

UŽITNÝ VZOR

(11) Číslo dokumentu:

37 393

(13) Druh dokumentu: **U1**

(51) Int. Cl.:

B32B 27/30 (2006.01)
B29C 59/14 (2006.01)
B32B 33/00 (2006.01)
B29K 27/12 (2006.01)
B29K 25/00 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2023-40865**
(22) Přihlášeno: **05.04.2023**
(47) Zapsáno: **25.10.2023**

(73) Majitel:
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Praha 6, Dejvice, CZ
Fyziologický ústav AV ČR, v. v. i., Praha 4, Krč,
CZ

(72) Původce:
prof. Ing. Petr Slepíčka, Ph.D., Praha 4, Chodov,
CZ
Ing. Nikola Slepíčková Kasálková, Ph.D., Praha 4,
Chodov, CZ
Ing. Dominik Fajstavr, Ph.D., Trutnov, Horní Staré
Město, CZ
RNDr. Jana Musílková, CSc., Praha 2, Vinohrady,
CZ

(74) Zástupce:
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Technická 1905/5, 160 00 Praha 6, Dejvice

(54) Název užitného vzoru:
**Plazmaticky a/nebo laserově modifikovaná
polymerní folie jako substrát pro růst
kmenových ASC buněk**

Plazmaticky a/nebo laserově modifikovaná polymerní folie jako substrát pro růst kmenových ASC buněk

5 Oblast techniky

Technické řešení se týká polymerního povlaku typického tvaru na plazmaticky modifikované fluoropolymerní folii pro přípravu vaskularizovaných cévních náhrad. Technické řešení spadá do oblasti materiálového inženýrství a tkáňového inženýrství, přičemž rozšiřuje možnosti metod v oblasti cévních náhrad, kdy ASC kmenové buňky izolované z tukové tkáně, mají funkci pericytů, které podporují vaskularizaci, tedy tvorbu přípravu vaskularizovaných cévních náhrad pro cévní zásobení.

15 Dosavadní stav techniky

Mikroporézní polymerní fólie charakterizované úzkou distribucí regulovatelných velikostí a tvarů pórů mají velký význam jak v základním výzkumu, tak v aplikační sféře, např. tkáňovém inženýrství. Porézní filmy s mikrostrukturou konstruované tak, aby napodobovaly strukturu včelí plástve, mají specifické vlastnosti, např. velký specifický povrch či dobrou konstrukční a mechanickou pevnost. Plazmatická modifikace byla využita pro modifikaci perfluorovaných polymerů s následnou přípravou struktur včelí pláštěv, nicméně byla rovněž využita i pro povrchovou aktivaci polyolefinů, např. polystyrenu a jiných polyolefinů.

Stávající způsoby přípravy mikroporézních filmů a jejich modifikace jsou popsány v následujících řádcích. Polymerní materiály jsou vhodnými kandidáty pro přípravu mikroporézních povrchových struktur díky jejich vlastnostem, jako velký specifický povrch, dobrá strukturální stabilita, vysoká mechanická pevnost, nízká hustota, tepelná a zvuková izolace. Unikátní vlastnosti těchto materiálů jsou závislé především na struktuře, použitém materiálu, procesu přípravy a finální aplikaci. Zatímco fyzikální aspekty (mechanické vlastnosti, tepelný odpor atd.) souvisejí s typem použitého polymeru, funkcionalizace HCP povrchů je bezpochyby kritickým aspektem v případě použitelnosti struktur. Funkční vzorované porézní filmy byly použity v různých aplikacích, jako jsou super-hydrofobní povrchy, biomateriály nebo materiály pro aplikace v elektronice. Tyto typy konstrukcí mohou být připraveny různými technikami, např. fotolitografie, samsopřádání či jiné metody. Mezi dalšími technikami byla jako úspěšná metoda pro konstrukci porézních struktur použita technika „breath figure“ (BF). Vzhledem k jejich nízké ceně a dostupnosti byly pro přípravu porézních struktur nejčastěji používány standardní komerční polymery např. polystyren (PS), poly(methyl)metakrylát (PMMA), polykarbonát (PC), poly(e-kaprolakton) (PCL), kyselina polymléčná (PLA), celulóza. Bui et al. popsal dvoustupňovou metodu, nazvanou metoda zlepšené fázové separace (IPS), která byla úspěšně použita při výrobě hexagonálních struktur v normální atmosféře. Hexagonální mikrostruktury byly modifikovány za pomoci laserového svazku Nemodifikovaný polystyren (PS) je standardním materiálem ve tkáňovém inženýrství, a jak původní tak zejména modifikované PS folie byly použity jako substráty pro růst buněk.

