

D01F 1/10 (2006.01)
D01F 11/14 (2006.01)
D01F 11/16 (2006.01)
D06M 13/00 (2006.01)
D01D 1/02 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
B82B 3/00 (2006.01)

(19)
 ČESKÁ
 REPUBLIKA



ÚŘAD
 PRŮMYSLOVÉHO
 VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2021-479**
 (22) Přihlášeno: **14.10.2021**
 (40) Zveřejněno: **26.04.2023**
(Věstník č. 17/2023)
 (47) Uděleno: **27.04.2023**
 (24) Oznámení o udělení ve věstníku: **07.06.2023**
(Věstník č. 23/2023)

(56) Relevantní dokumenty:
 CZ 303911 B6; CZ 303587 B6; CZ 34116 U1; CZ 300797 B6.

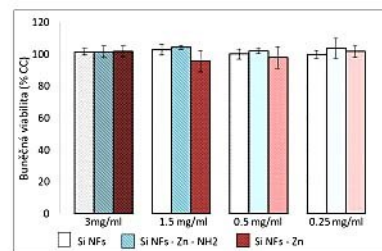
(73) Majitel patentu:
 Technická univerzita v Liberci, Liberec, Liberec I-
 Staré Město, CZ

(72) Původce:
 Ing. Miroslava Rysová, Dětenice, CZ
 Ing. Hana Tománková, Mgr., Liberec, Liberec III-
 Jeřáb, CZ

(74) Zástupce:
 Dobroslav Musil a partneři s.r.o., Zábřdovická
 917/11b, 615 00 Brno, Zábřdovice

(54) Název vynálezu:
**Biokompatibilní a biodegradabilní netkaná
 vlákněná struktura s obsahem
 submikronových vláken na bázi oxidu
 křemičitého, biogenních iontů a funkčním
 povrchem pro vazbu aktivních látek a
 způsob její výroby**

(57) Anotace:
 Řešení se týká biokompatibilní a biodegradabilní netkané vlákněné struktury se submikronovými vlákny na bázi oxidu křemičitého, biogenními ionty a funkčním povrchem pro vazbu aktivních látek. Vlákna jsou vytvořena zvlákněním solů připravených metodou sol-gel a jsou přímo ve svém objemu při zvlákněování opatřena bioaktivními ionty ze skupiny ionty vápníku a/nebo mědi a/nebo zinku a/nebo stříbra a povrch vláken je funkcionalizován aminoalkylalkoxysilanem nebo epoxyalkylalkoxysilanem. Řešení se dále týká způsobu výroby uvedené biokompatibilní a biodegradabilní netkané vlákněné struktury, při kterém se zvlákněuje sol připravený metodou sol-gel. Sol se před zvlákněním syntetizuje z nízkomolekulárního prekurzoru tetraalkoxysilanu metodou sol-gel v alkoholu s přísávkem vody za kyselých katalýzy, přičemž tento sol se dopuje bioaktivními ionty ve formě solí již v průběhu jeho přípravy před zvlákněním a po zvlákněním se povrch vláken funkcionalizuje aminoalkylalkoxysilanem nebo epoxyalkylalkoxysilanem.



Biokompatibilní a biodegradabilní netkaná vlákenná struktura s obsahem submikronových vláken na bázi oxidu křemičitého, biogenních iontů a funkčním povrchem pro vazbu aktivních látek a způsob její výroby

5

Oblast techniky

Vynález se týká stabilní a zároveň biokompatibilní a biodegradabilní netkané vlákenné struktury s obsahem submikronových vláken na bázi oxidu křemičitého dopovaných bioaktivními ionty či jejich směsí s povrchem nesoucím funkční skupiny modifikující povrchové vlastnosti vláken a umožňující případnou vazbu aktivních látek na tento povrch.

Vynález se týká také způsobu výroby těchto netkaných vlákenných struktur.

15

Dosavadní stav techniky

Vlákenné struktury s obsahem submikronových vláken a nanovláken představují díky svým unikátním vlastnostem – tedy především malému rozměru pórů při současné vysoké porozitě a malému průměru vláken vedoucímu k enormně vysokému měrnému povrchu dostupnému k vazbě molekul či průběhu katalytických reakcí, struktury s vysokým aplikačním potenciálem v medicíně a biotechnologiích. Pro oblast medicíny jsou submikronové vlákenné struktury využitelné zejména jako nosiče pro tkáňové inženýrství různých tkání a také jako kryt ran. Zde je využívána podobnost uměle připravených vlákenných struktur s přirozeně se vyskytujícími strukturami extracelulární hmoty (ECM) a/nebo membránového efektu, který stimuluje prostředí rány, podporuje tzv. vlhké hojení a současně umožňuje výměnu plynů mezi ránou a vnějším prostředím. Pro dosažení tohoto efektu musí být splněno několik podmínek, z nichž nejpodstatnější je zachování dostatečné porozity ve vlhkém prostředí.

Hojení porušené či růst zcela nové tkáně může být také podpořeno přítomností signálních a bioaktivních a biogenních molekul a iontů, které podporují buněčnou migraci, diferenciaci či stimulaci tvorby vybraných komponent ECM. Zároveň mohou být tyto látky využity i k dekontaminaci infikované rány či předcházení vzniku postoperativních infekcí. Mezi takové biogenní látky se řadí například křemík, jehož přítomnost v nízkých koncentracích podporuje hojení a stimuluje tvorbu kolagenu. Dále byl popsán účinek iontů stříbra a mědi jako látek s vysokým antimikrobiálním účinkem.

V biotechnologických aplikacích ale i medicínských aplikacích se využívá konjugace aktivních molekul na různé substráty za účelem zlepšení jejich stability, snížení zatížení daného reakčního prostředí volnými aktivními molekulami a prodloužení jejich účinné doby při aplikaci *in situ*. Zde je možné využít kombinaci bioaktivních iontů a například konjugovaných enzymů, jejichž katalytická aktivita může být přímo závislá anebo podpořená přítomností a pozvolným uvolňováním vybraných bioaktivních iontů. Takový efekt byl popsán například v případě vápenatých iontů ve vztahu k aktivitě enzymu trypsin nebo zinku ve vztahu k aktivitě trávicích enzymů.

V takovém případě následná funkcionalizace povrchu vede ke změně smáčivosti povrchu vodným roztokem, který má následně dva efekty. Jednak zvyšuje účinnost následné vazby aktivní molekuly z vodných pufrů a zároveň vede ke zlepšení kinetiky uvolňování inkorporovaných iontů podporující aktivitu vázané molekuly. Tento efekt je možné podpořit také aplikací fyzikálních metod v průběhu výroby vlákenného krytu, které vedou ke zlepšení smáčivosti povrchu před samotnou chemickou funkcionalizací (roubováním funkčních skupin) a zvyšují účinnost tohoto procesu a počet funkčních skupin na jednotku plochy.

Z CZ PV 2003-2421 A3, respektive z WO 2005024101 A1, je znám postup výroby nanovláken elektrostatickým zvlákňováním, avšak nejsou zde blíže specifikovány polymerní roztoky pro přípravu vláken.

