



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61C 13/09 (2021.05); A61L 27/34 (2021.05); A61L 27/50 (2021.05); A61L 27/58 (2021.05); B82B 3/00 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2017137016, 20.10.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
20.10.2017

Дата регистрации:
28.09.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
20.10.2016 CZ PV 2016-656

(43) Дата публикации заявки: 22.04.2019 Бюл. № 12

(45) Опубликовано: 28.09.2021 Бюл. № 28

Адрес для переписки:

119019, Москва, Гоголевский б-р, 11, этаж 3,
"Гоулинг ВЛГ (Интернэшнл) Инк.", Угрюмов
Владислав Михайлович

(72) Автор(ы):

СУХИ, Томаш (CZ),
СУПОВА, Моника (CZ),
ДЕНК, Франтишек (CZ),
РЫГЛОВА, Сарка (CZ),
ЗАЛОУДКОВА, Маргит (CZ),
СУХАРДА, Збынек (CZ),
БАЛЛАЙ, Растислав (CZ),
ГОРНЫ, Лукас (CZ),
ЦЕЙКА, Зденек (CZ),
ПОКОРНЫ, Марек (CZ),
КНОТКОВА, Катерина (CZ),
ВЕЛЕБНЫ, Владимир (CZ)

(73) Патентообладатель(и):

Устав структуры а механики горнин АВ ЧР,
в.в.и. (CZ),
Ческе высоке учени технике в Праге,
Факулта стройни (CZ),
ПроСпон, спол. с р.о. (CZ),
Контитро а.с. (CZ)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2015162559 A1, 29.10.2015. WO
2009049565 A2, 23.04.2009. WO 2009131638 A2,
29.10.2009. RU 2261116 C2, 27.09.2005. RU
2452517 C2, 10.06.2012. RU 2206341 C1,
20.06.2003. RU 2482880 C1, 27.05.2013. RU
2591087 C2, 10.07.2016.

(54) Нанокompозитный слой на основе коллагеновых нановолокон и способ его изготовления

(57) Реферат:

Изобретение имеет отношение к биологически активному нанокompозитному слою на основе коллагеновых нановолокон для нанесения на ортопедические и зубные имплантаты на основе металлов или металлических сплавов, ортопедическому или зубному имплантату на основе металла или металлических сплавов и способу изготовления указанного слоя. Биологически активный нанокompозитный слой

содержит нановолокна, имеющие средний диаметр 100-350 нм. Нановолокна содержат от 5 до 15 вес.% антибиотика, полиэтиленоксид в количестве не более 1 вес.% и коллаген типа I - остальное. Ортопедический или зубной имплантат содержит на по меньшей мере части его поверхности покрытие указанным нанокompозитным слоем. Способ изготовления слоя включает стадии: коллаген типа I и

полиэтиленоксид, имеющий средневязкостный молекулярный вес в диапазоне от 400'000 до 900'000, причем отношение полиэтиленоксида к коллагену составляет от 0,05 до 0,11, смешивают с фосфатным буфером для получения концентрации коллагена в смеси от 5 вес.% до 11 вес.%. Затем полученную смесь выдерживают в течение по меньшей мере 60 часов при температуре в диапазоне от 32°C до 42°C. Далее осуществляют гомогенизацию смеси путем перемешивания с одновременным добавлением этанола, с окончательным объемным отношением фосфатного буфера к этанолу от 1:1 до 1:2, после чего осуществляют электростатическое формование из смеси нанокompозитного слоя, который упрочняют путем погружения в раствор спирта в воде с концентрацией спирта 95 вес.% с добавлением гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N этилкарбодиимида и N-гидроксисукцинимид. Вес гидрохлорида N-(3-

диметиламинопропил)-N этилкарбодиимида на 1 г сформованного коллагена составляет по меньшей мере 0,625 г, и вес N-гидроксисукцинимид на 1 г сформованного коллагена составляет по меньшей мере 0,156 г. Количество раствора спирта в воде с содержанием спирта 95 вес.% составляет по меньшей мере 140 мл на 1 г сформованного коллагена. Затем слой промывают соляным раствором или фосфатным буфером и затем водой с последующим высушиванием. Далее слой пропитывают антибиотиком. Технический результат – получение нанокompозитного слоя, воспроизводящего состав и структуру реальной кости, насколько это возможно, то есть так что он содержит только коллаген и фосфат кальция/гидроксиапатит, что обеспечивает улучшение остеоиндуктивных свойств поверхностного слоя имплантата. 3 н. и 5 з.п. ф-лы, 5 ил., 3 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

A61C 13/09 (2006.01)*A61L 27/34* (2006.01)*A61L 27/50* (2006.01)*A61L 27/58* (2006.01)*B82B 3/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61C 13/09 (2021.05); *A61L 27/34* (2021.05); *A61L 27/50* (2021.05); *A61L 27/58* (2021.05); *B82B 3/00* (2021.05)

(21)(22) Application: **2017137016, 20.10.2017**

(24) Effective date for property rights:
20.10.2017

Registration date:
28.09.2021

Priority:

(30) Convention priority:
20.10.2016 CZ PV 2016-656

(43) Application published: **22.04.2019 Bull. № 12**(45) Date of publication: **28.09.2021 Bull. № 28**

Mail address:

**119019, Moskva, Gogolevskij b-r, 11, etazh 3,
"Gouling VLG (Interneshnl) Ink.", Ugryumov
Vladislav Mikhajlovich**

(72) Inventor(s):

**SUCHY, Tomas (CZ),
SUPOVA, Monika (CZ),
DENK, Frantisek (CZ),
RYGLOVA, Sarka (CZ),
ZALOUDKOVA, Margit (CZ),
SUCHARDA, Zbynek (CZ),
BALLAY, Rastislav (CZ),
HORNY, Lukas (CZ),
CEJKA, Zdenek (CZ),
POKORNY, Marek (CZ),
KNOTKOVA, Katerina (CZ),
VELEBNY, Vladimir (CZ)**

(73) Proprietor(s):

**Ustav struktury a mechaniky hornin AV CR,
v.v.i. (CZ),
Ceske vysoke uceni technicke v Praze, Fakulta
strojni (CZ),
ProSpon, spol. s r.o. (CZ),
Contipro a. s. (CZ)**

