vodě, zamražena na -30 °C po dobu 5 hodin a

lyofilizována. Konečné objemové množství málo porézního jádra v sendvičové pěně je 60 %. Posledním krokem přípravy je impregnace sendvičové pěny 95% hmotn. roztokem ethanolu s vodou obsahujícím odvážené množství antibiotik vybraných ze skupiny zahrnující vankomycin, gentamicin, rifampicin, nitrofurantoin, nebo jejich kombinace tak, aby jejich výsledné množství bylo 30 % hmotn. Impregnovaná pěna může být poté zamražena a lyofilizována. Tímto postupem je získána pěna s výsledným množstvím kolagenu 70 % hmotn. a 30 % hmotn. antibiotik.

Příklad 17 – sendvičová kolagenová pěna

Odvážené množství kolagenu se smísí s deionizovanou vodou v koncentraci 8 % hmotn., po nabobtnání kolagenu při teplotě 20 °C po dobu 3 hodin je směs dvojnásobně homogenizována po dobu 20 minut při 6000 ot/min s 20 minutovou prodlevou při teplotě 25 °C. V prvním kroku je výsledná 8% hmotn. disperze dávkována do forem, zamražena při teplotě -80 °C po dobu 3 hodin a lyofilizována do dosažení konstantní hmotnosti, za získání tuhého jádra. Ve druhém kroku je tuhé jádro impregnováno 1,5% hmotn. disperzí kolagenu ve formě (poměr disperze pro přípravu jádra k disperzi pro přípravu okrajových vrstev je 7:3) a takto ponecháno 2 hodiny při teplotě 25 °C, zamraženo při teplotě -80 °C po dobu 3 hodin a lyofilizováno do dosažení konstantní hmotnosti za získání sendvičové pěny sestávající z málo porézního jádra a vysoce porézních okrajových vrstev. Stabilita kolagenové sendvičové pěny je po lyofilizaci 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 se použilo 1,4 g EDC a 0,35 g NHS smísené se 160 ml 95 % hmotn. roztoku ethanolu s vodou. Po zesíťování kolagenu je pěna promývána 1,5 M hydrogen fosforečnanem disodným po dobu alespoň 30 minut a dále promyta alespoň 20 minut v destilované vodě, zamražena na -30 °C po dobu 5 hodin a lyofilizována. Konečné objemové množství málo porézního jádra v sendvičové pěně je 70 %. Posledním krokem přípravy je impregnace sendvičové pěny 95 % hmotn. roztokem ethanolu s vodou obsahujícím odvážené množství antibiotik vybraných ze skupiny zahrnující vankomycin, gentamicin, rifampicin, nitrofurantoin, nebo jejich kombinace tak, aby jejich výsledné množství bylo 30 % hmotn. Impregnovaná pěna může být poté zamražena a lyofilizována. Tímto postupem je získána pěna s výsledným množstvím kolagenu 70 % hmotn. a 30 % hmotn. antibiotik.

Příklad 18 – sendvičová kolagenová pěna

V tabulce 2 jsou dosažené maximální doby rozpadu sendvičové kolagenové pěny a maximální doby uvolňování antibiotik, doba a teplota síťování, přičemž příprava sendvičové pěny se provedla dle příkladu 11 s proměnnými konečnými objemovými množstvími málo porézního jádra v sendvičové pěně 40 %, 50 %, 60 %, tj. s proměnnými poměry výchozích disperzí (2:3, 1:1, 3:2).

Tab. 2

objemový podíl jádra	doba síťování při teplotě 15 až 25 °C	doba síťování při teplotě 30 až 40 °C	dosažená maximální doba degradace	maximální doba uvolňování antibiotik
40%	6 hodin	2 hodiny	4 týdny	21 dnů
	9 hodin	3 hodiny	6 týdnů	25 dnů
	12 hodin	4 hodiny	8 týdnů	30 dnů
50%	6 hodin	2 hodiny	5 týdny	31 dnů
	9 hodin	3 hodiny	7 týdny	35 dnů
	12 hodin	4 hodiny	9 týdnů	40 dnů
60%	6 hodin	2 hodiny	6 týdny	41 dnů
	9 hodin	3 hodiny	8 týdny	45 dnů
	12 hodin	4 hodiny	10 týdnů	50 dnů