- 5 CZ PV 2012-549 A3 popisuje nanovláknennou strukturu s imobilizovaným organickým agens, která je tvořena čistě křemičitými nanovláknky s povrchem modifikovaným aminoalkoxysilanem a s následně imobilizovaným organickým agens. Tato nanovláknenná struktura se vyrábí tak, že z výchozího solu syntetizovaného metodou sol-gel z tetraalkoxysilanu se elektrostatickým zvlákňováním vytvoří čistě křemičitá nanovláknna, která se následně tepelně zpracují a poté se
10 povrch nanovláken modifikuje roztokem aminoalkoxysilanu, načež se na takto modifikovaný povrch nanovláken imobilizují organická agens.

CZ 34116 U1, se zabývá přípravou čistě křemičitých nanovláken s roubovanými funkčními skupinami a imobilizovaným organickým agens. Pro zvýšení účinnosti vazby je zde kombinována
15 předúprava povrchu plazmatem a na ni navazující chemická modifikace.

Z CZ PV 2015-406 A3 je znám způsob výroby hybridní nanovláknenné struktury s imobilizovanými aktivními látkami spočívající v tom, že se provede příprava výchozího hybridního solu metodou sol-gel, a to tak, že základní reakční směs obsahující tetraalkoxysilan je
20 obohacena o podíl aminopropyltriethoxysilanu, načež takto připravený hybridní sol je následně zvlákněn, přičemž dále vytvořená nanovláknenná struktura je tepelně stabilizována při specifických podmínkách, a to působením teploty do 200 °C. Načež konečně takto vytvořená nanovláknenná vrstva s aktivním povrchem je vystavena působení roztoku pro imobilizaci vybrané aktivní látky, kde tato aktivní látka je prostřednictvím peptidických a/nebo vodíkových vazeb vázána na povrch
25 uvedených nanovláknenných vrstev. Technické řešení se týká také hybridní nanovláknenné struktury, vytvořené jako nanovláknenná prostorová struktura na bázi nanovláken aktivovaných -NH₂ skupinami, kde na povrchu nanovláken je navázána aktivní látka, a to vazbou peptidickou nebo vazbou vodíkovými můstky, přičemž přednostně se jedná o hybridní nanovláknennou vrstvu vyrobenou způsobem, jak výše uvedeno, kde pak aktivní látkou je přednostně léčivá látka či léčivo.
30 U takto připravených nanovláknenných struktur je však omezená dostupnost funkčních skupin dostupných na povrchu nanovláken k další vazbě aktivních agens.

CZ PV 2012-549 A3, CZ 34116 U1, CZ PV 2015-406 A3 neobsahují bioaktivní ionty kromě křemíku, který je jejich základní stavební složkou, ale jehož uvolňování ze struktury není
35 deklarováno.

V dokumentu WO 2009018104 A1 je pro přípravu křemičitých nanovláken jako výchozí prekurzor používán methyltrimethoxysilan. Bez tepelného zpracování nanovláken podle
40 WO 2009018104 A1 nebo při nízkých teplotách tepelného zpracování nanovláken podle WO 2009018104 A1 mají tato nanovláknna v důsledku přítomnosti methylové skupiny na svém povrchu hydrofobní vlastnosti a vykazují nízký počet Si-OH skupin na povrchu potřebných pro případnou následnou modifikaci povrchu aminoalkylalkoxysilanem. Z těchto důvodů není řešení podle WO 2009018104 A1 vhodné pro přípravu výchozích křemičitých nanovláken pro následnou modifikaci povrchu a případnou imobilizaci organických agens.
45

Dokumenty JP 20040041335 A, JP 20040161234 A a JP 20040243580 A popisují přípravu organicko-anorganického nanovláknenného kompozitu složeného z pravidelné kostry polyethylenimidových vláken s vrstvami oxidu křemičitého nanosených metodou sol-gel. Výsledný kompozitní materiál má sloužit k záchytu nebo koncentraci různých látek v připravené
50 struktuře, k záchytu žádaných částic však dochází pouze jako u filtru, tj. v mezerách mezi jednotlivými nanovláknky, nebo prostou adsorpcí žádaných částic do objemu nanovláknenného kompozitu.

Balící papír podle KR 20090058155 A je vyrobený z nanovláken, která byla získána
55 elektrostatickým zvlákňováním biodegradabilního organického polymeru s přísadkou solu oxidu

křemičitého a dusičnanu stříbrného. Výsledný produkt má antiseptické a antibakteriální vlastnosti, avšak nevykazuje funkční povrch a není uzpůsoben pro imobilizaci organických agens.

5 KR 20100058372 A uvádí přípravu katalyzátoru z mezoporézních nanovláken oxidu křemičitého připravených růstem z plané fáze a následným zavedením katalyzátoru pomocí silanu na povrch a do pórů takto vytvořených vláken. Výsledný produkt je deklarován jako katalyzátor různých organických reakcí, ovšem neobsahuje biogenní ionty a ani neslouží pro imobilizaci organických agens.

10 Užitečný vzor CZ 34086 U1, popisuje kryt rány s nanovláknennou vrstvou pro dopravu léčiv, přičemž aktivní látka je zde vázána v nosných nanočásticích – liposomech, pro něž nanovláknenná struktura funguje jako podpůrný systém umožňující jejich aplikaci do prostoru rány. Jako podpůrná nanovláknna zde mohou být použita i nanovláknna připravená elektrostatickým zvlákněním organosilikátu. Tato vlákna nejsou jinak povrchově funkcionalizována. Nevýhodou tohoto řešení je
15 nemožnost vazby dalších aktivních látek.

Z patentového dokumentu CZ PV 2012-166 A3 a užiténého vzoru CZ 31723 U1 jsou známy vláknenné (nanovláknenné a mikrovláknenné) biokompatibilní struktury využitelné k ošetření ran a kožních defektů. V případě CZ 31723 U1 neobsahuje struktura na bázi kopolymeru L-laktidu a ϵ -kaprolaktonu na svém povrchu funkční skupiny pro vazbu agens ani neobsahuje bioaktivní ionty. V případě CZ PV 2012-166 A3 je nevýhodou materiálu na bázi karboxymethylované celulózy nízká stabilita ve vodném prostředí, nepřítomnost aktivních látek/iontů a omezená funkčnost povrchu.

25 Jsou také známa řešení s obsahem iontů, případně i řešení představující konjugaci enzymů na polymerních nanovláknna.

Z patentového dokumentu EP 3042628 A1 jsou známy vláknenné dentální implantáty na bázi bioskla. Ty však neobsahují povrchově funkcionalizovaná vlákna submikronového průměru a jejich struktura je založena především na obsahu fosfátových složek jako jsou trikalciumpfosfát a další. Z patentového dokumentu WO 2007017756 A2 je známo řešení přípravy scaffoldů na bázi bioskla. Ty jsou však připravovány vrstvením přes polymerní templát a neobsahují submikronová vlákna. Situace je stejná i u ostatních bioskel, i když tato obsahují bioaktivní ionty, tak jejich struktura obsahuje další složky, není povrchově funkční a vláknenná.

35 Nedostatkem dosavadního stavu techniky je absence komplexního řešení, které by současně umožňovalo využití účinku bioaktivních iontů a možnosti povrchové imobilizace aktivních látek v dostatečném množství a dosažení jejich synergického efektu.