(54) **NANO-COMPOSITE LAYER BASED ON COLLAGEN NANO-FIBERS AND ITS PRODUCTION METHOD**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to a biologically active nano-composite layer based on collagen nano-fibers for application to orthopedic and dental implants based on metals or metal alloys, an orthopedic or dental implant based on metal or metal alloys and a method for producing the specified layer. The biologically active nano-composite layer contains nano-fibers with an average diameter of 100-350 nm. Nano-fibers contain from 5 to 15 wt.% of antibiotic, polyethylene oxide in the amount of no more than 1 wt.% and I type collagen for the rest. The orthopedic or dental implant contains coating with the specified nano-composite layer on at least part of its surface. The method for producing the layer includes following stages: I type collagen and polyethylene oxide medium-viscosity molecular weight

in the range from 400'000 to 900'000, wherein the ratio of polyethylene oxide to collagen is from 0.05 to 0.11, are mixed with phosphate buffer to obtain a collagen concentration in a mixture from 5 wt.% to 11 wt.%. Then, the obtained mixture is held for at least 60 hours at a temperature in the range from 32°C to 42°C. Next, homogenization of the mixture is carried out by mixing with simultaneous addition of ethanol with final volume ratio of phosphate buffer to ethanol from 1:1 to 1:2, after which electrostatic molding is carried out from the mixture of the nano-composite layer, which is hardened by means of immersion in an alcohol solution in water with an alcohol concentration of 95 wt.% with the addition of hydrochloride of N-(3-dimethylaminopropyl)-N ethylcarbodiimide and N-hydroxysuccinimide. The weight of hydrochloride of

N-(3-dimethylaminopropyl)-N ethylcarbodiimide per 1 g of molded collagen is at least 0.625 g, and the weight of N-hydroxysuccinimide per 1 g of molded collagen is at least 0.156 g. The amount of the alcohol solution in water with an alcohol content of 95 wt.% is at least 140 ml per 1 g of molded collagen. Then, the layer is washed with a saline solution or phosphate buffer and then with water with the following drying.

Next, the layer is impregnated with antibiotic.

EFFECT: obtaining the nano-composite layer reproducing the content and structure of a real bone as much as possible, so that it contains only collagen and calcium phosphate/hydroxyapatite, which provides for an improvement of osteo-inductive properties of an implant surface layer.

8 cl, 5 dwg, 3 ex

R U 2 7 5 6 1 6 4 C 2

R U 2 7 5 6 1 6 4 C 2

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к ортопедическим и зубным имплантатам на основе металлов или металлических сплавов, покрытым слоем биологически активного коллагена типа I и гидроксиапатита, отличающимся эффективным высвобождением антибиотиков. Биологически активный слой, содержащий структуры с размерами в субмикронном и наномикронном диапазоне, представляет собой биологически разлагаемый, биологически совместимый и/или биологически рассасывающийся материал. Такой слой получают путем электростатического формования (прядения) и раздува волокон из раствора коллагена, содержащего наночастицы гидроксиапатита. Основным объектом настоящего изобретения является способ осаждения антибиотиков для достижения более эффективного их высвобождения без повышения цитотоксичности. Этот способ включает пропитку антибиотиками, используемыми в форме растворов, слоев сшитого стерилизованного коллагена с гидроксиапатитом.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Принимая во внимание серьезные опасности для здоровья и высокие затраты, связанные с переделками установленных имплантатов, в частности имплантатов крупных суставов, повышение срока их службы путем расширения функциональных возможностей их поверхности представляется очень перспективным и насущным направлением развития в области медицинских технологий. Учитывая то, что за последнее десятилетие количество хирургических операций по протезированию значительно выросло, внедрение современных типов имплантатов с биологически активной поверхностью, модифицированной с использованием нанотехнологий, благодаря их повышенной прочности и улучшенному врастанию в костные ткани (остеоинтеграции), может привести как к повышению удобства пациентов, так и к существенному снижению расходов на лечение. Металлические имплантаты на основе титана, титановых сплавов, нержавеющей стали и сплавов кобальта, которые до последнего времени использовались чаще всего, являются биологически совместимыми, но они биологически инертны. Такие имплантаты также часто подвергаются в среде организма различным формам коррозии. Остеоинтеграция биологически инертных металлических имплантатов сложна, и их поверхность должна в дальнейшем модифицироваться для обеспечения необходимой фиксации в кости. Для обеспечения фиксации должна быть произведена физическая и химическая или морфологическая модификация поверхности эндопротеза. В наши дни для химической модификации металлических имплантатов используются биологически активные фосфаты кальция, обычно гидроксиапатит или трикальцийфосфат. Эти биокерамические материалы демонстрируют великолепные свойства вместе с костью благодаря химической активности их поверхности, в результате которой формируется контактный минерализованный слой между имплантатом и костной тканью. Этот промежуточный слой обеспечивает физическое, химическое и механическое сцепление между имплантатом и костью. Однако использование этих материалов в их исходной форме ограничивается их механическими характеристиками или сцеплением с поверхностью имплантата. Высокое содержание гидроксиапатита повышает хрупкость, что, в свою очередь, может приводить к снижению механической прочности и ухудшения сцепления с опорной поверхностью. Другой подход может включать покрытие поверхности слоем полимер на основе синтетических полимеров, таких как алифатические полиэфиры и их сополимеры. Улучшение биологической активности поверхности может быть достигнуто путем покрытия природными полимерами (коллаген, желатин). Если эти природные полимеры в форме нановолокон дополнены фосфатом кальция в форме наночастиц,

поверхность с наномикронными размерами составляющих ее структур идеальна для обеспечения подходящего сцепления, и достигается быстрое разрастание костных клеток. Другое достоинство этих композитных материалов заключается в возможности выбора определенных компонентов в соответствии с их составом и ориентацией, материалом, физическими и химическими характеристиками, которые могут обеспечить широкий спектр механических и биологических свойств.

В то же время слои этих биологически активных материалов могут служить в качестве местных носителей антибиотиков в связи с их постепенным высвобождением для предотвращения остеомиелита. Местное применение антибиотиков более предпочтительно, поскольку в этом случае обеспечиваются повышенные дозы, и, кроме того, достоинствами являются более короткий путь доставки и минимальные флуктуации уровней антибиотиков в кровотоке. Таким образом, антибиотики действуют также в аваскулярных зонах без повышения общей токсичности. Кроме того, антибиотик может воздействовать как на остаточные планктонные микроорганизмы, так и на сидячие формы в биопленке. Местные носители антибиотиков также заполняют "мертвую зону", возникающую после удаления отмирающих тканей инфицированной кости.