Příklad 19 – kompozitní kolagenní pěna

Při přípravě nanostrukturované vysoce porézní kompozitní kolagenní pěny se obecně postupuje tak, že je nejprve připravena nanovlákenná kolagenová vrstva, a to elektrostatickým zvlákňováním 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). Zvlákňování probíhá v elektrostatickém poli 200 až 300 $kV.m^{-1}$ s dávkováním 100 až 200 µl/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 smísené 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 zamražena 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 zamražení 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 smísené 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, zamražena na -15 až -30 °C po dobu 5 až 7 hodin a lyofilizována. Konečné objemové množství kolagenové nanovlákenné 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 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 20 – kompozitní kolagenní pěna

Při přípravě nanostrukturované vysoce porézní kompozitní kolagenní pěny se postupuje tak, že se nejprve připraví nanovlákenná kolagenová vrstva elektrostatickým zvlákňováním 8% hmotn. roztoku kolagenu s fosfátovým pufrem a ethanolem (1:1 objemově), do kterého je přidán polyethylenoxid v hmotnostním poměru 0,08 ku kolagenu (Mr 700 000). Zvlákňování probíhá v elektrostatickém poli 270 $kV.m^{-1}$, dávkování 150 $\mu l.min^{-1}$ 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 smísené 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 smísené 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 vlákenné vrstvy a disperze je 2:3, a proto i objemový poměr vlákenné vrstvy a pěny ve výsledném kompozitu je 2:3, tj. konečné objemové množství kolagenové nanovlákenné 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 21 – kompozitní kolagenní pěna

Při přípravě nanostrukturované vysoce porézní kompozitní kolagenní pěny se postupuje tak, že se nejprve připraví nanovlákenná kolagenová vrstva jako v příkladu 20. 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 nanovlákenných 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 smísené 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 vlákenných vrstev k disperzi je 2:3, a proto i objemový poměr vlákenných vrstev a pěny ve výsledném kompozitu je 2:3, tj. konečné objemové množství kolagenových nanovlákenných 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 22 – kompozitní kolagenní pěna

Postupuje se stejně jako v příkladu 20, ale doba každého síťování (stabilizace) je 3 hodiny.

Příklad 23 – kompozitní kolagenní pěna

Postupuje se stejně jako v příkladu 20, ale doba každého síťování (stabilizace) je 4 hodiny.

Příklad 24 – kompozitní kolagenní pěna

Při přípravě nanostrukturované vysoce porézní kompozitní kolagenní pěny se postupuje tak, že se nejprve připraví nanovlákenná kolagenová vrstva jako v příkladu 20. Stabilizace, zamražení a lyofilizace se provede také jako v příkladu 20. 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 nanovlákenných 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 smísené 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 vlákenných vrstev k disperzi je 1:4, a proto i objemový poměr vlákenných vrstev a pěny ve výsledném kompozitu je 1:4, tj. konečné objemové množství

kolagenových nanovlákenných 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.

Průmyslová využitelnost

Degradovatelné kolagenní pěny s hemostatickými účinky, s řízenou dobou degradace a s řízeným lokálním uvolňováním antibiotik podle tohoto užitného vzoru lze využít v humánní a veterinární medicíně, zejména v chirurgii, ortopedii, traumatologii a plastické chirurgii. Použití samotné pěny je vhodné v případech, kdy se jedná o potenciálně infekční terén, například hrozí riziko vzniku infekce při operaci nebo ošetření otevřené rány nebo vředu. V některých případech lze použít jen samotné kolagenové krytí díky jeho hemokoagulačním účinkům. Přídavek aktivních látek, například antibiotik pak slouží jako rychlá, krátkodobá prevence. Rychlejší je i doba rozpadu. Sendvičové kolagenní pěny s málo porézním jádrem a vysoce porézními okrajovými vrstvami s hemostatickými účinky, s řízenou dobou degradace a s řízeným lokálním uvolňováním antibiotik podle tohoto užitného vzoru lze využít v humánní a veterinární medicíně, zejména v chirurgii, ortopedii, krytí ran, léčbě bércových vředů, traumatologii a plastické chirurgii. Vhodná je zejména u méně rozsáhlých zánětů nebo v potenciálně infekčním terénu, tedy tam, kde je zapotřebí nejprve rychlé uvolnění optimální dávky aktivní látky, a následně dlouhodobější účinek aktivní látky, díky kterému se zamezí opětovnému vzniku zánětu. Nanostrukturované vysoce porézní kompozitní kolagenní pěny s hemostatickými účinky, s řízenou dobou degradace a s řízeným lokálním uvolňováním antibiotik podle tohoto užitného 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.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Kolagenní kompozit pro řízené uvolňování aktivních látek, **vyznačující se tím**, že obsahuje alespoň jednu vrstvu vysoce porézní pěny, která obsahuje kolagen typu I a má otevřenou porozitu v rozmezí 70 až 90 % a střední hodnotu velikosti pórů 50 až 200 μm, přičemž alespoň 50 % obj. pórů má velikost póru nad 80 μm, a alespoň jednu nanovlákennou kolagenní vrstvu, kde průměr vláken nanovlákenné vrstvy je v rozmezí 100 až 350 nm.