40 Cílem tohoto vynálezu je odstranit nebo alespoň minimalizovat nevýhody dosavadního stavu techniky.

Podstata vynálezu

45 Vynález je dosažen křemičitou netkanou vláknennou strukturou s průměrem vláken v submikronovém měřítku dopovanou bioaktivními ionty a zároveň povrchově funkcionalizovanou tak, aby byla dosažena 2D nebo 3D struktura se zvýšenou antibakteriální aktivitou či jinou biologickou aktivitou, a zároveň umožněna aplikace netkané vláknenné struktury v této podobě či
50 její další využití pro konjugaci molekul na jejich povrch v dostatečném množství díky modifikaci povrchu aminoalkylalkoxysilanem nebo epoxyalkylalkoxysilanem. Taková modifikace vede ke zvýšení smáčivosti povrchu a zároveň umožňuje elektrostatickou vazbu, vodíkovou vazbu nebo kovalentní vazbu dle využití konjugační chemie, přičemž účinnost modifikace může být zvýšena doplněním o fyzikální aktivaci povrchu vláken plazmatickou úpravou.

55

Křemičitá submikronová vlákna jsou v tomto vynálezu využívána jako nosný substrát z důvodu jejich biokompatibility, unikátního způsobu biodegradace a také díky širokým možnostem jejich povrchových modifikací. U nanostruktur na bázi oxidu křemičitého byla prokázána nejen biokompatibilita vůči různým typům tkáně, ale i jejich bioaktivita díky uvolňování kyseliny ortokřemičité při jejich degradaci. Ta probíhá postupnou erozí povrchu, kdy nedochází ke snižování porozity vrstvy vlivem bobtnání jednotlivých vláken. Další nespornou výhodou křemičitých vláken je vysoký podíl silanolových Si-OH skupin na jejich povrchu, jež mohou být využity k modifikaci jejich povrchu prostřednictvím kovalentní vazby funkčního alkoxyasilanu. Četnost výsledných funkčních skupin vpravených na povrch je potom modifikována podmínkami reakce a může být zvýšena také předúpravou povrchu vláken před samotnou vazbou.

Podstata výroby netkané submikrovlákněné struktury spočívá v přípravě zvláknovacího solu. Ten je připraven metodou sol-gel z tetraalkoxyasilanu prostřednictvím kyselý katalýzy v alkoholovém prostředí, ovšem bez přídavku dalšího pomocného polymeru, a v průběhu procesu přípravy je tento sol dopován vybranými bioaktivními ionty ve formě vhodných sloučenin – nejčastěji dusičnanů. Takto připravený sol je následně zpracován do podoby netkané textilie s průměry vláken v submikronovém měřítku. V závislosti na parametrech zvláknovacího solu a podmínkách zvláknování je možné dosáhnout i struktur s většinovým podílem nanovláken (tedy vláken s průměrem ≤ 100 nm) ve struktuře. Výroba vlákněného útvaru může probíhat jak metodou elektrostatického, tak i odstředivého zvláknování. Vytvořená netkaná vlákněná struktura je následně tepelně stabilizována a případně upravena vhodným typem plazmatu. Tento krok zvyšuje účinnost povrchové funkcionalizace alkoxyasilanem, ovšem není nezbytný. Následně je povrch modifikován zvoleným aminoalkylalkoxyasilanem nebo epoxyalkylalkoxyasilanem. Tímto je dosaženo biokompatibilní a bioaktivní netkané vlákněné vrstvy s funkčním povrchem dostupným pro vazbu aktivní látky na její povrch prostřednictvím zvolené konjugační chemie.

Při přípravě zvláknovacího solu dopovaného jednotlivými bioaktivními ionty (Ca^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+}) nebo jejich kombinací, přičemž zvláknovací sol je vytvořený metodou sol-gel z tetraalkoxyasilanu při zapojení kyselý katalýzy, musí být dodrženy následující poměry vstupních surovin.

V případě molárního poměru tetraalkoxyasilanu vůči vodě je tento držen v rozmezí 0,3 až 0,65 a zároveň molární poměr kyseliny vůči tetraalkoxyasilanu je udržován v rozmezí 0,005 až 1. Při dopování bioaktivními ionty je potom nezbytné udržení molárního poměru soli vůči tetraalkoxyasilanu v rozmezí 0,001 až 0,25. Po ukončení polykondenzační reakce je upravena koncentrace zvláknovacího solu na rozmezí 25 až 45 %. Tímto postupem je připraven zvláknovací sol, při jehož zpracování je možné dosáhnout netkané vlákněné struktury s průměrem vláken v submikronovém měřítku. Struktura připravené vrstvy je určena zvolenou metodou zvláknování, kdy použití elektrostatického zvláknování vede k přípravě převážně 2D struktur, zatímco použití odstředivého zvláknování umožňuje tvorbu 3D struktur s vyšším podílem a rozměrem mezivlákněných pórů. Průměr vláken ve vrstvě a tloušťka zvlákněné vrstvy je určena podmínkami zvláknování. Nejčastěji se plošná hmotnost pohybuje v rozmezí 10 až 50 g/m^2 , ovšem tyto hranice nejsou omezující. Připravené struktury jsou dále tepelně upraveny pro dosažení vyšší mechanické stability. Tepelná stabilizace probíhá nejčastěji při teplotách do 350 °C, ovšem další úpravy je možné realizovat i bez tepelné úpravy. Stejně tak může být vrstva před vazbou funkčních skupin hydrofilizována fyzikální úpravou nízkotlakým plazmatem nebo plazmatem prováděným při atmosférickém tlaku. Tato úprava vede ke zvýšení počtu Si-OH skupin na povrchu, čímž je následně dosaženo vyšší funkčnosti povrchu. Úprava plazmatem může být také využita u vláken stabilizovaných při teplotách nad 350 °C k opětovné indukci Si-OH ztracených vlivem tepelné úpravy provedené za účelem dosažení vyšší mechanické odolnosti vrstvy. Vyšší teplotou nedochází u křemičitých nanovláken ke ztrátě biokompatibility. Ta byla potvrzena u vláken upravovaných až do teploty 750 °C.

Následně je povrch dopovaných křemičitých vláken funkcionalizován kovalentní vazbou funkčního alkoxyasilanu v podobě aminoalkylalkoxyasilanu nebo epoxyalkylalkoxyasilanu

v koncentraci nejčastěji 0,1 až 5 % v roztoku, může však být i 0,1 až 75 %, výhodněji 0,1 až 60 %, ještě výhodněji 0,1 až 25 % a nejméně výhodněji výše uvedených 0,1 až 5 %. Tato povrchová funkcionální nevede ke snížení biokompatibility povrchu, upravuje jeho náboj a smáčivost. Tato úprava vede ke zlepšení dostupnosti aktivních iontů inkorporovaných do hmoty vláken a současně může být využita pro adsorpci, elektrostatickou anebo kovalentní vazbu dalších molekul na povrch vláken v závislosti na konkrétní zvolené biotechnologické či medicínské aplikaci tak, aby bylo, pokud možno dosaženo synergického efektu s inkorporovanými ionty. Tyto dva typy funkčních skupin na povrchu umožňují vazbu většiny aktivních molekul s využitím spontánní vazby či prostřednictvím pomocné konjugační chemie. Příkladem takové chemie může být využití různých typů konjugačních linkerů, tzv. nulové délky na bázi ethyl(dimethylaminopropyl)karbodiimidu.

