

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

308 118

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

B82B 1/00 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
A61K 9/70 (2006.01)
A61L 15/64 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2013-126**
(22) Přihlášeno: **20.02.2013**
(40) Zveřejněno: **01.10.2014**
(Věstník č. 40/2014)
(47) Uděleno: **27.11.2019**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **08.01.2020**
(Věstník č. 2/2020)

(56) Relevantní dokumenty:
CZ 302008; US 4579731.

- (73) Majitel patentu:
Technická univerzita v Liberci, Liberec 1, CZ
- (72) Původce:
prof. Ing. Petr Louda, CSc., Dlouhý Most, CZ
Ing. Zbigniew Rożek, Ph.D., 93-361 Łódź, PL
Ing. Mateusz Fijałkowski, 25-553 Kielce, PL
prof. RNDr. David Lukáš, CSc., Liberec 6, CZ
Ing. Jiří Chvojka, Liberec 2, CZ
Ing. Jana Bajáková, Hodonín, CZ
Ing. Lucie Vysloužilová, Prostějov, CZ
prof. RNDr. Evžen Amler, CSc., Praha 7, CZ
Mgr. Matej Buzgo, 04402 Turňa nad Bodvou, SK
Bc. Dagmar Bezděková, Kamenický Šenov, CZ
Bc. Věra Lukášová, Liberec 6, CZ
- (74) Zástupce:
STRNAD Patent. a známková kancelář, Ing. Václav
Strnad, Rychtářská 375/31, 460 14 Liberec 14

(54) Název vynálezu:
**Způsob výroby nanovlákněné vrstvy z
vodného roztoku polyvinylalkoholu pro
tkáňové inženýrství elektrostatickým
zvlákňováním pomocí metody bezjehlového
či jehlového elektrostatického zvlákňování**

(57) Anotace:
Podstata řešení spočívá v tom, že za účelem zvýšení
stupně smáčivosti polymerních nanovláken a současně
pro zvýšení adheze a vyšší proliferaci eukaryotních
živočišných buněk jsou tato polymerní nanovláknena
plazmaticky modifikována plynnou metanovou plazmou
metodou Radio Frequency Plasma Assisted Chemical
Vapour Deposition při průtoku plynu 20 až
50 cm³/minutu, vakuu 15 až 80 Pa, záporném napětí v
rozsahu 100 až 700 V po dobu 2,5 až 20 minut. Pro
stabilizaci polymerních nanovláken ve vodném prostředí
se provede zesíťování jejich struktury glyoxalem a
kyselinou fosforečnou při tepelném zpracování.

CZ 308118 B6

Způsob výroby nanovláknenné vrstvy z vodného roztoku polyvinylalkoholu pro tkáňové inženýrství elektrostatickým zvlákněním pomocí metody bezjehlového či jehlového elektrostatického zvláknění

5

Oblast techniky

Vynález se týká způsobu výroby nanovláknenných vrstev z polyvinylalkoholu pro tkáňové inženýrství.

10

Dosavadní stav techniky

Polymerní nanovláknena a nanovláknenné vrstvy vyráběné metodou elektrostatického zvláknění vykazují neobvyklé vlastnosti. Jedná se o pórovitý materiál, v tomto případě póry jsou prostory mezi nanovláknny. Elektrostatické zvláknění umožňuje vytváření polymerních nanovláken, kde se průměr pórů pohybuje v hodnotách od několika desítek nanometrů do několika mikrometrů. Polymerní nanovláknenné vrstvy vykazují velkou specifickou plochu na jednotkový objem a hmotnost a jsou propustné pro plyny. Tyto vlastnosti polymerních nanovláken umožňují široké využití v mnoha aplikacích. Nanovláknenný materiál se využívá například při výrobě senzorů, elektronických a fotovoltaických zařízení, filtrů plynů a kapalin, ochranného oblečení atd. Polymerní nanovláknena se také používají v biomedicině například jako nosiče, tzv. scaffoldy v tkáňovém inženýrství.

Zejména při aplikaci tohoto materiálu v oblasti biomedicíny je velký význam kladen na možnosti jeho modifikace, s cílem poskytnout mu nejlepší vlastnosti pro medicínské použití. V současné době jsou plazmové techniky široce využívány pro povrchové úpravy polymerních nanovláken. Při použití této techniky dochází k mnoha fyzikálním a chemickým procesům, které působí na polymer. Mezi nejdůležitější procesy patří odstranění nečistot z povrchu polymeru, leptání a chemické reakce na hranicích mezi plazmou a polymerem. Tyto procesy lze řídit pomocí výběru pracovních plynů a parametrů plazmové modifikace, což umožňuje získat požadovanou morfologii povrchu, chemickou strukturu nebo smáčivost polymerních nanovláken.

