

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **228884**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **414353**

(22) Data zgłoszenia: **13.10.2015**

(51) Int.Cl.
C08J 9/26 (2006.01)
C08K 7/02 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)

(54) **Sposób otrzymywania szerokoporowatego, poliestrowego rusztowania komórkowego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

24.04.2017 BUP 09/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.05.2018 WUP 05/18

(73) Uprawniony z patentu:

**INSTYTUT BIOCYBERNETYKI I INŻYNIERII
BIOMEDYCZNEJ IM. MACIEJA NAŁĘCZA
POLSKIEJ AKADEMII NAUK, Warszawa, PL
POLITECHNIKA WARSZAWSKA,
Warszawa, PL**

**INSTYTUT PODSTAWOWYCH PROBLEMÓW
TECHNIKI POLSKIEJ AKADEMII NAUK,
Warszawa, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**ANDRZEJ CHWOJNOWSKI, Warszawa, PL
EWA ŁUKOWSKA, Warszawa, PL
CEZARY WOJCIECHOWSKI, Sulejówek, PL
AGNIESZKA GADOMSKA-GAJADHUR,
Warszawa, PL**

**ALEKSANDRA KRUK, Warszawa, PL
PAWEŁ RUŚKOWSKI, Wołomin, PL
LUDWIK SYNORADZKI, Warszawa, PL
PIOTR DENIS, Kobyłka, PL
JUDYTA DULNIK, Busko-Zdrój, PL
PAWEŁ SAJKIEWICZ, Otrębusy, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Grażyna Padée

PL 228884 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania szerokoporowatego, poliestrowego rusztowania komórkowego typu 3D, w formie membrany półprzepuszczalnej.

Trójwymiarowe rusztowania komórkowe (scaffolds), są przestrzennymi strukturami służącymi do prowadzenia hodowli tkankowych. Najczęściej mają one formę membran półprzepuszczalnych, co zapewnia dostarczanie komórkom składników odżywczych oraz wyprowadzanie metabolitów na zewnątrz rusztowania. Do wytwarzania membran często stosowanymi materiałami są syntetyczne poliestry, takie jak polilaktyd (PLA), polikaprolakton (PCL), poliglikolid (PGA) oraz ich kopolimery. Charakteryzują się one biogodnością, biokompatybilnością oraz biodegradowalnością i są dobrze tolerowane przez organizm. Związki te oraz produkty ich rozpadu nie są toksyczne wobec komórek organizmu, ulegają w organizmach hydrolitycznemu rozkładowi, najpierw do budujących je monomerów, występujących fizjologicznie w organizmach ssaków, a następnie do CO₂ i wody, produktów fizjologicznej przemiany materii, które są z łatwością wydalane z ustroju. Poliestry te różnią się między sobą czasem degradacji, który dla określonego polimeru wzrasta wraz z długością łańcucha węglowego. Dzięki tej właściwości, dobierając odpowiedni polimer o określonym ciężarze cząsteczkowym, można w pewnym zakresie sterować czasem degradacji całego rusztowania.

Ze względu na łatwość przetwórstwa poliestry są często stosowane w inżynierii tkankowej oraz farmacji. Są rozpuszczalne w niepolarnych rozpuszczalnikach organicznych takich jak: chloroform, dichlorometan, 1,4-dioksan, tetrahydrofuran i mieszaninach tych rozpuszczalników, natomiast nie rozpuszczają się w związkach polarnych, takich jak woda czy alkohole. Dzięki temu do wytwarzania poliestrowych scaffoldów można zastosować metodę mokrej inwersji faz, polegającą na tym, że mieszaninę membranotwórczą (polimer lub polimery membranotwórcze, dodatek lub dodatki porotwórcze i rozpuszczalnik polimerów membranotwórczych) zanurza się w nierozpuszczalniku polimeru membranotwórczego tak dobranego, aby dobrze lub bardzo dobrze rozpuszczał rozpuszczalnik polimeru membranotwórczego. W rezultacie, po zanurzeniu mieszaniny membranotwórczej następuje wypłukiwanie rozpuszczalnika polimeru przez nierozpuszczalnik i wytrącanie struktury membrany. Metoda ta charakteryzuje się łatwością i prostotą wykonania.