Objasnění výkresů

15 Vynález je schematicky znázorněn na výkresech, kde ukazuje:

- obr. 1 SEM mikroskopickou morfologii submikronových vláken na bázi křemíku s obsahem bioaktivních iontů zinku podle příkladu 1, obr. 1a zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken ve vrstvě podle příkladu 1;
- 20 obr. 2 důkaz biokompatibility submikronových vláken na bázi křemíku s obsahem bioaktivních iontů zinku podle příkladu 1 před povrchovou funkcionální a po ní, hodnoceno na buňkách Hacat;
- 25 obr. 3 SEM mikroskopickou morfologii submikronových vláken na bázi křemíku s obsahem bioaktivních iontů mědi podle příkladu 2;
- obr. 3a zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken ve vrstvě podle příkladu 3;
- 30 obr. 4 důkaz povrchové funkčnosti a biokompatibility submikronových vláken na bázi křemíku s obsahem bioaktivních iontů mědi podle příkladu 2 před povrchovou funkcionální a po ní, důkaz přítomnosti aminoskupin na povrchu neupravených a upravených vláken prostřednictvím barvení methylovaním, biokompatibilita před povrchovou úpravou a po ní hodnocena na buňkách Hacat;
- 35 obr. 5 SEM mikroskopickou morfologii submikronových vláken na bázi křemíku s obsahem bioaktivních iontů vápníku podle příkladu 3;
- obr. 5a zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken ve vrstvě podle příkladu 3;
- 40 obr. 6 SEM mikroskopickou morfologii submikronových vláken na bázi křemíku s obsahem směsi bioaktivních iontů stříbra, mědi a zinku podle příkladu 4;
- obr. 6a zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken ve vrstvě podle příkladu 4;
- 45 obr. 7 důkaz biokompatibility submikronových vláken na bázi křemíku s obsahem směsi bioaktivních iontů stříbra, mědi a zinku podle příkladu 4 před povrchovou funkcionální a po ní, hodnoceno na buňkách Hacat; a
- 50 obr. 8 důkaz antibakteriální aktivity submikronových vláken na bázi křemíku s obsahem směsi bioaktivních iontů vůči bakteriím *S. gallinarum* (vlevo) a *E. coli* (vpravo).

Příklady uskutečnění vynálezu

Vynález bude popsán na příkladech vytvoření netkané vlákenné struktury založené na oxidu křemičitém dopovaném biogenními ionty a s modifikovaným povrchem, který dále umožňuje vazbu aktivních a léčivých látek a dalších molekul volených dle konkrétní aplikace. Vynález je dokumentován vybranými konkrétními příklady provedení, jimiž však nejsou popsány všechny možnosti uskutečnění vynálezu. Tyto zde blíže nepopsané možnosti jsou průměrnému odborníkovi při znalosti tohoto vynálezu z tohoto textu zřejmé bez nutnosti další vynálezecké činnosti.

10

Příklad 1

Modifikovanou metodou sol-gel byl připraven zvláknovací sol – a to smísením 164 ml izopropylalkoholu a 200 ml tetraethoxysilanu, vody a kyseliny tak, aby molární poměry odpovídaly hodnotám 0.45 molárního poměru tetraethoxysilanu ku vodě a zároveň 0.1 molárního poměru kyseliny ku tetraethoxysilanu. Současně byl přidán dusičnan zinečnatý jako zdroj bioaktivních iontů v poměru 0.01 molů ku tetraethoxysilanu. Takto připravený sol prošel procesem hydrolyzy, polykondenzace a zrání, kdy je v závěru zahuštěn na 33 % obsahu sušiny z celkové hmotnosti zvláknovacího solu. Tento krok je zajištěn odparem rozpouštědla.

20

Takto připravený zvláknovací sol byl následně zpracován metodou elektrostatického zvláknování stejnosměrným proudem (tzv. DC electrospinning) z drátové elektrody při zachování zvláknovacích podmínek na 160 mm zvláknovací vzdálenosti a rozdílu napětí elektrod 60 kV. Tímto způsobem byla připravena netkaná vlákenná vrstva se střední hodnotou průměru vláken 174 nm, její plošná hmotnost byla určena rychlostí pohybu podkladového materiálu na 12 g/m². Pro dosažení vyšší soudržnosti vrstvy byla provedena teplotní stabilizace expozicí teplotě 180 °C po dobu 2 hodin. Tato tepelná úprava nevedla k významné změně ve struktuře (homogenitě) vrstvy ani průměrů submikronových vláken. Pro dosažení povrchové funkčnosti byla následně vrstva smáčena v 3% roztoku 3-aminopropyltryethoxysilanu rozpuštěného v 96% ethanolu po dobu 2 hodin při laboratorní teplotě. Stabilita funkčních skupin roubovaných na povrch po oplachu přebytečného funkcionalizačního činidla, provedeného opakovaným oplachem v roztoku ethanolu, byla podpořena tepelnou úpravou při 110 °C po dobu 30 minut. Tímto způsobem byla získána křemičitá nanovlákna s obsahem bioaktivního zinku a současně s funkčním povrchem obsahujícím –NH₂ skupiny volné k další vazbě zvoleným způsobem.

35

Morfologie takto připravených submikronových vláken je zobrazena na obr. 1 pořízeném prostřednictvím elektronové mikroskopie, zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken ve vrstvě podle příkladu 1 je zobrazeno na obr. 1a. U takto připraveného materiálu byla prokázána biokompatibilita vůči buňkám kožního krytu. Test provedený *in vitro* na lidských keratinocytech Hacat byl proveden v souladu s normou ČSN EN ISO 10993-5:2009 tak, že eluát testovaného vzorku v různých koncentracích byl připraven elucí po dobu 24 hodin. Ten byl následně exponován předkultivovaným buňkám po následujících 24 hodin. Výsledná cytokompatibilita byla vyhodnocena prostřednictvím metabolické aktivity živých buněk tetrazoliovou solí WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfonfenyl)-2H-tetrazolium, sodná sůl) a následnou kvantifikací při 450 nm vlnové délky. Dosažené výsledky v podobě důkazu biokompatibility submikronových vláken na bázi křemíku s obsahem bioaktivních iontů zinku podle příkladu 1 před povrchovou funkcionalizací a po ní, hodnoceno na buňkách Hacat, jsou zobrazeny na obr. 2.

50

Tato vrstva může být aplikována v tomto stavu bez další modifikace, nebo může sloužit k další vazbě biotechnologicky nebo medicínsky významných látek. V tomto případě například jako nosič biotechnologicky využitelného enzymu lakázy pro úpravu vod.

