

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2015-406

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **17.06.2015**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **28.12.2016**
(Věstník č. 52/2016)

C08L 83/04 (2006.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
B82Y 40/00 (2011.01)
C08L 101/16 (2006.01)
D01D 5/00 (2006.01)
A61K 47/30 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

- (71) Přihlašovatel:
JUDr. Jan Kavalírek, Praha 7 Holešovice, CZ
- (72) Původce:
JUDr. Jan Kavalírek, Praha 7 Holešovice, CZ
- (74) Zástupce:
Bohemia Patent, Ing. Jana Vandělíková, Vodičkova
791/41, 110 00 Praha 1

- (54) Název přihlášky vynálezu:
**Způsob výroby hybridní, povrchově aktivní
nanovláknenné struktury s imobilizovanými
aktivními látkami a nanovláknenná
struktura, vyrobená tímto způsobem**

- (57) Anotace:
Technické řešení se týká způsobu 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 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 k imobilizování vybrané aktivní látky, kde tato aktivní látka je prostřednictvím peptidických a/nebo vodíkových vazeb vázána na povrch uvedené nanovláknenné vrstvy. Technické řešení se také týká hybridní nanovláknenné struktury, vytvořené jako nanovláknenná prostorová struktura na bázi nanovláken aktivovaných $-NH_2$ skupinami, kde na povrch nanovláken je navázána aktivní látka, a to vazbou peptidickou nebo vazbou vodíkovými můstky, přičemž přednostně se jedná o hybridní nanovláknennou strukturu vyrobenou způsobem, jak výše uvedeno, kde pak aktivní látkou je přednostně léčivá látka či léčivo.

Způsob výroby hybridní, povrchově aktivní nanovláknenné struktury s imobilizovanými aktivními látkami a nanovláknenná struktura, vyrobená tímto způsobem

Oblast techniky

Vynález se týká nanovláknenné struktury s povrchem aktivovaným již v procesu přípravy polymerních řetězců a následně opatřeným, resp. aktivovaným imobilizovanými aktivními látkami. Vynález se týká především způsobu výroby hybridních nanovláknenných struktur a imobilizace aktivních látek, vázaných na těchto strukturách.

Dosavadní stav techniky

V současnosti se provádí nejčastěji aplikace léčiv, a tak i jejich následné působení nikoliv in situ, tedy na místo požadovaného působení, ale perorálně, což přináší řadu vedlejších účinků včetně negativního vlivu na životně důležité orgány či dokonce včetně jejich trvalého poškození při dlouhodobém užívání. Uvedené negativní vedlejší účinky lze sice omezovat snižováním dávek léčiva, ale tím se zase dochází k dávkování pod minimální účinnou dávkou léčiva, čímž se konečný účinek léčby omezuje či dokonce zaniká. Při aplikaci in situ jsou pak léčivé látky často uloženy v hmotě lékové formy, což s sebou nevyhnutelně nese uvolňování nejen aktivní, tedy terapeutické látky, ale také materiálu nosiče. Negativní reakce organismu může být tedy způsobena nikoli aktivní látkou jako takovou, ale jako odezva na přítomnost nosné látky, aditiv či jejich metabolitů. Z uvedených důvodů je snahou vázat aktivní látku na povrch nosiče. Při aplikaci in situ s uvolňováním aktivní látky z povrchu takového nosiče dochází potom k eliminaci či snížení rizik uvedených zde výše. Problematickým momentem je zde krok aktivace povrchu před samotnou imobilizací aktivní, zpravidla terapeutické látky. V těchto případech je do procesu úpravy nosiče vnesena minimálně jedna další chemická látka, která s sebou nese riziko toxického efektu či negativní reakce organismu. Kromě toho je zde také nárůst ceny takového produktu, prodloužení doby přípravy, a také ekologické aspekty spojené použitím dalších chemických látek a rozpouštědel a jejich likvidací. Co se týče dosavadního stavu techniky v oblasti nosičů aktivních, resp. terapeutických látek pro aplikaci in situ, je další, již déle řešenou problematikou právě forma těchto nosičů, a to zejména ve vztahu k rozměrům

nosiče, který přímo ovlivňuje maximální možné množství aktivní látky imobilizované na jeho povrchu.

V současnosti jsou známa sama o sobě křemičitá nanovlákná, též povrchově funkcionalizovaná nanovlákná a také i některé metody povrchové funkcionalizace křemičitých povrchů. Například se jedná o tzv. metodu „one pot“, která ale byla dosud využita pouze k modifikaci křemičitých nanočástic a nikoli nanovláken. Významná odlišnost ve stavbě a vlastnostech křemičitých nanočástic a nanovláken je zcela jasně prokazatelným faktorem, který má za následek, že i přes podobnost reakčních směsí se liší reakční podmínky, které významně ovlivňují průběh polymerační reakce a typ vznikajícího polymerního řetězce.

