

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10)

PL 243410 B1

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437224**

(22) Data zgłoszenia: **2021.03.04**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.09.05 BUP 36/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.08.21 WUP 34/2023**

(51) MKP:

A61F 2/08 (2006.01)

A61L 27/08 (2006.01)

A61L 31/08 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**CARBONMED SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Wrocław, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

DARIUSZ HRENIAK, Wrocław, PL

MARIUSZ HASIAK, Wrocław, PL

MAGDALENA WAWRZYŃSKA, Wrocław, PL

VITALII BOIKO, Wrocław, PL

(74) Pełnomocnik:

Dorota Orlińska, Warszawa, PL

(54) Tytuł:

**Sposób pokrywania wszczepialnego urządzenia medycznego powłoką grafenu oraz
zastosowanie tego sposobu**

PL 243410 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób pokrywania wszczepialnego urządzenia medycznego powłoką grafenu oraz zastosowanie tego sposobu.

Wynalazek dotyczy urządzenia medycznego, zwłaszcza implantu i stentu wewnątrznacyniowego, w tym implantu i stentu do zastosowań w tętnicach wieńcowych, tętnicach szyjnych, nerkowych oraz innych tętnicach obwodowych, wykonanego ze stopu metali do zastosowań medycznych, przy czym jego powlekanie warstwą grafenu prowadzi się *in situ*. Wynalazek dotyczy także innych wszczepialnych urządzeń medycznych mających długotrwały kontakt z tkankami, ze ścianami naczyń i z krwią.

Wszczepialne urządzenia medyczne, zwłaszcza stenty naczyniowe, są często pokrywane różnego rodzaju powłokami, które poprawiają właściwości tych urządzeń. W przypadku stentów wewnątrznacyniowych naniesione na nie powłoki pozytywnie wpływają na procesy fizjologiczne zachodzące w tkance naczynia po wszczepieniu stentu np. wzmagają pożądane procesy w chorobowo zmienionych tkankach. Powłoki naniesione na stentach inhibują stany zapalne pojawiające się w bezpośrednim sąsiedztwie stentu.

Technologie nanoszenia powłok grafenu ogólnie na różnych podłożach metalowych, są znane i mogą bazować na metodach takich jak: chemicznego osadzania z fazy gazowej (CVD, j. ang.: *Chemical Vapor Deposition*), epitaksji na podłożu krystalicznym, redukcji tlenku grafitu (utlenionego grafitu), eksfoliacji i innych. Znane jest także pokrywanie urządzeń medycznych powłoką grafenu, jednak znacznie ograniczona jest możliwość zastosowania poszczególnych, znanych technologii nanoszenia powłok węglowych, w tym grafenowych.

W klasycznych technikach CVD, opartych na procesach termolizy prekursora na powierzchni podłoża, stosowane są dwa typy reaktorów, tj. reaktory pracujące w układzie gorący reaktor/gorące podłoże (HW, j. ang.: *Hot-Wall*) oraz, w drugim typie, zimny reaktor/gorące podłoże (CW, j. ang.: *Cold-Wall*).

W obecnie prowadzonych badaniach zwraca się uwagę na fakt, że dla każdego podłoża metalicznego warunki nanoszenia powłok węglowych są dobierane indywidualnie, a w przypadku stopów wieloskładnikowych, zawierających kilka metali oraz domieszki niemetaliczne, proces nanoszenia powłok jest bardziej skomplikowany i trudno jest przewidzieć wszystkie efekty wynikające z zastosowanych technologii. Proces wzrostu powłoki grafenu metodą CVD jest ściśle związany z obecnością poszczególnych pierwiastków i ich związków chemicznych w osadzonym podłożu. Niektóre metale i ich tlenki mogą hamować proces tworzenia się warstwy grafenowej, a niektóre mogą ten proces aktywować. Dlatego, w tej dziedzinie prowadzi się ciągle poszukiwania odpowiednich metod nanoszenia grafenu na konkretnie wybranych podłożach.

Niniejszy wynalazek dotyczy wytwarzania powłok na drodze chemicznego osadzania z fazy gazowej – CW-CVD.

Stopy przeznaczone do celów medycznych, przykładowo stop L-605 są znane. Stop ten może występować pod innymi równoważnymi nazwami/oznaczeniami jako np.: stop 25, UNS R30605, W.Nr.2.4964, Haynes® 25, UDIMET®, ATI L-605, CarTech® L-605, VDM® 25, Conicro 5010 i inne. Skład chemiczny tego stopu wskazano poniżej (% wag.), przy czym dopełnienie do 100% stanowi kobalt (Co):

Fe	Ni	Cr	W	C	Mn	Si	P	S
≤3,0	9,0- 11,0	19,0– 21,0	14,0– 16,0	0,05- 0,15	1,00– 2,00	≤0,40	≤0,04	≤0,03

Z publikacji M. Wawrzyńska, i inni „Biocompatible Carbon-Based Coating as Potential Endovascular Material for Stent Surface”, Biomed Res Int., vol. 2018, Oct. 4, 2018, ID: 2758347, znane są sposoby nanoszenia warstwy grafenu na stal nierdzewną (316L) do zastosowań medycznych. Warstwa grafenu była osadzana metodą CVD na podłożu miedzianym, a następnie przeniesiona na powierzchnię stali 316L metodą transferu z wykorzystaniem poli(metakrylanu metylu) (PMMA).