Что касается неразрушаемых биологически матриц, которые могут использоваться в качестве носителей антибиотиков, то наиболее распространенным материалом является полиметилметакрилат (часто используется в качестве костного цемента). Его недостатком является неконтролируемое, или даже слишком быстрое, высвобождение высоких концентраций антибиотиков и необходимость еще одной хирургической операции по окончании лечения (лечение проводится в два этапа: заживление, завершающая имплантация). Поэтому в настоящее время ведутся исследования биологически разлагаемых систем, для которых отпадает необходимость в дополнительной хирургической операции. Эти системы также обеспечивают возможность регулируемого высвобождения лекарственного средства за счет физической и химической конфигурации матрицы/носителей и лекарственных средств. Такие системы могли бы обеспечивать антибиотики в концентрациях, превышающих минимальные концентрации подавления роста (ингибирования) для большей части известных патогенных микроорганизмов без негативных побочных действий. Наиболее часто используются такие антибиотики, как гентамицин, ванкомицин, тобрамицин и их комбинации.

Регулируемая скорость высвобождения зависит от проницаемости, химической модификации матрицы/носителя, толщины слоя, степени сшивания матрицы/носителя, физических и химических свойств лекарственного средства, взаимодействия между полимерной матрицей, связанным лекарственным средством и растворяющей средой, а также от взаимного расположения компонентов. Высвобождение антибиотиков в лабораторных условиях обычно непрерывно контролируется с использованием УФ-спектрометрии или высокоэффективной жидкостной хроматографии. Биологические испытания, проводимые в лаборатории на остеобластах или на мезенхимальных стволовых клетках, не только характеризуют цитотоксичность самого материала, но также дают возможность непосредственной оценки ингибирующего потенциала концентрации высвобожденного антибиотика или влияния используемых способов получения (например, сшивания коллагена) на биологическую совместимость исследуемого материала. Испытания, проводимые для получения характеристик практической антибактериальной активности, часто выполнялись на трех видах микроорганизмов, таких как грамположительные стафилококки, грамотрицательные псевдомонады и *E. coli*.

Антибиотики могут быть введены с использованием различных способов. Основной способ представляет собой простое перемешивание полимера и антибиотика в форме порошка или раствора. Недостатком этого способа является использование органических растворителей. Другим традиционным способом является выдерживание полимера в растворе, содержащем антибиотики. Нановолоконные слои, насыщенные антибиотиками, часто получают путем непосредственного формования из раствора полимера, содержащего необходимое лекарственное средство. Несмотря на то, что условия, создаваемые при электростатическом формовании, очень важны для стабильности антибиотиков, они не принимаются во внимание. Некоторые антибиотики, такие как ванкомицин, чувствительны к температуре, и было установлено, что в течение нескольких часов они преобразуются в растворе в неактивные формы уже при комнатной температуре. Эти неактивные формы не обнаруживаются обычными средствами. Традиционно используемая УФ/ВИД-спектрометрия неспособна обнаружить эти неактивные формы, и поэтому анализы должны выполняться с использованием жидкостной хроматографии. Коллагеновые нанослои должны быть сшиты после электростатического формования. При выполнении этой процедуры их промывают, и нановолоконный носитель становится менее эффективным, что, в конечном счете, снижает экономическую эффективность всего процесса.

Цель настоящего изобретения заключается, среди прочего, в получении нанокompозитного слоя, воспроизводящего состав и структуру реальной кости, насколько это возможно, то есть, так что он содержит только коллаген и фосфат кальция/гидроксиапатит, что обеспечивает улучшение остеоиндуктивных свойств поверхностного слоя имплантата. Таким образом, присутствие любых дополнительных компонентов (кроме антибиотиков), включая полиэтиленоксид, нежелательно. Использование полиэтиленоксида предпочтительно для обеспечения эффективного процесса электростатического формования, однако благодаря достаточному, почти полному вымыванию полиэтиленоксида обеспечивается оптимальный состав вышеописанного слоя.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Недостатки известных технических решений в значительной степени устраняются предлагаемым в настоящем изобретении биологически активным нанокompозитным слоем на основе коллагеновых нановолокон для нанесения на ортопедические и зубные имплантаты, причем слой содержит нановолокна, имеющие средний диаметр 100-350 нм и содержащие коллаген типа I в количестве от 75 вес.% до 100 вес.%, предпочтительно от 85 вес.% до 100 вес.%, и нановолокна содержат полиэтиленоксид в количестве не более 1 вес.%. Целью является нулевое содержание полиэтиленоксида, однако наверно он всегда будет присутствовать в ничтожно малых количествах. Поэтому выражение "полиэтиленоксид в количестве не более 1 вес.%" относится к содержанию полиэтиленоксида в диапазоне от 0 вес.% до 1 вес.%.

Предпочтительно нанокompозитный слой содержит антибиотик в количестве от 5 вес.% до 15 вес.%, предпочтительно от 7 вес.% до 12 вес.%, предпочтительно от 9 вес.% до 11 вес.%, причем антибиотик выбирают из группы, состоящей из ванкомицина, гентамицина, тобрамицина и их комбинаций.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом нанокompозитный слой содержит также гидроксиапатит в количестве от 5 вес.% до 15 вес.% в форме наночастиц с размерами 25-250 нм.

Недостатки известных технических решений в значительной степени устраняются предлагаемым в настоящем изобретении ортопедическим или зубным имплантатом на

основе металла или металлических сплавов, по меньшей мере частично покрытым вышеописанным биологически активным нанокompозитным слоем, и такой имплантат предлагается для использования в медицине для людей или животных.

В изобретении также предлагаются ортопедические и зубные имплантаты на основе металлов или металлических сплавов, покрытые биологически активным композитным слоем на основе коллагеновых нановолокон с внедренными в них наночастицами гидроксиапатита и антибиотиком или комбинацией антибиотиков.

Нанокompозитный слой по настоящему изобретению получают, используя следующий способ: коллаген типа I и полиэтиленоксид, имеющий средневязкостный молекулярный вес в диапазоне от 400'000 до 900'000, причем отношение полиэтиленоксида к коллагену составляет от 0,05 до 0,11, смешивают с фосфатным буфером для получения концентрации коллагена в смеси от 5 вес.% до 11 вес.%, затем полученную смесь выдерживают в течение по меньшей мере 60 часов при температуре в диапазоне от 32°C до 42°C, затем осуществляют ее гомогенизацию путем перемешивания с одновременным добавлением этанола, с окончательным объемным отношением фосфатного буфера к этанолу от 1:1 до 1:2, после чего осуществляют электростатическое формование из смеси нанокompозитного слоя, с последующим промыванием соляным раствором или фосфатным буфером и затем водой с последующим высушиванием.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Изобретение описывается далее более подробно с использованием примеров и чертежей, причем на чертежах показано:

Фигура 1 - графики концентрации активной формы ванкомицина (медиана, вероятное отклонение), высвобожденного из материалов, содержащих 0 вес.% (фиг. 1a), 5 вес.% (фигура 1b) и 15 вес.% (фигура 1c) гидроксиапатита (ГА), приготовленных тремя различными способами.