Příklad 2

5 Modifikovanou metodou sol-gel byl připraven zvlákňovací sol – a to smísením 164 ml izopropylalkoholu a 200 ml tetraethylortosilikátu (tetraethoxysilanu), vody a kyseliny tak, aby molární poměry odpovídaly hodnotám 0.4 molárního poměru tetraethoxysilanu ku vodě a zároveň 0.11 molárního poměru kyseliny ku tetraethoxysilanu. Současně byl do směsi přidán dusičnan měďnatý jako zdroj bioaktivních iontů v poměru 0.034 molů ku tetraethoxysilanu. Takto
10 připravený sol prošel procesem hydrolýzy, polykondenzace a zrání, kdy byl v závěru zahuštěn na 35 % obsahu sušiny z celkové hmotnosti zvlákňovacího solu. Tento krok byl zajištěn odparem rozpouštědla.

Takto připravený zvlákňovací sol byl následně zpracován metodou elektrostatického zvlákňování
15 stejnosměrným proudem (tzv. DC elektrosinning) z tyčkové elektrody při zachování zvlákňovacích podmínek na 150 mm zvlákňovací vzdálenosti a rozdílu napětí elektrod 45kV. Tímto způsobem byla připravena netkaná vlákněná vrstva se střední hodnotou průměru vláken 289 nm. Pro dosažení vyšší soudržnosti vrstvy byla provedena teplotní stabilizace expozicí teplotě 180 °C po dobu 2 hodin. Pro zvýšení účinnosti povrchové funkcionalizace byla následně
20 vlákněná vrstva upravena koronovým výbojem ve vzduchové atmosféře při pokojové teplotě, tlaku ~101 kPa, výkonu 800 W a při rychlosti posuvu materiálu 1 m/min. Aktivovaná vrstva byla následně přenesena do funkcionalizační lázně sestávající ze 3% roztoku 3-aminopropyltriethoxysilanu rozpuštěného v 96 % ethanolu, kde byla máčena po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě. Stabilita funkčních skupin roubovaných na povrch byla po oplachu
25 přebytečného funkcionalizačního činidla, provedeného opakovaně v roztoku ethanolu, podpořena tepelnou úpravou při 110 °C po dobu 30 minut. Tímto způsobem byla získána křemičitá nanovlákněná s obsahem bioaktivních iontů mědi a současně s funkčním povrchem obsahujícím – NH₂ skupiny volné k další vazbě zvoleným způsobem.

Morfologie takto připravených submikronových vláken je zobrazena na obr. 3 pořízeném
30 prostřednictvím elektronové mikroskopie, zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken ve vrstvě podle příkladu 3 je znázorněno na obr. 3a. U takto připraveného materiálu byla prokázána biokompatibilita vůči buňkám kožního krytu. Test provedený *in vitro* na lidských keratinocytech Hacat byl proveden v souladu s normou ČSN EN ISO 10993-5:2009 tak, že eluát testovaného
35 vzorku v různých koncentracích byl připraven elucí po dobu 24 hodin. Ten byl následně exponován předkultivovaným buňkám po následujících 24 hodin. Výsledná cytotoxicita byla vyhodnocena prostřednictvím metabolické aktivity živých buněk tetrazoliovou solí WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfonfenyl)-2H-tetrazolium, sodná sůl) a následnou kvantifikací při 450 nm vlnové délky. Viabilita exponovaných buněk přesahovala u všech koncentrací 95 % viability buněčné kontroly. Zároveň došlo povrchovou úpravou
40 k mírnému zvýšení viability buněk ve srovnání s neupravenou dopovanou vrstvou. Dosažené výsledky, v podobě důkazu povrchové funkčnosti a biokompatibility submikronových vláken na bázi křemíku s obsahem bioaktivních iontů mědi podle příkladu 2 před povrchovou funkcionalizací a po ní, důkazu přítomnosti aminoskupin na povrchu neupravených a upravených prostřednictvím
45 barvení methylovaním, biokompatibilita před povrchovou úpravou a po ní hodnocena na buňkách Hacat, jsou zobrazeny na obr. 4.

Tato vrstva může být aplikována v tomto stavu bez další modifikace, nebo může sloužit k další
50 vazbě biotechnologicky nebo medicínsky významných látek. V tomto případě je vhodná například kombinace aktivní křemičité vrstvy a přírodních antiseptik, růstových faktorů či dalších látek podporujících angiogenezi a hojení ran. To může být vázáno prostou adsorpcí či elektrostatickou vazbou či vazbou kovalentní při zachování vysoké porozity křemičité vrstvy. V případě proteinových látek může být jejich přítomnost na povrchu prokázána (ne)specifickým barvením proteinů a jejich kvantifikací.

55

Příklad 3

Modifikovanou metodou sol-gel je připraven zvláknovací sol – a to smísením 164 ml isopropylalkoholu a 200 ml tetraethylortosilikátu (tetraethoxysilanu), vody a kyseliny tak, aby molární poměry odpovídaly hodnotám 0,43 molárního poměru tetraethoxysilanu ku vodě a zároveň 0,1 molárního poměru kyseliny ku tetraethoxysilanu. Současně byl do směsi přidán dusičnan vápenatý jako zdroj bioaktivních iontů v poměru 0,0072 molů ku tetraethoxysilanu. Takto připravený sol prošel procesem hydrolýzy, polykondenzace a zrání, kdy byl v závěru zahuštěn na 29 % obsahu sušiny z celkové hmotnosti zvláknovacího solu. Tento krok byl zajištěn odparem rozpouštědla.

Takto připravený zvláknovací sol byl následně zpracován metodou odstředivého zvláknování při zachování zvláknovacích podmínek 200 mm a 9000 RPM. Tímto způsobem byla připravena trojrozměrná netkaná vlákenná vrstva se střední hodnotou průměru vláken 463 nm. Morfologie takto připravených submikronových vláken je zobrazena na obr. 5, zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken ve vrstvě podle příkladu 3 je zobrazeno na obr. 5a. Pro dosažení vyšší soudržnosti vrstvy byla provedena teplotní stabilizace expozicí teplotě 180 °C po dobu 2 hodin. Následně byla vrstva povrchově funkcionalizována smáčením po dobu 30 minut ve 2% směsi 3-glycidyloxypropyltriethoxysilanu a ethanolu s podílem 15 % vody. Po opakovaném oplachu v roztoku ethanolu byla vrstva sušena při pokojové teplotě po dobu 48 hodin. Tímto způsobem byla získána křemičitá nanovláknina s obsahem bioaktivních iontů vápníku a současně s funkčním povrchem obsahujícím epoxy skupiny volné k další vazbě zvoleným způsobem.

Tato vrstva může být aplikována v tomto stavu bez další modifikace a sloužit k *in situ* konjugaci (např. jako sensor). Nebo může být konjugována s biotechnologicky nebo medicínsky významnými látkami pro zajištění jejich zvýšené stability při následné aplikaci. Tato povrchová funkcionalizace zajišťuje reaktivitu s celým spektrem látek obsahujících aminoskupiny, sulfanylové skupiny a další. V tomto případě je vhodná například kombinace aktivní křemičité vrstvy a konjugovaného enzymu trypsin využívaného pro debridement ran.