Z opisu zgłoszenia międzynarodowego WO2006071297A1 znane jest urządzenie medyczne w postaci tubularnej, rozszerzalnej endoprotezy, np. stentu, pokrytej częściowo arkuszem nanorurek węglowych, która może być mocowana na stencie z udziałem kompozycji polimerowych. Arkusz nanorurek węglowych rozciąga się na tej części endoprotezy, która nie jest rozszerzalna i jest bardziej sztywna. Arkusze nanorurek mogą być także nanoszone z użyciem rozpuszczalników m.in. takich jak toluen.

Z opisu zgłoszenia międzynarodowego WO2006052538A2 znana jest metoda pokrywania urządzeń medycznych powłoką, przy czym metoda ta obejmuje przygotowanie roztworu zawierającego środek

czynny (np. lek) i prekursor nanorurek węglowych, a także obróbkę roztworu w celu utworzenia nanorurek węglowych w roztworze. W kolejnym etapie następuje pokrywanie tym roztworem wyrobu medycznego, przy czym można zastosować powlekanie zanurzeniowe, natryskowe, wtrysk roztworu do formy lub inne metody.

Z publikacji A. Garcia-Argumanez, I. Llorente, O. Caballero-Calero, Applied Surface Science, Volume 465, 28 January 2019, str. 1028–1036 znane są metody nanoszenia warstw tlenku grafenu z redukcją elektrochemiczną (ErGO) na stopie Co-Cr klasy biomedycznej. Proces bezpośredniego osadzania elektrolitycznego przeprowadza się za pomocą dwóch technik elektrochemicznych: chronoamperometrii i woltamperometrii cyklicznej, z uwzględnieniem stężenia tlenu w roztworze. Obie procedury redukcji elektrochemicznej doprowadziły do osadzenia warstw grafenu na powierzchniach Co-Cr po częściowym usunięciu utlenionych grup funkcyjnych obecnych w sieci grafenowej materiału wyjściowego. Powłoki ErGO, które zostały ułożone na powierzchniach Co-Cr, wykazywały niejednorodną grubość, osiągając wartości odpowiadające obecności 80 warstw grafenowych. Ponadto spektroskopia Ramana ujawniła pewne zaburzenie strukturalne w kolejnych warstwach ErGO.

Z polskiego zgłoszenia wynalazku PL-P414368 znane jest zastosowanie powłoki grafenowej do powlekania wszczepialnego urządzenia medycznego, przy czym powłokę stanowi przynajmniej jedna warstwa grafenu tworząca jednolitą powłokę składającą się z nachodzących na siebie płatków grafenu. W tym przypadku najkorzystniej powłokę grafenową stanowi od 1 do 10 nieciągłych warstw grafenu. Niestety w zgłoszeniu tym nie ujawniono sposobu wytwarzania powłoki grafenu ani sposobu nanoszenia grafenu na urządzenie medyczne.

Przedmiotem wynalazku jest sposób pokrywania wszczepialnego urządzenia medycznego powłoką grafenu, poprzedzony etapem przygotowania urządzenia medycznego obejmującym jego oczyszczanie, charakteryzujący się tym, że urządzenie medyczne ze stopu kobaltowo-chromowego Co-Cr typu L-605 pokrywa się powłoką grafenu na drodze procesu chemicznego osadzania z fazy gazowej na zimno CW-CVD obejmującego etapy, w których: a) utrzymuje się urządzenie medyczne w próżni, b) ogrzewa się urządzenie medyczne do zadanej temperatury wyższej od temperatury pokojowej i wygrzewa je w atmosferze redukującej, c) opcjonalnie dodatkowo ogrzewa się urządzenie medyczne do temperatury wynoszącej co najmniej 900°C, jeżeli w etapie b) utrzymywano niższą temperaturę, oraz opcjonalnie wygrzewa się urządzenie medyczne w tej temperaturze w atmosferze redukującej, a następnie d) tworzy się na urządzeniu medycznym powłokę grafenu, w środowisku mieszaniny metanu i wodoru, w temperaturze wynoszącej co najmniej 900°C, a następnie ochładza się urządzenie medyczne.

Korzystnie, atmosferę redukującą zapewnia się w środowisku mieszaniny argonu z wodorem.

Korzystnie, etap d) tworzenia powłoki grafenu prowadzi się w temperaturze wynoszącej od 900 do 1100°C, a w etapie a) urządzenie medyczne utrzymuje się w próżni od 30 minut do 90 minut.

Korzystnie, w etapie b) wygrzewanie prowadzi się w temperaturze wynoszącej co najmniej 90°, korzystnie w temperaturze wynoszącej od 90°C do 1100°C.

Korzystnie, etap d) tworzenia powłoki grafenu na urządzeniu medycznym prowadzi się w czasie od 600 do 3600 s.

Korzystnie, urządzenie medyczne ma formę płaską 2D lub przestrzenną 3D, korzystnie, urządzenie medyczne stanowi stent, korzystnie wewnątrznaczyniowy.