W celu zwiększenia porowatości membran wykonanych metodą mokrej inwersji faz, modyfikuje się ją poprzez dodanie do roztworu polimeru substancji porotwórczej. Substancją taką mogą być odpowiednio rozdrobnione kryształki soli (US 5514378 A). Kryształki soli dają duże pory (makropory), lecz nieregularnie rozmieszczone. Dodatkowo pory utworzone przez kryształy soli nie są ze sobą bezpośrednio połączone, co wyklucza możliwość penetracji komórek od jednego do drugiego makropora. Ponadto istnieje ryzyko zalegania ich pozostałości w strukturze membrany.

Opisywane są także sposoby wykorzystania jako poroforu polimerów rozpuszczalnych w rozpuszczalniku poliestru oraz w jego nierozpuszczalniku. Polimerem takim może być poli(glikol etylenowy) (PEG) lub poliwinylpirolidon (PVP). Porofory polimerowe zwiększają porowatość rusztowania, jednak powstałe dzięki nim pory są stosunkowo małych rozmiarów (kilka μm). Tymczasem do wydajnego wzrostu komórek rusztowanie musi zawierać duże pory (o średnicy kilkudziesięciu μm), tak aby hodowane komórki zmieściły się w nich. Rozwiązanie tego problemu przedstawiono w opisie patentowym CN 102886068 A, gdzie otrzymano rusztowanie metodą elektroprzędzenia z mieszaniny PLGA/PVP. Po procesie przędzenia PVP usunięto ze struktury scaffoldu, rozpuszczając porofor w roztworze wodnym, co znacznie zwiększyło porowatość. Otrzymane tą metodą rusztowanie charakteryzowało się jednak dużą porowatością obu powierzchni, co niesie ryzyko wypadnięcia komórek z wnętrza scaffoldu. Bardziej pożądana jest obecność porów na jednej z powierzchni rusztowania, bowiem, po posianiu hodowli komórkowej na tę powierzchnię, komórki mogą swobodnie penetrować do wnętrza membrany (rusztowania 3D) i kolonizować całe wnętrze, a jednocześnie nie ma ryzyka wypadania komórek.

Znany jest także sposób otrzymywania szerokoporowatych membran do hodowli komórkowych (chondrocytów) wykonanych z polieterosulfonu. Zostały one opisane w patencie PL 211793 i polskim zgłoszeniu patentowym P-400288. W rozwiązaniach tych stabilnym elementem powstającej membrany był polieterosulfon lub polisulfon, a właściwym prekursorem makroporów zapewniającym powstanie struktury 3D – bibuła celulozowa, ulegająca wytrawieniu za pomocą roztworu kompleksu tetraaminomiedziowego. Wadą tego rozwiązania jest wymagany długi czas trawienia (kilka tygodni) oraz ograniczenie do polimerów membranotwórczych nie ulegających hydrolizie w roztworach rozpuszczających

celulozę (czyli do polisulfonów, polieterosulfonów oraz niektórych poliamidów i poliiimidów). Wyklucza to zastosowanie poliestrów jako materiału membranotwórczego.

Celem wynalazku było otrzymanie poliestrowych rusztowań komórkowych typu 3D w postaci membrany półprzepuszczalnej, o dużych, równomiernie rozmieszczonych porach, z możliwością kontrolowania ich wielkości i ułożenia.

Sposób otrzymywania szerokoporowatego, poliestrowego rusztowania komórkowego metodą mokrej inwersji faz według wynalazku polega na tym, że roztwór poliestru w rozpuszczalniku wylewa się na podkład, po czym układa się pierwszą warstwę włókniny polimerowej z polimeru nierozpuszczalnego w rozpuszczalniku poliestru, usuwa się powietrze za pomocą walcowania, wylewa się drugą warstwę roztworu poliestru i układa się drugą warstwę włókniny polimerowej, usuwa się powietrze za pomocą walcowania i proces ten ewentualnie powtarza się do uzyskania membrany o założonej grubości, przy czym ostatnią warstwę stanowi warstwa włókniny. Następnie tak przygotowany produkt poddaje się żelowaniu za pomocą nierozpuszczalnika poliestru, którym jest woda lub alkohol C₁-C₄. Proces żelowania prowadzi się w temperaturze poniżej 10°C, aby nie naruszyć struktury włókniny podczas formowania skafoldu. Korzystnie w etapie żelowania stosuje się nierozpuszczalnik poliestru, który jest jednocześnie rozpuszczalnikiem polimeru warstwy włókniny. W przypadku, gdy nierozpuszczalnikiem tego polimeru, po etapie żelowania prowadzi się kolejny etap mycia włókniny za pomocą jej rozpuszczalnika. Po usunięciu włókniny membranę suszy się do momentu usunięcia pozostałości rozpuszczalnika i nierozpuszczalnika.