2. Kolagenní kompozit podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že vysoce porézní vrstva má otevřenou porozitu v rozmezí 80 až 90 % a/nebo že kompozit je uspořádán do více než dvou vrstev, přičemž všechny nanovlákenné vrstvy dohromady tvoří 20 až 60 % obj. vzhledem k celkovému objemu kompozitu.

3. Kolagenní kompozit podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že kompozit je uspořádán do alespoň pěti vrstev, kde se pravidelně střídají vrstva vysoce porézní pěny s nanovlákennou vrstvou, přičemž všechny nanovlákenné vrstvy dohromady tvoří 20 až 60 % obj. vzhledem k celkovému objemu kompozitu.

4. Kolagenní kompozit podle kteréhokoli z předchozích nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje alespoň jednu aktivní látku a že hmotnostní poměr kolagenu k celkovému množství aktivních látek v kolagenní pěně je v rozmezí 2:3 až 7:3.

5. Způsob přípravy kolagenního kompozitu definovaného v nároku 1, **vyznačující se tím**, že se nejprve elektrostatickým zvlákňováním připraví nanovlákenná kolagenová vrstva, která se stabilizuje chemickým síťováním, načež se promyje, zamrazí na teplotu -60 až -90 °C po dobu 3 až 8 hodin a lyofilizuje, poté se nanovlákenná kolagenová vrstva ponechá v 0,1 až 3 % hmotn. disperzi kolagenu po dobu 1 až 3 hodin při teplotě 15 až 25 °C, následně se zamrazí na teplotu -60 až -90 °C po dobu 3 až 8 hodin a lyofilizuje za vzniku kolagenové kompozitní pěny, která se poté stabilizuje fyzikálním nebo chemickým síťováním, načež se promyje, zamrazí a lyofilizuje.

6. Způsob přípravy podle nároku 5, kolagenního kompozitu definovaného v nároku 2, **vyznačující se tím**, že se nejprve elektrostatickým zvlákňováním připraví nanovlákenná kolagenová vrstva, která se stabilizuje chemickým síťováním, načež se promyje, zamrazí na teplotu -60 až -90 °C po dobu 3 až 8 hodin a lyofilizuje, poté se dvě nebo více takto připravených nanovlákenných vrstev položených na sobě ponechá v 0,1 až 3 % hmotn. disperzi kolagenu po dobu 1 až 3 hodin při teplotě 15 až 25 °C, následně se zamrazí na teplotu -60 až -90 °C po dobu 3 až 8 hodin a lyofilizuje za vzniku kolagenové kompozitní pěny, která se poté stabilizuje fyzikálním nebo chemickým síťováním, načež se promyje, zamrazí a lyofilizuje.