Výzkum v oblasti plazmové modifikace polymerních nanovláken poukazuje na jejich možné využití v biomedicínských aplikacích, zejména v oblasti tkáňového inženýrství. V odborné literatuře lze najít články, které popisují použití různých druhů plazmy k modifikaci polymerních materiálů. Většinou se používá plazma generovaná za atmosférických podmínek nebo plazmatický výboj v amoniaku nebo argonu. Použití tohoto druhu plazmy způsobuje zvýšení hydrofility nanovláknenných materiálů vyrobených např. z polymeru kyseliny mléčné (PLA) a kyseliny glykolové (PGA) nebo jejich kopolymerů (PLGA) nebo poly(L–mléčné kyseliny) (PLLA). Výsledky biologického zkoumání ukazují lepší růst a lepší adhezi buněk fibroblastů, osteoblastů a hladkých svalových buněk na povrchu polymerních nanovláken modifikovaných pomocí plazmy. Takto upravená polymerní nanovláknena mohou být použita v tkáňovém inženýrství k regeneraci kostí, kožní tkáně nebo svalů.

45

V odborné literatuře prakticky neexistují publikace, které se zabývají modifikací polymerních nanovláken pomocí uhlovodíkového plazmatu s cílem zlepšení jejich biologických vlastností.

Ztráta části tkáně, úbytek nebo selhání funkce orgánu jsou hlavní problémy, které řeší tkáňové inženýrství. V současné době existuje několik možných přístupů, jak chybějící či poškozenou tkáň nahradit. Obvykle se k rekonstrukci tkáně používají dva typy štěpů, autologní (dárce je sám pacient) a alogenní (dárce je jiná osoba).

Možnost využití autologních štěpů je často omezena. Hlavní omezení při použití tohoto typu transplantace vyplývá z nedostatečného množství nebo špatné kvality dostupných autologních

55

tkání. Hlavní nevýhodou alogenních štěpů je riziko přenosu infekcí z dárce na pacienta. Dále to může vést k imunitní reakci organismu a v konečném důsledku k odmítnutí náhrady.

5 Jedním z možných způsobů, jak řešit tyto problémy je použití polymerních nanovláken, která díky řadě jedinečných vlastností (pórovitý materiál, propustný pro plyny, průměr nanovláken podobný vláknům mezibuněčné hmoty), mohou být úspěšně použity ve tkáňovém inženýrství.

10 Kromě fyzikálních vlastností je nutné, aby nanovlákná měla i vhodné chemické a biologické vlastnosti. Nelze tedy použít libovolný materiál, ale podmínkou je, aby byl takový materiál biologicky degradovatelný a biokompatibilní.

15 Jeden z polymerů, který může být použit ve výrobě nanovláken pro tkáňové inženýrství je polyvinylalkohol (PVA). Polyvinylalkohol je farmaceuticky schválený polymer využívaný jako pomocná látka ve farmaceutických přípravcích. Vyznačuje se biokompatibilitou, biodegradabilitou a netoxicitou. Díky rozpustnosti v polárních rozpouštědlech umožňuje přenos bioaktivních látek včetně citlivých molekul, jako jsou proteiny a nukleové kyseliny. Hlavní nevýhodou polyvinylalkoholu pro aplikace v tkáňovém inženýrství je buněčná antiadhezivita, ze které pramení nevhodnost pro osazení buňkami. Silně hydrofilní vlastnosti polyvinylalkoholu zamezují přichycení nasazených živočišných buněk na nanovláknenný nosič. Je tedy zapotřebí snížit hydrofilitu polyvinylalkoholního nosiče.

20

25 Jedním z možných způsobů, jak řešit tyto problémy je použití plazmových technik. V procesech plazmové modifikace polymerních nanovláken hraje rozhodující roli druh pracovního plynu. Správný výběr plynu a vhodných parametrů plazmové modifikace umožňuje cíleně modifikovat morfologii povrchu, chemickou strukturu a stupeň smáčivosti polymerních nanovláken. Stupeň smáčivosti těchto materiálů je podstatný z hlediska jejich použití, zejména v tkáňovém inženýrství.