Фигура 2 - размеры зон ингибирования для материалов, приготовленных с помощью определенных способов с использованием MSRA. * относится к статистически значительным различиям (критерий Манна-Уитни, $p=0,05$).

Фигура 3 - диаграммы активной формы ванкомицина из материалов, приготовленных путем пропитки в среде плазмы крови (медиана, вероятное отклонение). * относится к статистически значительным различиям (критерий Манна-Уитни, $p=0,05$).

Фигура 4 - диаграммы размеров зон ингибирования для материалов, приготовленных пропиткой, для разных концентраций гидроксиапатита и положительного контроля (диски EUCAST). * относится к статистически значительным различиям (среднее, среднеквадратическое отклонение, критерий Манна-Уитни, $p=0,05$) по сравнению с положительным контролем.

Фигура 5 - флюоресцентные изображения остеобластов, культивируемых в течение 2 и 8 дней на пропитанных слоях, и слои перед пропиткой (N0, N5 и N15).

ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ниже описываются варианты осуществления изобретения, в которых нанослой получают с помощью электростатического формования волокон из коллагена типа I, дополнительно с добавлением гидроксиапатита с размерами частиц 50-250 нм и с добавлением полиэтиленоксида в количестве от 5 вес.% до 11 вес.%, предпочтительно 8 вес.% раствора в фосфатном буфере (0,01 М моносодийфосфата, 0,0027 М хлорида калия и 0,137 М хлорида натрия, $pH=7,4$ при температуре 25°C), и с последующим добавлением этанола в отношении 1:1 (до 1:2) к объему фосфатного буфера. Слой и способ его изготовления разработаны для формирования слоя коллагена со средним диаметром волокон 100-350 нм и дополнительно содержащего равномерно

распределенные наночастицы гидроксиапатита. Слой может быть электростатически нанесен непосредственно на поверхность металлического имплантата.

Процесс изготовления содержит следующие стадии: навеску лиофилизированного коллагена и полиэтиленоксида с молекулярным весом в диапазоне 400'000-900'000 смешивают с фосфатным буфером. Соотношение весов полиэтиленоксида и коллагена находится в диапазоне от 0,05 до 0,11, предпочтительное соотношение - 0,08. Подготовленную смесь выдерживают при температуре в диапазоне 32-42°C, предпочтительно при температуре 37°C, по меньшей мере в течение 60 часов, предпочтительно по меньшей мере в течение 72 часов. Следующая стадия представляет собой гомогенизацию с высокой скоростью вращения в диапазоне 7000-15000 об/мин с добавлением гидроксиапатита и этанола. Полученную дисперсию формуют (прядут) с помощью электростатического поля напряженностью в диапазоне 200-300 кВ/м, причем дисперсия подается с расходом 100-200 мкл/мин в условиях относительной влажности, не превышающей 30%, и температуры, не превышающей 37°C. Процесс электростатического формования предпочтительно дополняется раздувом в электростатическом поле или раздувом потоком воздуха, предпочтительно нагретым до температуры 20-25°C, с расходом, например, 15-50 л/мин. Поток воздуха направляется в зону, окружающую выпускное отверстие сопла, и улучшает процесс формирования волокон из вышеуказанного раствора. Прочность слоя после электростатического формования повышают путем его погружения в 95% раствор спирта (например, этанола) в воде с гидрохлоридом N-(3-диметиламинопропил)-М этилкарбодиимидом (EDC) и N-гидроксисукцинимидом (NHS) при температуре 32-42°C, предпочтительно при температуре 37°C, на 18-30 часов, предпочтительно примерно на 24 часа, и течение этого времени происходит образование поперечных связей (сшивание). При этом по меньшей мере 0,625 г EDC и 0,156 г NHS (то есть, весовое отношение EDC к NHS составляет 4:1) смешивают по меньшей мере со 140 мл 95% спирта на 1 г коллагена. После сшивания слой промывают в соляном растворе или в фосфатном буфере по меньшей мере в течение 2х30 минут и затем промывают дистиллированной водой по меньшей мере в течение 30 минут. В процессе сшивания и промывки слоя полиэтиленоксид вымывается практически полностью. Затем осуществляют сублимационную сушку слоя. Слой, получаемый вышеописанным способом, содержит коллаген в количестве 85-100 вес.% и гидроксиапатит в количестве 0-15 вес.%. Для стерилизации слоя может использоваться стерилизация этиленоксидом или стандартная стерилизация гамма-лучами. Достоинством электростатического формования волокон из дисперсии коллагена и гидроксиапатита является достижение однородности слоя по всему его объему за счет комбинации характеристик раствора и характеристик процесса формования.

Предпочтительно также вводят антибиотики. Антибиотики вводят в слой с использованием пропитки в дисперсии этанола или воды или соляного раствора, причем концентрация антибиотиков находится в диапазоне от 10 вес.% до 50 вес.%. Пропитка может осуществляться либо путем погружения имплантата с нанесенным слоем в дисперсию, либо нанесением дисперсии на слой с помощью кисти, либо с использованием распыления дисперсии. После нанесения дисперсии слой выдерживают при комнатной температуре до полного испарения растворителя. Подходящие антибиотики включают, например, гентамицин, ванкомицин, тобрамицин или их комбинации, такие как ванкомицин и гентамицин в различных весовых отношениях. Эффективность пропитки показана ниже на примере ванкомицина.

Пропитка слоев (EI0, EI5 и EI15) была выбрана в качестве оптимального способа

введения антибиотика по сравнению с двумя другими способами изготовления слоев: лиофилизация коллагеновой дисперсии, содержащей гидроксиапатит в количестве 0 вес.%, 5 вес.% и 15 вес.% и ванкомицин в количестве 10 вес.% (L0, L5 и L15), и электростатическое прядение коллагеновой дисперсии, содержащей гидроксиапатит в количестве 0 вес.%, 5 вес.% и 10 вес.% и ванкомицин в количестве 10 вес.% (E0, E5 и E15). Влияние конкретных способов изготовления слоев и их структурных свойств на кинетику высвобождения ванкомицина определялось средствами высокоэффективной жидкостной хроматографии, и полученные результаты приведены на фигуре 1.