Przedmiotem wynalazku jest także zastosowanie procesu chemicznego osadzania z fazy gazowej na zimno CW-CVD, określonego powyżej, do wytwarzania wszczepialnego urządzenia medycznego pokrytego powłoką z grafenu, przy czym urządzenie jest wykonane ze stopu kobaltowo-chromowego Co-Cr typu L-605.

Sposób według wynalazku umożliwia pokrycie docelowo ukształtowanych, całych, gotowych elementów metalowych urządzeń medycznych takich jak stentów kardiowaskularnych wykonanych ze stopu kobaltowo-chromowego, dokładniej stopu kobaltowo-chromowo-wolframowo-niklowego typu L-605. Sposób umożliwia zachowanie odpowiednich własności materiału metalicznego podłoża przy jednoczesnym nadaniu jemu nowych, korzystnych cech biologicznych objawiających się wzrostem szybkości pokrycia powierzchni implantu śródbłonkiem naczyniowym w stosunku do referencyjnych stentów niepokrywanych powłoką grafenową.

Urządzenie medyczne uzyskane sposobem według wynalazku cechuje się bardzo dobrymi właściwościami w zakresie hemokompatybilności powierzchni, co skutkuje zmniejszeniem częstości występowania powikłań po implantacji stentu, takich jak tworzenie się zakrzepów na powierzchni implantu. Zakrzepica związana z implantami śródnaczyniowymi stanowi istotny problem kliniczny, którego przewyciężenie jest możliwe poprzez zastosowanie urządzeń powlekanych grafenem.

W badaniach aplikacyjnych in vitro na komórkach śródbłonna naczyniowego na stentach GBMS (stenty pokryte warstwą grafenową) wzrost HUVEC był o 51,2% wyższy niż na stentach BMS (stenty referencyjne, niepowlekane) bez powłoki grafenowej. Wskazuje to, że powłoka grafenowa sprzyja zasiedlaniu komórek śródbłonna, a implant pokryty warstwą naczyniową wykazuje cechy szybszego gojenia się tkanki otaczającej materiał po implantacji niż implant niepokryty powłoką grafenową.

Wyniki testu hemokompatybilności, rozumianej jako zdolność do inaktywacji procesów krzepnięcia krwi, wskazują, że próbki ze stopu Co-Cr (L-605), pokryte warstwą grafenu nie wykazywały prokoagulacyjnego działania otrzymanej warstwy. Powyższe wyniki, wraz z udowodnionym uzyskaniem osadzenia dobrej jakości warstw grafenu, przy zastosowaniu stosunkowo taniej techniki CW-CVD, dają możliwość zastosowania opisanej technologii w dziedzinie medycyny.

Sposobem według wynalazku otrzymano urządzenia z warstwą grafenu na dużej powierzchni podłoża ze stopu Co-Cr (L-605) w procesie CVD na zimno (CW) i potwierdzono uzyskanie powłoki grafenowej pomiarami spektroskopii ramanowskiej.

Część eksperymentalna wynalazku obejmuje wstępne przygotowanie wszczepialnego urządzenia medycznego do procesu CW-CVD, następnie prowadzenie zasadniczego procesu naniesienia powłoki grafenu na urządzeniu, i wykonanie badań na uzyskanym produkcie w postaci urządzenia medycznego zawierającego powłokę z grafenu.

Wstępne przygotowanie urządzenia polega na poddaniu go znanym ze stanu techniki procesom albo standardowo stosowanym w przypadku wszczepialnych urządzeń medycznych albo procesów przygotowujących podłoża do procesów CVD, które wymagają bardzo dokładnego oczyszczania podłoża z wszelkich śladów zanieczyszczeń organicznych, tłuszczów, pyłów, wilgoci, dwutlenku węgla i innych. Wstępne przygotowanie urządzenia prowadzone przed poddaniem go procesowi CW-CVD obejmuje polerowanie i/lub wygrzewanie i/lub oczyszczanie, przy czym możliwe jest także dodanie innych znanych procedur np. obróbkę elektrochemiczną.

Polerowanie, zazwyczaj na drodze procesów chemicznych, jest typowym etapem stosowanym w produkcji implantów czy stentów wewnątrznaczyniowych. Sposób według wynalazku może być realizowany na urządzeniach polerowanych jak i niepolerowanych, przy czym w drodze wykonanych badań stwierdzono, że na podłożu niepolerowanym szybciej i łatwiej narasta powłoka grafenu, a więc przy prowadzeniu procesu modyfikuje się jego warunki dostosowując je do rodzaju podłoża. Powłoka polerowana wymaga przykładowo w procesie CW-CVD dłuższego etapu wyżarzania urządzenia medycznego przed etapem nanoszenia grafenu. Także inne parametry procesu dostosowuje się w pewnym zakresie w zależności od tego, czy podłożo Co-Cr zostało już wstępnie wypolerowane.

Wygrzewanie urządzeń medycznych ze stopów metali stanowi typowy i znany etap ich obróbki pozwalający na kształtowanie ich pożądanych właściwości mechanicznych.