30 Podstata vynálezu

35 Provedené experimenty v tomto oboru ukázaly, že modifikace polyvinylalkoholových nanovláknenných vrstev pomocí metanové plazmy vede k hydrofobizaci tohoto materiálu, přičemž nemodifikované vzorky se charakterizovaly silnými hydrofilními vlastnostmi. Modifikace nanovláknenných vrstev přinesla zvýšení adheze a proliferace fibroblastů na povrchu polyvinylalkoholových nanovláknenných vrstev. Z tohoto důvodu polyvinylalkoholová nanovlákná modifikovaná takovýmto způsobem jsou vhodným materiálem pro tkáňové inženýrství.

40 Podstatou řešení podle vynálezu je povrchová úprava nanovláknenných nosičů na bázi PVA jejich expozicí v prostředí metanové plazmy pro optimalizaci povrchových vlastností nanovláknenných nosičů k jejich následnému využití v tkáňovém inženýrství a regenerativní medicíně.

45 Polymerní nanovláknenný nosič je plazmaticky modifikován plynnou metanovou plazmou metodou Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition při průtoku plynu 20 až 50 cm³/minutu, vakuu 15 až 80 Pa, záporném napětí v rozsahu 100 až 700 V po dobu 2,5 až 20 minut.

50 Po shora uvedené plazmatické úpravě vykazuje polymerní nanovláknenný nosič na bázi polyvinylalkoholu nižší smáčivost při měření metodou kontaktního úhlu a povrchové energie. Výrobek současně vykazuje vyšší adhezi a proliferaci eukaryotních živočišných buněk v porovnání s nemodifikovanou nanovláknennou vrstvou z polyvinylalkoholu.

55 Cílená povrchová modifikace vláken závisí jednak na jejich fyzikálně chemických vlastnostech, dále také na požadovaných vlastnostech nanovláknenné vrstvy, kterých má být dosaženo, jako je typicky stupeň hydrofility či hydrofobicity, existence specifických chemických skupin na

povrchu nanovláken. Použití vhodných parametrů plazmové expozice je proto závislé na parametrech žádaných pro finální produkt.

- 5 Stabilizace polymerních nanovláken z polyvinylalkoholu ve vodném prostředí je dosažena zesíťováním jejich struktury glyoxalem a kyselinou fosforečnou.

Příklady uskutečnění vynálezu

10 Příklad 1

Nanovláknina byla vytvořena z vodného roztoku polyvinylalkoholu, zvláknění provedeno pomocí metody jehlového elektrostatického zvláknění technologií NANOSPIDER™ vyvinuté na Technické univerzitě v Liberci a síťovaná glyoxalem a kyselinou fosforečnou s následnou
15 modifikací povrchu polyvinylalkoholových nanovláknenných struktur jejich expozicí v metanové plazmě aplikací technologie obchodního označení Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition. Tato metoda slouží k modifikaci různých materiálů pomocí chemických reakcí probíhajících v elektrickém vysokofrekvenčním poli. Při této metodě jsou reagenční látky
20 dodávány do vakuové komory ve formě plynů. Na průběh procesů modifikace mají vliv takové parametry jako záporné napětí, průtok plynu, hodnota vakua a čas. V závislosti na požadovaných vlastnostech nanovláknenné vrstvy jako je stupeň hydrofobicity a existence specifických chemických skupin na povrchu nanovláken jsou zvoleny parametry průtoku plynu v rozmezí 20 až 50 cm³/minutu, hodnoty vakua 15 až 80 Pa, hodnoty záporného napětí v rozsahu 100 až 700 V a to po dobu 2,5 až 20 minut. Užití konkrétních parametrů plazmové expozice je proto závislé na
25 žádaných parametrech pro finální produkt.

Nanovláknenná vrstva byla vyrobena technologií elektrostatického zvláknění zvolné hladiny tenké polymerní vrstvy za působení vysokého elektrostatického pole. Tato nanovláknenná vrstva z polyvinylalkoholu byla před modifikací jejího povrchu ve vakuové komoře podrobena tepelnému
30 zpracování s cílem zesíťování struktury nanovláknenné vrstvy tak, aby získala odolnost proti degradaci ve vodném prostředí.