45

Podstata technického řešení

Výše popsané postupy přípravy a modifikace jsou popsány pro povrchy bez předpokladu následné povrchové aktivace procesem plazmatické modifikace, či laserové expozice pod prahem morfologické změny ozářeného materiálu. Oproti známému řešení konstrukce HCP struktury jsou tyto postupy vylepšeny pomocí předkládaného technického řešení, které představuje jak povlak fluoropolymerní folie aktivované plazmatem a následně povlakované HCP strukturami PS pro substráty určené pro růst buněk a formaci vaskularizovaných cévních náhrad, tak zejména následné povrchové aktivace připravené mikroporézní struktury. Podstata technického řešení spočívá v tom, že fluoropolymerní folie je plazmaticky modifikována před procesem povlakování a následněm

55

vytvoření hexagonálních struktur, a zejména pak v použití aktivace plazmatem následně připravené polystyrenové folie typu včelí pláštěv. Jako alternativní sekundární modifikace je použita metoda aktivace excimerovým laserem.

- 5 Výhoda použití plazmaticky modifikované FEP (fluorovaný ethylen propylen) folie spočívá v povrchové aktivaci substrátu a změně jeho povrchové energie v kombinaci s nízkou drsností nemodifikovaného substrátu a odolností vůči rozpouštědlům jako chloroform.

10 V jistém výhodném provedení je aktivován povrch fluorované FEP folie, je zvýšena její povrchová energie a signifikantně zvýšen obsah kyslíku na povrchu s následným potažením z roztoku PS.

V dalším výhodném provedení může být plazmatická modifikace inertním Ar plazmatem použita pro změnu zejména povrchové chemie připravené hexagonální PS struktury.

- 15 V dalším výhodném provedení může být modifikace excimerovým KrF laserem použita pro změnu zejména povrchové chemie následně připravené hexagonální PS struktury.

20 Mezi výhodné technické aspekty zde uváděného řešení je použití jinak chemicky odolné FEP folie pro přípravu polymerních vrstev typu včelí pláštěv (hexagonální polymerní struktura). Tato struktura je vytvořena na povrchu FEP folie z roztoku polystyrenu. Unikátní řešení spočívá v plazmatické modifikaci FEP folie, která ve spojitosti s optimální hmotnostní koncentrací PS ve směsi vede k vytvoření PS mikrostruktur a zejména následně plazmatické nebo laserové modifikaci takto připravených mikrostruktur. Tím dochází k zásadní změně vlastností povrchu hexagonálních struktur, zejména pak díky chemicko-fyzikálním vlastnostem (změna zastoupení kyslíku) zlepšují
25 tyto modifikace jeho biokompatibilitu. Povrchová morfologie typu včelí pláštěv zůstává touto změnou morfologicky téměř nedotčena.

Výhodnost spočívá v kombinaci plazmatické modifikace pro expozici jak původní FEP folie, tak použití tohoto jednoduchého procesu pro následnou plazmatickou modifikaci struktur typu včelí
30 pláštěv. Plazmatická aktivace hexagonální struktury z PS v porovnání s neošetřenou PS strukturou typu včelí pláštěv vytváří upravený povrch s vlastnostmi výhodnými pro lepší cytokompatibilitu polymerního nosiče uspořádaného do hexagonálních struktur. Toto technické řešení tak zlepšuje biokompatibilitu povrchu FEP s následnou polystyrenovou vrstvou jako buněčného scaffoldu pro tkáňové kultury, což bylo ověřeno na adhezi, proliferaci a životaschopnosti kmenových ASC
35 buněk. V porovnání s FEP folií s nemodifikovanou polystyrenovou strukturou typu včelí pláštěv byl identifikován výrazně větší počet přilnutých buněk (391 tisíc buněk/cm²) na plazmaticky modifikované PS folii typu včelí pláštěv připravené na FEP folii a (286 tisíc buněk/cm²) na laserově modifikované PS folii typu včelí pláštěv připravené na FEP folii s 1000 pulzy, jednalo se tedy o významný nárůst vůči standardu v tkáňovém inženýrství, tedy polystyrenu.