Příklad 4

Modifikovanou metodou sol-gel je připraven zvláknovací sol – a to smísením 164 ml isopropylalkoholu a 200 ml tetraethylortosilikátu (tetraethoxysilanu), vody a kyseliny tak, aby molární poměry odpovídaly hodnotám 0,37 molárního poměru tetraethoxysilanu ku vodě a zároveň 0,11 molárního poměru kyseliny ku tetraethoxysilanu. Současně byly do směsi přidány dusičnan stříbrný, dusičnan měďnatý a dusičnan zinečnatý jako zdroje bioaktivních iontů v poměru 0,007/0,004/0,003 molů ku tetraethoxysilanu. Takto připravený sol prošel procesem hydrolýzy, polykondenzace a zrání, a následně byl zahuštěn na 36 % obsahu sušiny z celkové hmotnosti zvláknovacího solu. Tento krok je zajištěn odparem rozpouštědla.

Takto připravený zvláknovací sol byl následně zpracován metodou elektrostatického zvláknování stejnosměrným proudem (tzv. DC elektrospinning) z drátové elektrody při zachování zvláknovacích podmínek na 165 mm zvláknovací vzdálenosti a rozdílu napětí elektrod 65 kV. Tímto způsobem byla připravena netkaná vlákenná vrstva se střední hodnotou průměru vláken 193 nm. Pro dosažení vyšší soudržnosti vrstvy byla provedena teplotní stabilizace expozicí teplotě 200 °C po dobu 120 minut. Pro dosažení povrchové funkčnosti byla následně vrstva smáčena v 5% roztoku 3-aminopropyltryethoxysilanu rozpuštěném v 96 % ethanolu po dobu 30 minut při laboratorní teplotě. Stabilita funkčních skupin roubovaných na povrch byla po oplachu přebytečného funkcionalizačního činidla, provedeného opakovaně v roztoku ethanolu, podpořena tepelnou úpravou při 110 °C po dobu 30 minut. Tímto způsobem byla získána křemičitá nanovláknina se směsí bioaktivních iontů stříbra, mědi a zinku a současně s funkčním povrchem obsahujícím $-NH_2$ skupiny volné k další vazbě.

Morfologie takto připravených submikronových vláken je zobrazena na obr. 6 pořízeném prostřednictvím elektronové mikroskopie, zastoupení jednotlivých tříd průměrů vláken ve vrstvě podle příkladu 4 je znázorněno na obr. 6a. U takto připraveného materiálu byla prokázána biokompatibilita vůči buňkám kožního krytu dle metodiky popsané v příkladu 1. Dosažené výsledky jsou zobrazeny na obr. 7 v podobě důkazu biokompatibility submikronových vláken na bázi křemíku s obsahem směsi bioaktivních iontů stříbra, mědi a zinku podle příkladu 4 před povrchovou funkcionalizací a po ní, hodnoceno na buňkách Hacat. Dále byla difuzní metodou potvrzena antibakteriální aktivita vrstvy proti dvěma modelovým bakteriálním kmenům *Staphylococcus gallinarum* a *Escherichia coli*. V průběhu testu byla na misku s kultivačním agarem vyočkována bakteriální suspenze o koncentraci 10^4 bakterií/ml. Následně byl přiložen triplikát testovaných vzorků. Po inkubaci při standardních podmínkách ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) po dobu 24 hodin byl vyhodnocen rozměr difuzní zóny v okolí vzorků. Průměrný rozměr 14 mm potvrdil antibakteriální účinnost vzorků na oba bakteriální kmény, jak je znázorněno na obr. 8 v podobě důkazu antibakteriální aktivity submikronových vláken na bázi křemíku s obsahem směsi bioaktivních iontů vůči bakteriím *S. gallinarum* (vlevo) a *E. coli* (vpravo).

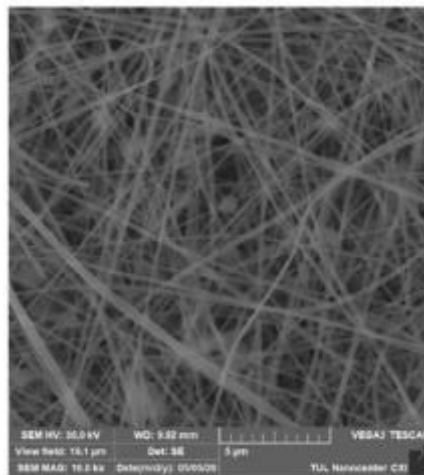
Tato vrstva může být aplikována v tomto stavu bez další modifikace a podpořit například čištění a hojení kontaminovaných a těžko se hojících ran, nebo může sloužit k další vazbě biotechnologicky nebo medicínsky významných látek. V tomto případě je vhodná kombinace s antiseptikem či antibiotikem významným pro dermatovenerologii. To může být vázáno prostou adsorpcí či elektrostatickou vazbou při zachování vysoké porozity křemičité vrstvy. Tímto způsobem může být dosažena aktivní vrstva se synergickým účinkem kombinujícím antibakteriálně účinnou povrchově vázanou látku uvolňující se v řádu hodin až dnů a bioaktivní ionty zajišťující ochranu před druhotnou infekcí po uvolnění léčiva z povrchu či infekcí způsobenou mikroorganismy mimo oblast účinku povrchově vázané aktivní látky.