Oczyszczanie urządzenia medycznego przed właściwym procesem CW-CVD jest jedynym obowiązkowym etapem wstępnej obróbki, jakiej poddaje się urządzenie. W celu oczyszczenia urządzenia stosuje się np. detergenty, wodę destylowaną lub dejonizowaną oraz rozpuszczalniki organiczne, wybrane z grupy obejmującej np. etanol, aceton, izopropanol. W wymienionych kąpielach płucze się implanty czy stenty przez kilka, kilkanaście minut, korzystnie w płuczkach ultradźwiękowych.

Zasadniczy proces nanoszenia powłoki grafenu według wynalazku obejmuje odpompowanie gazów z komory reakcyjnej do uzyskania próżni, pozostawienie urządzenia medycznego w próżni, ogrzewanie komory reakcyjnej z urządzeniem medycznym do zadanej podwyższonej temperatury, wygrzewanie urządzenia w atmosferze redukującej, korzystnie w mieszaninie argonu z wodorem, następnie opcjonalnie dalsze ogrzewanie komory reakcyjnej jeśli powyższy etap był prowadzony w temperaturze niższej niż wymagana docelowa temperatura prowadzenia etapu nanoszenia grafenu wynosząca od 900 do 1100°C. Następnie tworzy się na urządzeniu medycznym powłoki z grafenu w środowisku metanu, w temperaturze wynoszącej co najmniej 900°C i na koniec prowadzi się ochłodzenie komory reakcyjnej wraz z urządzeniem medycznym, korzystnie prowadzone w obecności argonu. Zamiast argonu możliwe jest stosowanie innego gazu inertnego.

Proces nanoszenia powłoki grafenu według wynalazku zawiera więc obligatoryjny etap osiągnięcia próżni w komorze reakcyjnej i utrzymywania w tych warunkach urządzeń medycznych w celu usunięcia wszystkich gazów z otoczenia, zwłaszcza usunięcia pozostałości tlenu i jego związków z powierzchni podłoża. Następnie, w jednym etapie lub stopniowo, w kilku etapach ze wzrastającą temperaturą wygrzewania, przykładowo w dwóch etapach lub w trzech etapach, prowadzi się nagrzewanie komory reakcyjnej i wygrzewanie urządzeń medycznych w atmosferze mieszaniny argonu i wodoru. W końcu, po osiągnięciu przez urządzenia medyczne docelowej temperatury wynoszącej co najmniej 900°C prowadzi się etap

nanoszenia warstwy grafenu w obecności metanu jako prekursora. Na potrzeby niniejszego wynalazku, o ile inaczej wyraźnie nie wskazano, określenie „próżni” rozumie się jako warunki, w których ciśnienie jest niskie i wynosi 10 tor (Tr) lub mniej. Wszystkie etapy ogrzewania urządzeń medycznych, ich wygrzewania oraz osadzania powłoki grafenu prowadzi się w warunkach próżni wynoszącej poniżej 10 Tr. Etap wstępny odpompowywania gazów z komory reakcyjnej prowadzi się do uzyskania najniższego ciśnienia w zakresie od 0,5 do 0,05 Tr.

W pierwszym wykonaniu wynalazku dysk, tj. postać dwuwymiarowa (2D) urządzenia medycznego albo stent, tj. postać trójwymiarowa (3D) urządzenia ze stopu Co-Cr jest umieszczany w komorze roboczej CW-CVD, po czym prowadzi się kolejno: odpompowanie gazów do uzyskania próżni w zakresie od 0,7 do 0,05 Tr i utrzymanie urządzenia 2D lub 3D w warunkach próżni, korzystnie przez co najmniej 30 min, np. w czasie od 30 do 60 min; następnie doprowadzenie komory reakcyjnej wraz z dyskiem lub stentem w jednym lub dwóch etapach (w tym przypadku zatrzymujemy proces grzania na 90°C co najmniej na 300 s) docelowo do temperatury mieszczącej się w zakresie od 900°C do 1100°C (czyli temperatury, przy której odbywa się nanoszenie grafenu) i w tych warunkach, tj. w temp. 90°C, wygrzewanie dysku lub stentu w czasie wynoszącym od 300 s do 4000 s, przy optymalnej atmosferze gazów argonu i wodoru wynoszącej od 100 do 200 sccm dla argonu oraz od 10 sccm do 20 sccm dla wodoru; następnie, ponieważ opisane powyżej wygrzewanie dysku lub stentu odbywa się w temperaturze niższej niż docelowa temperatura etapu nanoszenia powłoki grafenu, nadal prowadzi się ogrzewanie dysku lub stentu do temperatury wynoszącej od 900°C do 1100°C; a następnie prowadzi się nanoszenie warstwy grafenu, przy czym na tym etapie zapewnia się atmosferę mieszaniny gazów wodoru oraz metanu, przy czym dla wodoru utrzymuje się przepływ wynoszący od 1 do 10 sccm, a dla metanu od 10 do 20 sccm, a jednocześnie utrzymuje się nadal temperaturę procesu wynoszącą od 900°C do 1100°C oraz warunki próżni od 0,05 do 10 Tr, przy czym czas nanoszenia grafenu wynosi od 1800 s do 3600 s.