40 Technické řešení je níže dále objasněno pomocí ilustrativních obrázků a příkladů provedení, které nelze chápat jako omezení nárokovaného rozsahu.

45 Objasnění výkresů

Obr. 1 - schematicky znázorňuje polystyrenovou struktury typu včelí pláštěv připravenou na plazmaticky exponované folii FEP, kdy dochází ponořením do roztoku PS (A) o vhodném složení (poměr chloroform/methanol = 85:15 objemově) k fázové separaci na povrchu FEP a vytvoření
50 struktur typu včelí pláštěv z PS. K povrchové aktivaci takto získané mikrostruktury dochází následně dvěma způsoby – (B) plazmatickou expozicí plazmatem o výkonu 8 W a 240 s; (C) expozicí excimerovým svazkem (vlnová délka 248 nm) s energií 10 mJ cm⁻² a počtem pulzů 100 až 3000.

Obr. 2 - představuje snímek z mikroskopu atomárních sil. Jsou vyobrazeny struktury typu včelí pláštěv z polystyrenu, následně exponované laserovým zářením o energii $10 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ a počtem pulzů 500 (vlevo) a 3000 pulzů (vpravo). Jedná se o modelové představitele mikrostruktury exponované excimerovým svazkem bez zásadní změny povrchové morfologie, jsou uvedeny hodnoty drsnosti (Ra) a efektivní plochy (S).

Obr. 3 - dokládá výrazně zvýšenou adhezi a zejména proliferaci kmenových ASC buněk indukované aditivní plazmatickou a laserovou expozicí mikrostruktur PS typu včelí pláštěv. Je zde patrný rozdíl mezi biokompatibilitou mikrostruktury bez expozice („0“), folie tkáňového polystyrenu (PS) a vlivu sekundární laserové (10 mJ cm^{-2} s počtem pulzů 500, 1000 a 3000) a plazmatické modifikace (plasma – 8 W 240 s).

Obr. 4 - reprezentuje modelovou fotografii buněčné adheze ASC buněk na mikrostruktuře typu včelí pláštěv z PS po plazmatické modifikaci 1. den od nasazení. Je zde ukázán konkrétní typ buněčné vrstvy na vzorku kvantitativně popsáno na Obr. 3.

Příklady uskutečnění technického řešení

Pro technické řešení popsané v tomto příkladu je použita polystyrenová mikrostruktura typu včelí pláštěv připravená procesem vylepšené fázové separace na plazmaticky modifikované folii FEP (hustota $2,15 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, tloušťka $50 \mu\text{m}$; Goodfellow, UK). Pro vytvoření polymerní mikrostruktury z polystyrenu byl použit princip vylepšené fázové separace použitý pro biopolymer PLLA na plazmaticky aktivovaném polymeru PTFE, jenž byl popsán v užitém vzoru č. CZ 32969 U1 (Biopolymerní povlak typu včelí pláštěv na fluoropolymerní fólie pro kostní implantáty). Komerčně dostupný polymer PS (Goodfellow Ltd.) byl rozpuštěn ve směsi chloroformu a methanolu (objemově 85/15), ve 100 mL směsi bylo rozpuštěno 2 g polymeru. Ponořením polymeru FEP do roztoku PS byla vytvořena struktura typu včelí pláštěv z polystyrenu na FEP.- A

Takto připravená mikrostruktura je následně plazmaticky aktivována argonovým plazmatem na zařízení Balzers SCD 050, čistota plynu 99,997 %, tlak 10 Pa, průtok $0,3 \text{ dm}^3\cdot\text{s}^{-1}$, Baltec, UK. V tomto případě dochází vlivem plazmatické aktivace ke změně povrchové chemie mikrostruktury a nárůstu kyslíku, kdy je zachována povrchová morfologie typu včelí pláštěv - B. Alternativou je využití excimerového svazku, kdy vlivem působení KrF laseru o energii $10 \text{ mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ a intervalu počtu pulzů 100 až 3 000 pulzů dochází ke změně povrchové chemie, a nárůstu obsahu kyslíkatých skupin - C.

Mikrostruktura z PS aktivovaná buď Ar plazmatem – 2, nebo excimerovým laserem – 3 byla následně použita pro interakci s kmenovými ASC buňkami a přípravu substrátu s větší proliferací (počtem buněk) po 7. dni od nasazení.