Максимальная концентрация ванкомицина, высвобождаемого из материала, полученного с помощью лиофилизации, а именно примерно 250 мг/л, была достигнута на восьмой день. Материал, полученный с помощью электростатического прядения, показал максимальную величину, а именно примерно 60 мг/л, через 24 часа, в то время как материал, полученный с использованием пропитки, показал максимальную величину, а именно примерно 700 мг/л, через 3 часа. Концентрация высвобождаемой активной формы ванкомицина превышала минимальную концентрацию ингибирования (16 мг/л) в 17 раз для лиофилизированного материала, в 4 раза для материала, полученного с помощью электростатического прядения, и в 44 раза для материала, полученного с использованием пропитки. Все указанные материалы обеспечивают поддержание концентрации ингибирования активной формы ванкомицина выше минимальной концентрации ингибирования в течение 21 дня. Результаты испытаний аналогичного материала, приведенные в публикациях (Wachol-Drevek, 1996 и Tu и др., 2012), показывают, что 90% ванкомицина было высвобождено через 24 часа, и полное время высвобождения достигало 4 дней. Материал, полученный с использованием пропитки, показал наивысшую эффективность, которая была также подтверждена предварительными испытаниями на антимикробную чувствительность (фигура 2).

Материал, получаемый с использованием пропитки, также исследовался на высвобождение ванкомицина в плазме крови. Как это очевидно из фигуры 3, материал еще способен высвобождать даже через 30 дней примерно 62 мг/л активной формы ванкомицина, что превышает минимальную концентрацию ингибирования почти в 4 раза. Эффект концентрации гидроксиапатита не очевиден.

Этот материал также испытывался на антимикробную чувствительность в отношении четырех видов микробов. Размеры зон ингибирования конкретных видов микробов приведены на фигуре 4. Все испытуемые материалы показали антимикробную активность как в отношении штаммов *Staphylococci*, так и в отношении штаммов, устойчивых к гентамицину. Размеры зон ингибирования были сравнимы с положительным контролем (стандартные диски, EUCAST). Отрицательный контроль (образцы без ванкомицина) показал нулевую зону ингибирования (на диаграмме не показано).

Слои, получаемые с использованием пропитки, исследовались на цитотоксичность и цитосовместимость в лабораторных условиях с использованием костных клеток (SAOS-2, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Germany). Клетки выращивались как в бульоне, так и непосредственно на слоях, и оценивалась их метаболическая активность (тест MTS), а их адгезия и разрастание оценивались с помощью микроскопа. Испытания показали, что высвобождаемые количества антибиотиков не токсичны, и слои цитосовместимы. На фигуре 5 приведены иллюстративные изображения флюоресцентно подкрашенных клеток через два дня и восемь дней выращивания на слоях с ванкомицином, без ванкомицина (N0, N5 и N15) и на положительном контроле (PS).

ПРИМЕР 1

Нанослой был изготовлен путем электростатического формирования волокон из коллагена типа I, содержащегося в количестве 8 вес.% в фосфатном буфере, с последующим добавлением этанола (в объемном отношении 1:1), к которому был добавлен полиэтиленоксид в весовом отношении полиэтиленоксида к коллагену, равном 0,08. Средний диаметр коллагеновых волокон был равен примерно 220 нм. Слой был электростатически нанесен непосредственно на поверхность металлического имплантата. Процесс изготовления содержал следующие стадии: навеску лиофилизированного коллагена и полиэтиленоксид с молекулярным весом 900'000 смешивали с фосфатным буфером. Приготовленную смесь выдерживали в течение 72 часов при температуре 37°C. На следующей стадии осуществляли гомогенизацию смеси на высокой скорости вращения, равной 10000 об/мин, с одновременным добавлением этанола. Из полученной дисперсии получали волокна способом электростатического формирования в электростатическом поле напряженностью 250 кВ/м при расходе дисперсии 130 мкл/мин, в условиях относительной влажности воздуха 25% и температуры 30°C. Процесс формирования сопровождался электростатическим раздувом или подачей потока подогретого воздуха при температуре 24°C с расходом 35 л/мин. Прочность слоя после электростатического формирования повышали погружением в раствор этанола в количестве 95 вес.% с водой и EDC и NHS на 24 часа при температуре 37°C. На 1 г коллагена пришлось по меньшей мере 0,625 г EDC и 0,156 г NHS, смешанных со 140 мл 95% спирта. После сшивания слой промывали в течение 2×30 минут 0,1 М раствором Na_2HPO_4 и наконец в течение 30 минут промывали дистиллированной водой. В процессе сшивания и промывки слоя полиэтиленоксид вымывался практически полностью. Затем осуществляли сублимационную сушку слоя. Слой, полученный таким способом, содержал коллаген в количестве 100 вес.%. Для стерилизации слоя использовали этиленоксид. Затем в слой вводили антибиотик путем пропитки в этаноловой дисперсии, содержание антибиотика в которой составляло 20 вес.%. В качестве антибиотика использовался ванкомицин. Пропитку осуществляли путем нанесения антибиотика кистью на нанесенный слой, так чтобы получить окончательную концентрацию антибиотика в слое (после испарения растворителя) порядка 8 вес.% от общего веса слоя. После нанесения дисперсии слой выдерживали при комнатной температуре до полного испарения растворителя.

ПРИМЕР 2

Нанослой был изготовлен путем электростатического прядения волокон из коллагена типа I, содержащегося в количестве 10 вес.% в фосфатном буфере, с последующим добавлением этанола (в объемном отношении 1:1), к которому был добавлен полиэтиленоксид в весовом отношении полиэтиленоксида к коллагену, равном 0,10. Средний диаметр коллагеновых волокон составил примерно 180 нм, и они содержали распределенные в них наночастицы гидроксиапатита, которые составляли фракцию 170 нм. Слой был электростатически нанесен непосредственно на поверхность металлического имплантата. Процесс изготовления содержал следующие стадии: навеску лиофилизированного коллагена и полиэтиленоксид с молекулярным весом 800'000 смешивали с фосфатным буфером. Приготовленную смесь выдерживали в течение 88 часов при температуре 35°C. На следующей стадии осуществляли гомогенизацию смеси на высокой скорости вращения порядка 12000 об/мин с добавлением этанола и гидроксиапатита с весовым отношением гидроксиапатита к коллагену 5:95. Из полученной дисперсии получали волокна способом электростатического формирования в электростатическом поле напряженностью 280 кВ/м при расходе дисперсии 140 мкл/мин, в условиях относительной влажности воздуха 25% и температуры 27°C. Процесс