W drugim wykonaniu wynalazku ogrzewanie komory reakcyjnej wraz z płytką albo stentem ze stopu Co-Cr prowadzi się w jednym etapie, od razu osiągając temperaturę docelową zadaną do prowadzenia etapu osadzania grafenu na podłożu. Tak więc, płytkę lub stent umieszcza się w komorze roboczej CW-CVD, po czym prowadzi się kolejno: odpompowanie gazów do uzyskania próżni w zakresie od 0,7 do 0,05 Tr i utrzymanie dysku lub stentu w warunkach próżni, korzystnie przez co najmniej 10 min, co najmniej 30 min, np. w czasie od 30 do 90 min, np. 60 min. Następnie doprowadza się komorę reakcyjną wraz z dyskiem lub stentem do temperatury mieszczącej się w zakresie od 900°C do 1100°C i w tych warunkach wygrzewa się płytkę lub stent przez czas wynoszący od 600 s do 4000 s, przy optymalnej atmosferze gazów argonu i wodoru wynoszącej od 100 do 200 sccm dla argonu oraz od 10 sccm do 20 sccm dla wodoru, a następnie przeprowadza się nanoszenie warstwy grafenu, przy czym na tym etapie zapewnia się atmosferę mieszaniny gazów wodoru oraz metanu, przy czym dla wodoru utrzymuje się przepływ wynoszący od 10 do 20 sccm, a dla metanu od 10 do 20 sccm, a jednocześnie utrzymuje się nadal temperaturę procesu wynoszącą od 900°C do 1100°C oraz warunki próżni od 0,05 do 10 Tr, przy czym czas nanoszenia grafenu wynosi od 600 s do 3600 s.

Na podstawie widm Ramanowskich stwierdzono, że w etapie tworzenia powłoki grafenowej w temperaturze wynoszącej 900°C na powierzchni urządzeń medycznych po 10 min zaczyna pojawiać się grafen w postaci wysp. Ze wzrostem czasu trwania procesu wyspy rozrastają i tworzy się warstwa grafenowa, która jest łatwo identyfikowalna metodą mapowania z wykorzystaniem spektroskopii Ramanowskiej. Dla wyższych temperatur, czyli powyżej 1100°C powstająca warstwa grafenu ma gorszą jakość. Pojawiają się na powierzchni wyspy grafitu, które zawierają ponad 10 i więcej warstw atomowych węgla. W przypadku płytek i dysków (urządzenia 2D) zaobserwowano, że temperatury wygrzewania mogą być niższe, a w etapie nanoszenia grafenu wystarczający jest proces prowadzony przy 900°C ale trwający dłużej, ponad 2000 s, np. od 2000 s do 3600 s, przykładowo od 2500 s do 2800 s.

W przypadku wyrobów 3D, optymalny proces na etapie powstawania warstwy grafenu, wymaga temperatury wynoszącej 1100°C, a więc podniesionej w stosunku do wyrobów 2D, co wynika prawdopodobnie z innego mechanizmu dyssypacji ciepła w wyrobach 3D. Proces w przypadku wyrobów 3D jest prowadzony stosunkowo krótko, w czasie od 600 do 800 s, np. w czasie 600 s. W niższych temperaturach, wynoszących poniżej 900°C możemy uzyskać warstwę grafenu gorszej jakości, a proces naniesienia grafenu jak i wygrzewanie stentu musi być wydłużony do ponad godziny.

Na potrzeby niniejszego wynalazku za urządzenia 2D uważa się wszelkie urządzenia dwuwymiarowe takie jak płytki, dyski, taśmy i inne, a za urządzenia trójwymiarowe uważa się stenty, tuleje, pierścienie, spirale, struktury plecione, wycinane laserowo i inne.

Przykłady nanoszenia na urządzenia medyczne powłok grafenu metoda CW-CVD

Przed etapem osadzania grafenu każda próbka podłoża, tj. urządzenia medycznego w postaci dysków i stentów ze stopu Co-Cr L-605, została oczyszczona w celu usunięcia zanieczyszczeń powierzchniowych, kolejno poprzez: płukanie w acetonie (99,5%) przez 10 minut w kąpeli ultradźwiękowej, płukanie w alkoholu etylowym (96,5%) przez 10 minut w kąpeli ultradźwiękowej, oraz płukanie w izopropanolu (99,7%) przez 10 minut w kąpeli ultradźwiękowej.

Urządzenia medyczne ze stopu Co-Cr L-605 pokrywano grafenem w urządzeniu nanoCVD-8G, Moorfield Nanotechnology Ltd (UK). Przygotowane, oczyszczone podłoża umieszcza się bezpośrednio na nagrzewnicy (4,0 cm x 2,5 cm) osadzonej na termoparach. Urządzenie CVD jest sterowane elektronicznie w sposób ciągły raportując stan komory reakcyjnej w zakresie jej temperatury oraz przepływu gazów procesowych wyrażonego w sccm (standardowe centymetry sześciennego na minutę). Próżnia w komorze jest kontrolowana przez manometr pojemnościowy 20 Tr (pełna skala) o wskazaniach z dokładnością odczytu 0,5 Tr.