Jako poliestry korzystnie stosuje się polilaktyd, polikaprolakton, poliglikolid oraz ich kopolimery. Do wytworzenia membrany korzystnie można użyć jednego polimeru, mieszaniny co najmniej dwóch polimerów, jednego polimeru o różnych masach molowych albo co najmniej dwóch polimerów o różnych masach molowych. Stężenie polimerów membranotwórczych korzystnie powinno wynosić od 3% do 23% wagowych roztworu polimer membranotwórczy/rozpuszczalnik, a stężenie opcjonalnych dodatków może wynosić od 0 do 150% masy polimeru/polimerów membranotwórczych.

Korzystnie jako rozpuszczalnik poliestru stosuje się chloroform, dichlorometan, 1,4-dioksan, aczkolwiek odpowiedni jest każdy rozpuszczalnik, który dobrze rozpuszcza poliestry. Po rozpuszczeniu poliestru do roztworu można ewentualnie dodać klasyczny porofor, na przykład poliwinylpirolidon, Pluronic®, czy poli(glikol etylenowy) oraz ewentualnie, środki hydrofilizujące.

Jako polimer tworzący włókninę korzystnie stosuje się poliwinylpirolidon, żelatynę, politlenek etylenu (glikol polietylenowy), polialkohol winylowy. Możliwe jest użycie różnych polimerów do kolejnych warstw włókniny.

Ilość mieszaniny membranotwórczej zawierającej poliestry musi być tak dobrana, aby całkowicie wypełnić włókninę i utworzyć cienkie warstwy pod i na włókninie. W ten sposób włóknina definiuje wielkość i liczbę porów w powstającej membranie. Po usunięciu (rozpuszczeniu) włókniny powstaje właściwa struktura 3D.

Włókninę polimerową użytą w sposobie według wynalazku można otrzymać dowolną znaną metodą, korzystnie metodą elektroprzędzenia.

W etapie żelowania nierozpuszczalnik poliestru dobiera się odpowiedni do użytego rozpuszczalnika poliestru. Jeżeli do rozpuszczenia poliestru używa się rozpuszczalników halogenowanych, najczęściej chlorowanych, to jako nierozpuszczalnik do inwersji faz stosuje się alkohol C₁-C₄, a w przypadku dioksanu czy tetrahydrofuranu jako nierozpuszczalnik stosuje się wodę. Wynika to z wzajemnej mieszalności i rozpuszczalności układu rozpuszczalnik-nierozpuszczalnik polimeru/polimerów membranotwórczych i pozostaje w zakresie wiedzy dostępnej specjalistom.

W sposobie według wynalazku prekursorem makroporów w polimerze lub mieszaninie polimerów membranotwórczych jest włóknina wykonana z polimeru nie ulegającego rozpuszczeniu w rozpuszczalniku polimeru membranotwórczego, natomiast rozpuszczającego się w jego nierozpuszczalniku używanym do otrzymywania membran w procesie mokrej inwersji faz. Włókniny te są wytwarzane w kontrolowanym procesie, np. elektroprzędzenia, co sprawia że charakteryzują się ściśle kontrolowaną morfologią porów i rozmiarem włókien. Tym samym, powstałe dzięki nim pory w membranie mają ściśle określoną strukturę, odpowiadającą morfologii włókniny. Zgodnie z wynalazkiem warstwy włókniny są umieszczone w taki sposób, że jeden fragment włókniny jest całkowicie nasycony i pokryty z obu stron mieszaniną membranotwórczą, dzięki czemu po obydwóch stronach membrany tworzą się warstwy naskórkowe. Umieszczenie na wierzchniej stronie pierwszej włókniny drugiego fragmentu powoduje powstanie makroporów na wierzchniej warstwie polimeru pokrywającego dolną włókninę.