Průmyslová využitelnost

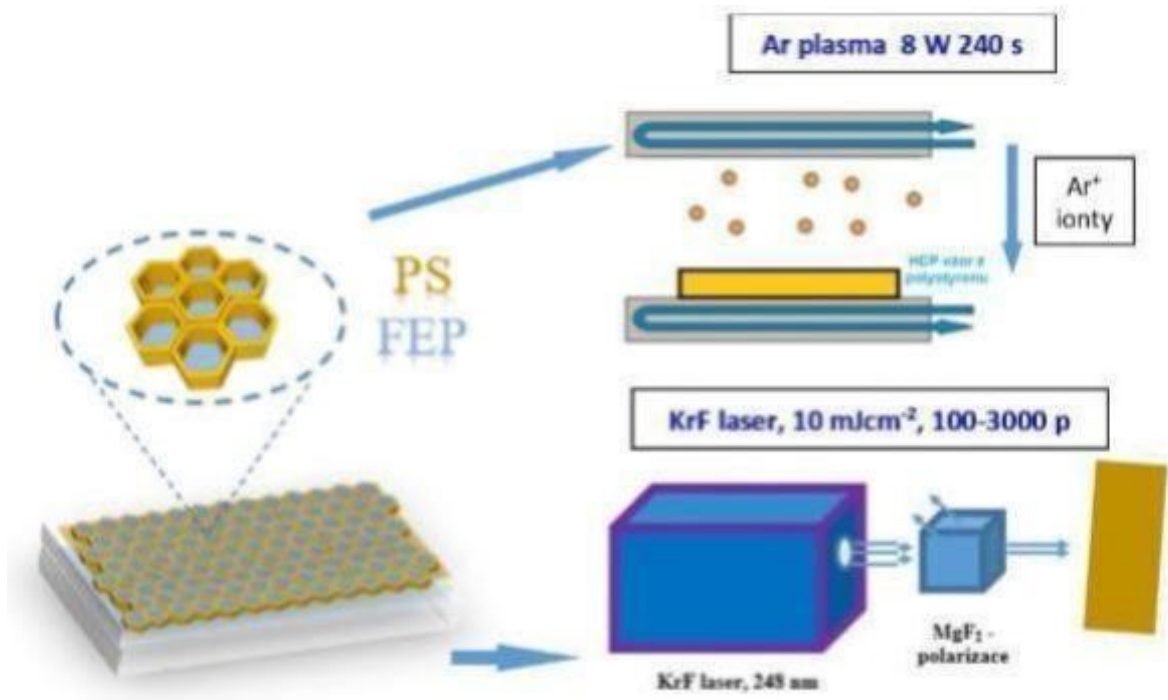
Technické řešení představuje využití modifikace plazmatem a modifikace excimerovým laserem pro přípravu biokompatibilního mikrostrukturního povlaku na jinak inertním polymeru FEP. Plazmatická modifikace je tedy využita jak pro aktivaci primárního nosiče FEP, tak aditivně pro aktivaci následně připravené mikrostruktury. Takto aktivovaný nosič může být obecně využit jako biokompatibilní povlak nanesený na materiály pro tkáňovou regeneraci, zejména přípravu vaskularizovaných cévních náhrad pro cévní zásobení s využitím kmenových buněk.