формования сопровождался электростатическим раздувом или подачей потока подогретого воздуха при температуре 22°C и с расходом 40 л/мин. Прочность слоя после электростатического формования улучшали погружением в раствор этанола в количестве 95 вес.% и EDC и NHS на 24 часа при температуре 37°C. На 1 г коллагена пришлось по меньшей мере 0,800 г EDC и 0,200 г NHS, смешанных с 200 мл 95% спирта. После сшивания слой промывали в течение 2×40 минут 0,1 М раствором Na_2HPO_4 и наконец в течение 30 минут промывали дистиллированной водой. В процессе сшивания и промывки слоя полиэтиленоксид вымывался практически полностью. Затем осуществляли сублимационную сушку слоя. Слой, получаемый вышеописанным способом, содержал коллаген в количестве 95 вес.% и гидроксиапатит в количестве 5 вес.%. Для стерилизации слоя использовали этиленоксид. Затем в слой вводили антибиотик путем пропитки в водной дисперсии, содержание антибиотика в которой составляло 30 вес.%. В качестве антибиотика использовался гентамицин. Пропитку осуществляли путем нанесения дисперсии, содержащей антибиотик, кистью на нанесенный слой, так чтобы получить окончательную концентрацию антибиотика в слое (после испарения растворителя) порядка 10 вес.% от общего веса слоя. После нанесения дисперсии слой выдерживали при комнатной температуре до полного испарения растворителя.

ПРИМЕР 3

Нанослой был изготовлен путем электростатического прядения волокон из коллагена типа I, содержащегося в количестве 8 вес.% в фосфатном буфере и этаноле (в объемном отношении 1:1), к которому был добавлен полиэтиленоксид в весовом отношении полиэтиленоксида к коллагену, равном 0,08. Средний диаметр коллагеновых волокон составил примерно 310 нм, и они содержали равномерно распределенные наночастицы гидроксиапатита, которые составляли фракцию 190 нм. Слой был электростатически нанесен непосредственно на поверхность металлического имплантата. Процесс изготовления содержал следующие стадии: навеску лиофилизированного коллагена и полиэтиленоксид с молекулярным весом 700'000 смешивали с фосфатным буфером. Приготовленную смесь выдерживали в течение 92 часов при температуре 40°C. На следующей стадии осуществляли гомогенизацию смеси на высокой скорости вращения порядка 15'000 об/мин, и в процессе гомогенизации добавляли гидроксиапатит в весовом отношении к коллагену, равном 15:85, и этанол. Из полученной дисперсии получали волокна способом электростатического формования в электростатическом поле напряженностью 270 кВ/м при расходе дисперсии 150 мкл/мин, в условиях относительной влажности воздуха 26% и температуры 25°C. Процесс формования сопровождался электростатическим раздувом или подачей потока подогретого воздуха при температуре 24°C с расходом 45 л/мин. Прочность слоя после электростатического формования повышали погружением в раствор спирта в количестве 95 вес.% с водой и EDC и NHS на 24 часа при температуре 37°C. На 1 г сформованного коллагена пришлось по меньшей мере 0,920 г EDC и 0,230 г NHS, смешанных по меньшей мере с 250 мл 95% спирта. После сшивания слой промывали в течение 2×35 минут 0,1 М раствором Na_2HPO_4 и наконец в течение 40 минут промывали дистиллированной водой. В процессе сшивания и промывки слоя полиэтиленоксид вымывался практически полностью. Затем осуществляли сублимационную сушку слоя. Слой, получаемый вышеописанным способом, содержал коллаген в количестве 85 вес.% и гидроксиапатит в количестве 15 вес.%. Для стерилизации слоя использовали этиленоксид. Затем в слой вводили антибиотик путем пропитки в спиртовой дисперсии, содержание антибиотика в которой составляло 30 вес.%. В качестве антибиотика использовалась смесь гентамицина с

ванкомицином в весовом отношении 1:1. Пропитку осуществляли путем распыления дисперсии. После нанесения дисперсии слой выдерживали при комнатной температуре до полного испарения растворителя. Пропитку осуществляли путем нанесения кистью дисперсии, содержащей антибиотик, на нанесенный слой, так чтобы получить
 5 окончательную концентрацию антибиотика в слое (после испарения растворителя) порядка 11 вес.% от общего веса слоя.

Хотя здесь были описаны некоторые предпочтительные варианты осуществления изобретения, следует понимать, что специалист в данной области техники легко сможет предложить и другие возможные альтернативные варианты. Таким образом, объем
 10 настоящего изобретения не ограничивается этими предпочтительными вариантами, а определяется прилагаемой формулой.

Промышленная применимость

Ортопедические и зубные имплантаты на основе металлов или металлических сплавов, покрытые биологически активным слоем коллагена типа I, также дополнительно
 15 содержащим гидроксиапатит и введенный антибиотик, полученные в соответствии с настоящим изобретением, могут использоваться в медицине для людей и животных, особенно в протезировании и стоматологии.

(57) Формула изобретения

1. Биологически активный нанокompозитный слой на основе коллагеновых
 20 нановолокон для нанесения на ортопедические и зубные имплантаты на основе металлов или металлических сплавов, причем слой содержит нановолокна, имеющие средний диаметр 100-350 нм, отличающийся тем, что нановолокна содержат от 5 до 15 вес. % антибиотика, полиэтиленоксид в количестве не более 1 вес.% и коллаген типа I -
 25 остальное.

2. Нанокompозитный слой по п. 1, отличающийся тем, антибиотик выбран из группы, состоящей из ванкомицина, гентамицина, тобрамицина и их комбинаций.

3. Нанокompозитный слой по п. 1 или 2, отличающийся тем, что нановолокна содержат также гидроксиапатит в количестве 5-15 вес.% в форме наночастиц размерами
 30 50-250 нм.

4. Ортопедический или зубной имплантат на основе металла или металлических сплавов, отличающийся тем, что по меньшей мере часть его поверхности покрыта нанокompозитным слоем по любому из предыдущих пунктов.