Podstata vynálezu

Uvedené nedostatky odstraňuje hybridní nanovláknenná struktura s imobilizovanými aktivními látkami, jejíž podstata, celkově v obecné rovině, spočívá v tvorbě křemičitých nanovláken modifikovaných $-NH_2$ skupinami již v procesu jejich přípravy. Na jejich povrch jsou následně, a to bez nutnosti použití dalších povrchových funkcionalizací zavádějících $-NH_2$ funkční skupinu, tedy tzv. silylace, imobilizovány aktivní látky prostřednictvím peptidické vazby a/nebo vodíkových můstků.

Nanovláknenné struktury jsou známy řadou výjimečných vlastností, přímo souvisejících s průměry jednotlivých vláken, jsoucích v řádech desítek až stovek nanometrů. Jejich hlavními přednostmi pro aplikaci v této oblasti jsou vysoký měrný povrch a velice dobré adhezivní vlastnosti, především muko-adheze. Tyto vlastnosti umožňují jejich snadnou aplikaci in situ a zaručují několikanásobně vyšší množství látky imobilizované na jejich povrch ve srovnání se stejnou plochou struktur s nižším měrným povrchem, jako jsou mikrovláknenné struktury, apod.

Použití hybridních nanovláken na bázi oxidu křemičitého jako hlavní složky zaručuje biokompatibilitu, projevující se jako inertní chování ve styku s buněčným materiálem a také rozpustnost v tělních tekutinách. Ta je zaručena tepelnou stabilizací při teplotách pod $200^\circ C$. Rozpustnost nanovláken na bázi oxidu křemičitého zaručuje aplikační bezpečnost, neboť v případě dlouhodobějšího vystavení aplikačního místa působení hybridních nanovláken a kompletnímu uvolnění imobilizované aktivní látky dochází k rozpouštění samotného nosiče a nemůže dojít k poškození či iritaci aplikačního místa. Další výhodou hybridních nanovláken je, že kromě zavedených $-NH_2$ skupin obsahuje jejich povrch také řadu $-OH$ skupin, které mohou být využity k dalším modifikacím či doprovodným reakcím s aktivními látkami.

V souladu s předkládaným vynálezem potom vlastní podstata způsobu výroby hybridní nanovláknenné struktury s imobilizovanými aktivními látkami spočívá v tom, že se provede

- příprava výchozího hybridního solu metodou sol-gel, a to tak, že základní reakční směs, obsahující tetraalkoxysilan, je 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 imobilizované aktivní látky, kde tato aktivní látka je prostřednictvím peptidických a/nebo vodíkových vazeb vázána na povrch uvedené nanovláknenné vrstvy.

Dále je podstatou ještě hybridní nanovláknenná struktura, vytvořená jako nanovláknenná prostorová struktura na bázi nanovláken, aktivovaných $-NH_2$ skupinami, kde na povrch nanovláken je navázána aktivní látka, a to vazbou peptidickou nebo vazbou vodíkovými můstky. S výhodou tato uvedená hybridní nanovláknenná struktura s imobilizovanými aktivními látkami je vyrobená výše uvedeným způsobem. V takovém případě je zvláště výhodné, jestliže imobilizovaná aktivní látka je vybrána z rozsahu: léčivá látka, léčivo, aktivní agens, terapeutický agens.

Celkově tedy jde o to, že se vytvoří nanovláknenná struktura s povrchem aktivovaným $-NH_2$, přičemž látka obsahující tuto funkční skupinu je přidávána do reakční směsi přímo v procesu přípravy zvláknovacího solu metodou sol-gel za kyselé katalýzy, a je tedy zabudována přímo do tvořených molekulárních řetězců. Další, následně prováděné zpracování solu elektrostatickým zvláknováním umožňuje získání povrchově aktivní nanovláknenné struktury ve formě vrstvy či jiné. Univerzálnost vzniklého aktivního povrchu nanovláken umožňuje imobilizaci prokazatelného a relativně vysokého množství řady lékařsky a biochemicky aktivních látek, čímž je následně pak umožněna jejich vysoce účinná aplikace in situ.

Příklady uskutečnění vynálezu

Vynález bude popsán na příkladu vytvoření hybridní nanovláknenné struktury funkcionalizované zabudováním funkčních amino skupin, na kterážto nanovláknna jsou dále prostřednictvím reakce s touto skupinou imobilizovány aktivní látky. Dále uvedené příklady uskutečnění vynálezu ukazují pouze jednu možnost z celého spektra možných realizací a aktivních molekul. Tento fakt, stejně jako zde blíže nepopsané další možnosti uskutečnění vynálezu musejí být průměrnému odborníkovi zřejmé bez vynaložení další vynálezecké činnosti.

V uvedeném příkladu bylo jako aktivní molekula zvoleno antibiotikum tetracyklin umožňující rychlou a účinnou imobilizaci a prokázání aktivity.