NÁROKY NA OCHRANU

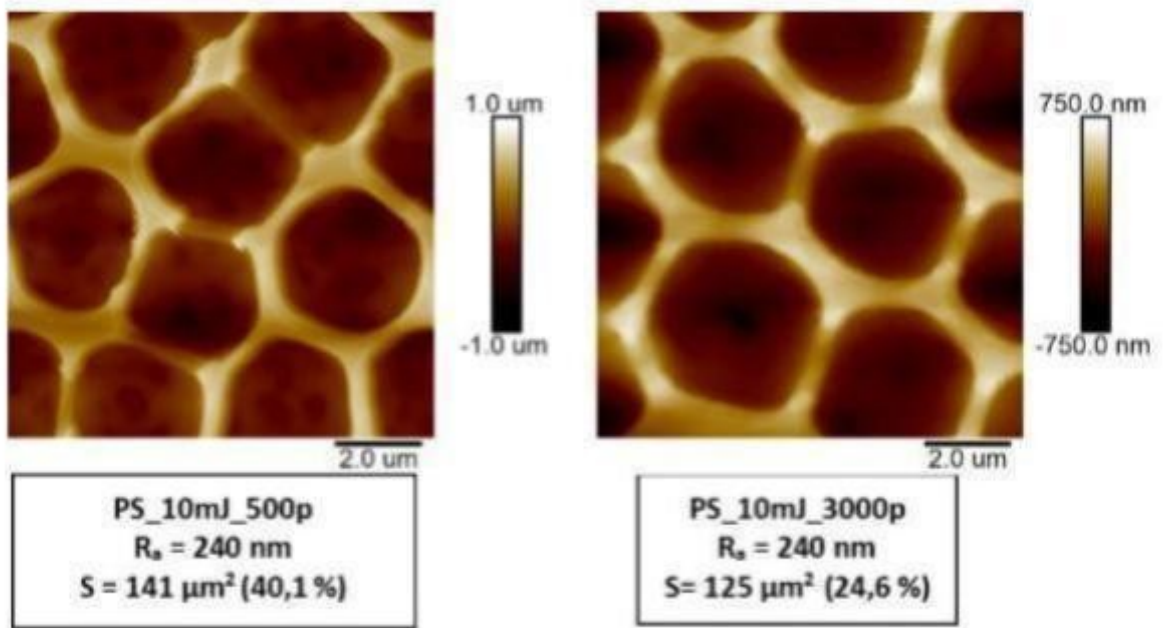
- 5 1. Polystyrenová folie typu včelí pláštěv pro růst kmenových ASC buněk **přípravitelná** na folii z fluorovaného ethylen propylenu metodou dip-coating z roztoku polystyrenu a metodou fázové separace z roztoku methanolu a chloroformu v poměru 85/15 obj. a následně je polystyrenová folie na fluorovaném ethylen propylenu plasmaticky modifikována výkonem 8 W po dobu 240 s, alternativně pak expozicí excimerovým svazkem s vlnovou délkou 248 nm, s energií 10 mJ cm⁻² a počtem pulzů 100 až 3000.