Przykład 1

Dysk lub stent Co-Cr umieszczono w komorze roboczej CW-CVD, po czym odpompowano gazy do uzyskania próżni w zakresie od 0,7 do 0,1 Tr i utrzymywano dysk lub stent w warunkach próżni przez 60 min. Następnie, doprowadzono komorę reakcyjną z dyskiem lub stentem do temperatury 90°C i w tych warunkach prowadzono wygrzewanie dysku lub stentu przez czas wynoszący 300 s, przy optymalnej atmosferze gazów argonu i wodoru wynoszącej 100 sccm dla argonu oraz 20 sccm dla wodoru. Ciśnienie na tym etapie utrzymywano przy wartości 10 Tr. Następnie, ponownie ogrzewano urządzenia medyczne w komorze reakcyjnej do temperatury 900°C, utrzymując warunki ciśnienia i przepływu gazów: argonu i wodoru jak w poprzednim etapie wygrzewania. Następnie prowadzono nanoszenie warstwy grafenu, przy czym na tym etapie zapewniano atmosferę mieszaniny gazów wodoru oraz metanu, przy czym przepływ wodoru wynosił od 2 sccm, a metanu 20 sccm, a jednocześnie utrzymywano temperaturę wynoszącą 900°C oraz warunki próżni wynoszące 10 Tr, przy czym czas prowadzenia tego etapu nanoszenia grafenu wynosił 2700 s. Proces zakończono chłodzeniem swobodnym urządzenia medycznego do temperatury 100°C w atmosferze argonu przy ciśnieniu 10 Tr.

Przykład 2

Płytkę lub stent umieszczono w komorze roboczej CW-CVD, odpompowano gazy do uzyskania próżni w zakresie od 0,7 do 0,1 Tr i utrzymywano płytkę lub stent w warunkach próżni przez 60 min. Następnie ogrzano dysk lub stent w komorze do temperatury 1100°C i po osiągnięciu tych warunków wygrzewano płytkę lub stent przez 3600 s, przy optymalnej atmosferze gazów argonu i wodoru wynoszącej od 100 sccm dla argonu oraz 20 sccm dla wodoru. Na tym etapie utrzymywano ciśnienie wynoszące 2 Tr. Następnie prowadzono nanoszenie warstwy grafenu, przy czym na tym etapie zapewniono atmosferę mieszaniny gazów wodoru oraz metanu, przy czym dla wodoru utrzymuje się przepływ wynoszący od 20 sccm i dla metanu 20 sccm, a jednocześnie utrzymuje się nadal temperaturę procesu wynoszącą od 1100°C oraz warunki próżni wynoszące 2 Tr, przy czym czas prowadzenia tego etapu nanoszenia grafenu wynosił od 600 s. Proces zakończono chłodzeniem urządzenia medycznego do temperatury 100°C w atmosferze argonu przy ciśnieniu 2 Tr.

Tabela 1

Warunki prowadzenia opisanych procesów w przykładzie 1 oraz przykładzie 2, bez wskazania wstępnego etapu osiągnięcia próżni w komorze reakcyjnej

Etap procesu	t [s]	T [°C]	p [Tor]	Ar [sccm]	H ₂ [sccm]	CH ₄ [sccm]
PRZYKŁAD 1						
grzanie	–	90	10	100	20	0
wygrzewanie	300	90	10	100	20	0
grzanie	–	900	10	100	20	0
naniesienie warstwy grafenu	2700	900	10	0	2	20
chłodzenie	do 100 °C w atmosferze Ar przy zadanym ciśnieniu (10 Tr)					

PRZYKŁAD 2						
grzanie	–	1100	2	100	20	0
wygrzewanie	3600	1100	2	100	20	0
naniesienie warstwy grafenu	600	1100	2	0	20	20
chłodzenie	do 100 °C w atmosferze Ar przy zadanym ciśnieniu (2 Tr)					
Uwaga: symbolem „–” oznaczono etap, w którym komora reakcyjna jest doprowadzana do wskazanej temperatury, przy tym czas tego etapu może być zmienny (orientacyjnie czas grzania od temperatury pokojowej do 900°C wynosi 100 s).						

Badania urządzeń medycznych zawierających naniesione powłoki grafenu

Spektroskopia ramanowska (Ramana)

Ocenę uzyskanych urządzeń medycznych i osadzonych na nich powłok grafenu przeprowadzono metodą spektroskopii Ramana z wykorzystaniem mikroskopu z funkcją konfokalną, co pozwoliło na potwierdzenie uzyskania grafenu na dysku i na stencie. Widma ramanowskie rejestrowano za pomocą mikroskopu Renishaw inVia Raman (20× oraz 100×, powiększenie) wyposażonego w laser VIS Ar (514 nm, 50 mW) i kamerę CCD w warunkach środowiskowych (Renishaw pic, Wotton-under-Edge, UK). Zakres detekcji 100–3200 cm^{-1} , maksymalna moc na powierzchni próbki (~ 9 mW). Na fig. 2 przedstawiono widmo ramanowskie zarejestrowane dla urządzenia medycznego w postaci dysku, uzyskanego w powyższym przykładzie 1, a na fig. 3 widmo dla urządzenia medycznego w postaci stentu, uzyskanego w powyższym przykładzie 2. Wyznaczona ze stosunku intensywności 2D do G ilość warstw grafenu dla tych urządzeń medycznych mieściła się średnio między wartością 3 i 4. Na uzyskanych urządzeniach medycznych nie zaobserwowano obszarów zawierających więcej niż 10 warstw grafenu, a na niektórych wyrobach nie zaobserwowano więcej niż 5 warstw grafenu. Jednocześnie przeprowadzone badania wykazały niejednorodność uzyskanej powłoki grafenu, tj. charakteryzuje się zróżnicowaną grubością w zakresie od 1 do 4 albo do 5 warstw grafenu.