Włókna tej drugiej warstwy „przecinają” powstałą na powierzchni warstwę naskórkową, tworząc makropory umożliwiające wnikanie komórek do wnętrza membrany – zapobiegając uformowaniu całkowicie jednolitej górnej warstwy naskórkowej. Druga powierzchnia dzięki warstwie naskórkowej pozostaje mikroporowata, co zapobiega „wypadnięciu” komórek z rusztowania.

Wynalazek według powyższego opisu rozwiązuje problemy, które występują we wcześniej cytowanych rozwiązaniach. Metoda zapewnia otrzymanie membran o dużych porach (kilkadziesiąt μm) oraz silnie porowatej tylko jednej z powierzchni. Ponadto, zastosowanie w proponowanym rozwiązaniu włókien wykonanych z polimerów ulegających rozpuszczeniu w rozpuszczalnikach użytych do koagulacji polimeru membranotwórczego umożliwia ich łatwe usunięcie ze struktury membrany.

Na rysunku (Fig. 1) przedstawiono zdjęcia SEM membrany polilaktydowej otrzymanej z użyciem jedynie poliwinylpirolidonu jako klasycznego poroforu, zgodnie z Przykładem 5, a na drugim rysunku (Fig. 2) przedstawiono zdjęcia SEM membrany polilaktydowej otrzymanej z dodatkiem włókniny polimerowej jako poroforu, zgodnie z Przykładem 2.

Zdjęcia przedstawiają obie powierzchnie oraz przełom (wnętrze) membrany. Można zauważyć, że w pierwszym przypadku (Fig. 1) obie powierzchnie mają nieliczne, małe pory. Wnętrze skafoldu wykazuje z kolei bardzo wysoką porowatość, lecz pory te są małych rozmiarów (kilka μm) oraz wzajemnie niepołączone. W przypadku membrany otrzymanej z dodatkiem włókniny jako prekursora porów, jedna z powierzchni jest praktycznie nieprzepuszczalna (brak porów), natomiast druga zawiera liczne, podłużne pory o wielkości kilkudziesięciu μm . Morfologia porów w przełomie membrany jest podobna do powierzchni II, co świadczy o braku warstwy naskórkowej. Należy również zauważyć, że pory te są wzajemnie ze sobą połączone, co jest niezwykle istotną cechą z punktu widzenia prowadzenia hodowli komórkowych, ponieważ zapewnia dopływ substancji odżywczych i odprowadzenie produktów metabolizmu komórek i degradacji polimeru membranotwórczego.

Sposób według wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach.

Przykład 1

Przygotowano roztwór poli-L-laktydu (PLLA) o M_n 86 kDa, poprzez rozpuszczenie 3,7 g PLLA w 100 ml dioksanu. Po całkowitym rozpuszczeniu PLLA, dodano 3,7 g PVP o M_w 10 kDa, otrzymując roztwór, w którym sumaryczne stężenie polimerów wynosi 9% wag. Roztwór schłodzono do temperatury 8°C, a następnie wylano na szklany podkład. Po wylaniu warstwy roztworu położono na nim włókninę z poliwinylpirolidonu o masie cząsteczkowej powyżej 100 kDa i usunięto powietrze przy pomocy wałka. Następnie wylano kolejną warstwę roztworu, na którą położono taką samą włókninę polimerową. Na koniec ponownie usunięto z uformowanej mieszaniny membranotwórczej powietrze. Membranę żelowano w wodzie o przewodności 18,2 $\text{M}\Omega\text{cm}$ z lodem (temperatura około 2°C). Po skoagulowaniu polimeru oraz rozpuszczeniu rozpuszczalnych w wodzie poroforów i włókien membranę wysuszono.

Przykład 2

Przygotowano roztwór poli-L-laktydu o M_n 86 kDa, poprzez rozpuszczenie 2,55 g PLLA w 100 ml chloroformu. Po całkowitym rozpuszczeniu PLLA, dodano 2,55 g PVP o M_w 10 kDa, otrzymując roztwór, w którym sumaryczne stężenie polimerów wynosi 9% wag. Roztwór schłodzono do temp. 8°C, a następnie wylano na szklany podkład. Po wylaniu warstwy roztworu położono na nim włókninę żelatynową i usunięto powietrze przy pomocy wałka. Następnie wylano kolejną warstwę roztworu, na którą położono taką samą włókninę. Na koniec ponownie usunięto z uformowanej mieszaniny membranotwórczej powietrze. Membranę żelowano w metanolu schłodzonym do temperatury -15°C. Po skoagulowaniu polimeru, membranę poddano kąpeli wodnej o temperaturze 40°C, w celu usunięcia żelatyny. Po usunięciu poroforów membranę wysuszono.