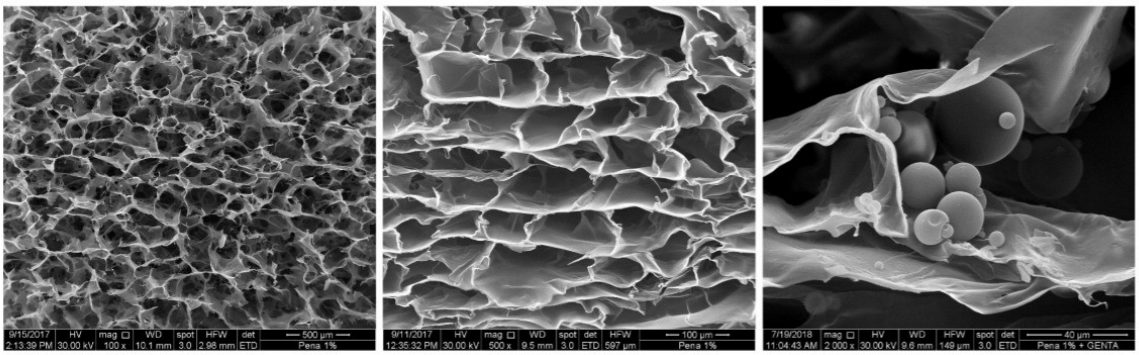
7. Způsob přípravy kolagenního kompozitu podle nároku 5 nebo 6, **vyznačující se tím**, že síťování je chemické a provede se máčením pěny v roztoku 95 % hmotn. ethanolu a vody s *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylkarbodiimid hydrochloridem a *N*-hydroxysukcinimidem při teplotě 25 až 40 °C po dobu 2 až 4 hodin.

8. Způsob přípravy kolagenního kompozitu podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že při síťování je na 1 g kolagenu množství *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylkarbodiimid hydrochloridu 0,5 až 1,5 g a množství *N*-hydroxysukcinimidu je 0,125 až 0,750 g.

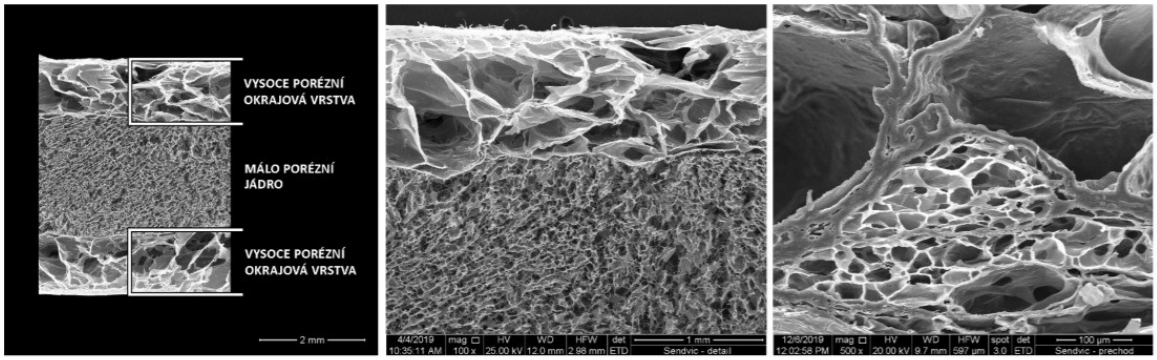
9. Způsob přípravy podle nároku 5 kolagenního kompozitu definovaného v nároku 4, **vyznačující se tím**, že se kompozit po poslední lyofilizaci impregnuje 95% hmotn. roztokem ethanolu s vodou

obsahujícím jednu nebo více aktivních látek, s výhodou vybranou ze skupiny zahrnující antibiotikum, anestetikum, antiagregans, antivirotikum, nebo jejich směs, s výhodou antibiotikum.