10

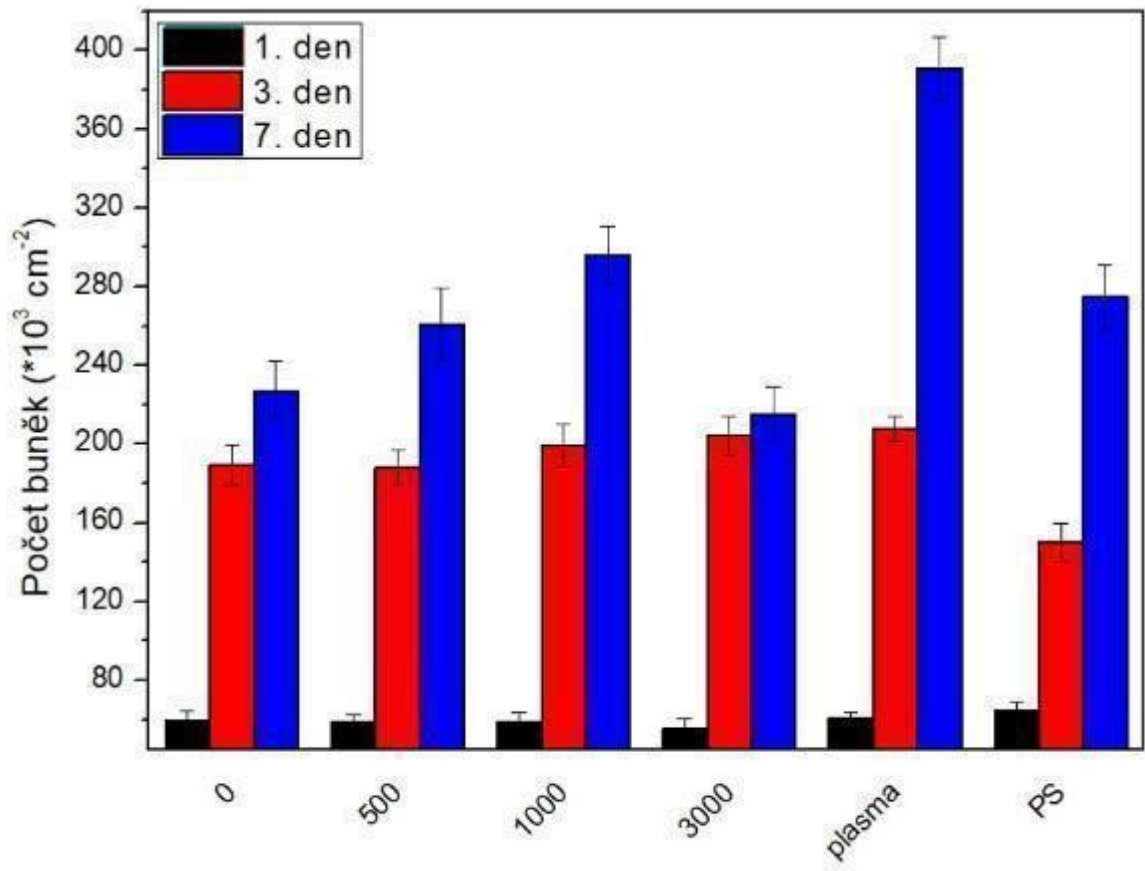
4 výkresy



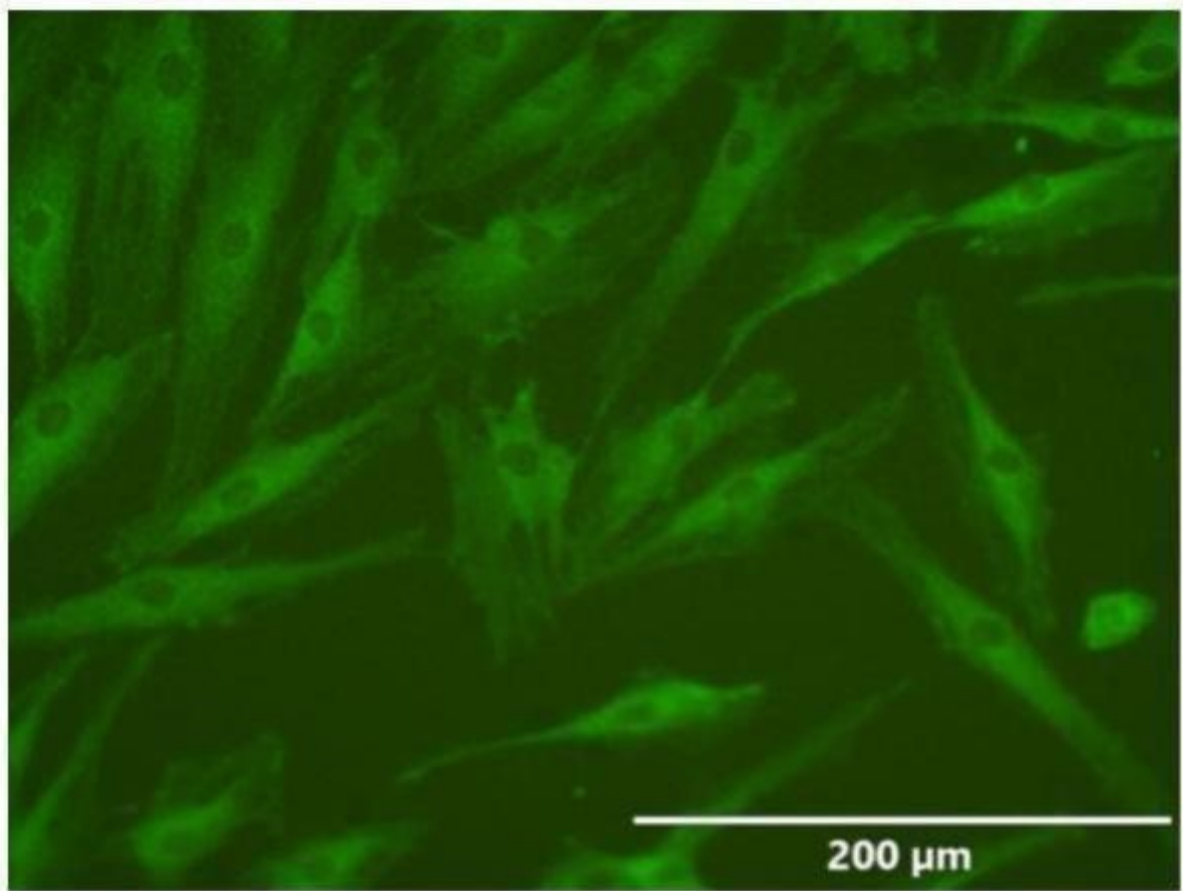
Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4