Przykład 3

Przygotowano roztwór terpoli-(L-laktydu-glikolid-kaprolakton) o M_n 68 kDa, poprzez rozpuszczenie 3,7 g terpolimeru w 100 ml dioksanu. Po całkowitym rozpuszczeniu, dodano 3,7 g PVP o M_w 10 kDa, otrzymując roztwór, w którym sumaryczne stężenie polimerów wynosi 9% wag. Roztwór schłodzono do temperatury 8°C, a następnie wylano na szklany podkład. Po wylaniu warstwy roztworu położono na nim włókninę PVP i usunięto powietrze przy pomocy wałka. Następnie wylano kolejną warstwę roztworu, na którą położono taką samą włókninę polimerową. Na koniec ponownie usunięto z uformowanej mieszaniny membranotwórczej powietrze. Membranę żelowano w wodzie o przewodności 18,2 $\text{M}\Omega\text{cm}$ z lodem (temperatura poniżej 4°C). Po skoagulowaniu polimeru oraz usunięciu poroforów membranę wysuszono.

Przykład 4

Przygotowano roztwór polikaprolaktonu o M_n 72 kDa, poprzez rozpuszczenie 2,55 g PLLA w 100 ml chloroformu. Po całkowitym rozpuszczeniu PLLA, dodano 2,55 g PVP o M_w 10 kDa, otrzymując roztwór, w którym sumaryczne stężenie polimerów wynosi 9% wag. Roztwór schłodzono do temp. 8°C, a następnie wylano na szklany podkład. Po wylaniu warstwy roztworu położono na nim włókninę żelatynową i usunięto powietrze przy pomocy wałka. Następnie wylano kolejną warstwę roztworu, na którą położono taką samą włókninę polimerową. Na koniec ponownie usunięto z uformowanej mieszaniny membranotwórczej powietrze. Membranę żelowano w metanolu schłodzonym do temperatury -10°C. Po skoagulowaniu polimeru, membranę poddano kąpeli wodnej o temperaturze 40°C, w celu usunięcia żelatyny. Po usunięciu poroforów membranę wysuszono.

Przykład 5, porównawczy.

Membrana otrzymana z udziałem tylko klasycznego poroforu.

Przygotowano roztwór poli-L-laktydu o M_n 86 kDa, poprzez rozpuszczenie 2,55 g PLLA w 100 ml chloroformu. Po całkowitym rozpuszczeniu PLLA, dodano 2,55 g PVP o M_w 10 kDa, otrzymując roztwór, w którym sumaryczne stężenie polimerów wynosi 9% wag. Roztwór wylano na szklany podkład. Po wylaniu roztworu membranę żelowano w metanolu w temperaturze pokojowej. Po skoagulowaniu i usunięciu poroforu membranę wysuszono. Membranę tę przedstawiono na Fig. 1.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania szerokoporowatego, poliestrowego rusztowania komórkowego metodą mokrej inwersji faz, **znamienny tym**, że roztwór poliestru w rozpuszczalniku wylewa się na podkładzie, po czym układa się pierwszą warstwę włókniny polimerowej z polimeru nierozpuszczalnego w rozpuszczalniku poliestru, usuwa się powietrze za pomocą walcowania, wylewa się drugą warstwę roztworu poliestru i układa się drugą warstwę włókniny polimerowej, usuwa się powietrze za pomocą walcowania i proces ten ewentualnie powtarza się do uzyskania membrany o założonej grubości, przy czym ostatnią warstwę stanowi warstwa włókniny, a następnie tak przygotowany produkt poddaje się żelowaniu za pomocą nierozpuszczalnika poliestru, którym jest woda lub alkohol C₁-C₄, a proces żelowania prowadzi się w temperaturze poniżej 10°C, przy czym, w przypadku gdy nierozpuszczalnik poliestru jest nierozpuszczalnikiem lub słabym rozpuszczalnikiem polimeru włókniny po etapie żelowania prowadzi się kolejny etap wymywania włókniny za pomocą jej rozpuszczalnika, zaś po usunięciu włókniny membranę suszy się do momentu usunięcia pozostałości rozpuszczalnika i nierozpuszczalnika.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako poliester stosuje się polilaktyd, polikaprolakton, poliglikolid oraz ich kopolimery.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się: jeden poliester, mieszaninę co najmniej dwóch poliestrów, jeden poliester o różnych masach molowych albo co najmniej dwa poliestry o różnych masach molowych.
4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stężenie poliestrów wynosi od 3% do 23% wag. roztworu poliestru/rozpuszczalnik.
5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako rozpuszczalnik poliestru stosuje się 1,4-dioksan, chloroform, dichlorometan i inne halogenowane rozpuszczalniki.
6. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że jako polimer tworzący włókninę stosuje się poliwinylpirolidon, żelatynę, politlenek etylenu (glikol polietylenowy), polialkohol winylowy.
7. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że do roztworu poliestru dodaje się klasyczny porofor.
8. Sposób według zastrz. 7, **znamienny tym**, że klasycznym poroforem jest poliwinylpirolidon, Pluronic, poli(glikol etylenowy) lub ich mieszanina.