Příklad 1 – způsob výroby

Výchozí sol pro přípravu funkcionalizovaných křemičitých nanovláken byl připraven speciálně upravenou metodou sol-gel. Příprava zvláknovacího roztoku metodou sol-gel byla provedena zpracováním 370 ml směsi základních prekurzorů tetraethoxysilanu (TEOS) a aminopropyltriethoxysilanu (APTES) v molárním poměru $[\text{TEOS}]/[\text{APTES}] = 18$. Rozpouštědlem pro obě komponenty byl izopropylalkohol v molárním poměru $[\text{IPA}]/[\text{TEOS}] = 2,75$. Kyselá hydrolýza proběhla za přítomnosti vody při počátečním molárním poměru $[\text{H}_2\text{O}]/[\text{TEOS}] < 3$. Po zakončení hydrolýzy a polykondenzační reakce byl zvláknovací sol upraven na finální koncentraci 32% hmotnostních.

Hybridní křemičitý sol byl následně zpracován metodou elektrostatického zvláknování při napětí 40 kV a vzdálenosti elektroda-kolektor 13 cm. Takto připravená homogenní nanovláknenná vrstva se vyznačovala střední hodnotou průměru vláken 230 nm. Připravená nanovláknenná vrstva byla následně tepelně zpracována po dobu 2 hodin při teplotě 180°C. Tímto postupem byla získána stabilní, ale biodegradabilní, hybridní křemičitá nanovláknna funkcionalizovaná amino skupinami. Takto připravená nanovláknenná vrstva nevyžadovala další povrchovou funkcionalizaci a umožňovala přímou imobilizaci antibiotika na povrch nanovláken. Ta byla dosažena smočením nanovláknenné vrstvy v 3% roztoku tetracyklinu v etanolu jako hlavním rozpouštědle po dobu 1 hodiny, a to při laboratorní teplotě. Nanovláknna s imobilizovanou aktivní látkou byla následně opakovaně promyta v bezvodém ethanolu a vysušena.

Účinnost inkorporace funkčních skupin do nanovláknenné vrstvy stejně jako účinnost imobilizace antibiotika byla ověřena mikroskopicky fluorescenčním barvením. Ověření aktivity imobilizovaného antibiotika bylo provedeno sérií antibakteriálních testů na spektru bakteriálních kmenů, konkrétně *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* a *Pseudomonas aeruginosa*. Hodnocení antimikrobiální aktivity bylo provedeno dotykovou metodou, kdy byl vzorek nanovláknenné vrstvy s imobilizovaným antibiotikem umístěn na agarový substrát s inokulem příslušného bakteriálního kmene. Hodnocení bylo provedeno po 24 hodinách inkubace při standardních podmínkách. U všech vzorků byly pozorovány výrazné inhibiční zóny. Účinnost u testovaných kmenů dosahovala minimálně 80%. Testy antibakteriální aktivity tak prokázaly vysokou antibakteriální účinnost imobilizace a imobilizovaného antibiotika ve srovnání s prázdným vzorkem, tzn. hybridními křemičitými nanovláknny bez imobilizované aktivní látky.

Příklad 2 – nanovláknenná struktura

Příkladně se uvádí nanovláknenná struktura, vyrobená na bázi prostorové struktury nanovláken, a to způsobem podle příkladu 1, kde na povrch nanovláken je vázána aktivní látka, která je zde volena jako léčivo, a to konkrétně léčivo ve formě tetracyklinu.

Průmyslová využitelnost

Způsob podle vynálezu je použitelný pro získání nanovláknenné struktury, nesoucí aktivní látku, kde pak tato struktura je s výhodou využitelná přednostně k aplikaci aktivní látky in situ. Nanovláknenná struktura podle vynálezu je analogicky použitelná pro aplikaci aktivní látky, nejčastěji léčiva, apod., in situ.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. 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 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 k imobilizování vybrané aktivní látky, kde tato aktivní látka je prostřednictvím peptidických a/nebo vodíkových vazeb vázána na povrch uvedené nanovláknenné vrstvy.
2. Způsob výroby podle nároku 1, kde přímá imobilizace aktivní látky na povrch nanovláken je dosažena smáčením nanovláknenné struktury v roztoku aktivní látky v ethanolu za normálního tlaku a při teplotě 18 až 25°C, s následným promytím v bezvodém ethanolu a konečným vysušením.
3. Hybridní nanovláknenná struktura, vytvořená jako nanovláknenná prostorová struktura na bázi nanovláken aktivovaných $-NH_2$ skupinami, kde na povrch nanovláken je navázána aktivní látka, a to vazbou peptidickou nebo vazbou vodíkovými můstky.
4. Hybridní nanovláknenná struktura s imobilizovanými aktivními látkami, podle nároku 3, vyrobená způsobem podle nároku 1 nebo 2.
5. Hybridní nanovláknenná struktura podle nároku 4, kde imobilizované aktivní látky jsou vybrány z rozsahu: léčivá látka, léčivo, aktivní agens, terapeutický agens.