Badanie biokompatybilności stentów pokrytych powłoką grafenu

Komórki śródbłonna pierwotnej linii HUVEC hodowano w podłożu EGM-2 bullet kit zawierającym suplementy wzrostu oraz 2% surowicę. Komórki trypsynizowano i ustalano ich gęstość na 5×10^5 komórek/ml. Stenty niepowlekane – BMS (j. ang.: bare metal stent) oraz pokryte powłoką grafenową – GBMS, zanurzano w PBS (pH 7.4), aby zwilżyć ich powierzchnię i umieszczano w dołkach płytki hodowlanej. Do dołków wlewano następnie zawiesinę komórek HUVEC o ustalonej gęstości i inkubowano 24 godz. w 37°C w atmosferze 5% CO_2 . Po inkubacji stenty przenoszono za pomocą jałowej pęsety do nowych dołków i płukano je trzykrotnie w ogrzonym PBS, aby usunąć luźno związane komórki. Następnie stenty znów przenoszono do nowych dołków i dodawano podłoże hodowlane z dodatkiem odczynnika WST1 (20 μl na 200 μl podłoża), który pozwala na ocenę proliferacji i żywotności komórek. Próbkę inkubowano 2 godz. w 37°C w atmosferze 5% CO_2 . Komórki żywe metabolizują WST1 do barwnych produktów, tj. formazanu. Z każdego dołka ze stentami pobierano $4 \times 100 \mu\text{l}$ na płytkę 96-dołkową i dokonywano spektrofotometrycznego pomiaru absorbancji przy długości fali 450 nm. Na stentach GBMS wzrost HUVEC był o 51,2% wyższy niż na stentach BMS bez powłoki grafenowej, co przedstawiono na fig. 1. Wskazuje to, że powłoka grafenowa sprzyja zasiedlaniu komórek śródbłonna.

Badane urządzenia medyczne pokryte powłoką grafenu wykazały bardzo dobrą biokompatybilność w badaniach cytotoksyczności, genotoksyczności oraz hemokompatybilności zgodnie z obowiązującą normą ISO 10993.

Badania starzeniowe urządzeń medycznych pokrytych powłoką grafenu

Próbki urządzeń medycznych ze stopu L-605, uzyskanych sposobem według wynalazku, zostały poddane starzeniu w roztworze soli fizjologicznej. Nie zauważono wpływu starzenia na zmiany topografii badanych materiałów w formie próbek płaskich. Na wszystkich próbkach poddanych starzeniu w czasie do 11 tygodni w roztworze soli fizjologicznej obserwowano widmo ramanowskie specyficzne dla warstwy grafenowej. Uzyskane wyniki wskazały brak istnienia jakichkolwiek struktur węgla we wszystkich ze zbadanych roztworów soli fizjologicznej potwierdzając w ten sposób ostatecznie, że naniesiona warstwa nie ulega oderwaniu i migracji do roztworu.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób pokrywania wszczepialnego urządzenia medycznego powłoką grafenu, poprzedzony etapem przygotowania urządzenia medycznego obejmującym jego oczyszczanie, **znamienny tym**, że urządzenie medyczne ze stopu kobaltowo-chromowego Co-Cr typu L-605 pokrywa się powłoką grafenu na drodze procesu chemicznego osadzania z fazy gazowej na zimno CW-CVD, obejmującego etapy, w których:
 - a) utrzymuje się urządzenie medyczne w próżni,
 - b) ogrzewa się urządzenie medyczne do zadanej temperatury wyższej od temperatury pokojowej i wygrzewa je w atmosferze redukującej,
 - c) opcjonalnie dodatkowo ogrzewa się urządzenie medyczne do temperatury wynoszącej co najmniej 900°C, jeżeli w etapie b) utrzymywano niższą temperaturę, oraz opcjonalnie wygrzewa się urządzenie medyczne w tej temperaturze w atmosferze redukującej, a następnie
 - d) tworzy się na urządzeniu medycznym powłokę grafenu, w środowisku mieszaniny metanu i wodoru, w temperaturze wynoszącej co najmniej 900°C,a następnie ochładza się urządzenia medyczne.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że atmosferę redukującą zapewnia się w środowisku mieszaniny argonu z wodorem.
3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny tym**, że etap d) tworzenia powłoki grafenu prowadzi się w temperaturze wynoszącej od 900 do 1100°C.
4. Sposób według zastrz. 1 albo 2 albo 3, **znamienny tym**, że w etapie a) urządzenie medyczne utrzymuje się w próżni od 30 minut do 90 minut.
5. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. od 1 do 4, **znamienny tym**, że w etapie b) wygrzewanie prowadzi się w temperaturze wynoszącej co najmniej 90°.
6. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. od 1 do 5, **znamienny tym**, że w etapie b) wygrzewanie prowadzi się w temperaturze wynoszącej od 90°C do 1100°C.
7. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. od 1 do 6, **znamienny tym**, że etap d) tworzenia powłoki grafenu na urządzeniu medycznym prowadzi się w czasie od 600 do 3600 s.
8. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. od 1 do 7, **znamienny tym**, że urządzenie medyczne ma formę płaską 2D lub przestrzenną 3D.
9. Sposób według któregośkolwiek z zastrz. od 1 do 8, **znamienny tym**, że urządzenie medyczne stanowi stent, korzystnie wewnątrznaczyniowy.
10. Zastosowanie procesu chemicznego osadzania z fazy gazowej na zimno CW-CVD, określonego w zastrz. od 1 do 9, do wytwarzania wszczepialnego urządzenia medycznego pokrytego powłoką z grafenu, przy czym urządzenie jest wykonane ze stopu kobaltowo-chromowego Co-Cr typu L-605.