5. Способ изготовления слоя по п. 1, отличающийся тем, что коллаген типа I и
 35 полиэтиленоксид, имеющий средневязкостный молекулярный вес в диапазоне от 400'000 до 900'000, причем отношение полиэтиленоксида к коллагену составляет от 0,05 до 0,11, смешивают с фосфатным буфером для получения концентрации коллагена в смеси от 5 вес.% до 11 вес.%, затем полученную смесь выдерживают в течение по меньшей мере 60 часов при температуре в диапазоне от 32°C до 42°C, затем осуществляют ее
 40 гомогенизацию путем перемешивания с одновременным добавлением этанола, с окончательным объемным отношением фосфатного буфера к этанолу от 1:1 до 1:2, после чего осуществляют электростатическое формование из смеси нанокompозитного слоя, который упрочняют путем погружения в раствор спирта в воде с концентрацией спирта 95 вес.% с добавлением гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N-
 45 этилкарбодиимида и N-гидроксисукцинимиды, причем вес гидрохлорида N-(3-диметиламинопропил)-N-этилкарбодиимида на 1 г сформованного коллагена составляет по меньшей мере 0,625 г, и вес N-гидроксисукцинимиды на 1 г сформованного коллагена составляет по меньшей мере 0,156 г, и количество раствора спирта в воде с содержанием

спирта 95 вес.% составляет по меньшей мере 140 мл на 1 г сформованного коллагена, затем слой промывают соляным раствором или фосфатным буфером и затем водой с последующим высушиванием, и затем слой пропитывают антибиотиком.

5 6. Способ изготовления по п. 5, отличающийся тем, что в процессе гомогенизации в раствор добавляют гидроксиапатит в количестве от 5 вес.% до 15 вес.% от веса коллагена.

7. Способ изготовления по п. 5, отличающийся тем, что антибиотик выбран из группы, состоящей из ванкомицина, гентамицина, тобрамицина или их смеси.

10 8. Способ изготовления по любому из пп. 5-7, отличающийся тем, что пропитку выполняют путем погружения слоя в дисперсию, или осаждения дисперсии на слой или распыления дисперсии на слой, причем дисперсия представляет собой дисперсию антибиотиков в спирте, воде или в смеси спирта и воды.