PATENTOVÉ NÁROKY

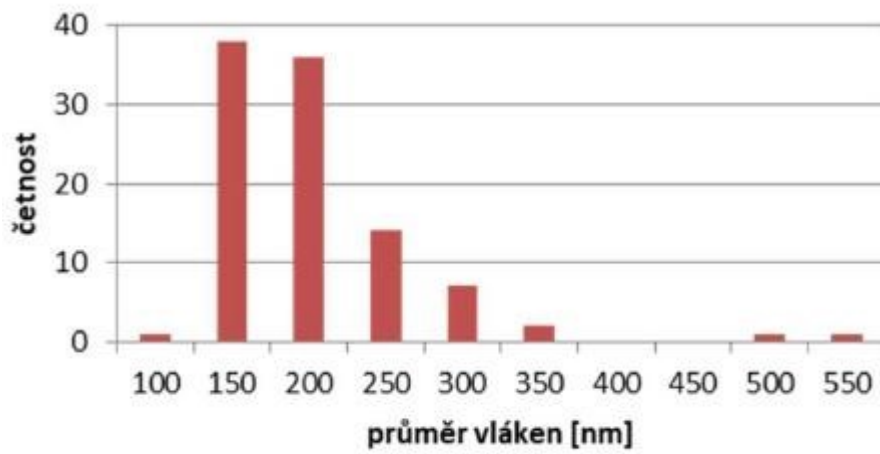
- 5 1. Biokompatibilní a biodegradabilní netkaná vlákenná struktura se submikronovými vlákny na bázi oxidu křemičitého, s biogenními ionty a s funkčním povrchem pro vazbu aktivních látek, **vyznačující se tím**, že vlákna jsou vytvořena zvlákněním solů připraveného metodou sol-gel a jsou přímo ve svém objemu při zvláknění opatřena bioaktivními ionty ze skupiny ionty vápníku a/nebo mědi a/nebo zinku a/nebo stříbra a povrch vláken je funkcionalizován aminoalkylalkoxysilanem nebo epoxyalkylalkoxysilanem.
- 10 2. Způsob výroby biokompatibilní a biodegradabilní netkané vlákenné struktury podle nároku 1, při kterém se zvlákněje sol připravený metodou sol-gel, **vyznačující se tím**, že sol se před zvlákněním syntetizuje z nízkomolekulárního prekurzoru tetraalkoxysilanu metodou sol-gel v alkoholu s přísadkou vody za kyselých katalýz, přičemž tento sol se dopluje bioaktivními ionty ve formě solí již v průběhu jeho přípravy před zvlákněním a po zvláknění se povrch vláken funkcionalizuje aminoalkylalkoxysilanem nebo epoxyalkylalkoxysilanem.
- 15 3. Způsob podle nároku 2, **vyznačující se tím**, že sol se před zvlákněním syntetizuje v roztoku ethanolu nebo isopropylalkoholu a molární poměr tetraalkoxysilanu vůči vodě je v rozmezí 0,3 až 0,65, přičemž pH solů při reakci se upraví přísadkou anorganické či organické kyseliny při poměru kyseliny vůči tetraalkoxysilanu v rozmezí 0,005 až 1.
- 20 4. Způsob podle nároku 2 nebo 3, **vyznačující se tím**, že sol se před zvlákněním zahustí odpařením přebytečného alkoholu na finální koncentraci sušiny v rozmezí 25 a 45 % hmotnostních, vztaženo na celkovou hmotnost zvlákněvacího solů.
- 5 5. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 2 až 4, **vyznačující se tím**, že sol se dopluje bioaktivními ionty vápníku a/nebo mědi a/nebo zinku a/nebo stříbra při udržení molárního poměru solí vůči tetraalkoxysilanu v rozmezí 0,001 až 0,25.
- 25 6. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 2 až 5, **vyznačující se tím**, že zvláknění se provede elektrostatickým a/nebo odstředivým zvlákněním, načež se vlákenná struktura tepelně upraví a případně i ozáří plazmatem pro zvýšení účinnosti následné povrchové modifikace zvoleným funkčním aminoalkylalkoxysilanem nebo epoxyalkylalkoxysilanem.
- 30 7. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 2 až 6, **vyznačující se tím**, že povrch vláken netkané vlákenné struktury se po zvláknění funkcionalizuje v roztoku funkčního aminoalkylalkoxysilanu nebo epoxyalkylalkoxysilanu ve vodě, alkoholu nebo jiném organickém rozpouštědle po dobu 0,5 až 12 hodin při koncentraci funkčního aminoalkylalkoxysilanu nebo epoxyalkylalkoxysilanu 0,1 až 75 %, výhodněji 0,1 až 60 %, ještě výhodněji 0,1 až 25 % a nejvýhodněji 0,1 až 5 % v roztoku.