Rysunki

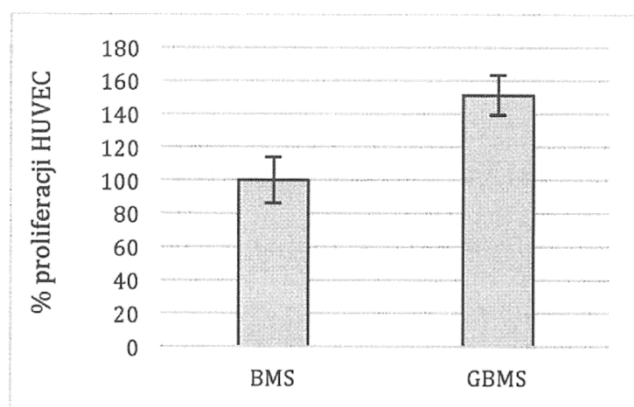


Fig. 1

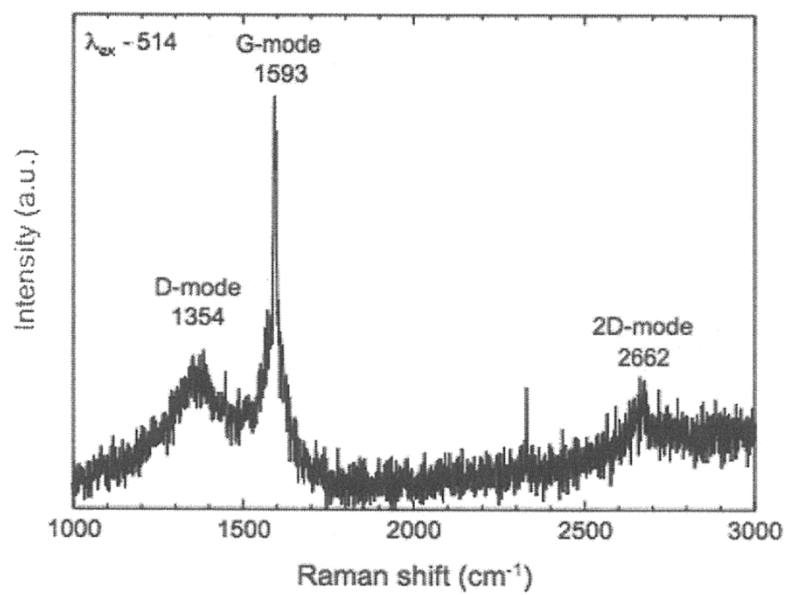
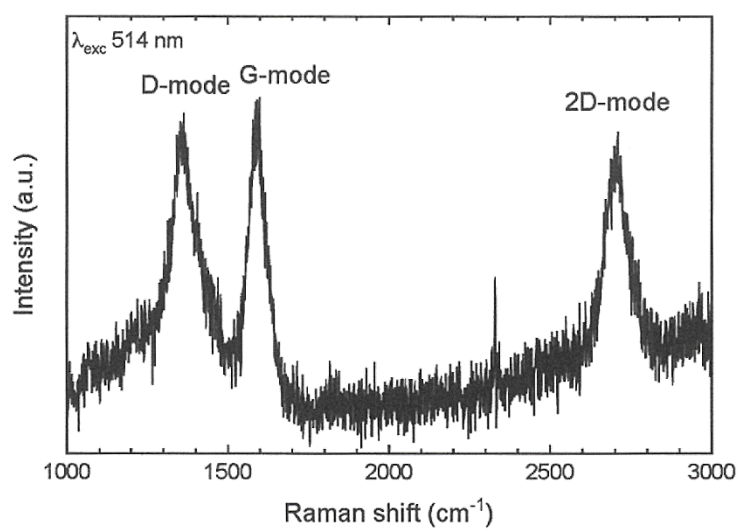


Fig. 2

**Fig. 3**