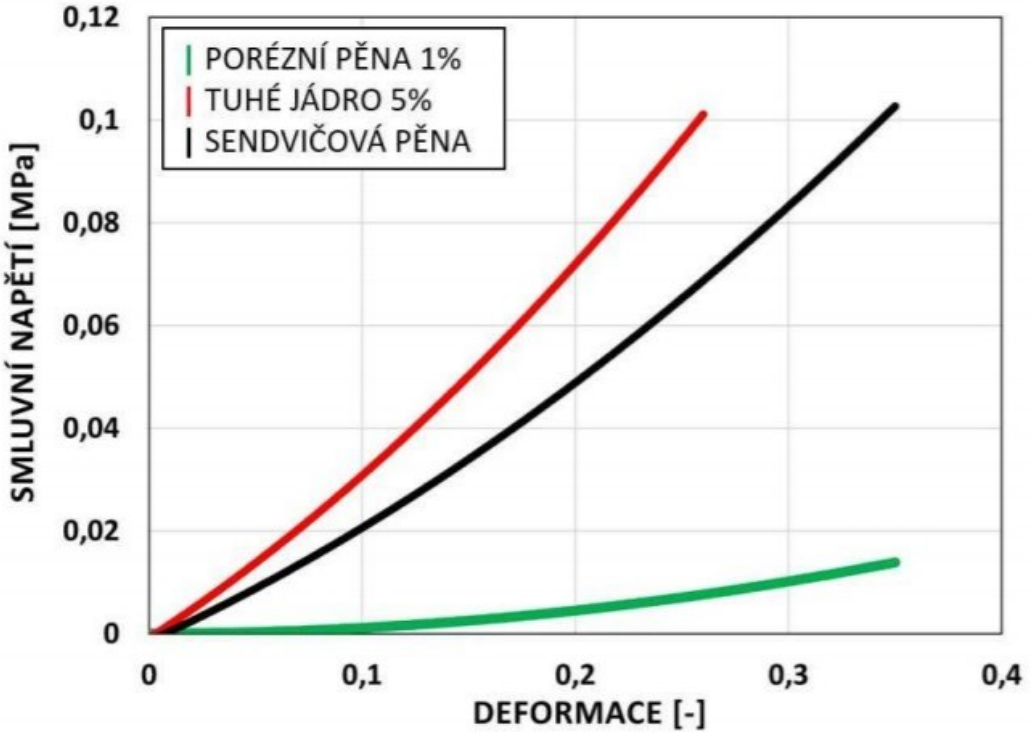
4 výkresy


9/15/2017 2:13:39 PM
HV 30.00 kV
mag 100 x
WD 10.1 mm
spot 3.0
HFW 2.98 mm
det ETD
500 µm
Pena 1%
9/11/2017 12:35:32 PM
HV 30.00 kV
mag 500 x
WD 9.5 mm
spot 3.0
det ETD
HFW 597 µm
100 µm
Pena 1%
7/19/2018 11:04:43 AM
mag 2 000 x
HV 30.00 kV
WD 9.6 mm
HFW 149 µm
spot 3.0
det ETD
40 µm
Pena 1% + GENTA

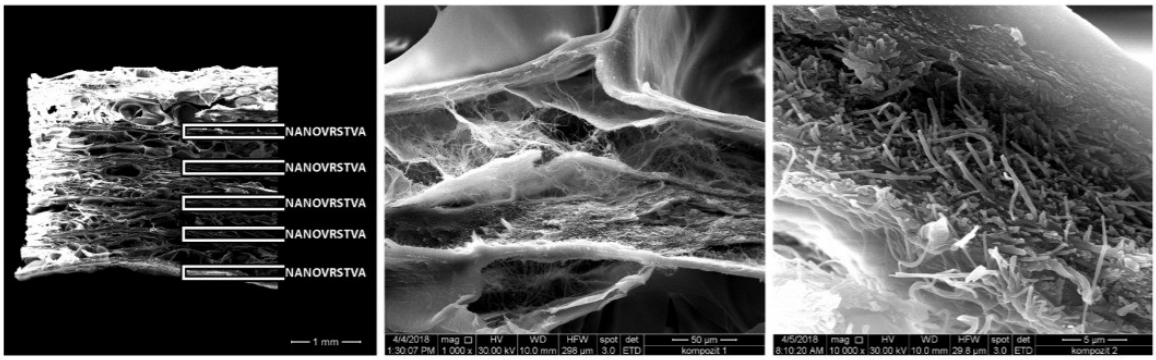
Obr. 1


VYSOCE PORÉZNÍ
OKRAJOVÁ VRSTVA
MÁLO PORÉZNÍ
JÁDRO
VYSOCE PORÉZNÍ
OKRAJOVÁ VRSTVA
2 mm
4/4/2019 mag HV WD HFW det 1 mm
10:35:11 AM 100 x 25.00 kV 12.0 mm 2.98 mm ETD Sendvic - detail
12/6/2019 mag HV WD HFW spot det 100 µm
12:02:58 PM 500 x 20.00 kV 9.7 mm 597 µm 3.0 ETD Sendvic - prechod

Obr. 2


0,12
0,1
0,08
0,06
0,04
0,02
0
SMLUVNÍ NAPĚTÍ [MPa]
PORÉZNÍ PĚNA 1%
TUHÉ JÁDRO 5%
SENDVIČOVÁ PĚNA
0
0,1
0,2
0,3
0,4
DEFORMACE [-]

Obr. 3


NANOVRSTVA
NANOVRSTVA
NANOVRSTVA
NANOVRSTVA
NANOVRSTVA
1 mm
50 µm
5 µm

Obr. 4