Rysunki

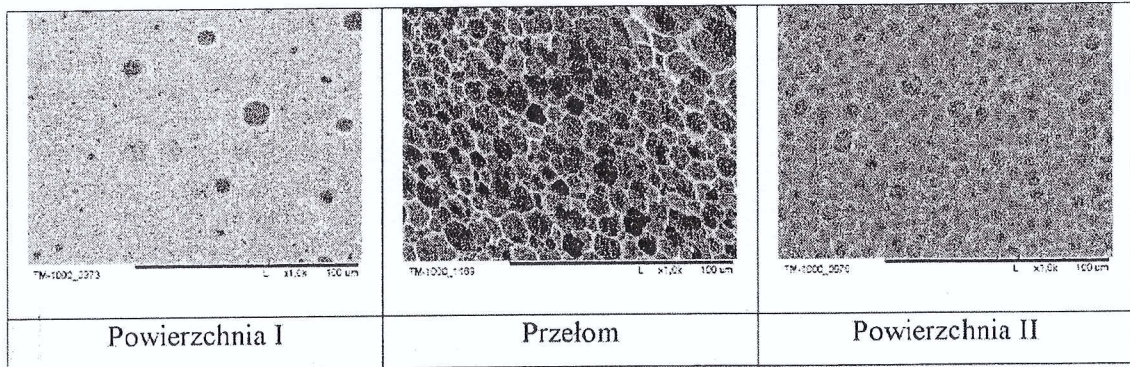


Fig. 1

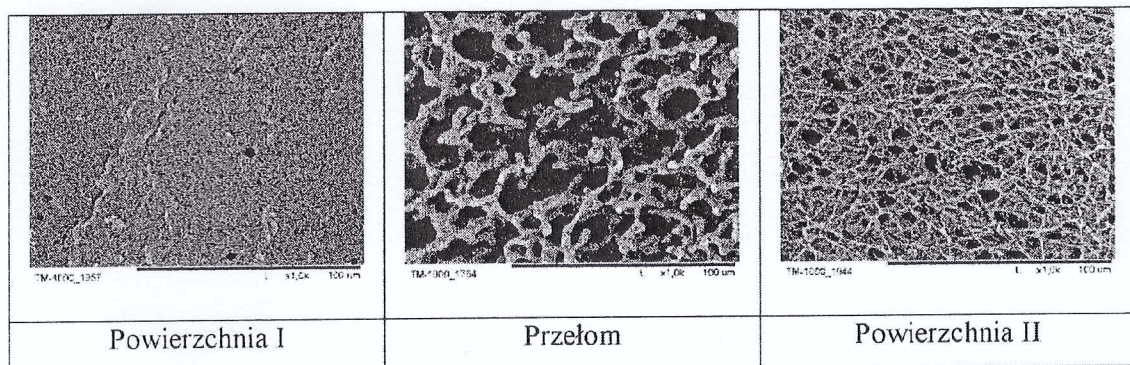


Fig 2