35

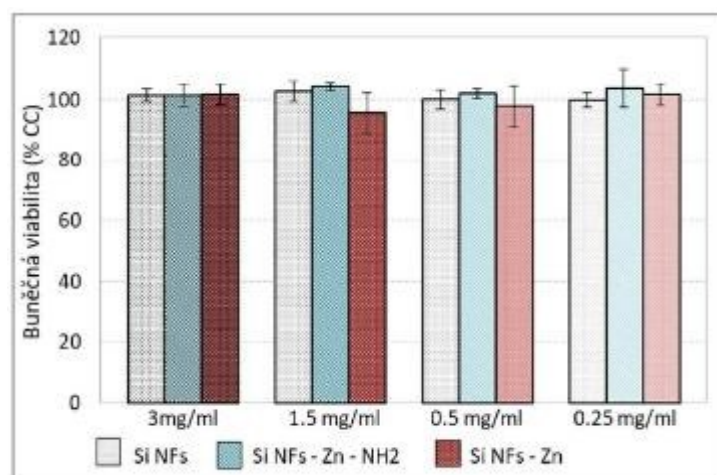
4 výkresy



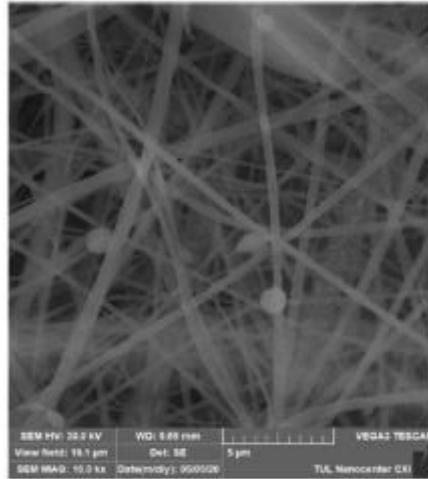
Obr. 1



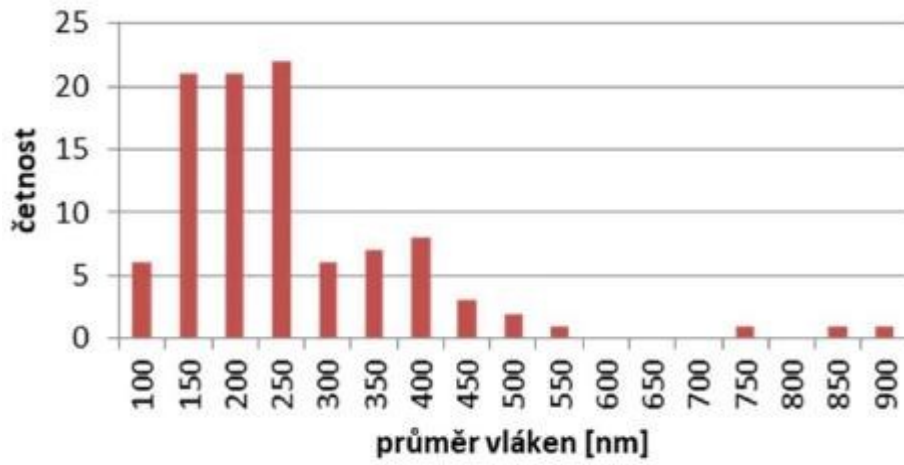
Obr. 1a



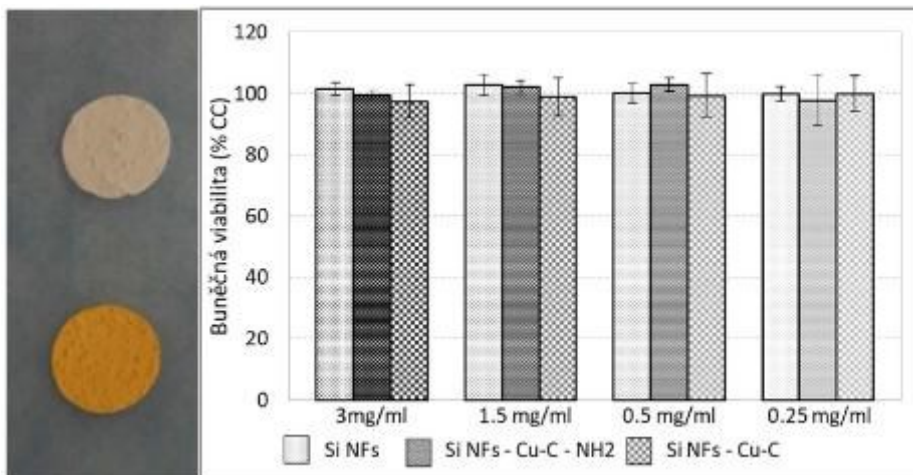
Obr. 2



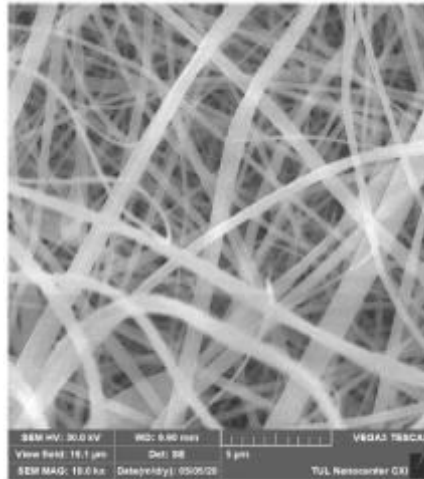
Obr. 3



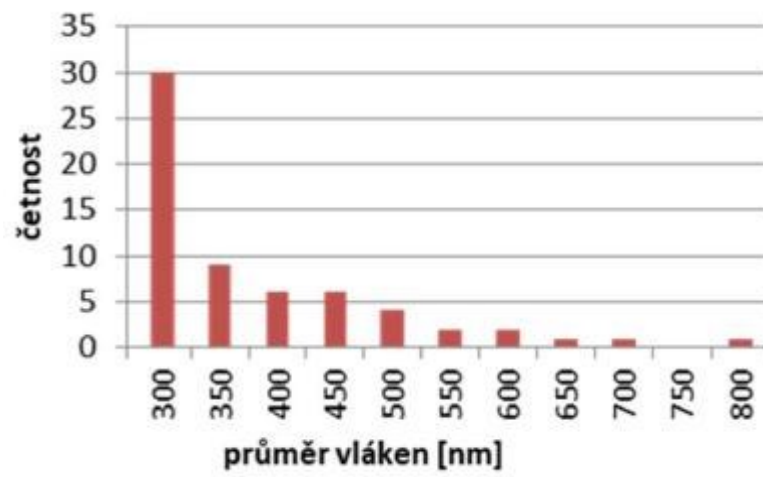
Obr. 3a



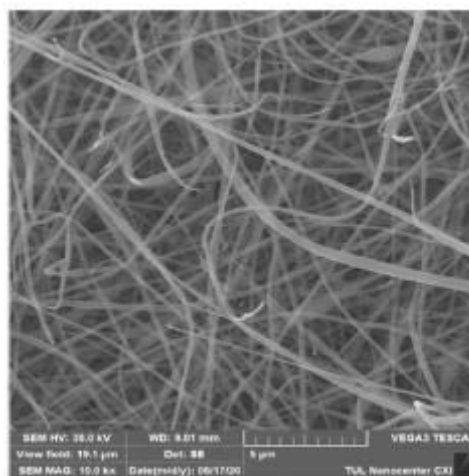
Obr. 4



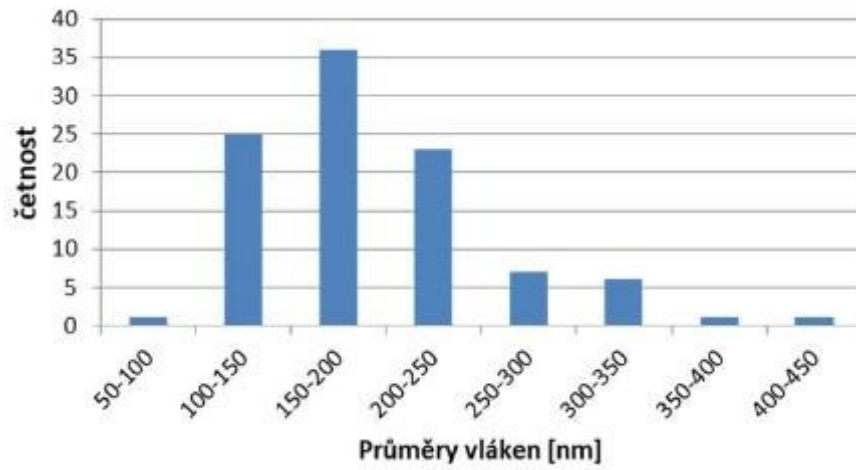
Obr. 5



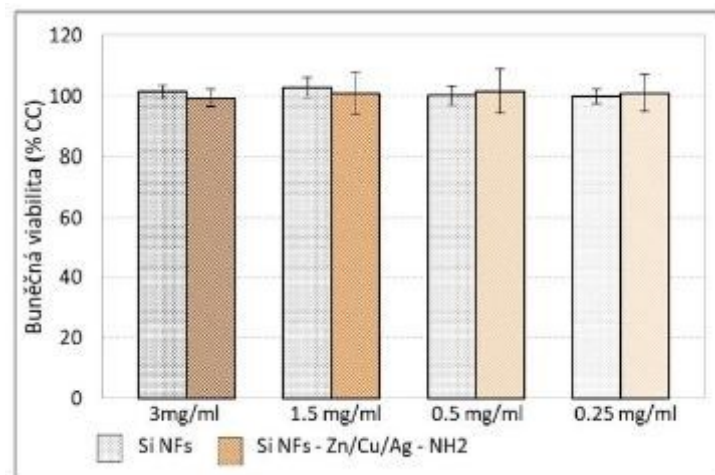
Obr. 5a



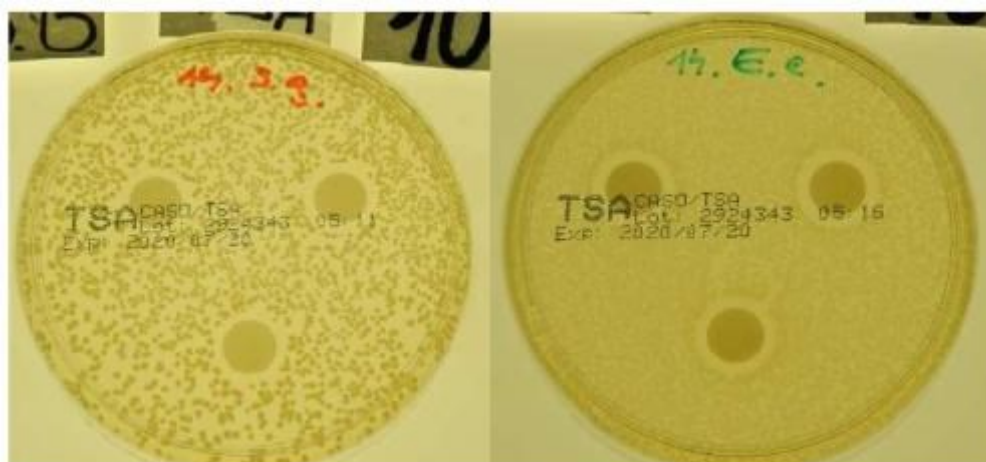
Obr. 6



Obr. 6a



Obr. 7



Obr.8