Při procesu plazmové modifikace byl vzorek nanovláknenné vrstvy z polyvinylalkoholu umístěn přímo na povrch RF elektrody. V pracovní komoře bylo vytvořeno potřebné vakuum a následně
35 byl dodáván metan. Před každým procesem byla pracovní komora vyplachována metanem po dobu pěti minut s cílem vytvoření pracovní atmosféry v komoře. Po této době následovalo buzení plazmy při určitém záporném potenciálu autopolarizace a průtoku metanu. Požadovaný tlak metanu ve vakuové komoře byl regulován pomocí kulového ventilu.

40 Na základě provedených zkoušek a testů je možno konstatovat, že modifikace nanovláknenných vrstev PVA metánovou plazmou významným způsobem ovlivňuje jejich smáčivost. Nemodifikované vzorky byly silně hydrofilní, naměřený kontaktní úhel smáčení představoval 22°. V opačném případě vzorky modifikované metánovou plazmou byly charakterizovány hydrofóbními vlastnostmi.

45 Bylo také zjištěno, že vzrůst záporného napětí a doby procesu plazmové modifikace má za následek vyšší hodnoty kontaktního úhlu smáčení, to znamená silnější hydrofóbní vlastnosti vzorků. Maximální hodnota kontaktního úhlu smáčení byla zjištěna 121 ° pro vzorek modifikovaný při největším záporném napětí. Rovněž výsledky biologických studií ukázaly
50 významný nárůst viability a adheze na vzorcích upravených metánovou plazmou v porovnání s plazmaticky neupraveným polyvinylalkoholem.

Příklad 2

Koaxiální nanovlákná vytvořená z vodného roztoku PVA zvlákněná pomocí metody bezjehlového elektrostatického zvláknování, tzv. přepravovacím způsobem byla zesíťována glyoxalem a kyselinou fosforečnou. Při výrobě nanovláknenné vrstvy z polyvinylalkoholu byl připravený polymerní roztok vnesen na povrch válcové elektrody jejím rotačním pohybem. Válcová elektroda připojená na záporný zdroj vysokého napětí se nacházela ve vzdálenosti 100 až 160 mm od uzemněné kladně nabitě protielektrody, která zároveň zastávala funkci kolektoru. Po sepnutí vysokonapěťového zdroje došlo k formování Taylorových kuželů na vrcholu válcové elektrody a následnému zvláknování. Nanovlákná se ukládala v nahodilé orientaci na podkladovou textilii typu Spunbond umístěnou před kolektorem.

Vytvořená nanovláknenná vrstva byla následně podrobena modifikaci povrchu pomocí chemických reakcí expozicí v metanové plazmě aplikací technologie Radio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition. Reakční látky byly dodávány do vakuové komory ve formě plynů, přičemž byl zvolen průtok metanu v rozmezí 20 až 50 cm³/minutu, hodnoty vakua byly nastaveny od 15 až do 80 Pa, hodnoty záporného napětí v rozsahu 100 až 700 V a to po dobu 2,5 až 20 minut. Užití konkrétních parametrů plazmové expozice je však závislé na žádaných parametrech pro finální produkt.

Výsledkem provedené plazmové modifikace povrchu nanovláknenné vrstvy z polyvinylalkoholu bylo dosažení příznivých výsledků hodnot kontaktního úhlu smáčení, což znamená silnější hydrofóbní vlastnosti vrstvy. Rovněž výsledky biologických zkoušek ukázaly významný nárůst viability a adheze na vzorcích upravených metanovou plazmou v porovnání s plazmaticky neupraveným polyvinylalkoholem.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob výroby nanovláknenné vrstvy z vodného roztoku polyvinylalkoholu pro tkáňové inženýrství elektrostatickým zvláknováním pomocí metody bezjehlového či jehlového elektrostatického zvláknování, zaručující biologickou degradovatelnost, biokompatibilitu a netoxicitu, **vyznačený tím**, že pro stabilizaci polymerních nanovláken ve vodném prostředí jsou tato polymerní nanovlákná plazmaticky modifikována plynou metanovou plazmou metodou Rádio Frequency Plasma Assisted Chemical Vapour Deposition při průtoku plynu 20 až 50 cm³/minutu, vakuu 15 až 80 Pa, záporném napětí v rozsahu 100 až 700 V po dobu 2,5 až 20 minut.

2. Způsob výroby nanovláknenné vrstvy z vodného roztoku polyvinylalkoholu pro tkáňové inženýrství podle nároku 1, **vyznačený tím**, že zesíťování struktury polymerních nanovláken je provedeno glyoxalem a kyselinou fosforečnou.