15

20

25

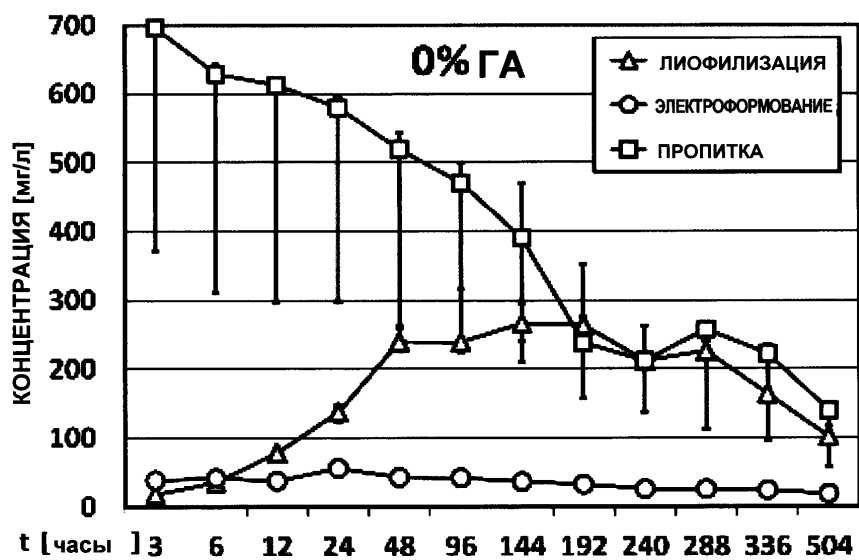
30

35

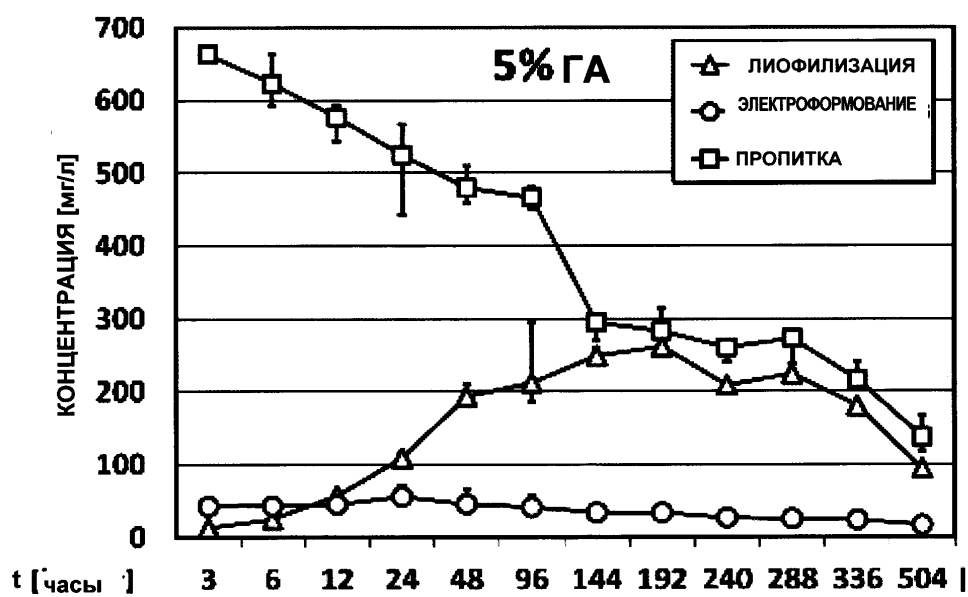
40

45

1

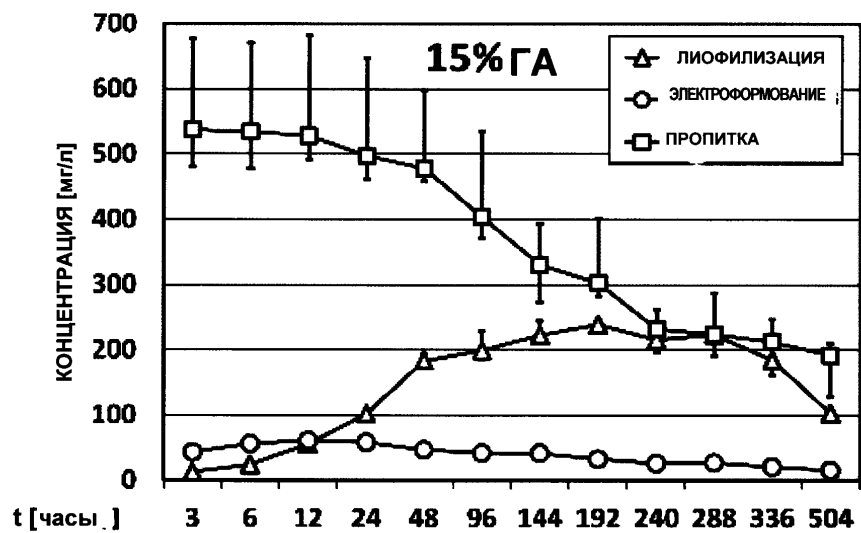


Фиг. 1а

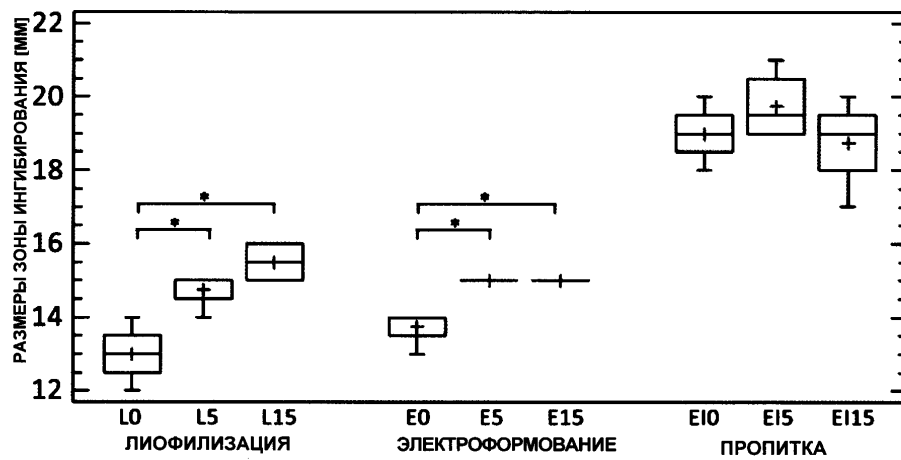


Фиг. 1б

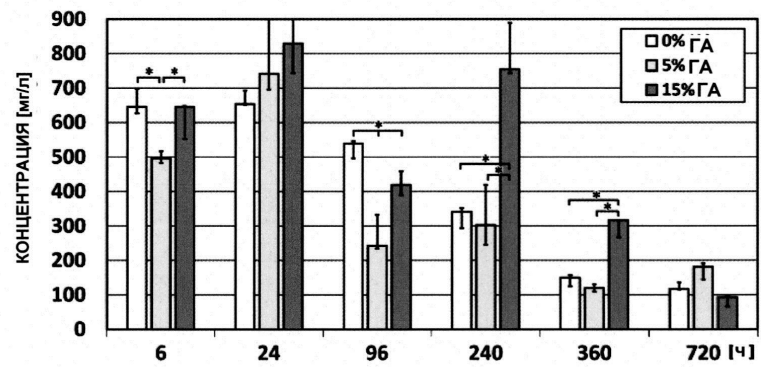
2



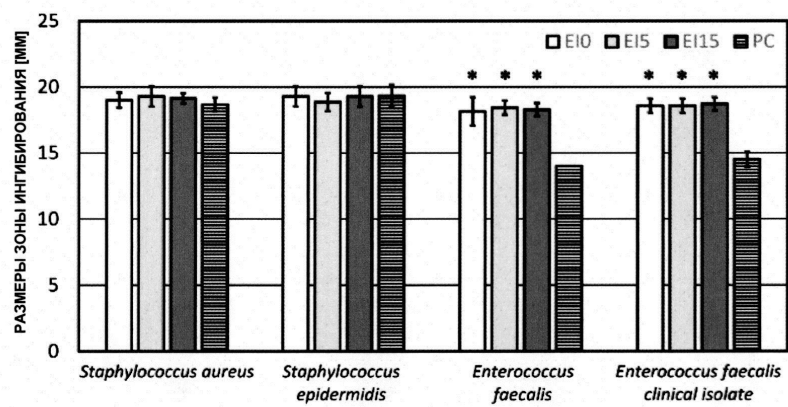
Фиг. 1с



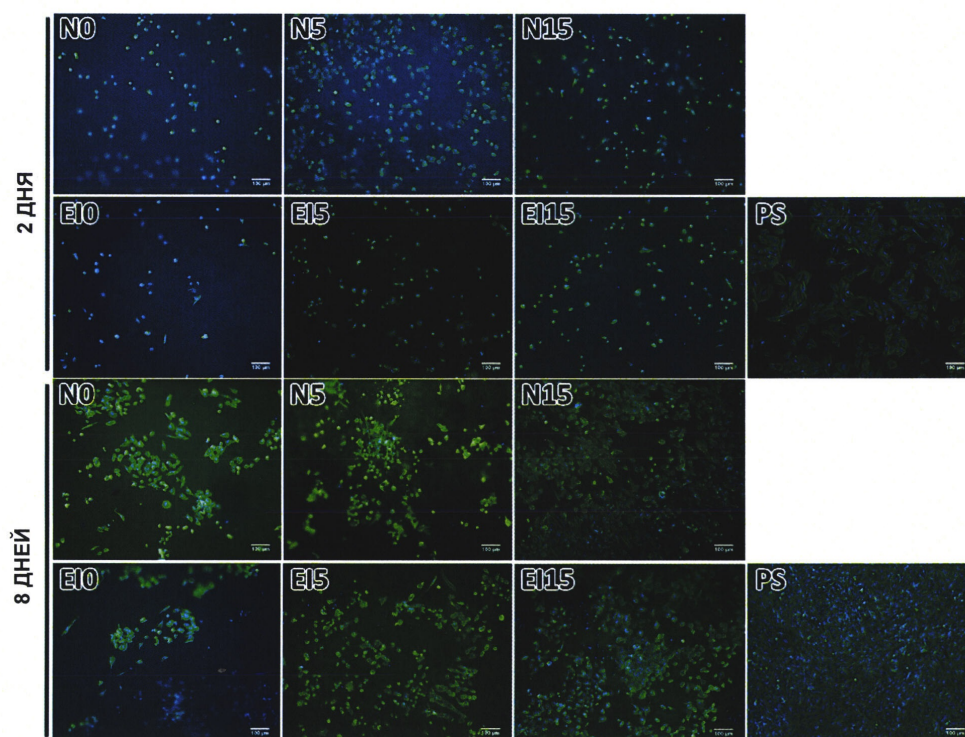
Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5